

ELİF YOSUNKAYA FENERCİ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2007

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

(DOKTORA TEZİ)

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞINDA
GENOTİP - FENOTİP İLİŞKİLERİ**

ELİF YOSUNKAYA FENERCİ

**DANIŞMAN
PROF.DR.A.NUR BUYRU**

**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK ORTAK
PROGRAMI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

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

24 / Temmuz / 2007

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Genetik AD
Tez Sahibi : Elif Yosunkaya Fenerci
Tez Başlığı : Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Genotip-Fenotip İlişkileri
Sınav Yeri : İÜ CTF Tıbbi Biyoloji AD
Sınav Tarihi : 18 / Temmuz / 2007

Tez Sınav Jürisi

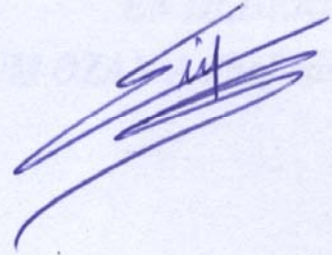
Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.A.Nur Buyru (Tez Danışmanı), İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Tıbbi Biyoloji ABD.
- 2.Prof.Dr.Turgut Umut (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Tıbbi Biyoloji ABD.
- 3.Prof.Dr.Nejat Dalay (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniv., Onkoloji Enst., Temel Onkoloji ABD.
- 4.Prof.Dr.Beyazıt Çirakoğlu, Marmara Üniv., Tıp Fak., Tıbbi Biyoloji ABD.
- 5.Doç.Dr.Özgür Kasapçopur, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD.

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 çalışmayla 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.

Elif Yosunkaya Fenerci (İmza)



İTHAF

*EN DEĞERLİM'E,
OĞLUM OZAN'A ithaf ediyorum*

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimden beri geçen 10 yılda, “deneyim” olarak klişeleştirebileceğim bahanenin, bana ve yaşantıma kattığı anlamlar adına, yalnızca hakedenlere teşekkür etmek istiyorum...

*En ümitsiz anlarda, ailevi sağlık problemlerimde, daima anlayışlı davranan, bölümsel bunalıtların çözümsüzlüklerinde, son noktada varlığını hissettirip, herşeye gülüp geçmemi öğütleyerek beni rahatlatan, yetki ve kişiliğiyle, kendimi onun başkanı olduğu anabilim dalında, uzman doktor olmaktan dolayı hep güvencede hissettiğim, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı, Sayın **Prof.Dr.Turgut Ulutin**’e,*

*İdealimdeki “hoca”ya “öğrenci”lik yapmamı sağlayan, Türkiye’de moleküler genetiğin en yetkinlerinden, asla dürüstlük ve doğru bildiğinden ayrılmayan, mesleki ve kişilik özelliklerini, kendime rol model aldığım, almamış olsam da, kapıldığım akışın beni sürüklediği noktalardaki yansımalarda, hep onun yaşamından izler bulduğum, herşeyden önemlisi, onunla çalışmıyor olsaydım, asla doktora yapmayı kabul etmeyeceğim, bana bilimsel anlamda öğrettiklerinin yanısıra yaşantıma kattığı prensiplerin de, hakkını asla ödeyemeyeceğim, benim için daima özel kalacak olan, gerçekten çok sevdiğim ve sonsuz saydığım, “danışmanım” **Prof.Dr.A. Nur Buyru**’ya, (if you would just assume that you would be free of me, you are in deep delusion, cause you are going to be my best life-long advisor and my friend!..)*

*Eğitimimin her aşamasında birçok dersine girdiğim, hekimliğini örnek aldığım, her fırsatta benimle övündüğünü dile getirip, çok mahcup eden, değerli hocam, sayın **Prof.Dr.Asım Cenani**’ye, yıllardır meslek yaşantımın farklı ortamlarında beraber bulunup, doktora sırasında derslerine, ilk kez “öğrenci” olarak girdiğim, tüm genetik programı hocalarına, mesleki deneyimlerini örneklerle anlattıklarında, bağımsız bir bilim kadını olmaya beni daha çok cesaretlendiren, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarına (sometimes, bad advertisements really works!..),*

*Yedi yıldır laboratuarda beraber çalıştığım, kimi zaman abla, kimi zaman en yakın arkadaşları olduğum, çalışmalarında sayısız katkıları olan, hepsini çok sevdiğimi bilen, **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik “takımı”**na, destek, içtenlik ve arkadaşlıklarını hep yanımda hissettiğim, Dr.Bio.Erdal İnce, Çiğdem Sirek, Sibel Koç başta olmak üzere, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda görevli akademisyen ve personel arasında, ismini burada sayamasam da, benim için değerli olduğunu hissettirmeye çalıştığım herkese; “Kardeş”lik duygularını, birbirimizde bulduğumuz, yürekten ve yıkılmayacak bir güvenle birbirimizi sevdiğimiz, dostluk gücünü, kariyer basamaklarında, birbirimizi desteklemek adına sınırsızca ve içtenlikle, her tür çıkar düşüncelerinden arınmış bir halde, bilimsel verimlere döktüğümüz, canım dostum, **Dr. Tıb. Bio. Gülgün Güven**’e; Onu daha iyi tanıma ve kalbinde sakladığı pırlantanın ışığını görme şansına ulaştığımdan beri, hep yanımda olan, İstanbul trafiğinde yaşadığımız bilimsel beyin fırtınalarındaki ortağım, daima ileriye yürümem için hep destekleyen, ümitsizliğe düştüğüm anlarda beni kendime getiren, herkesin sahip olması gereken bir dost, çok nadide insan, **Doç.Dr. İlhan Onaran**’a,*

Yıllardır aynı bölümde olmamıza rağmen, kaderin garip bir cilvesiyle! masa komşusu olmamız üzerine, birbirimizi tanıdığımız, tanıyıp anladıkça karşılıklı sarsılmaz bir güven ve saygı çerçevesinde, çok güzel bir dostluk kurduğumuz, varlığı, bilgi ve birikimiyle, sadece tezimde değil, birçok zor durumumda imdadıma yetişen, çok yakın gelecekte doçent olarak görmekten çok büyük gurur ve mutluluk duyacağım, çok saydığım, takdir ettiğim, hep güveneceğim ve en gerçek dostlarımdan biri, **Dr.Tıb.Bio.Ahmet Özaydın**'a,

Son olarak, canım aileme...Baba, bana çocukken dediklerini, birer birer yerine getirebiliyor muyum? Sana sözcüklerle dile getiremediklerimi, senin hissettiğini biliyorum. Ömrüm boyunca hep övüneceğin bir evlat olmaya gayret edeceğimi bil. Ağır bedeller ödemene rağmen, yaşayamadığın mesleki ideallerini, ben senin adına elde etmeye kesin kararlıyım, ve senin bunu “bir şekilde” göreceğine söz veriyorum. Senin kızın olduğum, senden aldığım başta inatçılık, dürüstlük gibi huylar için, çok sevdiğim, babam **Op.Dr.Erer Yosunkaya**'ya...Anne, sen olmasan, ben hiçbir anlamda “ben” olmazdım...Senin benim için yaptığın fedakarlıklar satırlara sığamaz ki, benim yüzümden saçına düşen her bir ak tel, beraber yaşadığımız acı-tatlı yılların izlerini o güzel yüzüne taşıyan incecik çizgilerin ve bütün ömrünü bana harcadığın için...Bana hayatın anlamını aşıladığın, en faziletli huyları edinmemi sağladığın, kısaca benim annem olduğun için, canımdan çok sevdiğim, biricik annem, **Jin.Op.Dr.Meral Yosunkaya**'ya...Tezler arası 10 seneyi devirdiğimiz evliliğimizin her anında, bana devamlı sevgini, bağlılığını, güvenini, desteğini hissettirdiğin, yıkılır gibi olduğum olaylarda hiç kimsenin aklına gelmeyecek önerilerle beni kendime getirdiğin, yanımda kimsenin bulunmadığı anlarda, hep sen olduğun ve olacağın, ilerlediğim kariyer basamaklarında beni hep yüreklendirdiğin, herkesten çok farklı da gözükse, yüreğinin içini bildiğim, herşeyden önemlisi vicdanın için, seninle beraber yaşlanmakta olduğumuz, çocuğumuzla kurduğumuz ailede bizi hep mutlu ettiğin için, sevgilim, eşim **Özhan Fenerci**'ye; Ve herkesten, herşeyden önce, nefesimin, kalp çarpıntımın, damarımdaki kanımın en özü, biricik oğlum, dünyalar tatlısı, Ozan'ım, anneciğim, seni herkes ve herşeyden çok sevdiğimi, ileride sen de tezinin teşekkür yazısında çocuklarının adını geçirirken anlayacaksın...Son bir iki aydır, seninle doya doya oynayamadık, özür dilerim yavrurum...Ama akşamları seni kucağımda uyuturken, saçlarını okşamayı, gözlerini gözlerime kenetleyerek uykuya dalışını, hiç aksatmadım değil mi bebeğim...Sen, yedi yıllık doktora çalışmalarım arasında hayatıma giren en önemli hediyesin, ve ömrümün en anlamlı ışığısın...Canım Ozan'ım, geçen akşam tezimi bilgisayarda yazarken, kucağıma çıkıp, ellerimi tutuşun, klavyenin üzerine koydurup, başını “Sen çalış anneciğim, ben sadece senin sıcaklığını istiyorum, özledim” dercesine göğsüme yasladığında; ben yazarken, sen kucağımda kan ter içinde, mutlu bir gülümsemeyle uyuyarak, bana verdiğin o eşsiz huzur için, sana, herşeyime, gururum, biricik değerli oğlum, **Ozan**'ıma,

Kalbimin en derinlerinden gelen ve sözcüklere sığdırmaya çalıştığımdan çok daha yoğun teşekkürlerimi sunuyorum...Biriniz bile eksik olsaydınız, aynı yap-boz parçaları gibi, ne bu doktora biter, ne bu tez tamamlanırdı...(22-Haziran-2007)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİİİ
ÖZET.....	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklarla İlişkili İnflamasyon Fizyopatolojisi.....	3
2.1.1. Doğal Bağışıklık Sistemde Görevli Moleküller Ve İşlevleri.....	3
2.1.1.1. Bağışıklık Yanıtını Başlatan Tetikleyici Molekül: PAMP.....	3
2.1.1.2. PAMP'ları Karşıl原因 Moleküller: PRM Veya PRR'ler.....	4
2.1.1.3. İlk Tanımlanan PRM'ler: TLR Ve İşlevleri.....	5
2.1.1.4. TLR'lerin Hücre İçi Akıbaları: NLR Moleküller Ve İşlevleri.....	6
2.1.1.5. NLR Örnekleri: NOD, NALP, CATERPİLLER Proteinler Ve Yapılarındaki NACHT, LRR Ve CARD Alanları.....	7
2.1.1.6. CARD Alanı.....	8
2.1.1.7. İnflamasyon Ve Apoptozun Kesişim Noktasında Önemli Bir Molekül: NFκB.....	9
2.1.1.8. İnflamasyon Başrol Kahramanı: İnterlökin 1β.....	10
2.1.2. İnflamasyon Olgunlaşma Döneminde Görevli Önemli Bir Yapı: İnflamazom.....	11
2.1.2.1. Kapsamlarındaki Moleküllere Göre Tanımlanan Çeşitli İnflamazomlar.....	11
2.1.2.2. İnflamazom İçinde Bir Köprü: ASC.....	12
2.1.2.3. İnflamazomun Etkinleşmesi.....	13
2.2. Otoinflamatuvar Hastalıklar.....	14
2.2.1. Otoinflamatuvar Hastalıkların Oluşumundan Sorumlu Mekanizma.....	16
2.2.2. Otoinflamatuvar Hastalıkların Prototipi: Ailevi Akdeniz Ateşi.....	16
2.2.2.1. AAA Klinik Tablosu: Ataklarda Sık Karşılaşılan Bulgular Ve Hastalığın Önemli Komplikasyonları.....	17
2.2.2.2. AAA Tanısı Nasıl Konmalı: Klinik Değerlendirme Mi, Moleküler Test Mi?.....	19
2.2.2.3. AAA Tedavisinde Kolşisin.....	21
2.2.2.4. AAA Etyolojisinde MEFV Geni Ve Mutasyonları.....	24

2.2.2.5. MEFV Gen İfadesi.....	26
2.2.2.6. MEFV Gen Ürünü: Pirin Proteininin Yapısı Ve Sık Rastlanan Mutasyonların Etkilediği Alanlar	27
2.2.2.7. Pirin Proteininin Hücre İçi Yerleşimi	28
2.2.2.8. Pirin Proteini İşlevleri Ve Yapısında PİRİN Alanı Bulunan Başka Proteinlerle Olan Etkileşimler	28
2.2.3. Üç Sendromdan Oluşan Otoinflatuar Hastalık Grubu: Kriyopirinopatiler	29
2.2.3.1. Kriyopirinopatilerin Klinik Tablosunda Sık Karşılaşılan Bulgular	29
2.2.3.2. Kriyopirinopatilerin Tedavisi	31
2.2.3.3. Kriyopirinopati Etiyolojisinde CIAS1 Geni Ve Mutasyonları	31
2.2.3.4. CIAS1 Gen İfadesi Sonucu Oluşan Kriyopirin Proteininin Yapısı Ve Hücre İçi Yerleşimi.....	33
2.2.3.5. CIAS1 Gen Mutasyonlarının Kriyopirin Proteininde Etkilediği Alanlar Ve Bunların Fenotipe Yansıması.....	34
2.2.4. Pirin Ve Kriyopirin Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Sonuçları.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. GEREÇ	37
3.1.1. Çalışma Ve Kontrol Grubu	37
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	37
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde Ve Malzemeler	38
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Ve çözeltiler.....	39
3.1.4.1. Polimeraz Zincir Tepkimesinde (PZR) Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler	39
3.1.4.2. Agaroz Jel Elektforezinde Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler.....	39
3.1.4.3. Restriksiyon Enzim Kesiminde Kullanılan Endonükleaz Ve Tampon Çözeltiler.....	40
3.1.4.4. PZR-RFLP Ve DNA Dizilemesi Yöntemlerinde Kullanılacak Primer Dizileri	41
3.1.5. Demografik Ve Klinik Bilgilerinin Kaydedilmesi Ve İncelemede Kullanılan Bilgisayar Donanımları.....	42
3.2. YÖNTEM	42
3.2.1. CIAS1 Mutasyonlarının İncelenmesinde Kullanılan PZR Yöntemi.....	43
3.2.2. CIAS1 Mutasyonlarının İncelenmesinde Kullanılan RFLP Yöntemi	45
3.2.3. CIAS1 Mutasyonlarının Agaroz Jel Elektforeziyle İncelenmesi	46
3.2.4. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilemesinin İlk Aşamasındaki Kullanılan PZR Yöntemi	47
3.2.5. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilenmesinde Kullanılan PZR Ürünü Saflaştırması İçin Kullanılan Yöntem.....	48
3.2.6. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucunun Dizilenmesinde Kullanılan Döngü Dizileme PZR Yöntemi	48
3.2.7. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilenmesinde Kullanılan Döngü Dizileme PZR Sonrası NaAc Saflaştırma Yöntemi.....	49
3.2.8. Saflaştırılmış PZR Ürününün Otomatik Dizileme Cihazına Yüklenmesi	49
3.2.9. Hastalarda Genotip-Fenotip İlişkisinin İncelenmesi Amacıyla Hazırlanan Klinik Sorgulama Belgesinin Oluşturulması	49
3.2.10. İstatiksel Değerlendirme	51
4. BULGULAR.....	52

4.1. Çalışma Grubunun Oluşum Şekli	52
4.2. Çalışma Grubundakilerin Başvuru Nedenleri.....	52
4.3. MEFV Mutasyonu İnceleme Sonuçları	52
4.4. MEFV Mutasyonu Sonuçlarının Tel-Hashomer Klinik Tanı Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi.....	54
4.5. Çalışma Grubundakilerin Demografik Özellikleri	55
4.6. Yakınmaları Olanların Atak Özellikleri	58
4.6.1. Atak Sıklığı	58
4.6.2. Atak Süresi.....	60
4.7. Atak Sıklık Ve Ağırliğini Etkileyen Durumlar.....	60
4.8. Çalışma Grubundakilerin Yakınmaları	62
4.9. Çalışma Grubundakilerin Biyokimyasal Ve Hematolojik Laboratuvar Sonuçları	63
4.10. Çalışma Grubundakilerin İlaç Kullanımı.....	65
4.10.1. Kolşisin Başlama Zamanı	66
4.10.2. Kolşisin Kullanımına Uyum	66
4.10.3. Kolşisin Tedavisine Yanıt.....	66
4.11. CIAS1 Geni Mutasyon Sonuçları	68
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	85
FORMLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	101
TEBLİĞLER:.....	103
SERTİFİKALAR	105

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: TLR'ler ve ligandları.....	6
Tablo 2-2: Otoinflamatuvar hastalıklar.....	14
Tablo 2-3: Tel Hashomer kriterleri tanı = 2 major veya 1 major + 2 minör; Olası tanı = 1 major + 1 minör)	(Kesin 20
Tablo 2-4: Klinik olarak AAA ile ilişkilendirilmiş MEFV mutasyonlarının gen yerleşimleri (Not: 27 Haziran 2007 itibariyle INFEVERS veri tabanından elde edilmiştir).....	20
Tablo 3-1: PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.....	41
Tablo 3-2: DNA dizilemesinde kullanılan primer dizileri	41
Tablo 4-1: MEFV mutasyonuna göre genotiplerin dağılımı	53
Tablo 4-2: MEFV mutasyon taşıyıcılarının Tel-Hashomer kriterlerine göre değerlendirmesi ..	54
Tablo 4-3: Tel-Hashomer kriterleri ile M694V/M694V genotip bağlantısı.....	55
Tablo 4-4: Cinsiyet ile MEFV gen mutasyonu bağlantısı.....	55
Tablo 4-5: Cinsiyet ile -/V726A genotip bağlantısı	55
Tablo 4-6: Cinsiyet ile M694V/V726A genotip bağlantısı	56
Tablo 4-7: Yaş ile MEFV gen mutasyonu bağlantısı	56
Tablo 4-8: Bölge ile -/V726A genotip arası bağlantı	58
Tablo 4-9: Çalışma grubundakilerin cinsiyetlerine göre bölgesel kökenleri.....	59
Tablo 4-10: Ebeveyn akrabalığı ile MEFV mutasyonu arası bağlantı.....	59
Tablo 4-11: Atak sıklığına göre genotip dağılımı	61
Tablo 4-12: Atak süresinin genotiplere göre dağılımı	61
Tablo 4-13: Atak etkilenmesi ile MEFV mutasyonu arasındaki bağlantı	62
Tablo 4-14: Başlıca yakınmaların genotipe göre dağılımı	63
Tablo 4-15 : Yaş ile artrit arasındaki bağlantı	63
Tablo 4-16: İstatistiksel olarak anlamlı genotip-fenotip bağlantıları	64
Tablo 4-17: İstatistiksel olarak anlamlı laboratuvar bulguları ile genotip bağlantıları.....	64
Tablo 4-18: İlaç kullanımı ve -/M694V genotipi arasındaki bağlantı	65
Tablo 4-19: İlaç kullanımı ve M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı.....	65
Tablo 4-20: İlaç kullanım uyumu ile M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı	66
Tablo 4-21: MEFV mutasyonu ile Kolşisin kullanımının değerlendirilmesi	67
Tablo 4-22: Kolşisin kullananların genotip dağılımlarına göre tedaviye verilen yanıt	67
Tablo 4-23: Kolşisin'e olumlu yanıt verenlerdeki artrit yakınması ile M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı.....	68
Tablo 4-24: L307P heterozigotların MEFV genotip ve klinik bulguları	70
Tablo 4-25: CIAS1 mutasyonları ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunan parametreler....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mikrop, PAMP, tehlike sinyali varlığında NLR etkinleşmesi-Fritz (2006)'dan	4
Şekil 2-2: Toll-benzeri almaçların yapısı – Beutler (2004a)'dan.....	5
Şekil 2-3: CATERPİLLER proteinlerinin yapısı – Ting (2006)'dan	7
Şekil 2-4: Alıcı ve uyarlayıcı moleküllerin CARD, PİRİN ve TIR bölgelerine göre düzenlenmesi – Werts (2006)'dan.....	8
Şekil 2-5: CARD alanı bulunan proteinler – Bouchier Hayes (2002)'den.....	9
Şekil 2-6: Apoptoz ve NFκB'ya bağlı gen yazılımı oluşumu – Bouchier Hayes (2002)'den	10
Şekil 2-7: IL-1β'nın kriyopirin/NALP3 inflamazomuyla etkinleşmesi – Kastner (2005)'den...	11
Şekil 2-8: NALP3 inflamazomun yapısı – Ferrero (2006)'dan	12
Şekil 2-9: ASC'nin PİRİN alanı – Liepinsh (2003)'den	12
Şekil 2-10: Kaspaz1 inflamazomunun etkinleşmesi ve IL-1β salınımı için iki ayrı hücre dışı sinyal gerekir – Mariathasan (2007)'den	13
Şekil 2-11: Otoinflamatuvar hastalıkların algoritmik tanısı – Samuels (2006)'dan.....	15
Şekil 2-12: INFEVERS veri tabanı - http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/ (28 Haziran 2007 verileri).....	16
Şekil 2-13: Erizipel benzeri eritem – Tunca (2005)'den.....	17
Şekil 2-14: Böbrek amiloidozunda masif glomerüler tutulum histolojik görüntü – Aldea (2004)'ten	18
Şekil 2-15: Colchicum autumnale bitkisi ve Kolşisin'in kimyasal yapısı – Cerquaglia (2005)'ten	21
Şekil 2-16: 16 kromozomda MEFV geninin bulunduğu bant.....	24
Şekil 2-17 MEFV geninde sık rastlanan mutasyonlar – Moutereau (2004)'ten	24
Şekil 2-18: Çeşitli dokularda MEFV gen ifadesi (sırasıyla: kalp, böbrek, dalak, karaciğer, akciğer, ince barsak, kas, prostat, over) – Tidow (2000)'den.....	26
Şekil 2-19: Pirin proteinin temel yapısı ve proteini oluşturan alanlar	27
Şekil 2-20: MEFV mutasyonlarının protein yapısını etkilediği bölgeler – Chae (2006)'dan	27
Şekil 2-21: Pirinin hücre içi yeri, mutasyonlara göre yer değişimi – Mansfield (2001)'den	28
Şekil 2-22: CINCA sendromu, klinik, histolojik ve radyografik belirtileri – Aksentijevich (2002)'den	30
Şekil 2-23: CIAS1 geni ekson ve intron yapısı. Kutucuklar eksonları göstermektedir. 3-5. eksonlar ile 5-7. eksonların üstündeki noktalı çizgiyle gösterilen kısımlar, alternatif kırılma bölgelerini göstermektedir. Bu kırılmalar sonucu oluşan kısa transkript (719 aa) ve uzun transkript (922 aa) altta gösterilmiştir – Aganna (2002)'den.....	32
Şekil 2-24: Kriyopirinopatilerle ilişkilendirilen CIAS1 gen mutasyonları – McDermott (2002)'den	32
Şekil 2-25: Kriyopirin proteininin üç boyutlu yapısı ve sık gözlenen mutasyonlar – Neven (2004)'den	33
Şekil 2-26: 1035 amino asitten oluşan kriyopirin proteini ve yapısındaki alanlar – Aganna (2002)'den	34
Şekil 2-27: Amino ucunda PYD alanı olan proteinler, ASC ile etkileşimleri sonucu inflamasyonu düzenlerler – McDermott (2002)'den	36
Şekil 4-1: V734G ve R761H mutasyonları bulunan kompleks allelin DNA dizisi.....	52
Şekil 4-2: Çalışma grubunda MEFV mutasyonu bulunanların dağılımları.....	53
Şekil 4-3: Çalışma grubundakilerin cinsiyet ve yaş dağılımları	57
Şekil 4-4: Çalışma grubundakilerin bölgelere göre dağılımı.....	57
Şekil 4-5: Atak sıklığına göre dağılım	59
Şekil 4-6: Çalışma grubunun Kolşisin kullanımı	67

- Şekil 4-7: V200M mutasyonu %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 3. kuyucuklarda restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnekler. 2. kuyucuk mutasyon bulunmayan örnek, 4. kuyucuk heterozigot mutasyon taşıyıcısı, DNA belirtgeci: 100 bç 69
- Şekil 4-8: L307P mutasyonu %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 3, 7, 9. kuyucuklarda restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnekler. 2, 6, 8. kuyucuklar mutasyon bulunmayan örnekler, 4. kuyucuk heterozigot mutasyon taşıyıcısı, DNA belirtgeci: 100 bç 69
- Şekil 4-9: R262W mutasyonu %3 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 2. kuyucukta restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnek, 1, 4 ve 5. kuyucuklar restriksiyon enzim kesimi uygulanmış, mutasyon bulunmayan örnekler, DNA belirtgeci: 100 bç..... 69

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH (Adreno Cortico Trophic Hormone): Adrenokortikotrop hormon

AAA (Ailevi Akdeniz Ateşi)

Alu (Arthrobacter luteus)

ASC (Apoptosis associated Speck like protein with a Caspase recruitment domain): Kaspaz çekim alanı olan apoptozla ilişkili benek benzeri protein

Bcl10 (B-cell BLL/lenfoma): B hücreli lenfoma

CAPS (Cryopyrin Associated Periodic Syndromes): Kriyopirinle ilişkili periyodik sendrom

CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain): Kaspaz etkinleştirme ve çekim alanı

CATERPILLER (CARD, Transcription Enhancer, R (purine) binding, PyrIn, Lots of LEucine Repeats): CARD, Yazılım zenginleştirici, Pürin bağlayıcı, Pirin, Birçok lösün tekrarları

CIAS (Cold Induced Autoinflammatory Syndrome): Soğukla indüklenen otoinflamatuvar sendrom

CIITA (Class II TransActivator): II. Sınıf çapraz etkinleştirici

CINCA (Chronic Infantile Neurologic Cutaneous Articular syndrome): Kronik infantil nörolojik kutanöz artiküler sendrom

CRP (C Reactive Protein): C Reaktif Protein

CYP (Cytochrome P450): Sitokrom p450

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis): Denatüre edici gradyen jel elektroforezi

DMSO (DiMethyl SulfOxide): Dimetil sulfoksit

EtBr (Etidyum Bromür): Etidyum bromür

EtOH (Ethyl Alcohol): Etil alkol

FCAS (Familial Cold Autoinflammatory Syndrome): Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom

GFR (Glomerular Filtration Rate): Glomerüler filtrasyon oranı

HIDS (Hyper-IgD and periodic fever Syndrome): Hiper IgD ve periyodik ateş sendromu

Hsp (Haemophilus species)

- IKK (I Kappa B Kinase):** I Kappa B kinaz
- NEMO (NFκB Essential Modulator):** NFκB esas düzenleyici
- IL (InterLeukin):** İnterlökin
- IPAF (ICE Protease Activating Factor):** ICE Proteaz etkinleştirici etmen
- IkB (Inhibitor of NFκB):** NFκB baskılayıcısı
- Caspase (Cysteine aspartic acid specific proteases):** Sistein aspartik asit özgü proteaz
- LPS (Lipo Poly Saccharide):** Lipopolisakkarit
- LRR (Leucine Rich Repeat):** Lösinden zengin tekrar
- MDA (Melanoma Differentiation Associated gene):** Melanom farklılaşmasıyla ilişkili gen
- MEFV (MEditerranean FEver):** Akdeniz Ateşi
- MICA (Major histocompatibility complex class I Chain-related gene A):** Büyük doku uyum karmaşım, sınıf I zinciriyle ilişkili A geni
- MWS (Muckle-Wells Syndrome):** Muckle Wells sendromu
- NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, TP1)**
- NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein):** Nöronal Apoptoz baskılayıcı protein
- NALP (NACHT, LRR, PIRIN)**
- NFκB (Nuclear Factor κ Beta):** Çekirdek etmeni kappa beta
- NIRCA (NonIsotopic Rnase Cleavage Assay):** İzotopik olmayan RNAz ayrılma yöntemi
- NLR (Nod Like Receptor):** Nod benzeri almaç
- NOD (Nucleotide binding Oligomerization Domain):** Nükleotid bağlayıcı oligomerleşme alanı
- NOMID (Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease):** Yenidoğan başlangıçlı çoklu sistem inflamatuvar hastalık
- OD (Optical Density):** Optik yoğunluk
- PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns):** Patojenle ilişkili moleküler örüntüler
- PRM (Pattern Recognition Molecules):** Model tanıyıcı moleküller
- PRR (Pattern Recognition Receptors):** Örüntü tanıyıcı almaçlar
- PYPAF (PYrin containing APAF-1 like protein):** Pirin içeren Apaf-1 benzeri protein
- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi

RIG (Retinoid Inducible Gene): Retinoidle indüklenebilen gen

SAA (Serum Amyloid A): Serum amiloid A

SNP (Single Nucleotide Polymorphism): Tek nükleotid polimorfizmi

SPRY (SP1A kinase and RYanodine): SP1A kinaz ve ryanodin

SSRI (Selective Serotonin Receptor uptake Inhibitors): Seçici serotonin almaç geri alım baskılayıcıları

***Taq* (Thermophilus *aquaticus*)**

TIR (Toll Interleukin Receptor): Toll interlökin almaç

TLR (Toll Like Receptors): Toll benzeri almaçlar

TNF (Tumor Necrosis Factor): Tümör nekroz etmeni

TNFRSF (TNF Receptor Super Family): TNF almaç üst ailesi

TP (Telomerase-associated Protein): Telomerazla ilişkili protein

TRAPS (TNF Receptor Associated Periodic Syndrome): TNF almacıyla ilişkili periyodik sendrom

ÖZET

Fenerci, E.Y. (2007). Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında genotip fenotip ilişkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Türk toplumunda sık gözlenen, Ailevi Akdeniz Ateşi, akut serözit bulgularının bulunduğu, kısa süreli ataklarla seyreden bir hastalıktır. Atakların sıklık, süre gibi özellikleri ile gözlenen klinik bulgular, hastalar ve aynı hastanın atakları arasında değişkenlik gösterir. MEFV genotipinin yanı sıra, çevresel etmen, epigenetik mekanizma veya değiştirici rolü olan başka genlerin, hastalık fenotipine etki ettiği ileri sürülmüştür. Hastalık tablosuna hakim olan belirtiler, inflamasyon zincirindeki problemlerden kaynaklanmaktadır. MEFV gen mutasyonları sonucu oluşan anormal pirinin, kriyopirin işlevini baskılamadığı ve inflamasyonu tetiklediği anlaşılmıştır.

Çalışmamız kapsamında, MEFV gen mutasyonlarının incelenmesi için gönderilen 192 kişinin genotipleriyle, fenotipik özellikleri arasındaki bağlantı ve kriyopirinopatilerden sorumlu, CIAS1 gen mutasyonlarını araştırmayı amaçladık.

Rutin çalışılan MEFV gen mutasyonları dışında, MEFV geninin 10. ekson 5' ucunun dizilemesi yapılarak, başka dizi varyantlarının varlığı da incelendi. Bir hastada, MEFV gen mutasyonlarının toplandığı veri tabanında bulunmayan, yeni V734G dizi varyantı bulundu. Ayrıca, 6 MEFV mutasyon taşıyıcısının, CIAS1 geninde PZR-RFLP yöntemiyle V200M ve L307P mutasyonları belirlendi.

Çalışma grubundakilerin, MEFV ve CIAS1 genotipleriyle, demografik, klinik ve laboratuvar bulgularından oluşan fenotipleri karşılaştırıldığında, 30 kadar parametre ile çeşitli mutasyonlar arasında, istatistiksel olarak anlamlı bağlantılar kuruldu.

Çalışmamızın sonucunda, tek gen kalıtımı göstermesine rağmen, AAA tablosunda yalnızca MEFV gen mutasyonlarının değil, başka etmenlerin de rol oynadığı görüşünü destekleyen veriler elde edildi. Bundan hareketle- iddialı bir görüş olmakla beraber- klasik Mendelyen kalıtıma farklı bir bakış açısı getirilebilir. AAA hastalığında CIAS1 mutasyonları gibi, eğer beklenmedik farklı gen mutasyonları, ilişkilendirilmedikleri otoinflamatuvar hastalıkların fenotipine etki ediyorsa, fenotip-genotip ilişkilendirmelerini basite indirgeyen eski inanışlardan uzaklaşılması ve bu tip bağlantı çalışmalarına yeni boyutlar kazandırılması yerinde olacaktır.

Anahtar Kelimeler : Ailevi Akdeniz Ateşi, pirin, MEFV, CIAS1, kriyopirin

ABSTRACT

Fenerci, E.Y. (2007). Genotype phenotype correlations in Familial Mediterranean Fever. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Doktora Tezi. İstanbul.

Familial Mediterranean Fever, a common disease in Turkey, is characterized by short lasting acute serositic attacks. The frequency and duration of attacks and accompanying clinical features vary among patients and between the attacks of a patient. It is suggested that the phenotype is both affected by the genotype, and environmental factors, epigenetic mechanisms and other modifying genes. Symptoms are based on inflammation cascade problems. It is understood that abnormal pyrin, resulting from MEFV gene mutations, wouldn't inhibit cryopyrin's effect, so inflammation is triggered.

In this study, we planned to examine the genotype-phenotype correlations and CIAS1 gene mutations responsible from cryopyrinopathies in 192 people, referred for MEFV mutation investigations. Additionally, sequencing of the 5' end of the 10th exon of the MEFV gene was performed. A novel V734G variant was identified in a person. Also, using PCR-RFLP, we detected V200M and L307P mutations of the CIAS1 gene in six people carrying MEFV mutations. The evaluation of the MEFV and CIAS1 genotypes, together with the phenotypes consisting of demographical, clinical and laboratory findings, resulted in statistically significant correlations between approximately 30 parameters and various mutations.

In conclusion, our data supports the view that a number of factors other than MEFV gene mutations play important roles in the clinical picture of FMF. If different mutations in unassociated genes, such as CIAS1 mutations in FMF, affect phenotypes of autoinflammatory disorders, it would make sense that we should leave old beliefs simplifying genotype-phenotype correlations, instead add new dimensions for these kinds of association studies.

Key Words: Familial Mediterranean fever, pyrin, MEFV, CIAS1, cryopyrinopathies

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), otoinflamatuvar hastalıklar arasında en sık tanı konan, otozomal çekinik kalıtım modeli bulunan genetik bir hastalıktır. Dönüşümlü olarak tekrarlayan ateş ve tipik serozit bulgularıyla seyreden hastalıkta, atak sıklıklarının azaltılması ve hastalığın ölümcül komplikasyonu olan amiloidoz gelişiminin engellenmesi için, erken tanı konup, tedaviye başlanması çok önemlidir. Bu hastalık, başlıca Türk, Arap, Ermeni, Musevi ve diğer Akdeniz kökenli etnik gruplarda görülmektedir.

AAA'nin temel bulguları, ateş ataklarına eşlik eden karın, yan ve eklem ağrısı ile ciltte ağırlı kızamık alanlardır. Bu belirtiler, herhangi bir infeksiyon ya da başka neden olmaksızın gelişen, inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkar. Genel ateş ise, inflamasyona yanıt olarak gelişir ve doğal bağışıklık sisteminin tetiklendiğini gösterir.

Hastalık belirtileri, genellikle yirmili yaşlara kadar ortaya çıkmaktadır. Hastalar, bazen klasik bulgular gözlenmeden, gelişen böbrek amiloidozundan kaynaklanan yakınmalarla hekime başvurmaktadır. Ayrıca AAA tanısı konmadan, gelişen akut batın tablosu nedeniyle, araştırma amaçlı batın ameliyatı geçiren hasta sayısı da oldukça fazladır. Tanıyı güçleştiren başlıca etmen, yakınmaların hastalığa özgü olmamasıdır. Gecikmiş tanı, gereksiz tıbbi/cerrahi tedavilere yol açarak masraflı, invazif ve komplikasyonlara açık durumlara neden olmanın yanısıra, amiloidoz gelişimine de zemin hazırlamaktadır.

Hastalıkla ilgili yakınmaların azaltılması, hatta çoğu zaman giderilmesi, uygulaması kolay ve ekonomik olan, Kolşisin içeren ilaçların sürekli ve ömür boyu kullanımıyla mümkündür. Düzenli ilaç kullanımı, atak şiddet ve sıklığını azaltır; ayrıca amiloidoz gelişimini de engeller. Kolşisin etkisini, hücre bölünmesini engelleyerek gösterir. AAA'da başarıyla kullanılan bu maddenin, ciddi yan etkileri de bulunmaktadır. En sık rastlananlar, diyare, karın ağrısı, saç dökülmesi şeklinde, subakut toksik etkilerdir. Bu nedenle, kesin tanı konmadan Kolşisin kullanımı, güvenli olmamaktadır.

AAA hastalığından sorumlu gen, MEFV (**ME**diterranean **Fe**Ver) 1997 yılında, 16. kromozom kısa kolunda belirlenmiştir. Günümüze kadar, 150 farklı MEFV DNA dizi değişikliği tanımlanmıştır. Değişikliklerin birçoğu, tipik AAA fenotipiyle

ilişkilendirilerek, AAA'nın allelik heterojenite gösterdiği ortaya konmuştur. Bu gen tarafından kodlanan pirin adlı proteinin, inflamasyon ve apoptoz yollarında önemli rolü bulunmaktadır.

Pirin yapısına benzer yapıda alanları olan başka proteinler de tanımlanmış, bir kısmı diğer otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Otoinflamatuvar hastalıkların klinik tabloları birbirlerine oldukça benzediğinden, aralarında ayırım yaparak, tanı koymak oldukça zordur.

AAA atakları, hem hastalar arasında, hem de aynı hastanın atakları arasında farklılıklar göstermektedir. MEFV geninde mutasyon bulunan her hastanın klinik tablosu, hastalığın başlangıç yaşı, ilaç tedavisine verilen yanıt, atakları başlatan durumlar açısından birbirinden farklıdır. Bazı hastalarda, MEFV mutasyonu bulunmasına karşın, fenotipik olarak hiçbir bulgu gözlenmemektedir. Bunun tersine, bazı hastalarda klinik tablo kesinlikle AAA tanı kriterlerine uyduğu halde, mutasyon bulunmamaktadır. MEFV genotipiyle, AAA fenotipi arasındaki ilişkiler netlik kazanmamıştır. En sık bildirilen genotip-fenotip ilişkisi, M694V mutasyonu ile amiloidoz gelişimi ve klinik tablonun ağırlığı arasındadır.

MEFV gen ifadesinin düzenlenmesinde, değiştirici başka genler bulunabilir. AAA genotip-fenotip ilişkileri kapsamında, benzer otoinflamatuvar hastalıklardan sorumlu mutasyonların incelenmesi, günümüz araştırma konularındandır. Bu nedenle, kliniği AAA'ya benzeyen, CAPS (Cryopyrin Associated Periodic Syndromes) grubu hastalıklardan, kısaca kriyopirinopatilerden sorumlu ve PİRİN alanı bulunan, kriyopirin adlı proteini kodlayan CIAS1 (NALP3/PYPAF1 olarak da isimlendirilir) geninin, MEFV gen mutasyonlarının etkisini değiştirici bir rolü olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla, fakültemiz moleküler onkoloji laboratuvarında, MEFV geninde M694V, M680I ve V726M mutasyonları incelenen 192 kişinin, test sonrası artan DNA örneklerinde, CIAS1 geni 3. eksonunda tanımlanmış V198M, L307P ve R262W mutasyonlarının PZR-RFLP yöntemiyle çalışılması planlandı. Ayrıca laboratuvar kayıtları ve telefon görüşmelerinden elde edilen bilgilerle, MEFV genotipi ile AAA fenotipi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklarla İlişkili İnflamasyon Fizyopatolojisi

İnflamasyon, Latince *inflammare* (ateşe vermek) sözcüğünden gelmektedir. Roma'lı yazar Cornelius Celsus “Da Medicina” adlı kitabında: “*Notae vero inflammationis sunt quattuor. Rubor et tumour cum calore et dolore*: inflamasyonun dört işareti vardır: kızarıklık, şişlik, ateş ve ağrı” şeklindeki ifadesiyle, inflamasyonun temel belirtilerini kaydeden ilk kişi olmuştur. Sonradan, Rudolf Virchow bu belirtilere “*functio laesa*: işlev kaybı”nı da eklemiştir. Celsus’tan iki yüzyıl sonra Galen, inflamasyonun travmaya karşı gelişen, faydalı bir tepki olduğunu ileri sürmüştü; birkaç yüzyıl sonra Virchow, inflamasyonun aslında patolojik bir olay olduğunu belirtmiştir. Celsus’un tanımı dünyada hala geçerliliğini korusa da, moleküler düzeydeki gelişmeler inflamasyonu çok daha ayrıntılı ve karmaşık bir konu haline getirmiştir (Ferrero Miliani ve ark. 2006).

Bağışıklık sistemi, edinsel ve doğal olarak ikiye ayrılır. Birkaç günlük süreçte, organizmaya zararlı antijenlerin hücrelerde işlenmesi ve özgün antikorların üretilmesi, edinsel bağışıklığın görevidir. Doğal bağışıklık ise, vücudun demirbaşısıdır; organizma bütünlüğünü tehdit eden herhangi bir unsura karşı, ani yanıt olarak gelişir (Duncan ve Schmidt 2001). Bu yanıtta, edinsel bağışıklığın tersine, herhangi bir “başlatıcı” etmene ya da önceki karşılaşmalar sırasında oluşmuş “bellek” hücrelerine gereksinim duyulmaz (Fritz ve ark. 2006). Doğal bağışıklık kapsamında, fiziksel engeller, kompleman sistemi, kemokin ve sitokin gibi çözünebilir etmenler, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi beyaz kan hücreleri bulunur. Sayılan hücrelerden salgılanan ve temel işlevi hücreler arası sinyalleşme olan sitokinler, doğal bağışıklıkta baş komutan konumundadır (Duncan ve Schmidt 2001).

2.1.1. Doğal Bağışıklık Sistemde Görevli Moleküller Ve İşlevleri

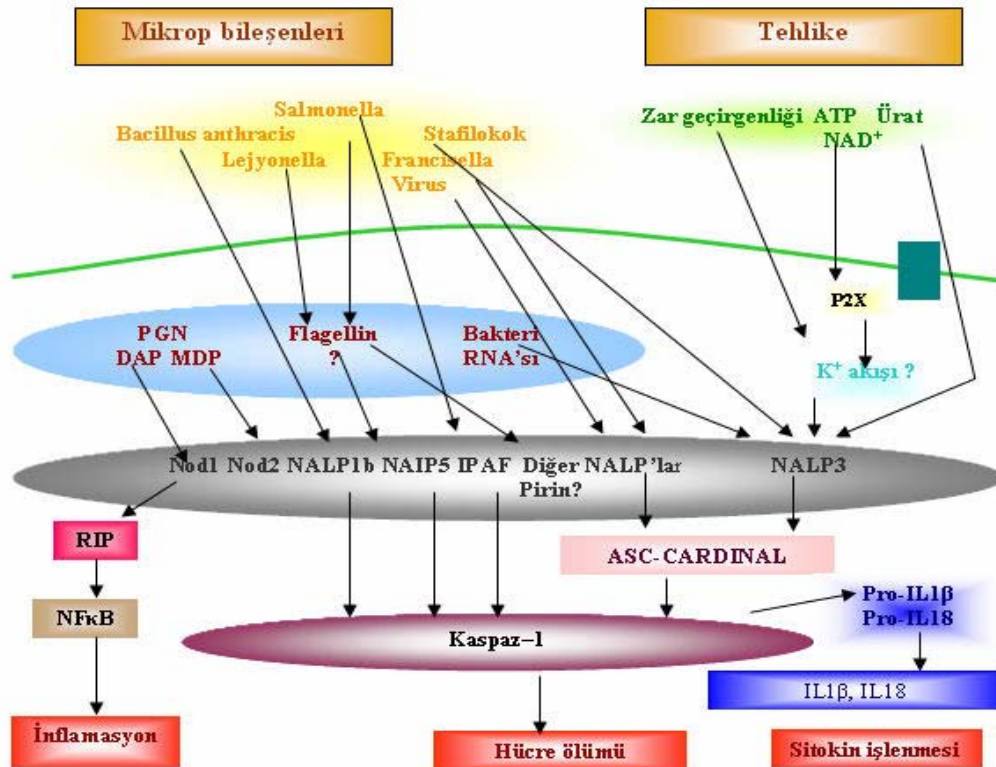
2.1.1.1. Bağışıklık Yanıtını Başlatan Tetikleyici Molekül: PAMP

Doğal bağışıklığın hızla etkinleşmesinde, patojenlerle ilişkili moleküler örüntüler anlamına gelen, PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) olarak isimlendirilen, mikrobik motifler bulunur. Bunlar arasında, lipopolisakkarid, peptidoglikan, bakteri lipoproteinleri, flagellin, bakteri ve virüslerdeki nükleik asit yapıları sayılabilir (Fritz ve ark. 2006). PAMP varlığını algılayan doğal bağışıklık

hücreleri, inflamasyon ve enfeksiyona karşı direnç gelişimiyle sonuçlanan, geniş yelpazeli bir savunma mekanizması başlatır. Fagositler olay alanına gelir; antimikrobik peptidler salınır; sitokin, kemokin ve prostanooidlerden oluşan bir düzenek kurulur. Çoğu zaman, enfeksiyon kontrolü için, edinsel bağışıklık yanıtı gerek kalmaz. Yine de, daha güçlü bir yanıt gerekirse, doğal bağışıklık sistemi, edinsel bağışıklık sistemindeki düzenleyici molekülere emir vermekte, oldukça etkin görev üstlenebilir (Fritz ve ark. 2006).

2.1.1.2. PAMP'ları Karşılayan Moleküller: PRM Veya PRR'ler

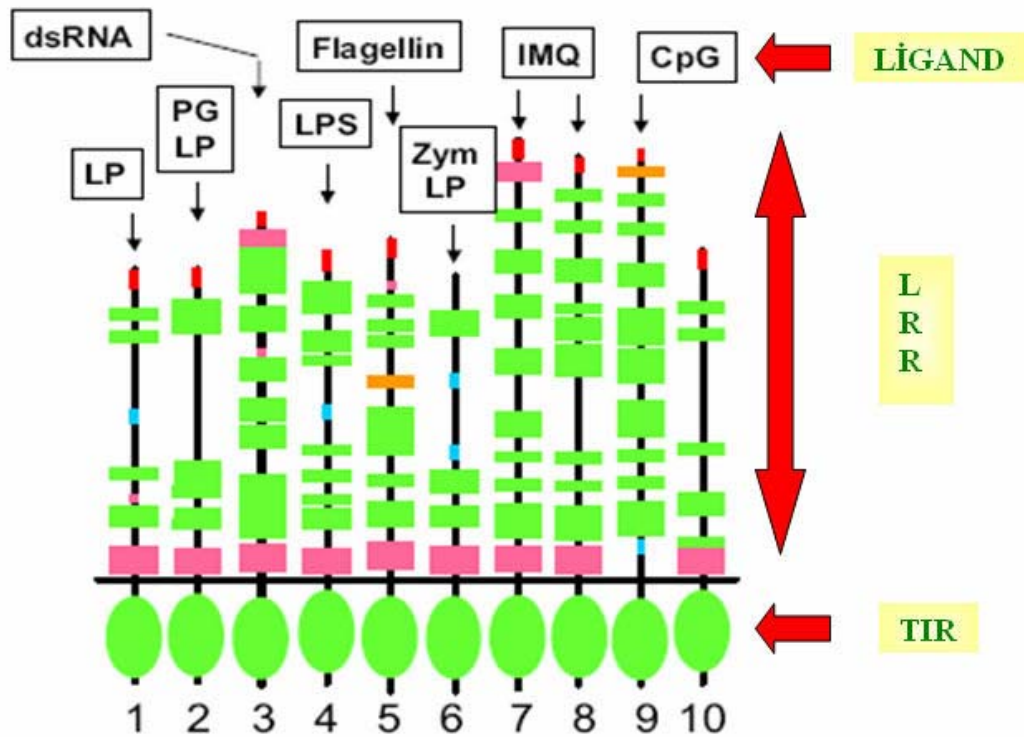
Hücrelerde örüntü tanıma molekülleri olan PRM (Pattern Recognition Molecules) veya aynı anlamda kullanılan örüntü tanıma almaçları PRR'ler (Pattern Recognition Receptors) bulunur (Şekil 2.1). Bunlar, patojenlerde bulunup, insan organizmasında üretilmeyen, enfeksiyon etkenlerine ait değişik moleküler bileşenleri tanıır. Edinsel bağışıklık yanıtı neden olan proteinler yerine, doğal bağışıklıkta karbonhidrat, lipid ya da nükleik asit dizileri gibi genel moleküler modeller tanınmaktadır (Lazarus ve ark. 2002).



Şekil 2-1: Mikrop, PAMP, tehlike sinyali varlığında NLR etkinleşmesi-Fritz (2006)'dan

2.1.1.3. İlk Tanımlanan PRM'ler: TLR Ve İşlevleri

Tanımlanan ilk PRM grubu, Toll benzeri almaçlar, TLR (Toll Like Receptors)'dır (Beutler 2004b). Hücre zarına bağlı olan TLR'lerin, hücre dışında kalan parçasında, lösinden zengin tekrarlardan oluşan LRR alanı (Leucine Rich Repeat), hücre sitoplazmasına uzanan iç kısmında ise, TIR olarak isimlendirilen, Toll interlökin-1 almaç alanı (Toll Interleukin-1 Receptor) bulunmaktadır. Bu almaç bölgesi, işgalci patojene karşı, gerekli sinyal molekülleriyle etkileşime girmektedir (Beutler ve ark. 2004a; Mathison 2005) (Şekil 2.2).



Şekil 2-2: Toll-benzeri almaçların yapısı – Beutler (2004a)'dan

TLR'ler, bazı durumlarda, birden fazla uyarana gereksinim duyar. Örneğin, TLR4'ün uyarılması için, eksojen olarak bakteri endotoksini ve endojen olarak heparan sülfat gerekmektedir (Brunn ve Platt 2006). Fizyolojik koşullarda, heparan sülfat, hücre dışı matris içine gömülü olduğundan, TLR4'ü uyaramaz. Enfeksiyonda, aşırı heparan sülfat salınımı ve patojenlerin virulans etmenleri aracılığıyla ortaya çıkan, proteaz etkinliği, TLR4 uyarımı için yeterli olur (Sansonetti 2006) (Tablo 2.1).

Tablo 2-1: TLR'ler ve ligandları

TLR	Ligandları
TLR1	Triasetile lipoproteinler (TLR2'yle beraber)
TLR2	Bakteri lipoproteinleri, Triasetile lipoprotein Gram pozitif peptidoglikan Lipoteikoik asit
TLR3	Çift zincirli virus RNA'sı
TLR4	Gram negatiflerin dış zarındaki lipopolisakkarid
TLR5	Bakteri flagellini
TLR6	Diasetile lipoprotein (TLR2'yle beraber)
TLR7 ve 8	Küçük sentetik antiviral proteinler
TLR9	Metillenmemiş CpG
TLR10	Bilinmiyor

TLR'ler zargeçen proteinler olmalarına rağmen, bazı bağışıklık hücreleri ile steril vücut boşluklarındaki bazı hücrelerin yüzeylerinde de ifade edilir. Örneğin, fizyolojik koşullarda, kendine özgü mikroflorası bulunan, sindirim sistemi kanallarında, uygunsuz inflamasyon oluşmaması için, yüzey epitel hücrelerinde TLR ya çok az ifade edilir ya da hiç edilmez; buna ek olarak PAMP algılanması için gerekli eş-almaçlar da ifade edilmez. TLR5 dağılımı da, TLR2 örneğindeki gibi farklıdır. TLR5 çoğunlukla bazolateral bölgededir ve uyarılması için, flagellin gibi bir PAMP'ın, epitelden geçiş yapması gerekir (Athman ve Philpott 2004).

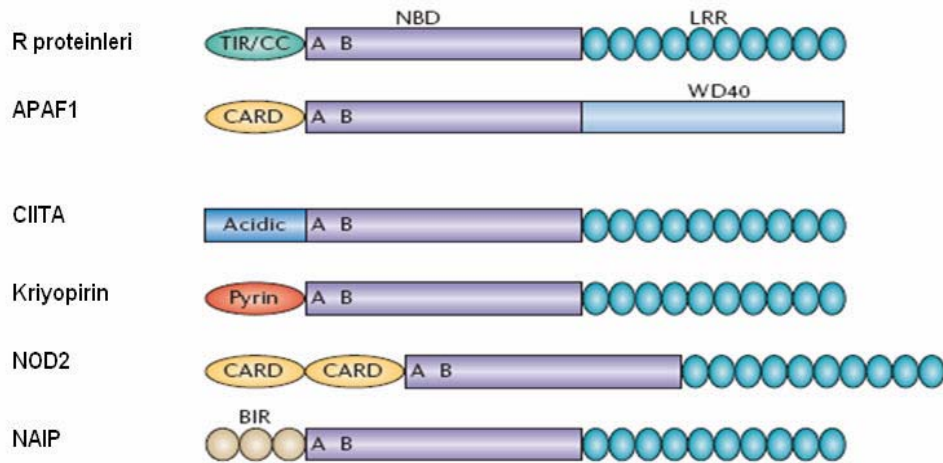
2.1.1.4. TLR'lerin Hücre İçi Akraları: NLR Moleküller Ve İşlevleri

Doğal bağışıklıkta, hücre içinde de patojen algılayıcı moleküllerin bulunduğu, *Shigella flexneri*'nin, kültür epitel hücrelerinde, NFκB'nin etkinleşmesini tetiklemesiyle anlaşılmıştır. Bu yanıtta, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi olan, NOD1 (Nucleotide binding Oligomerization Domain 1) sorumludur. NOD, bakteri bileşenlerini, toksinleri, ölüm aşamasında veya hasarlanmış hücreler tarafından salgılanan "tehlike sinyalleri"ni algılar. NOD benzeri almaç olarak isimlendirilen, NLR

(Nod Like Receptor), TLR'nin sitoplazmik karşılığı olup, savunma açısından tam bir işbirliği yaparlar (Fritz ve ark. 2006).

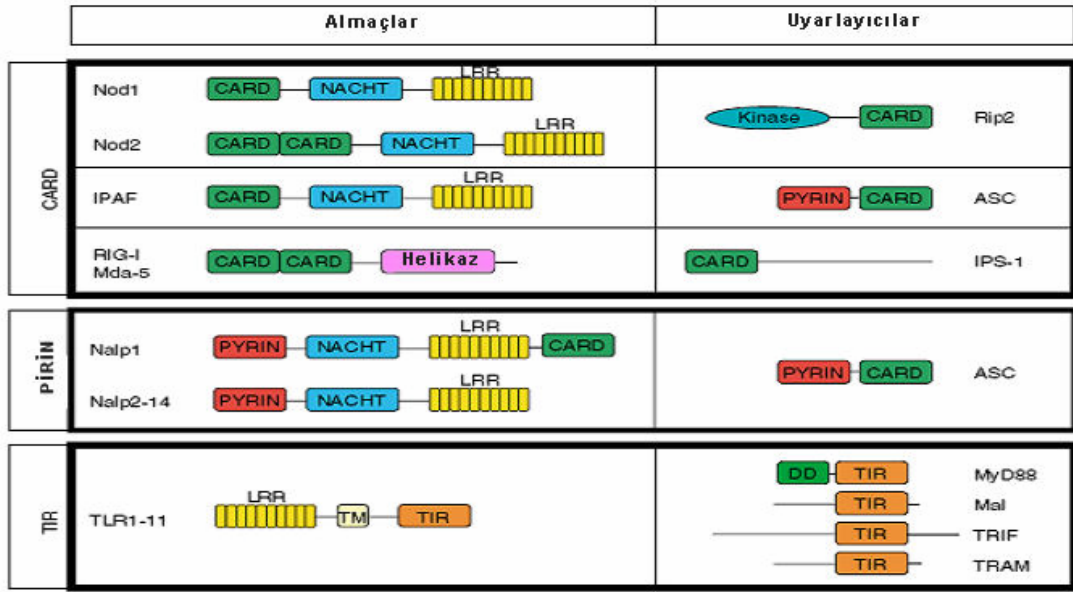
2.1.1.5. NLR Örnekleri: NOD, NALP, CATERPİLLER Proteinler Ve Yapılarındaki NACHT, LRR Ve CARD Alanları

NLR'ler arasında, antiviral olan NOD1, NOD2, IPAF, NALP ile helikaz alanı bulunan proteinlerden, RIG-1 ve MDA-5 sayılabilir. NOD proteinleri yerine, CATERPİLLER (CARD, Transcription Enhancer, R (purine) binding, PyrIn, Lots of LEucine Repeats) terimi de kullanılmaktadır (Ting ve ark. 2006). Yirmiden fazla üyesi bulunan NLR ailesi proteinlerinin, karboksil ucunda LRR alanı ve orta kısmında nükleotid bağlanma alanı olan NACHT bulunur (Şekil 2.3). Bu alanlarda, TIR alanı yerine, homofilik protein-protein etkileşimlerinde görevli, kaspaz çekim ve etkinleştirme alanı olan, CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) ile PİRİN alanı, sinyalleri daha alt düzeylere iletmekle yükümlüdür (Werts ve ark. 2006).



Şekil 2-3: CATERPİLLER proteinlerinin yapısı – Ting (2006)'dan

Sonuç olarak, memelilerde, mikroorganizmaların doğal bağışıklık yoluyla tanınmasını sağlayan üç kollu sac ayağında, TIR, CARD ve PİRİN alanları işlev görmektedir (Werts ve ark. 2006) (Şekil 2.4).

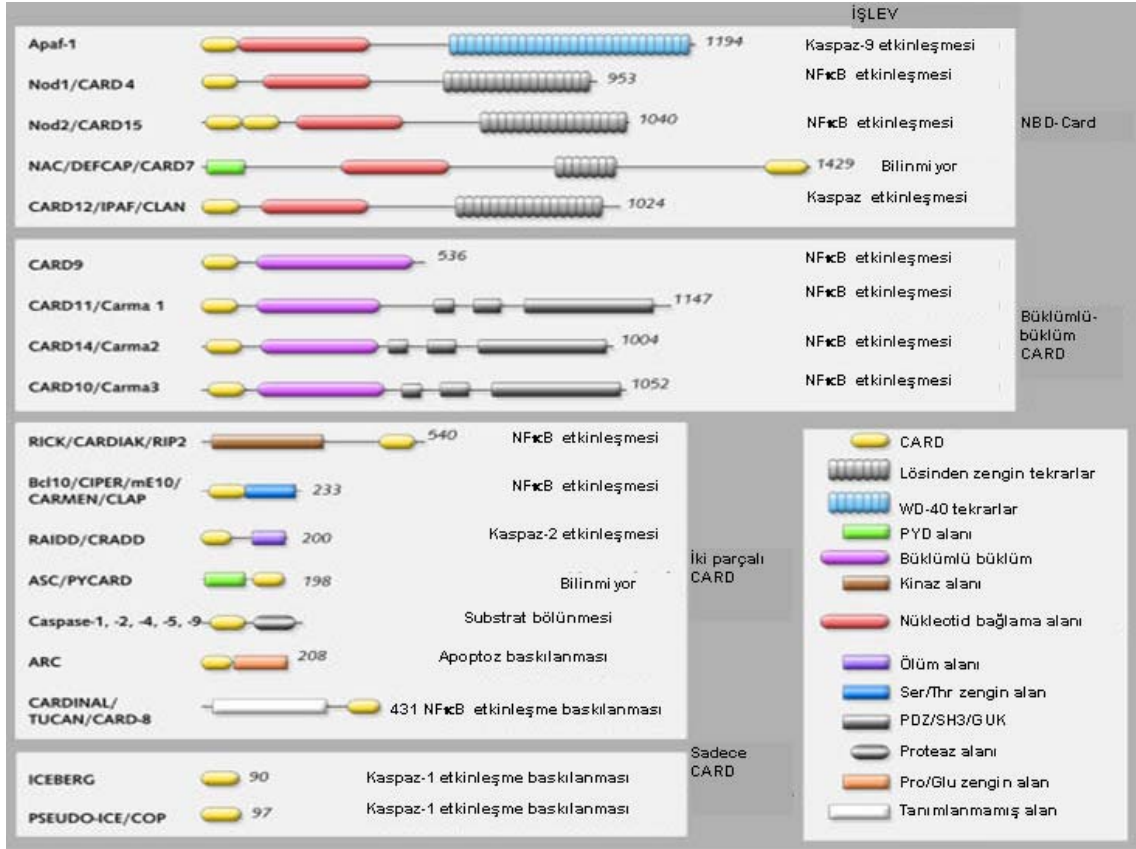


Şekil 2-4: Alıcı ve uyarlayıcı moleküllerin CARD, PİRİN ve TIR bölgelerine göre düzenlenmesi – Werts (2006)’dan

2.1.1.6. CARD Alanı

Organizmanın kendisini enfeksiyon, çevresel stres veya hücresel hasara karşı savunmasında, CARD alanlarının önemli rolleri vardır. Ayrıca NFκB etkinleşmesi ve kaspazlarla düzenlenen, inflamasyon ve apoptoz yolları arasında belirgin bir kesişim bulunur (Bouchier Hayes ve Martin 2002). Altı α sarmallı bir demetten oluşan CARD alanları, apoptozda kaspaz (cysteine aspartic acid specific proteases), inflamasyonda NFκB etkinleşmesine neden olur (Siegel 2006).

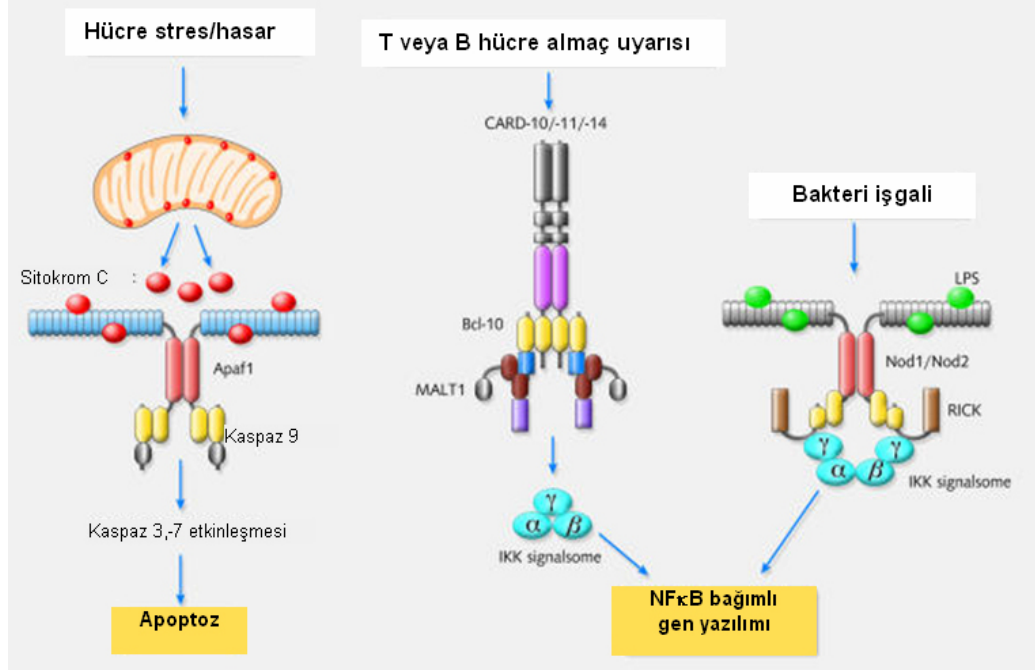
CARD alanı, kaspazlar dışında, Bcl10, CARD4/Nod1, Nod2, CARD10, CARD11 ve CARD14 gibi, işlevleri NFκB’yı etkinleştirmek olan bazı proteinlerde de bulunmuştur. Etkinleşen NFκB, inflamasyon veya apoptozda rol oynayan genlerin yazılımına neden olur. CARD alanı olan CARDINAL adlı protein ise, diğerlerinin tersine, NFκB etkinleşme sinyallerini baskılar ve yanıt süresini sınırlar (Bouchier Hayes ve ark. 2001) (Şekil 2.5).



Şekil 2-5: CARD alanı bulunan proteinler – Bouchier Hayes (2002)’den

2.1.1.7. İnflamasyon Ve Apoptozun Kesişim Noktasında Önemli Bir Molekül: NFκB

NFκB etkinleşmesi, TNF-α, IL-1β ve LPS gibi değişik uyaranlarla sağlanabilir. Sitoplazmada NFκB alt birimleri, NFκB baskılayıcısı olan IκB ile karmaşık oluşturarak, etkin olmayan halde bulunur. Birçok uyaran, katalitik IKKα ve IKKβ ile düzenleyici IKKγ/NEMO alt ünitelerinden oluşan, IκB kinaz (IKK) karmaşımını etkinleştirir. Etkinleşen IκB kinaz, ubiquitin-proteozom yoluyla fosforillenir ve parçalanır. Serbestleşen NFκB alt üniteleri, hücre çekirdeğine geçerek, bağışıklal yanıt, inflamasyon veya hücre sağkalımında rol oynaması gereken genleri etkinleştirir (Kinoshita ve ark. 2006) (Şekil 2.6).



Şekil 2-6: Apoptoz ve NFκB'ya bağlı gen yazılımı oluşumu – Bouchier Hayes (2002)'den

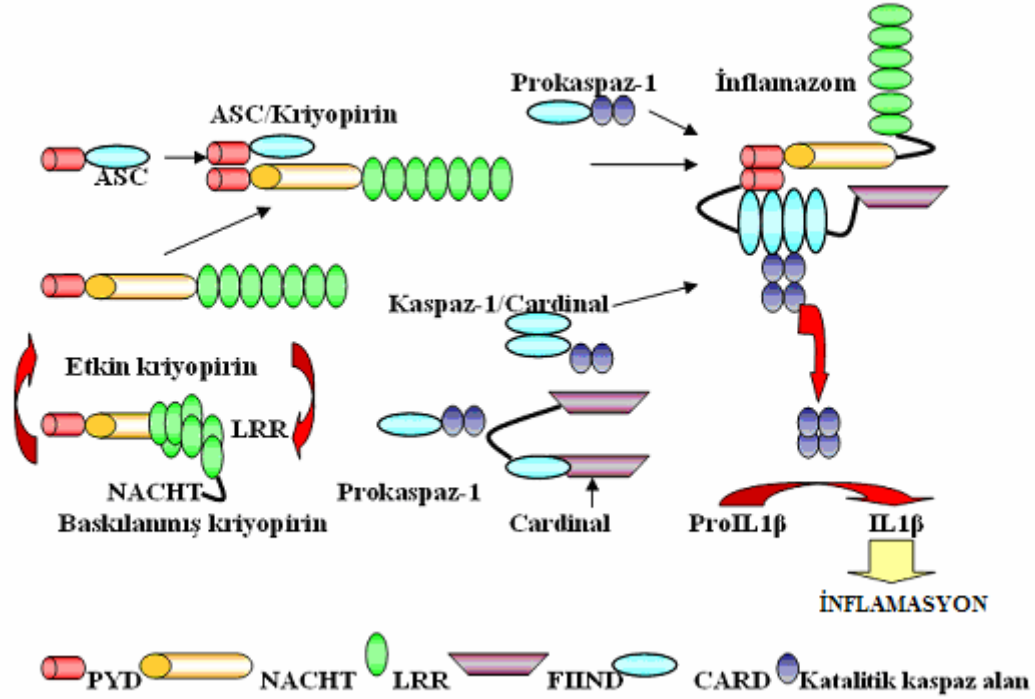
2.1.1.8. İnflamasyon Başrol Kahramanı: İnterlökin 1β

İnflamasyonda yer alan, en önemli çözünür moleküllerden biri, IL-1β (InterLökin 1 β)'dir. Başlıca monositler olmak üzere, makrofaj ve dendritik hücrelerden akut faz yanıtı sırasında salınır. Düşük düzeylerde, ateş ve hipotansiyon gelişimi, ACTH salınımı ve IL-6 gibi sitokinlerin oluşumuna neden olur. IL-6 ise, karaciğerden SAA (Serum Amiloid A) ve CRP (C Reaktif Protein) gibi akut faz proteinlerinin salınmasına, endotel hücre ve lökositlerde adezyon moleküllerinin sentezini uyararak, lökositoz ve trombositoz gelişimine katkı sağlar (Ferrero Miliani ve ark. 2006). En güçlü pirojenlerden biri olan IL-1β'nın, uygunsuz salınımı ağır sonuçlar doğurabilir. IL-1β salınımını negatif yönde düzenleyen endojen yollar da bulunmaktadır (Mariathasan ve Monack 2007).

Lipoteikoik asit ve lipopolisakkaritin TLR2'i, CpG dinükleotidlerinin TLR9'u, antiviral R848 bileşeninin TLR7'yi uyarması gibi, TLR uyaranlarına yanıt olarak salgılanan, etkin olmayan pro-IL-1β, daha sonra işlenerek etkinleştirilir. Tüm TLR'lerin, en önemli uyararı NFκB etkinleşmesidir (Mariathasan ve Monack 2007).

Olgun IL-1β, sitozolden hücre dışına salgısal lizozomlar veya mikrovezikül yırtılması sonucu çıkar. Olgun IL-1β salgılanma aşamasında, Kaspaz-1 etkinleşmesi sonucu sitokin salgılanması veya hücre ölümü meydana geldiğinden, etkinleşme sonrası

olayların düzenlendiği, inflamazom adında bir yapı oluşur (Ogura ve ark. 2006) (Şekil 2.7).



Şekil 2-7: IL-1β'nın kryopirin/NALP3 inflamazomuyla etkileşmesi – Kastner (2005)'den

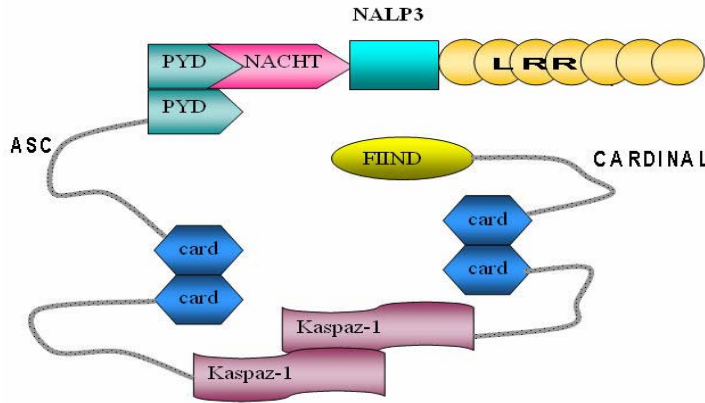
2.1.2. İnflamasyon Olgunlaşma Döneminde Görevli Önemli Bir Yapı: İnflamazom

İnflamazom, moleküler bir iskele olup, yapısındaki en belirgin görevi, Kaspaz-1 bileşeni üstlenir. Etkin olmayan, 45 kD'luk bir zimojen şeklinde sentezlenen pro-Kaspaz-1, uygun uyarı sonrası otokatalize uğrar. Etkin enzimin, p20 ve p10 alt birimleri bulunur ve etkinleşme sırasında, heterotetramer olarak düzenlenir. Kaspaz-1, Kaspaz-5, ASC ve NALP1, karmaşık bir yapı olan inflamazomu oluşturur (Mariathasan ve Monack 2007). Kaspaz-12, kaspaz etkinleşmesini baskılayarak, ters yönde düzenleme yapar. Bu düzenlemede, inflamazom yapısı ve NFκB etkinleşmesiyle ilişkili yolları baskılar (Saleh ve ark. 2004).

2.1.2.1. Kapsamlarındaki Moleküllere Göre Tanımlanan Çeşitli İnflamazomlar

Yapılarındaki NLR'e göre, farklı inflamazomlar tanımlanmıştır: NALP1 inflamazomu (NACHT [NAIP-{Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein}, CIITA, HET-E, TP1], LRR, PIRIN) kapsamında, Kaspaz-1, Kaspaz-5, NALP1 ve ASC (Apoptosis associated Speck like protein with a Caspase recruitment domain), NALP2

ve 3 inflamazomlarında ise NALP2 ve 3'ün yanısıra, CARDINAL, ASC ve Kaspaz-1 bulunur. Üçüncü inflamazomda ayrıca IPAF bulunur (Kummer ve ark. 2007; Martinon ve Tschopp 2007) (Şekil 2.8).

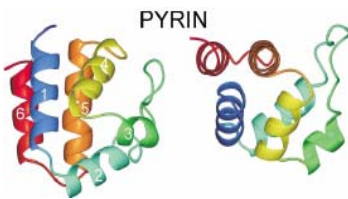


Şekil 2-8: NALP3 inflamazomun yapısı – Ferrero (2006)'dan

NALP ve IPAF, NLR ailesinin üyesidir (Kummer ve ark. 2007). CATERPILLER ailesinde ise 14 NALP proteini tanımlanmıştır (Harton ve ark. 2002).

2.1.2.2. İnflamazom İçinde Bir Köprü: ASC

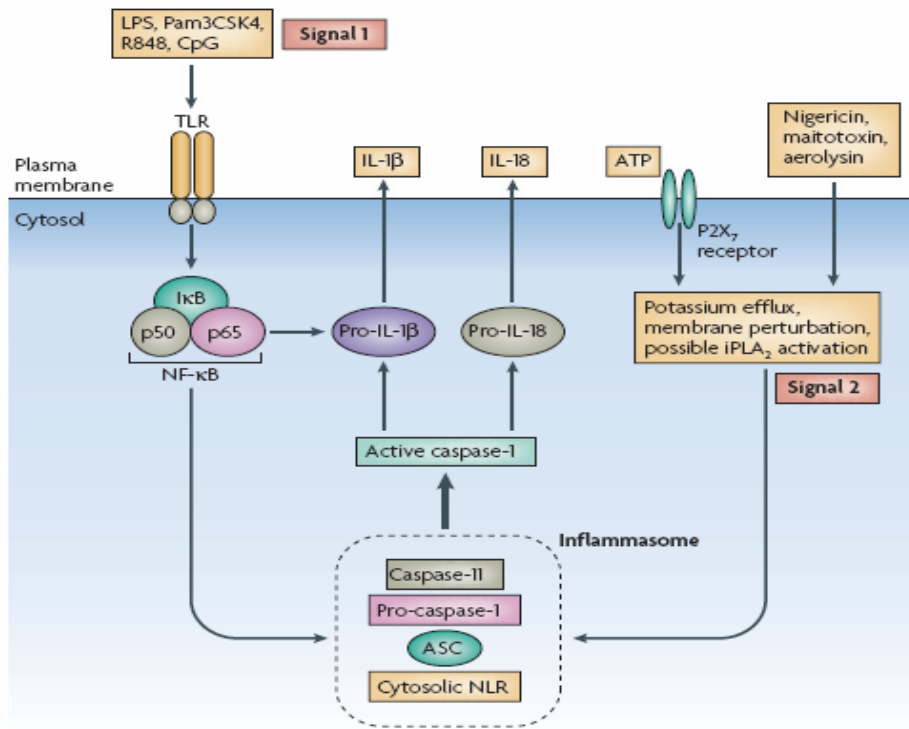
İnflamazom yapısındaki 22 kD'luk ASC'nin, amino ucunda PİRİN (PYD/PIRIN/PAAD/DAPIN olarak da isimlendirilir), karboksil ucunda CARD alanı bulunur (Şekil 2.9). ASC'nin temel işlevi, PİRİN ve CARD bölgeleri bulunan başka proteinlerin biraraya gelmesinde uyarlayıcı rol oynamasıdır. ASC kendi yapısındaki CARD alanı aracılığıyla, prokaspaz-1'in homotipik CARD ve PİRİN alanları ile NALP'ın PİRİN alanı arasında doğrudan köprü işlevi görür (Masumoto ve ark. 2003; Mariathasan ve Monack 2007). ASC'nin, NFκB etkinleşmesindeki rolü kesin bilinmemektedir (Shiohara ve ark. 2002; Kinoshita ve ark. 2006). İnflamazom, iki prokaspaz-1 molekülünü birbirine yakınlaştırarak, kaspaz-1'in etkin katalitik p20 ve p10 birimlerinin, otokataliz yoluyla salınmasına neden olur. Kaspaz-1, IL-1β'nın 31 kD'luk öncü formunu ayırarak, etkin 17 kD'luk parçaya dönüştürür (Chae ve ark. 2006).



Şekil 2-9: ASC'nin PİRİN alanı – Liepinsh (2003)'den

2.1.2.3. İnflamazomun Etkinleşmesi

Bakteri RNA'sı ve hücre duvarındaki peptidoglikan, NALP3 inflamazomunu etkinleştirmektedir (Kanneganti ve ark. 2006). Flagellin adlı bileşen ise, IPAF'ı etkinleştirir (Kummer ve ark. 2007). Gut hastalığıyla ilişkili ürik asit, psödogutta bulunan kalsiyum pirofosfat dihidrat kristalleri, ölen hücrelerden salınan ATP gibi parakrin sinyaller ve hemolizin gibi, hücre zarını değiştirerek, potasyum pompalarını etkinleştirip, hücre içi potasyum eksilmesine yol açan mikrobik toksinler, NALP3'e bağlı olarak, kaspaz-1'i etkinleştirir (Gurcel ve ark. 2006; Mariathasan ve ark. 2006; Martinon ve ark. 2006) (Şekil 2.10).



Şekil 2-10: Kaspaz1 inflamazomunun etkinleşmesi ve IL-1β salınımı için iki ayrı hücre dışı sinyal gerekir – Mariathasan (2007)’den

İnsan genomunun dizilenmesi, birçok genomiks ve proteomiks teknolojilerinin kullanıma girmesiyle, bağışıklık ve inflamasyon konularıyla ilişkili dinamik parçaların anlaşılması kolaylaşmıştır. Teknolojik olanaklar, bilgisayar desteğiyle birlikte kullanıldığında, bu biyolojik olayların tamamı, net bir şekilde açıklığa kavuşabilir. Bundan yola çıkarak yapılan bilgisayar programları, internet ortamında bilgilendirme amacıyla hizmete sunulmuştur: <http://www.sbeams.org/> (Aderem, 2004).

2.2. Otoinflatuar Hastalıklar

Otoinflatuar hastalıklar, tetikleyici unsur olmadan başlayan ve inflamasyon ataklarıyla seyreden hastalıklar grubudur. Önceleri “kalıtsal ateş sendromları” olarak isimlendirilmiş; ateşin her atağa eşlik etmediği anlaşıldıktan sonra “otoinflatuar hastalıklar” teriminin kullanılmasına karar verilmiştir (Stojanov ve Kastner 2005; Masters ve ark. 2006). Farklı klinik özellikleri bulunan otoinflatuar hastalıklar tanımlanmıştır: Başlıcaları, AAA (Ailevi Akdeniz Ateşi), TRAPS (tümör-nekroz faktör-TNF Reseptörü ilişkili [Associated] Periyodik Sendrom), HIDS (Hiperİmmünglobulinemi D ile seyreden periyodik ateş Sendromu) ve CAPS (kriyopirinle ilişkili [Cryopyrin Associated] Periyodik Sendromlar)’dır (Tablo 2.2). Herbirinde, başlangıç yaşı, atak devam süresi, eşlik eden klinik belirtiler, hastalık seyri, hastaların etnik kökeni gibi farklı özellikler olmasına rağmen, klinik tabloya dayanarak, aralarında ayırıcı tanı yapmak oldukça zordur. Ancak, hastalığa özgü tedavi uygulanması açısından, kesin tanı konması gerekmektedir (Simon ve ark. 2006) (Şekil 2.11).

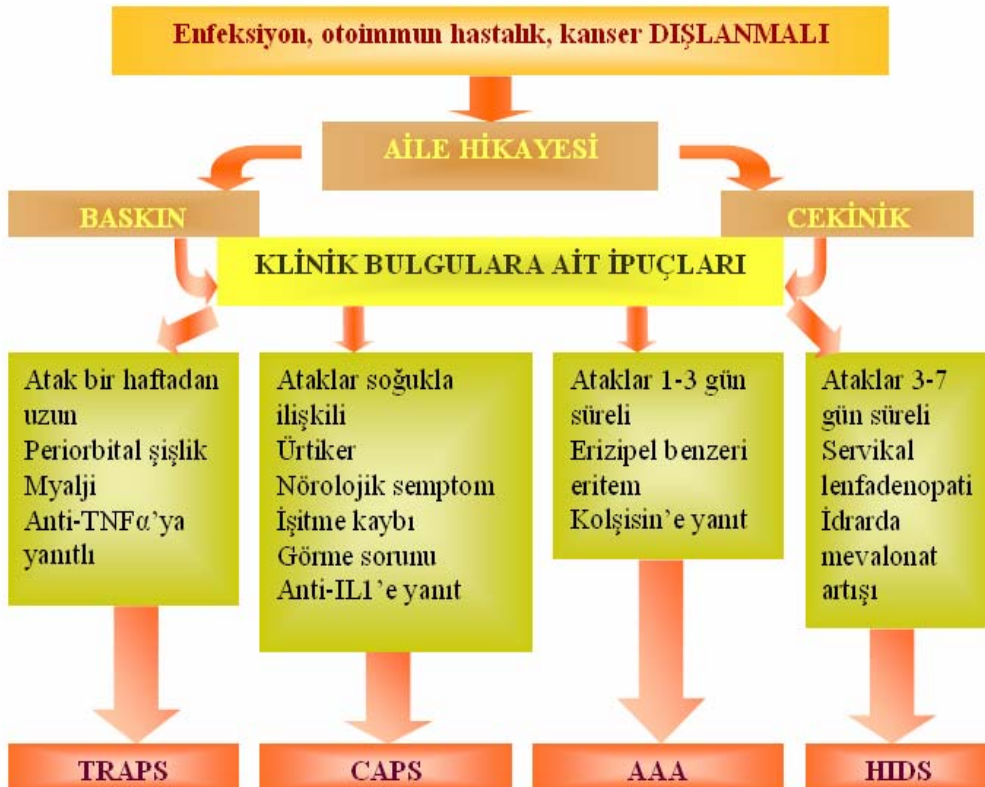
Tablo 2-2: Otoinflatuar hastalıklar

	AAA	TRAPS	HIDS	CAPS
Kalıtım	O. çekinik	O.baskın	O.çekinik	O.baskın
Gen, Kromozom, Protein	MEFV, 16p13, Pirin	TNFRSF1A, 12p13, TNFRSF1A	MWK, 12q24, MK	CIAS1, 1q44, Kriyopirin
Etnik köken	Musevi, Ermeni, Arap, Türk	Özellikli değil	Hollanda, Fransa, Avrupa ülkeleri	Kuzey Avrupa, Amerika beyazları
Atak süresi	1-3 gün	1 haftadan uzun	3-7 gün	Değişken
Ayırıcı klinik bulgular	Poliserozit, eritem, Artrit	Göz çevresi ödemi, myalji, döküntü	Lenfadenopati, başağrısı, idrarda mevalonat artışı	Soğuk ürtikeri, işitme kaybı, menenjit, artropati
Tedavi	Kolşisin	Anti-TNF α	Anti-TNF α	Anti-IL1

Aşağıda belirtilen koşullarda otoinflamatuvar hastalıktan şüphelenilmektedir:

- (i) Ateşe eşlik eden karın ağrısı, kas-iskelet tutulumuna ait yakınmalar ve cilt döküntüsü gibi belirtilerin varlığı.
- (ii) Aralıklı, ancak gerçek bir düzene sahip olmayan (bazen yılda, bazen haftada bire kadar değişebilen) atak sıklığı.
- (iii) Klinik belirtilere eşlik eden lökositoz, CRP, SAA düzeylerinde artış gibi biyokimyasal inflamasyon göstergeleri.
- (iv) Otozomal baskın veya çekinik modele uyan kalıtsal geçiş (Grateau 2004).

Otoinflamatuvar hastalıklar, sistemik lupus eritematozus veya romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklardan, otoantikor titrasyonlarının yüksek düzeylere ulaşmaması ve antijene özgü T hücrelerinin bulunmamasıyla ayrılır. Otoinflamatuvar hastalıklar doğal, otoimmün hastalıklar ise edinsel bağışıklık sistemiyle ilgili problemlerden kaynaklanmaktadır (Kastner 2005).

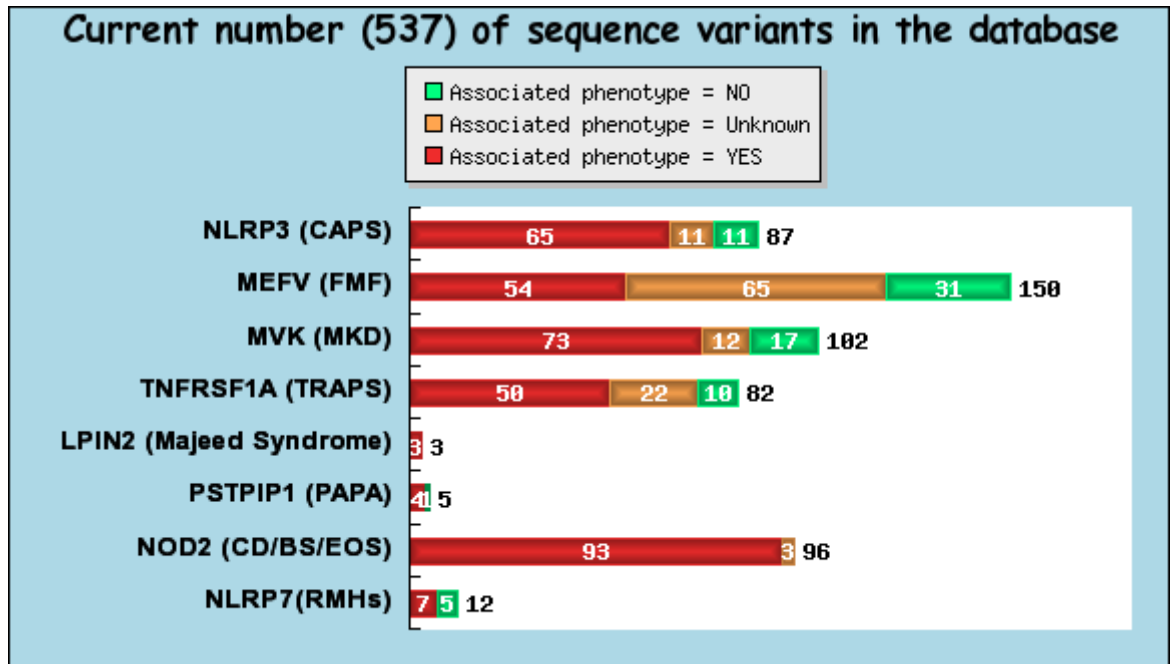


Şekil 2-11: Otoinflamatuvar hastalıkların algoritmik tanısı – Samuels (2006)'dan

2.2.1. Otoinflatuar Hastalıkların Oluşumundan Sorumlu Mekanizma

Otoinflatuar hastalıkların oluşumunda, inflamasyon ve apoptoz olaylarını düzenleyen bazı proteinleri kodlayan genlerde tanımlanan mutasyonların rolü olduğu bulunmuştur (Stojanov ve Kastner 2005). Hemen hepsinde ortak olarak, IL-1 etkinleşmesi, NFκB düzenlenmesi ve apoptoz aksaklıklarıyla karşılaşmaktadır. Otoinflatuar hastalıkların oluşumundaki temel mekanizma, TNF almaçı ve PİRİN aile üyesi olan bazı molekülleri kodlayan genlerde belirlenen mutasyonların, normalde apoptoza uğraması gereken lökositlerin, yaşamlarını devam ettirmesine neden olarak, çok hafif bir uyaranda dahi, şiddetli inflamasyon oluşturmalarıdır (McDermott ve Aksentijevich 2002). Ayrıca sitokin salgılanmasıyla ilişkili problemler de, apoptoz mekanizmasını bozarak, nötrofillerin devamlı etkin halde kalmasına neden olur (Samuels ve Özen 2006).

Otoinflatuar hastalıklardan sorumlu mutasyonlar ve bunlarla ilişkili protein değişiklikleri, internet ortamında INFEVERS veri tabanında güncellenmektedir (Pugnere ve ark. 2003) (Şekil 2.12).



Şekil 2-12: INFEVERS veri tabanı - <http://fmf.igh.cnrs.fr/infervers/> (28 Haziran 2007 verileri)

2.2.2. Otoinflatuar Hastalıkların Prototipi: Ailevi Akdeniz Ateşi

Otoinflatuar hastalıklar arasında en çok karşılaşılan AAA, otozomal çekinik olarak kalıtılmaktadır (Paut ve ark. 2000). En sık Türk, Arap, Musevi ve Ermeniler gibi

Akdeniz bölgesinde yerleşmiş etnik gruplarda ortaya çıkmakla birlikte, genetik test uygulamasıyla birlikte, dünya çapında olgular tanımlanmıştır (Kastner 2005). Hastalıktan sorumlu MEFV geninde, heterozigot mutasyon taşıma sıklığı, Ermeniler’de 1:7, Museviler’de 1:5 oranındadır (Grateau ve ark. 2000). Toplum genetiği çalışmalarında, AAA taşıyıcılık sıklığı, yüksek riskli etnik gruplarda 1:5 oranlarında bulunmuştur. (Stoffman ve ark. 2000). Bu etnik gruplarda, 1:200 kadar yüksek düzeylere ulaşan prevalans, yalancı baskın kalıtım modelini açıklar (Cazeneuve ve ark. 2000; Grateau 2004). Yüksek taşıyıcılık oranı ve etnik kökene göre sık rastlanan mutasyonların farklı oluşu, “genetik sürüklenme” mekanizması yerine “heterozigot üstünlüğü”nü ön plana çıkarmıştır (Chae ve ark. 2006). AAA hastalarında tüberküloza bağlı ölüm oranlarının düşük düzeylerde bulunması, tüberküloz basiline karşı heterozigot MEFV mutasyonu taşıyıcılarının avantajlı olduğunu düşündürmüştür (Cattan 2003). Bunun dışında, Akdeniz bölgesinde pandemi oluşturmuş kolera, çiçek, veba, tifüs, sıtma, gelişmiş tarımcılık ve bu coğrafyada bol miktarda bulunan küçükbaş hayvandan dolayı, hala endemik olan bruselloz hastalıklarıyla ilişkili heterozigot üstünlüğü de ileri sürülmüştür (Cattan 2005; Ross 2007). MEFV mutasyonları, genel doğal bağışıklısal yanıt artışına yol açıp, birden fazla patojene karşı heterozigot üstünlüğü yaratmış olabilir (Chae ve ark. 2003; Chae ve ark. 2006; Lachmann ve ark. 2006).

2.2.2.1. AAA Klinik Tablosu: Ataklarda Sık Karşılaşılan Bulgular Ve Hastalığın Önemli Komplikasyonları

AAA hastalığının, çoğunlukla 4 yaşına kadar ortaya çıkan tipik klinik tablosunda, 1-3 gün süren ateş ataklarıyla beraber karın ağrısı, göğüs kafesinde yan ağrısı olarak hissedilen plörezi, eklem kızarıklığı, şişliği ve ağrısı olarak beliren monoartiküler artrit, genelde ayak bileği etrafında ağrılı, kızarık bir döküntü olarak gözlenen erizipel benzeri eritem belirtileri bulunur (Paut ve ark. 2000) (Şekil 2.13).



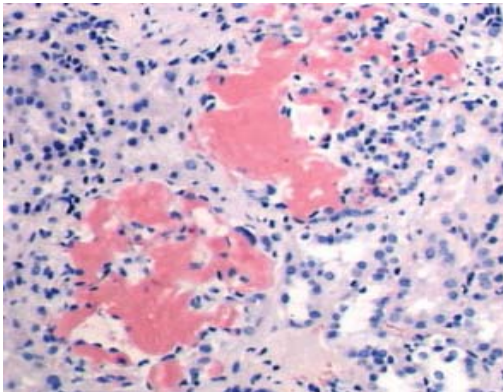
Şekil 2-13: Erizipel benzeri eritem – Tunca (2005)’den

Peritonit nedeniyle oluşan karın ağrısı yanısıra, batin hassasiyeti varlığı, akut batin tablosunu andırır. Bağırsak hareketlerinin azalması ve atağın düzelme dönemine geçişiyle, yumuşak gaita çıkışı çok tipiktir. Plörite bağlı gelişen, şiddetli ve çoğunlukla tek taraflı göğüs ağrısı, solunum hareketlerinin azalması ve göğüs röntgeninde küçük plevral effüzyonlar, sık rastlanan belirtiler arasındadır (Aringer 2004).

AAA ataklarını tetikleyen etmenler arasında, alt ekstremitelerde hidrostatik basınç artışına yol açan egzersiz, uzun süreli ayakta durma ya da oturma (Dinc, 2000), gerilim, ruh çökkünlüğü gibi duygu durum bozuklukları, yağdan zengin beslenme, bazı sebze ve süt ürünlerinin tüketimi sayılabilir (Mattit ve ark. 2006).

Atak sırasında, kan tablosunda nötrofili ve akut faz yanıtına özgü biyokimyasal göstergeler bulunur. Histolojik olarak, inflamasyon bulunan anatomik bölgede, yoğun miktarda polimorfonükleer lökosit artışı görülür. Klinik belirtilerin bulunmadığı, ataklar arası dönemlerde, hastaların kendini iyi hissetmesine rağmen, biyokimyasal göstergelerde inflamasyon durumu devam eder. (Kastner 2005; Lachmann ve ark. 2006).

Birçok çekinik hastalıkta olduğu gibi, heterozigot kişilerde klinik belirtiler daha hafiftir. Taşıyıcı bireylerde, akut faz proteinlerinin bazal düzeyleri, normale göre daha yüksektir. Ataklar kendiliğinden sonlanır ve belli bir düzene uymaksızın bir süre sonra tekrarlar. Kalça eklemine etkileyen, haraplayıcı artrit nadir rastlanan kronik belirtilerden biridir (Grateau 2004). AAA'nın en önemli komplikasyonu sayılan amiloidoz, akut-faz proteinlerinden biri olan, SAA (Serum Amiloid A)'a ait yanlış katlanmış bir parçanın birikimi sonucu ortaya çıkar (Kastner 2005) (Şekil 2.14).



Şekil 2-14: Böbrek amiloidozunda masif glomerüler tutulum histolojik görüntü – Aldea (2004)'ten

AAA hastalarında, SAA ölçümleri düzenli olarak kontrol edilmelidir. SAA değerinin, 1000 mg/ml'den daha yüksek bulunduğu başka bir hastalık olmadığı için, SAA artış düzeyi, asemptomatik hastalarda tanı koymaya yardımcı olur. Asemptomatik hastalarda, akut faz yanıtı sırasında gözlenen SAA değerleri, amiloidoz gelişim yatkınlığının belirlenmesi ve ilaç tedavisi düzenlenmesi açısından da faydalıdır (Lachmann ve ark. 2006).

Amiloidoz, her hastada ortaya çıkmamaktadır. AAA hastalarında, AA amiloidoz gelişimi için üç genetik faktör belirlenmiştir. Bunlardan birincisi, MEFV genotipidir. Homozigot M694V mutasyonu taşıyanlarda, hastalık başlangıç yaşı, atak sıklığı ve amiloidoza yatkınlık açısından, daha ağır bir tablo gözlenmektedir. İkinci risk faktörü, erkek cinsiyetidir. Üçüncü faktör ise SAA1 genotipi olup, SAA1.1 homozigotluğu, güçlü bir risk belirleyicisidir. AAA'nin II. fenotipik görünümü kabul edilen, ataklar olmaksızın, hastalığın amiloidoz tablosuyla ortaya çıkışı, ataklar arası dönemde tipik olarak CRP ve SAA düzeylerinde artıştan anlaşılabileceği gibi, subklinik inflamasyona bağlanabilir (Grateau 2004).

Bazı AAA hastalarında, infertiliteye de rastlanır. Kadınlarda oligomenore, erkeklerde spermatogenezi etkileyen testis kanalları inflamasyonu, infertiliteden sorumlu tutulmuştur (Mijatovic ve ark. 2003). AAA hastalarında, ateroskleroz gelişme riski artmıştır (Akdoğan ve ark. 2006). MEFV mutasyonu taşıyanlarda, erken dönem koroner hastalıklara yatkınlık görülür. Ayrıca Behçet hastalığı, poliarteritis nodosa, mikroskopik polianjiit, Henoch-Schönlein purpurası, inflamatuvar bağırsak hastalığı da AAA'ne eşlik eden diğer hastalıklardır (Cattan 2005). Romatizmal hastalığı bulunan, MEFV mutasyonu taşıyıcılarında, arka plan inflamasyon artışına bağlı olarak hastalığın seyri etkilenebilir (Özen ve ark. 2003).

2.2.2.2. AAA Tanısı Nasıl Konmalı: Klinik Değerlendirme Mi, Moleküler Test Mi?

AAA tanısı, büyük ölçüde klinik değerlendirmelere göre konulmaktadır. Sıklıkla Tel Hashomer grubunun önerdiği tanı kriterleri kullanılmaktadır (Aringer 2004) (Tablo 2.3).

Tipik AAA belirtilerinin olduğu kişilerde, tanı koymak oldukça kolaydır. Ancak, belirtilerin henüz netleşmediği aşamada veya aile öyküsü bulunmayan durumlarda, genetik test önem kazanır. Her iki MEFV allelinde de, aynı veya farklı mutasyon gözlenmesi -homozigot veya bileşik heterozigotluk- kesin AAA tanısı konmasını sağlar.

Tek allelde mutasyon gözleendiğinde, belirlenmemiş bir mutasyon olasılığından dolayı, hastalık tanısı dışlanamaz. Hastaların %85'inde rastlanan beş mutasyon, M694V, M680I, V726M, E148Q ve M694I'dır (Grateau 2004) (Tablo 2.4).

Tablo 2-3: Tel Hashomer kriterleri

(Kesin tanı = 2 major veya 1 major + 2 minör; Olası tanı = 1 major + 1 minör)

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

Tablo 2-4: Klinik olarak AAA ile ilişkilendirilmiş MEFV mutasyonlarının gen yerleşimleri (Not: 28 Haziran 2007 itibariyle INFEVERS veri tabanından elde edilmiştir)

5' çevrilmeyen bölge	614 C>G, 382 C>G, 330 G>A
Ekson 1	A89I
Ekson 2	G111G, E148Q, E167D, T177I, S179I, c606_621dup, S242R, T267I, A268V, A289V
Ekson 3	T309M, R354W
Ekson 5	V469L, H478Y, F479L
Ekson 9	I591L
Ekson 10	M680L, M680I, T681I, Y688X, I692DEL, M694V, M694L, M694DEL, M694I, K695R, A744S, R761H

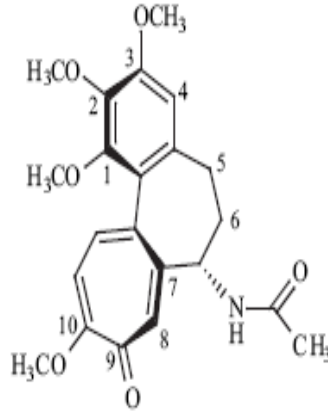
Mutasyon tarama amacıyla bazı yöntemler geliştirilmiştir. MEFV geninin kodlayıcı bölgesi, yaklaşık 2400 bp uzunluğunda ve gözlenen mutasyonlar çok çeşitli olduğu için, tüm gen dizisinin taranması, özellikle sık gözlenen mutasyon profillerinin tanımlanmadığı toplumlarda, oldukça zordur. Dolayısıyla, gen analiz yöntemleri, bilinen ve sık gözlenen mutasyonların taranmasıyla sınırlandırılmaktadır. AAA tanısı konduğu halde, PZR-RFLP (Polimeraz Zincir tepkimesi [Reaksiyonu]- Restriksiyon kesim parça uzunluk polimorfizmi [Restriction Fragment Length Polymorphism])

yöntemiyle, mutasyon saptanmayan hastalar için geliştirilen izotopik olmayan Rnaz ayrılma yöntemi, NIRCA (NonIsotopic Rnase Cleavage Assay) güvenli, hızlı sonuç veren ve fazla masraflı olmayan alternatif bir yöntemdir. Bu yöntem, riskli etnik gruplara dahil olmayan, dolayısıyla mutasyon yelpazesi bilinmeyen topluluklarda, ilk basamak tarama tekniği olarak kullanılabilir. Rutin kullanımda, sırasıyla 10 ve 2, bunlardan sonuç alınmadığında ise 3 ve 9. eksonlar taranmalıdır (Ritis ve ark. 2006).

MEFV mutasyonlarının incelenmesi için, sıklıkla denatüre edici jel elektroforezi, (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ve ters hibridizasyona dayalı yöntemler kullanılmaktadır (Cazeneuve ve ark. 1999; Tchernitchko ve ark. 2003). Teknik olarak, sıralı uygulama zorunluluğu, uzun zaman ve işgücü gerektirmesi, bu yöntemlerin sınırlayıcı özellikleridir (Moutereau ve ark. 2004).

2.2.2.3. AAA Tedavisinde Kolşisin

AAA hastalığında, Kolşisin kullanımı, 1972 yılında ilk kez Goldfinger tarafından önerilmiştir. Eski çağlardan beri, antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılan Kolşisin, Orta-Güney Avrupa ve Orta-Kuzey İtalya'da çok miktarda bulunan, zambak ailesinin bir üyesi olan, *Colchicum Autumnale* adlı bitkiden elde edilen bir alkaloiddir (Grateau 2004) (Şekil 2.15).



Şekil 2-15: Colchicum autumnale bitkisi ve Kolşisin'in kimyasal yapısı – Cerquaglia (2005)'ten

Günlük oral Kolşisin kullanımı, AAA ataklarının şiddet ve sıklığını belirgin olarak azaltmakta ve amiloidoz gelişimini büyük oranda önlemektedir (Aringer 2004; Kastner 2005). Kolşisin'in normal dozu, günde yaklaşık 1-2,5 mg olup, atakları önleyebilen miktara göre belirlenir. Gerçek Kolşisin yanıtı sıklığı sık değildir, başarılı olunmayan durumların çoğunda, önerilen kullanıma uyum sağlayamayan bir hasta söz

konusudur (Grateau 2004). Behçet hastalığı, Sweet sendromu ve gut hastalıklarının tersine, AAA'nin serozit ve artrit belirtilerinin önlenmesi veya düzeltilmesinde glukokortikoid kullanımı faydasızdır. Atakların, Kolşisin kullanımına olumlu yanıt vermesi, AAA'yi diğer otoinflamatuvar hastalıklardan ayıran önemli bir özelliktir. Bu özellik, moleküler testin kullanılabildiği günümüzde de, önemli bir tanı ögesi olarak yerini korumaktadır (Mansfield ve ark. 2001).

Kolşisin kullanım endikasyon ve etkinliği şu maddelerde özetlenmiştir:

- (i) AAA hastalarında, ataklardan korunma ve amiloidozun önlenmesi için, kesintisiz Kolşisin kullanımı önerilmektedir.
- (ii) Kolşisin'e, AAA tanısı konar konmaz başlanmalı ve yaşam boyu devam etmelidir.
- (iii) Amiloidoz tedavisi için Kolşisin önerilmektedir.
- (iv) Kullanılacak doz, yaş ve böbrek işlevine göre ayarlanmalıdır.

Kolşisin uygulaması ve doz belirlenmesi için yapılan öneriler şunlardır:

- (i) Başlangıç olarak, 0,5 mg/gün (5 yaş altı çocuklarda), 1 mg/gün (5-10 yaş arasında) ve 1,5 mg/gün (10 yaş üstü çocuklarda) oral yoldan verilmelidir. Gerekirse, her defasında 0,25 mg olmak kaydıyla, basamaklı olarak, günde en çok 2 mg'a kadar arttırılabilir.
- (ii) Böbrek nakli sonrası veya amiloidoz oluşmuş çok riskli hastalarda, günde 2 mg'e kadar yüksek dozda Kolşisin, klinik belirtilerin kontrolü için gereken doza ek olarak verilmelidir.
- (iii) Böbrek veya karaciğer işlevlerinde bozulma olan hastalar, çok dikkatli izlenmelidir. GFR'si (**G**lomerular **F**iltration **R**ate) 10ml/dak altında, ağır böbrek yetmezliği olanlarda, doz %50 oranında düşürülmelidir (Kallinich ve ark. 2007).

Günlük Kolşisin kullanımı, ataklar sırasında kullanıma göre daha etkindir (Mansfield ve ark. 2001). Uzun süreli ve yüksek doz Kolşisin kullanımının, endotel hücrelerinde birçok gen ifadesini değiştirdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, yalnızca atak oluştuğunda Kolşisin kullanılmasının, ani tedavi edici bir etki yaratamayacağı anlaşılmıştır (Ben-Chetrit ve ark. 2006).

Yüksek doz Kolşisin, mikrotübüllerin “artı” uçlarında polimerleşmeyi; düşük dozlar ise tübülün değişimini engeller. Mikrotübül dinamiği etkilendiğinde, lökosit göçü baskılanır. Kolşisin, nötrofil ve endotel hücrelerinde, yüzey adezyon moleküllerinin sayı ve dağılımını değiştirerek, lökosit adezyonunu da bozar (Mansfield ve ark. 2001). Koruyucu doz Kolşisin, nötrofil kemotaksisini, yüksek dozlar ise fosfolipaz A2 etkinleşmesi, lizozomlardan enzim salınımı ve fagositozu engellemektedir (Cerquaglia ve ark. 2005).

Kolşisin’in en sık rastlanan yan etkisi, diyaredir. Yan etkilerden kaçınmak için, geçici olarak süt ve süt ürünleri tüketiminin azaltılması gibi beslenme değişiklikleri, günlük dozların bölünerek kullanımı ve gerekirse doz azaltılması önerilebilir. Yakınmalar düzeldiğinde, basamaklı sistem kullanılarak uygun doza yeniden dönülür. Yan etkiler, 4-6 ayda bir yapılacak kontrollerle izlenmelidir (Kallinich ve ark. 2007). Kolşisin etkinliği, lökositlerde biriken ilaç düzeyiyle bağlantılıdır. Kolşisin, CYP3A4 ve/veya P-glikoproteinle etkileşen ilaçlarla birlikte alınırsa, renal ve/veya hepatik atılım azalacağı için, yan etkiler ortaya çıkar. Bu durumun dikkatlice izlenmesi, toksisite gelişiminin önlenmesinde önemlidir (Niel ve Scherrmann, 2006).

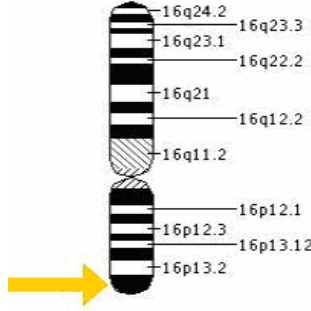
Kolşisin’in, sperm üretimi ve fonksiyonu üzerine olan yan etkileri tam bilinmemektedir. Gebelikte kullanılan Kolşisin, düşük oranlarını arttırmakta ancak fetal gelişimi olumsuz yönde etkilememektedir. Bu nedenle, yalnızca sosyal endikasyondan dolayı, amniyosentez yapılması önerilemez, ancak obstetrik izlemlerde, detaylı ultrasonografik incelemelerin yapılması uygundur. Kolşisin’e, gebelikte olduğu kadar, emzirme döneminde de devam edilmelidir (Mijatovic ve ark. 2003; Grateau 2004; Kallinich ve ark. 2007).

Yüksek doz Kolşisin’in atak sonlandırılmasına faydası olmadığından, ataklar sırasındaki yakınmaların giderilmesi için, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar kullanılmalı, ağır durumlarda ise opioidler denenmelidir (Kallinich ve ark. 2007).

AAA hastalarının yaklaşık üçte birinde, Kolşisin’e yanıt alınamadığından, alternatif çözüm üretilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Gerilim, yorgunluk gibi ruhsal durumların, atakları tetiklemesinden yola çıkılarak, Kolşisin’e dirençli bazı olgularda denenilen SSRI’lar (serotonin geri emilim blokerleri) hasta yakınmalarında azalmaya neden olduğundan, Kolşisin yanında kullanımı önerilmiştir (Onat ve ark. 2007).

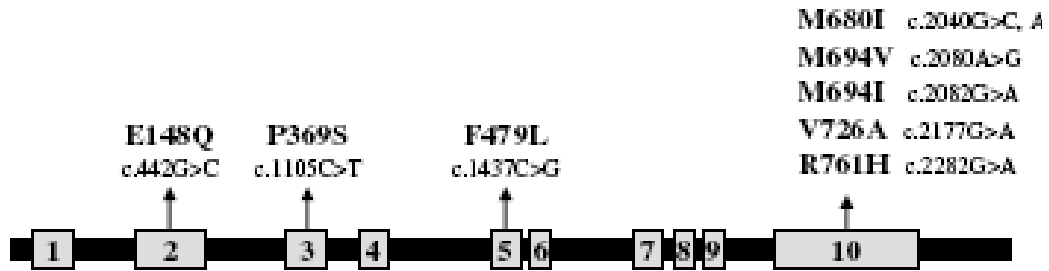
2.2.2.4. AAA Etiyolojisinde MEFV Geni Ve Mutasyonları

AAA hastalığından sorumlu MEFV geni, 1997 yılında, biri Fransız, diğeri uluslararası araştırmacılarından oluşmuş iki ayrı ekip tarafından, eşzamanlı olarak, 16p13.3 bölgesinde 3.232.028-3.246.627 bç arasına konumlanmıştır (Şekil 2.16).



Şekil 2-16: 16 kromozomda MEFV geninin bulunduğu bant

Gen on eksondan oluşmaktadır. Tanımlanan mutasyonların çok büyük bir kısmı, nükleotid yer değiştirmesi tipinde olup, genellikle 10. eksondadır (Paut ve ark. 2000) (Şekil 2.17).



Şekil 2-17 MEFV geninde sık rastlanan mutasyonlar – Moutereau (2004)’ten

MEFV allellerinde bulunan mutasyonlara göre üç ayrı fenotip tanımlanmıştır:

- (i) Fenotip I: Belirgin AAA. Hastalıkla ilgili çoğu belirti, M694V mutasyonu başta olmak üzere, sık rastlanan mutasyonların gözleendiği ve bu mutasyonlar ile klinik tablonun ağırlaşma eğilimi arasında ilişki bulunan hastalar.
- (ii) Fenotip II: İzole amiloidoz. İlk veya tek belirti olarak amiloidozu bulunan ve M694V mutasyonuna çok sık rastlanan hastalar.
- (iii) Fenotip III: Sub/Pre-klinik AAA. Klinik olarak hasta olmayan ancak MEFV mutasyon taşıyıcısı olanlar.

III. fenotip kapsamında çoğunlukla, E148Q ve V726A mutasyonlarına rastlanmaktadır. Bu kategorideki kişiler, diğer iki kategoridekilerden çok daha fazla olup, bu fenotipin ortaya çıkışını etnik köken etkilemektedir (Kogan ve ark. 2001).

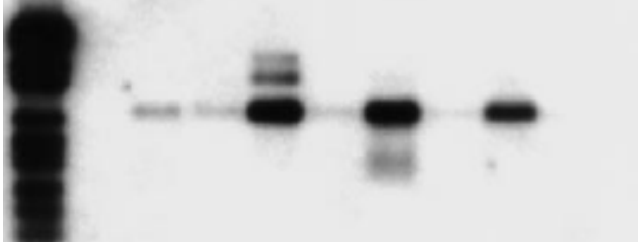
AAA hastalığına yol açan MEFV mutasyonlarının hemen hepsi, yanlış anlamli değişikliklerdir. 2007 yılına dek, MEFV mutasyonlarının yalnızca birinin çerçeve kayması tipinde ve kodlayıcı dizinin 5'ucuna yakın bir yerde olduğu bildirilmiş olup, herhangi bir sıfırlayıcı mutasyon tanımlanmamıştır. Yanlış anlamli yerine koyma mutasyonları, periyodik paralizi, orak hücre anemisi gibi "periyodik" fenotip gösteren, birkaç genetik hastalığın genel özelliğidir. Bu gibi durumlarda oluşan farklı gen ürününde, çevresel tetikleyici koşullara uyum sağlanacak miktarda işlev kaldığı sanılmaktadır (Ting ve ark. 2006).

E148Q mutasyonu, en sık rastlanan beş mutasyondan biri olup, bazı durumlarda klinikle ilişkisiz bir polimorfizm olarak kabul edilmiştir. Bu mutasyon başka bir mutasyonla birlikte, hastalığın kendini göstermesine neden olabilir (Stoffman ve ark. 2000). E148Q mutasyonu ile ilişkili klinik bulgular oldukça değişken olmasına karşın, semptomatik kişilerde Kolşisin kullanımına başlanmalıdır (Topaloglu ve ark. 2005). Bu mutasyonu asemptomatik olarak taşıyan hastalarda, subklinik inflamasyon varlığı, serum akut faz yanıtı göstergeleriyle ölçülebilmektedir. E148Q mutasyonu, örneğin TNFRSF1A'daki R92Q gibi, başka otoinflamatuvar hastalık genlerine ait mutasyonlarla beraber bulunduğu, hastalığa ait mutasyonu değiştirici bir etki gösterip, daha ağır fenotipe neden olur (Stojanov ve ark. 2004b).

MEFV tanımlanmadan önce, otoimmün bir hastalık olarak kabul edilen AAA'daki atakların, yorgunluk, enfeksiyon ve duyulanım durumunu zorlayıcı koşullarda arttığı bildirilmiştir. MICA (major histocompatibility complex class I chain-related gene A) adlı proteinde bulunan Hsp-70 benzeri ısı-şok elemanından yola çıkarak, stresle uyarılan organizmada, MICA'nın organizmaya ait bir antijen gibi davrandığı bulunmuştur. Bu HLA antijeni, Behçet hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada MICA'nın, MEFV geninden bağımsız olarak, AAA hastalığını değiştirici etkisi olduğu bulunmuştur. Değişim, hastalık başlangıç yaşı ve atak sıklığıyla ilişkilendirilmiş, ancak klinik belirtilerin gözleendiği bölgeleri etkilemediği bulunmuştur (Touitou ve ark. 2001). Ayrıca, MICA geni A5 allelinin, amiloidoz gelişimi üzerine koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Türkçapar ve ark. 2007).

2.2.2.5. MEFV Gen İfadesi

MEFV geni, başlıca granülosit, monosit ve lökosit gelişiminin erken dönemlerinde, ayrıca dalak, akciğer ve kaslarda yoğun olarak ifade edilmektedir. Akciğer ve kaslarda, bu bölgelere özgü makrofaj infiltrasyonu ve nötrofil kontaminasyonu nedeniyle, MEFV geni daha fazla miktarda ifade olmaktadır (Tidow ve ark. 2000; McDermott ve Aksentjevich 2002) (Şekil 2.18).



Şekil 2-18: Çeşitli dokularda MEFV gen ifadesi (sırasıyla: kalp, böbrek, dalak, karaciğer, akciğer, ince barsak, kas, prostat, over) – Tidow (2000)’den

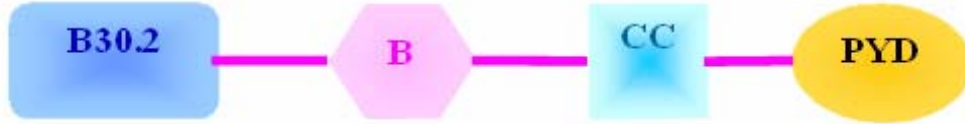
MEFV promotörü, myeloid hücrelere özgü promotörler ile büyük ölçüde benzeşiktir. İn vitro koşullarda, IFN- α , IFN- γ , TNF ve lipopolisakkaritler monositleri uyardıklarında, MEFV ifadesi tetiklenir. IL-4, IL-10 ve TGF β (transforming growth factor β) ise MEFV ifadesini baskılar. IFN- γ ’nın, hızlı MEFV ifadesi tetiklemesi, sikloheksimide dirençlidir. Kolşisin varlığında, IFN- α ve IFN- γ , granülositlerdeki MEFV ifadesini artırır (Centola ve ark. 2000). TNF α ile uyarılan hücrelerde, genin 5’ ucuna yakın 243 bç’lik bölge, MEFV ifadesini arttırmaya yeterlidir (Papin ve ark. 2003).

MEFV geni fibroblastlarda ifade edildiğinde, C5a etkinleşmesi baskılanır (Matzner ve ark. 2000). MEFV geni, ülseratif kolit hastalığını değiştirebilir. Homozigot MEFV mutasyonları, Behçet hastalığında amiloidoz gelişme riskini arttırdığı için, bu hastalarda koruyucu doz Kolşisin kullanılmalıdır (Akpola ve ark. 2002; Giaglis ve ark. 2006).

MEFV geni, lökosit apoptoz ve IL-1 β salgılanmasını değiştirerek, NF κ B yolağının etkinleşmesiyle, inflamasyonda rol alır (Giaglis ve ark. 2006).

2.2.2.6. MEFV Gen Ürünü: Pirin Proteininin Yapısı Ve Sık Rastlanan Mutasyonların Etkilediği Alanlar

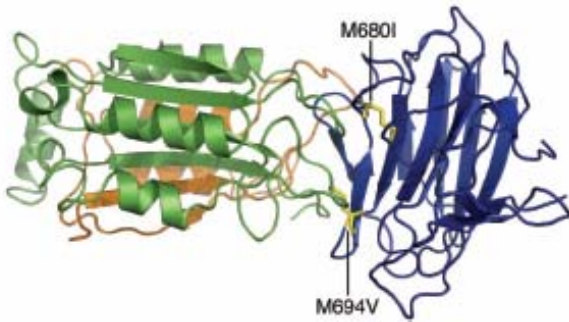
MEFV geninin ürünü olan, 781 amino asitlik pirin proteininin amino ucundan karboksil ucuna doğru, 92 amino asitlik PİRİN, bükümlü büküm, B-kutu çinko parmak ve B30.2 (veya rfp) alanları bulunur (Mansfield ve ark. 2001) (Şekil 2.19).



Şekil 2-19: Pirin proteininin temel yapısı ve proteini oluşturan alanlar

Pirin, amino ucundaki 90 amino asitlik PİRİN (PYD/PAAD/DAPIN olarak da isimlendirilmektedir) alanında hemen hiç mutasyona rastlanmaz. AAA'ya yol açan pirin mutasyonlarının çoğu, karboksil ucundaki 200 amino asitlik B30.2 (PRYSPRY, rfp) alanında oluşur. B30.2 alanının, değişik görevleri olan yaklaşık 500 farklı proteinde bulunduğu ve proteinler arası etkileşimleri düzenlediği anlaşılmış olsa da, pirindeki işlevi net değildir. B30.2 alanının, karboksil ucunda 139 amino asitlik bir SPRY parçası (çift amaçlı SPIA kinaz ve RYanodin almaçısıyla ilişkili) ve amino ucunda 61 amino asitlik bir PRY alt bölgesi bulunmaktadır (McDermott ve Aksentijevich 2002; Liepinsh ve ark. 2003).

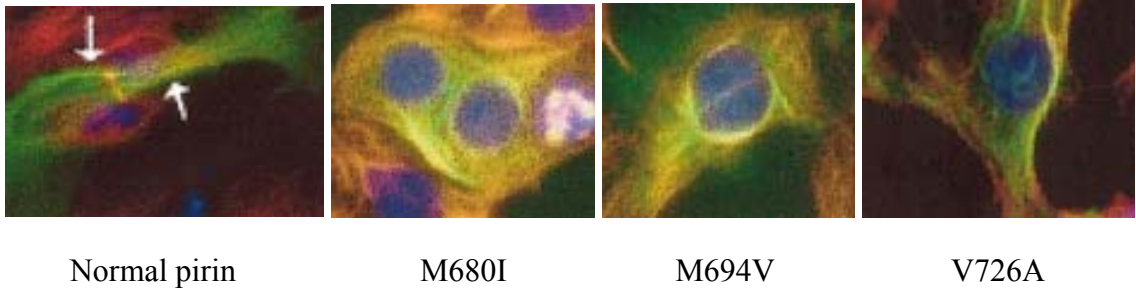
Pirindeki B30.2 alanı, kaspaz-1'in alt birimleri olan p20 ve p10'a bağlanarak, katalitik etkinliği baskılar. M694V ve M680I gibi sık rastlanan MEFV mutasyonları, bu etkiyi ortadan kaldırır (Chae ve ark. 2006) (Şekil 2.20).



Şekil 2-20: MEFV mutasyonlarının protein yapısını etkilediği bölgeler – Chae (2006)'dan

2.2.2.7. Pirin Proteininin Hücre İçi Yerleşimi

Pirin, hücrede tek bölgede bulunmaz. Sinyal ileterek, gen yazılımı etkinleştiren proteinlerin, sitoplazmada monomerik olarak ifade edilip, belli etkenlere yanıt olarak dimerize olmaları ve etkilerini gerçekleştirmek üzere, hücre çekirdeğine geçişleri gibi, hücre içi yer değişimleri gösterir (Tidow ve ark. 2000). Amino ucu mikrotübüllere bağlanır; dolayısıyla karboksil ucundaki B30.2 alanını etkileyen mutasyonlar, bu bağlanmayı etkilemez. Phalloidinle boyandığında, çekirdek etrafında ve çevresel düzlemsel kabarıklıklarda, aktinle beraber yer aldığı görülür (Mansfield ve ark. 2001) (Şekil 2.21). Alternatif kırılma sonucu oluşan ve 2. eksonu bulunmayan pirinin, hücre çekirdeğine girdiği, doğal haldeki pirinin, monositlerin sitoplazmasında; granülosit, dendritik hücre ve sinovyum fibroblastlarının ise çekirdeklerinde bulunduğu gözlenmiştir (Ting ve ark. 2006).



Şekil 2-21: Pirinin hücre içi yeri, mutasyonlara göre yer değişimi – Mansfield (2001)’den

2.2.2.8. Pirin Proteinini İşlevleri Ve Yapısında PİRİN Alanı Bulunan Başka Proteinlerle Olan Etkileşimler

İnflamasyon ve apoptoz yollarında gerçekleşen sinyal iletimi ve protein oligomerleşmesi gibi olaylar, proteinler arası homotipik etkileşim alanlarıyla yürütülür. Bu alanlarda yer alan proteinler, ölüm alan-katlanma üst ailesinin üyesidir. Bu protein ailesinin, PİRİN dışında üç üyesi bulunur: Ölüm alanı (DD=death domain), ölüm etkileyici alan (DED=death effector domain) ve kaspaz çekim alanı CARD (CAspase-Recruitment Domain). Bu alanların hepsinde, antiparallel olarak dizilmiş altı α -sarmal yapısı vardır ve bu yapılar karşılıklı alanların (ölüm alanıyla, karşısındaki ölüm alanı gibi) elektrostatik yük etkileşimleri yoluyla, birbirine bağlanmasına olanak tanır (Stojanov ve Kastner 2005).

Pirin, ASC’ye PİRİN alanıyla bağlanır (Pycard/ASC). Kaspaz-1 çekimi sonucu, süreç interlökin-1 üretimi, NF κ B düzenlenmesi ya da apoptoz ile devam eder. Pirinin antiinflamatuvar etkisi, farede hedefli pirin bozulması sonucu, interlökin-1 işlenmesinin

artması ve periton monositlerinde lipopolisakkarid ve interlökin-4'le uyarılan apoptozun bozulmasıyla gösterilmiştir (McDermott ve Aksentijevich 2002).

Pirinin amino ucundaki PİRİN alanı, normal koşullarda apoptoz yolağında da rol oynayan ve CARD alanı bulunan ASC'nin, PİRİN alanıyla etkileşime girerek, inflamasyon yolağında daha alt basamakların tetiklenmesini engeller (Srinivasula ve ark. 2002; Liepinsh ve ark. 2003; Stehlik ve Reed 2004).

2.2.3. Üç Sendromdan Oluşan Otoinflamatuvar Hastalık Grubu: Kriyopirinopatiler

Kriyopirinopatiler, klinik şiddetleri birbirinden farklı, ancak belirtileri birbiriyle örtüşen, üç ayrı hastalıktan oluşan otoinflamatuvar hastalık grubudur. Bu hastalıklar, ailevi soğuk ürtikeri sendromu-FCAS (**F**amilial **C**old **A**utoinflammatory **S**ndrome), Muckle-Wells sendromu-MWS ve kronik infantil nörolojik kutanöz artiküler sendrom CINCA (**C**hronic **I**nfantile **N**eurologic **C**utaneous **A**rticular syndrome) (ABD'de NOMID, Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease, olarak isimlendirilir)'dir.

Bu grup hastalık otozomal baskın modelde kalıtılır (Grateau 2004). Bazı hastalarda, aile öyküsü bulunmaması, otozomal baskın kalıtımda rastlanabilecek olan penetrans eksikliği akla getirmeli ve kriyopirinopati tanısından uzaklaştırmamalıdır (Aksentijevich ve ark. 2002; Dode ve ark. 2002; Feldman ve ark. 2002; Arostegui ve ark. 2004).

2.2.3.1. Kriyopirinopatilerin Klinik Tablosunda Sık Karşılaşılan Bulgular

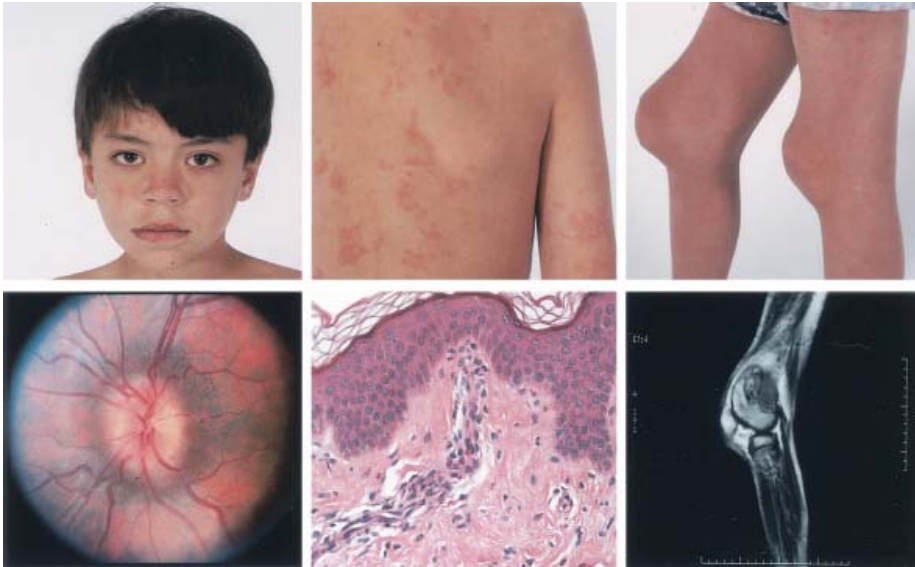
Kriyopirinopatilerden MWS'de, genellikle çocuklukta olmak üzere, 20 yaşına kadar bir dönemde ortaya çıkan kaşıntısız, ürtiker benzeri döküntüye rastlanır. Histolojik olarak, mast hücrelerinden çok, lenfosit ve nötrofil birikimi olması, bu döküntüleri gerçek ürtiklerden ayırır. Konjunktivit, hem FCAS hem de MWS'de; sensörinöral işitme kaybı ve sistemik amiloidozun ise, hem MWS hem de CINCA'da görülmesinden anlaşılabileceği gibi, bazı belirtiler birkaç hastalıkta birden bulunur.

FCAS'da ortalama 12 saat süren ateş ataklarına, ürtiker benzeri döküntü ve poliartralji eşlik eder. Atak soğuk bir ortamda kaldıktan birkaç saat sonra başlar (Grateau 2004; Kagami ve ark. 2006).

MWS'da, atak başlangıcı soğukla ilişkisizdir. Ürtiker benzeri döküntünün yanısıra ateş, halsizlik, konjunktivit, ekstremiteler, karın ve eklem ağrısı vardır. Sensörinöral işitme kaybı ve sistemik amiloidoz da gelişebilir. Ürtikerin yanısıra,

inflamatuvar ataklarda konjunktivit ve daha az sıklıkla artrit bulunur. Bazı ailelerde papiller ödem, endokrin anormallik, aftöz ülser, abdominal herni, dismorfojik bulgular bulunması, klinik tablodaki değişkenliği gösterir. MWS'deki üç temel özellik: (i) ürtiker tipi döküntüler, (ii) ilerleyici sensörinöral işitme kaybı ve (iii) amiloid nefropatisidir (Kagami ve ark. 2006).

En ağır tablo, CINCA'da gözlenir. Klinik şiddette dalgalanmalar olsa da, hastalık sürekli etkinliğini korur. Ateş, işitme kaybı, amiloidoz ve kondrosit tutulumundan kaynaklanan artralji yanı sıra, uzun kemik epifizleri ve patellada büyüme kıkırdağı hipertrofisi şeklinde özellikli patolojik bulgular, başlıca dizlerde belirgin olan ağır deformasyon ve kemik gelişim gecikmesine yol açan artropati, çocukluk döneminde şiddetli baş ağrısına neden olan kronik aseptik menenjit, kasılma, spastisite, motor eksiklik, beyin atrofisiyle beraber gözlenen mental retardasyon gibi nörolojik bulgular ve konjunktivit, üveit, optik atrofi ile papillit gibi görme kaybına yol açabilen oküler tutulum da sıklıkla gözlenir. Hastaların birbirine benzer bir görünümde olmasına yol açan, özgün yüz dismorfolojisi sık rastlanan bir özelliktir. Bazı hastalarda, eozinofili veya koagülopati ortaya çıkar. Menenjit gelişirse, elde edilen serebrospinal sıvı steril olmakla beraber, bol miktarda nötrofil içerir (Feldman ve ark. 2002; Grateau 2004; Kastner 2005; Samuels ve Özen 2006) (Şekil 2.22).



Şekil 2-22: CINCA sendromu, klinik, histolojik ve radyografik belirtileri – Aksentijevich (2002)'den

MWS ile CINCA sendromları arasındaki sınır kesin olmadığından, önce MWS tanısı konan bazı hastaların, daha sonra CINCA olduğuna karar verilmesi çok sık rastlanan bir durumdur (Grateau 2004; Hawkins ve ark. 2004).

2.2.3.2. Kriyopirinopatilerin Tedavisi

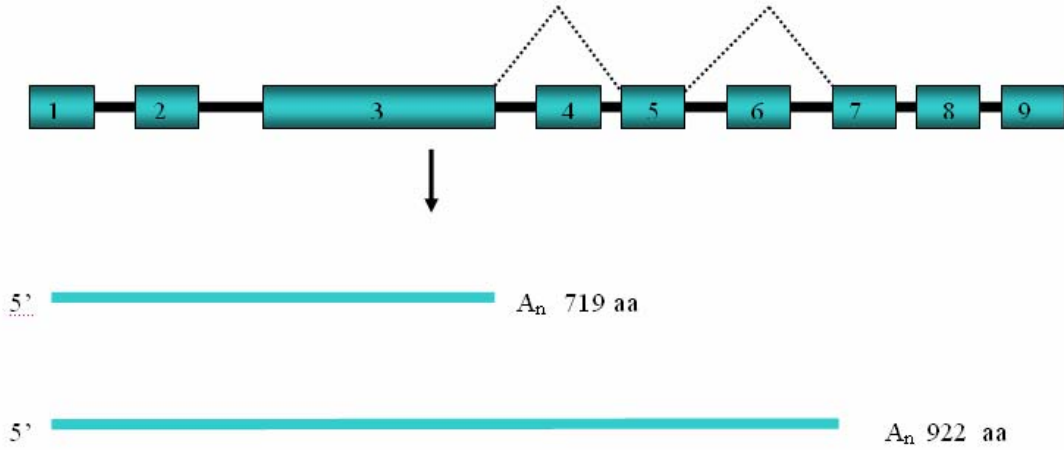
CINCA hastalığında, intratekal metotreksat ve anti-IL-6 antikorları kullanılmıştır (Stojanov ve ark. 2004a). CIAS1 mutasyonu sonucu oluşan kriyopirin, IL-1 sinyal yolunu etkinleştirdiğinden, erişkin romatoid artritli hastalarda başarıyla kullanılan, IL-1 α ile IL-1 β bağlanmasını yarışmalı baskılayan Anakinra'nın, CINCA hastalığında da faydalı olduğu gösterilmiştir (Boschan ve ark. 2006).

2.2.3.3. Kriyopirinopati Etyolojisinde CIAS1 Geni Ve Mutasyonları

Kriyopirinopatiler, CIAS1 (Cold Induced Autoinflammatory Syndrome 1)/PYPAF1 (PYrin containing APAF-1 like protein)/NALP3 adlı gendeki, otozomal baskın mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. (Grateau 2004; Masters ve ark. 2006).

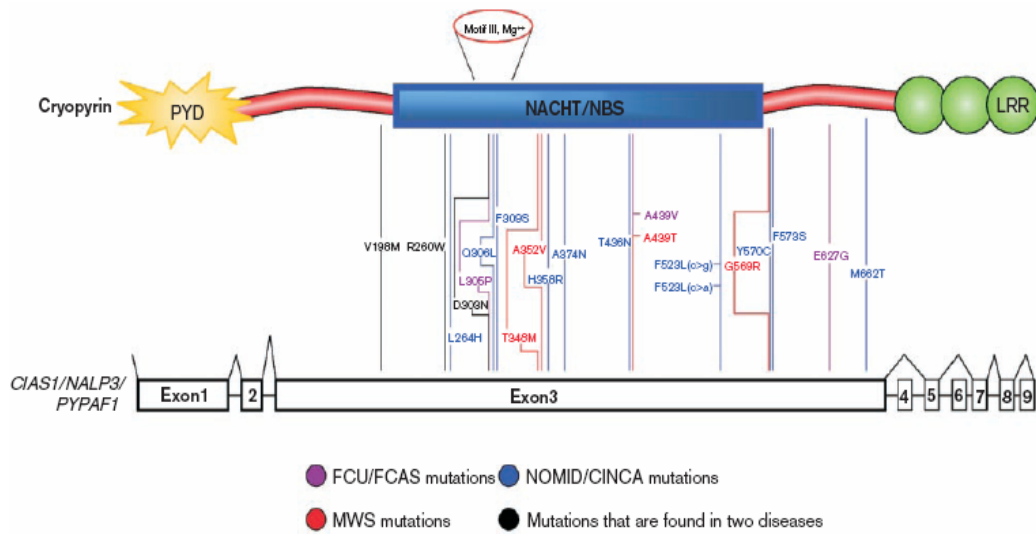
CIAS1 geni, 2001 yılında pozisyonel klonlama tekniğiyle, 1q44'te 10 cM boyutunda bir bölgede haritalanmıştır (Hoffman ve ark. 2001). Dokuz eksonlu CIAS1'in, 3105 bç'lik açık okuma çerçevesi bulunur (Hoffman ve ark. 2003). CIAS1'in kısa, orta ve uzun olmak üzere üç izoformu bulunur. Kısa olan izoform, 1, 2 ve uzun bir 3. ekson tarafından kodlanır, bir durdurma kodonu ve poli(A) kısmı vardır. Orta boy izoform, 4 ve 6. dışında kalan eksonlarca kodlanır. Uzun olan izoformun kodlayıcı dizisi, birinci eksonun ilk ATG'sinde başlayıp, 9. eksondaki durdurma kodonunda sona ermektedir (Aganna ve ark. 2002).

Her ne kadar, ilk ekson içinde bulunan iki potansiyel başlangıç kodonundan, ikincisi Kozak dizisine daha uyumluysa da, bazı araştırmacılar, ilk ATG'yi başlangıç kodonu olarak kabul eden belirlemeler yapmışlardır. Bu durum, numaralandırma sisteminde iki amino asitlik farka neden olabileceğinden, bazı makalelerde V198M, L305P ve R260W olarak belirtilen mutasyonlar, diğer yayınlarda V200M, L307P ve R262W olarak geçebilmektedir (Aganna ve ark. 2002) (Şekil 2.23).



Şekil 2-23: CIAS1 geni ekson ve intron yapısı. Kutucuklar eksonları göstermektedir. 3-5. eksonlar ile 5-7. eksonların üstündeki noktalı çizgiyle gösterilen kısımlar, alternatif kırılma bölgelerini göstermektedir. Bu kırılmalar sonucu oluşan kısa transkript (719 aa) ve uzun transkript (922 aa) altta gösterilmiştir – Aganna (2002)’den

Kriyopirinopatiler ile ilişkili net genotip-fenotip bağlantıları kurulamamıştır. Bu üç ayrı klinik tablonun oluşumunda, başka gen ve/veya çevresel etmenlerin de önemli roller oynadığı düşünülmektedir. CINCA hastalarının yarısında, herhangi bir mutasyon bulunamaz. Genellikle tek bir mutasyon bulunmasına karşın, üç hastalığa ait özelliklerin karışık olarak yer aldığı bir klinik tablo gözlenir (Şekil 2.24). Bazı ailelerde, hasta bireylerle aynı mutasyonu taşıyan, sağlıklı kişilere rastlanması, tam olmayan penetrans varlığına işaret eder (Samuels ve Özen 2006).

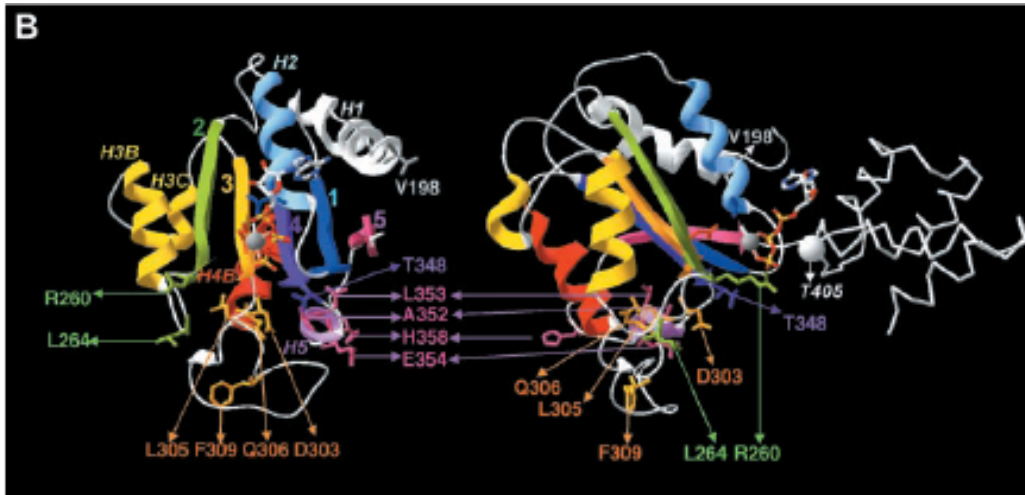


Şekil 2-24: Kriyopirinopatilerle ilişkilendirilen CIAS1 gen mutasyonları – McDermott (2002)’den

Bir hastada tanımlanan, somatik Y570C mutasyon mozaikliği, mutasyon taramasında periferik lökosit DNA'sının güvenilir olmayabileceğini göstermiştir (Saito ve ark. 2005). CIAS1'de oluşan bir mutasyonun, kriyopirinopatilerden hangisine neden olacağı kestirilemez, örneğin R260W mutasyonu, hem MWS hem de FCAS'ta, D303N mutasyonu ise hem MWS hem de NOMİD'de bulunmuştur (Aksentijevich ve ark. 2002; Dode ve ark. 2002). V200M mutasyonu FCAS ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen (Hoffman ve ark. 2001), aynı mutasyonu taşıyan iki kişide klinik belirti görülmemiştir (Aganna ve ark. 2002).

2.2.3.4. CIAS1 Gen İfadesi Sonucu Oluşan Kriyopirin Proteininin Yapısı Ve Hücre İçi Yerleşimi

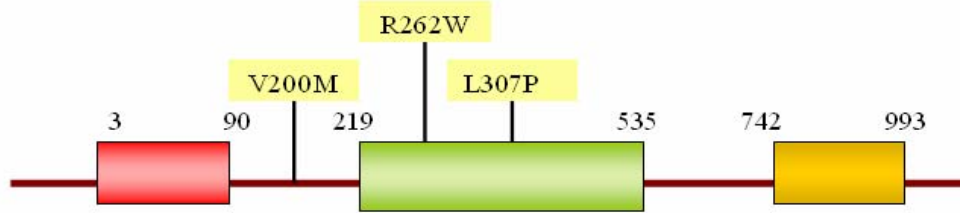
Başlıca monosit, nötrofil ve kondrositlerde ifade edilen kriyopirin, 105.7 kD ağırlığında olup, 920 amino asit içerir. Amino ucunda, 90 amino asitten oluşan PİRİN, ortasında ve üçüncü ekson tarafından kodlanan bölgede NACHT (NBS veya NOD olarak da isimlendirilir), karboksil ucunda ise LRR alanı bulunur. Kriyopirinin, çekirdek yerleşim sinyali veya belirgin bir zargeçen alanı yoktur. CIAS1 geninin tamamı, yani dokuz eksonu tarafından kodlanabilecek potansiyel protein, 117,9 kD ağırlığında, 1034 amino asitli olup, karboksil ucunda 11 adet LRR bulundurur (Hoffman ve ark. 2001; Feldmann ve ark. 2002; Hoffman ve ark. 2003; Dowds ve ark. 2004). Kriyopirin sitozol yerleşimlidir (Manji ve ark. 2002; Saito ve ark. 2005) (Şekil 2.25).



Şekil 2-25: Kriyopirin proteininin üç boyutlu yapısı ve sık gözlenen mutasyonlar – Neven (2004)'den

2.2.3.5. CIAS1 Gen Mutasyonlarının Kriyopirin Proteininde Etkilediği Alanlar Ve Bunların Fenotipe Yansıması

Kriyopirinopatilere yol açan ve çoğu CIAS1'in üçüncü eksonunda toplanan mutasyonlar, kriyopirinin NACHT alanını etkiler. Bu alan içinde, birkaç farklı motif bulunur. Bunlar, nükleotid ve Mg^{+2} bağlayıcı olan, sırasıyla Walker A ve B olarak isimlendirilen motiflerdir. Hastalıkla ilişkilendirilmiş mutasyonların çoğu, Mg^{+2} bağlayıcı motifin yakınında toplanmıştır. Kriyopirin ile ASC birleşmesi, kaspaz-1 etkinleşmesi yoluyla, interlökin-1 işlenmesini uyarır ve sonuçta NF κ B etkinleşir. CIAS1 mutasyonlarının, NF κ B etkinleşmesiyle ilişkili sonuçları, mutant olmayan kriyopirinin antiapoptotik etkisi olduğunu düşündürür (Aksentijevich ve ark. 2002; Feldman ve ark. 2002; McDermott ve Aksentijevich 2002; Dowds ve ark. 2004; Grateau 2004; Neven ve ark. 2004). CINCA sendromunda rastlanan iskelet sistemi bulgularından olan aşırı epifiz büyümesi sonucu deforme edici artropati oluşumu, normalde belli bir düzeyde oluşması gereken apoptozun, mutasyonlar sonucu bozulduğunu göstermektedir (Feldman ve ark. 2002).



Şekil 2-26: 1035 amino asitten oluşan kriyopirin proteini ve yapısındaki alanlar – Aganna (2002)'den

Kriyopirinopatilerle ilişkilendirilmiş, NACHT alanını etkileyen, yanlış anlamalı R260W, D303N, E627G mutasyonlarının oluşturduğu fenotip işlev kazanımı şeklinde olup, bu hastalıklarda gözlenen baskın genetik kalıtım modeliyle uyumludur. Mikrobik ligandların etkinleşmeyi uyarmasına benzer şekilde, mutasyonlar da kriyopirinin ASC'ye bağlanmasını artırır (Dowds ve ark. 2004) (Şekil 2.26).

Yanlış anlamalı birçok mutasyona karşın, Arg554X tanımlanan tek anlamsız mutasyondur. Bu mutasyonun saptandığı hastada, soğuk havada artış dışında AAA kliniğine benzer şekilde fenotipik etkiler gözlenmiş, ayrıca başlangıç yaşının FCAS'a

göre daha erken olduğu ve hastada ürtiker ile konjuktivit bulgularının bulunmadığı anlaşılmıştır. Aynı mutasyon, hastanın annesinde de saptanmış, ancak hiç klinik belirtisi olmadığından, penetrans eksikliği düşünülmüştür. Arg554X mutasyonu, kriyopirinin LRR alanınının eksik kalmasına ve NFκB sinyal baskılanmasının bozulmasına yol açmıştır (Jeru ve ark. 2006).

CIAS1, sitokin ve TLR agonistleri gibi proinflamatuvar maddelerle uyarılınca, NFκB sinyalini azaltarak düzenleme yapar. NFκB p65 alt ünitesinin hücre çekirdeğine geçişi, CIAS1 gen ifadesinin yoğunluğuna göre baskılanır (O'Connor ve ark. 2003). Kriyopirin eksikliği, TNF-α ve IL-6 salgılanmasını, ayrıca NFκB ve mitojenle etkinleşmiş protein kinazların işlevini etkilemez (Kanneganti ve ark. 2006).

2.2.4. Pirin Ve Kriyopirin Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Sonuçları

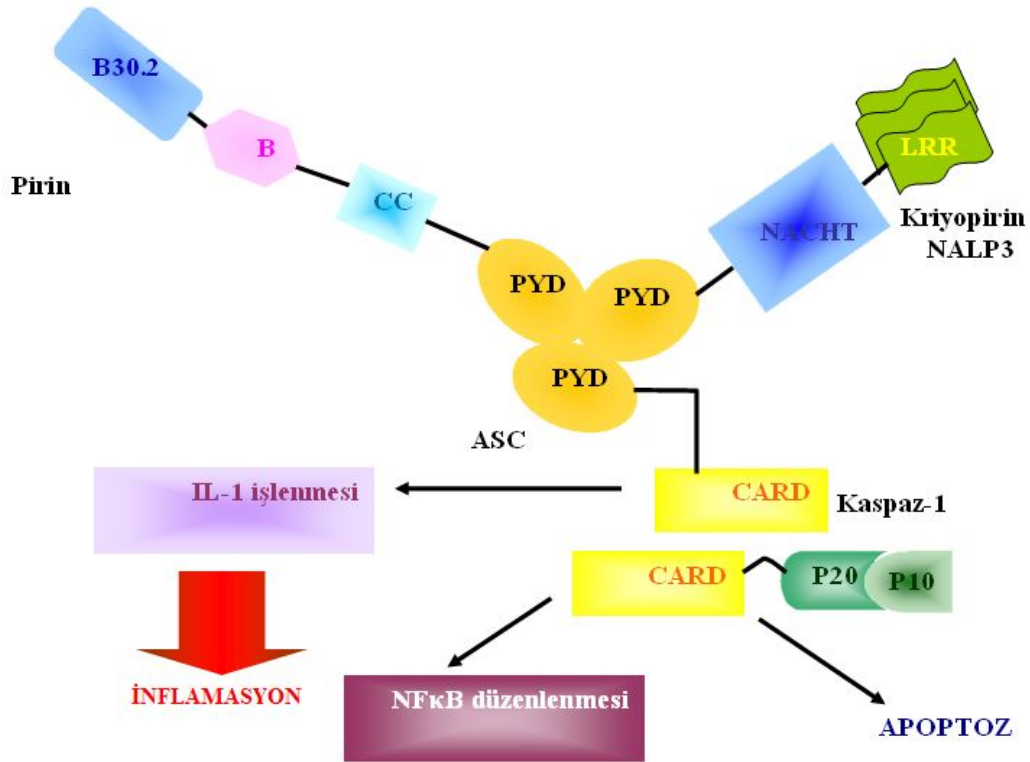
Pirin ASC'ye bağlanmak için, kaspaz-1'le yarışarak IL-1β üretimini düzenler. Ayrıca pirin, kriyopirin ile ASC etkileşimlerini de ters yönde etkiler. Dolayısıyla, pirin, kriyopirin aracılı sitokin üretim sinyalinin, birkaç noktasında etkide bulunur. ASC yokluğunda ve çok miktarda kriyopirin üretildiğinde, hem IL-1β salgılanması, hem de TNFα tarafından uyarılan NFκB yer değişimi azalır. ASC azaldığında, kriyopirin baskılama işlevini yürütür. Kriyopirin, ASC ve pirin arasındaki etkileşimlerin net sonucu, herbirinin birbiriyle olan dengesine bağlıdır (Stehlik ve ark. 2002; Chae ve ark. 2003; Dowds ve ark. 2003; Rosengren ve ark. 2005).

Pirindeki PİRİN alanı, kriyopirin ile ASC bağlanmasını engeller ve inflamatuvar zinciri sınırlar. Ancak CIAS1 mutasyonları sonucu oluşan kriyopirin, bu baskılamanın üstesinden gelerek, daha alt düzeylerde etkinleşmenin devamı yoluyla IL-1 ve NFκB'nin artışı sağlar (Samuels ve Özen 2006) (Şekil 2.27).

Pirin proteininin, PİRİN alanında mutasyonlara nadir rastlanır. Bu alanda oluşan R42W mutasyonunun da AAA fenotipine neden olduğu gösterilmiştir. Bu amino asit grubu, NALP1 proteini PİRİN alanındaki, A43 amino asit grubuna denk gelmektedir. PİRİN alanının üç boyutlu yapısı incelendiğinde, NALP1 PİRİN alanının, 2 ve 4. α sarmalları arasında kalan kısımda, diğer ölüm bölgesi üst ailesi katlantılarından farklı olarak, esnek bir ilmek oluşumu gözlenmiştir. A43 amino asit grubunun esnek ilmekteki yeri, bu bölgenin apoptoz veya inflamasyonu tetikleyen protein-protein etkileşimlerinde işlevi olduğunu düşündürür (Hiller ve ark. 2003).

Mutant pirinin, PİRİN alanı ile ASC arasında etkileşim zayıfladığından, ASC ve kriyopirin, kendi PİRİN alanları arasında daha serbest bağlanabilirler. Mutant pirin nedeniyle oluşan bu durumda, kaspaz-1 etkinleşir, IL-1 β salınır ve inflamasyon patlaması yaşanır. Ayrıca NF κ B salınımı da inflamasyona katkıda bulunur (Samuels ve Özen 2006).

Hem AAA atakları sırasında, hem de ataklar arası dönemlerde, MEFV ve CIAS1 gen ifadesinin de azaldığı belirlenmiştir (Üstek ve ark. 2007).



Şekil 2-27: Amino ucunda PYD alanı olan proteinler, ASC ile etkileşimleri sonucu inflamasyonu düzenlerler – McDermott (2002)’den

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Ve Kontrol Grubu

Çalışma grubu, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda (Not: Bundan sonraki bölümlerde “laboratuar” olarak belirtilecektir) MEFV geninde mutasyon analizi yapılmış, 192 kişiden oluşturulmuştur.

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen araştırma çalışmaları kapsamında kullanılmak üzere, gönüllü ve sağlıklı hastane personelinden daha önce elde edilmiş ve benzer diğer çalışmalarda da kullanılan 81 DNA örneğinden, kontrol grubu olarak faydalanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (+4) (İndesit – RG2330)
- Derin dondurucu (-20) (Ariston – ETUP 527 SL)
- Hibridizasyon fırını (Thermo Scientific – Hybaid 6242)
- Güç kaynağı (Thermo Scientific – EC 250-90)
- Mini cell submarine elektroforez sistemi (Thermo Scientific – EC 370M)
- Manyetik ısıtmalı karıştırıcı (Velp Scientifica - ARE)
- Hassas terazi (Shimadzu Libror EB-3200 HU)
- Vortex (Velp Scientifica – ZX3)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich)
- Masaüstü soğutmalı mini santrifüj (Hettich Mikro - 200)
- Termal döngü cihazı (Techne TC-312)
- Otomatik mikro pipet seti (0-2µl, 2-10 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl) (Eppendorf)
- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Courmat)
- Otomatik DNA dizileme cihazı (ABI Prism 3100)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde Ve Malzemeler

- Magnezyum klorür 25 mM (Fermentas - Litvanya)
- dNTP (Fermentas - Litvanya)
- Taq DNA polimeraz 5 U/μl (Sigma - ABD)
- Agaroz (Sigma - ABD)
- Etidyum bromür (Sigma - ABD)
- Tris baz (Carlo Erba - İtalya)
- Borik asit (Merck - Almanya)
- Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Amresco - ABD)
- Bromfenol mavisi (Sigma - ABD)
- Sukroz (Merck - Almanya)
- DNA belirtgeci 100 bç (Promega - ABD)
- 10X restriksiyon enzim tamponu – No.3 (New England Biolabs - ABD)
- 10X restriksiyon enzim tamponu – K (Promega - ABD)
- 10X restriksiyon enzim tamponu – No.2 (New England Biolabs - ABD)
- TaqI* endonükleaz 10 U/μl (New England Biolabs - ABD)
- Hsp92II* endonükleaz 10 U/μl (Promega - ABD)
- AluI* endonükleaz 10U/μl (New England Biolabs)
- Sığır serum albümini (BSA) (Fermentas - Litvanya)
- DMSO (Fermentas - Litvanya)
- DNA saflaştırma kiti (Marligen Biosciences)
- BigDye Terminator v3.1 döngü dizileme kiti (Applied Biosystems)
- NaAc (Riedel de Haen - Almanya)
- EtOH (Riedel de Haen - Almanya)
- Formamide (Merck - Almanya)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Tampon Ve çözeltiler

3.1.4.1. Polimeraz Zincir Tepkimesinde (PZR) Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

-10X PZR tamponu:

10 mM Tris-HCl (pH=8)

20 mM NaCl

0,02 mM EDTA

0,2 mM DTT (%19 gliserol, %0,2 TritonX-100)

-Nükleotid karışımı (dNTP): 12,5 mM

Ticari olarak hazırlanmış 100 mM'lık ana stoktan, herbir nükleotidin son derişimi 12,5 mM olacak şekilde, dört nükleotid (Guanin-G, Adenin-A, Timin-T, Sitozin-C) içeren karışım hazırlandı.

3.1.4.2. Agaroze Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

- Etidyum bromür (EtBr):

10 mg/ml

-10X TEB:

54 g Tris-baz

27,5 g Borik asit

3,72 g EDTA (pH=7,4)

-6X yükleme tamponu:

%25 (w/v) bromfenol mavisi

%40 (w/v) sukroz

3.1.4.3. Restriksiyon Enzim Kesiminde Kullanılan Endonükleaz Ve Tampon Çözeltiler

-R262W mutasyonu için *TaqI* endonükleaz (10 U/μl) ve 10X enzim kesim tamponu

50 mM Tris-HCl (pH=7,9; 25°C)

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM Ditioreitol

TaqI endonükleazının tanıdığı nükleotid dizisi ve kesim bölgesi



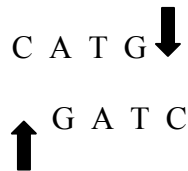
-V200M mutasyonu için *Hsp92II* endonükleaz (10 U/μl) ve 10X enzim kesim tamponu

10 mM Tris-HCl (pH=7,4; 37°C)

150 mM KCl

10 mM MgCl₂

Hsp92II endonükleazının tanıdığı nükleotid dizisi ve kesim bölgesi



-L307P mutasyonu için *AluI* endonükleaz (10 U/μl) ve 10X enzim kesim tamponu

10 mM Tris-HCl (pH=7,9; 25°C)

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM Ditioreitol

AluI endonükleazının tanıdığı nükleotid dizisi ve kesim bölgesi

A G ↓ C T

T C ↑ G A

-Sığır serum albümini (BSA):

100 µg/ml

3.1.4.4. PZR-RFLP Ve DNA Dizilemesi Yöntemlerinde Kullanılacak Primer Dizileri

İncelenecek farklı mutasyonlar ve DNA dizilemesi için kullanılacak, ticari olarak sentezletilerek, liyofilize halde gelen primerlerin 260nm'deki OD ve $15,3 \times A + 11,8 \times G + 9,3 \times T + 7,4 \times C$ denklemiyle hesaplanan sönüm katsayısı değerlerine göre, ana stok derişimleri belirlendi. Çalışmada kullanılacak stok primer derişimleri, 10 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3-1: PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri

R262W F	5' CCT GTG CAC ACT GTG GTG TT 3'
R262W R	5' TGT GTC ACA AGG CTC ACC TCT 3'
V200M F	5' CCA GTG CAT TGA AGA CAG GA 3'
V200M R	5' TAT GCC AGR CAG RGC AGA GC 3'
L307P F	5' GAT CGT GAG AAA ACC CTC CA 3'
L307P R	5' GCA GCA AAC TGG AAA GGA AG 3'

Tablo 3-2: DNA dizilemesinde kullanılan primer dizileri

MEFV 10 F	5'GCA TGG ATC CTG GGA GCC TG 3'
MEFV 10 R	5'ATA CAA GGC CAG AAG CAG G 3'

3.1.5. Demografik Ve Klinik Bilgilerinin Kaydedilmesi Ve İncelemede Kullanılan Bilgisayar Donanımları

Çalışma grubundakilere ait laboratuvar kayıtları ve telefon görüşmelerinden elde edilen demografik ve klinik bilgiler, Microsoft Office 2000 yazılımı kapsamında, Microsoft Excel programı kullanılarak kaydedildi. CIAS1 gen mutasyonlarının dökümü ve elde edilen verilere ait grafik çizimleri için, Microsoft Office 2000 yazılımı kapsamında, Microsoft Word programı kullanıldı. Dizi analizi için, ABI Prism 3100 otomatik dizileme sisteminde bulunan kapsamında “DNA Sequencing Analysis” adlı yazılım kullanıldı. AAA fenotipi ile MEFV genotiplerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için, SPSS yazılımı, 13.0 sürümü kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

Laboratuvar kayıtlarından çalışma grubunda bulunanlarla ilgili bilgiler ve uygulanan MEFV mutasyon testinde kullanıldıktan sonra artan DNA örnekleri elde edildi.

Çalışma grubundakilerle ilgili olarak, laboratuvar kayıtlarından elde edilen bilgiler, Excel dosyası içine kaydedildi.

Çalışmamız kapsamında, genotip-fenotip ilişkileri kurulması amacıyla, mevcut bilgilere eklenmesi planlanan sorulardan oluşan klinik sorgulama belgesi, Word dosyası olarak oluşturuldu.

CIAS1 geni üçüncü eksonunda bulunan, R262W, V200M ve L307P mutasyonlarının incelenmesi için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı.

MEFV geni 10. ekson 5’ ucunun dizilenmesi amacıyla, bu bölge standart PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri saflaştırıldı.

Saflaştırma sonrası, kalan PZR ürününün belirlenmesi için, agaroz jel elektroforezi uygulandı.

Yeterli miktarda PZR ürünü kaldığı belirlendiğinde, döngü dizileme PZR yöntemi uygulandı.

Elde edilen PZR ürünleri, bir kez daha saflaştırıldıktan sonra otomatik dizileme cihazına yüklendi.

“DNA Sequencing Analysis” programı tarafından değerlendirilerek, cihazın veritabanında biriktirilen DNA dizileri, MEFV geni 10. ekson 5’ucu normal dizisiyle karşılaştırılarak mutasyon varlığı incelendi.

3.2.1. CIAS1 Mutasyonlarının İncelenmesinde Kullanılan PZR Yöntemi

R262W mutasyonu için PZR karışımı:

25µl tepkime hacminde;

-150-200 ng genomik DNA

-1X PZR tamponu

-2 mM MgCl₂

-10 pmol RW F primeri

-10 pmol RW R primeri

-200 µM dNTP karışımı

-1 U Taq polimeraz

hazırlanarak, şu koşullarda çoğaltıldı:

94°C	15 dak	} 35 döngü
94°C	45 sn	
60°C	45 sn	
72°C	1 dak	
72°C	10 dak	

PZR ile çoğaltılan bölge 120 bp boyutundaydı.

V200M mutasyonu için PZR karışımı:

25µl tepkime hacminde;

-150-200 ng genomik DNA

-1X PZR tamponu

-2 mM MgCl₂

-10 pmol VM F primeri

-10 pmol VM R primeri

-200 μ M dNTP karışımı

-1 U Taq polimeraz

hazırlanarak, şu koşullarda çoğaltıldı:

94°C	15 dak	}	35 döngü
94°C	45 sn		
58°C	55 sn		
72°C	1,5 dak		
72°C	10 dak		

PZR ile çoğaltılan bölge 505 bp boyutundaydı.

L307P mutasyonu için PZR karışımı:

25 μ l tepkime hacminde;

-150-200 ng genomik DNA

-1X PZR tamponu

-1,5 mM MgCl₂

-10 pmol VM F primeri

-10 pmol VM R primeri

-200 μ M dNTP karışımı

-1 U Taq polimeraz

hazırlanarak, şu koşullarda çoğaltıldı:

94°C	15 dak	}	32 döngü
94°C	45 sn		
60°C	45 sn		
72°C	1 dak		
72°C	10 dak		

PZR ile çoğaltılan bölge 489 bp boyutundaydı.

3.2.2. CIAS1 Mutasyonlarının İncelenmesinde Kullanılan RFLP Yöntemi

R262W mutasyonu için, 10µl PZR ürününe, 10µl restriksiyon kesim karışımı eklenerek, 12 saat boyunca 65°C’de bekletildi.

R262W için restriksiyon kesim karışımı:

6,5 µl dH₂O

1X enzim tamponu

1 µl *TaqI*

TaqI enzimi, normal allelde bulunan tek tanıma bölgesinden keserek, PZR ürününü 20 bç ve 100 bç’lik iki parçaya ayırdı. Mutasyon, tanıma bölgesini ortadan kaldırdığı için, mutant örneklerde 120 bç’lik allel boyutunda bir değişiklik beklenmiyordu.

V200M mutasyonu için 10µl PZR ürününe, 10µl restriksiyon kesim karışımı eklenerek 12 saat boyunca 37°C’de bekletildi.

V200M restriksiyon kesim karışımı:

5,5 µl dH₂O

1X enzim tamponu

1 µl BSA

1 µl *Hsp92II*

Hsp92II enzimi, normal allelde bulunan iki tanıma bölgesinden keserek, PZR ürününü 67, 72 ve 366 bç’lik üç parçaya ayırdı. Mutasyon oluştuğunda 366 bç’lik parçanın içinde yeni bir tanıma bölgesi ortaya çıktığından, mutant örneklerde 366 bç’lik parçanın da kesilerek 135 ve 231 bç’lik iki parça oluşturması beklenmekteydi.

L307P mutasyonu için 8µl PZR ürününe, 12µl restriksiyon kesim karışımı eklenerek 12 saat boyunca 37°C’de bekletildi.

L307P restriksiyon kesim karışımı:

7,5 µl dH₂O

1X enzim tamponu

1 µl *AluI*

AluI enzimi normal allelede bulunan iki tanıma bölgesinden keserek, PZR ürününü 52, 99 ve 338 bp'lik üç parçaya ayırdı. Mutasyon oluştuğunda tanıma yerlerinden biri ortadan kalkıp, tek tanıma bölgesinden kesim olduğundan, 151 ve 338 bp'lik iki parça oluşturması beklenmekteydi.

3.2.3. CIAS1 Mutasyonlarının Agaroz Jel Elektroforeziyle İncelenmesi

PZR ile çoğaltılan DNA örneklerinde, beklenen boyutta ürünlerin oluştuğu agaroz jel elektroforezinde incelendikten sonra, herbir mutasyona özgü koşullarda, restriksiyon enzim kesimi uygulanan örneklerin incelenmesi amacıyla, V200M ve L307P mutasyonları için %2, R262W mutasyonu için %3'lük agaroz jel hazırlandı.

%2 agaroz jel:

2 g Agaroz, 100 ml 0,5X TEB içinde kaynatılıp, yaklaşık 60°C'e kadar soğutulduktan sonra, 5µl Etidyum bromür eklenerek hazırlanan minijel, elektroforez düzeneğine döküldü.

%3 agaroz jel:

3 g Agaroz, 100 ml 0,5X TEB içinde kaynatılıp, yaklaşık 60°C'e kadar soğutulduktan sonra, 7,5µl Etidyum bromür eklenerek hazırlanan minijel, elektroforez düzeneğine döküldü.

Jel katılaştıktan sonra elektroforez tankı içine aktararak, incelenecek örnekler, 6X yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara bırakıldı. Kuyucuklardan birine örnek boyutlarının belirlenmesi amacıyla ticari olarak hazırlanmış 100 bp'lik DNA belirteci yüklendi. Bu şekilde hazırlanan agaroz jele V200M, L307P mutasyonları için 120 V'da 30 dak, R262W mutasyonu için 100 V'da 60 dak akım uygulandı. Daha sonra örnekler, jel görüntüleme sisteminde incelendi ve sonuçlar bilgisayara kaydedildi.

3.2.4. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilemesinin İlk Aşamasındaki Kullanılan PZR Yöntemi

MEFV geni 10. ekson 5' ucuna yönelik dizileme için PZR karışımı:

- 55µl tepkime hacminde;
- 150-200 ng genomik DNA
- 1X PZR tamponu
- 2 mM MgCl₂
- 10 pmol F primeri
- 10 pmol R primeri
- 200 µM dNTP karışımı
- 5 µl DMSO
- 0,5 U Taq polimeraz

hazırlanarak şu koşullarda çoğaltıldı:

94°C	5 dak	}	35 döngü
94°C	40 sn		
61°C	40 sn		
72°C	40 sn		
72°C	7 dak		

3.2.5. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilenmesinde Kullanılan PZR Ürünü Saflaştırması İçin Kullanılan Yöntem

- 50 µl TE 65°C'de beklemeye alındı
- 55 µl PZR ürününe 400 µl H1 bağlama çözeltisi eklendi
- 14160 g'de 1 dak santrifüjlenip, yıkama tüpü içinde biriken sıvı atıldı
- Kartuj yeniden aynı tüpün içine yerleştirilerek, 700 µl H2 tamponu eklendi
- 14160 g'de 1 dak santrifüjlenip, yıkama tüpü içinde biriken sıvı atıldı
- Kartuj yeni bir tüpe alınarak, 65°C'de bekletilmiş TE eklendi
- 14160 g'de 2 dak santrifüjlendi

3.2.6. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucunun Dizilenmesinde Kullanılan Döngü Dizileme PZR Yöntemi

20 µl tepkime hacminde;

150-200 ng genomik DNA

10 pmol F veya R primeri

8 µl Ready Reaction mix 100 (dNTP, ddNTP, 10X tampon, MgCl₂, Taq polimeraz)

hazırlanarak şu koşullarda çoğaltıldı:

96°C	10 sn	} 25 döngü
50°C	5 sn	
60°C	4 sn	

3.2.7. MEFV Geni 10. Ekson 5' Ucu Dizilenmesinde Kullanılan Döngü Dizileme PZR Sonrası NaAc Saflaştırma Yöntemi

- 20 µl PZR ürünü üzerine 2 µl NaAc eklendi
- Üzerine 50 µl %95 EtOH eklendi
- Karışım elle vurulup çalkalanarak, buz üzerine alınıp, 15 dak bekletildi
- 14160 g'de 20 dak santrifüjlendi
- Pellete dikkat edilerek üst sıvı atıldı
- 250 µl %70 EtOH eklenip, elle vurularak hafifçe karıştırıldı
- 14160 rpm'de 5 dak santrifüjlendi
- Üst sıvı tamamen atılarak, oda ısısında kurumaya bırakıldı
- Liyofilize haldeki DNA üzerine 20 µl formamid eklenip vorteksle karıştırıldı

3.2.8. Saflaştırılmış PZR Ürününün Otomatik Dizileme Cihazına Yüklenmesi

Saflaştırılmış haldeki DNA, 95°C'de 5 dak denatüre edilip, buz üstüne alınarak 2 dak bekletildikten sonra otomatik dizileme için hazır hale getirildi ve dizileme cihazına yüklendi.

3.2.9. Hastalarda Genotip-Fenotip İlişkisinin İncelenmesi Amacıyla Hazırlanan Klinik Sorgulama Belgesinin Oluşturulması

Hastaların laboratuvar kayıtlarından elde edilen bilgiler:

- Laboratuara kim tarafından gönderildiği
- Gönderiliş nedeni
- Cinsiyet
- Ailesinin nereli olduğu
- Ebeveynler arası akraba evliliği durumu
- Atak sıklığı
- İlaç kullanımı
- Yakınmaları

bilgisayarda oluşturulan Excel dosyası içine kaydedildi.

Daha sonra bunlara eklenmek üzere şu maddelerle ilgili sorular düzenlendi:

- Yaş
- Atakların ne kadar sürdüğü
- Atakları tetikleyen, ağırlaştıran durumlar
- Hastaların ilaç kullanımına uyumu
- Atakların ilaç kullanımına yanıtı
- Atakları belirleyen veya eşlik eden yakınmalar:

37°C üstü ateş; karın ağrısı, mide ağrısı, kasık ağrısı, bulantı, kusma; eklem ağrısı, kızarıklığı, şişliği; nefes alıp verme durumunda batıcı tarzda olabilen göğüs kafesi, yan ağrısı; kalp bölgesinde sıkıştırıcı, batıcı nitelikte ağrı; böbrek ağrısı; baş ağrısı; kas güçsüzlüğü, kas ağrıları, kramp; göz çevresinde şişlik; görme problemi; işitme problemi; ağız bölgesinde sık tekrarlayan aftlar; farenjit, anjin; genel halsizlik, bitkinlik; iltihaplı, kaşıntılı olan veya olmayan cilt döküntüleri (ağır akne, pyoderma gangrenosum, ürtiker gibi); varsa cilt döküntülerinin soğukta artışı; cilt üzerinde, özellikle bacaklarda, kenarları düzenli sınırlı, kabarık olmayan, dokunulduğunda hassas, ağrılı, kızarık alanlar (erizipel benzeri eritem); sık tekrarlayan infeksiyonlar

- Kan veya idrar tetkiklerinde gözlenen bulgular
- Amiloidoz gelişimi
- Hastalıkla ilgili ek bilgi

Tüm sorular ve bunlara uygun seçenekli yanıtlarından oluşan bir form hazırlandı (Form 1).

Çalışma grubuna ait toplanan kayıtlar ve telefon görüşmelerinden elde edilen bilgiler, laboratuarda PZR-ARMS yöntemiyle incelenmiş üç farklı MEFV mutasyonu (M694V, M680I, V726A), çalışmamızda PZR-RFLP yöntemiyle incelediğimiz üç farklı CIAS1 mutasyonu (R262W, V200M, L307P), MEFV mutasyonu bulunmamış kişiler için uygulanan MEFV geni 10. ekson 5' ucu dizilemesinden elde edilen tüm sonuçlar, biraraya getirilerek Word ve Excel dosyalarına kaydedildi.

3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 13.0 sürümü kullanıldı. Çalışma grubundakilerin demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar bulgularından oluşan fenotipleri ile MEFV ve CIAS1 genotipleri arasındaki ilişki, tanımlayıcı istatistiksel testlerle değerlendirildi.

Veri tabanından seçilerek, çapraz tabloya (crosstabs) aktarılan değişkenler, X^2 testleri kullanılarak incelendi ve $p<0.05$ olduğunda anlamlı kabul edildi.

Risk oranını belirten, OR hesaplamalarında %95'lik CI (güvenlik aralığı) uygulandı.

Nominal değişkenlerin simetrik ölçümleri, Cramer V veya Spearman Rho testleriyle değerlendirildi. Spearman Rho testinde çıkan – değerler, incelenen değişkenler arasında ters yönde bağlantı olduğunu göstermekteydi. Bu ölçümlerde de anlamlılık, $p<0.05$ değerinde kabul edildi. Ancak incelenen değişkenlerin sayısına göre, Spearman Rho testinde anlamlılık düzeyi, bazı durumlarda $p<0.01$ değerinde kabul edildi.

p anlamlılık değerleri, tüm analizlerde çift yönlü olarak incelendi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Oluşum Şekli

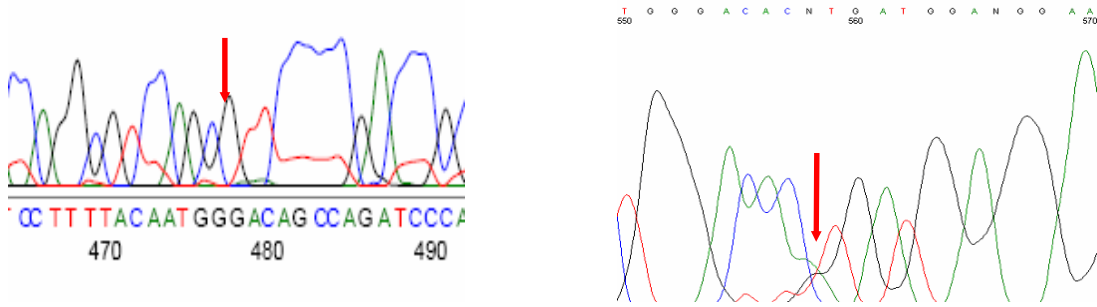
Çalışma grubu, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Moleküler Onkoloji Laboratuvarına gönderilen 192 kişiden oluşturuldu. 94 kişi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde çalışan hekim, 77 kişi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi dışı hekim tarafından gönderilmiş, 21 kişi ise kendiliğinden veya önerildiği için gelmişti.

4.2. Çalışma Grubundakilerin Başvuru Nedenleri

170 kişi, kendindeki yakınmalardan, 22 kişi ise aile bireylerinde belirlenmiş AAA hastalığından dolayı, MEFV mutasyonu analizi için gönderilmişti.

4.3. MEFV Mutasyonu İnceleme Sonuçları

Laboratuvar kayıtlarında, incelenen M694V, V726A ve M680I mutasyonlarından herhangi biri saptanmamış 95 kişiden, yeterli miktarda DNA'sı kalan 77 tanesine, MEFV geni 10. ekson 5' ucunun dizi analizi yapıldı. Dizileme sonucunda, 1 kişide heterozigot K695R mutasyonu, 1 kişide ise R761H ve INFEVERS veri tabanında yer almayan **yen**i V734G mutasyonlarının heterozigot olarak taşındığı kompleks allel bulundu (Şekil 4.1).



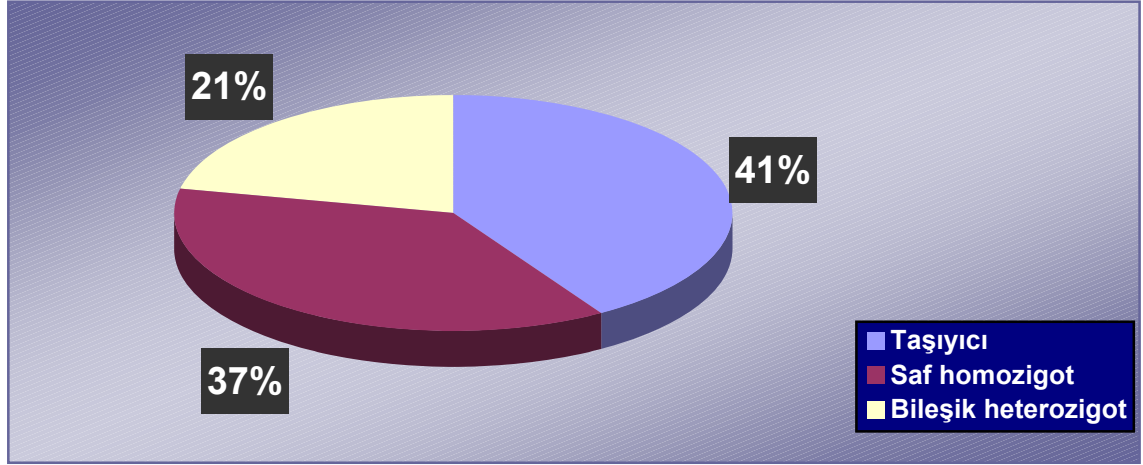
Şekil 4-1: V734G ve R761H mutasyonları bulunan kompleks allelin DNA dizisi

(Sol: 473 AAT GTG AC 480 → 473 AAT GGG AC 480 = V734G;

Sağ: 554 ACA CGT GAT 562 → 554 ACA CNT GAT 562 = R761H mutasyonları)

Çalışma grubunda bulunan 192 kişinin 97'sinde, MEFV geninde mutasyon saptanırken, 95 kişide ne M694V, M680I, V726A mutasyonları, ne de MEFV geni 10. ekson 5' ucunda herhangi bir dizi değişikliğine rastlanmadı (Tablo 4.1).

Mutasyon bulunan 97 kişinin, 40 tanesi heterozigot mutasyon taşıyıcısı; 36 tanesi saf homozigot ve 21 tanesi bileşik heterozigot genotipte AAA hastası olarak değerlendirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4-2: Çalışma grubunda MEFV mutasyonu bulunanların dağılımları

Tablo 4-1: MEFV mutasyonuna göre genotiplerin dağılımı

GENOTİP	KİŞİ SAYISI (%)	GENOTİP	KİŞİ SAYISI (%)
-/-	95 (49,47)	M694V/M694V	31(16,14)
-/M694V	30 (15,62)	M680I/M680I	4 (2,08)
-/M680I	4 (2,08)	V726A/V726A	1 (0,52)
-/V726A	4 (2,08)	M694V/M680I	13 (6,77)
-/K695R	1 (0,52)	M694V/V726A	8 (4,16)
-/R761H/V734G	1 (0,52)		

4.4. MEFV Mutasyonu Sonuçlarının Tel-Hashomer Klinik Tanı Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi

Çalışma grubu kapsamında bulunan 192 kişi, Tel-Hashomer kriterlerine göre değerlendirildi. Major bulgulardan ikisi, ya da biri ile minör bulgulardan ikisi beraber bulunduğu “Kesin AAA tanısı”, major bulgulardan biri veya minör bulgulardan ikisi bulunduğu “Olası AAA tanısı” alan kişiler, genotiplerine göre ayrıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4-2: MEFV mutasyon taşıyıcılarının Tel-Hashomer kriterlerine göre değerlendirmesi

Genotip dağılımı	Tel-Hashomer kriterlerine uymayan (n=38)	Tel-Hashomer kriterlerine göre KESİN AAA tanısı (n=117)	Tel-Hashomer kriterlerine göre OLASI AAA tanısı (n=37)
Heterozigot MEFV mutasyon taşıyıcısı (n=40)	9	27	4
Saf homozigot MEFV mutasyonu taşıyıcısı (n=36)	3	24	9
Bileşik heterozigot MEFV mutasyonu taşıyıcısı (n=21)	2	14	5
MEFV mutasyonu bulunmayan (n=95)	24	52	19

Çalışma grubundakilerin genotipleri ile Tel-Hashomer kriterlerine göre fenotipik değerlendirme sonuçları, istatistiksel olarak incelendiğinde, homozigot M694V mutasyonu taşıyanlarla, Tel-Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı alanlar arasında anlamlı bağlantı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4-3: Tel-Hashomer kriterleri ile M694V/M694V genotip bağlantısı

		M694V/M694V		Toplam
		Yok	Var	
Tel Hashomer	Hasta değil	36	2	38
	Kesin AAA	97	20*	117
	Olası AAA	28	9	37
	Toplam	161	31	192

* : Spearman Korelasyon = 0,162; $p:0,025$; [Anlamlılık düzeyi $p\leq0,05$]

4.5. Çalışma Grubundakilerin Demografik Özellikleri

Çalışma grubunda 99 kadın, 89 erkek bulunuyordu. MEFV genotip sonuçları ile cinsiyet arasında anlamlı bir bağlantı olup olmadığı değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4-4: Cinsiyet ile MEFV gen mutasyonu bağlantısı

		MEFV +/-		Toplam
		Mut var	Mut yok	
Cinsiyet	Kadın	48	51	99
	Erkek	49	44	93
Toplam		97	95	192

Pearson X^2 : 0,339; df: 1, p : 0,560; [Anlamlılık düzeyi $p\leq0,05$]

V726A mutasyon taşıyıcılığı ile erkek (Tablo 4.5), M694V/V726A genotipi ile kadın cinsiyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bağlantı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.6) .

Tablo 4-5: Cinsiyet ile -/V726A genotip bağlantısı

		-/V726A		Toplam
		Yok	Var	
Cinsiyet	Kadın	99	0	99
	Erkek	89	4*	93
Toplam		188	4	192

* : Pearson X^2 : 4,349; df: 1, p : 0,037; [Anlamlılık düzeyi $p\leq0,05$]
OR=1,045; [1,001-1,091 (%95 CI)]

Tablo 4-6: Cinsiyet ile M694V/V726A genotip bağlantısı

		M694V/V726A		Toplam
		Yok	Var	
Cinsiyet	Kadın	92	7*	99
	Erkek	92	1	93
Toplam		184	8	192

* : Pearson χ^2 : 4,317; df: 1, p: 0,038; [Anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$]
 OR = 0,143; [0,017-1,184 (%95 CI)]

Çalışma grubundakilerin yaş aralıkları ile MEFV geninde mutasyon olup olmadığı karşılaştırıldığında, herhangi bir yaş grubuyla mutasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bağlantı kurulamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4-7: Yaş ile MEFV gen mutasyonu bağlantısı

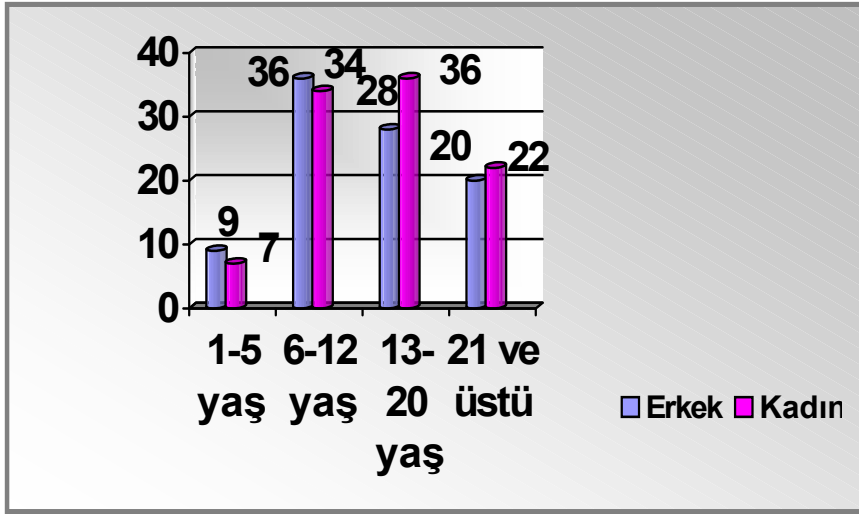
		MEFV +/-		Toplam
		Mut var	Mut yok	
Yaş	1-5	9	7	16
	6-12	38	32	70
	13-20	33	31	64
	21= ∞	17	25	42
Toplam		97	95	192

Pearson χ^2 : 2,330; df: 3, p: 0,507; [Anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$]

Çalışma grubu kapsamında bulunan 93 erkek ve 99 kadının yaşlara göre dağılımları belirlendi. Buna göre çalışma grubunda en çok 6-12 yaş grubu erkek, en az 1-5 yaş grubundan kadın bulunmaktaydı (Şekil 4.3).

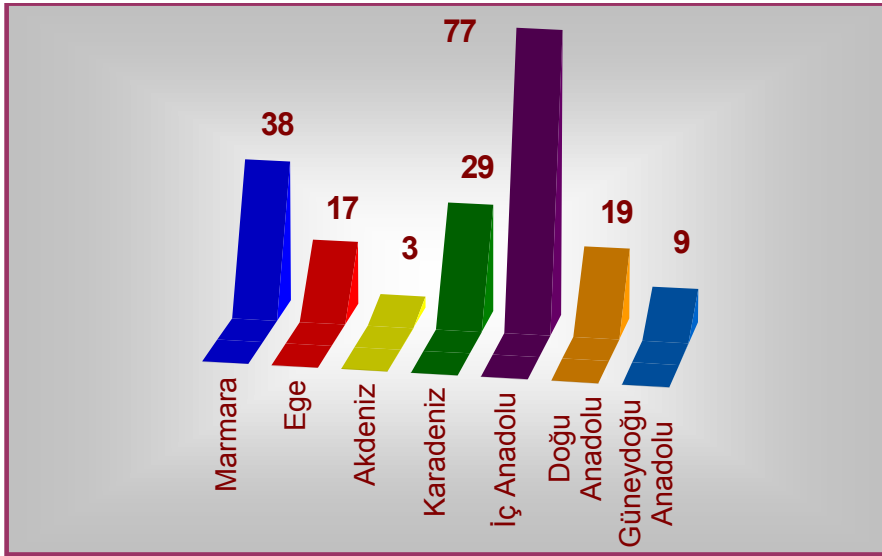
MEFV genotipleri ile çalışma grubundakilerin nereli olduğu arasında bağlantı araştırıldığında, Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, heterozigot V726A mutasyonu taşıyanların bulunmaması, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olarak değerlendirildi ($p > 0,05$) (Tablo 4.8).

Çalışma grubundakilerin nereli olduğu, Türkiye'nin coğrafik bölgelerine göre düzenlenerek incelendi. Ayrıca bölgelere göre cinsiyet dağılımları belirlendi (Tablo 4.9).



Şekil 4-3: Çalışma grubundakilerin cinsiyet ve yaş dağılımları

Çalışma grubundakilerin Türkiye'nin hangi coğrafi bölgesinden oldukları belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4-4: Çalışma grubundakilerin bölgelere göre dağılımı

Tablo 4-8: Bölge ile -/V726A genotip arası bağlantı

		-/V726A		Toplam
		Yok	Var	
Nereli	Marmara	38	0	38
	Ege	16	1	17
	Akdeniz	2	1	3
	İç Anadolu	75	2	77
	Karadeniz	29	0*	29
	Doğu Anadolu	19	0*	19
	Güneydoğu Anadolu	9	0*	9
	Toplam	188	4	192

Pearson χ^2 : 17,685; df: 6, p: 0,007; [Anlamlık düzeyi $p \leq 0,05$]

* : Cramer V: 0,303, p: 0,007

Çalışma grubundakilerin cinsiyetleri ile bölgesel kökenlerinin dağılımı, Pearson χ^2 testiyle incelendiğinde $p < 0,05$ bulundu. İki değişken arasındaki bağlantı, Spearman Rho korelasyon testiyle değerlendirildiğinde, çalışma grubundaki erkeklerin, Marmara ve Ege, kadınların ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleriyle istatistiksel olarak anlamlı bağlantısı olduğu bulundu (Tablo 4.9).

Çalışma grubundan 44 kişinin annesi ile babası arasında akraba evliliği vardı. Bunlardan 23 tanesi birinci, 4 tanesi ikinci, 17 tanesi üçüncü dereceden akrabalık ilişkisiydi. Akrabalık durumu ile MEFV mutasyonu varlığı arasında bağlantı olup olmadığı incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.10).

4.6. Yakınmaları Olanların Atak Özellikleri

4.6.1. Atak Sıklığı

Çeşitli yakınmaları olan 170 kişinin atak sıklığı incelendiğinde, 71 kişinin ataklarının belirli bir düzende olduğu, 99 kişinin ise düzensiz atakları olduğu görüldü (Şekil 4.5).

Tablo 4-9: Çalışma grubundakilerin cinsiyetlerine göre bölgesel kökenleri

COĞRAFİ BÖLGE	KADIN	ERKEK
Marmara	18	20*
Ege	5	12*
Karadeniz	19	10
İç Anadolu	34	43
Akdeniz	1	2
Doğu Anadolu	14*	5
Güneydoğu Anadolu	8*	1

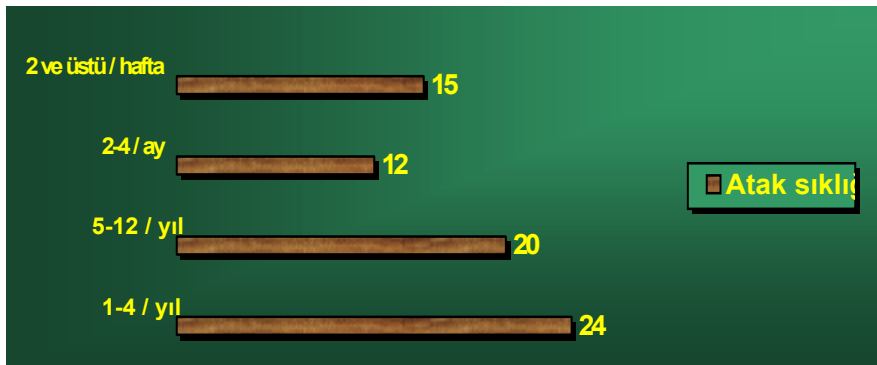
Pearson χ^2 : 16,702; df: 6, p: 0,010; [Anlamlık düzeyi $p \leq 0,05$]

* : Spearman Rho korelasyon katsayısı: - 0,231, p: 0,001; [Anlamlık düzeyi $p = 0,01$]

Tablo 4-10: Ebeveyn akrabalığı ile MEFV mutasyonu arası bağlantı

		MEFV -/-		Toplam
		Mut var	Mut yok	
Akrabalık	Yok	74	74	148
	1. derece	9	14	23
	2. derece	4	0	4
	3. derece	10	7	17
	ve <			
Toplam		97	95	192

Pearson χ^2 : 5,596; df: 3, p: 0,133; [Anlamlık düzeyi $p \leq 0,05$]



Şekil 4-5: Atak sıklığına göre dağılım

Düzenli atakları olan 71 kişinin içinde, MEFV gen mutasyonu tanımlanan 36 kişinin genotip dağılımları incelenip, atak sıklığı ile arasında ilişki olup olmadığı,

Spearman Rho bağlantı testiyle değerlendirildiğinde, M694V/M680I genotipi ile atakların daha az sıklıkla ortaya çıkması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.11).

4.6.2. Atak Süresi

Çalışma grubunda 22 kişide atak yoktu; 48 kişi atak süresinin, ataklar arasında değiştiğini belirtti. Bunun dışındaki 83 kişinin atakları 1-3 gün, 29 kişinin 4 gün ile 1 hafta arası sürerken, 10 kişi ataklarının bir haftadan daha uzun sürdüğünü bildirdi.

Atak süreleriyle genotip dağılımları arasındaki ilişki incelendiğinde homozigot M694V genotipi ile atakların süresi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olduğu bulundu. Bu ilişki, Spearman Rho testiyle incelendiğinde homozigot M694V genotipi ile atakların kısa süreli olması arasında anlamlı bağlantı olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 4.12).

4.7. Atak Sıklık Ve Ağırlığını Etkileyen Durumlar

Çeşitli yakınmaları olan 170 kişiye, atakları tetikleyen ve/veya ağırlaştıran durumları olup olmadığı soruldu. 77 kişinin etkilendiği herhangi bir durum yoktu. Stres, üzüntü gibi duygusal zorlanmalar sonucu 28 kişi, yorgunluk, uzun süreli ayakta durma ya da oturma gibi fiziksel zorlanmalar sonucu 16 kişi, soğuk ve nemli hava gibi çevresel koşullar nedeniyle 17 kişi, adet dönemi gibi hormonal değişikliklerle 32 kişi atak sıklık ve/veya ağırlığının arttığını belirtti. MEFV geninde mutasyon varlığıyla, atakların sayılan koşullardan etkilenmesi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.13).

Tablo 4-11: Atak sıklığına göre genotip dağılımı

GENOTİP	2≤/HAFTA	2-4/AY	5-12/YIL	1-4/YIL
-/M694V	0	1	3	4
-/V726A	0	1	0	2
M694V/M694V	4	2	3	4
V726A/V726A	0	0	1	0
M694V/M680I*	1	1	2	4
M694V/V726A	2	0	1	0

* : Spearman Rho korelasyon katsayısı: - 0,168, p: 0,020; [Anlamlık düzeyi $p \leq 0,05$]

Tablo 4-12: Atak süresinin genotiplere göre dağılımı

GENOTİP	1-3 GÜN SÜREN ATAK (n=48)	4 GÜN-1 HAFTA SÜREN ATAK (n=12)	1 HAFTADAN UZUN SÜREN ATAK (n=5)
-/M694V	12	4	3
-/M680I	1	1	0
-/V726A	1	0	0
M694V/M694V*	22	3	1
M680I/M680I	0	2	0
V726A/V726A	1	0	0
M694V/M680I	7	0	1
M694V/V726A	3	2	0
-/K695R	1	0	0

* : Pearson X^2 : 12,980; df: 4, p: 0,011; [Anlamlık düzeyi $p \leq 0,05$]

* : Spearman Rho korelasyon katsayısı: - 0,249, p: 0,001 [Anlamlılık düzeyi $p=0,01$]

Tablo 4-13: Atak etkilenmesi ile MEFV mutasyonu arasındaki bağlantı

		MEFV +/-		Toplam
		Mut var	Mut yok	
Atak etkilenmesi	Atak yok	6	16	22
	Duygusal	19	9	28
	Fiziksel	8	8	16
	Çevresel	8	9	17
	Hormonal	13	19	32
	Etkilenmiyor	43	34	77
Toplam		97	95	192

Pearson X^2 : 10,333; df: 5, p: 0,066

4.8. Çalışma Grubundakilerin Yakınmaları

Yakınması olan 170 kişinin, 155'inde birden fazla, 8 kişide yalnızca karın ağrısı, 7 kişide ise yalnızca eklem ağrısı şeklinde yakınmalar vardı.

170 kişinin 112'sinde ateş; 135 kişide karın ağrısı, mide ağrısı, kasık ağrısı, bulantı, kusma şeklinde gözlenen peritonit bulguları; 108 kişide eklem ağrısı, şişlik ve kızarıklık şeklinde gözlenen artrit bulguları; 79 kişide göğüs kafesinde nefes alıp verme sırasında batıcı tarzda yan ağrısı şeklinde gözlenen plörit bulguları; 24 kişide kalp bölgesinde sıkıştırıcı, batıcı nitelikte ağrı şeklinde gözlenen kardit bulgusu; 59 kişide erizipel benzeri eritem bulguları; 44 kişide böbrek ağrısı, 107 kişide kas güçsüzlüğü, kas ağrıları, kramp, başağrısı gibi nörolojik bulgular; 6 kişide görme problemi; 2 kişide işitme problemi; 75 kişide ağız bölgesinde sık tekrarlayan aftöz lezyonlar, 21 kişide farenjit bulguları; 112 kişide genel halsizlik, bitkinlik yakınmaları tanımlandı. 14 kişi akne, 17 kişi soğuk havada artış gösteren ürtikerden yakındı. 37 kişi sık tekrarlayan infeksiyonları olduğunu tanımladı (Tablo 4.14).

Çalışma grubunda belirlenen yakınmalar, yaşlara göre değerlendirildi. Yaş artışı ile artrit rastlanma sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bağlantı bulundu (Tablo 4.15).

Çalışma grubumuzda MEFV mutasyonu bulunarak, kesin AAA tanısı konabilen 57 kişiden 40 tanesinde ateş (%70,17), 46 tanesinde peritonit (%80,70), 30 tanesinde plörit (%52,63), 7 tanesinde perikardit (%12,28), 37 tanesinde artrit (%64,91), 16 tanesinde eritem (%28,07) ve 5 tanesinde amiloidoz (%8,77) belirlendi.

4.9. Çalışma Grubundakilerin Biyokimyasal Ve Hematolojik Laboratuvar Sonuçları

İdrar tetkikleri yapılan 65 kişiden 32 tanesinde mikroskopik hematüri, 7 tanesinde eritrosit silindirlerinde artış olduğu; kan tetkiki yapılan 78 kişiden 47 tanesinde anemi; 12 tanesinde nötropeni; 28 kişide ise sürekli sedimentasyon yüksekliği bulunduğu öğrenildi.

Yakınmalar ve laboratuvar bulguları genotiplerle karşılaştırıldı (Tablo 4.16 ve 4.17).

Tablo 4-14: Başlıca yakınmaların genotipe göre dağılımı

	Ateş n=112	Peritonit n=135	Artrit n=108	Plörit n=79	Kardit n=24	Eritem n=59	Amiloidoz n=5
-/-	49	62	50	36	12	27	0
-/M694V	17	21	13	10	4	14	0
-/M680I	3	3	4	2	0	1	0
-/V726A	2	2	3	1	1	1	0
-/K695R	1	1	1	0	0	0	0
694/694	19	26	23	17	4	10	3
680/680	4	4	2	1	0	1	1
726/726	0	0	0	0	1	0	0
694/680	11	8	9	8	2	3	1
694/726	6	8	3	4	0	2	0

Tablo 4-15 : Yaş ile artrit arasındaki bağlantı

		Artrit		Toplam
		Yok	Var	
Yaş	1-5	9	7	16
	6-12	38	32	70
	13-20	24	40	64
	21=<	13	29	42
Toplam		84	108	192

Pearson χ^2 : 7,984; df: 3, p: 0,046 , Cramer V: 0,204

Tablo 4-16: İstatistiksel olarak anlamlı genotip-fenotip bağlantıları

	Pearson X ²	df	p	OR (%95 CI)	Spearman Rho	Anlamlılık düzeyi (p=)
Nörolojik bulgu*-/	6,754	1	0,009	0,466 (0,261-0,832)	-0,188	0,01
Faranjit*-/	4,123	1	0,042	0,369 (0,137-0,995)	-0,147	0,05
Amiloidoz*-/	5,028	1	0,025	0,948 (0,905-0,993)	-0,162	0,05
Eritem*-/694	4,243	1	0,039	2,275 (1,027-5,040)	0,149	0,05
Akne*-/695	12,781	1	0,000	0,068 (0,040-0,115)	0,258	0,01
İnfeksiyon*-/695	4,211	1	0,040	0,188 (0,140-0,253)	0,148	0,05
Artrit*694/694	4,837	1	0,028	2,571 (1,086-6,087)	0,159	0,05
Amiloidoz*694/694	7,292	1	0,007	8,518 (1,361-53,298)	0,195	0,01
Ürtiker*694/694	5,051	1	0,025	3,273 (1,110-9,648)	0,162	0,05
Amiloidoz*680/680	8,078	1	0,004	15,333 (1,296-181,361)	0,205	0,01
Faranjit*680/680	17,211	1	0,000	28,333 (2,799-286,794)	0,299	0,01
Kardit*726/726	7,037	1	0,008	0,120 (0,082-0,177)	0,191	0,01
Görme problemi*726/726	31,162	1	0,000	0,026 (0,011-0,062)	0,403	0,01
Ateş*694/680	3,963	1	0,047	4,248 (0,915-19,721)	0,144	0,05
Nörolojik bulgu*694/680	7,562	1	0,006	10,611 (1,351-83,334)	0,198	0,01

Tablo 4-17: İstatistiksel olarak anlamlı laboratuvar bulguları ile genotip bağlantıları

	Pearson X ²	df	p	OR (%95 CI)	Spearman Rho	Anlamlılık düzeyi (p=)
Eritrosit silindirleri*-/726	5,303	1	0,021	10,111 (0,913-111,998)	0,166	0,05
Sedimentasyon artışı*-/726	4,114	1	0,043	6,231 (0,841-46,188)	0,146	0,05
Anemi*-/680	5,640	1	0,018	9,818 (0,996-96,781)	0,171	0,05
Anemi*694/694	4,050	1	0,044	2,274 (1,007-5,131)	0,145	0,05

4.10. Çalışma Grubundakilerin İlaç Kullanımı

Yakınmaları olan 170 kişinin, 74'ünün yalnızca Kolşisin, 11 tanesinin Kolşisin'le beraber analjezik ve antipiretik, 62 tanesinin yalnızca analjezik ve antipiretik kullandığı ve 23 tanesinin hiçbir ilaç kullanmadığı belirlendi (Şekil 4.6).

İlaç kullanımı ile genotipler arası ilişki incelendiğinde, M694V taşıyıcılığı (Tablo 4.18) ve bileşik heterozigot M694V/V726A genotipi ile ilaç kullanımı arasında anlamlı bağlantı bulundu (Tablo 4.19).

Tablo 4-18: İlaç kullanımı ve -/M694V genotipi arasındaki bağlantı

		-/M694V		Toplam
		Yok	Var	
İlaç kullanımı	Yakınma yok	17	5	22
	İlaç kullanmıyor	15	8	23
	Kolşisin	66	8	74
	Analjezik	53	9	62
	Kolşisin+Analjezik	11	0	11
Toplam		162	30	192

Pearson χ^2 :10,640, df:4, p:0,031; Cramer V:0,235

Tablo 4-19: İlaç kullanımı ve M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı

		M694V/V726A		Toplam
		Yok	Var	
İlaç kullanımı	Yakınma yok	22	0	22
	İlaç kullanmıyor	23	0	23
	Kolşisin	66	8	74
	Analjezik	62	0	62
	Kolşisin+Analjezik	11	0	11
Toplam		184	8	192

Pearson χ^2 :13,311, df:4, p:0,010; Cramer V:0,263

4.10.1. Kolşisin Başlama Zamanı

Kolşisin kullanan 85 kişiden, 17 tanesinde MEFV mutasyon analizi sonucundan önce, 68 tanesinde ise sonra Kolşisin başlanmıştı. Sonuç beklenmeden, başlananlardan 7 tanesinde incelenen hiçbir mutasyona rastlanmazken, 3 tanesinde heterozigot M694V mutasyon taşıyıcılığı, 1 tanesinde homozigot M694V mutasyonu, 1 tanesinde homozigot M680I mutasyonu, 1 tanesinde bileşik heterozigot M694V/M680I, 5 tanesinde ise bileşik heterozigot M694V/V726A genotipi bulundu.

4.10.2. Kolşisin Kullanımına Uyum

Çalışma grubunda Kolşisin kullanan 85 kişiden, 70 tanesi önerilen doz ve düzende kullandığını, 15 tanesi ise düzenli kullanmayıp, ataklar sırasında doz ve uygulama sıklığını, önerilmediği halde arttırdıklarını ifade ettiler. Düzenli olarak Kolşisin kullananlardan 7, düzensiz kullananlardan 3, hiç Kolşisin kullanmayanlardan 62 kişi ataklar sırasında ağrı kesici ve ateş düşürücü aldıklarını belirtti.

İlaç kullanım düzenine uyum ile MEFV genotipleri arasındaki ilişki incelendiğinde bileşik heterozigot M694V/V726A genotipi ile Kolşisin kullanım uyumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu (Tablo 4.20).

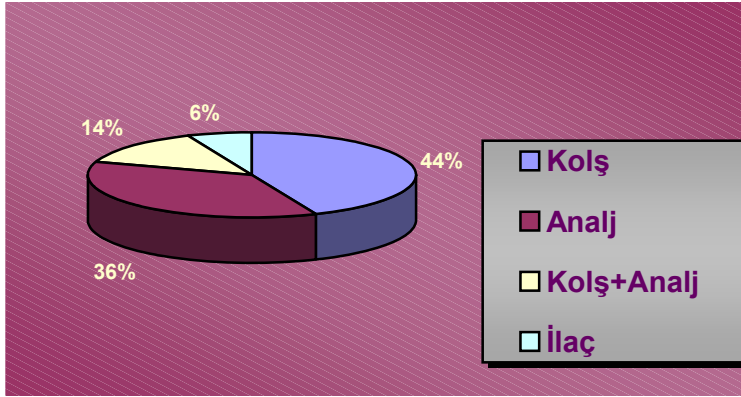
Tablo 4-20: İlaç kullanım uyumu ile M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı

		M694V/V726A		Toplam
		Yok	Var	
İlaç uyumu	Yakınma yok	22	0	22
	Kolşisin kullanmıyor	85	0	85
	Uyumlu	64	6	70
	Uyumsuz	13	2	15
Toplam		184	8	192

Pearson χ^2 :11,210, df:3, p:0,011; Cramer V:0,242

4.10.3. Kolşisin Tedavisine Yanıt

Kolşisin kullanan ancak MEFV mutasyonu belirlenmeyen 41 kişinin, 29 tanesinde atak sıklığının belirgin ölçüde azaldığı, 5'inde ise atak şiddetinde belirgin hafifleme olduğu, 2 tanesinde hem atak sıklığının hem de şiddetinin hafiflediği, ancak 5 tanesinde herhangi bir yanıt alınamadığı kaydedildi. Kolşisin kullanan ve MEFV mutasyonu belirlenen 44 kişinin genotip dağılımı ile Kolşisin'e yanıtları karşılaştırıldı (Tablo 4.21)



Şekil 4-6: Çalışma grubunun Kolşisin kullanımı

Tablo 4-21: MEFV mutasyonu ile Kolşisin kullanımının değerlendirilmesi

MEFV MUTASYONUNA GÖRE	KOLŞİSİN KULLANIYOR (n=85)	KOLŞİSİN KULLANMIYOR (n=107)
AAA hastası (n=57)	32	25
MEFV mutasyon taşıyıcısı (n=40)	12	28
MEFV mutasyon taşıyıcısı değil (n=95)	41	54

Tablo 4-22: Kolşisin kullananların genotip dağılımlarına göre tedaviye verilen yanıt

KOLŞİSİN KULLANANLARIN GENOTİP DAĞILIMI (n=44)	ATAK SIKLIĞINDA AZALMA (n=26)	YAKINMALARDA HAFİFLEME (n=5)	ATAK SIKLIĞINDA AZALMA VE YAKINMALARDA HAFİFLEME (n=2)	YANIT YOK (n=11)
-/M694V (n=8)	4	3	0	1
-/M680I (n=3) ¹	1	0	1	1
M694V/M694V (n=12)	8	1	1	2
M680I/M680I (n=3)	2	0	0	1
M694V/M680I (n=9) ²	5	0	0	4
M694V/V726A (n=8) ³	5	1	0	2
-/K695R (n=1)	1	0	0	0

İlaç tedavisine verilen yanıt ile genotip arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, M680I mutasyon taşıyıcılığı, M694V/M680I ve M694V/V726A genotipleri ile tedaviye verilen yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bağlantı bulundu (sırasıyla, ¹Pearson X^2 :12,702, df:5, p:0,026; Cramer V:0,257; ²Pearson X^2 :12,081, df:5, p:0,034; Cramer V:0,251; ³Pearson X^2 :11,801, df:5, p:0,038; Cramer V:0,248) (Tablo 4.22).

Kolşisin tedavisine olumlu yanıt verenlerin genotipleriyle, yakınmaları karşılaştırıldığında, yalnızca M694V/V726A genotipiyle artrit arasında ters yönde anlamlı bir bağlantı olduğu bulundu. Bu genotipteki kişilerin artrit yakınmasının, Kolşisin'e yanıt veren diğer genotiptekilerden anlamlı düzeyde az olduğu belirlendi

Tablo 4-23: Kolşisin'e olumlu yanıt verenlerdeki artrit yakınması ile M694V/V726A genotipi arasındaki bağlantı

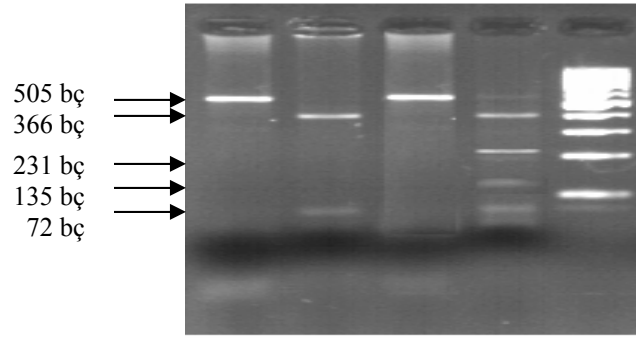
	MVVA		Toplam
	yok	var	
Artrit yok	1	5	6
Artrit var	6	1	7
Toplam	7	6	13

Pearson X^2 :6,198, df:1, p:0,013; Spearman Rho: -0,690

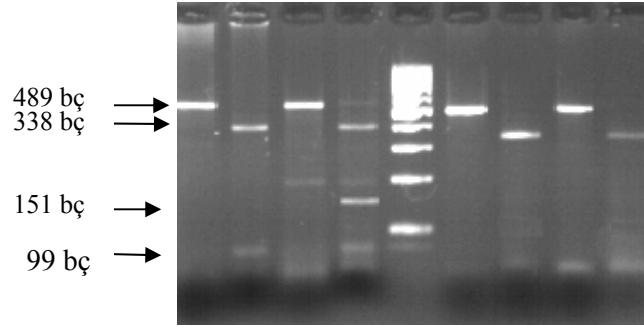
4.11. CIAS1 Geni Mutasyon Sonuçları

192 kişiden oluşan çalışma grubunda, CIAS1 geninde tanımlanmış R262W, V200M ve L307P mutasyonları PZR-RFLP yöntemiyle incelendi. Sonuç olarak, 1 kişide heterozigot V200M mutasyonu, 10 kişide heterozigot L307P mutasyonu gözlemlendi. Hiçbir hastada R262W mutasyonuna rastlanmadı. 81 kişiden oluşan kontrol grubunda her üç mutasyon da saptanmadı.

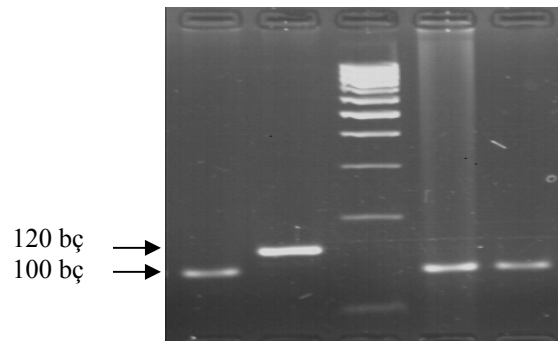
Heterozigot V200M mutasyonu bulunan, 6-12 yaş grubundan erkek hastanın aynı zamanda, MEFV geninde homozigot M694V mutasyonu taşıdığı belirlendi. Yakınmaları incelendiğinde, klinik tablosunun daha çok kriyopirinopati grubu hastalıklara benzediği görüldü. Değişken süreli atakları, düzensiz sıklıkla oluyordu. Her atakta ateş ve artrit yakınması olduğu, nadiren karın ağrısı bulunduğunu bildirdi. Ayrıca baş ağrısı, ağız aftları, halsizlik yakınmaları vardı. Atakların soğuk havada daha belirgin olarak arttığı ve daha ağır geçtiğini ifade etti. Çoğu atakta, vücudunda kırmızı lekelenmelerin arttığını, ateş düşüşüyle beraber bu döküntülerin hafiflediğini belirtti. Kolşisin kullanımıyla beraber atakların sıklığında azalma olduğu belirtildi.



Şekil 4-7: V200M mutasyonu %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 3. kuyucuklarda restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnekler. 2. kuyucuk mutasyon bulunmayan örnek, 4. kuyucuk heterozigot mutasyon taşıyıcısı, DNA belirtgeci: 100 bç



Şekil 4-8: L307P mutasyonu %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 3, 7, 9. kuyucuklarda restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnekler. 2, 6, 8. kuyucuklar mutasyon bulunmayan örnekler, 4. kuyucuk heterozigot mutasyon taşıyıcısı, DNA belirtgeci: 100 bç



Şekil 4-9: R262W mutasyonu %3 agaroz jel elektroforez görüntüsü. 2. kuyucukta restriksiyon enzim kesimi uygulanmamış örnek, 1, 4 ve 5. kuyucuklar restriksiyon enzim kesimi uygulanmış, mutasyon bulunmayan örnekler, DNA belirtgeci: 100 bç

Çalışma grubunda, CIAS1 gen mutasyonları bulunanların demografik göstergeleri ve yakınmaları, MEFV genotipleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olan bağlantılar bulundu. Heterozigot L307P mutasyonu taşıyıcıların, Kolşisin ve/veya analjezik kullanımı arasında bağlantı vardı. Ayrıca bu mutasyonu taşıyanlarda, peritonit, işitme problemi ve ürtiker, diğer bulgulara göre anlamlı olarak daha çok bulundu. L307P mutasyonu taşıyıcılarında anlamlı ölçüde anemi bulundu. V200M mutasyonu taşıyıcısında, ürtiker dışında herhangi bir klinik ya da laboratuvar bulgusuyla anlamlı ilişki saptanmadı. L307P mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan 10 kişinin yakınmaları ve MEFV mutasyon sonuçları değerlendirildi (Tablo 4.24). MEFV gen mutasyonlarıyla, CIAS1 geni mutasyonları arasındaki ilişki ve CIAS1 gen mutasyonlarıyla fenotipik parametreler arasındaki ilişkiler değerlendirildi. MEFV geninde homozigot M694V mutasyonu ile CIAS1 geninde heterozigot V200M mutasyonu bulunması arasında istatistiksel olarak anlamlı bağlantı bulundu (Tablo 4.25).

Tablo 4-24: L307P heterozigotların MEFV genotip ve klinik bulguları

MEFV GENOTİPİ	BULGULAR
-/-	Peritonit, artrit, plörit, böbrek ağrısı, baş ağrısı, ürtiker
-/-	Peritonit, artrit, plörit, halsizlik, ürtiker, anemi
-/-	Ateş, peritonit, plörit, artrit, kardit, böbrek ağrısı, baş ağrısı, akne, ürtiker, infeksiyon, hematüri, eritrosit silendirlerinde artış, anemi
-/-	Ateş, peritonit, plörit, artrit, eritem, baş ağrısı, ürtiker
-/-	Ateş, peritonit, plörit, artrit, böbrek ağrısı, baş ağrısı, halsizlik, ürtiker, anemi
-/M694V	Ateş, peritonit, işitme problemi, halsizlik, ürtiker
-/V726A	Peritonit, kardit, böbrek ağrısı, baş ağrısı, halsizlik, ürtiker, infeksiyon, anemi
M694V/M694V	Peritonit, plörit, artrit, eritem, baş ağrısı, aft, ürtiker, anemi
M680I/M680I	Ateş, peritonit, baş ağrısı, farenjit, halsizlik, ürtiker, infeksiyon, hematüri, anemi, sedimentasyon artışı
M694V/M680I	Ateş, peritonit, plörit, artrit, kardit, baş ağrısı, aft, ürtiker, hematüri

Tablo 4-25: CIAS1 mutasyonları ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunan parametreler

	Pearson X ²	df	p	OR (%95 CI)	Spearman Rho (*Cramer V)	Anlamlılık düzeyi (p=)
İlaç kullanımı*-/307	10,234	4	0,037		(*0,231)	
Peritonit*-/307	4,454	1	0,035	1,080 (1,030-1,133)	0,152	0,05
İşitme problemi*-/307	8,213	1	0,004	20,111 (1,162-348,193)	0,207	0,01
Ürtiker*-/307	108,597	1	0,000	2,429 (1,376-4,286)	0,752	0,01
Anemi*-/307	7,200	1	0,007	5,159 (1,389-19,158)	0,194	0,01
Ürtiker*-/200	10,348	1	0,001	1,063 (0,943-1,197)	0,232	0,01
-/200*694/694	5,221	1	0,022	1,033 (0,969-1,102)	0,165	0,05

5. TARTIŞMA

Otoinflamatuvar hastalıkların kesin tanısı, özgün tedavi uygulanması açısından çok önemlidir. Tanı aşamasında, demografik göstergeler, detaylı anamnez ve fizik muayene oldukça yardımcı unsurlardır. Karışık kalıtım modeli, tipik olmayan etnik köken ve belli bir hastalıkla tam örtüşmeyen klinik bulgular söz konusu olduğunda, tanı koymak oldukça zordur. Ön tanının moleküler düzeyde kesinleştirilmesi amacıyla, hastayı laboratuara gönderen hekimler bazen, beklentilerinin tersine, mutasyon saptanamadığını bildiren sonuçlarla karşılaşmaktadırlar (Samuels ve Özen 2006).

En sık tanı konan otoinflamatuvar hastalıklardan biri, Ailevi Akdeniz Ateşi'dir. Hastalığın, Akdeniz bölgesinden köken alan etnik gruplarda çok sık gözlenmesi, otozomal çekinik kalıtım modeline sahip olması, ateşli inflamasyon ataklarının 1-3 gün kadar sürüp, kendini sınırlayıcı özellik göstermesi, erizipel benzeri eritem şeklindeki cilt döküntüleri ve Kolşisin tedavisine olumlu yanıt alınması, bu hastalığı diğer otoinflamatuvar hastalıklardan ayıran belli başlı özelliklerdir.

AAA hastalığından sorumlu MEFV mutasyonları, moleküler düzeyde saptanabildiği halde, tanı sıklıkla klinik tabloya göre konmaktadır. Klinik tanıda Tel-Hashomer kriterlerinden büyük ölçüde faydalanılmaktadır. MEFV geni 2, 3 ve 5. eksonlarda DGGE ve PZR-RFLP, 10. eksonda ise dizileme yöntemiyle mutasyon aranan bir çalışmada, AAA hastalığı tanısında klinik ve moleküler yaklaşım modelleri karşılaştırılmıştır. Tel-Hashomer kriterlerine göre, kesin AAA tanısı konan hastaların, yalnızca %67'sinde, AAA olma olasılığı az olanların ise %16'sında, MEFV geninde iki mutasyon bulunduğu gösterilmiştir. Mevcut olan hemen hemen tüm mutasyonları incelediklerini ileri süren araştırmacılar, moleküler test istemlerinin yapılması için daha genişletilmiş tanı kriterlerinin kullanılmasını önermişlerdir (Grateau ve ark. 2000).

Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre değerlendirildiğinde, çalışma grubumuzda bulunan 192 kişinin, 117 tanesi kesin AAA olarak belirlenmiş ve bunların 38 tanesinde (%32,47), kriterlere göre AAA hastalığından uzaklaşan 38 kişinin ise 5 tanesinde (%13,15) homozigot MEFV gen mutasyonları saptanmıştır. Kesin AAA olarak belirlenen 117 kişinin 27 tanesinde (%23,07), AAA tanısından uzaklaşan 38 kişinin 9 tanesinde (%23,68) heterozigot MEFV mutasyonları saptanmıştır. Tel-Hashomer kriterlerine göre olası AAA tanısı alan 37 kişinin 14 tanesinde homozigot (%37,83),

4 tanesinde (%10,81) ise heterozigot MEFV mutasyonlarına rastlanmıştır. Kriterlere göre çalışma grubumuzda kesin AAA tanısı konan kişiler arasında, çift mutasyon taşıyıcısı olanların oranının (%32,47), bilinen hemen hemen tüm mutasyonlara bakıldığı ileri sürülen Grateau'nun çalışmasında bildirilenin (%67), yaklaşık yarısı kadar olması, çalışmalarda incelenen mutasyon panellerindeki sayılarla ilişkilendirilebilir.

Çalışmamız kapsamında, MEFV mutasyon testi için gönderilen 192 kişiden, 97 tanesinde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon saptananların 95 tanesinde, rutin olarak taranan M694V, M680I ve V726A mutasyonları, 10. ekson 5'ucu dizi analizi ile bir tanesinde K695R mutasyonu, diğerinde ise R761H mutasyonu ile daha önce tanımlanmamış yeni V734G dizi değişikliği bulunan kompleks allel belirlenmiştir. Çalışma grubunda bulunan 95 kişide ise, mutasyon veya 10. ekson 5'ucunda herhangi bir dizi değişikliğine rastlanmamıştır.

Çalışma grubumuzda saptanan MEFV mutasyon oranı %49,47'dir. Bu sonuç, mutasyon saptanmayan %50,53'lük kesimdeki kişilerde, AAA hastalığını kesin olarak dışlayabileceğimiz anlamına gelemmez. MEFV geninin her bölgesinde olmakla birlikte, en sık 10, 2, 5 ve 3. eksonlarda dizi değişiklikleri tanımlanmaya devam etmektedir. 2007 yılı Haziran ayı itibarıyla, INFEVERS veri tabanında bulunan 150 MEFV dizi değişikliğinin, 32 tanesi kriterlere göre klasik AAA hastalığı, 9 tanesi ise tipik olmayan AAA ile ilişkilendirilmiştir. AAA hastalığından kuşkulanan bir kişinin, MEFV geninin tamamı dizilenmeden, tanı dışlanamaz.

Yapılan bir çalışmada, MEFV geninde daha önce tanımlanmamış H478Y mutasyonu bulunması, hastanın klinik tablosunun uzun atak süresi, başlıca yakınmasının artrit olması ve Kolşisine yanıt vermeyişiyle, tipik olmayan AAA'ya uyması, ayrıca baskın kalıtım modelinden yola çıkarak, özellikle AAA açısından riskli etnik kökene sahip olmayan hastalarda, otoinflamatuvar hastalık şüphesi olduğunda, uygun tanı konması amacıyla, MEFV geninin tam dizi analizinin yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Aldea ve ark. 2004).

Çalışma grubumuzda bulunan ve AAA klinik şüphesiyle gönderilen 170 kişinin, 90 tanesinde laboratuarda rutin incelenen MEFV mutasyonları saptanmış, 80 tanesinde ise saptanmamıştır. Ailesinde bulunan AAA nedeniyle gönderilen 22 kişinin ise 5 tanesinde MEFV mutasyonu saptanmış, 17 tanesinde ise saptanmamıştır. Yakınması olduğu halde mutasyon saptanmayan 80 kişi ve yakınması olmayıp mutasyon

saptanmayan 17 kişi olmak üzere toplam 97 kişiden, dizileme için yeterli miktarda DNA'sı artan 77'sinde, MEFV geni 10. ekson 5' ucunun DNA dizilemesi yapıldığında, yalnızca 2 kişide daha mutasyon saptanabilmiş ve böylelikle çalışma grubunda laboratuarda incelenen mutasyonların bulunduğu 95 kişiye, dizileme sonucu mutasyon saptanan 2 kişi daha eklenerek, toplam 97 kişide mutasyon bulunmuştur. Kendisindeki ateş, peritonit, artrit, baş ağrısı, halsizlik, akne ve sık enfeksiyon geçirme yakınmaları nedeniyle gönderilen kişide, heterozigot K695R mutasyonu saptanmıştır. Ailesinde AAA öyküsü nedeniyle gönderilen ve herhangi bir klinik bulgusu olmayan diğer kişide ise heterozigot V734G ve R761H mutasyonları bulunan kompleks allel saptanmıştır.

Kendi serimizde, MEFV geninde en sık rastlanan üç mutasyondan herhangi biri saptanmayan 95 kişinin 77 tanesine, 10. ekson 5' ucunun dizilemesi uygulandığında, yalnızca 2 kişide daha dizi değişikliğine rastlanması nedeniyle, klinik açıdan AAA tablosuna çok benzeyen belirtileri olan kişilere, tüm MEFV geni dizi analizinin yapılmasının yerinde olacağını ve bu açıdan Aldea ve arkadaşlarının, yalnızca etnik risk grubu dışında kalanlara, tam gen dizilemesi yapılması önerisinin doğru olmadığını düşünmekteyiz. Her geçen gün veri tabanlarına eklenen yeni MEFV dizi değişikliklerinin çoğunun, riskli etnik kökenlerden gelenlerde bulunması ve ayrıca erken tanının, uygun tedavi başlatılması açısından ne denli değerli olduğu gerçeğinden yola çıkarak, AAA'ya çok benzer klinik bulguları olan kişilerde, mutasyon belirlenmesi amacıyla yapılabilecek en detaylı analizlerin yapılmasının doğru olacağını düşünmekteyiz.

Arap toplumunda yapılan bir çalışmada, hastaların %41'inde MEFV gen mutasyonu bulunamamış, %38,49 oranında homozigot, %22,17 oranında bileşik heterozigot ve %38,07 oranında heterozigot MEFV mutasyonları tanımlanmıştır. Araştırmacılar, mutasyon saptanamayan %41'lik oranı, test edilen mutasyon panelinin yalnızca beş mutasyonla sınırlanmış olmasına bağlamışlardır (Majeed, 2005). Bir başka çalışmada ise homozigot, bileşik heterozigot ve heterozigot MEFV mutasyon oranları sırasıyla, %30,1, %39,8 ve %19,3 bulunmuş; %10,8 oranında herhangi bir mutasyon saptanamamıştır (Mattit ve ark. 2006).

Çalışmamızda, MEFV gen mutasyon oranları, %18,7 homozigot, %11 bileşik heterozigot ve %20,8 heterozigot bulunmuş; %49,5 oranında mutasyon saptanamamıştır. Çalışmalar arasındaki oran farklılıkları, büyük olasılıkla incelenen

mutasyon tiplerinin sayısına bağlıdır. Nitekim hem Majeed, hem de Mattit'in yaptığı çalışmalarda beş farklı mutasyon incelenmiş, bizim çalışmamızda ise yalnızca üç mutasyona bakılmıştır. Dolayısıyla incelenecek mutasyon çeşidi arttıkça, hasta kişilerde mutasyon tanımlanmasının artacağı sonucu ortaya çıkmaktadır.

AAA hastalığında, çoğu zaman tipik olarak ateş ve akut seröz inflamasyon belirtileri birlikte bulunur. Yapılan bir çalışmada, AAA hastalığında en sık rastlanan klinik belirtilerden ateş %83,3, abdominal bulgular %74, torasik bulgular %24, eklem bulguları %50,3, eritem %8,2 ve amiloidoz %4 oranında bulunmuştur (Grateau ve ark. 2000). Aynı araştırmacıların yaptıkları bir başka çalışmada ise abdominal bulgu oranı %95, torasik bulgu oranı %45, eritem oranı %25 ve artrit oranı %50'den fazla olarak bildirilmiş, önceki çalışmada bildirilmeyen perikardit oranı ise %1 olarak belirtilmiştir (Grateau 2004).

Bizim çalışma grubumuzda ateş, peritonit, plörit, artrit, kardit, eritem ve amiloidoz oranları sırasıyla %58,3, %70,3, %41,1, %56,3, %12,5, %30,7 ve %2,6 olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi, aynı araştırmacıların değişik zamanlarda yaptıkları benzer çalışmalarda da, klinik bulguların görülme sıklıkları arasında önemli ölçüde farklılıklara rastlanmaktadır. Bu nedenle, AAA hastalığında sık tanımlanan bulguları, anamnez ve fizik muayene yanında, tanıya götüren yardımcı unsurlar olarak değerlendirmek dışında anlam yüklememek yerinde olacaktır. AAA hastalığında, fenotipik özellik sıklıklarının, sağlıklı olarak belirlenebilmesi için, yaş, cinsiyet, etnik köken, ebeveynler arası akrabalık durumu, bulunan başka hastalıklar ve ilaç kullanımı gibi, çok detaylı kriterlere göre seçilmiş ve sağlıklı kişilerden oluşturulmuş kontrol grubu gerekir. Bu durumda bile, AAA hastalığı açısından, etnik olarak özellik gösteren bir toplumda, kontrol grubuna alınacak herkesin, tüm MEFV geni dizilenmeden, en azından mutasyon taşıyıcılığı dışlanamayacağı için, çeşitli taraflı sonuçlardan kaçınılamayacağını düşünmekteyiz. Bu koşulların yerine getirelemeyeceği hallerde ise, AAA hastalarındaki klinik belirtilerden oluşan fenotipin, MEFV genotipleriyle karşılaştırılması ve istatistiksel düzeyde anlamlı ilişkilerinin olup olmadığının incelenmesi daha yerinde olacaktır.

Bir çalışmada, iki kızkardeşte de homozigot M694V genotip bulunmasına karşın, fenotipik bulgularının farklı bulunması, genotip-fenotip bağlantı çalışmalarının düşünüldüğü kadar basite indirgenemeyeceğini göstermektedir (Kutlay ve ark. 2006).

Bu bağlantıların anlaşılması için kompleks alleller, değiştirici lokuslar, genetik heterojenite ve olası epigenetik etmenlerin varlığı detaylı şekilde incelenmelidir.

AAA hastalığının görülme sıklığı, genel olarak erkek ve kadınlarda farklı kabul edilmemekle birlikte, 1,2:1 gibi bir oranla erkeklerde daha sık görüldüğünün bildirildiği bazı çalışmalar da mevcuttur (Tunca ve ark. 2005). AAA genotip-fenotip bağlantılarının incelendiği bir başka çalışmada, erkeklerin oranı %44,7, kadınların ise %55,3 olarak bildirilmiştir (Sakallıoğlu ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda ise erkeklerin oranı %48,43, kadınların %51,56 olarak bulunmuştur.

AAA hastalığındaki klinik belirtilerin, 20 yaşına kadar ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Sayarlıoğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 20 yaş üzerindeki, toplam çalışma grubunun %14'ünü oluşturduğunu bulmuşlardır (Sayarlıoğlu ve ark. 2005). Bizim çalışmamızda ise, 21 yaş ve üstündekiler, çalışma grubunun % 21,9'unu oluşturmaktadır. Çalışma grubumuzdaki kişilerin, rastlantısal olarak seçilmiş olması ve çoğunun, moleküler test için laboratuara, klinik tanı zorlukları nedeniyle hastalıklarının ileri evrelerinde gönderilmesi ya da hasta ve/veya hasta ailelerinin, çeşitli nedenlerle, hastalık yakınmaları başlayıp, bir süre devam ettikten sonra hekimlere gitmeleri nedeniyle, karşılaşılan yaşların ilerlediğini düşünebilir, çalışmalar arasındaki bu orantısal farktan, bu durumu sorumlu tutabiliriz.

Türkiye'de, AAA'nın sık görülmesine ve kırsaldan büyük kentlere yoğun göç yaşanmasına karşın, Türk AAA çalışma grubunun bildirdiğine göre AAA hastalarının anne ve babalarının kökenleri araştırıldığında sıklıkla İç Anadolu ve Karadeniz'in iç kısımları ön plana çıkmaktadır (Tunca ve ark. 2005). Bir çalışmada, kökenleri İç Anadolu olan AAA hastalarının, incelenen tüm hastaların %62,9'u olduğu ve bunların %80'inin homozigot veya heterozigot M694V mutasyonu taşıdığı belirtilmiştir (Sakallıoğlu ve ark. 2006). Çalışma grubumuzun %36,84'ünün İç Anadolu bölgesinden olduğu, bunların homozigot veya heterozigot M694V mutasyonu taşıma oranlarının %27 olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmalar arasında oranların farklı bulunması, incelenen mutasyon panelinden kaynaklansa da, her bir çalışmanın kendi kapsamında rastlanan mutasyon tipleri sıralandığında, çalışmaların ikisinde de en başta M694V'nin yerini koruduğu görülmektedir.

AAA ataklarında yalnızca bir organ tutulumu olmakta ve atak birkaç saat ya da en fazla 3-4 gün içinde kendiliğinden çözülmetedir. Atakların oluş sıklığı, hastadan

hastaya veya aynı hastanın atakları arasında farklılık göstermektedir (Groteau 2004). Birçok genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmasında, M694V mutasyonu ile atak sıklığı ve yakınmaların yoğunluğuyla ölçülen, klinik tablo ağırlığı arasında bağlantı kurulmuştur (Cazeneuve ve ark. 2000).

Çalışma grubumuzda, çeşitli yakınması olanların %58,82'sinin, atak sıklıklarının dönemler içinde değişerek, belli bir düzene uymadığı görülmüştür. İstatistiksel değerlendirmede, homozigot M680I ve M694V genotiplerine sahip olanlarda, atak sıklıklarının değişken olduğu, M694V/M680I genotipine sahip kişilerde ise yıllık atak sayısının diğer genotiplere oranla anlamlı derecede az olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç, sık ataklar ile M694V mutasyonu arasında bağlantı olduğunu ileri süren çalışmalara ters düşmektedir. Çalışma grubumuzdaki hastalarla yapılan görüşmelerde, çoğu hastanın, artrit veya kardit gibi, yaşam kalitelerini belirgin şekilde azaltan belirtiler dışında, hafif bir karın ağrısı ve fazla yüksek olmayan ateşle seyreden atakları çok önemsemediği ve bu nedenle üstünde durmadığı fikri oluşmuştur. Hastaların öznel tanımlamalarından yola çıkarak, atak sıklığını değerlendirmenin çok sağlıklı bilgi sağlamayabileceği olasılığını da aklımızdan çıkartmamamız gerekmektedir.

Kogan ve arkadaşları, Musevi AAA hastalarıyla yaptıkları bir çalışmada, V726A mutasyonu ile ateşli ataklar arasında anlamlı ilişki bulmuştur. Aynı çalışmada, AAA'nın III. fenotipi olarak tanımlanan, kendisinde klinik belirtiler olmadığı halde, homozigot MEFV gen mutasyonu bulunan kişilerin, bildirilen oranlardan daha çok olduğu saptandığından, bu toplumda MEFV mutasyon taşıyıcılığı oranlarının çok yüksek düzeylere ulaştığı belirtilmiştir (Kogan ve ark. 2001).

Bizim çalışmamızda, V726A mutasyonu ile ateş arasında değil, kardit ve görme problemleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı ilişki bulunmuştur. Bunun yanı sıra, M694V/M680I genotipi ile ateş arasında anlamlı bağlantı bulunmuştur. Çalışma grubumuzda, AAA fenotip III olarak tanımlanan herhangi bir kişi belirlenmemiştir.

Tunca'nın çalışmasında kardit oranı %2,4 bulunmasına karşın (Tunca ve ark. 2005), çalışma grubumuzda MEFV genotipine göre, kesin AAA tanısı konanların % 12,8'inde kardit bulunmuş ve homozigot V726A genotipiyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Ancak bizim çalışmamızda kardit belirtisi bulunan kişilerin önemli bir kısmı, Tunca'nın çalışmasında belirttiği gibi, retrosternal ağrı ile belirginleşen, kişisel

yakınma düzeyinde kardit tanımlamış, bu hastaların çok az bir kısmında, klinik yaklaşım ve görüntüleme yöntemleriyle kardit tanısı kesinleştirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz %12,8'lik kardit oranına, şüpheyile yaklaşmak yerinde olacaktır; çünkü bu yakınmaların yerleşim olarak plöritten ayırdedilmesi, öznel düzeyde çok sağlıklı yapılamaz.

Cazeneuve yaptığı bir çalışmada, AAA hastalığında sık rastlanan belirtiler ile M694V, M680I ve V726A mutasyonları arasında ilişki olup olmadığını incelemiş, homozigot M694V mutasyonu ile amiloidoz ve artrit arasında anlamlı bağlantı bulmuştur (Cazeneuve ve ark. 1999). Paut ve Türkçapar'ın yaptıkları çalışmalarda da, homozigot M694V genotipinin artrit ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Paut ve ark. 2000; Türkçapar ve ark. 2007).

Çalışmamızda, Cazeneuve, Paut ve Türkçapar'ın sonuçlarını destekler nitelikte, homozigot M694V genotipi ile hem artrit hem de amiloidoz arasında bağlantı ortaya konmuştur.

Sayarlıoğlu incelediği 20 yaş üstü AAA hastalarında, artrit belirtisinin anlamlı ölçüde az görüldüğünü bildirmiştir. Aynı sonuç Tunca ve arkadaşlarının çalışmasında da belirtilmiştir (Sayarlıoğlu ve ark. 2005; Tunca ve ark. 2005). Oysa bizim çalışmamızda yaş ilerledikçe, artrit bulgusunun da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı bulunmuştur. Ancak, bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz bir başka parametre olan Kolşisin tedavisine uyumun, bu sonuçla ilişkisi olduğu düşünülebilir. Her iki allelde MEFV mutasyonu bulunuşuna göre kesin tanı alan, 57 AAA hastasının 25'inin, saç dökülmesi, diyare gibi ilacın yan etkileri ile infertilite ve abortus oluşturma riski gibi, kişisel endişelerinden ötürü, uygun zaman ve dozda Kolşisin kullanmadığı belirlenmiştir. 20 yaş üstünün, kadın ve erkeklerde özellikle sayılan yan etkiler açısından psikolojik olarak rahatsızlık duyulabilecek yaş dönemi olduğu ve hastaların bu çekincelerinden ötürü, Kolşisin kullanımını aksatmalarına bağlı olarak, artrit yakınmasını daha ağır ve sık yaşadıklarını ileri sürebiliriz.

AAA hastalığında, mukokutanöz belirtiler sıklıkla tanımlanmıştır. Bu belirtilerin genotip dağılımlarına göre ilişkisinin incelendiği bir çalışmada M694V mutasyonu ile eritem arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki belirlenmiştir (Paut ve ark. 2000).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, eritem ile M694V mutasyon taşıyıcılığı, akne ile K695R mutasyonu taşıyıcılığı ve ürtiker ile homozigot M694V

genotipi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bağlantı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlarımız, Paut'un elde ettiği sonuçları desteklemekle kalmayıp, akne ve ürtiker gibi iki yeni mükokutanöz belirti ile genotipik ilişkileri de ortaya koymuştur.

Yapılan bir çalışmada uzun süreli ayakta durma veya oturma gibi fiziksel zorlanmaların, AAA hastalarında bacak ağrısını arttırması, alt ekstremitelerde artan hidrostatik basınca veya mutant pirinin, zorlayıcı koşullarda oluşan mikro çevrede oluşan inflamatuvar durumu karşılayacak düzeyde bulunmamasına bağlamışlardır (Dinç 2000).

Çalışmamızda bahsedilen fiziksel koşulların atakları tetikleyip tetiklemediği sorgulanmış, 16 kişide atakları etkilediği belirlenmiştir. Ancak bu etkilenim, kişilerin genotipleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel düzeyde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak literatürde çok bildirilmeyen, ancak üstünde durulması gereken bir durum, fiziksel, çevresel, hormonal ve duygusal zorlayıcı koşulların, AAA hastalarında atakları tetiklemesi, sıklık ve ağırlığını arttırması oldukça dikkat çekicidir. Bu görüşümüz, AAA tedavisinde Kolşisin'e çok olumlu yanıt vermeyen hastalarda, tedavi protokollerine SSRI'ların eklenmesiyle, tedavi başarısının artışıyla da desteklenmiştir (Onat ve ark. 2007).

Kolşisin kullanan hastaların, atak sıklık ve şiddetinin azalmasını tedaviye verilen yanıt olarak değerlendiren bir çalışmada, Kolşisin'e yanıtız olan hastaların, yanıt veren hastalara göre, ataklarının daha ağır geçtiği, özellikle peritonit, artrit, plörit, eritem ve ateş yakınmalarının anlamlı ölçüde daha belirgin olduğu bulunmuştur. Baldır ve ayak bileği ağrısı, proteinüri sıklıkları, yanıt veren ve vermeyen gruplar arasında değişmemiştir. Ancak anemi, Kolşisin'e yanıtız hastalarda daha fazla görülmüştür. Hastaların klinik yakınmaları ve MEFV genotipleri, Kolşisin yanıtlarına göre değerlendirildiğinde, iki grup arasında genotip dağılımı ve sık rastlanan yakınmalar açısından anlamlı fark bulunamamıştır (Lidar ve ark. 2004).

Çalışma grubumuzda, Kolşisin'e, atak sıklığında azalma ve/veya şiddetinde hafifleme şeklinde yanıt veren hastaları değerlendirdiğimizde, M694V/V726A genotipinde, artrit yakınmasının, diğer yakınmalara oranla anlamlı ölçüde daha fazla olduğu ortaya çıktı. Kolşisin'e verilen yanıt ile anemi arasındaki ilişkiyi, MEFV geninde mutasyon varlığına göre incelediğimizde, anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır. Sonuçlarımızın ikisi de, Lidar'ın elde ettiği sonuçları desteklememektedir.

Heterozigot MEFV mutasyonu taşıyanlarda, kronik olarak akut faz yanıtının bulunduğu gösterilmiş, yeni belirlenen klinik tanı kriterleri arasına bu ölçütün de eklenmesi önerilmiştir. Bu çalışmada, heterozigot MEFV mutasyonu taşıyıcılarında gözlenen fenotipik özellikler, taranmamış olan bazı mutasyonların varlığıyla açıklanmaya çalışılmıştır. Buna ek olarak, ikinci bir genin varlığı, MEFV gen promötör bölgesinde oluşabilecek mutasyonlar, çevrim hataları, değiştirici genler ve penetrans azalması da, ileri sürülen mekanizmalar arasındadır. İnflamasyona duyarlı bu kişilerde, değiştirici gen ya da epigenetik etmenlerin, aşırı boyutta inflamasyon patlamalarına neden olabileceği ileri sürülmüştür (Özen ve ark. 2003).

Yaptığımız çalışmada, akut faz yanıtı göstergelerinden biri olan eritrosit sedimentasyon hızı artışının, heterozigot V726A mutasyonu taşıyıcılarında, diğer genotiplere göre anlamlı ölçüde fazla olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, Özen ve arkadaşlarının sonuçlarını desteklemiş ve akut faz göstergelerinden biriyle daha, genotip arasında anlamlı bir bağlantı kurulmasını sağlamıştır.

Yapılan birçok genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmasından elde edilen karşıt sonuçların başında, M694V mutasyonu ile amiloidoz arasındaki ilişki gelmektedir. AAA, ani gelişen böbrek amiloidozu gibi tipik olmayan bir tablo ile ortaya çıkabilse de, hastalık seyri sırasında amiloidoz gelişimine daha sık rastlanmaktadır (Regina ve ark. 2003). Suriye’de yapılan bir genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmasında da, daha önceki çalışmalara benzer bir şekilde hastalık şiddeti ile amiloidoz gelişimi açısından, M694V mutasyonu arasında bağlantı kurulmuştur (Mattit ve ark. 2006). Sakallıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı inceleme sonucu, M694V ile amiloidoz arasında ilişki bulunamamıştır (Sakallıoğlu ve ark. 2006).

V726A mutasyonunun sık bulunduğu Askenazi Museviler, Ermeniler ve Irak Musevileri gibi etnik gruplarda, amiloidoza daha az rastlandığı bulunmuş ve V726A mutasyonunun amiloidoz açısından koruyucu olduğu ileri sürülmüştür (Pras ve ark. 1997, Kaynak: Yalçinkaya ve ark. 2000 p.68). Ancak, Yalçinkaya ve arkadaşları, bu mutasyonun amiloidoz gelişimini önlemediğini göstermiştir (Yalçinkaya ve ark. 2000). Ayrıca, sıklıkla Ermeniler’de gözlenen M680I mutasyonunun, hastalık açısından daha hafif bir tablo ve düşük amiloidoz frekansı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Schwabe ve ark. 1974, Kaynak: Yalçinkaya ve ark. 2000 p.68; Pras 1998, Kaynak: Yalçinkaya ve ark. 2000 p.68).

Türk AAA çalışma grubunun verilerine göre, Türklerde en sık rastlanan gen mutasyonu M694V ve ikinci sırada ise M680I'dır. Bu grubun verileri, daha önceki bulgulardan bazılarını desteklese de, amiloidozla ilişkili sonuçlar birkaç çalışmanın tersinedir. Yalçinkaya ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, M694V mutasyonunun amiloidoz riskini arttırmadığı bulunmuştur (Yalçinkaya ve ark. 2000).

Amerika'da yaşayan Ermeniler'de, Ermenistan'da yaşayanlara göre daha az amiloidoz bulunması, çevresel etmenlerin amiloidoz gelişimine katkısı olduğu yönünde destekleyici bir bulgu olmuştur (Cazeneuve, 2000).

Bizim çalışma grubumuzda beş hastada, hastalığın seyri sırasında amiloidoz gelişmiştir. Bu hastalardan ikisi, homozigot M694V, biri bileşik heterozigot M694V/M680I genotipinde, toplam üç erkek, biri homozigot M694V, diğeri homozigot M680I genotipinde, toplam iki kadındı. Cazeneuve'nin çalışmasında erkek cinsiyetinin, amiloidoz için risk faktörü olduğunun belirlenmesinin tersine, bizim çalışmamızda amiloidozla cinsiyet arasında anlamlı herhangi bir ilişki kurulamadı. 192 kişinin, yalnızca 5 tanesi kadar az bir kısmında amiloidoz gözlenmesi, çalışmalar arasındaki farklılıktan sorumlu tutulabilir. Ancak amiloidoz ile genotipler karşılaştırıldığında, M694V ve M680I homozigotluğu ile amiloidoz gelişimi arasında, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Çalışmamızda, hiç MEFV mutasyonu saptanmaması ile amiloidoz arasında anlamlı ilişki bulunması çelişkili gözükse de, bunun temelinde çalışmamızda saptanmamış bir MEFV mutasyonu olasılığı yattığı ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, genotip-fenotip bağlantılarıyla ilgili çelişkili bildiriler vardır ve Kolşisin tedavisi, AAA'nın doğal seyrini önemli düzeyde değiştirip, amiloidoz sıklığını belirgin olarak azalttığı için, özellikle tedavi erken başlatıldığında, belli genotipleri hastalık belirtileriyle ilişkilendirmek güçtür.

Bazı hastalarda, birden fazla otoinflatuar hastalıklarla ilişkilendirilmiş gen mutasyonu tanımlanmıştır. Örneğin Stojanov 12 yaşında bir Çinli erkek çocukta, hem TNFRSF1A geninde heterozigot Y20D mutasyonu, hem de MEFV geninde heterozigot E148Q mutasyonu tanımlamıştır. Hastada gözlenen fenotip, ağır bir TRAPS tablosu olarak belirtilmiştir. Araştırmacılar MEFV geninin, diğer otoinflatuar hastalıkları değiştirici etkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Stojanov ve ark. 2004b).

Arkwright 3 yaşında bir HIDS hastasında, MVK geninde bileşik heterozigot V377I/G211A mutasyonlarına ek olarak, TNFRSF1A geninde heterozigot P46L

taşıyıcılığı bulmuşlar ve bu iki hastalığın birarada görülmesinin 5 milyonda bir kadar nadir olduğunu bildirmişlerdir. Genel fikir birliğine varılmış bir HIDS tedavi protokolü olmamasına rağmen, bu hastada TRAPS hastalarında kullanılan bir TNF almaç blokeri denenmiş ve kısmen fayda sağlanmıştır (Arkwright ve ark. 2002).

Bir diğer çalışmada Hoffman, V377I/S378P bileşik heterozigot genotipi bulunan bir HIDS hastasında, aynı zamanda TNFRSF1A'da heterozigot olarak R92Q mutasyonu tanımlamıştır. Bu hastada ileri derecede düşük mevalonat kinaz aktivitesine rağmen, beklenen HIDS tablosu oldukça hafif gözlenmiş, ancak herhangi TRAPS hastalık bulgusuna rastlanmamıştır, oysa bu penetransı düşük mutasyonun, bazen semptomları bulunmayan TRAPS hastalarında gözlenmesine rağmen, normalde otoinflamatuvar yanıtı arttırması beklenmektedir (Hoffmann ve ark. 2005).

Kalıtsal otoinflamatuvar hastalıkların tanısında moleküler test yaklaşımlarının nasıl olması gerektiğini inceleyen bir çalışmada, otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiş birçok genin moleküler olarak incelenmesiyle, hastalığa klinik olarak tanı konması arasında anlamlı düzeyde fark bulunamamıştır. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, öncelikle klinik ayırıcı tanı ile hastalık şüphesinin en fazla iki hastalığa kadar indirgenmesine çalışılmasını, daha sonra bunlara yönelik moleküler test yapılmasını önermişlerdir. Bu çalışma sonuçları, aynı hastalarda birden fazla otoinflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilmiş gen mutasyonlarının gözlenme sıklığı ile aynı mutasyonlara toplumda rastlanma olasılığının farklı olmadığını göstermiştir (Simon ve ark. 2006).

Bizim çalışmamızda MEFV gen mutasyonu bulunan 6 kişide, aynı zamanda CIAS1 genine ait mutasyonların bulunması tamamen rastlantısal olabilir. Ancak 81 kişilik kontrol grubumuzda incelediğimiz CIAS1 mutasyonlarından hiçbirini saptanmamıştır. Bu sonuçlar, R262W, L307P ve V200M mutasyonlarının, Türk toplumunda sık rastlanan ve penetransı düşük olan mutasyonlar arasında sayılamayacağını düşündürebilir.

“AAA benzeri” klinik tablosu bulunan kişilerde, CIAS1 mutasyonlarının da sorumlu olabileceği ileri sürülmüş ve MEFV geninde mutasyon bulunmayan, ancak AAA benzeri fenotipi olan hastalarda CIAS1 geninde mutasyon incelenmesi gerekliliği vurgulanmıştır (Jéru ve ark. 2006).

Bir diğer çalışmada, CIAS1 geninde tanımlanan V200M mutasyonunun fenotipik etkileri arasında, kriyopirinopatilerde sık rastlanan bulguların dışında öksürük, kardiyomiyopati, nefropati ve ötiroid tiroidit gibi, daha önce bildirilmemiş bulgular sıralanmıştır. Bu nedenle CIAS1 gen mutasyonlarıyla ilişkili klinik fenotipin, daha da geniş olduğu ileri sürülmüştür (Pörksen ve ark. 2004).

Çalışmamızda CIAS1 geninde mutasyon bulduğumuz 11 hasta, Tel-Hashomer kriterlerine göre değerlendirildiğinde, V200M heterozigot taşıyıcısının kesin AAA, L307P heterozigotlarından 6 tanesinin kesin AAA, 3 tanesinin olası AAA ve 1 tanesinin AAA olmadığı görüşüne varılmıştır. İlginç bir şekilde, V200M mutasyonu gözlenen hastada, homozigot M694V mutasyonu tanımlanmış ancak fenotip daha çok kriyopirinopatilere benzetilmiştir. Pirinin, kriyopirin üzerindeki baskılayıcı rolünden yola çıkarak, MEFV mutasyonu nedeniyle işlevinde bozulma oluşmuş pirinin, kriyopirin üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması beklenir. Buna ek olarak, aynı hastada işlev artışı şeklinde etkisi olduğu bildirilen, V200M mutasyonunun da bulunması, M694V mutasyonunun kriyopirin üzerine olan etkisinin, daha da artışına yol açmış ve hastada gözlenen fenotipin, kriyopirinopati tablosuna daha çok benzemesine neden olmuştur. Bu hastada oluşan atakların, Kolşisin'e olumlu yanıt vermesi, mutant pirin işlevinin, fenotipe olan etkisini daha da kesinleştirmektedir.

R262W, L307P ve V200M varyantlarının hastalıklara nasıl yatkınlık oluşturduğuyla ilişkili bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlardan biri CIAS1'in olası bir baskılayıcısı olduğu ve bunun bağlanması bozulması, bir diğeri ise hücre içi sinyal olaylarında CIAS1'in etkinliğinin artışıdır. NACHT alanında yer alan R262W ve L307P mutasyonlarının, NTPaz etkinliği oluşturduğu düşünülmektedir (Aganna ve ark. 2002).

Bir çalışmada uzun dönemler boyu Kolşisin kullanımının, endotel hücrelerinde birçok inflamasyon öncüsü genin ifadesinin baskılandığı gösterilmiştir. Kolşisin kullanmayan bir AAA hastasında, CIAS1 gen ifadesinin yüksek düzeylerde olması, Kolşisin tedavisinin periferik lökositlerde CIAS1 ifadesini azaltıcı yönde değiştirebileceğini düşündürmüştür (Üstek, 2007).

Çalışma grubumuzda L307P mutasyonu bulduğumuz hastalardan bir tanesi, yalnızca Kolşisin kullanmakta, 2 tanesi ise hem Kolşisin, hem de analjezik kullanmaktaydı. Yalnızca Kolşisin kullanan hasta ile, hem Kolşisin, hem analjezik

kullananlardan birinin MEFV geninde mutasyon bulunmadı. Hem Kolşisin hem de analjezik kullanan L307P mutasyon taşıyıcısının, aynı zamanda MEFV geninde homozigot M680I genotipi belirlenmiştir.

Sonuç olarak, CIAS1 geninde mutasyon tanımladığımız 11 kişiden, ikisinin hem MEFV geninde homozigot mutasyon belirlenmiş, hem de Kolşisin kullanmaktaydı. Üstek'in çalışmasında bildirdiği gibi, Kolşisin kullanımının, bizim çalışmamızdaki iki hastada birlikte gözlenen, MEFV ve CIAS1 gen mutasyonlarının, pirin ve kriyopirin işlevlerinin bozulmasına ek katkıda bulunup bulunmadığının anlaşılması için, protein düzeyinde işlevsel çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Çalışma grubundakilerin, MEFV ve CIAS1 genotipleriyle, demografik, klinik ve laboratuvar bulgularından oluşan fenotipleri karşılaştırıldığında, 30 kadar parametre ile çeşitli mutasyonlar arasında, istatistiksel olarak anlamlı bağlantılar kurulmuştur.

Çalışmamızın sonucunda, tek gen kalıtımı göstermesine rağmen, AAA tablosunda yalnızca MEFV gen mutasyonlarının değil, başka etmenlerin de rol oynadığı görüşünü destekleyen veriler elde edilmiştir. Bundan hareketle- iddialı bir görüş olmakla beraber- klasik Mendelyen kalıtıma farklı bir bakış açısı getirilebilir. AAA hastalığında CIAS1 mutasyonları gibi, eğer beklenmedik farklı gen mutasyonları, ilişkilendirilmedikleri otoinflamatuvar hastalıkların fenotipine etki ediyorsa, fenotip-genotip bağlantılarını basite indirgeyen eski inanışlardan uzaklaşılması ve bu tip bağlantı çalışmalarına yeni boyutlar kazandırılması yerinde olacaktır.

KAYNAKLAR

Aderem, A. ve Smith, K.D. (2004). A systems approach to dissecting immunity and inflammation. *Seminars in Immunology*, **16**, 55-67.

Aganna, E., Martinon, F., Hawkins, P.N., Ross, J.B., Swan, D.C., Booth, D.R. ve ark. (2002). Associations of mutations in the *NALP3/CIAS1/PYPAF1* gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis and Rheumatology*, **46**(9), 2445-2452.

Akdoğan, A., Çalgüneri, M., Yavuz, B., Arslan, E.B., Kalyoncu, U., Sahiner, L. ve ark. (2006). Are familial Mediterranean fever (FMF) patients at increased risk for atherosclerosis? Impaired endothelial function and increased intima media thickness are found in FMF. *JACC*, **48**, 2351-2353.

Akpolat, T., Yılmaz, E., Akpolat, I., Dilek M., Karagöz, F., Balcı, B. ve ark. (2002). Amyloidosis in Behçet's disease and familial Mediterranean fever. *Rheumatology*, **41**, 592-593.

Aksentijevich, I., Nowak, M., Mallah, M., Chae, J.J., Watford, W.T., Hofmann S.R. ve ark. (2002). De novo *CIAS1* mutations, cytokine activation and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID). *Arthritis in Rheumatology*, **46**(12), 3340-3348.

Aldea, A., Campistol, J.M., Arostegui, J.I., Rius, J., Maso, M., Vives, J.ve ark. (2004). A severe autosomal dominant periodic inflammatory disorder with renal AA amyloidosis and colchicine resistance associated to the MEFV H478Y variant in a Spanish kindred: An unusual familial Mediterranean fever phenotype or another *MEFV* associated periodic inflammatory disorder? *American Journal of Medical Genetics*, **124A**, 67-73.

Aringer, M. (2004). Periodic fever syndromes: a clinical overview. *Acta Medica Austriaca*, **31**(1), 8-12.

Arkwright, P.D., McDermott, M.F., Houten, S.M., Frenkel, J., Waterham, H.R. ve Aganna, E. (2002). Hyper IgD syndrome (HIDS) associated with *in vitro* evidence of

defective monocyte TNFRSF1A shedding and partial response to TNF receptor blockade with etanercept. *Clinical and Experimental Immunology*, **130**, 484-488.

Arostegui, J.I., Aldea, A., Modesto, C., Rua, M.J., Argüelles, F., Gonzales Ensenat, M.A. ve ark. (2004). Clinical and genetic heterogeneity among Spanish patients with recurrent autoinflammatory syndromes associated with the *CIAS1/ PYPAF1/ NALP3* gene. *Arthritis and Rheumatology*, **50**(12), 4045-4050.

Athman, R. ve Philpott D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Current opinion in microbiology*, **7**, 25-32.

Ben-Chetrit, E., Bergman, S. ve Sood, R. (2006). Mechanism of the antiinflammatory effect of colchicine in rheumatic disease: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology*, **45**, 274-282.

Beutler, B., Hoebe, K., Georgel, P., Tabeta, K. ve Du, X. (2004a). Genetic analysis of innate immunity: TIR adaptor proteins in innate and adaptive immune responses. *Microbes and Infection*, **6**, 1374-1381.

Beutler, B. (2004b). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, **40**, 845-859.

Boschan, C., Witt, O., Lohse, P., Foeldvari, I., Zappel, H. ve Schweigerer, L. (2006). Neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID) due to a novel S331R mutation of the *CIAS1* gene and response to interleukin-1 receptor antagonist treatment. *American Journal of Medical Genetics*, **140A**, 883-886.

Bouchier Hayes, L., Conroy, H., Egan, H., Adrain, C., Creagh, E.M., MacFarlane, M. ve ark. (2001). CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NFκB activation pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(47), 44069-44077.

Bouchier Hayes, L. ve Martin, S.J. (2002). CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO reports*, **3**(7), 616-621.

Brunn, G.J. ve Platt, J.L. (2006). The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends in Molecular Medicine*, **12**(1), 10-16.

Cattan, D. (2003). Familial Mediterranean Fever: Is low mortality from tuberculosis a specific advantage for MEFV mutation carriers? Mortality from

tuberculosis among Muslims, Jewish, French, Italian and Maltese patients in Tunis (Tunisia) in the first half of the 20th century. *Clinical and Experimental Rheumatology*, **21**(4 Suppl 30), S53-54.

Cattan, D. (2005). MEFV mutation carriers and diseases other than Familial Mediterranean Fever: proved or non-proved associations, putative biological advantage. *Current Drug Targets Inflammation & Allergy*, **4**, 105-112.

Cazeneuve, C., Sarkisian, T., Pecheux, C., Dervichian, M., Nedelec, B., Reinert, B. ve ark. (1999). MEFV gene analysis in Armenian patients with Familial Mediterranean Fever: Diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype- genetic and therapeutic implications. *American Journal of Human Genetics*, **65**, 88-97.

Cazeneuve, C., Ajrapetyan, H., Papin, S., Roudot-Thoraval, P., Genevieve, D. ve ark. (2000). Identification of MEFV independent modifying genetic factors for Familial Mediterranean Fever. *American Journal of Human Genetics*, **67**, 1136-1147.

Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M. ve Farrell, C. (2000). The gene for Familial Mediterranean Fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, **95**, 3223-3231.

Cerquaglia, C., Diaco, M., Nucera, G., La Regina, M., Montalto, M. ve Manna, R. (2005). Pharmacological and clinical basis of treatment of familial Mediterranean fever (FMF) with Colchicine or analogues: An update. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, **4**, 117-124.

Chae, J.J., Komarov, H.D., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P.P. ve ark. (2003). Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell*, **11**, 591-604.

Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J. ve ark. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *PNAS*, **103**(26), 9982-9987.

Dinç A. (2000). Non-periodic leg pain in patients with familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **59**, 400.

Dodé, C., Dû, N.L., Cuisset, L., Letourneur, F., Berthelot, J.M., Vaudour, G. ve ark. (2002). New mutations of *CIAS1* that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: A novel mutation underlies both syndromes. *American Journal of Human Genetics*, **70**, 1498-1506.

Dowds, T.A., Masumoto, J., Chen, F.F., Ogura, Y., Inohara, N. ve Núñez, G. (2003). Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **302**, 575-580.

Dowds, T.A., Masumoto, J., Zhu, L., Inohara, N. ve Núñez, G. (2004). Cryopyrin induced interleukin 1 β secretion in monocytic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(21), 21924-21928.

Duncan, B.B. ve Schmidt, M.I. (2001). Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *Sao Paulo Medical Journal*, **119**(3), 122-127.

Feldmann, J., Prieur, A.M., Quartier, P., Berquin, P., Certain, S., Cortis, E. ve ark. (2002). Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in *CIAS1*, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 198-203.

Ferrero Miliani, N., Nielsen, O.H., Andersen, P.S. ve Girardin, S.E. (2006). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β secretion. *Clinical and Experimental Immunology*, **147**, 227-235.

Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J. ve Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*, **7**(12), 1250-1257.

Giaglis, S., Mimidis, K., Papadopoulos, V., Thomopoulos, K., Sidiropoulos, P., Rafail, S. ve ark. (2006). Increased frequency of mutations in the gene responsible for familial Mediterranean fever (MEFV) in a cohort of patients with ulcerative colitis: evidence for a potential disease-modifying effect? *Digestive Diseases and Sciences*, **51**(4), 687-692.

Grateau, G., Pêcheux, C., Cazeneuve, C., Cattan, D., Dervichian, M., Goossens, M. ve ark. (2000). Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Quarterly Journal of Medicine*, **93**, 223-229.

Grateau, G. (2004). Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology*, **43**, 410-415.

Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. ve Gisou van der Goot, F. (2006). *Cell*, **126**(6), 1135-1145.

Harton, J.A., Linhoff, M.V., Zhang, J. ve Ting, J.P.Y. (2002). CATERPILLER: Large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding and leucine-rich repeats domains. *The Journal of Immunology*, **169**, 4088-4093.

Hawkins, P.N., Lachmann, H.J., Aganna, E. ve McDermott, M.F. (2004). Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to Anakinra. *Arthritis&Rheumatism*, **50**(2), 607-612.

Hiller, S., Kohl, A., Fiorito, F., Herrmann, T., Wider, G., Tschopp, J. ve ark. (2003). NMR structure of the apoptosis and inflammation related NALP1 pyrin domain. *Structure*, **11**, 1199-1205.

Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A. ve Kolodner, R.D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nature Genetics*, **29**, 301-305.

Hoffman, H.M., Gregory, S.H., Mueller, J.L., Tresieras, M., Broide, D.H., Wanderer, A.A. ve ark. (2003). Fine structure mapping of *CIAS1*: identification of an ancestral haplotype and a common FCAS mutation, L353P. *Human Genetics*, **112**, 209-216.

Hoffmann, F., Lohse, P., Stojanov, S., Shin, Y.S., Renner, E.D., Kéry, A. ve ark. (2005). Identification of a novel mevalonate kinase gene mutation in combination with the common *MVK* V377I substitution and the low-penetrance *TNFRSF1A* R92Q mutation. *European Journal of Human Genetics*, **13**, 510-512.

Jéru, I., Hayrapetyan, H., Duquesnoy, P., Sarkisian, T. ve Amselem, S. (2006). *PYPAF1* nonsense mutation in a patient with an unusual autoinflammatory syndrome. Role of *PYPAF1* in inflammation. *Arthritis&Rheumatism*, **54**(2), 508-514.

Kagami, S., Saeki, H., Kuwano, Y., Imakado, S. ve Tamaki, K. (2006). A probable case of Muckle-Wells syndrome. *Journal of Dermatology*, **2**, 118-121.

Kallinich, T., Haffner, D., Niehues, T., Huss, K., Lainka, E., Neudorf, U. ve ark. (2007). Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: Literature review and consensus statement. *Paediatrics*, **119**, 474-483.

Kanneganti, T.D., Özören, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L. ve ark. (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/NALP3. *Nature*, **440**, 233-236.

Kastner, D.L. (2005). Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology (American Society of Hematology, Education Program Book)*, **1**, 74-81.

Kinoshita, T., Kondoh, C., Hasegawa, M., Imamura, M. ve Suda, T. (2006). Fas-associated factor 1 is a negative regulator of pyrin-containing Apaf-1-like protein 1. *International Immunology*, **18**(12), 1701-1718.

Kogan, A., Shinar, Y., Lidar, M., Revivo, A., Langevitz, P., Padeh, S. ve ark. (2001). Common *MEFV* mutations among Jewish ethnic groups in Israel: High frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *American Journal of Medical Genetics*, **102**, 272-276.

Kummer, J.A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F. ve ark. (2007). The inflammasome components NALP1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues, suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*, **55**, 443-452.

Kutlay, S., Şengül, S., Keven, K., Ertürk, S. ve Erbay, B. (2006). Two sisters with familial Mediterranean fever: Lack of correlation between genotype and phenotype? *Journal of Nephrology*, **19**(1), 104-107.

Lachmann, H.J., Şengül, B., Yavuzşen, T.U., Booth, D.R., Booth, S.E., Bybee, A. ve ark. (2006). Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations. *Rheumatology*, **45**, 746-750.

Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L.J., Klimecki, W.J., Silverman, E.K., Richter, B. ve ark. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunological Reviews*, **190**, 9-25.

Lidar, M., Scherrmann, J.M., Shinar, Y., Chetrit, A., Niel, E., Gershoni-Baruch, R. ve ark. (2004). Colchicine nonresponsiveness in familial Mediterranean fever: clinical, genetic, pharmacokinetic and socioeconomic characterization. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **33**, 273-282.

Liepinsh, E., Barbals, R., Dahl, E., Sharipo, A., Staub, E. ve Otting, G. (2003). The death-domain fold of the ASC pyrin domain, presenting a basis for pyrin/pyrin recognition. *Journal of Molecular Biology*, **332**, 1155-1163.

Majeed, H.A., El-Khateeb, M., El-Shanti, H., Rabaiha, Z.A., Tayeh, M. ve Najib, D. (2005). The spectrum of familial Mediterranean fever mutations in Arabs: Report of a large series. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **34**, 813-818.

Manji, G.A., Wang, L., Geddes, B.J., Brown, M., Merriam, S., Al-Garawi, A. ve ark. (2002). PYPAF1, a pyrin-containing Apaf-1 like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF κ B. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(13), 11570-11575.

Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, H.D., Brotz, T.M., Frucht, D.M., Aksentijevich, I. ve ark. (2001). The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood*, **98**, 851-859.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose Girma, M. ve ark. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, **240**, 228-232.

Mariathasan, S. ve Monack, D.M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, **7**, 31-40.

Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. ve Tschopp, J. (2006). Gout associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, **440**, 237-241.

Martinon, F. ve Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, **14**, 10-22.

Masters, S.L., Lobito, A.A., Chae, J.J. ve Kastner, D.L. (2006) Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, **6**, 428-433.

Masumoto, J., Dowds, T.A., Schaner, P., Chen, F.F., Ogura, Y., Li, M. ve ark. (2003). ASC is an activating adaptor for NF κ B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **303**, 69-73.

Mathison, J. (2005). Innate immunity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **40**, S13-S15.

Mattit, H., Joma, M., Al-Cheikh, S., El-Khateeb, M., Medlej-Hassim, M., Salem, N. ve ark. (2006). Familial Mediterranean fever in the Syrian population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation. *European Journal of Medical Genetics*, **49**(6), 481-486.

Matzner, Y., Abedat, S., Shapiro, E., Eisenberg, S., Bar-Gil-Shitrit, A., Stepensky, P. ve ark. (2000). Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood*, **96**, 727-731.

McDermott, M.F. ve Aksentijevich, I. (2002). The autoinflammatory syndromes. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, **2**, 511-516.

Mijatovic, V., Hompes, P.G.A. ve Mouges, M.G.A.J. (2003). Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **108**, 171-176.

Moutereau, S., Narwa, R., Matheron, C., Vongmany, N., Simon, E. ve Goossens, E. (2004). An improved electronic microarray-based diagnostic assay for identification of MEFV mutations. *Human Mutation*, **23**, 621-628.

Neven, B., Callebaut, I., Prieur, A.M., Feldmann, J., Bodemer, C., Lepore, L. ve ark. (2004). Molecular basis of the spectral expression of *CIAS1* mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS and FCU. *Blood*, **103**, 2809-2815.

Niel, E. ve Scherrmann, J.M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine*, **73**, 672-678.

O'Connor, W., Harton, J.A., Zhu, X., Linhoff, M.W. ve Ting, J.P.Y. (2003). CIAS1/Cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF κ B suppressive properties. *The Journal of Immunology*, **171**, 6329-6333.

Ogura, Y., Sutterwala, F.S. ve Flavell, R.A. (2006). The inflammasome: First line of the immune response to cell stress, *Cell*, **126**, 659-662.

Onat, A.M., Öztürk, M.A., Özçakar, L., Üreten, K., Kaymak, S.U., Kiraz, S. ve ark. (2007). Selective Serotonin reuptake inhibitors reduce the attack frequency in familial Mediterranean fever. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **211**, 9-14.

Özen, S., Bakkaloğlu, A., Yılmaz, E., Düzova, A., Balcı, B., Topaloğlu, R. ve ark. (2003). Mutations in the gene for familial Mediterranean fever: Do they predispose to inflammation? *Journal of Rheumatology*, **30**, 2014-2018.

Papin, S., Cazeneuve, C., Duquesnoy, P., Jéru, I., Sahali, D. ve Amselem, S. (2003). The tumour necrosis factor α -dependent activation of the human Mediterranean fever (MEFV) promoter is mediated by a synergistic interaction between C/EBP β and NF κ B p65. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(49), 48839-48847.

Paut, I.K., Dubuc, M., Sportouch, J., Minodier, P., Garnier, J.M. ve Touitou, I. (2000). Phenotype-genotype correlation in 91 patients with familial Mediterranean fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. *Rheumatology*, **39**, 1274-1279.

Pörksen, G., Lohse, P., Rösen-Wolff, A., Heyden, S., Förster, T., Wendisch, J. ve ark. (2004). Periodic fever, mild arthralgias, and reversible moderate and severe organ inflammation associated with the V198M mutation in the *CIAS1* gene in three German patients- expanding phenotype of *CIAS1* related autoinflammatory syndrome. *European Journal of Haematology*, **73**, 123-127.

Pugnère, D., Ruiz, M., Sarrauste de Menthère, C., Masdoua, B., Demaille, J. ve Touitou, I. (2003). The MetaFMF website: a high quality tool for meta-analysis of FMF. *Nucleic Acids Research*, **31**(1), 286-290.

Regina, M., Nucera, G., Diaco, M., Manna, R. ve Gasbarrini, G. (2003). Differential diagnosis of periodic fevers. *Archives of Disease in Childhood*, **88**, 87-93.

Ritis, K., Giaglis, S., Spathari, N., Micheli, A., Zonios, D., Tzoanopoulos, D. ve ark. (2004). Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **63**, 438-443.

Rosengren, S., Hoffman, H.M., Bugbee, W. ve Boyle, D.L. (2005). Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **64**, 708-714.

Ross, J.J. (2007). Goats, germs, and fever: Are the pyrin mutations responsible for familial Mediterranean fever protection against Brucellosis? *Medical Hypotheses*, **68**, 499-501.

Saito, M., Fujisawa, A., Nishikomori, R., Kambe, N., Nakata-Hizume, M., Yoshimoto, M. ve ark. (2005). Somatic mosaicism of *CIAS1* in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis&Rheumatism*, **52**(11), 3579-3585.

Sakallıoğlu, O., Gök, F., Kalman, S., Gül, D. ve Gökçay, E. (2006). The phenotype-genotype correlations of FMF patients: a single center study. *Rheumatology International*, **26**, 638-640.

Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. ve ark. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*, **429**, 75-79.

Samuels, J. ve Özen, S. (2006). Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Current Opinion in Rheumatology*, **18**, 108-117.

Sansonetti, P.J. (2006). The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nature Immunology*, **7**(12), 1237-1242.

Sayarlıoğlu, M., Cefle, A., İnanc, M., Kamalı, S., Dalkılıç, E., Gül, A. ve ark. (2005). Characteristics of patients with adult onset familial Mediterranean fever in Turkey: analysis of 401 cases. *International Journal of Clinical Practice*, **59**(2), 202-205.

Shiohara, M., Taniguchi, S., Masumoto, J., Yasui, K., Koike, K., Komiyama, A. ve ark. (2002). ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **293**, 1314-1318.

Siegel, R.M. (2006). Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 308-317.

Simon, A., van der Meer, W.M., Veselý, R., Myrdal, U., Yoshimura, K., Duys, P. ve ark. (2006). Approach to genetic analysis in the diagnosis of hereditary autoinflammatory disorders. *Rheumatology*, **45**, 269-273.

Srinivasula, S.M., Poyet, J.L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z. ve Alnemri, E.S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for Caspase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(24), 21119-21122.

Stehlik, C., Fiorentino, L., Dorfleutner, A., Bruey, J.M., Ariza, M.E., Sagara, J. ve ark. (2002). The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor κ B activation pathways. *Journal of Experimental Medicine*, **196**(12), 1605-1615.

Stehlik, C. ve Reed, J.C. (2004). The PYRIN connection: Novel players in innate immunity and inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, **200**(5), 551-558.

Stoffman, N., Magal, N., Shohat, T., Lotan, R., Koman, S., Oron, A. ve ark. (2000). Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups. *European Journal of Human Genetics*, **8**, 307-310.

Stojanov, S., Weiss, M., Lohse, P. ve Belodrahsky, B.H. (2004a). A novel CIAS1 mutation and plasma/cerebrospinal fluid cytokine profile in a German patient with neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to methotrexate therapy. *Pediatrics*, **114**, 124-127.

Stojanov, S., Lohse, P., McDermott, M.F., Renner, E.D., Kéry, A., Mirakian, R. ve ark. (2004b). Periodic fever due to a novel *TNFRSF1A* mutation in a heterozygous Chinese carrier of *MEFV* E148Q. *Rheumatology*, **43**, 526-527.

Stojanov, S. ve Kastner, D.L. (2005). Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis, and treatment. *Current Opinion in Rheumatology*, **17**, 586-599.

Tchernitchko, D., Legendre, M., Delahaye, A., Cazeneuve, C., Niel, F., Goossens, M. ve ark. (2003). Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve *MEFV* gene mutations. *Clinical Chemistry*, **49**(11), 1942-1945.

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

Ting, J.P.Y., Kastner, D.L. ve Hoffman, H.M. (2006). CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 183-195.

Topaloğlu, R., Özaltın, F., Yılmaz, E., Özen, S., Balcı, B., Beşbaş, N. ve ark. (2005). E148Q is a disease-causing *MEFV* mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **64**, 750-752.

Touitou, I., Picot, M.C., Domingo, C., Notarnicola, C., Cattan, D., Demaille, J. ve ark. (2001). The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis&Rheumatism*, **44**(1), 163-169.

Tunca, M., Akar, S., Önen, F., Özdoğan, H., Kasapçopur, Ö., Yalçinkaya, F. ve ark. (2005). Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey. Results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, **84**, 1-11.

Türkçapar, N., Tuncalı, T., Kutlay, S., Burhan, B.Y., Kınıklı, G., Ertürk, Ş. ve ark. (2007). The contribution of genotypes at the MICA gene triplet repeat polymorphisms and *MEFV* mutations to amyloidosis and course of the disease in the patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, **27**(6), 545-551.

Üstek, D., Ekmekçi, C.G., Selçukbiricik, F., Çakiris, A., Oku, B., Vural, B. ve ark. (2007). Association between reduced levels of *MEFV* messenger RNA in peripheral blood leukocytes and acute inflammation. *Arthritis&Rheumatism*, **56**(1), 345-350.

Werts, C., Girardin, S.E. ve Philpott, D.J. (2006). TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death and Differentiation*, **13**, 798-815.

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

FORMLAR

1) Laboratuara kim tarafından gönderildiniz?

- a. CTF mensubu hekim
- b. CTF dışı hekim
- c. Kendisi/tavsiye

2) Laboratuara gönderilme nedeniniz?

- a. Kendisinde yakınmalar
- b. Akrabalarında AAA tanısı

3) Cinsiyetiniz nedir?

- a. Kadın
- b. Erkek

4) Kaç yaşındasınız?

- a. 1-5
- b. 6-12
- c. 13-20
- d. 21 ve üstü

5) Aileniz Türkiye'nin hangi bölgesinden?

- a. Marmara bölgesi
- b. Ege bölgesi
- c. Akdeniz bölgesi
- d. İç Anadolu bölgesi
- e. Karadeniz bölgesi
- f. Doğu Anadolu bölgesi
- g. Güneydoğu Anadolu bölgesi

6) Ebeveynleriniz arasında akraba evliliği var mı?

- a. Yok
- b. Birinci derece
- c. İkinci derece
- d. Üçüncü derece ve üstü

7) Atak sıklığınız nedir?

- a. Yılda 1-4 arası
- b. Yılda 5-12 arası
- c. Ayda 2-4 arası
- d. Haftada 2 veya daha fazla
- e. Düzensiz sıklıkta ataklar
- f. Atak geçirmiyorum

8) Ataklarınız ne kadar sürer?

- a. 1-3 gün
- b. 4 gün-1 hafta
- c. 1 haftadan uzun
- d. Ataklar arasında farklı süreler
- e. Atak geçirmiyorum

9) Ataklarınızı tetikleyen ve/veya ağırlaştıran durumlar arasında hangileri bulunuyor? (En sık karşılaşılan bir tane belirtin)

- a. Böyle bir durum yok
- b. Duygusal zorlanmalar (stres, üzüntü)
- c. Fiziksel zorlanmalar (yorgunluk, uzun süreli ayakta durma/oturma)
- d. Çevresel koşullar (soğuk, nemli hava)
- e. Hormonal değişiklikler (adet dönemleri)
- f. Atak geçirmiyorum

10) İlaç kullanıyor musunuz?

- a. Hiçbir ilaç kullanmıyorum
- b. Yalnızca Kolşisin kullanıyorum
- c. Yalnızca ağrı kesici ve ateş düşürücü kullanıyorum
- d. Hem Kolşisin, hem de ağrı kesici ve ateş düşürücü kullanıyorum
- e. Yakınmam yok

11) Kolşisin kullanımına ne zaman başlandı?

- a. Moleküler test sonucu belirlenmeden önce
- b. Moleküler test sonucu belirlendikten sonra
- c. Kolşisin kullanmıyorum
- d. Yakınmam yok

12) Kolşisin'i reçetede belirtildiği doz ve aralıklara uygun kullanıyor musunuz?

- a. Kullanıyorum
- b. Kullanmıyorum (düzensiz kullanım, az dozda kullanım, ataklarda artırma vb)
- c. Kolşisin kullanmıyorum
- d. Yakınmam yok

13) Ataklarınızın Kolşisin kullanımına yanıtı nasıl?

- a. Sıklığını belirgin oranda azaltıyor
- b. Yakınmaları belirgin ölçüde hafifletiyor
- c. Hem sıklığı, hem de yakınmaları azaltıp hafifletiyor
- d. Hiçbir değişiklik meydana gelmiyor
- e. Kolşisin kullanmıyorum
- f. Yakınmaların yok

14) Hangilerinden yakınmanız var?

- a. Ateş
- b. Karın ağrısı, mide ağrısı, kasık ağrısı, bulantı, kusma
- c. Eklem ağrısı, kızarıklığı, şişliği
- d. Nefes alıp verme durumunda batıcı tarzda olabilen göğüs kafesi, yan ağrısı
- e. Kalp bölgesinde sıkıştırıcı, batıcı nitelikte ağrı
- f. Cilt üzerinde, özellikle bacaklarda, kenarları düzenli sınırlı, kabarık olmayan, dokunulduğunda hassas, ağrılı, kızarık alanlar (erizipel benzeri eritem)
- g. Böbrek ağrısı
- h. Baş ağrısı, kas güçsüzlüğü, kas ağrıları, kramp
- i. Görme problemi
- j. İşitme problemi
- k. Ağız bölgesinde sık tekrarlayan aftlar
- l. Farenjit, anjin
- m. Genel halsizlik, bitkinlik
- n. Soğukta artış gösteren cilt döküntüsü
- o. Sık tekrarlayan infeksiyonlar
- p. Amiloidoz
- q. İdrarda mikroskopik hematüri
- r. İdrarda albüminüri
- s. Anemi
- t. Nötropeni
- u. Sedimentasyon artışı
- v. Yakınmam yok

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif	Soyadı	Yosunkaya Fenerci
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	04.01.1971
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	55081041206
Email	eyfenerci@istanbul.edu.tr	Tel	0 533 336 4598

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Uzmanlık	İ.Ü. CTF, TBBB, Tıbbi Genetik AD	1997
Üniversite	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	1994
Lise	İstanbul Kadıköy Anadolu Lisesi	1988

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzman doktor	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD	2000-
2.	Research Associate	Boston University, Center for Human Genetics	1997-2000
3.	Asistan doktor	İ.Ü. CTF, TBBB, Tıbbi Genetik AD	1994-1997

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	98/97	TOEFL:600
Almanca	İyi	Orta	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	63	65	67
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
SPSS	İyi
HTML	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

YAYINLAR:

- 1) Brancati F, Barrano G, Silhavy JL, Marsh SE, Travaglini L, Bielas SL, Amorini M, Zablocka D, Kayserili H, Al-Gazali L, Bertini E, Boltshauser E, D'Hooghe M, Fazzi E, **Fenerci EY**, Hennekam RCM, Kiss A, Lees MM, Marco E, Phadke SR, Rigoli L, Romano S, Salpietro CD, Sherr EH, Signorini S, Stromme P, Stuart B, Sztriha L, Viskochil DH, Yuksel A, Dallapiccola B, International JSRD Study Group, Valente EM, Gleeson JG: CEP290 Mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome related disorders. American Journal of Human Genetics. 2007 Jul; 81(1):104-114.
- 2) **Yosunkaya Fenerci E**, Güven GS, Kuru D, Yılmaz Ş, Tarkan-Argüden Y, Çırakoğlu A, Birinci N, Deviren A, Hacıhanefioğlu S, Yüksel A: Supernumerary chromosome der(22)t(11;22): Emanuel syndrome associates with novel features. Genetic Counseling, 2007 (kabul edildi).
- 3) **Yosunkaya Fenerci E**, Yüksel A: Mutasyondan kliniğe Rett sendromu. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 2006, 69(4):120-125.
- 4) **Fenerci EY**, Degirmenci S, Yesil G, Yuksel A: Proteus syndrome with agenesis of the rectus abdominis. British Journal of Dermatology. Nov 2006; 155(5): 1094-1095.
- 5) Güven GS, **Fenerci EY**, Deviren A, Özkılıç A, Yüksel A, Hacıhanefioğlu S: Joubert syndrome co-existing with partial Xp trisomy: review of the literature. Genetic Counseling. 2004; 15(3):321-378.
- 6) Buyru N, Tezol A, **Fenerci EY**, Dalay N: Vitamin D receptor gene polymorphism in breast cancer. Experimental and molecular medicine. 2003 Dec; 35(6): 550-555. (*Atıf sayısı:3*)
- 7) Arısal Ö, Deviren A, **Fenerci EY**, Hacıhanefioğlu S, Ulutin T, Erkmen S, Buyru N: Polymorphism analysis in the COL1A1 gene of patients with thalassemia major and intermedia. Haematologica. 2002;32: 475-482.
- 8) Hacıhanefioğlu S, Güven GS, Deviren A, Silahtaroglu AN, **Fenerci EY**, Özkılıç A, Yüksel A: Trisomy 9p syndrome in two brothers: New clinical findings and review of the literature. Genetic Counseling. 2002; 13(1):41-48. (*Atıf sayısı:1*)
- 9) Lebo RV, Maher T, Farrer L, **Fenerci EY**, Milunsky JM: Highly polymorphic short tandem repeat analyses clarify complex molecular test results. Diagnostic Molecular Pathology. 2001 Sep;10(3):179-89. (*Atıf sayısı:1*)
- 10) Milunsky JM, Maher TA, **Yosunkaya E**, Vohr BR: Connexin-26 gene analysis in hearing-impaired newborns. Genetic Testing. 2000;4(4):345-9. (*Atıf sayısı:13*)
- 11) Lebo RV, Shapiro LR, **Fenerci EY**, Hoover JM, Chuang JL, Chuang DT, Kronn DF: Rare etiology of autosomal recessive disease in a child with noncarrier parents. American Journal of Human Genetics. 2000 Sep;67(3):750-4. (*Atıf sayısı:6*)

12) Wyandt HE, Lebo RV, **Fenerci EY**, Sadhu DN, Milunsky JM: Tandem duplication/deletion in a maternally derived chromosome 9 supernumerary derivative resulting in 9p trisomy and partial 9q tetrasomy. American Journal of Medical Genetics. 2000 Aug 14;93(4):305-12. (*Atıf sayısı:3*)

TEBLİĞLER:

1) Yılmaz S, Deviren A, Kuru D, Cırakoglu A, Kuskucu M, **Yosunkaya-Fenerci E**, Tarkan-Arguden Y, Guven SG, Yuksel A, Hacıhanefioglu S: A case with ring chromosome 18. 6th European Cytogenetics Conference, Chromosome Research Suppl 1, 15: 101, July 2007.

2) Karaca E, Soylemez MA, **Yosunkaya-Fenerci E**, Seven M, Deviren A, Yuksel A: Subtelomeric FISH analysis of chromosome 10. 6th European Cytogenetics Conference, Chromosome Research Suppl 1, 15: 106, July 2007.

3) **Yosunkaya-Fenerci E**, Karaca E, Kuru D, Cırakoglu A, Seven M, Deviren A, Hacıhanefioglu S, Yuksel A: Cytogenetics findings in Joubert syndrome. 6th European Cytogenetics Conference, Chromosome Research Suppl 1, 15: 259, July 2007.

4) Yeşil G, Seven M, **Y. Fenerci E**, Hacıhanefioğlu S, Yüksel A: Warburg micro sendromlu bir olgu sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı, S30, s:85, 17-20 Mayıs 2006

5) Güven SG, Kuru D, **Yosunkaya-Fenerci E**, Yılmaz Ş, Tarkan-Argüden Y, Çırakoğlu A, Deviren A, Birinci N, Yüksel A, Hacıhanefioğlu S: Derivatif 22 [der(22)t(11;22)(q23;q11)] sendromlu bir vaka sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı, P158, s:158, 17-20 Mayıs 2006

6) **Yosunkaya Fenerci E**, Değirmenci S, Yeşil G, Yüksel A: Proteus sendromlu bir olguda iki yeni bulgu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı, P162, s:160, 17-20 Mayıs 2006

7) Yılmaz Ş, Tarkan-Argüden Y, Çırakoğlu A, Deviren A, Kuru D, Güven G, **Yosunkaya-Fenerci E**, Kurt H, Yüksel A, Hacıhanefioglu S: A case with partial trisomy 7p and monosomy 9p: 15th international chromosome conference, Chromosome Research Suppl 1, 12: 145-146, September 2004.

8) Yılmaz Ş, Tarkan-Argüden Y, Çırakoğlu A, Deviren A, Kuru D, Güven G, **Yosunkaya-Fenerci E**, Kurt H, Yüksel A, Hacıhanefioglu S: Parsiyel 7p trizomili ve 9p monozomili bir olgu sunumu. VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Özet Kitabı, KLP:22, 21-24 Nisan 2004

9) **Fenerci EY**, Seven M, Hacıhanefioğlu S, Yüksel A: Bir olgu sunumu: Fraser sendromu. VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Özet Kitabı, KLP:37, 21-24 Nisan 2004

- 10) Buyru N, **Fenerci EY**, Dalay N: VDR polymorphisms in breast cancer. Molecular targets for cancer therapy: Second Biennial Meeting, Conference Syllabus, p. 3, October 11-15, 2002.
- 11) **Fenerci EY**, Özkılıç A, Seven M, Hacıhanefioğlu S: Bardet-Biedl sendromunda yeni bir bulgu (?): Astrositom. V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Özet Kitabı, PK:14, 215, 9-12 Ekim 2002
- 12) Özkılıç A, **Fenerci EY**, Seven M, Hacıhanefioğlu S: Langer mezomelik sendromlu bir olgu. V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Özet Kitabı, PK:05, 206, 9-12 Ekim 2002
- 13) Güven GS, Yılmaz Ş, Deviren A, **Fenerci EY**, Özkılıç A, Yüksel A, Hacıhanefioğlu: Joubert sendromlu bir olguda kısmi X;2 translokasyonu. V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Özet Kitabı, PK:06, 207, 9-12 Ekim 2002
- 14) **Fenerci EY**, Arısal O, Sayhan N, Hacıhanefioğlu S, Erkmén S, Deviren A: Polymorphism analysis in the COL1A1 gene of patients with thalassemia major and intermedia. American Journal of Human Genetics Suppl, 2001.
- 15) Kronn DF, Lebo RV, **Fenerci EY**, Hoover JM, Shapiro LR: Novel occurrence of identical homozygous deletion mutations for maple syrup disease (MSUD) in a child whose parents have no somatic mutations: Confirmation of parenthood and delineation of unique underlying mechanisms. Pediatric Research 47(4):1421 Part 2 Suppl. S Apr 2000.
- 16) Lebo RV, Shapiro LR, **Fenerci Yosunkaya E**, Hoover JM, Chuang JL, Chuang DT, Kronn DF: Etiology of autosomal recessive genetic disease in a child with noncarrier parents. American Journal of Human Genetics Suppl 2, 67:4, 147, Oct 2000.
- 17) Lebo RV, Maher T, Farrer L, **Yosunkaya E**, Milunsky J: Minisatellite analyses clarifies mutation, nonidentity and sample history. American Journal of Human Genetics Suppl 65:4, A219, 1209 Oct 1999.
- 18) Milunsky JM, **Yosunkaya E**, Maher TA, Vohr BR: Connexin-26 (Cx-26) gene mutation detection using Guthrie cards from subsequently identified deaf children. American Journal of Human Genetics Suppl 65:4, A405, Oct 1999
- 19) Wyandt HE, Lebo RV, **Fenerci Yosunkaya E**, Sadhu DN, Milunsky JM: Molecular and cytogenetic characterization of duplication/deletion in a supernumerary der(9) resulting in 9p trisomy and partial 9q tetrasomy in a stillborn. Am J Human Genetics Suppl 63:4, A125, Oct 1998
- 20) Güven SG, Hacıhanefioğlu S, Deviren A, Timur C, Seven M, **Yosunkaya E**, Cenani A: Myelodysplastic syndrome and monosomy 7. 2nd Balkan Meeting on Human Genetics abstract book, section c1, 1996
- 21) Seven M, Suyugül Z, Yüksel A, **Yosunkaya E**, Hacıhanefioğlu S, Cenani A: Focal dermal hypoplasia (Goltz syndrome) associated with giant papillomas and

hypogammaglobulin-A. 2nd Balkan Meeting on Human Genetics abstract book, section e21, 1996

SERTİFİKALAR

Certificate of Research Associate in Medical Genetics. Boston University, Center for Human Genetics, 2000.

ÖDÜLLER

Charcot-Marie-Tooth Association fellowship for “ Fetal gene therapy for Charcot Marie Tooth disease”, 1998

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Şiir ve öykü yazmak,

Fotoğraf çekmek,

Desen çalışmaları