



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında; NLRP13 Geninin Düzenlenmesi ve
Proptozda Rol Oynayan Proteinlerin Hastalıkla İlişkisinin Değerlendirilmesi

Hazırlayan

Feyzanur Yıldırımtepe ÇALDIRAN

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Tıbbi Biyokimya

Doktora Tezi

Danışman

Köksal DEVECİ

Ercan ÇAÇAN

TOKAT – 2021



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında; NLRP13 Geninin Düzenlenmesi ve
Proptozda Rol Oynayan Proteinlerin Hastalıkla İlişkisinin Değerlendirilmesi

Hazırlayan

Feyzanur Yıldırımtepe ÇALDIRAN

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Tıbbi Biyokimya

Doktora Tezi

Danışman

Köksal DEVECİ

Ercan ÇAÇAN

TOKAT – 2021



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurumu tarafından 2019-84 ve 2019-88 nolu projeler ile desteklenmiştir.

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../200...)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Feyzanur Yıldırımtepe ÇALDIRAN

İmzası

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca bilgi, öneri, deneyim ve görüşleriyle her zaman yanımda olan, en yoğun zamanlarında bile bana her zaman yardımcı olan, fikirlerimi önemseyen, destekleyen, hiçbir zaman geri çevirmeyen ve projelerimi gerçekleştirmemde elinden gelen yardımı esirgemeyen, anlayışı, sabrı ve akademik vizyonu ile örnek aldığım bilim adamlarımdan olan saygıdeğer danışman hocam, Doç. Dr. Köksal DEVECİ'ye,

Yoğun çalışma temposuna rağmen eş danışmanım olmayı kabul eden, her türlü problemimde mutlaka bir çözüm yolu üreterek çalışmamın daha güzel olması için elinden geleni yapan, öğrencilerine olan tutumu, bilime olan merakı ve çalışma disipliniyle örnek aldığım, saygıdeğer hocam, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a,

Doktora dönemim boyunca biyokimya derslerini bana sevdiren, öğrencilerine karşı her zaman nazik, güleryüzlü ve kibar tavırları olan derslerini dinlemekten büyük zevk duyduğum, tez sürecimdeki katkılarından dolayı, Dr. Öğretim Üyesi Zeliha Cansel ÖZMEN'e

Aynı ekipte yer almaktan mutluluk duyduğum, çalışmalarını her zaman takdir ettiğim ve laboratuvar ortamımızın daha güzel olmasına vesile olan sevgili meslektaşlarım Çağlar BERKEL, Burak KÜÇÜK'e ve Muhsine ÖZEN'e,

Çalışma grubunu oluşturmamda, yardımlardan dolayı Dr. Öğretim Üyesi Hülya DEVECİ ve Doç.Dr. Serhat KOYUNCU'ya

Doktora çalışmama katkılarından dolayı çok değerli tez jüri üyelerine,

Eğitimim için ellerinden gelen her türlü özveriye gösteren, bana destek olan, evlatları olmaktan gurur duyduğum anne ve babama, neşe kaynağım kardeşlerime, bu süreçteki yoğunluğumda bana elinden gelen her türlü desteği veren ve anlayış gösteren, yükümü hafifleten en iyi dostum sevgili eşime, şans meleşim biricik oğluma teşekkürü bir borç bilirim.

İTHAF

Evlatları olmaktan onur duyduğum annem ve babama ithafen...



ÖZET

İnflamazomlar, kaspaz-1'in aktivasyonunu düzenleyen ve enfeksiyöz mikroplara ve konakçı proteinlerden türetilen moleküllere yanıt olarak inflamasyonu indükleyen doğuştan gelen bağışıklık sistemi reseptörleri ve sensörleridir. Metabolik bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların başlaması veya ilerlemesinde rol oynarlar. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), inflamazomapati sınıfına giren otoinflamatuvar bir hastalık olup inflamazomların hastalık patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında, 30 atak, 30 remisyon dönemi AAA hastasının ve 30 sağlıklı bireyin, inflamazom ilişkili IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyelerinin, hastaların klinik parametreleri ve NLRP13 ile ilişkisi araştırıldı. Ayrıca, AAA'da potansiyel bir role sahip olabileceğini düşündüğümüz NLRP13 inflamazomunun, gen ifadesinin düzenlenmesi, gen spesifik ve global metilasyon durumu incelendi. Sonuç olarak, IL-1 β ile hastalık şiddeti arasındaki korelasyonun, IL-1 β 'nin inhibisyonu yoluyla AAA'lı hastalara terapötik bir fayda sağladığını desteklemektedir. Ayrıca, kaspaz-1'in sadece atak döneminde değil, ataklar arası dönemde de yararlı bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini gösterilmektedir. AAA hastalarında, NLRP13 geninin promotör hipermetilasyonu nedeniyle susturulmasıyla, promotör bölgedeki metilasyon seviyesindeki artışın NLRP13'ün inaktivasyonuna neden olduğu ortaya konuldu.

2021, 117 SAYFA

ANAHTAR KELİMELEER: Ailevi Akdeniz Ateşi, Proinflamatuvar Sitokinler, IL-1 β , IL-18, Kaspaz-1, İnflamazom, Epigenetik Regülasyon, NLRP13 Geni

ABSTRACT

Inflammasomes are innate immune system receptors and sensors that regulate the activation of caspase-1 and induce inflammation in response to infectious microbes and molecules derived from host proteins. They play a role in the initiation or progression of diseases such as metabolic disorders and neurodegenerative diseases. Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autoinflammatory disease called inflammasomeopathy and inflammasomes are known to play a role in disease pathogenesis. In this study, the clinical parameters of the patients and the relationship between NLRP13 and the inflammatory IL-1 β , IL-18 and caspase-1 levels of 30 attack, 30 remission FMF patients and 30 healthy individuals were investigated. In addition, the regulation of gene expression, gene-specific and global methylation status of NLRP13 inflammasome, which may have a potential role in FMF, were examined. As a result, it supports that the correlation between IL-1 β and disease severity provides a therapeutic benefit to patients with FMF through inhibition of IL-1 β . In addition, it has been shown that caspase-1 can serve as a useful biomarker not only during the attack period but also during the inter-attack period. In FMF patients, the increase in the level of methylation in the promoter region causes inactivation of NLRP13 by silencing the NLRP13 gene due to promoter hypermethylation.

2021, 117 PAGES

KEYWORDS: Familial Mediterranean Fever, Proinflammatory Cytokines, IL-1 β , IL-18, Caspase-1, Inflammasome, Epigenetic Regulation, NLRP13 Gene

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME...	iii
TEŞEKKÜR	v
İTHAF	vi
ÖZET	vii
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım ve Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetik Temelleri	4
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Patogenezi	6
2.5. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Klinik Bulgular	7
2.6. Atak	8
2.7. Amiloidoz	8
2.8. Tekrarlayan Ateş	9
2.9. Karın Ağrısı	9
2.10. Göğüs Ağrısı	9
2.11. Perikardit	9
2.12. Artrit	9
2.13. Erişipel Benzeri Cilt Lezyonu	10
2.14. Miyalji	10
2.15. AAA Hastalığını Tanı Kriterleri	10
2.16. AAA ile İlişkili Hastalıklar	12
2.17. AAA Hastalığında Tedavi Yöntemleri	12
2.18. Epigenetik	13
2.19. DNA metilasyonu	15
2.20. DNA Metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi)	17
2.21. Histon Modifikasyonları	19
2.22. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACi)	20
2.23. Kodlanmayan RNA	23
2.24. Housekeeping ncRNA'lar	24
2.25. Regülatör ncRNA'lar	24
2.26. Epigenetik ve AAA	26
2.27. İnflamazomlar	27
2.28. NLRP13	30
2.29. İnflamazomlar ve AAA	31

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	34
3.2. Araç ve Gereçler	35
3.3. Yöntem	38
3.3.1. IL-1 β ,IL-18 ve Kaspaz-1 seviyelerinin ELISA yöntemi ile ölçümü.....	38
3.3.2. NLRP13 geninin MEFV ile ilişkisinin biyoinformatik analizi	41
3.3.3. Hasta ve kontrol grubu kan örneklerinden RNA izolasyonu.....	41
3.3.4. Hasta ve kontrol grubu kan örneklerinden elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarının ölçümü ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu, $\Delta\Delta C_t$ Değerlerinin Hesaplanması.....	42
3.3.5. Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden DNA izolasyonu.....	43
3.3.6. AAA remisyon/atak hastaları ve kontrol grubu bireylere ait NLRP13 hipermetilasyon durumunun araştırılması	44
3.3.7. Bisülfid konversizasyonu uygulanan DNA örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonu	45
3.3.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	46
3.3.9. Global DNA metilasyonu.....	46
3.3.10. İstatiksel Analizler.....	49
4.BULGULAR VE YORUM	50
4.1. Atak ve Remisyon dönemi hastaların demografik verilerinin incelenmesi	50
4.2. Atak ve Remisyon dönemi hastaların klinik bulgularının incelenmesi	53
4.3. Serum Sitokin Düzeyleri ile Klinik Bulgular Arasındaki İlişki.....	54
4.4. NLRP13 ilişkili proteinlerin biyoinformatik analizi.....	58
4.5. Hasta ve kontrol grubu bireylerin hypometilasyon seviyeleri	58
4.6. AAA hasta ve kontrol grubunun NLRP13 ekspresyonunun, promoter hipermetilasyonu ile ilişkisi.....	59
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	63
6.KAYNAKLAR.....	72
7. EKLER	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
8. ÖZGEÇMİŞ	105

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 Tel-Hashomer Kriterleri	11
Tablo 2.2 Memeli DNA metilasyonunda rol oynayan enzimler (Jiang & Guo, 2020)	17
Tablo 2.3: Bazı HDACi'lerine genel bakış (José-Enériz vd., 2019)	22
Tablo 2.4: ncRNA'ların sınıflandırılması (Zhang vd., 2019).....	26
Tablo 3.1 Kullanılan Cihazlar	35
Tablo 3.2 Kullanılan Kimyasallar.....	36
Tablo 3.3 Kullanılan Primerler	37
Tablo 3.4: Standartların Hazırlanması.....	38
Tablo 3.5: Standartların Hazırlanması.....	39
Tablo 3.6: Standartların Hazırlanması.....	40
Tablo 3.7: Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli karışım içeriği ve miktarları.....	42
Tablo 3.8: Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri	43
Tablo 3.9: Reaksiyon Bileşenleri.....	45
Tablo 3.10: PCR döngüleri ve ısı değerleri	46
Tablo 3.11: Standartların Hazırlanması.....	47
Tablo 3.12: Antikor Eklenmesi	48
Tablo 4.1 Atak ve remisyon grubu olarak ayrılan hastalarının demografik özellikleri	51
Tablo 4.2 Atak ve Remisyon dönemi hasta gruplarına ait gen varyantları.....	52
Tablo 4.3 Atak ve remisyon dönemi hastalara ait klinik bulgular.....	54
Tablo 4.4 Atak ve remisyon dönemi sitokin seviyeleri	55
Tablo 4.5 Atak ve Remisyon dönemi hastalarda sitokinler ve klinik bulgular arasındaki ilişkisi	57
Tablo 4.6 Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon ve global metilasyon seviyeleri.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 MEFV geninin ve kodlanmış pirin proteininin şematik gösterimi.	5
Şekil 2.2 Epigenetik modifikasyonlar ile gen transkripsiyonunun düzenlenmesi	14
Şekil 2.3 Memelilerde DNA metilasyonunun modülasyonu	16
Şekil 2.4 DNA metiltransferazın nükleosit analogu inhibitörleri	19
Şekil 2.5: İnsan NLR alt ailelerinin alan yapısı	29
Şekil 2.6: İnflamazom Aktivasyonu	30
Şekil 2.7: NLRP13 geninin şematik gösterimi	31
Şekil 4.1 Hasta ve Kontrol grubu bireylerin cinsiyet dağılımları	50
Şekil 4.2 AAA hasta ve kontrol grubuna ait IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri	55
Şekil 4.3 NLRP13 ile karşılaştırmalı fonksiyonel olarak ilişkili proteinlerin STRING analizi.	58
Şekil 4.4 Hasta ve kontrol grubu bireylerin NLRP13 hypermetilasyonunun gen ekspresyon profili ile ilişkisi.....	60
Şekil 4.5 AAA remisyon dönemi hastalarına ait korelasyon analizi	61
Şekil 4.6 AAA atak dönemi hastalarına ait korelasyon analizi	62

KISALTMALAR LİSTESİ

AIM: ABSENT-İN-MELANOMA

AAA: AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ

MEFV: AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ'NDEN SORUMLU GENİN SEMBOLÜ

ASC: APOPTOSİS-ASSOCIATED SPECK-LIKE PROTEİN CONTAINING A CARD

BH: BEHÇET HASTALIĞI

CAPS: CRYOPYRİN-ASSOCIATED PERİODİC SYNDROMES

CARD: C-TERMİNAL CASPASE-RECRUITMENT DOMAIN

CASPASE: CYSTEİNE-ASPARTİC ACİD PROTEASE

DAMPS: DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS

DNA: DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT

DNMT1: DNA METİLTRANSFRAZ İNHİBİTÖR

DS: DOUBLE STRANDED

ELISA: ENZYME-LINKED İMMUNOSORBENT ASSAY

FACS: FAMILİAL COLD AUTOİNFLAMMATORY SYNDROME

F: FORWARD

RT-PCR: GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

HIDS: HİPERİMMÜNGLOBULİN D SENDROMU

HDAC1: HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖR

IL: İNTERLÖKİN

LRR: LÖSİNCE ZENGİN TEKRAR BÖLGELERİ

NOMID: NEONATAL ONSET MULTİSİSTEM İNFLAMATÖR HASTALIK

NAIP: NÖRONAL APOPTOZ İNHİBİTÖR PROTEİN

NF-KB: NÜKLEER FAKTÖR KB

NLR: NUKLEOTİD BAĞLAYICI OLİGOMERİZASYON DOMAINİ

PCR: POLİMERİZ ZİNCİR REAKSİYONU

R: REVERSE

SLE: SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS

SDBY: SON DÖNEM BÖBREK YETMEZLİĞİ

TMS1: TARGET OF METHYLATION-İNDUCED GENE SİLENCİNG

TAQ: THERMUS AQUATİCUS'DAN ELDE EDİLEN ENZİM POLİMERAZ

TLR: TOLL-LİKE RECEPTOR

TRAP: TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖRLE BİRLİKTE OLAN PERİYODİK SENDROM



1. GİRİŞ

Otoinflamatuvar hastalıklar, genellikle sistemik olan ve tekrarlayan ateş atakları ile karakterize hastalıklardır (Jéru, 2019). İnflamasyonun düzenlenmesinde görevleri olan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, bu hastalıkların ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır. Otoinflamatuvar hastalıklar, klinik olarak gösterdikleri farklılıklar ile öne çıkmaya birlikte, doğal bağışıklık hücrelerinin, bu hastalıkların patogenezeine büyük ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Álvarez-Errico vd., 2017). Otoinflamatuvar sendromların çoğu, tekrarlayan ve epizodik periyodik ateş, serozit, artrit ve / veya kutanöz inflamasyon, aşırı IL-1 β üretimi ve özellikle monositler olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu gibi sistemik ve / veya organa özgü inflamatuvar özellikler göstermektedir (Fiona Moghaddas & Masters, 2018). Başlangıçta otoinflamatuvar hastalıklar terimi yalnızca Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) veya kriyopirinle ilişkili periyodik sendromlar (CAPS) gibi prototipik kalıtsal monojenik periyodik ateş sendromları için kullanılmış olsa da, yeni nesil dizileme yöntemleri ile inflamasyon ile ilgili genlerdeki mutasyonlarının neden olduğu çok sayıda monojenik bozukluklar keşfedilmiştir (Jéru, 2019). Ayrıca, otoinflamatuvar hastalıklar, yalnızca çoklu allellerin katılımını değil bununla birlikte bir dizi çevresel faktörün katılımını da içeren Behçet hastalığı (BD) ve Crohn hastalığı (CD) gibi birkaç multifaktöriyel ve karmaşık hastalığı da içermektedir (Direskeneli vd., 2002; Fiona Moghaddas & Masters, 2018; Zhen & Zhang, 2019). İnflamatuvar spektrumda hem doğuştan gelen hem de adaptif immün düzensizliğin özelliklerini sergileyen sürekli bir bozukluk olduğu kabul edilmektedir. Bu duruma, işlev kazanımı mutasyonlarının yanı sıra ek ajanların klinik seyir üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Otoinflamatuvar bozukluklarda genetik kalıtım, spesifik hastalığa bağlı olarak değişmektedir (Jéru, 2019).

AAA, nötrofiller, eozinofiller ve sitokinle aktive olan monositlerde eksprese edilen sensör protein pirini kodlayan MEFV mutasyonları ile karakterizedir. AAA, çoğunlukla otozomal resesif bir kalıtım gösterir ve lokusun her iki allelinde de mutasyonlar olması gerekir. (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Fakat MEFV alleli için heterozigot olan, tek bir alelde mutasyon gösteren veya daha nadir durumlarda saptanabilir bir mutasyon göstermeyen ve yine de hastalığın gelişimi ile ilişkili olan AAA vakaları da bildirilmiştir (Ben-Chetrit & Touitou,

2009; Sari vd., 2014). MEFV mutasyonu negatif hastalarda, AAA fenotipini inceleyen birkaç grup, bu hastaların fenotipinde geç hastalık başlangıcını ve daha düşük AAA öyküsü oranıyla ilişkili olduğunu bulmuştur (Ben-Zvi vd., 2012). Aynı zamanda, bu tür mutasyonsuz hastaların varlığı, alternatif genlerde meydana gelen mutasyonlar veya epigenetiğin hastalık gelişimine katkı sağlamadığını düşündürmektedir (Sari vd., 2014). Bu değişikliklerin belirlenmesi, hastalığın tanı ve tedavisinde büyük önem arz etmektedir.

Ayrıca, MEFV, pro-inflamatuar sitokin olan IL-1 β üretimini düzenleyen inflamazom kompleksinin bir elemanını oluşturan pyrin kodladığı için, inflamazomapati sınıfına girmektedir (Tartey & Kanneganti, 2020). İnflamazomlar, bulaşıcı hastalıklara karşı doğuştan gelen bağışıklık yanıtı için çok önemli olan sinyal yollarıdır. Enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalara ve konak proteinlerinden oluşan moleküllere karşı inflamasyonun başlatılması sağlayan multiprotein platformlarıdır (Martinon vd., 2002). Bu büyük, multimerik kompleksler, patojenlere ve hücre hasara özgü moleküler modellere yanıt olarak oluşturur ve piroptotik hücre ölümünün uyarılması, proinflamatuar sitokinlerin salınması gibi hücresel yanıtları tetikler (Álvarez-Errico vd., 2017). İnflamazomların rol oynadığı otoinflamatuar hastalıklara, CAPS, Piyeoderma gangrenozum ve akne ile birlikte olan piyojenik artrit (PAPA), AAA ve TNF Reseptörü ile ilişkili Periyodik Sendrom (TRAPS) örnek olarak gösterilebilir (Tartey & Kanneganti, 2020).

Piroptotik hücre ölümüne neden olan inflamazom oluşumunda rol oynayan genlerden biri de NLRP13'tür. Bu gen literatürde NALP13, NOD14, PAN13, CLR19.7 olarak da bilinmektedir (Chu vd., 2016). Daha önce yapılan çalışmalar, NLRP13'in inflamasyon uyarılması veya baskılanması üzerinde etkili olduğu ve immün ayrıcalığın en önemli bölgeleri arasında plasenta ve testislerde ifade edildiğini göstermiştir (Chu vd., 2016; Grøndahl vd., 2013). Literatürde NLRP13 ile ilgili bilgi oldukça kısıtlıdır ve NLRP13 geninin inflamasyonda nasıl bir etkiye sahip olduğu hakkında ayrıntılı bilgiler bulunmamaktadır.

Bu proje kapsamında, atak/remisyon dönemindeki olan 60 hastanın klinik parametreleri, inflamazom ilişkili sitokinler olan IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri ile ilişkili olup olmadığı araştırıldı. Ek olarak, AAA hastalığında potansiyel bir role sahip olabileceğini düşündüğümüz NLRP13'ün gen ifadesinin düzenlenmesi ve hyper- ve hypometilasyon durumu

incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım ve Tarihçe

AAA, tekrarlayan akut inflamasyon ataklarına neden olan otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalıktır (Jamilloux vd., 2018). AAA, üç fenotip ile karşımıza çıkmaktadır. Tekrarlayan ateş ve seroz zarların inflamasyonu (peritonitis, sinovitis veya plöritis) ve daha az sıklıkla perikardit ve menenjit atakları ile karakterize bulgular hastalığın ilk fenotipi oluşturmaktadır (Alghamdi, 2017). Yinelenen inflamasyon ve ateş şikayeti olmayan bir hastada amiloidoz ortaya çıkması ise ikinci fenotip olarak tanımlanmaktadır (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Klinik olarak hasta olmayan ancak MEFV mutasyonu taşıyan kişiler ise üçüncü gruba dâhil olmaktadır (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Hastalık fenotipi ile ilgili ilk vaka sunumu T.C. Janeway ve H.O. Mosenthal tarafından 1908 yılında bildirilmiştir (Sari vd., 2014). 1945 yılında Siegal, Benign Paroksizmal Peritonitis adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları ile seyreden bir olgu tanımlamıştır (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Periyodik hastalık tanımlaması ise Reiman tarafından 1948 yılında kullanmıştır (Reimann, 1947). Hastalığın aileden kalıtıldığına dair hipotez ise 1951 yılında Catton ve Mamou tarafından ortaya konmuştur. Ayrıca bu hastalarda amiloid gelişebileceği yine bu ekip tarafından 1956 yılında bildirilmiştir. İlk kez AAA tanımı ise Heller ve Sohar tarafından 1958 yılında kullanmıştır ve hastalığın otozomal resesif bir kalıtım gösterdiği 1961 yılında kanıtlanmıştır (Sohar vd., 1967a). Türkiye’de ise ilk AAA olgusu, 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından “Garip Bir Karın Ağrısı Sendromu” adı ile bildirilmiştir (Sari ve ark., 2014). 1992 yılında AAA hastalığına neden olan genin, pirin proteinini kodlayan MEFV genini kodlayan 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) oluşan mutasyonların rolünün olduğu gösterilmiştir (Hortu vd., 2019).

2.2. Epidemiyoloji

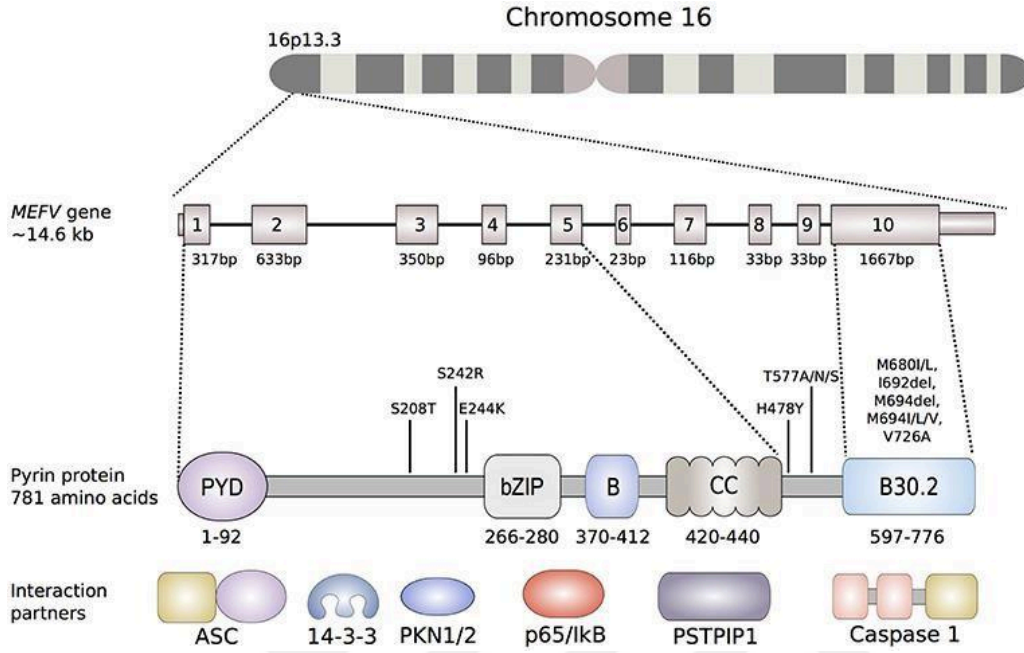
AAA, Yahudiler, Türkler, Araplar ve Ermeniler olmak üzere belirli etnik grupları etkilemektedir. Olgu bakımından en yüksek sayıya sahip olan ülkemizde hastalık prevalansı, 1/400-1/1000 arasında değişmektedir (Tunca vd., 2005). Hastalığın bölgesel dağılımının ise, aile kökenleri Batı-Orta Karadeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde olan bireylerde, Akdeniz kıyılarında yaşayan bireylere kıyasla daha yüksek

olduğu bulunmuştur. Akraba evliliğinin fazla olduğu bölgelerde de hastalığın ortaya çıkma oranı yine diğer bölgelere nazaran daha yüksektir. Türk toplumunda AAA vakalarının görülme oranı 1/1000, taşıyıcılık oranı ise 1/5'dir. Ayrıca Türkiye'de en sık görülen MEFV gen mutasyonları; M694V (%51,4), M680I (%14,4), V726A (%8,6), E148Q (%3,5) ve M694I (%1,7) olarak belirlenmiş ve AAA hastalığının %80'ninden sorumlu oldukları bildirilmiş (Akkaya-Ulum vd., 2017; Jamilloux vd., 2018; Mansfield vd., 2001).

2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetik Temelleri

MEFV geni, 16. kromozomun (16p13.3) kısa kolunda bulunmakta ve 10 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 1). MEFV geni, Fransız AAA konsorsiyumu tarafından marenostirin, Uluslararası AAA konsorsiyumu tarafından pirin, olarak isimlendirilen, 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (French FMF Consortium, 1997; Touitou, 2001). Otoinflamatuvar hastalıklar için çevrimiçi bir kayıt olan INFEVERS veri tabanına göre, yaklaşık 340 MEFV gen varyasyonu tanımlanmış ve varyasyonlardan 205 tanesinin AAA hastalığının klinik bulguları ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. AAA ile ilişkili yanlış anlam mutasyonlarının çoğunluğu 2. 3. 5. ve 10. ekzonda bulunmaktadır. Ekzon 10'da sık görülenleri mutasyonlar M694 V, M680I, V726A, M694I iken, ekzon 2'de E148Q'dur (Touitou, 2001). M694V, tüm Akdeniz mutasyonlarının en yaygın ve patojenik varyantıdır. homozigot M694V varyantı taşıyan hastaların daha erken hastalık başlangıcına sahip olduğu ayrıca, artrit ve amiloidoz geliştirmeye daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Hastalık şiddetini kontrol edebilmek için daha yüksek dozlarda kolşisin ihtiyacı duymaktadırlar. M680I; Türk ve Ermeni hastalar arasında, V726A; Aşkenaz Yahudilerinde ve M694I; Araplarda arasında daha yaygındır. Öte yandan E148Q, genel popülasyonda ve AAA'nın Japonya gibi nadir olduğu yerlerde en yaygın varyanttır (Giancane vd., 2015; Touitou, 2001). E148Q'nun patojenik etkisi kesin olmamakla birlikte yapılan çalışmalar, bu varyantın hastalık şiddetini etkilemeyen bir polimorfizme sahip olduğunu (Ben-Chetrit & Touitou, 2009) ayrıca E148Q için homozigot olan hastalarda daha hafif bir AAA fenotipi sergilediği bildirilmiştir (Ozdogan & Ugurlu, 2019). Elde edilen veriler doğrultusunda kalıtsal tekrarlayan ateş, gen varyantlarının klinik yorumu ile ilişkili bir kılavuz geliştirilmiştir. Bu kılavuz neticesinde gen varyantlarını, a: açıkça patojenik varyantlar (ör. M694 V), b: belirsiz öneme sahip varyantlar (ör. E148Q ve ör. L384P), c:

genetik nedeni olmayan varyantlar (ör. R202Q) olmak üzere 3 grup ayrılmıştır (Shinar vd., 2012).



Şekil 2.1 MEFV geninin ve kodlanmış pirin proteininin şematik gösterimi (Schnappauf vd., 2019).

Klasik olarak AAA, fenotipi ifade etmek için bir hastalık allelinin iki kopyasının gerekli olduğu otozomal resesif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. MEFV geni haritalanmadan önce 1992'de yayınlanan bir çalışmada, 1943 AAA hastası arasında tanımlanan 21 di- ve monozygotik ikiz set bildirilmiştir. 10 monozygotik ikiz setinin tümünde tam uyum gözlenirken, 11 dizigotik ikizin sadece 3'ünde tam uyum gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, bu bulguların tek gen otozomal resesif modelini desteklediği ve AAA'da bulunan beklenenden düşük insidansın genetik olarak etkilenebilir ancak klinik olarak tanı konmamış hastalardan kaynaklandığı iddiasını desteklediği sonucuna varmışlardır (Shohat vd., 1992). Bir başka çalışmada da MEFV mutasyonlarının, düzenleyici genlerden ve çevresel faktörlerden etkilendiği sonucuna varmıştır (Ben-Zvi vd., 2012). Bunun nedeni, MEFV mutasyonu olan bir bireyde AAA fenotipinin ekspresyonu, diğer genlerde ve / veya çevresel faktörlerde bir veya daha fazla modifiye edici allelin katkısına ihtiyaç duymasından kaynaklanmaktadır. Diğer genlerin, AAA fenotipi üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere yapılan bir çalışmada da, SAA (serum amiloid A) geni ve MICA (MHC sınıf I polipeptörle ilgili dizi A) geninin, AAA hastalık şiddetini tetikleyici modifiye

edici genler olarak rapor edilmiştir. SAA1a alleli, belirli popülasyonlarda amiloidoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunda gösterilmiştir (Brik vd., 1999; Cazeneuve vd., 2000; Touitou, 2001). Ayrıca, çevresel faktörlerin, AAA fenotipinin ekspresyonu üzerindeki etkisi belirlenmek istenmiş ve farklı ülkelerde yaşayan aynı ırktan bireyler üzerinde araştırma yapılmıştır. Ermenistan'da yaşayanlara Ermeni hastaların, ABD'de yaşayan Ermeni hastalara nazaran hastalık şiddetinin daha fazla olduğu ve amiloidoz riskinin arttığı rapor edilmiştir (Schwabe ve ark., 1974). Benzer bir gözlem, Almanya'da yaşayan AAA hastalığına sahip Türk çocuklarının, Türkiye'de yaşayan akranlarına göre daha az hastalık şiddeti sergilediği gösterilmiştir (S Ozen vd., 2014). Eldeki veriler göz önüne alındığında, AAA'nın, çok faktörlü ve poligenik bir hastalık olduğu ve birden fazla genin hastalık fenotipini etkilediği ayrıca çevresel faktörlerin fenotipik heterojenliğinden sorumlu olduğu söylenebilir.

2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Patogenezi

AAA, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir hastalığıdır. *MEFV* geni, ağırlıklı olarak nötrofiller, monositler, dendritik hücreler, fibroblastlarda eksprese edilen pirini kodlamaktadır (Schnappauf vd., 2019). Pirinin, AAA hastalığındaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte pirinin, doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde etkin bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Alghamdi, 2017; Migita vd., 2018). AAA hastalarında, pirin kodlayan *MEFV* geninde mutasyon mevcuttur ve pirin proteini fonksiyonel olarak pasif durumdadır (Schnappauf vd., 2019). Mutant pirinin neden olduğu kaspaz-1'in devamlı sinyalizasyonu, pro-IL-1 β 'nin işlenmesine ve ardından AAA patogenezinde önemli bir rol oynayan IL-1 β 'nin aktivasyonuna ve gerektiğinden fazla salınmasına yol açmaktadır. Bu durum, aşırı inflamatuvar cevap oluşmasına ve piroptoz olarak adlandırılan bir inflamatuvar hücre ölümüne yol açmaktadır (Chae vd., 2003; Kerr vd., 2018).

Yapılan çalışmalarda, AAA atak dönemi hastalarında IL-2, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi sitokin seviyelerinin ve C-reaktif protein (CRP) ve SAA gibi akut faz reaktanlarının arttığı gösterilmiştir (Abuhandan vd., 2015; Baykal vd., 2003). Ayrıca, remisyon döneminde de bazı inflamatuvar markırların yüksek olması, sublinik inflamasyonun ataklar arası dönemde de rol aldığını düşündürmektedir (Lachmann vd., 2006; Özçakar vd., 2006). İnflamasyonun bulunduğu bölgelerde nötrofillerin artışının gözlenmesi üzerine nötrofil fonksiyonlarının, AAA ile ilişkisi dair çalışmalar yapılmış ve AAA ataklarının, nötrofilden

zengin serozal inflamasyonla birlikte devam ettiği gözlemlenmiştir (Migita vd., 2018;Gohar vd., 2016). AAA hastalarında, artan IL-1 β seviyesi aynı zamanda endotel hücrelerine lökosit adezyonunu artırması ve endotel hücrelerinde, adezyon molekül ekspresyonun indüklenmesine neden olmaktadır (Alghamdi, 2017). Artan TNF- α , IL-6 salınımını da, akut faz yanıtını ve lökotrien oluşumunu indüklemektedir. Yapılan çalışmalarda, IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktör-88 alfa'nın (TNF-88 α), atak ve atak olmayan dönemde kontrole göre daha yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Direskeneli vd., 1999).

Pirin, aynı zamanda kaspaz-1 aktivasyonu için inflamazomların birleşmesi için önemli bir adaptör protein olan ASC ile etkileşime girmektedir. Pirin, hücre içi bir model tanıma reseptörüdür (PRR), ancak PAMP'ler / DAMP'ler gibi moleküler modelleri doğrudan tanımaz, bunun yerine enfeksiyonun neden olduğu sitoplazmik homeostaz'daki bozukluklara yanıt verir. Bu süreç "homeostazı değiştiren moleküler süreçler (HAMP'ler) olarak tanımlanmıştır (Chae vd., 2003). Başlangıçta pirin mutasyonlarının, otozomal resesif kalıtım nedeniyle işlev kaybına neden olduğu varsayılmaktaydı (Grandemange vd., 2011) fakat hastaların üçte biri tek bir mutasyona sahip olması ve bazı vakalarda baskın olarak kalıtsal olması, AAA'nın sadece resesif fonksiyon kaybı mutasyonları ile açıklanamayacağını göstermektedir (Chae ve Kastner, 2015). Knock-in fareler ile yapılan deneyler, MEFV mutasyonlarının aslında bir gen dozaj etkisi ile işlev kazancı sağladığını da göstermektedir (Chae vd., 2011).

2.5. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Klinik Bulgular

AAA hastalarının % 90'ında, ataklar 20 yaşından önce başlamaktadır (Sohar vd., 1967a). Ortalama başlangıç yaşı, 3-9 yaş arasında değişmektedir. Nadir de olsa hastalığın, 40 yaşından sonra ortaya çıktığı bazı vakalar tespit edilmiştir (Sari vd., 2014). Hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıkması daha çok erkeklerde görülmektedir. Hastalık, bu grupta hafif seyir ve düşük doz kolşisine yanıt ile karakterizedir (Tunca vd., 2005) . Hastalar ateş, serosit, artrit ve yüksek seviyelerde inflamatuvar reaktanlardan oluşan tekrarlayan klinik ataklar gösterir: eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), CRP, nötrofili ile ilişkili SAA ve lökositoz bunlardan bazılarıdır. AAA ataklarını enfeksiyon, stres, regl dönemi, soğuk, yağ açısından zengin diyet ve kullanılan bazı ilaçlar tetikleyebilir (Alghamdi, 2017).

2.6. Atak

AAA hastalığında, en yaygın belirti olarak ataklar gösterilmektedir. Ataklar periyodik olmaktan ziyade daha çok tekrarlayıcıdır. Tedavi edilmeyen hastalarda atakların sıklığı, ayda bir ya da birden fazla görülmektedir. Atakların şiddeti değişkenlik göstermektedir. Bazı ataklar, yatan hasta tedavisi gerektirecek kadar şiddetli olabilirken bazıları daha hafif seyretilmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). Klasik bir atak, ateş ve serozit ile birlikte karın ağrısı ve/veya göğüs ağrısı ve/veya eklem ağrısı şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ataklar arasında hastalar asemptomatiktir (Ozdogan & Ugurlu, 2019). Atakların sıklığı, şiddeti ve ortaya çıkışıyla ilgili bu klinik çeşitlilik, tanısız gecikmenin ana nedenlerinden biridir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009).

2.7. Amiloidoz

AAA hastalığının en sık görülen uzun dönem komplikasyonu amiloidozdur. AAA hastalarında reaktif/sekonder amiloidoz olarak adlandırılan AA amiloidoz görülmektedir. AA tipi amiloidozun, en sık sebebi AAA iken, hastalığın daha seyrek görüldüğü batı ülkelerinde ise kronik infeksiyonlar ve romatoid artrit (Sari vd., 2014). Sekonder amiloidozda en sık tutulum böbreklerde görülmesine rağmen dalak, kalp, böbrek üstü bezi, testis, karaciğer, gastrointestinal ve sinir sistemde bu durumdan etkilenebilmektedir (Migita vd., 2018). Böbrek tutulumunun derecesine göre hematüri, nefrotik sendrom, proteinüri, ve son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) görülebilir (Obici & Merlini, 2012). Testis tutulumuna bağlı infertilite ve kardiyak tutulumla bağlı ölümcül aritmi, kardiyomyopati görülebilir. Karaciğer ve dalak tutulumuna bağlı olarak hepatosplenomegali izlenebilir. Gastrointestinal sistem tutulumuna bağlı olarak enteropati veya ishal görülebilir. (Seza Ozen, 2004). AAA hastalığında amiloidozun gelişimi, 1972'den sonra kolşisin tedavisinin kullanılmasıyla birlikte gerilemeye başlamıştır (Mor vd., 2005).

Ayrıca, atakların sıklığı, şiddeti ve amiloidoz arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Fakat etnik gruplara göre amiloidoz gelişme sıklığını değişiklik göstermektedir. Ermeniler ve Askenazi Yahudilere göre Sefardik Yahudileri ve Türklerin amiloidoz gelişimine yatkınlığının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009; Çobankara vd., 2011).

2.8. Tekrarlayan Ateş

İnflamatuvar atakların % 96'sından fazlasında 12 saat ile 72 saat boyunca devam etmekte olan, 38 °C - 40 °C arasında vücut ısısının görülmesi tipik bir semptomdur. Ancak hafif seyreden ataklarda 37,5°C ila 38°C arasında değişen subfebril ateş eşlik etmektedir. Hastaların % 25'i ateşten önce titreme gösterir. Prodromal dönem 1-4 gün sürebilir. Miyalji, artralji, baş ağrısı, lomber omurga ağrısı, artralji, dispnoea, asteni, bulantı gibi spesifik olmayan bulgular sıklıkla yüksek ateşe eşlik etmektedir (Sari vd., 2014).

2.9. Karın Ağrısı

Karın ağrısı hastaların neredeyse % 90'ında sık görülen bir semptomdur ve yaygın veya lokalize olarak kendini gösterir. Bazı durumlarda, tipik olarak akut karın veya apandisit taklit eder. AAA'de karın ağrısı klinik bulguları akut batına benzemesinden dolayı, apandektomi ve laparotomi yapılmasına yol açabilir. Hastaların % 30-40'ı gereksiz apandisit ameliyatı olmaktadır (Livneh vd., 1997). Akut peritonit veya bağırsak tıkanıklığı, bu hastalarda, ateş ve/veya AAA'nin diğer tipik semptomları ile ilişkili olarak ortaya çıkabilir (Kışla İkinci vd., 2019).

2.10. Göğüs Ağrısı

Hastaların % 25-50'sinde görülen bu semptom 24-72 saate kadar sürer. Sıklıkla tek taraflıdır (Livneh vd., 1997) Ağrının meydana geldiği tarafta solunum sesleri azalırken, nefes alıp verirken ağrı olur (Sari vd., 2014).

2.11. Perikardit

AAA hastalarında, perikart tutulumu da tanımlanmıştır. Birçok olguda, tekrarlayan ve akut perikardit, tamponad, perikardiyal efüzyon ve konstriktif perikardit gibi şikâyetler bildirilmiştir. AAA hastalarında perikardit yaklaşık 4 gün boyunca devam eden göğüs ağrısı olarak görülmekte ve herhangi bir tedavi uygulanmadan şikâyetler kendiliğinden düzelmektedir (Örün & Yalçınkaya, 2003).

2.12. Artrit

Olguların % 45'inde görülen klinik semptomlarından biridir. Genellikle monoartikülerdir, esas olarak alt ekstremitelerin ana eklem bölgelerini (kalça, diz, ayak bileği) içerir (Sari

vd., 2014). Artrit genellikle çocukluk döneminde gelişir. Hastalıkta, artrit atakları genellikle ateş ile birlikte görülmektedir. Ayrıca, artrit olgularında, çoğunlukla kızarıklık görülür. Bazı araştırmalar, olguların yaklaşık % 40'ında erizipel benzeri eritemin de eşlik edebileceği gösterilmiştir (Livneh vd., 1997; Migita vd., 2018).

2.13. Erizipel Benzeri Cilt Lezyonu

AAA'nin en tipik deri bulgusudur. Olguların %12-40'ında bildirilmiştir. Lezyon 10-35 cm²'lik alanda, kabarık, hassas ve eritematöz şeklindedir. Bazen ateşle ilişkilendirilen, genellikle alt ekstremitelerin ana eklem bölgelerinde oluşan hassas, kırmızı, sıcak, sertleşmiş lezyonlardır (Livneh vd., 1997). Çocuklarda bu semptomun görülmesi, AAA'nin ortaya çıkış bulgusu olabilir ancak enfeksiyöz erizipel veya selülit gibi doğru olmayan tanıları konabilir. Lezyonların iyileşmesi spontan olarak seyreder ve antibiyotik kullanımına gerek duyulmaz (Brik vd., 1999).

2.14. Miyalji

AAA hastalarında miyalji, çoğunlukla bacaklarda lokalize olurken, bazı hastalar da uzamış ateşli miyalji görülmektedir (Ben-Chetrit & Touitou, 2009).

2.15. AAA Hastalığını Tanı Kriterleri

AAA teşhisi, klinik belirtilerin tanınmasına, ataklar ve ataklar arasında inflamatuvar indekslerin değerlendirilmesine, kolşisine yanıt ve genetik analize dayanmaktadır. Enfektif ajanlar, otoimmün hastalıklar, sistemik Juvenil İdiyopatik Artrit (JİA), atakların başlangıcını uyarabilen inflamatuvar bağırsak hastalıklarını, AAA'dan ayırabilmek için doğru bir ayırıcı tanı zorunludur. Bu ayrımı yapmada tipik tekrarlayan ataklar, tanı koymada yardımcı olmaktadır (Livneh vd., 1997). Atak ve ataksız dönem arasındaki, ESR, CRP ve SAA gibi artmış seviyelerde inflamatuvar mediyatörler tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Erer vd., 2016; Sohar vd., 1967b). Tunca ve arkadaşları, ataksız aralıkların % 34'ünde yüksek APR bildirmişlerdir (Tunca vd., 2005). Ataklar arasında APR varlığı, devam eden amiloidoz riskinin ve subklinik inflamasyonun işaretidir.

AAA tanısında en önemli kriterlerden biri de kolşisine cevaptır. Bu ölçek, Tel-Hashomer kriterlerinden biri tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Sohar vd., 1967a, 1967b). Aynı zamanda AAA'da en sık görülen mutasyonların taranması (M694V, M680I, V726A,

M694A, E148Q), klinik belirtilerin varlığında, hastalığı teşhis etmek için yeterli olmaktadır (Ben-Zvi & Livneh, 2011). Günümüzde AAA'nin teşhisinde Tel-Hashomer kriterlerine dayalı tanı yöntemi kullanılmaktadır (Sohar vd., 1967b) (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1 Tel-Hashomer Kriterleri

A. Majör Kriterler
Tipik atak
1. Ateş
2. Monoartrit (Kalça, diz)
3. Plevrit (unilateral ve perikardit)
4. Peritonit
B. Minör Kriterler
Aşağıdaki 1-3'üncü kriterlerden bir veya fazlasının atipik atağı
1. Eklem tutulumu
2. Göğüs ağrısı
3. Karın ağrısı
4. Kolşisine yanıt
5. Egzersiz sonrası bacak ağrısı
C. Destek Kriterleri
1. Ailede AAA tanısı
2. Uygun etnik gruba dahil olmak
3. Şikâyetlerin başladığında 20 yaşında küçük olmak
4. Atakların şiddetli seyretmesi
5. Atakların tedaviye gerek duyulmadan geçmesi
6. Ataklar arasının semptomsuz olması
7. Geçici inflamatuvar yanıtın, lökositoz, ESR, SAA ve/veya fibrinojenden bir veya birkaçı ile gösterilmesi.
8. Hematüri, proteinüri veya epizodik varlığı
9. Beyaz apandisin alınması veya sonuçsuz laparotomi girişimi
10. Akraba evliliği
Tanı koyulması için: 1'den fazla majör kriter / 2'den fazla minör kriter/ 1 minör ve 5 destekleyici kriter / 1 minör ve ilk 5 destekleyici kriterden 4 veya fazlasının olması gerekmektedir (Sohar vd., 1967b).

2.16. AAA ile İlişkili Hastalıklar

AAA hastalığı klinik belirtiler ve/veya gen mutasyonları bakımından bir takım hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıkların çoğunda MEFV mutasyonlarının, özellikle de M694V'nin artmış ekspresyon seviyesi tanımlanmış olup, bu durumun modifiye edici gen aktivitesi olduğunu düşündürmektedir (Jéru vd., 2013). AAA ilişkili hastalıklar arasında Henoch-Schönlein purpura ve polyarteritis nodosa en yaygın olanlarıdır (Hatemi vd., 2004; Ozdogan & Ugurlu, 2019; Tunca vd., 2005). Behçet Hastalığı (BH) ile ilgili ise bazı görüş ayrılıkları vardır. Kimi araştırmacılar, özellikle vasküler AAA ve BH arasında bir ilişki olduğunu savunurken, kimileri ise bu ilişkiyi reddetmekte ve bu ilişkinin şans eseri olduğunu öne sürmektedir (Direskeneli vd., 2002). AAA'nin, JİA ile birlikte varlığı da gözlenmiştir (Federici vd., 2015; Rozenbaum vd., 2004). 2716 AAA hastası olan büyük bir Türk kohortunda, 4 sistemik lupus eritematosus (SLE) vakası tanımlanmıştır (Tunca vd., 2005). Perikardiyal / plevral efüzyonlu SLE hastalarında MEFV gen varyantları daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Erer vd., 2014). AAA ile multipl skleroz (MS) arasında olası bir ilişki olduğu yine çalışmalarda gösterilmiştir (Ozdogan & Ugurlu, 2019). İsrail'den bir vaka serisine dayanarak, AAA popülasyonlarında, MS sıklığının beklenen orandan iki kat fazla olduğu rapor edilmiştir (Blaschek vd., 2018). Ayrıca aynı çalışma, 29 çocuk MS hastasının üçte birinde TNFRSF1A ve / veya MEFV geninde heterozigot bir mutasyon olduğunu bildirmiştir (Blaschek vd., 2018). Son zamanlarda Hodak ve arkadaşları, popülasyona dayalı bir çalışmada, hidrosadenit ve AAA arasında çok güçlü bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (Hodak vd., 2017). Ayrıca AAA'lı hastalarda ve akrabalarında artmış bir psoriasis sıklığı bildirilmiştir (Sönmez vd., 2018). Nötrofilik dermatozlu pirine bağlı otoinflamasyon (PAAND), pirindeki mutasyonların da yol açtığı yeni tanımlanan bir hastalıktır; bununla birlikte PAAND, AAA'ya göre belirgin bir klinik fenotip sergilemektedir (Moghaddas vd., 2017).

2.17. AAA Hastalığında Tedavi Yöntemleri

Kolşisin, AAA hastalığında, 1972 yılından beri güvenli bir ilaç tedavisi olarak kullanılmaktadır (El Hasbani vd., 2019; Goldfinger, 1972). Bir alkaloid olan ve *Colchicum autumnale* bitkisinden sentezlenen bu ilacın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Kolşisin, öncelikle mikrotübülleri hedeflemekte ve tübülün monomerlerine bağlanarak mikrotübül uzamasını önlemekte ve polimer oluşumunu inhibe etmektedir (Ben-Chetrit,

2019; Ravelli vd., 2004). Kolşisinin, ayrıca RhoA'nın bir aktivatörü olduğu dolayısıyla, AAA hastalarında kaspaz-1 ve IL-1 β 'nin indüksiyonunu inhibe ederek pirin inflamazom aktivasyonunu baskıladığı da bilinmektedir (Goldfinger, 1972). Kolşisin, enflamatuvar tekrarlayan atakların kontrol ederek ve amiloidoz gelişimini önlemektedir (Mor vd., 2005).

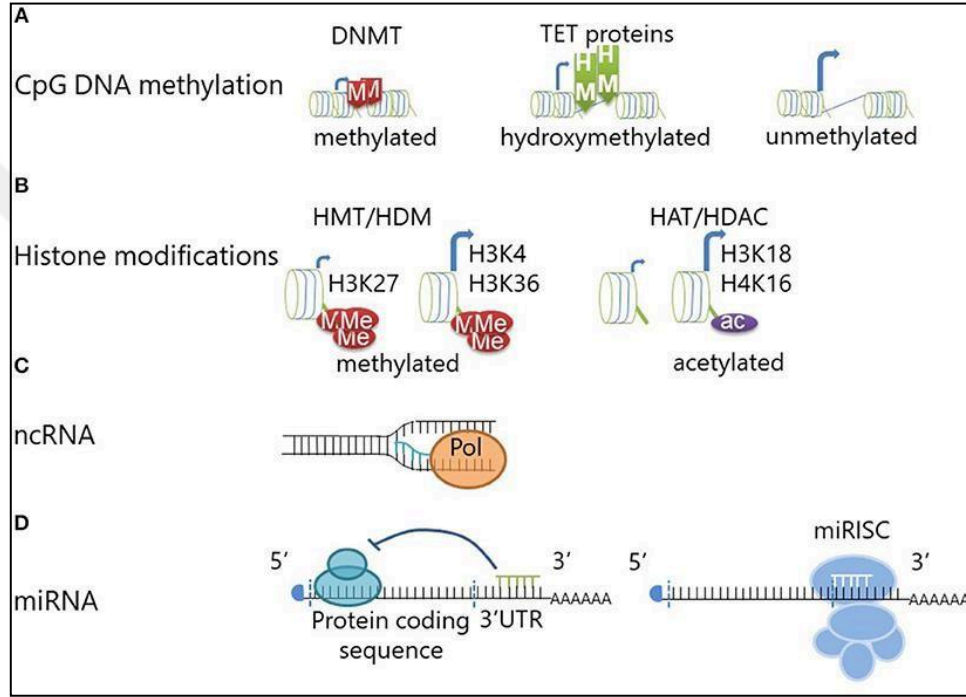
Önerilen kolşisin dozu, yaş aralığı 5'ten küçük olanlar için 0,5 mg/gün'den az, 5-10 olanlar için 0,5-1 mg/gün, 10 yaşından büyük çocuklar ve yetişkinler için 1-1,5 mg/gün'dür. Ataklar arasında, atak sıklığında ve/veya akut faz yanıtında bir artış varsa, günlük doz yetişkinlerde 3 mg/gün'e ve çocuklarda 2 mg/gün'e kadar artırılabilir (Ozdogan & Ugurlu, 2019). Kolşisinin en sık görülen yan etkileri; abdominal rahatsızlık, ishal ve bulantıdır. Bir diğer önemli yan etki ise ilerleyici kas güçsüzlüğü, yaygın miyalji ve kas enzimlerinde artışla kendini gösteren miyopatidir. Terapötik aralıktaki kolşisin nadiren lökopeni, trombositopeni ve daha az sıklıkla da aplastik anemiye neden olur (Goldfinger, 1972; Mor vd., 2005).

Ek olarak kolşisin, egzersizle ilgili bacak ağrısı, uzamış miyozit veya artrit, vaskülit gibi AAA'nin bazı belirtilerini kontrol etmede yeterli değildir. Bu nedenle, alternatif bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır. Önerilen birkaç seçenek arasında interferon alfa (Tunca vd., 2004), azatioprin (Sayarlioglu vd., 2006), metotreksat (Nakamura vd., 2007), talidomid (Seyahi vd., 2006), anti TNF ajanları (Seyahi vd., 2006) ve IL-1 β antagonistleri (Hashkes vd., 2012; van der Hilst vd., 2016) bulunmaktadır.

2.18. Epigenetik

Epigenetik terimi ilk olarak DNA metilasyonu çalışmaları ile Conrad Waddington tarafından 1940 yılında tanımlanmıştır. Daha sonra, Wolffe ve Matzkeset "DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkan gen ifadesinde kalıtsal değişimlerin incelenmesi" olarak bu terimi tam anlamıyla ifade etmişlerdir (Allis & Jenuwein, 2016). Epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, anormal kodlanmayan RNA, posttranslasyonel histon modifikasyonları, kromatin yeniden modellenmesini gibi transkripsiyonel düzenlemeleri kapsamaktadır (Allis CD. ve ark., 2015) (Şekil 2). Epigenetik çalışmalar, toksinler, ilaçlar, beslenme, stres ve hücrel fizyoloji arasında ilişki kurarak genler ve çevre arasındaki etkileşimleri incelemektedir (Álvarez-Errico vd., 2017). Epigenetik mekanizmaları daha iyi anlamak için, DNA'nın nasıl paketlenildiğini anlamak gerekmektedir. Ökaryotik bir

organizmanın genomu, her hücrenin çekirdeğinde saklanması gerektiğinden daha fazla genetik bilgi içerir (McVicker vd., 2013) ve bu bilgiyi taşıyan DNA molekülleri düzenli bir şekilde paketlenerek çekirdek içersine sığabilecek hale getirilir. DNA, nükleozom olarak adlandırılan yapısal birimi oluşturan histon proteinlerinin etrafına sarılmaktadır (Allis & Jenuwein, 2016). Nükleozomlar, dört çift çekirdek histon proteininden (H2A, H2B, H3 ve H4) oluşur ve DNA, bu proteinlerin etrafında sarılmış şekilde bulunur (Surace & Hedrich, 2019).



Şekil 2.2 Epigenetik modifikasyonlar ile gen transkripsiyonunun düzenlenmesi
(Surace & Hedrich, 2019).

(A) DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri, CpG dinükleotidlerinde (de novo) DNA metilasyonunu sürdürür veya oluşturur. DNA metilasyonundaki artış genellikle, gen ekspresyonunun baskılanmasını sağlar. DNA Hidroksimetilasyonu, TET proteinleri aracılığıyla sağlanır ve metillenmiş CpG, DNA'nın oksidasyonu yoluyla elde edilir. DNA hidroksimetilasyonu, gen transkripsiyonuna izin veren (metillenmemiş CpG DNA'ya benzer) bir "açık" kromatin yapısını tanımlar. (B) Histon metiltransferazlar (HMT), histon amino uçlarına (bir ila üç) metil grubu ekleyebilir. Moleküler konuma ve histon metilasyonunun derecesine bağlı olarak, kromatininin sıkışmasına veya ayrışmasına neden olabilir. Histon H3'ün lizin 27'de (H3K27) metilasyonu, kromatin sıkışmasına ve

transkripsiyonel baskılamaya yol açarken, H3 lizin 4 (H3K4) ve H3K36'daki metilasyon "açmaya" aracılık eder ve transkripsiyonu artırır. Histon demetilazlar (HDM), metil gruplarını çıkararak bu sürece karşı koyabilir. Histon asetilasyonuna histon asetiltransferazlar (HAT) aracılık eder ve histon deasetilazlar (HDAC) tarafından tersine çevrilebilir. Histon asetilasyonu, kromatin dekompaksiyonu ve genlerin transkripsiyonu ile ilişkilidir. (C) Kodlamayan RNA'nın intergenik veya intronik bölgelerden transkripsiyonu, açık bir kromatin oluşumu sağlayarak mRNA transkripsiyonunu ve kodlamayı destekleyebilir. (D) Kısa mikro-RNA'lar (snmiRNA), mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanırken ribozomun inhibisyonu yoluyla transkripsiyonel baskılamaya aracılık edebilir. Ayrıca miRNA'lar, miRISC kompleksinin başlamasıyla mRNA'nın degradasyonunu indükleyebilir.

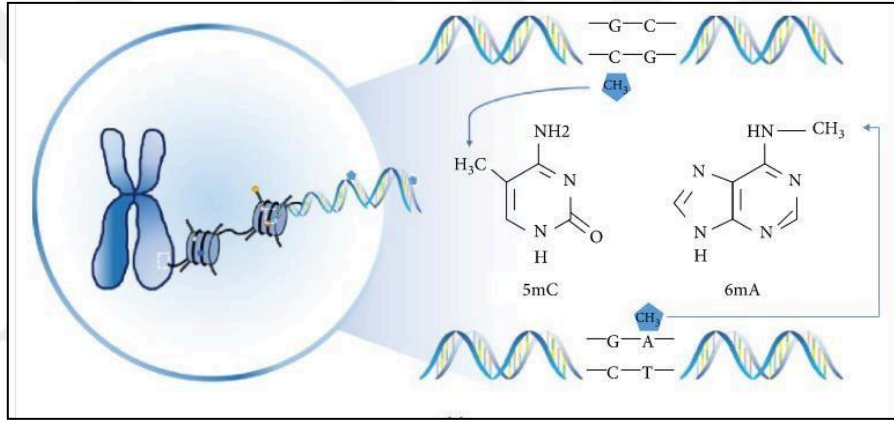
2.19. DNA metilasyonu

DNA düzeyindeki modifikasyonların en bilineni DNA metilasyonudur (Allis & Jenuwein, 2016). 1948 yılında, DNA bazlarının kimyasal modifikasyonları olarak tanımlanmıştır. DNA metilasyonunun özellikle 5-metilsitozin (5mC) üzerindeki etkisi, 1970'lerin ortalarında Holliday ve Pugh tarafından ortaya konmuştur (Holliday & Pugh, 1975). 1980 yılına gelindiğinde, DNA metilasyonu ve gen baskılanması arasındaki işlevsel bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2013). Kısa süre sonra Feinberg ve Vogelstein, kanserde küresel DNA hipometilasyonunu bildirmiş (Douvlataniotis vd., 2020) ve tümör baskılayıcı genlerin, lokal DNA hipermetilasyonu olarak tanımlamışlardır (Field vd., 2018). İlk olarak fare DNA'sından DNMT1 enziminin başarılı bir şekilde saflaştırılması ve klonlanması (Bell vd., 2019; Ferrucci vd., 2020) ardından DNMT1 mutant farelerin oluşturulması ve analizi, DNA metilasyonu konusunda ilerlemeleri hızlandırmıştır (Fatemi vd., 2001). Aynı zaman dilimlerinde, ilk DNA-metil bağlayıcı protein olan MeCP2 (metil-CpG-bağlayıcı protein 2) bulunmuş ve DNA metilasyonu ile 5mC arasındaki bağlantı epigenetik mekanizmalar olarak araştırılmaya başlamıştır (Picard & Fagiolini, 2019).

Ökaryotlarda metilasyon, özellikle genomik baskılamada, genom bütünlüğünün korunmasında, transkripsiyonel düzenlemede ve gelişimsel süreçlerin korunmasında görevlidir. DNA metilasyon modifikasyonu sitozinin beşinci pozisyonunda bir metil grubunun eklenmesi ve çıkarılması veya DNA'da adenin altıncı pozisyonunda bir metil

grubunun eklenmesi ve çıkarılması şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 2) (Dor & Cedar, 2018). DNA 5-metilsitozin (5mC), ökaryotik genomlarda en yaygın DNA metilasyon modifikasyonudur ve esas olarak bir guanin nükleotidinden (CpG bölgeleri) önce gelen sitozinlerde meydana gelmektedir (Smith & Meissner, 2013). 5mC'nin varlığının genellikle transkripsiyon faktörlerinin bir promoter bölgesine bağlanmasını engellediğine ve dolayısıyla gen ekspresyonunu bastırdığına inanılmaktadır.

6-adenin metilasyonu (6mA), insan genomunda yakın zamanda keşfedilen ve gelişimi etkilediği gösterilen bir epigenetik modifikasyondur (Greer vd., 2016; Xiao vd., 2018). 5mC ve 6mA arasındaki fark ise düzenlenmelerinde farklı enzimatik sistemlerin görev almasıdır (Sun vd., 2015).



Şekil 2.3 Memelilerde DNA metilasyonunun modülasyonu (Jiang & Guo, 2020).

DNA metilasyonu, S-Adenozil Metiyonin (SAM) yardımıyla DNA metiltransferaz enzimi (DNMT'ler) tarafından katalize edilmekte olup, 3 izoformdan oluşan DNA metiltransferazlar (DNMT'ler; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) tarafından kontrol edilmektedir. DNMT1, mitoz boyunca metilasyon durumunun korunmasından öncelikli olarak sorumluyken, DNMT3A ve DNMT3B de novo metilasyon sürecinde görevlidir. Yapılan son çalışmalar DNMT'lerin aktif DNA demetilasyonundaki etkin rolünü göstermiştir (Cacan vd., 2015; Chen vd., 2013). Promotor bölgesinde yer alan ve CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını inhibe ederek genellikle gen ifadenmesinin doğrudan baskılanmasına veya gen susturulmasına neden olmaktadır (Allis & Jenuwein, 2016). Ayrıca metilasyon DNA'nın aktif halden inaktif hale geçerek protein ekspresyonunun engellenmesine sağlayan bir sistem olarak işlev görmektedir (Chen vd., 2013). DNA metilasyonu, klasik DNA

metilasyon okuyucuları, metil-CpG-bağlayıcı proteinler (MBD'ler) tarafından veya on-onbir translokasyon (TET) enzimi gibi sistemler tarafından kontrol edilmektedir (Skvortsova vd., 2017) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Memeli DNA metilasyonunda rol oynayan enzimler.

DNA metilasyon türü	Enzimlerin Rolü	Aile	Üyeleri
5mC	Writer	DNMT	DNMT1 DNMT3A DNMT3B
	Eraser	TET	TET1 TET2 TET3
	Reader	MBD	MeCP2 MBD1 MBD2
	Writer	DNMT	DNMT1 DNMT3A
6mA	Writer	HemK Mettl	N6AMT1 Mettl4
	Eraser	ALKBH	ALKBH1 ALKBH4

Kaynak: (Jiang & Guo, 2020).

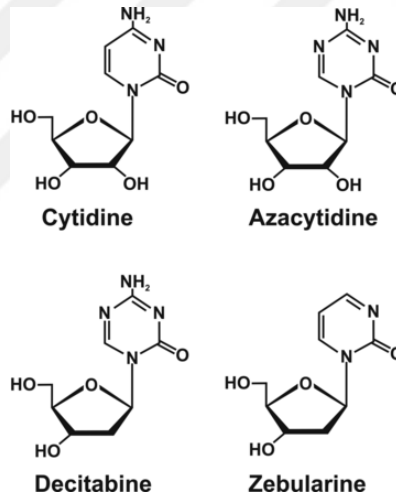
2.20. DNA Metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi)

Epigenetik değişiklikler, genetik mutasyonların aksine potansiyel olarak geri dönüşümlüdür. Bu nedenle, bu tür değişiklikler özellikle kanser gibi hastalıkların tedavisi için çekici bir hedef haline gelmiştir. Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ve DNMT'lerin aşırı ekspresyonu, karsinogenezde anahtar rol oynadığı tespit edildiğinden, demetile edici ajanlar, antikanser ilaçlar olarak özellikle umut verici görünmektedir (Canova vd., 1998). Anormal bir şekilde susturulmuş genlerin yeniden ekspresyonu ve normal işlevlerinin restorasyonu, büyüyen DNA zincirine dahil edilen ve DNMT'leri kovalent olarak bağlayan DNMT inhibitörlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir.

Günümüzde ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış iki DNMT inhibitörü (azanükleosidler), azasitidin (Vidaza; Celgene) ve 5-aza-2'deoksisitidin (5-Aza-2dc/desitabin) bulunmaktadır. Bu iki ilaç türü, akut miyeloid lösemi (AML) ve miyelodiplastik sendromu (MDS) olan hastaların tedavisi için onaylanmış tek epidilaçlardır. Azasitidin, FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından kronik miyelomonositik lösemiye (CMML) karşı kullanım içinde onaylanmıştır (Gros vd., 2012). DNMT inhibitörlerinin terapötik kullanımı, sadece hematolojik maligniteleri olan hastalar için değil aynı zamanda diğer tümör tipleri olan hastalar için yeni ve etkili çözümler sağlayabilir (Cowan vd., 2010). Nükleozid DNMT inhibitör ailesinin üçüncü yeni üyesi, in vitro deneylerde elde edilen iyi sonuçlar nedeniyle güçlü ve ümit verici bir ajan olarak karakterize edilen ve gelecekteki klinik deneyler için kullanılma potansiyeli olan, sitidin analogu zebularindir (Şekil 3) (Zhou vd., 2002).

Azasitidin ve desitabin, pirimidin halkasının 5. pozisyonunda modifiye edilmiş sitidin analoglarıdır (Şekil 2.4.). Her iki bileşik de 1964'te Sorm ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Şorm vd., 1964). Bu bileşikler, ilk olarak, lösemi kemoterapisinde, hipometilasyon özellikleri keşfedilene kadar antimetabolit ajanlar olarak kullanılmıştır. Bu sitidin analogları, insan nükleosit taşıyıcı-1 tarafından hücrelere taşınır ve aktif trifosfat formlarına, yani azasitidin, üridin sitidin kinazdan, 5-azasitidin 5'-trifosfata ve desitabin deoksisitidin kinazdan sitidin deaminaz (CDA) ile 5-aza-2'-deoksisitidin-5'-trifosfata indirgenmiştir. Bir ribonükleosit olan azasitidin, RNA'ya ve daha az miktarda DNA'ya dahil edilirken, bir deoksiriboz analogu olarak desitabin yalnızca DNA ipliklerine dahil edilmektedir. DNA veya RNA'nın aktif forma dönüşmesi için, bu bileşiklerin hücre döngüsünün S fazı sırasında, hücrelerin genomuna entegre edilmesi gerekmektedir (Cowan vd., 2010). 5-azanükleosit, DNA ve DNMT'ler arasındaki etkileşimi, kompleksin çözülmesini engelleyen ve nihayet proteozomal bozunmasını teşvik eden modifiye pirimidinin 5-pozisyonunda karbonu nitrojen kullanarak bozmaktadır. Böylece, enzim kovalent olarak DNA'ya ve onun DNMT'sine bağlı kalır ve fonksiyon bloke edilir. Ayrıca, kovalent protein eklentisi DNA'nın işlevselliğini tehlikeye atar ve DNA hasar sinyallemesini tetikleyerek DNMT'lerin bozulmasına neden olur (Santi vd., 1984; Stresemann & Lyko, 2008). Bu nedenle, sitozin kalıntılarının daha fazla metilasyonu inhibe edilir ve replikasyondan sonra yavru hücrelerde pasif sitozin metilasyon kaybına neden olur.

Bu iki maddenin etki mekanizmasının doza bağılı olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, bu iki ajanın ikili bir etki mekanizması kavramı ortaya çıkmıştır. Desitabin için 'ikili mekanizma', yüksek dozlarda hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve hücre farklılaşması ve tümör baskılama süreçlerini etkileyen, düşük dozlarda ise genin yeniden ekspresyonu üzerindeki DNA hipometilasyon aracılı etkiye sahiptir. Azasitidin için “ikili mekanizma” RNA ve DNA'ya dahil olma yoluyla yüksek dozlarda sitotoksisteye ve daha düşük dozlarda DNA hipometilasyon etkisine karşılık gelmektedir (Hollenbach vd., 2010). Ne yazık ki bu bileşiğin kullanılmasında bazı sınırlamalar vardır. Klinik etkinliklerine rağmen, azasitidin ve desitabin, zayıf biyoyararlanım, fizyolojik ortamda kararsızlık ve kullanımlarını kısıtlayan yüksek toksisite ile karakterizedir. Bu nedenle, hem stabilite ve hemde düşük toksisite oranı ile en umut verici moleküllerden biri zebularin gibi görünmektedir (Márquez vd., 2003; Zhou vd., 2002).



Şekil 2.4 DNA metiltransferazın nükleosit analogu inhibitörleri (Gnyszka vd., 2013).

2.21. Histon Modifikasyonları

Kromatin, bağlayıcı (linker) DNA ile bağlanmış nükleozomların bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Nükleozomlar, histon proteinlerinin bir oktomerine sarılı 146 baz çiftinden oluşan DNA'ya sahiptir. Oktomerler, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden iki kopya içermektedir (Can ve Aslan, 2016). Histon kuyruklarında yapılan posttranskripsiyonel modifikasyonlar, kromatinin yapısını ve genlerin transkripsiyonel durumunu değiştirmekte bu da DNA'yı etkilemektedir (Nestler, 2014). DNA, histon

proteinlerine sarılarak düzenlenmektedir. Böylece, gen transkripsiyonu, DNA replikasyonu, DNA rekombinasyonu ve hücrelerde DNA onarımı gibi çeşitli DNA ilişkili işlemlerde histon modifikasyonları düzenleyici mekanizmalardan biri olarak görülmektedir. Bu moleküler süreçler, hücre döngüsü, hücre büyümesi ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonlara katkıda bulunur (Allis & Jenuwein, 2016). Vincent Allfrey'in 1960'ların başındaki öncü çalışmalarından beri, histonların post-transkripsiyonel modifikasyonlara uğrayarak değiştiği bilinmektedir. Bu modifikasyonların kromatin yapısını nasıl etkileyebileceğine dair çalışmalar, 1997 yılında nükleozomun yüksek çözünürlüklü X-ışını yapısının çözülmesiyle hız kazanmıştır (Allis & Jenuwein, 2016). Histonlar, bazik histon amino N-terminal kuyruklarından çıkıntı yaparak bitişik nükleozomlarla temas kurabilmektedirler. Bu kuyrukların modifikasyonu, nükleozomlar arası etkileşimleri etkileyerek genel kromatin yapısını değiştirebilir. Değişiklikler, sadece kromatin yapısını düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda nükleozomları yeniden konumlandırmak için ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan yeniden modelleme enzimlerini de etkilemektedir (Bannister & Kouzarides, 2011).

Histon modifikasyonları; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikuitinasyon, sumoylasyon biyotinasyon (SUMO), sitrülasyon, poli-ADPribozilasyon ve N-glikosilasyon'dan oluşmaktadır (Bannister & Kouzarides, 2011).

2.22. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACi)

Histon asetilasyonunun, genlerin yaklaşık % 2-10'unun transkripsiyonunu kontrol eden önemli bir düzenleyici mekanizma olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2010). Histonların deasetilasyonu, kromatin yoğunlaşmasına neden olurken, dekondensasyon, artmış asetilasyondan kaynaklanmaktadır (Sarcar vd., 2010). Bu tür değişiklikler, azalmış veya artmış gen transkripsiyonu ile sonuçlanabilir. Bununla birlikte, histonlar dışında aktivitesi, asetilasyondan etkilenen başka proteinler de (örneğin; kromatin yeniden modelleme proteinleri, DNA bağlayıcı nükleer reseptörler, DNA onarım enzimleri, sinyal aracıları, yapısal proteinler, DNA bağlayıcı faktörler) bulunmaktadır. Özellikle, transkripsiyon faktörlerinin işlevi, olumlu veya olumsuz olarak asetilasyondan etkilenebilir. Bu da HDAC inhibisyonu ile belirlenen gen ekspresyonunun, kromatin yapısı gevşetilse bile neden her zaman artmadığına dair bir açıklama sağlamaktadır. HAT / HDAC aktivite dengesindeki değişiklikler: (I) değiştirilmiş bir gen ekspresyon profiline ve bazı sinyal yollarının

değişmesine yol açabilir; (II) proteazomal bozunmayı etkiler; (III) protein kinaz C aktivitesini etkiler ve (IV) DNA metilasyon durumunu değiştirir (Eckschlager vd., 2017).

HDACi, birkaç HDAC türüne (HDAC izoform seçici inhibitörleri) karşı etki edebileceği gibi, tüm HDAC türlerine de (pan-inhibitörleri) özel olarak etki edebilir. HDACi, beş bileşik sınıfının üyeleri olarak sınıflandırılabilir: (I) hidroksamik asitler (hidroksamatlar); (II) kısa zincirli yağlı (alifatik) asitler; (III) benzamidler; (IV) siklik tetrapeptidler; ve (V) sirtuin inhibitörleri (Eckschlager vd., 2017) (Tablo 2.3).



Tablo 2.3: Bazı HDACi'lerine genel bakış

Sınıf	HDAC İnhibitörü	Hedef HDAC Sınıfı
Hidroksamik asitler	Trikostatin A	pan
	SAHA	pan
	Belinostat	pan
	Panabioestat	pan
	Givinostat	pan
	Resminostat	pan
	Abeksinostat	pan
	Quisinostat	pan
	Rocilinostat	II
	Pratinostat	I, II ve IV
	CHR-3996	I
Kısa zincirli yağ asitleri	Valproik asit	I, IIa
	Bütirik asit	I, II
	Fenilbütirik asit	I, II
Benzamidler	Entinostat	I
	Takedinalin	I
	4SC202	I
	Moketinostat	I, IV
Siklik tetrapeptidler	Romidepsin	I
Sirtuins inhibitörleri	Nikotinamid	III
	Sirtinol	SIRT 1 ve 2
	Cambinol	SIRT 1 ve 2
	EX-527	SIRT 1 ve 2

Kaynak: (José-Enériz vd., 2019)

Trichostatin A (TSA), toksisitesi nedeniyle sadece laboratuvar deneylerinde kullanılan bir HDAC inhibitörü iken (Mogal & Abdulkadir, 2006), vorinostat ise (suberoylanilide hydroxamic asit, SAHA), nükseden ve refrakter kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde FDA onaylı olarak kullanılmaktadır (Fontecha-Barriuso vd., 2018; Munshi vd., 2006). Belinostat (periferik T hücre lenfoma tedavisi için onaylandı), panobinostat (multipl

miyelom tedavisi için onaylandı) ve yakın zamanda klinik çalışmalarda test edilen diğer bileşikler ise givinostat, fotoostat, abeksinostat kuisinostat ve pan-HDAC inhibitörleridir (Eckschlagler vd., 2017).

HDACi, histonların asetilasyonunu, transkripsiyon faktörlerini ve transkripsiyonu düzenleyen diğer proteinleri indükleyerek transkripsiyonu etkileyebilir (Bolden vd., 2006; Mogal & Abdulkadir, 2006; Stammeler vd., 2015). Ayrıca HDACi, kanser hücresi döngüsünün durdurulmasına, farklılaşmasına ve hücre ölümüne neden olur. Dahası, anjiyogenezi azaltırlar ve bağışıklık tepkisini düzenlerler. Dawson ve Kouzarides (Bannister & Kouzarides, 2011) tarafından öne sürülen “kanser hücrelerinin epigenetik savunmasızlığı” hipotezi, HDACi’lerinin göreceli özgüllüğünün bir nedenidir. Bu hipotez, normal hücrelerin, bazı kanser hücrelerinin aksine epigenetik düzenleyici mekanizmaları çoğalttığını varsaymaktadır (Ali vd., 2013; Fontecha-Barriuso vd., 2018).

2.23. Kodlanmayan RNA

1950'lerin sonlarında, ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA'sının (tRNA) keşfinden bu yana, büyük ölçekli dizileme ve hesaplama analizleriyle RNA ailesine ait birçok tür keşfedilmiştir. 21 yüzyılın başlarında insan ve fare genomunun ilk dizilim ve analiz verilerine göre DNA'nın % 98'inin kopyalanabileceğini gösterilmiştir. Ancak mRNA'ların çoğu transkript proteinleri kodlamıyor gibi görünmektedir. Bu durumda, kodlanmayan RNA (non-coding RNA/ncRNA) terimini ortaya çıkarmıştır. Ancak bu durum RNA'ların herhangi bir fonksiyona sahip olmadığı veya bilgi içermediği anlamına gelmemektedir (Surace & Hedrich, 2019). 2005 yılında İnsan Genom Projesi (HGP) gerçekleştirilmesiyle (Science, 1990) memelilerde bol miktarda uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) bulunduğu tespit edilmiştir (Carninci vd., 2005; Nature, 2005). Yüksek verimli sekanslamanın yaygın olarak uygulanması, ncRNA'ların daha doğru profillemesine izin vermiş (Kaiser vd., 2008) ve 2005 yılında yürütülmeye başlayan ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) projesi raporlarına göre, insan genomunun % 80'inin ncRNA'lara transkripsiyon yapma kapasitesine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Nature, 2005). Genel olarak, ncRNA'ların birçok biyolojik sürece katıldığı, fizyolojik ve gelişimsel süreçleri düzenlenmesi ve hatta hastalıklar patogeneğinde rol aldığı rapor edilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde, tümör baskılayıcılar ve onkogenik itici güçler olarak tanımlanmışlardır (Pavet vd., 2011).

Farklı genomik bölgelerden ökaryotik transkripsiyon ve RNA'nın işlenmesi, çeşitli ncRNA türlerinin üretilmesine katkı sağlamaktadır. Protein kodlayan genler, güçlendirici bölgeler veya transpozon elemanları gibi DNA'ların çeşitli kısımları ncRNA'lara kopyalanabilmektedir. Genom içerisindeki rolleri göz önüne alındığında, ncRNA'lar, housekeeping ve regülatör olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.4.). Housekeeping ncRNA'lar hücrelerde bol miktarda bulunur ve hücresel fonksiyonları düzenlerler. Regülatör ncRNA'lar ise genellikle anahtar düzenleyici RNA molekülleri olarak kabul edilirken, transkripsiyon sırasında ve transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak işlev görmektedirler (Cech vd., 2014; Peschansky & Wahlestedt, 2014; Ponjavic vd., 2007).

2.24. Housekeeping ncRNA'lar

Son yıllarda rRNA'lar, tRNA'lar, küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar), küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) ve telomeraz RNA'lar gibi housekeeping ncRNA'lar yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Cerutti vd., 1968; Zieve vd., 1976). Bu ncRNA'lar genellikle küçüktür ve uzunlukları 50-500 nükleotid (nt) arasında değişmektedir, tüm hücre tiplerinde yapısal olarak eksprese edilmekte ve hücre canlılığı için gereklidirler (Zhang vd., 2019). Protein sentezinde rRNA'lar ve tRNA'lar, RNA eklemede, snRNA'lar RNA modifikasyonlarında ve snoRNA'lar ise düzenleyici olarak görev almaktadır (Zhang vd., 2019).

2.25. Regülatör ncRNA'lar

Ortalama boyutlarına bağlı olarak, regülatör ncRNA'lar, küçük kodlayıcı olmayan (<200 nt) RNA'lar (sncRNA) ve büyük kodlayıcı olmayan (>200 nt) RNA'lar (lncRNA) olarak sınıflandırılmaktadır. sncRNA'lar miRNA, iRNA, piRNA gibi alt türlere ayrılmaktadır.

miRNA'lar, transkripsiyonlu saç tokası halka yapılarından üretilen sncRNA sınıfıdır (Lagos-Quintana vd., 2001; Lee vd., 1993). Hem sitoplazmada hem de çekirdekte gen ekspresyonunu farklı mekanizmalar yoluyla düzenlerler ve transkripsiyon sonrası seviyede gen susturulmasına aracılık ederler (Lagos-Quintana vd., 2001). Çeşitli RNA türleri arasındaki karmaşık etkileşimde kilit oyuncular olarak, miRNA'lar son yıllarda çokça çalışılan konular arasındadırlar (Kozomara vd., 2019). Birçok miRNA'ların gelişimsel süreçte, hücre proliferasyonunda, apoptoz ve yağ metabolizmasında hatta nöronal gen

ekspresyonu, beyin morfogenezi, kas farklılaşması ve kök hücre bölünmesi gibi birçok çeşitli gelişimsel sürecin merkezinde olduğu gösterilmiştir (Balci-Peynircioglu vd., 2019; Holley & Topkara, 2011; Zhang vd., 2019)

siRNA'lar, çift sarmallı RNA molekülleri sınıfıdır ve RNA enterferans (RNAi) yolunda önemlidirler. Kökenlerine göre siRNA'lar iki alt kategoriye ayrılabilir: eksojen siRNA (ekso-siRNA), yapay ekleme veya virüs enfeksiyonlarından kaynaklanan eksojen nükleik asit ürünleri ve endojen genomik lokustan kaynaklanan endojen siRNA'lar (endo-siRNA) ve çoğunlukla transpozon elemanlarından (TE'ler) (Waterhouse vd., 1998) transkribe edilmektedir.

PIWI proteinlerinden sonra adlandırılan piRNA'lar, hayvanlara özgü küçük ncRNA'ların bir sınıfıdır. miRNA'lardan ve siRNA'lardan farklı olarak piRNA'lar, tek sarmallı RNA öncüllerinden (Martinez vd., 2015) Dicer'dan bağımsız bir şekilde işlenir ve yalnızca PIWI proteinlerine bağlanarak işlev görürler (Martinez vd., 2015).

LncRNA'lar, 200 nt'den uzun, protein kodlama özelliği olmayan transkriptler olarak tanımlanmaktadır. Protein kodlayan genlere göre konumlarına bağlı olarak lncRNA, beş alt kategoriye ayrılabilir (Ma vd., 2013). Uzun intergenik ncRNA'lar (lincRNA'lar), intergenik bölgelerde her iki sarmaldan kopyalanır. Uzun intronik ncRNA'lar, protein kodlayan genlerin intronlarından kopyalanır. Duyu lncRNA'lar, duyu zincirinden kopyalanır ve protein kodlayan genlerin eksonlarını içerir. Sens lncRNA'ların aksine, antisens lncRNA'lar, eksonik veya intronik bölgelerle örtüşen veya protein kodlama sekansını bir intron yoluyla kaplayan antisens iplikten kopyalanır, çift yönlü lncRNA'lar ise zıt iplikteki bir kodlama transkriptinin yakınında lokalize olur (Bhan & Mandal, 2014). DNA sekansları üzerindeki düzenleyici etkilerine göre lncRNA, yakın komşulukta genlerin ekspresyonunu düzenleyen cis-lncRNA'lar (cis-etkili lncRNA'lar) ve uzak genleri düzenleyen trans-lncRNA'lar (trans-etkili lncRNA'lar) olarak sınıflandırılabilir (Kornienko vd., 2013). Bazı lncRNA'lar, miRNA'lar, piRNA'lar ve snoRNA'lar gibi küçük ncRNA'lar oluşturmak için daha fazla işlenebilmektedir (Röther & Biochimie, 2011).

Tablo 2.4: ncRNA'ların sınıflandırılması.

Sınıf	Kısaltma	Tür	Uzunluk
Housekeeping ncRNA'lar	rRNA	ribozomal RNA	120–4,500 nt
	tRNA	transfer RNA	76–90 nt
	snRNA	küçük nüleer RNA	100–300 nt
	snoRNA	küçük nüleolar RNA	60–400
Regulatör ncRNA'lar	TERC	telomeraz RNA	/
	tRF	tRNA-türevi Fragment	16–28 nt
	tiRNA	tRNA halves	29–50 nt
	miRNA	mikroRNA	21–23 nt
	siRNA	small interfering RNA	20–25 nt
	piRNA	piwi-iliskili RNA	26–32 nt
	eRNA	enhansır RNA	50–2,000 nt
	lncRNA	uzun kodlanmayan RNA	>200 nt
	circRNA	halkasal RNA	100–10,000 nt
	Y RNA	Y RNA	/

Kaynak: (Zhang vd., 2019)

2.26. Epigenetik ve AAA

AAA hastaları, benzer MEFV genotiplerine sahip olmalarına rağmen farklı heterojen klinik bulgularla karşımıza çıkabilmektedir. Bu fark, diğer modifiye edici genlere, epigenetik mekanizmalara veya çevresel faktörlere bağlı olduğu ve bununda epigenetik düzenleyicilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve miRNA'lar gibi epigenetik mekanizmalar AAA'nin patogenezinde rol oynamaktadır (Álvarez-Errico vd., 2017; Wada vd., 2017).

AAA üzerindeki epigenetik regülasyonun etkisini gösteren ilk ipucu, Ermenistan'da yaşayanlara Ermeni hastaların, ABD'de yaşayan Ermeni hastalara oranla, hastalık skorunun ve amiloidoz riskinin daha fazla olduğu rapor edilen çalışmaya dayanmaktadır (Schwabe ve ark., 1974). Diğer bir ipucu da, Almanya'da yaşayan AAA hastalığına sahip Türk çocuklarının aynı mutasyona sahip ve Türkiye'de yaşayanlara göre daha az şiddetli bir hastalık fenotipi ifade ettiklerini gösterilmesidir (S Ozen vd., 2014).

Kireçtepe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 21 sağlıklı kontrol ve 30 AAA hastası arasında periferik lökositlerde MEFV'nin ikinci eksonu içinde CpG adasının metilasyon seviyeleri karşılaştırılmış ve AAA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla MEFV ekzon 2'de metilasyon seviyesini daha yüksek olduğu saptanmıştır (Kireçtepe vd., 2011). Ayrıca MEFV mutasyonları taşıyan bireylerdeki MEFV mRNA ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir (Grandemange vd., 2011; Lachmann vd., 2006). Bunlara ek olarak, genotipik olarak benzer özelliklere ve aynı mutasyona sahip olgularda bile klinik semptomlar önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Yapılan diğer bir çalışmada MEFV mutasyon lokasyonunda (ekzon 10, ekzon 3 veya ekzon 10) farklılık gösteren üç AAA grubundaki ateş atakları sırasında, dolaşımdaki miRNA seviyesinin spesifik olarak değiştiği gösterilmiştir (Wada vd., 2017). Ayrıca, Koga ve arkadaşları, febril atak sırasında AAA hastalarının serumunda miR-204-3p'nin büyük ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Bu bulgular, miR-204-3p'nin AAA hastalarında yararlı bir biyobelirteç olabileceğini ve PI3Kγ yolunu hedefleyerek AAA'de inflamatuvar sitokinlerin bir baskılayıcısı olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir (Koga vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada da, histon modifikasyonları da AAA fenotipini etkileyen etmenlerden biri olduğu gösterilmiş ve AAA atakları sırasında nötrofiller, nötrofil hücre dışı tuzaklar (NET'ler) olarak bilinen kromatin filamentlerinin salgıladığı ve citrullinated histone H3 (H3cit), NET'lerin salınmasında aktivatör bir rol oynadığı gözlemlenmiştir (Apostolidou vd., 2016).

Bu gözlemler ışığında ortaya sürülen hipotez, rutin genetik analiz sırasında taranmayan, düzenleyici bölgelerde yeni bir mutasyonun varlığını, epigenetik faktörleri, genin ekspresyonunu düzenleyen diğer genlerin işlev bozukluğunu, hastalığın polijenik veya multigenik doğasını ve protein taşınması ile ilgili işlev bozukluklarını içermektedir.

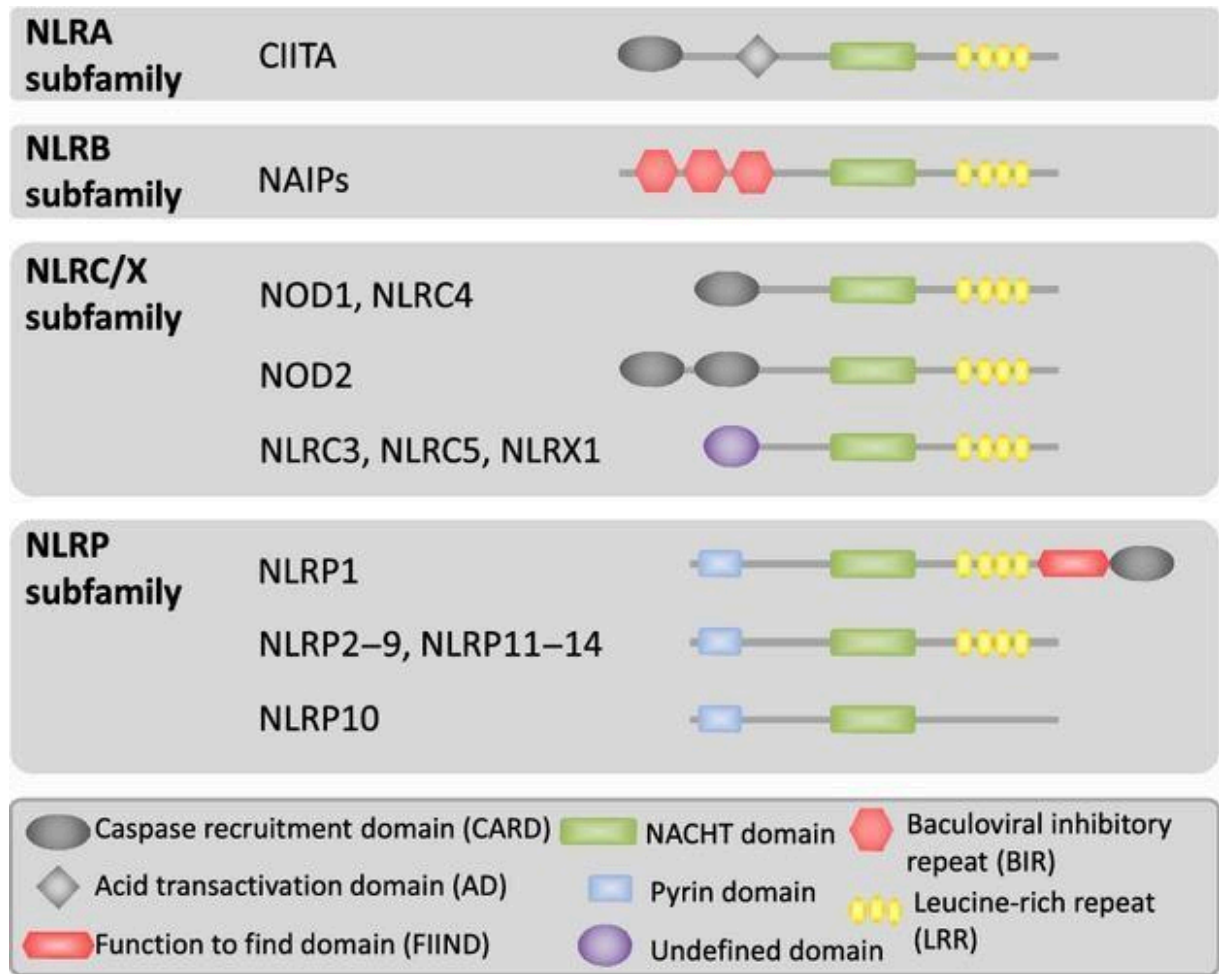
2.27. İnflamazomlar

İnflamazomlar, bulaşıcı hastalıklara karşı doğuştan gelen bağışıklıkta önemli görevleri olan ve enfeksiyonla ilişkili mikroorganizmalara ve konak proteinlerinden oluşan molekülere karşı, inflamasyon oluşumunu tetikleyen multiprotein platformlarıdır (Martinon vd., 2002). Bu büyük, multimerik kompleksler, patojenlere ve hücre hasara özgü moleküler modellere yanıt oluşturarak, piroptotik hücre ölümünün uyarılması ve proinflamatuvar

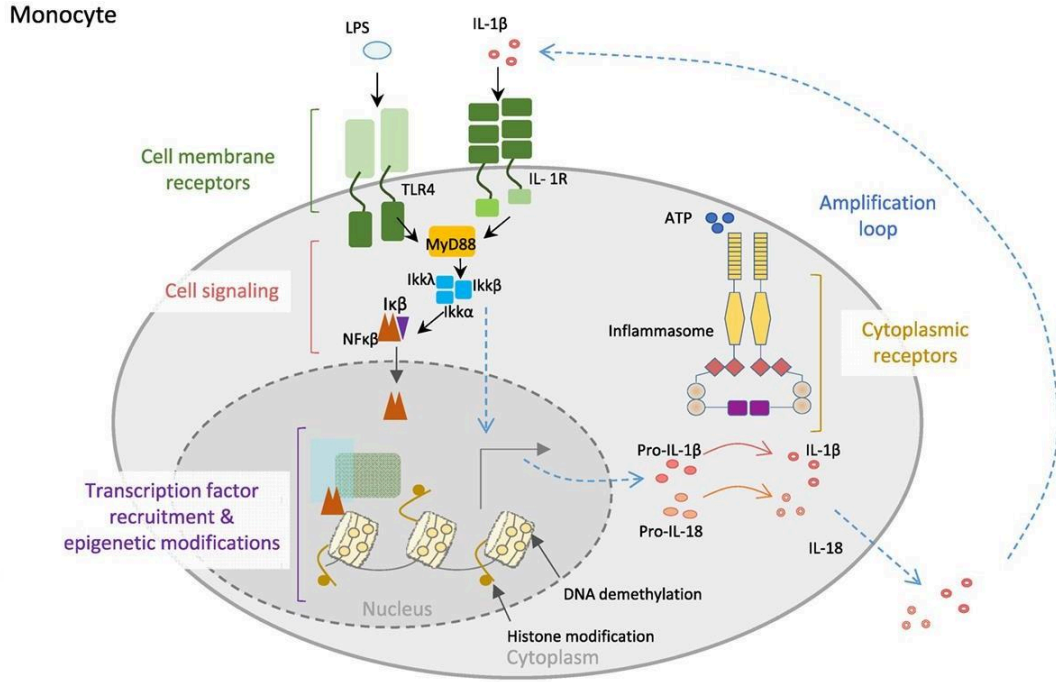
sitokinlerin salınması gibi hücreyel yanıtları tetiklemektedir. Bazı inflamazomlar bu kalıpları doğrudan tanırken, bazıları ise hücrenin homeostatik ortamındaki değişiklikler yoluyla bu kalıpları dolaylı olarak algılarlar (Xiong vd., 2020).

Farklı işlevlere sahip sensör, adaptör ve efektör (pro-Kaspaz) birimlerin bir araya gelmesi ile inflamazomlar oluşur. Sensör bileşenini çoğunlukla Nod-benzeri reseptörler olarak da bilinen Nükleotid-Bağlayıcı Oligomerizasyon Domaini (NOD) ve Lösince-Zengin Tekrar (LRR) içeren reseptör (NLR) proteinleri oluşturur (Malik ve ark. 2017). NLR ailesi, insanlarda 23 ve farelerde yaklaşık 34 üyeden oluşmaktadır (Jiang & Guo, 2020). Farklı NLR alt aileleri, merkezi bir nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon (NACHT) alanını ve karboksi terminal lösine açısından zengin tekrarları (LRR'ler) paylaşır. NACHT alanı, NTPaz aktivitesine sahip bir oligomerizasyon alanı iken, LRR'ler genellikle protein-protein etkileşimlerinde yer almaktadır. Belirli bir N-terminal protein-protein etkileşim alanının varlığına bağlı olarak farklı alt aileler tanımlanabilir (Lei vd., 2014; Zhen & Zhang, 2019). NLR ailesi kodladıkları proteinlerin N-terminal bölgesinde taşıdıkları sensör çeşitlerine göre isimlendirilirler: NLRA, N-terminal bölgesinde “asidik transaktivasyon” domaini, NLRB, “bakuloviral inhibituar tekrar” domaini, NLRC, “CARD” (Kaspaz aktivasyon ve bağlanma), NLRP, ise “pyrin” domaini taşımaktadır (Shinar vd., 2012) (Şekil 2.5.). Her bir grup, farklı sinyalleri tanımak için özelleşmiş olan alt tiplere ayrılmaktadırlar (Kerr vd., 2018). En iyi bilinen inflamazomlar arasında, pirin (PYD) alanı içeren NLRP1 ve NLRP3; NLR ailesi apoptoz inhibe edici protein (NAIP); kaspaz aktivasyonu ve görevlendirme alanı (CARD) içeren NLRC4 bulunmaktadır (Chu vd., 2016; Jamilloux vd., 2018). Ayrıca melanom 2 (AIM2) ve pirin inflamazomu da hakkında bilgi sahibi olunan diğer inflamazomlardır (Chu vd., 2016). Bu sensörlerden birkaçı, adaptör molekülü olarak bir CARD (ASC) içeren apoptozla ilişkili benek benzeri proteini kullanmaktadır. ASC adaptörü, sensörü negatif düzenleyici efektörü kaspaz-1'e (CASP1) bağlayan bir köprü görevi görür. İnflamazom ile CASP1'in birleşmesinden sonra, CASP1 yakınlık kaynaklı otoproteoliz yoluyla aktive olmakta ve aktif CASP1 daha sonra proinflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18'in olgunlaşmamış formlarını olgun sinyal formlarına işlenmesini sağlamaktadır (Nakano vd., 2013). Ayrıca, CASP1, gasdermin-D (GSDMD) proteinini böler. Bölünmeden sonra, (Rathinam vd., 2019) N-terminal fragmanı, hücre zarında gözenekler oluşturmak üzere oligomerize olur, IL-1 β ve IL-18'in hücreden ayrılmasına ve etkili bir şekilde piroptotik veya enflamatuvar hücre ölümünü gerçekleştirmesine izin verir

(Şekil 2.6.). Bu kompleksler, konak savunmasında hayati işlevlere hizmet etmelerine rağmen, inflamazomların anormal aktivasyonu ile ilgili birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Örneğin; NLRP3 ve pirin mutasyonları, kriyopirine bağlı periyodik sendromlar (CAPS) ve AAA dâhil olmak üzere otoinflamatuvar hastalıkların gelişmesine yol açmaktadır (de Torre-Minguela vd., 2017; Jamilloux vd., 2018). Ayrıca, kronik inflamazom aktivasyonu, metabolik sendromların, nörodejeneratif hastalıkların ve kanserin gelişmesine neden olmaktadır (Christgen vd., 2020; Karki & Kanneganti, 2019).



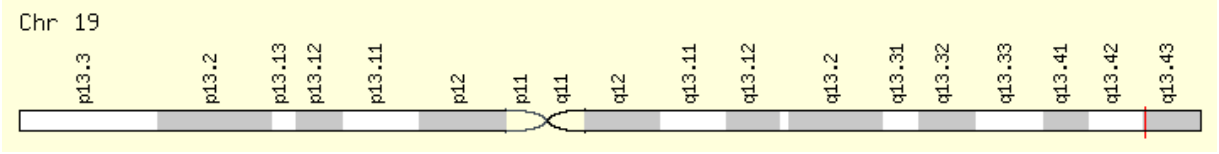
Şekil 2.5: İnsan NLR alt ailelerinin alan yapısı (Gorp vd., 2014).



Şekil 2.6: İnflamazom Aktivasyonu (Álvarez-Errico vd., 2017).

2.28. NLRP13

Piroptotik hücre ölümüne neden olan inflamazom oluşumunda rol oynayan genlerden biri de NLRP13'tür. Literatürde NALP13, NOD14, PAN13, CLR19.7 olarak da bilinmektedir (Chu J.Q. ve ark., 2016). İnsanda NLRP13, 19q13.43 kromozomda lokalize olup 12 ekzondan oluşan ve 118 kD protein üretmesi beklenen bir gendir (Şekil 2.7.). Veri tabanlarında iki ek varyasyonu mevcuttur. 1036 amino asit kodlayan varyant 1, 1043 amino asit kodlayan ise varyant 2 olarak isimlendirilir. Bu iki varyant, 1030. aminoaside kadar aynı amino asit dizisini paylaşırlar. NLRP13'de NLR ailesinin diğer üyeleri gibi N-terminal PYD (PYRİN) alanı, merkezi oligomerizasyon alanı NACHT ve yedi lösin bakımından zengin tekrarları içeren C-terminal LRR alanı olmak üzere üç fonksiyonel alan içermektedir (Chu J.Q. ve ark., 2016).



Şekil 2.7: NLRP13 geninin şematik gösterimi (GeneCard database).

Literatürde NLRP13 ile ilgili bilgi oldukça kısıtlıdır ve NLRP13 geninin hastalıklarda nasıl bir etkiye sahip olduğu hakkında ayrıntılı bilgiler vermemektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, NLRP13'ün inflamasyon uyarılması veya baskılanması üzerinde etkili olduğu ve immün ayrıcalığın en önemli bölgeleri arasında; plasenta ve testislerde ifade edildiğini göstermiştir (Grøndahl vd., 2013). Ülkemizde yapılan bazı tez çalışmalarında da aşırı ifade edildiklerinde NLRP13'ün pro-Kazpaz-1 ve ASC ile etkileştiği ve ASC-CASP1 ile inflamazom benzeri yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Gültekin Y., 2011). Ayrıca LPS ve ATP'nin, NLRP13 inflamazomunun aktivatörleri olduğu ortaya konulmuştur (Yalcinkaya M., 2015). Yine yapılan bir çalışmada NLRP13'ün inflamasyon aktivasyonu, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve makrofaj farklılaşmasında rollerinin olduğu ve artan NLRP13 seviyesinin, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 pro-inflamatuvar sitokinlerinin ifadelerini ve salınımlarını arttırdığı gözlemlenmiştir. NLRP13'ün baskılanması, IL-1 β 'nin THP-1 hücrelerindeki ifadesini azaltmakta iken yüksek NLRP13 seviyesi, NF- κ B aktivasyonunu sağlayarak, pro-IL-1 β ve NLRP3 gibi inflamazom kompleks bileşenlerinin protein seviyelerini ve pro-CASP1 ve pro-CASP-8'in maturasyonlarını arttırdığı belirlenmiştir (Yılmaz A., 2018). Bununla birlikte, aşırı IL-1 β ve IL-18 salınımı gereksiz bir inflamasyonu tetikleyerek, otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıkların gelişimine neden olmaktadır (Álvarez-Errico vd., 2017).

2.29. İnflamazomlar ve AAA

AAA, inflamazom kompleksinin önemli bir düzenleyici bileşeni olarak görev yapan pirin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Pirinin uygun uyarıcı yoluyla, inflamazom ile birleşmesi, kaspaz-1'in aktivasyonuna ve IL-1 β , IL-18'in salınmasına yol açar. Bu süreçte önemli bir adım, ASC'nin pirin'e kazandırılmasıdır. ASC, N-terminal PYD alanı aracılığıyla, homotipik etkileşime girer ve bu da ASC beneklerini indükler. Daha sonra, pro-kaspaz-1, ASC'nin kaspaz alım alanı (CARD), pro-kaspaz-1'in CARD alanı ile etkileşimi yoluyla beneklere alınır. Pro-kaspaz-1 moleküllerinin

kümelenmesi, kaspaz aktivitesinin indüklenen bir otoproteolitik indüksiyonunu teşvik eder (Lamkanfi & Dixit, 2014; Surace & Hedrich, 2019). Pro-kaspaz-1'in otoklavajı, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i olgun formlarına işleyen aktif kaspaz-1 p10/p20 tetramerinin oluşumuna yol açar. Pirin inflamazomunu düzenleyen moleküler mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalar, AAA'nin patogenezi ve MEFV'deki mutasyonların aşırı inflamazom aktivasyonuna nasıl yol açabileceğini daha iyi anlamak için gereklidir. B30.2 alanında, AAA ile ilişkili mutasyonların kümelenmesi gerçeği, mutasyonların bu alanın önemli bir düzenleyici rolü olduğunu gösterdi (Chae vd., 2006a). Van Gorp vd., AAA ile ilişkili mutasyonların, ASC'nin mikrotübülden bağımsız oligomerizasyonuna izin verdiğini ve bu nedenle, mikrotübül ile ilgili sinyaller olmaksızın ASC bağlanması ve inflamazom oluşumu için pirini hazırladığını göstermektedir (Van Gorp vd., 2016).

Otoinflamatuvar hastalıklarda disfonksiyonel epigenetik mekanizmaların bir rolü araştırılmış ve NALP3 veya NLRP3 gibi inflamazom komplekslerinin, AAA gibi otoinflamatuvar hastalıkların patogeneziinde rol oynadığı gösterilmiştir (Campbell vd., 2016; Jamilloux vd., 2018). İnflamazomların rol oynadığı diğer otoinflamatuvar hastalıklara, CAPS, TRAPS ve Bakteriyel Olmayan Osteomiyelitin (CNO) örnek olarak gösterilebilir (Tartey & Kanneganti, 2020). Örneğin, sitoplazmik tehlike sensörü NLRP3'teki mutasyonlar CAPS'e neden olmaktadır (Vento-Tormo vd., 2017). CNO'nun kesin moleküler patofizyolojisi belirsizliğini korurken, bağışıklık düzenleyici sitokinler IL-10 ve IL-19'un azalmış ekspresyonunun yanı sıra, artan NLRP3 inflamazom ekspresyonunun hastalık gelişiminde merkezi olarak rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Surace & Hedrich, 2019). TRAPS hastalığında ise NALP3 inflamazomunda meydana gelen değişiklik hastalık patogeneziinde rol oynamaktadır (Surace & Hedrich, 2019).

Tüm bu bilgiler ışığında, inflamazomların, otoinflamatuvar hastalıklarda bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde katkı sağladığı gösterilmektedir (Tartey & Kanneganti, 2020). Ancak hangi inflamazomların nasıl bir etkiye sahip olduğu hala merak konusudur. AAA hastalığında NALP3 ve NLRP3 gibi inflamazom komplekslerinin etkisi olduğu gösterilmiş olsa da NLRP13 kompleksinin, hastalık üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı veya nasıl bir etkiye sahip olduğu hakkında bir çalışma literatürde geçmemektedir.

AAA'nin patogeneziinde epigenetik faktörler rol oynadığı tespit edilmiş olmasına rağmen bu mekanizmaların hastalık fenotipindeki rolü veya AAA patogeneziine nasıl katkıda

bulunduğu hala belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca inflamazomların aktivasyonları sonucu salınan'ın, AAA hastalarında NLRP13 gen ekspresyonunun AAA hastalarında IL-1 β , IL-18 sitokinlerinin ve kaspaz-1'i nasıl düzenleyebileceği bilinmemektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, AAA hastarında atak/remisyon döneminde, inflamazom ilişki sitokinlerin hastaların klinik verileri ile ilişkisini, NLRP13 inflamazom gen ekspresyon seviyelerini, global ve DNA spesifik metilasyon profillerini inceledik.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun #19-KAEK-164 sayılı etik kurul izni ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yönergesi'ne uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerden, Helsinki bildirgesine göre bilgilendirilmiş gönüllü onamları alındı. Ayrıca, çalışmaya dahi edilen bütün hastalar için epidemiyolojik veriler, aile ağaçları, aile öyküleri, tanı yaşları, klinik bulgular, beraberinde görülen hastalıklar, tedaviye başlanma zamanı, tedaviye yanıt ve tedavi uyumu gibi doğrudan doğruya hastalık ile ilgili birtakım kriterleri ve bilgileri içeren hasta takip ve çalışma formu hazırlandı. Bu çalışma, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, 2019/84 ve 2019/88 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

Çalışma grubu, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Acil Polikliniğine ile Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği gelen AAA tanısı konulan 60 hastadan oluşturuldu. Kontrol grubu olarak ise ailesinde ve kendisinde AAA anamnezi olmayan 30 sağlıklı birey cinsiyet farkı gözetilmeksizin seçildi. Her bir bireyinden EDTA'lı tüpe 8 ml kan alınarak, DNA ve RNA izolasyonları yapılmak amacıyla -80 °C'de saklandı. Ayrıca ELISA testinde kullanılmak üzere sarı kapaklı jelli test tüplerine 2 ml kan alınarak, 30 dk. boyunca örnekler oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında toplanan serum her kriyotüpe 500 µl olacak şekilde aktarıldı ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.2. Araç ve Gereçler

Tablo 3.1 Kullanılan Cihazlar

Laminar Kabin	Esco Sınıf II Tip A2
İnkübatör	Nuaire AutoFlow NU-4750
Karıştırıcı İnkübatör	Heidolph Unimax 1010
Etüv	Memmert INB 500
Jel Görüntüleme	UVP BioSpectrum 500
RealTime PCR	Roche LightCycler 480
PCR	PeQlab Advanced Primus 96
Mikrodalga Fırın	Arçelik MD 554
Elektroforez Sistemi	Scie-Plas HU 10
Hassas Terazı	Denver Instrument TB 224A
Terazi	AccuLab VIC212
Kuru Blok Termostat	Bio TDB 100
Vorteks Tüp Çalkalayıcı	IKA Genius 3
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA RH Basic 2
Santrifüj	Hettich EBA21
pH Metre	Hanna HI 2211
Mikroplate Okuma	Rayto RT-2100C
Elisa Plate Yıkama	Cenix Exaro
Sonikatör	Sonics Vibracell VCX 130
Spektrofotometre	Eppendorf BioPhotometer UV/VIS
Otoklav	Hirayama HMC HV-110L
Derin Dondurucu (-80)	New Brunswick Scientific U-410
Derin Dondurucu (-20)	VESTEL GTP 455A
Soğutucu (+4)	UĞUR USS 440 DKTL
Buz Makinesi	Scotsman AF 80
Saf Su	MES MP MiniPure

Tablo 3.2 Kullanılan Kimyasallar

HCl	Carlo-Erba
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Amresco
NaHCO ₃	Merck
Agaroz	Lonza
Absolüt Alkol	Merck
Tris	Roche
EDTA	Amresco
Etidyum Bromür	Sigma
Triklorasetikasit (TCA)	Sigma
DNA Ladder H3 RTU	GeneDirex
VitaTaq® HS PCR Kit	Procomcure
One-Step RT-PCR kit	Bioline
One-Step RT-PCR kit	ZymoResearch
Global DNA methylation kit	ZymoResearch
Methylamp One-Step DNA modification kit	Geneall
Genomik DNA izolasyon kiti	Geneall
Kandan RNA izolasyon kiti	BioBasic
Human IL-1 β ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory
Human IL-18 ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory
Human Caspase1 ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory

Tablo 3.3 Kullanılan Primerler

Primer adı	Sekans (5'-3')
NLRP13 (PCR)	F: ATG GTG TGT TGG ACC GTA TGT R: GCC AAA TCT ACC TCT GCT GT
Metillenmiş-NLRP13	F: AAA TAT TTA GTT GAG GTC GGG T R: GAT CTC CTA ACC TTA TAA TCC GC
Metillenmemiş-NLRP13	F: AAA ATA TTT AGT TGA GGT TGG G R: AAT CTC CTA ACC TTA TAA TCC ACC C
GAPDH	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

3.3. Yöntem

3.3.1. IL-1 β , IL-18 ve Kaspaz-1 seviyelerinin ELISA yöntemi ile ölçümü

İnterlökin-1 β seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü

İnterlökin-1 β seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü için Bioasaay Techonology Laboratory Human İnterlökin-1 β ELISA kit kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak kit protokolüne uygun olarak standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ve seyreltme oranları aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 3.4: Standartların Hazırlanması

Standard	4000pg/L	120 μ l Original Standard + 120 μ l Standard Diluent
Standard	2000pg/L	120 μ l Standard No.5 + 120 μ l Standard Diluent
Standard	1000pg/L	120 μ l Standard No.4 + 120 μ l Standard Diluent
Standard	500pg/L	120 μ l Standard No.3 + 120 μ l Standard Diluent
Standard	250pg/L	120 μ l Standard No.2 + 120 μ l Standard Diluent

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler kite uygun olarak hazırlandı. Deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Standart kuyucuğa 50 μ l standart eklendi.
3. Örnek kuyucuklarına 40 μ l numune eklendikten sonra 10 μ l anti-IL-1 β antikoru eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 50 μ l streptavidin-HRP eklendi.
5. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra 37 ° C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 50 μ l substrat solüsyonu A eklendikten sonra yine her kuyucuğa 50 μ l substrat solüsyonu B eklendi.
8. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi.

9. Her kuyucuğa 50µl Stop Solüsyonu eklendi.
10. 10 dakika içinde 450 nm'de OD değeri ölçüldü.

İnterlökin-18 seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü

İnterlökin-18 seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü için Bioasaay Techonology Laboratory Human İnterlökin-18 ELISA kit kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak kit protokolüne uygun olarak standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ve seyreltme oranları aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 3.5: Standartların Hazırlanması

Standard No.5	64ng/L	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
Standard No.4	32ng/L	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
Standard No.3	16ng/L	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
Standard No.2	8ng/L	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
Standard No.1	4ng/L	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler kite uygun olarak hazırlandı. Deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Standart kuyucuğa 50µl standart eklendi.
3. Örnek kuyucuklarına 40µl numune eklendikten sonra 10µl anti-IL-18 antikoru eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP eklendi.
5. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra 37 ° C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A eklendikten sonra yine her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu B eklendi.
8. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi.

9. Her kuyucuğa 50µl Stop Solüsyonu eklendi.
10. 10 dakika içinde 450 nm'de OD değeri ölçüldü.

Kazpaz-1 seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü

Kazpaz-1 seviyesinin ELISA yöntemi ile ölçümü için Bioasaay Techonology Laboratory Human İnterlökin-18 ELISA kit kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak kit protokolüne uygun olarak standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ve seyreltme oranları aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 3.6: Standartların Hazırlanması

Standard	20ng/ml	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
Standard	10ng/ml	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
Standard	5ng/ml	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
Standard	2.5ng/ml	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
Standard	1.25ng/ml	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler kite uygun olarak hazırlandı. Deney, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Standart kuyucuğa 50µl standart eklendi.
3. Örnek kuyucuklarına 40µl numune eklendikten sonra 10µl anti-IL-1β antikoru eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP eklendi.
5. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra 37 ° C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A eklendikten sonra yine her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu B eklendi.
8. Plaka parafilm ile kaplandıktan sonra karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi.
9. Her kuyucuğa 50µl Stop Solüsyonu eklendi.

10. 10 dakika içinde 450 nm'de OD değeri ölçüldü.

Sonuçların Hesaplanması:

Dikey (Y) eksenindeki her standart için ortalama OD'yi yatay (X) eksenindeki konsantrasyona karşı çizerek standart bir eğri oluşturuldu ve grafikteki noktalar aracılığıyla en uygun eğri çizildi. En iyi uyum çizgisi graphpad prism 8,0 programı kullanılarak regresyon analizi ile belirlendi.

3.3.2. NLRP13 geninin MEFV ile ilişkisinin biyoinformatik analizi

NLRP13 geninin, protein-protein etkileşimi çevrimiçi analiz aracı STRING ile belirlendi. Hem bilinen hem de tahmin edilen NLRP13 ile entegre proteinlerin fonksiyonel etkileşimlerini tahmin etmek için (STRING) (<https://string-db.org>) veri tabanını kullanıldı.

3.3.3. Hasta ve kontrol grubu kan örneklerinden RNA izolasyonu

1. 500 µl kan örneği ependorf tüpe aktarıldı.
2. Üzerine 1000 µl saf su eklendikten sonra 10.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
3. Daha sonra üzerine 1000 µl trizol eklendi ve homojenizatör yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlandı.
4. Coloumn vial tüplere aktarılan örneklerin üzerine 150 µl kloroform ekendi.
5. Oda sıcaklığında 2-3 dakika beklendikten sonra +4 °C'deki santrifüjde 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
6. Yeni ependorf tüpleri etiketlendi.
7. Aktarım sonrası her bir tüpe 200 µl isopropanol eklendi ve tüpler alt-üst edildi.
8. Oda sıcaklığında 10 dk. İnkübasyondan sonra 12.000 rpm'de 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleşti.
9. Süpernatant döküldükten sonra her bir tüpe soğuk %75'lik etanol eklendi. 5 dk. boyunca 9000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
10. Coloumn tüpler yeni ependorflara yerleştirildi ve tüplerin tam merkezine gelecek şekilde 40 µl Rnase-free su tüplere eklendi.
11. 2 dk. 50 °C'de inkübasyondan sonra 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Örnekler -80 °C'ye kaldırıldı.

3.3.4. Hasta ve kontrol grubu kan örneklerinden elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarının ölçümü ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu, $\Delta\Delta C_t$ Değerlerinin Hesaplanması

RNA konsantrasyonlarının ölçümü, Thermo-Fischer nanodrop cihazı kullanarak yapıldı. Blank (Kör) olarak, RNA'ları dilüe ederken kullanılan Rnase-free su kullanıldı. Mikroplakada bulunan kuyucuklara her bir örnekten 2 tane olmak üzere 1 μ l'lik RNA'lar koyuldu. 260 nm ve 280 nm'de hasta kan örneklerinden elde edilen RNA'ların absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm sonrası hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = (A_{260\text{RNA}} + A_{280\text{RNA}})/2 - (A_{260\text{su}} + A_{280\text{su}})/2 \times 40 \mu\text{g/mL}$$

RNA konsantrasyonlarının ölçümü yapıldıktan sonra, AAA hastalarında NLRP13 geninin ekspresyonunun belirlemek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Referans gen olarak, housekeeping gen olan GAPDH seçildi. Çalışmada bu amaçla Roche LightCycler 480 cihazı kullanıldı. RNA'lar 10 ng/uL olacak şekilde dilue edildikten sonra SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Kit kullanılarak Rt-pcr işlemi kontrol amaçlı 3 kez tekrarlandı. Rt-pcr işleminde kullanılan, son hacmi 20 μ l olacak şekilde oluşturulan mix karışımı aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.7: Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli karışım içeriği ve miktarları

Reagent	Hacim	Son konsantrasyon
2x SensiFAST™ SYBR®		
No-ROX One-Step Mix	10 μ l	1X
10 μ M Forward Primer	0.8 μ l	400 nM
10 μ M Reverse Primer	0.8 μ l	400 nM
Reverse transcriptase	0.2 μ l	
RiboSafe RNase Inhibitor	0.4 μ l	
H ₂ O	3.8 μ l	
Template	4 μ l	
20 μ l (Son Hacim)		

Tablo 3.8: Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri

Rt-PCR Basamakları	Sıcaklık -Süre	Döngü Sayısı
Renatürasyon	95 °C - 15 dk.	1
Denatürasyon	50 °C - 20 dk	1
	95 °C - 15 sn	
Amplification	55 °C - 30 sn.	40
	72 °C - 35 sn.	
Cooling	37 °C - 15 sn	1

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak yapıldı. Bu çalışmada GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı. Öncelikle araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edildi ve delta Ct (ΔCt) değeri hesaplandı. Sonrasında kontrol grubunun ΔCt değerleri, deney grubunun ΔCt değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri bulundu. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplandı.

- $\Delta Ct = Ct(\text{kontrol}) - Ct(\text{referans})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef}) - \Delta Ct(\text{kontrol})$
- Kat değişimi = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.3.5. Hasta ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, GeneAll Exgene™ DNA extraction kit kullanılarak üretici firma önerilerine uygun olarak değerlendirildi.

1. Bu amaçla 200 µl kan örneği ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerine 20 µl proteinaz K eklendi.
2. Daha sonra üzerine 200 µl BL buffer ilave edildi ve 5-10 sn. arasında homojenizatör yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlandı.
3. Daha sonra örnekler 56 °C’de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrası coloumn vial tüplere aktarılan örneklerin üzerine 200 µl absolute etanol eklenip vorteksledikten sonra 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
5. 600 µl BW buffer eklendi. 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. 700 µl TW buffer ilave edildi ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
7. Sıvının iyice uzaklaştığından emin olununca yeni bir ependorfa aktarılan örneklerin üzerine 50 µl treated su eklendikten sonra, metilasyon aşamasında kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.3.6. AAA remisyon/atak hastaları ve kontrol grubu bireylere ait NLRP13 hipermetilasyon durumunun araştırılması

Metillenmemiş ve metillenmiş sitozinleri ayırt etmek ve saptamak için genomik DNA'nın sodyum bisülfid dönüşümü, DNA metilasyon analizi için altın standarttır. Bisülfid dönüşümü, modifiye edilmemiş sitozinlerin urasile deaminasyonunu içerir ve modifiye edilmiş bazlar 5-mC ve 5-hmC'yi bırakır. Bu prosedürü daha sonra, gene özgü amplifikasyon veya tüm genom amplifikasyonunda her sitozinin metilasyon durumunu ortaya çıkarmak için PCR amplifikasyonu takip etmektedir. Referans genom ve bisülfid ile muamele edilmiş DNA arasındaki dizi bilgisinin karşılaştırılması, sitozin metilasyon modelleri hakkında bilgi sağlamaktadır.

Bu amaç kapsamında Zymoresearch marka EZ-DNA Methylation Lighting Kit kullanıldı. Deney protokolü aşağıdaki gibi kite uygun olarak gerçekleştirildi. İşleme başlamadan önce tüm DNA örneklerinin konsantrasyonları 5 µM olacak şekilde ayarlandı.

1. PCR tüpüne 20 ul DNA örneği eklendikten sonra üzerine 130 ul Lightning Dönüşüm Reaktifi eklendi. Vorteks yapıldıktan sonra yaklaşık 30 sn. santrifüjlendi.
2. PCR tüpünü bir termal döngüleyiciye yerleştirdikten sonra aşağıdaki adımları gerçekleştirildi:
 - 8 dakika 98 °C
 - 60 dakika 54 °C
3. Zymo-Spin TM IC Kolonuna 600 µl M-Bağlama Tamponu eklendi.

4. Termal döngüleyiciden alınan örnekler, M-Bağlama Tamponunu içeren Zymo-Spin™ IC Sütununa yüklendi. Kapağı kapatıldı ve sütün birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı.
5. 8.000 rpm’de 30 sn. santrifüjlendi. Toplama kolonuna inen sıvı atıldı.
6. Coloumn tüpe 100 µl M-Wash Buffer eklendi. 8.000 rpm’de 30 sn. santrifüjlendi. Toplama kolonuna inen sıvı atıldı.
7. Coloumn tüpe L-Desülfonasyon tamponundan 200 µl eklendi ve 20 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyondan sonra, 8.000 rpm’de 30 sn. santrifüjlendi.
8. Kolona M-Wash Buffer solüsyonundan 200 µl eklendi. 8.000 rpm’de 30 sn. santrifüjlendi. Bu yıkama adımı 2 kez tekrarlandı.
9. 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne sütun yerleştirildi ve doğrudan sütun matrisine 10 ul M-Elüsyon Tamponu ekleyin. DNA'yı elüe etmek için 30 saniye boyunca 10.000 rpm’de santrifüjlendi.
10. DNA örnekleri PCR işleminde kullanılmak üzere -80 °C’ye kaldırıldı.

3.3.7. Bisülfidit konversizasyonu uygulanan DNA örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonu

Reaksiyon Bileşenleri

Buz üzerine yerleştirilmiş olan PCR tüplerine tabloda belirtilen primeler kullanılarak aşağıda belirtilen oranlarda bileşenler eklendi.

Tablo 3.9: Reaksiyon Bileşenleri

BİLEŞEN	HACİM	SON KONSANTRASYON
10X Master Mix	25 µl	1X
Primer Revers (10 µM)	1 µl	0.1 µM – 0.5 µM
Primer Forward (10 µM)	1 µl	0.1 µM – 0.5 µM
template DNA	2 µl	<2 µg
dH ₂ O	Son hacim distile su ile 50 µl’ye tamamlanır.	

Termal Döngü

PCR işlemi öncesinde, PCR gradiyenti yapılarak optimum Tm değeri bulunup, döngüler ve ısı değerleri aşağıdaki tablodaki gibi optimize edildi.

Tablo 3.10: PCR döngüleri ve ısı değerleri

Pcr Basamakları	Sıcaklık -Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94 °C - 5 dk.	1
	94 °C - 30 sn.	
Çoğalma	59,2 °C - 30 sn.	34
	72 °C – 1 dk.	
Uzama	72 °C – 5 dk.	1

3.3.8. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerindeki M-NLRP13 ve U-NLRP13 primerlerine ait DNA bantlarının varlığı Agaroz Jel Elektroforez yöntemi kullanılarak belirlendi. 100 ml 1XTAE'nin içerisine 1,5 gr agaroz eklenerek, çözündürüldü. Çözeltinin içerisine 5 µl etidyum bromür eklendikten sonra 10 kuyucuklu tarak içeren jel kalıbına döküldü. Jel soğuduktan sonra, 1XTAE tamponu eklendi. Kuyucukların ilkine, 100 bç DNA ladder moleküler ağırlık standardından (VC) 5 µl eklendi. Diğer kuyucuklarda her bir DNA örneğinden 7 µl eklendi ve elektroforez yürütüldü. Hedef PCR ürünlerinin varlığını, 380-450 nm dalga boyundaki UV altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.3.9. Global DNA metilasyonu

DNA metilasyonunu (yani, 5-metilsitozin) tespit etmek için Zymoresearch marka 5-MC DNA ELISA Kit kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda deney aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Her örnek için 2 tekrar yapıldı.

Standartların Hazırlanması

DNA örneklerindeki 5-mC yüzdesini ölçmek için standart bir eğri oluşturulmalıdır. Bunun içinde, bilinen 5-mC yüzdesi standartlarını oluşturmak için Negatif Kontrol (100 ng / µl) ve Pozitif Kontrol (100 ng / µl) karışımları hazırlanarak yapıldı (aşağıdaki tabloda miktarlar gösterilmiştir). Bir PCR tüpüne her bir karışımdan 1 µl (yani 100 ng) eklendi ve

5-mC Kaplama Tamponu ile son hacim 100 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan standartlar, DNA örnekleri ile birlikte termal döngüleyici aşamasından itibaren birlikte kullanıldı.

Tablo 3.11: Standartların Hazırlanması

% 5-mC	Negatif Kontrol (100 ng/µl)	Pozitif Kontrol (100 ng/µl)
0%	10.0 µl	0 µl
5%	9.5 µl	0.5 µl
10%	9.0 µl	1.0 µl
25%	7.5 µl	2.5 µl
50%	5.0 µl	5.0 µl
75%	2.5 µl	7.5 µl
100%	0 µl	10.2 µl

DNA Kaplama

1. PCR tüplerine her DNA'dan 100 ng eklendi ve 5-mC Kaplama Tamponu ile son hacmi 100 µl'ye getirildi.
2. DNA örnekleri bir termal döngüleyicide 5 dk. boyunca 98 ° C'de denatüre edildi. Denatürasyondan sonra, örnekler hemen buza aktarıldı ve 10 dakika beklenildi.
3. Denatüre olmuş DNA'ları plaka kuyucuklarına eklendi, folyo ile kaplandı ve 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Bloklama

1. Tampon kuyucuklardan aspire edildi.
2. Her kuyucuk 3 kez 200 µl 5-mC ELISA Tamponu ile yıkandı. Her yıkamadan sonra tampon aspire edildi.

3. Her bir kuyucuğa 200 µl 5-mC ELISA Tamponu eklendi. Plakanın üzeri folyo ile kaplandı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

Antikor Eklenmesi

1. Tampon kuyucuklardan aspire edildi.
2. Aşağıdaki tabloya göre 5-mC ELISA Tamponunda Anti-5-Metilsitozin ve İkincil Antikordan oluşan bir antikor karışımı hazırlandı. (Antikorlar kullanıma kadar buz üzerinde bekletildi)

Tablo 3.12: Antikor Eklenmesi

	Dilüsyon	Hacim (µl)	Örnek
5-mC ELISA Tamponu	N/A	(# kuyucuk + 2) 100	2,000 µl
Anti-5-Metilsitozin	1:2,000	Buffer Vol. / 2,000	1 µl
İkincil Antikor	1:1,000	Buffer Vol. / 1,000	2 µl

3. Her kuyucuğa 100 µl bu antikor karışımından eklendi. Plaka folyo ile üzeri kaplandı ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.

Renk Gelişimi

1. Antikor karışımı kuyucuklardan aspire edildi.
2. Her kuyucuk 3 kez 200 µl 5-mC ELISA Tamponu ile yıkandı. Her yıkamadan sonra tampon aspire edildi.
3. Her kuyucuğa 100 µl HRP Developer eklendi. Oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Plaka okuyucu kullanarak 405-450 ve 600 nm'de absorbansı ölçüldü.

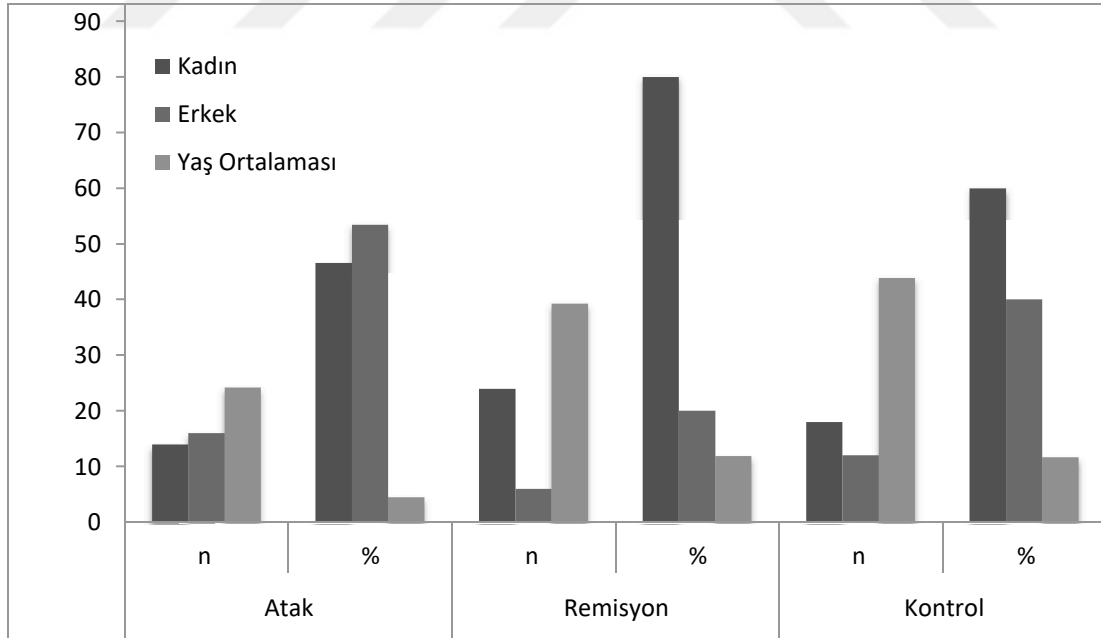
3.3.10. İstatiksel Analizler

Verilerin normal dağılımını kontrol etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal ve asimetrik değişkenlerin ortalamalarını karşılaştırmak için sırasıyla Student's t ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Sitokinler ile kaspaz-1 arasındaki korelasyonları ve klinik özellikleri araştırmak için Spearman korelasyon katsayısı testi kullanıldı. Epigenetik düzenleme ile sitokinler arasındaki ilişki de Spearman korelasyon katsayısı testi kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın genetik kısmı % 80 güç,% 5 hata payı ve 0,65 etki büyüklüğüne sahip 30 hasta ile çalışıldı. Tüm istatistiksel analizler SPSS 23.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapıldı ve grafikler GraphPad Prism sürüm 8.3.0 (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) kullanılarak oluşturuldu. Şekiller ve tablolarda iki kuyruklu p değerleri aşağıdaki şekilde belirtilmiştir: (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

4. BULGULAR ve YORUM

4.1. Atak ve Remisyon dönemi hastaların demografik verilerinin incelenmesi

Bu tez çalışması kapsamında, 30 atak ve 30 remisyon dönemi olmak üzere toplam 60 hasta ve 30 sağlıklı birey çalışmaya alındı. Hasta grubundaki tüm olgulara Tel-Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı konuldu. Atak dönemi hastaların 14’u kadın (%46,6), 16 tanesi erkek (%53,4) olgudan, remisyon dönemi hasta grubunun ise 24’u kadın (%80), 6 tanesi erkek (%20) olgudan ve sağlıklı kontrol grubu ise 18’si kadın (%60), 12’si erkek (%40) bireyden oluşmaktaydı. AAA atak ve remisyon dönemi hastalarının, çalışma anı yaş ortalaması sırasıyla, $24,2 \pm 4,5$ ve $39,3 \pm 11,9$ yıl olarak saptandı. Kontrol grubunun yaş ortalaması ise $43,9 \pm 11,7$ idi (Şekil 4.1). Atak ve remisyon grubunun çalışma anı yaş ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermekteydi ($p=0,003$, $p=0,024$, sırasıyla)



Şekil 4.1 Hasta ve Kontrol grubu bireylerin cinsiyet dağılımları

Atak ve remisyon dönemi hastaların, ortalama tanı alma yaşı $19,0 \pm 9,3$ ve $28,6 \pm 13,2$ yıl olarak saptandı ($p = 0.002$). Atak dönemi hastaların remisyon dönemine nazaran aylık ataklarının daha fazla olduğu saptandı ($p = 0.002$). Bu iki grubun BMI oranları karşılaştırıldığında ise atak dönemi hastalarda remisyona nazaran önemli bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.003$). Pras skoru (Pras vd., 1998) ile hesaplanan hastalık şiddeti, atak döneminde, remisyona nazaran anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.009$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Atak ve remisyon grubu olarak ayrılan hastalarının demografik özellikleri

	Atak (n=30)	Remisyon (n=30)
Tanı yaşı	19.0 ± 9.3^a	28.6 ± 13.2
Hastalık süresi	12.2 ± 9.0	10.7 ± 6.8
Atak sıklığı	2.1 ± 1.0^a	1.5 ± 0.7
BMI	22.2 ± 4.5^a	27.1 ± 3.9
Pras skoru	7.8 ± 2.5^a	6.8 ± 2.1
Kolşisin Dozu (mg/day) ^a	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.6
Aile Öyküsü, n (%)	16 (53.3)	11 (36.6)
Amiloidoz, n (%)	20 (66.6)	12 (40)
Veriler ortalama (standart sapma) veya ortanca olarak ifade edilmiştir. Kategorik değişkenler N (%) olarak verilmiştir. Normal dağılan değişkenler Student T, çarpık dağılımda Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır (*: $p < 0.05$)		
a: Atak ve remisyon grubu arasında $p < 0.05$ 'den anlamlı farklılık		

AAA atak hastalarının % 16,6'sı (5/30) heterozigot, % 36,6'sı (11/30) homozigot, % 30,0'u (9/30) compound heterozigottu ve hastaların % 13,3'ünde (4/30) mutasyon bulunmadı. Remisyon dönemi hastalarda ise % 36.6 (11/30) heterozigot, % 13.3 (4/30) homozigot, % 33.3 (10/30) compound heterozigot vardı ve hastaların % 16.6 (5/30) mutasyon bulunmadı. Hastaların genetik verilerinde atak hastalarının %46,6'sında M694V alelli bulunduğu ve hastaların çoğunlukla heterozigot allel (%46,6) taşıdığı görüldü. MEFV mutasyonları çoğunlukla 10.ekzonda görülmektedir. Çalışmada atakla gelen hastaların çoğunluğunda (%60, n:18) 10.ekzon mutasyonu saptandı, ekzon 2 taşıyan (%40,0 n:10) hasta bulunmaktaydı. Remisyon dönemi hastaların ise %43,3'ünde M694V alelli bulunduğu ve hastaların heterozigot allel (%69,9) taşıdığı görüldü. Remisyon hastalarının çoğunluğunda (%50, n:15) 10.ekzon mutasyonu saptandı, ekzon 2 taşıyan (%30,0 n:9), ekzon 5 taşıyan

(%3,3, n:1) hasta vardı. Hastalarda gözlenen MEFV geninin varyantları Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2 Atak ve Remisyon dönemi hasta gruplarına ait gen varyantları

Mutasyon tipi	Atak (n=30)	Remisyon (n=30)
Heterozigot, n (%)	5 (16.6)	11 (36.6)
Homozigot, n (%)	11 (36.6)	4 (13.3)
Compound heterozigot, n (%)	9 (30)	10 (33.3)
Normal, n (%)	4 (16.6)	5 (16.6)
M694V HOM.	2	2
M694V HET.	5	3
M694V HET. / A744S HET.	-	1
M694V HET. / M680I HET.	-	2
M694V HOM. / R202Q HOM.	1	-
M694V HOM. / R202Q HET.	1	-
M694V HET. / R202Q HET.	2	1
M694V HET. / V726A HET.	3	3
M694V HET. / E148Q HET. / V726A HET.	-	1
V726A HET. / E148Q HET.	1	-
R2020Q HET. / V726A HET.	-	1
V726A HET. / E148Q HET. /A744S HET.	1	1
A744S HET.	-	1
M680I HOM.	3	-
E148Q HOM.	3	1
E148Q HET.	1	4
R202Q HOM.	3	1
R202Q HET.	-	2
F479L HET.	-	1

4.2. Atak ve Remisyon dönemi hastaların klinik bulgularının incelenmesi

AAA atak hastalarında en sık gözlenen semptomlar sırası ile 22 (%73,3) hastada ateş, 26 (%86,6) hastada tekrarlayan karın ağrısı ve 18 (%60) hastada eklem ağrısı idi. Sık gözlenen bu 3 semptomun yanında daha az sıklıkta karşılaştığımız artrit, göğüs ağrısı, artrit ve miyalji bulunmaktaydı. Remisyon dönemindeki AAA hastalarında ise karın ağrısı (% 76,6) ve eklem ağrısının (% 66,6) gözlenme oranı fazlaydı.

AAA atak ve remisyon dönemi hastalar arasında WBC, nötrofil, CRP ve fibrinojen seviyelerinde de önemli farklılıklar vardı ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.036$, sırasıyla). Bununla birlikte, NLR oranı hem AAA atağında hem de remisyonunda sağlıklı bireylere göre daha yüksekti ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, sırasıyla). Ayrıca remisyon dönemi hastaların ESR miktarının kontrole anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptandı göre ($p = 0,0216$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Atak ve remisyon dönemi hastalara ait klinik bulgular

Klinik Bulgular	Atak (n = 30)	Remisyon (n = 30)	Kontrol (n=30)
Ateş, n (%)	22 (73.3) ^b	16 (53.3)	-
Karın Ağrısı, n (%)	26 (86.6)	23 (76.6)	-
Göğüs Ağrısı, n (%)	14 (46.6)	10 (33.3)	-
Eklem Ağrısı, n (%)	18 (60)	20 (66.6)	-
Artrit, n (%)	13 (43.3)	9 (30)	-
Myalji, n (%)	9 (33.3)	10 (33.3)	-
Splenomegali, n (%)	1 (3.3)	0	-
WBC 10t/mL	10.8 (5.2 - 26.9) ^{a,b}	7.3 (4.3 - 11.9)	6.8 (4.3 - 11.3)
Lenfosit	1.9 (0.9 - 4.8)	2.1 (0.9 - 3.1)	2.2 (1.2 - 5.0)
Nötrofil	8.2 (3.0 - 24.5) ^{a,b}	4.5 (1.6 - 9.8)	3.9 (2.0 - 6.5)
NLR, %	3.8 (1.1 - 26.9) ^{a,b}	0.5 (0.09 - 1.3) ^c	1.4 (1.0 - 4.8)
ESR, mm/h	14.5 (9.0 - 65.0)	13.0 (5.0 - 43.0) ^c	11.0 (2.0 - 49.0)
CRP, mg/L	25.4 (0.1 - 199.3) ^{a,b}	2.2 (0.2 - 42.1)	1.8 (0.1 - 12.0)

Veriler ortalama (standart sapma) veya ortanca olarak ifade edilmiştir. Kategorik değişkenler N (%) olarak verilmiştir. Normal dağılan değişkenler Student T, çarpık dağılımda Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır (*: $p \leq 0.05$)

a: Atak ve kontrol grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

b: Atak ve remisyon grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

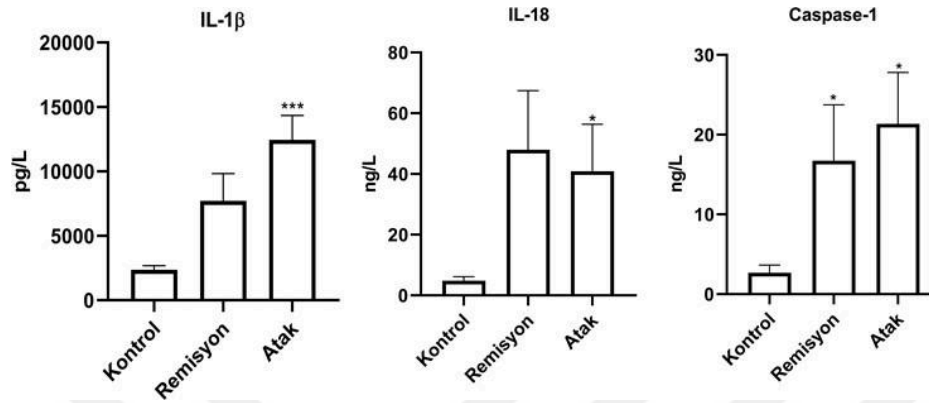
c: Remisyon ve kontrol grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

NLR: Nötrofil-Lenfosit oranı; ESR: Eritrosit sedimentasyon oranı; CRP: C-reaktif protein.

4.3. Serum Sitokin Düzeyleri ile Klinik Bulgular Arasındaki İlişki

AAA atak hastalarında serum IL-1 β konsantrasyonları ($p = 0.001$), kontrol grubundan anlamlı derecede yüksekti. Ayrıca AAA atak hastalarının IL-18 ($p = 0.043$), kaspaz-1 ($p = 0.021$) seviyeleri sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak farklılık gösterdi (Şekil 4.2). Sonuçlar, serum IL-1 β ve kaspaz-1 seviyelerinin AAA ataklarında birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. AAA remisyon hastalarında ise serum IL-1 β ($p = 0.075$) ve IL-

18 ($p = 0.516$) seviyelerinde artışa doğru bir eğilim kaydedilirken, istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Ancak remisyon dönemi hastalarında sınırda da olsa kaspaz-1 seviyesinde anlamlı bir fark gözlemlendi ($p = 0.049$) (Tablo 4.4).



Şekil 4.2 AAA hasta ve kontrol grubuna ait IL-1β, IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri

Tüm hastaların serum sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık SPSS - Mann Whitney U testi kullanılarak hesaplandı. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

Tablo 4.4 Atak ve remisyon dönemi sitokin seviyeleri

Sitokin	Atak (n = 30)	Remisyon (n = 30)	Kontrol (n=30)
IL-1β, pg/mL	11750.0 (3178 - 25054.0) ^a	4063.0 (1210.0 - 18029.0)	2117.0 (1254.0 - 4180.0)
IL-18, ng/mL	13.6 (2.4 - 140.9) ^a	4.2 (2.6 - 139.9)	5.3 (0.1 - 14.64)
Kaspaz-1, ng/mL	3.8 (1.0 - 60.6) ^a	1.9 (1.1 - 50.8) ^c	1.1 (0.7 - 4.7)

Veriler ortalama (standart sapma) veya ortanca olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel değerlendirme Mann Whitney U testi ile yapılmıştır.

a: Atak ve kontrol grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

b: Atak ve remisyon grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

c: Remisyon ve kontrol grubu arasında $p \leq 0.05$ 'den anlamlı farklılık

Ek olarak, bu sitokinlerin kendi aralarında ve hastaların klinik bulguları arasındaki ilişkisini değerlendirmek için bir Spearman korelasyon analizi yapıldı. AAA atak hastalarında IL-1β ile akut faz reaktan ESR ($r = 0.710$, $p = 0.01$), CRP ($r = 0.550$, $p = 0.05$,

sırasıyla) arasında korelasyon gözlemlendi. Ayrıca, AAA atak hastalarında IL-1 β , lenfosit ve pras skoru ($r = -0.500$, $p = 0.008$, $r = 0.570$, $p = 0.004$) arasında da anlamlı bir korelasyon gözlemlendi (Tablo 20). AAA remisyon hastalarının klinik parametreleri ile IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 arasında bir ilişki bulunmadı (Tablo 4.5).

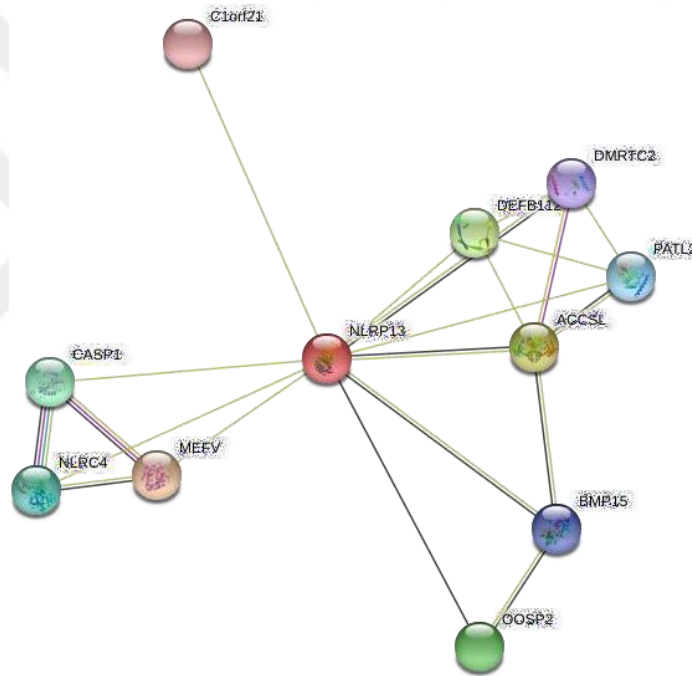


Tablo 4.5 Atak ve Remisyon dönemi hastalarda sitokinler ve klinik bulgular arasındaki ilişkisi

	Kontrol						Remisyon						Atak					
Laboratuar Bulguları	Caspase-1		IL-18		IL-1 β		Caspase-1		IL-18		IL-1 β		Caspase-1		IL-18		IL-1 β	
	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r_s</i>
WBC	0.61	0.19	0.25	-0.41	0.87	0.07	0.71	0.14	0.21	0.43	0.86	-0.07	0.22	0.36	0.58	0.2	0.69	0.12
Lenfosit	0.53	0.22	0.43	-0.28	0.35	-0.33	0.9	0.05	0.33	0.34	0.55	0.21	0.87	-0.05	0.97	-0.02	0.08*	-0.5
Nötrofil	0.84	-0.08	0.92	0.04	0.71	0.14	0.92	0.04	0.56	0.21	0.65	-0.17	0.31	0.3	0.97	-0.02	0.49	0.21
NLR	0.51	-0.24	0.37	0.32	0.15	0.49	0.9	-0.05	0.75	0.12	0.7	0.14	0.87	0.05	0.81	0.09	0.15	0.43
ESR	0.58	-0.2	0.03	-0.71	0.95	0.02	0.83	0.08	0.86	0.07	0.68	0.16	0.65	0.15	0.64	0.17	0.01*	0.71
CRP	0.84	0.08	0.92	-0.04	0.08	0.59	0.12	-0.52	0.28	-0.38	0.1	-0.55	0.81	-0.07	0.81	0.09	0.05*	0.55
Pras Skor							0.35	-0.33	0.46	-0.26	0.21	-0.43	0.14	0.43	0.63	0.17	0.04*	0.57
Spearman Korelasyon Analizi. * = $p < 0.05$ 'den anlamlı farklılık																		

4.4. NLRP3 İlişkili Proteinlerin Biyoinformatik Analizi

STRING analizi ile NLRP3 geninin AAA hastalığına neden olan MEFV geni ile ilişkisi olup olmadığı incelendi. Elde edilen analiz sonuçlarına göre NLRP3 proteinin, 1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat Sentaz Benzeri (ACCSL), Doublesex ve Mab-3 ile İlgili Transkripsiyon Faktörü C2 (DMRTC2), Kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15) ve Oosit Salgılanan Protein 2 (OOSP2A) proteinleri ile doğrudan fonksiyonel bir bağlantıya sahip olduğu saptandı. Ayrıca, NLRP3'ün CASP1 ve MEFV ile de bir ilişkisi olduğu fakat bu etkileşimin hangi yollar üzerinden yapıldığının veya nasıl bir etkiye sahip olduğunun bilinmediğini saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 NLRP3 ile karşılaştırmalı fonksiyonel olarak ilişkili proteinlerin STRING analizi.

Bilinen etkileşimler açık mavi ve pembe çizgilerle gösterilirken, tahmin edilen etkileşimler diğer renklerle gösterilmiştir.

4.5. Hasta ve kontrol grubu bireylerin hypometilasyon seviyeleri

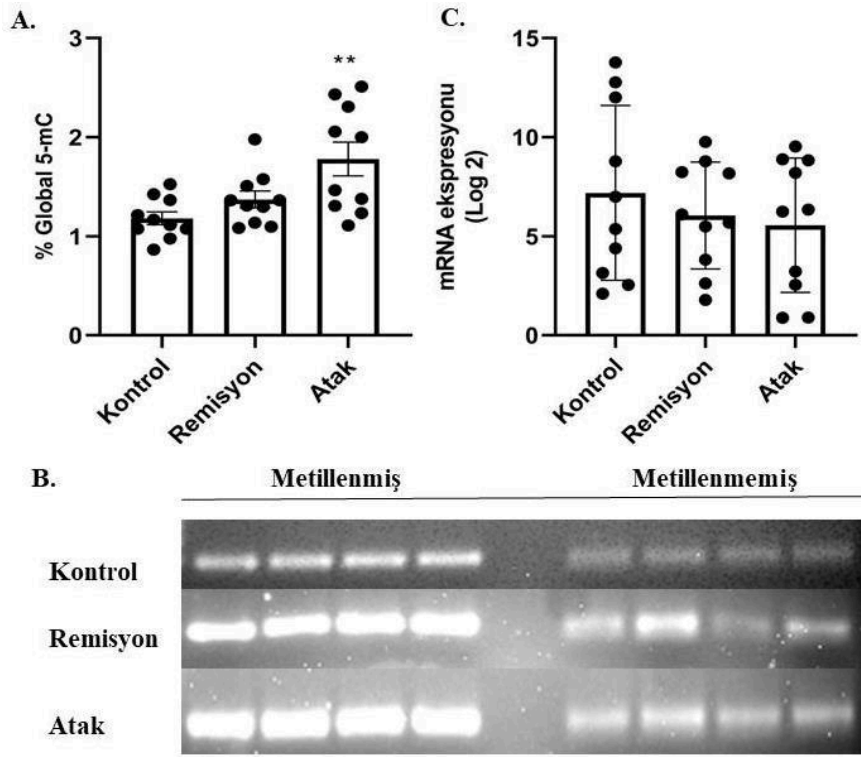
Bu amaçla ilk olarak atak ($n = 10$), remisyon ($n = 10$) ve kontrol grubu ($n = 10$) bireylerinin, global metilasyon durumu, ELISA bazlı 5-mC DNA kiti kullanarak değerlendirildi. Veriler, global metilasyon düzeylerinin atak ($p = 0.008$) ve remisyon ($p = 0.373$) dönemi hastalarının kontrole kıyasla arttığını gösterdi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Hasta ve kontrol grubu gen ekspresyon ve global metilasyon seviyeleri

	Atak	Remisyon	Kontrol
	(n = 10)	(n = 10)	(n=10)
NLRP13 expression	5.89 (1.78, 9.7)	6.2 (0.8 - 9.5)	6.1 (2.1 - 13.7)
Global methylation	0.5 (0.44, 1.36)**	1.3 (1.0 - 1.9)	1.1 (0.8 - 1.5)

4.6. AAA Hasta ve Kontrol Grubunun NLRP13 Ekspresyonunun, Promoter Hipermetilasyonu İle İlişkisi

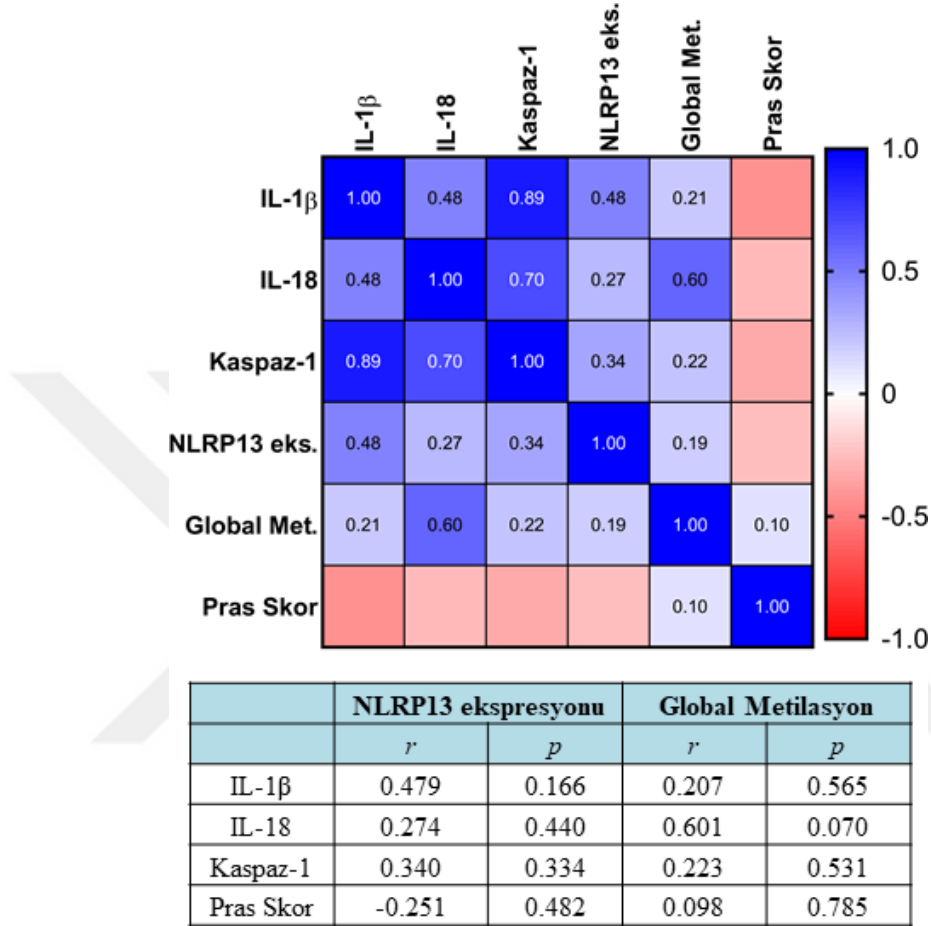
Metillenmeye özgü PCR analizinde, NLRP13'ün, kontrollere kıyasla atak ve remisyon dönemi hastalarında yüksek oranda metillendiğini gözlemlendi. Ayrıca AAA hastalarında NLRP13'te DNA metilasyonundaki bir artışın bu gen transkript ekspresyonunu değiştirip değiştirmediğini belirlemek istedik. Bu amaç doğrultusunda, atak (n = 10), remisyon (n = 10) ve kontrol (n = 10) grubu hastaların total RNA'sı izole edildi ve NLRP13'ün mRNA ekspresyonunun gruplar arası değişimi incelendi. qRT-PCR sonuçlarımız, NLRP13 transkript ekspresyon seviyesinin, kontrollere kıyasla atak ve remisyon dönemi hastalarda azaldığını ortaya çıkardı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Hasta ve kontrol grubu bireylerin NLRP13 hipermetilasyonunun gen ekspresyon profili ile ilişkisi.

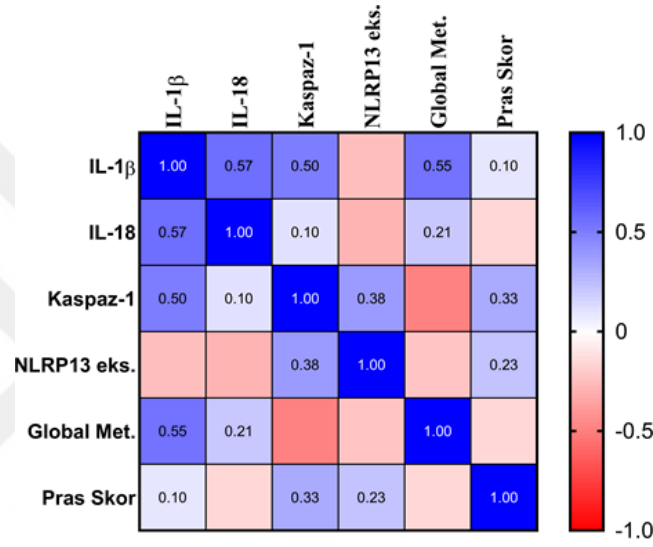
A. Grupların hypometilasyon seviyeleri **B.** NLRP13 geninin atak, remisyon ve kontrol grubu arasındaki hipermetilasyon seviyelerinin karşılaştırılması **C.** Gruplar arası metillenme düzeylerinin bisülfüt konverzasyon yöntemiyle tayini . Global metilasyon düzeyleri 5-mC ELISA kit kullanılarak belirlendi. Gen ekspresyon seviyeleri “materyal-metot” kısmında açıklandığı gibi primer setleri kullanılarak qPCR analizi ile ölçüldü. Tüm genler GAPDH geni referans alınarak normalize edildi. Analiz için Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1’e eşitlendi. Hata çubukları +SEM değerini göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık SPSS - Mann Whitney U testi kullanılarak hesaplandı. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

AAA remisyon dönemi hastalarında karşılaştırılan parametreler şekil 12’de sunulmuştur. Elde edile verilere göre; IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri ile NLRP13 ekspresyonu ve global hipometilasyon seviyeleri arasında herhangi bir ilişki gözlemlenmedi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 AAA remisyon dönemi hastalarına ait korelasyon analizi (Spearman korelasyon analizi)

AAA atak dönemi hastalarına ait IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri ile NLRP13 ekspresyonu ve global hipometilasyon seviyeleri Spearmann korelasyon analizi ile test edildi. Elde edilen sonuçlara göre AAA atak hastalarında, NLRP13 ile ilgili sitokinler arasında bir ilişki gözlemlenmezken, artan IL-1 β salınımı ve global metilasyon düzeyi arasında orta düzeyde ve anlamlı bir ilişki gözlemlendi. Ayrıca kaspaz-1 seviyesinin de hypometilasyon ile negatif bir korelasyona sahip olduğu saptandı (Şekil 4.6).



	NLRP13 ekspresyonu		Global Metilasyon	
	r	p	r	p
IL-1 β	-0.249	0.289	0.547	0.013*
IL-18	-0.297	0.204	0.212	0.369
Kaspaz-1	0.382	0.097	-0.491	0.028*
Pras Skor	0.235	0.319	-0.155	0.514

Spearmann korelasyon analizi, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Şekil 4.6 AAA atak dönemi hastalarına ait korelasyon analizi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), nötrofiller, eozinofiller ve sitokinlerle aktive olan monositlerde eksprese edilen sensör protein pirini kodlayan MEFV mutasyonları ile karakterizedir. AAA, çoğunlukla otozomal resesif bir kalıtım gösterir ve lokusun her iki allelinde de mutasyonlar olması gerekir. (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Fakat MEFV alleli için heterozigot olan, tek bir alelde mutasyon gösteren veya daha nadir durumlarda saptanabilir bir mutasyon göstermeyen ve yine de hastalığın gelişimi ile ilişkili olan AAA vakaları da bildirilmiştir (Ben-Chetrit & Touitou, 2009; Sari vd., 2014). Bu tür mutasyonsuz hastaların varlığı, alternatif genlerde meydana gelen mutasyonlar veya epigenetiğin hastalık gelişimine katkı sağladığını düşündürmektedir (Sari vd., 2014). Bu değişikliklerin belirlenmesi, hastalığın tanı ve tedavisinde büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, MEFV, pro-inflamatuar sitokin olan IL-1 β üretimini düzenleyen inflamazom kompleksinin bir elemanını oluşturan pirini kodladığı için, inflamazomapati sınıfına girmektedir (Tartey & Kanneganti, 2020). Pirinin uygun uyarıcı yoluyla, inflamazom ile birleşmesi, kaspaz-1'in aktivasyonuna ve IL-1 β , IL-18'in salınmasına yol açar. Bu süreçte önemli bir adım, ASC'nin pirin'e kazandırılmasıdır. ASC, N-terminal PYD alanı aracılığıyla, homotipik etkileşime girer ve bu da ASC beneklerini indükler. Daha sonra, pro-kaspaz-1, ASC'nin kaspaz alım alanı (CARD), pro-kaspaz-1'in CARD alanı ile etkileşimi yoluyla beneklere alınır. Pro-kaspaz-1 moleküllerinin kümelenmesi, kaspaz aktivitesinin indüklenen bir otoproteolitik indüksiyonunu teşvik eder (Lamkanfi & Dixit, 2014; Surace & Hedrich, 2019). Pro-kaspaz-1'in otoklavajı, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i olgun formlarına işleyen aktif kaspaz-1 p10/p20 tetramerinin oluşumuna yol açar. Pirin inflamazomunu düzenleyen moleküler mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalar, AAA'nin patogenezi ve MEFV'deki mutasyonların aşırı inflamazom aktivasyonuna nasıl yol açabileceğini dair kısıtlı bilgiler sunmaktadır. Örneğin, Van Gorp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, AAA ile ilişkili mutasyonların, ASC'nin mikrotübülünden bağımsız oligomerizasyonuna izin verdiğini ve bu nedenle, mikrotübül ile ilgili sinyaller olmaksızın ASC bağlanması ve inflamazom oluşumu için pirini hazırladığını göstermektedir (Van Gorp vd., 2016). Ayrıca diğer otoinflamatuar hastalıklarda disfonksiyonel epigenetik mekanizmaların rolleri araştırılmış, NALP3 veya NLRP3 gibi inflamazom komplekslerinin, bu hastalıkların patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Campbell vd.,

2016; Jamilloux vd., 2018). Örneğin, NLRP3'teki mutasyonlar CAPS hastalığının, NALP3 inflamazomunun ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler TRAPS hastalığının patogeneğinde rol oynamaktadır (Surace & Hedrich, 2019).

Son yıllarda inflamazomlar ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmış olmasına rağmen, otoinflamatuvar hastalıklar üzerindeki etkilerine dair bilgiler oldukça kısıtlıdır. NLRP13, piroptotik hücre ölümünde rol oynayan ve pirin domaini taşıyan inflamazomlar arasında yer almaktadır. Literatürde NLRP13 ile ilgili bilgi oldukça kısıtlıdır ve NLRP13 geninin hastalıklarda nasıl bir etkiye sahip olduğu hakkında ayrıntılı bilgiler vermemektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, NLRP13'ün inflamasyon uyarılması veya baskılanması üzerinde etkili olduğu ve immün ayrıcalığın en önemli bölgeleri arasında; plasenta ve testislerde ifade edildiğini göstermiştir (Grøndahl vd., 2013). Yaptığımız bu çalışma ile inflamazomların tetiklenmesinde rol alan IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1'in, AAA remisyon ve atak dönemi hastalarındaki değişimlerinin hastalık şiddeti ile ilişkisini, subklinik dönemde biyomarker olma potansiyelleri incelendi. Ayrıca, NLRP13 geninin, AAA hastalığında rolü ve epigenetik olarak düzenlenmesine dair kanıtlar sunuldu.

Çalışmamıza, Acil polikliniğe AAA şikayeti ile gelen ve atak başlangıcından itibaren 72 saat içinde başvuran 30 birey, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon polikliniğine gelen; son ataktan en az 2 hafta geçmiş ataklar arası intervalde olan 30 birey ve herhangi bir AAA öyküsü ve otoinflamatuvar bir hastalığı olmayan 30 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların, cinsiyet dağılımları birbirlerine yakın bulundu. Yapılan araştırmalar, AAA hastalarının yaklaşık %90'ında hastalık başlangıç yaşının <20 yıl olduğunu ortaya koymuştur. Ancak genel tanıda ortalama 10 yıla yakın bir gecikme görülmektedir. 2020 yılında Bodur ve arkadaşlarının, 979 hasta ile yaptığı kesitsel kohort çalışmasında, semptom başlangıcındaki ortalama yaş 18.64 ± 11.17 yıl olarak tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da genel tanıyla uyumlu olarak, semptomların başlama yaşı ortalaması atak dönemi hastalarda, 19.0 ± 9.3 yıl, remisyon dönemi hastalarda ise 12.2 ± 9.0 yıl olarak tespit edildi. Çalışmamızda, atak dönemi hastaların, remisyon dönemine nazaran aylık ataklarının daha fazla olduğu saptandı. Bu iki grubun BMİ oranları karşılaştırıldığında ise atak dönemi hastalarda remisyon dönemine nazaran önemli bir düşüş gözlemlendi. Pras skoru (Pras vd., 1998) ile hesaplanan hastalık şiddeti, atak döneminde, remisyon dönemine nazaran anlamlı derecede yüksekti.

AAA'dan sorumlu olan MEFV geninde etnik köken farketmeksizin en sık rastlanan mutasyonlar M680I, M694V, V726A ve M694I'dır. Yine ülkemizde yayınlanan birçok çalışmada da M694V mutasyonlarının, AAA hastalarında en çok görülen mutasyon tipi olduğu bildirilmiştir. Çalışma grubuna dahil edilen AAA atak hastalarının, % 16,6'sı (5/30) heterozigot, % 36,6'sı (11/30) homozigot, % 30,0'u (9/30) compound heterozigottu ve hastaların % 13,3'ünde (4/30) mutasyon bulunamadı. Remisyon dönemi hastalarda ise % 36,6 (11/30) heterozigot, % 13,3 (4/30) homozigot, % 33,3 (10/30) compound heterozigot vardı ve hastaların % 16,6 (5/30) mutasyon bulunmadı. Hastaların genetik verilerinde atak hastalarının %46,6'sında M694V alelli bulunduğu ve hastaların çoğunlukla heterozigot allel (%46,6) taşıdığı görüldü. MEFV mutasyonları sıklıkla 10. ekzonda görülmektedir (Ben-Chetrit & Touitou, 2009). Çalışmamızda da atakla gelen hastaların çoğunluğunda (%60, n:18) 10. ekzon mutasyonu saptandı, ekzon 2 taşıyan (%40,0 n:10) hasta bulunmaktaydı. Remisyon dönemi hastaların ise %43,3'ünde M694V alelli bulunduğu ve hastaların heterozigot allel (%69,9) taşıdığı görüldü. Remisyon hastalarının çoğunluğunda yine (%50, n:15) 10.ekzon mutasyonu saptandı, ekzon 2 taşıyan (%30,0 n:9), ekzon 5 taşıyan (n:1 %3,3) hasta vardı.

Araştırmalar, AAA atakları sırasında semptom sıklığını sırasıyla ateş, peritonit, artrit, plörit ve erzipel benzeri eritem şeklinde olduğunu bildirmiştir (Ben-Zvi & Livneh, 2011). Çalışma grubumuzda da yine ataklar sırasında en sık görülen semptomlar 22 (%73,3) hastada ateş, 26 (%86,6) hastada tekrarlayan karın ağrısı ve 18 (%60) hastada eklem ağrısı şeklindeydi. Sık gözlenen bu 3 semptomun yanında daha az sıklıkta karşılaştığımız artrit, göğüs ağrısı, artrit ve miyalji bulunmaktaydı. Remisyon dönemindeki AAA hastalarında ise karın ağrısı (% 76,6) ve eklem ağrısının (% 66,6) gözlenme oranı fazlaydı. Gözlemlediğimiz bu bulgular literatür ile karşılaştırıldığımızda benzer sonuçlar aldığımızı gösterdi. Ayrıca AAA atak döneminde, WBC, nötrofil, CRP seviyeleri remisyon ve kontrole göre yükseldiği görüldü. Ancak NLR oranı, hem AAA atağında hem de remisyon döneminde kontrole göre daha yüksekti. Başaran ve ark.'nın yaptıkları retrospektif çalışmada NLR değerlerini atak dönemindeki AAA hastalarında, remisyon ve kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (Basaran vd.,2017). Uslu ve arkadaşları ise remisyon dönemindeki AAA hastalarının kontrole nazaran yüksek NLR oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir (Uslu vd., 2013). Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamız

AAA hastalığının değerlendirilmesinde NLR oranının, diğer parametreler ile birlikte hastalık tanısında kullanılabileceğini göstermektedir.

Hasta gruplarının inflamazom ilişkili proinflamatuvar sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında, AAA atak hastalarının, IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri sağlıklı bireylere nazaran arttığı gözlemlendi. Ayrıca, atak hastalarında IL-1 β ile hastalık şiddeti, nötrofil, ESR ve CRP seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlemlendi. Ek olarak, remisyon dönemi hastalarında da IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyelerinde kontrole göre artış gözlenmiş olmasına rağmen sadece kaspaz-1 seviyesinde anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. AAA remisyon dönemi hastalarında IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleri ile CRP, ESR gibi inflamatuvar belirteçler arasında bir ilişki gözlemlenmedi. Notarnicola ve arkadaşları TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8'in transkripsiyonel sitokin ekspresyon seviyelerini araştırmış ve remisyon döneminde kontrole nazaran daha yüksek sitokin ekspresyonu bulmuşlardır (Notarnicola vd., 2002). Yıldırım ve ark., AAA hastalarında yine kontrole nazaran artan serum IL-1 β seviyesi gözlemlemişlerdir. (Yıldırım ve ark., 2012a) Deneysel ve klinik kanıtlar, IL-1 β 'nin AAA patogenezindeki önemli rolünü desteklesede atakları tetikleyen parametreler halen araştırılmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda AAA atak hastalarında artmış IL-1 β düzeyi hastalık şiddeti, nötrofil, ESR ve CRP ile pozitif korelasyon gösterdi. AAA ataklarında ESR, CRP ve SAA gibi inflamatuvar mediyatör düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Yine remisyon aralıklarının % 34'ünde yüksek APR bildirilmiştir (Korkmaz ve ark., 2002) Bu bulgular, nötrofillerin, hastalığın ilerlemesini sağlayan kandaki IL-1 β kaynağı olduğunu ve artan CRP ve ESR düzeylerinin bu ilerlemeye aracılık ettiğini desteklemektedir (Soriano ve diğerleri, 2013).

Ayrıca yaptığımız çalışmada, AAA atak döneminde IL-18 seviyesinde de bir artış gözlemlendi. Fakat, atak ve remisyon döneminde IL-18 ile hastalık şiddeti veya akut faz yanıtı arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. AAA hastalarında serum IL-18 düzeylerini araştıran birkaç çalışma birbirinden farklı sonuçlar bulmuşlardır. Bazı çalışmalarda, AAA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek IL-18 düzeyleri saptanırken (Novick vd., 2013; Wada vd., 2018). Bazı çalışmalarda IL-18 seviyelerini ve hastalık aktivitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Haznedaroğlu vd. ve Simsek vd.). Gohar ve ark. ise AAA atak ve remisyon dönemi hastalarında hastalık şiddeti ve IL-18 seviyesi ile bir korelasyon gözlemlemiştir (Gohar ve diğerleri, 2016). Bu sonuçlar, IL-18'in AAA

hastalarının hastalığın ilerlemesinde belirgin bir rol oynadığını gösterse de bunu doğrulamak için daha uzun vadeli prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

AAA hasta ve kontrol grubunun serum kaspaz-1 seviyelerine gelindiğinde ise, hem atak hemde remisyon dönemi hastalarda kontrole nazaran bir artış gözlemlendi. Ancak klinik parametrelerle bir korelasyon görülmedi. Bazı çalışmalar, pirinin, kaspaz-1 aktivitesini, N-terminal ucunun, inflamazomda anahtar bir molekül olan ASC ile etkileşimi yoluyla inhibe edebileceğini göstermektedir. (Chae ve diğerleri, 2008; Moghaddas ve diğerleri, 2017). Ayrıca, aktive edilmiş pirinin ASC ile etkileşime girdiğini ve kaspaz-1'i aktive ettiğini ve ardından aktif IL-1 β sekresyonuna yol açtığını gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2006). Sonuç olarak, kaspaz-1 tarafından aşırı IL-1 β üretimi, AAA'de epizodik ateş ve inflamatuvar bulguların ana nedenidir. (Apostolidou ve ark., 2016) Sonuçlarımız, AAA hastalarında kaspaz-1 düzeylerinin yükselmesinin, remisyon döneminin subklinik inflamasyonunun izlenmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, AAA hastalığının tanısında IL-1 β ve kaspaz-1 sitokin düzeylerinin birlikte değerlendirilmesine katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, sonuçlarımız IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1'in bir hastalık aktivitesi belirteci olarak önemini desteklemekte ve proinflamatuvar sitokinlerin longitudinal incelemesinin, AAA hastalarının daha iyi takip edilebilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

AAA'nin klinik penetrasyonları değişkenlik göstermekte olup, epigenetik, çevresel ve genetik faktörler hastalığın ortaya çıkmasına ve hastalık patogenezinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır (Álvarez-Errico vd., 2017; Ben-Chetrit & Touitou, 2009). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, CpG bölgelerinin metilasyon seviyelerini değiştirerek gen ekspresyonunu etkilemektedir (Cacan vd., 2014; Jones, 2012). Yapılan çalışmalar, inflamazom bağımlı NLRP3'ün (Jamilloux vd., 2018), MEFV ekson-2 metilasyonunun (Kirektepe vd., 2011) veya miRNA ile ilişkili pirin mutasyonlarının AAA patogenezinin etkilediğini bildirmişlerdir (Akkaya-Ulum vd., 2017). Bu gözlemler, AAA'nın gen transkripsiyonunda, inflamazomlar gibi ek mekanizmaların rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmamızın bu aşamasında, epigenetik değişikliklerin ve NLRP13 inflamazomunun, AAA hastalık patogenezin bir parçası olup olmadığı araştırılmış ve gen regülasyonundaki değişikliklerin inflamazomla ilişkili sitokinler üzerindeki etkisini değerlendirilmiştir. Bu

bağlamda ilk olarak, STRING analizi ile NLRP13 geninin AAA hastalığına neden olan MEFV geni ile ilişkisi olup olmadığı incelendi. Elde edilen analiz sonuçlarına göre NLRP13 geninin ACCSL, DMRTC2, BMP15 ve OOSP2A genleriyle doğrudan fonksiyonel bir bağlantıya sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, NLRP13'ün kaspaz-1 ve MEFV ile de bir ilişkisi olduğu fakat bu etkileşimin hangi yollar üzerinden yapıldığının veya nasıl bir etkiye sahip olduğunun bilinmediğini saptandı. MEFV geni ve NLRP13 arasında bir ilişki olduğu saptandıktan sonra, AAA (atak/remisyon) ve kontrol grubu bireylerin, NLRP13 gen ekspresyon seviyeleri, DNA hipermetilasyon ve global DNA hipometilasyon durumları karşılaştırıldı. DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların gen ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir. Bir genin promotör bölgesinin hipermetilasyonu, gen ekspresyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını doğrudan bloke etmekte, böylece ekspresyon kaybını veya gen sessizliğini sağlamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, NLRP13 ekspresyonundaki azalmanın NLRP13 geninde meydana gelen hipermetilasyondan kaynaklandığı saptandı. Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi (Ali vd., 2013; Robertson & Jones, 2000), artan metilasyon patternlerinin azalan ekspresyon ile ilişki olduğu gözlemlendi (Poli vd., 2020; Surace & Hedrich, 2019). DNA metilasyonunda, en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardan biride, 5-metilsitozin oluşturmak üzere bir grup enzim DNA metiltransferaz tarafından sitozinin C-5 pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesidir. Bu reaksiyon, yalnızca CG dinükleotid dizisi (CpG adaları) bakımından zengin gen promotör bölgelerinde meydana gelmektedir (Muhammad vd., 2019). Global DNA metilasyonun, hipermetilasyon kadar hastalıkların ilerlemesinde rolü olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Kuchiba vd., 2014; Nan vd., 2013; Robertson & Jones, 2000). Ayrıca, global DNA hipometilasyonun artan mutasyon oranı, artan genom kararsızlığı, bozulmuş epigenetik susturma ve interferon yollarının aktivasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Duan vd., 2021). Sonuçlarımıza göre AAA atak ve remisyon dönemi hastalarda artan hipometilasyonun hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu ve doğru tedavi ile tedavi edilen hastalarının hipometilasyon seviyesindeki düşüşün, sağkalımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olacağı düşünülmektedir. Fakat bu konu hakkında daha ayrıntılı çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Otoinflamatuvar hastalıklarda, sitokin salınımı ve inflamazomlar arasındaki ilişki oldukça karmaşık olup, günümüzde birçok gen, otoinflamatuvar sendromlarla ilişkilendirilmiştir

(Yao & Furst, 2008). Örneğin, Kriyopirin ile ilişkili periyodik sendromlar (CAPS), NLRP3 genindeki NLRP3 inflamasyonunun yapısal aktivasyonuna ve IL-1 β salınımına neden olan ve daha sonra hastalığın semptomatolojisinden sorumlu olan fonksiyon kazanımı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Omenetti vd., 2014). Bununla birlikte, otoinflamatuar sendromların klinik belirtilerinin değişken olduğu ve epigenetiksel düzensizliklerin, çevresel ve genetik faktörlerin hastalığın ortaya çıkmasına ve sonucuna katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Jéru, 2019). İnflamazomla ilişkili genlerin makrofaj farklılaşması ve monosit aktivasyonu sırasında demetile olduğu gözlemi ile harekete geçen Vento-Tormo ve arkadaşları, CAPS'li bir hasta kohortunda epigenetik düzensizleri araştırmıştır. Uyarılmamış monositler, hastalarda ve sağlıklı kontrollerde benzer seviyelerde DNA demetilasyonuna sahipken, IL-1 β uyarımı, CAPS hastalarında IL1 β , IL1RN, NLRC5 ve PYCARD gibi inflamazomla ilişkili genlerin daha yüksek demetilasyonuyla sonuçlandığını gözlemlemiştir (Vento-Tormo vd., 2017). Daha düşük metilasyon seviyeleri sadece anti-IL-1 tedavisi almayan CAPS hastalarında gözlenmiş, bu da IL-1'in farklı metilasyon modellerini tetiklediğini düşündürmektedir (Vento-Tormo vd., 2017). Bu bulgularla uyumlu olarak, bir otoinflamatuar kemik bozukluğu olan kronik bakteriyel olmayan osteomyelit / kronik tekrarlayan multifokal osteomyelitli hastalardan alınan monositler, sağlıklı kontrollere kıyasla NLRP3 ve PYCARD genlerinde azalmış metilasyon seviyelerine sahip olduğu saptanmıştır (Surace & Hedrich, 2019). Bu nedenle düzensiz epigenetik mekanizmalar, inflamazom bileşenlerinin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek otoinflamatuar sendromların klinik görünümüne katkıda bulunabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu genel bir mekanizma değildir, çünkü Vento-Tormo ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada da, AAA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde pirin proteininin metilasyonunda herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Vento-Tormo vd., 2017). Ek olarak, AAA hastalarından izole edilen LPS ile uyarılmış monositler, NLRP3'e bağımlı bir şekilde sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek miktarda IL-1 β salgıladığı gösterilmiştir (Omenetti vd., 2014). Yapılan çalışmalar, pirinin, inflamazom bileşenleri ve pro-IL-1 β ile arasındaki ilişki olduğu bildirmiştir (Grandemange vd., 2011; Repa vd., 2015). Pyrin, SPRY alanı aracılığıyla, inflamazom bileşenleri, kaspaz - 1'in yanı sıra NLRP1, NLRP2 veya NLRP3 ile doğrudan etkileşime girdiği bulunmuştur (Papin vd., 2007). Ayrıca, pirinin NLRP1, NLRP3 ve NLRC4 gibi inflamazomlarına karşı inhibe edici bir etkisi olduğunu ileri sürülmüştür (Chae vd., 2006b; Heskler vd., 2012; Papin vd., 2007)

Bu bulgulara dayanarak, başlangıçta, pirinin diğer inflamazomların negatif bir düzenleyicisi olabileceği ve B30.2 alanındaki mutasyonların, artmış inflamasyon aktivasyonu nedeniyle AAA'ye neden olduğu varsayılmıştır (Heilig & Broz, 2018). Dahası, mutant B30.2 allellerini ifade eden knock-in farelerde kaspaz-1 aktivitesi arttığı için, AAA'nin pirindeki fonksiyon kazanç mutasyonlarından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Chae vd., 2011). Sonuç olarak, inflamazomların aktif olmasında ve inflamazom ilişkili sitokinlerin salgılanmasında diğer genlerde rol oynamakta ve bu sitokin salınımının negatif veya pozitif düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Surace & Hedrich, 2019). Çalışmamızda, AAA hastalarında, NLRP13 ekspresyonunun azalmasına rağmen inflamazom ilişkisi sitokin seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler ve bu bilgiler doğrultusunda, bu sitokinlerin aktivasyonun, NLRP13 inflamazomundan bağımsız olarak AAA pirin mutasyonlarının negatif etkisi ile düzenlendiği düşündürmektedir. Ancak net bir yargıya ulaşabilmek için çalışmanın kapsamı genişletilmeli ve immünopresipitasyon çalışmaları yapılarak, bu sitokinlerin salınımlarının, NLRP13'e bağımlı veya bağımsız olduğuna dair kanıtlar sunulmalıdır.

Çalışmamızda ayrıca IL-1 β ve kaspaz-1 seviyesinin global hipometilasyon ile pozitif bir korelasyon içinde olduğu gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada, pro-inflamatuar sitokinlerin, sjögren sendromu hastalarından alınan tükürük bezlerinde DNA metilasyonunda global ve gene özgü değişiklikleri teşvik ettiği bildirilmiştir (Lagos vd., 2018). Benzer bir çalışmada da DNA hipometilasyonun, RA'nın kronikleşmesine katkıda bulunduğu ve mevcut tedavilerin sınırlandırılmasından sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Karouzakis vd., 2009). Elde ettiğimiz bulgular neticesinde MEFV'de meydana gelen mutasyonlar inflamazom ilişkili proinflamatuar sitokinlerin aşırı salınmasına neden olarak global hipometilasyonda artışa neden olabileceği ve epigenetik modifikasyonların, hastalık patogenezinde rol oynadığını düşünülmektedir. Gerek gen spesifik gerekse global düzeyde metilasyon seviyesini düşürmeye yönelik tedavi yollarının, hastalığın iyileştirilmesinde katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile inflamazom ilişkili IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1'in AAA hastalığının atak ve remisyon dönemi için hassas bir biyobelirteç olduğu gösterildi. Hedef aldığımız bu sitokinler, potansiyel olarak uzun vadeli komplikasyonlar için yüksek risk altında olan hastaları belirlemede kullanılabilir ve hastalar için spesifik tedaviler

hedeflenebilir. Ek olarak, AAA hastalığında; NLRP13, promotörün hipermetilasyonu nedeniyle susturulduğu ve promotör bölgedeki metilasyon seviyesindeki artışın, NLRP13'ün inaktivasyonuna neden olabileceği gösterildi. Ayrıca, global metilasyon durumunun IL-1 β ve kaspaz-1 ile ilişkili olduğunu MEFV'de meydana gelen mutasyonların sonucu aşırı salınan sitokinlerin global hipometilasyonda artışa neden olabileceği ve epigenetik modifikasyonların, hastalık patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışma sadece NLRP13 inflamazom aktivasyonunun epigenetik mekanizmalarını ortaya çıkarmakla kalmadı, aynı zamanda AAA'nin epigenetik düzenlenme mekanizmasının anlaşılması için yeni bilgiler sağladı.



6. KAYNAKLAR

- ABUHANDAN, M., Kaya, C., & Güzelçiçek, A. (2015). Ailevi Akdeniz ateşi tanısı alan 186 olgunun klinik semptom ve MEFV geni mutasyonlarının incelenmesi. *Dicle Medical Journal / Dicle Tıp Dergisi*, 42(1), 61–65.
<https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2015.01.0531>
- AKKAYA-ULUM, Y. Z., Balci-Peynircioglu, B., Karadag, O., Eroglu, F. K., Kalyoncu, U., Kiraz, S., Ertenli, A. I., Ozen, S., & Yilmaz, E. (2017). Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 35(7), S90–S94.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224588/>
- ALGHAMDİ, M. (2017). Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clinical Rheumatology*, 36(8), 1707–1713. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3715-5>
- ALİ, M. W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J. Y., Creasman, W. T., Murph, M. M., Govindarajan, R., Eblen, S. T., Greer, S. F., & Hooks, S. B. (2013). Transcriptional Suppression, DNA Methylation, and Histone Deacetylation of the Regulator of G-Protein Signaling 10 (RGS10) Gene in Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060185>
- ALLİS, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. İçinde *Nature Reviews Genetics* (C. 17, Sayı 8, ss. 487–500). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- ÁLVAREZ-ERRİCO, D., Vento-Tormo, R., & Ballestar, E. (2017). Genetic and epigenetic determinants in autoinflammatory diseases. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 8, Sayı MAR, s. 318). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00318>
- APOSTOLİDOU, E., Skendros, P., Kambas, K., Mitroulis, I., Konstantinidis, T., Chrysanthopoulou, A., Nakos, K., Tsironidou, V., Koffa, M., Boumpas, D. T., & Ritis, K. (2016). Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(1), 269–277.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205958>

- BALCI-PEYNİRCİOĞLU, B., Akkaya-Ulum, Y. Z., Akbaba, T. H., & Tavukcuoglu, Z. (2019). Potential of miRNAs to predict and treat inflammation from the perspective of Familial Mediterranean Fever. *Inflammation Research*, 68(11), 905–913. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01272-6>
- BANNISTER, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. İçinde *Cell Research* (C. 21, Sayı 3, ss. 381–395). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- BAYKAL, Y., Sağlam, K., Yılmaz, M. I., Taslipinar, A., Akinci, S. B., & Inal, A. (2003). Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF- α level in familial Mediterranean fever patients. *Clinical Rheumatology*, 22(2), 99–101. <https://doi.org/10.1007/s10067-002-0682-1>
- BELL, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., Christensen, B. C., Gladyshev, V. N., Heijmans, B. T., Horvath, S., Ideker, T., Issa, J. P. J., Kelsey, K. T., Marioni, R. E., Reik, W., Relton, C. L., Schalkwyk, L. C., Teschendorff, A. E., Wagner, W., ... Rakan, V. K. (2019). DNA methylation aging clocks: Challenges and recommendations. İçinde *Genome Biology* (C. 20, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>
- BEN-CHETRİT, E. (2019). Colchicine. İçinde *Textbook of Autoinflammation* (ss. 729–749). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98605-0_40
- BEN-CHETRİT, E., & Touitou, I. (2009). Familial mediterranean fever in the world. *Arthritis Care and Research*, 61(10), 1447–1453. <https://doi.org/10.1002/art.24458>
- BEN-ZVİ, I., Brandt, B., Berkun, Y., Lidar, M., & Livneh, A. (2012). The relative contribution of environmental and genetic factors to phenotypic variation in familial Mediterranean fever (FMF). *Gene*, 491(2), 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.005>
- BEN-ZVİ, I., & Livneh, A. (2011). Chronic inflammation in FMF: Markers, risk factors, outcomes and therapy. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(2), 105–112. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.181>

- BHAN, A., & Mandal, S. S. (2014). Long noncoding RNAs: Emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. İçinde *ChemMedChem* (C. 9, Sayı 9, ss. 1932–1956). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300534>
- BLASCHEK, A., v. Kries, R., Lohse, P., Huss, K., Vill, K., Belohradsky, B. H., Heinen, F., Müller-Felber, W., & Kümpfel, T. (2018). TNFRSF1A and MEFV mutations in childhood onset multiple sclerosis. *European Journal of Paediatric Neurology*, 22(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.08.007>
- BOLDEN, J., Peart, M., discovery, R. J.-N. reviews D., & 2006, undefined. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *nature.com*, 5(9), 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- BRIK, R., Shinawi, M., Kepten, I., Berant, M., & Gershoni-Baruch, R. (1999). Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics*, 103(5). <https://doi.org/10.1542/peds.103.5.e70>
- CACAN, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087455>
- CACAN, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015). Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *International Journal of Oncology*, 47(6), 2264–2275. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3192>
- CAMPBELL, L., Raheem, I., Malemud, C. J., & Askari, A. D. (2016). The relationship between NALP3 and autoinflammatory syndromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms17050725>
- CANOVA, C., Chevalier, G., Remy, S., Brachet, P., & Wion, D. (1998). Epigenetic control of programmed cell death: inhibition by 5-azacytidine of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced programmed cell death in C6.9 glioma cells. İçinde / *Mechanisms of Ageing and Development* (C. 101, Sayı 9).

- CARNINCI, P., Kasukawa, T., Katayama, S., & ... J. G. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *science*.
<https://science.sciencemag.org/content/309/5740/1559.abstract>
- CAZENEUVE, C., Ajrapetyan, H., Papin, S., Roudot-Thoraval, F., Geneviève, D., Mndjoyan, E., Papazian, M., Sarkisian, A., Babloyan, A., Boissier, B., Duquesnoy, P., Kouyoumdjian, J. C., Girodon-Boulandet, E., Grateau, G., Sarkisian, T., & Amselem, S. (2000). Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *American Journal of Human Genetics*, 67(5), 1136–1143.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)62944-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9297(07)62944-9)
- CECH, T., Cell, J. S.-, & 2014, undefined. (2014). The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Elsevier*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414003389>
- CERUTTI, P., Holt, J., biology, N. M.-J. of molecular, & 1968, undefined. (1968). Detection and determination of 5, 6-dihydrouridine and 4-thiouridine in transfer ribonucleic acid from different sources. *Elsevier*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283668901769>
- CHAE, J. J., Cho, Y. H., Lee, G. S., Cheng, J., Liu, P. P., Feigenbaum, L., Katz, S. I., & Kastner, D. L. (2011). Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity*, 34(5), 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.020>
- CHAE, J. J., & Kastner, D. L. (2015). *Pathogenesis* (ss. 13–30). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-14615-7_2
- CHAE, J. J., Komarow, H. D., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P. P., & Kastner, D. L. (2003). Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell*, 11(3), 591–604.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00056-X)
- CHAE, J. J., Wood, G., Masters, S. L., Richard, K., Park, G., Smith, B. J., & Kastner, D. L. (2006a). The B30.2 domain of pyrin, the familial mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9982–9987.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602081103>
- CHEN, C.-C., Wang, K.-Y., & James Shen, C.-K. (2013). DNA 5-Methylcytosine Demethylation Activities of the Mammalian DNA Methyltransferases * □ S. *ASBMB*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445585>
- CHRİSTGEN, S., Place, D. E., & Kanneganti, T. D. (2020). Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. İçinde *Cell Research* (C. 30, Sayı 4, ss. 315–327). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0295-8>
- CHU, J. Q., Shi, G., Fan, Y. M., Choi, I. W., Cha, G. H., Zhou, Y., Lee, Y. H., & Quan, J. H. (2016). Production of IL-1 β and inflammasome with Up-regulated expressions of NOD-like receptor related genes in toxoplasma gondii-infected THP-1 macrophages. *Korean Journal of Parasitology*, 54(6), 711–717.
<https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.711>
- ÇOBANKARA, V., Balkarlı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları, A. A., & VELİ Çobankara Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları, D. A. (y.y.). Ailesel Akdeniz Ateşi Familial Mediterranean Fever. İçinde *Pamukkale Tıp Dergisi* (Sayı 2). Tarihinde 22 Ekim 2020, adresinden erişildi
<https://dergipark.org.tr/en/pub/patd/392715>
- COWAN, L. A., Talwar, S., & Yang, A. S. (2010). Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. İçinde *Epigenomics* (C. 2, Sayı 1, ss. 71–86).
<https://doi.org/10.2217/epi.09.44>
- DE TORRE-MİNGUELA, C., del Castillo, P. M., & Pelegrín, P. (2017). The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 8, Sayı JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00043>
- DİRESKENELİ, H., Atagunduz, P., Ergun, T., Professor of Dermatology, A., & of Rheumatology, P. (2002). MEFV mutations are increased in Behçet’s disease (BD) and are associated with vascular involvement. İçinde *Article in Clinical and*

experimental rheumatology (C. 21).

<https://www.researchgate.net/publication/8917003>

DİRESKENELİ, H., Özdoğan, H., Korkmaz, C., Akoğlu, T., & Yazici, H. (1999). Serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial mediterranean fever. *Journal of Rheumatology*, 26(9), 1983–1986.
<https://europepmc.org/article/med/10493680>

DOR, Y., & Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *www.thelancet.com*, 392, 777. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31268-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31268-6)

DOUVLATANIOTIS, K., Bensberg, M., Lentini, A., Gylemo, B., & Nestor, C. E. (2020). No evidence for DNA N 6-methyladenine in mammals. İçinde *advances.sciencemag.org*. <http://advances.sciencemag.org/>

DUAN, X., Huang, Y., Chen, X., Wang, W., Chen, J., Li, J., Yang, W., Li, J., Wu, Q., & Wong, J. (2021). Moderate DNA hypomethylation suppresses intestinal tumorigenesis by promoting caspase-3 expression and apoptosis. *Oncogenesis*, 10(5), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41389-021-00328-9>

ECKSCHLAGER, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 18, Sayı 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>

EL HASBANI, G., Jawad, A., & Uthman, I. (2019). Update on the management of colchicine resistant Familial Mediterranean Fever (FMF). İçinde *Orphanet Journal of Rare Diseases* (C. 14, Sayı 1, ss. 1–12). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13023-019-1201-7>

ERER, B., Cosan, F., Oku, B., Ustek, D., Inanc, M., Aral, O., & Gul, A. (2014). MEFV gene variations in patients with systemic lupus erythematosus. *Modern Rheumatology*, 24(1), 93–96. <https://doi.org/10.3109/14397595.2013.854049>

ERER, B., Demirkaya, E., Ozen, S., & Kallinich, T. (2016). What is the best acute phase reactant for familial Mediterranean fever follow-up and its role in the prediction of

- complications? A systematic review. *Rheumatology International*, 36(4), 483–487.
<https://doi.org/10.1007/s00296-015-3413-z>
- FATEMİ, M., Hermann, A., Pradhan, S., & Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology*, 309(5), 1189–1199. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4709>
- FEDERİCİ, S., Sormani, M. P., Ozen, S., Lachmann, H. J., Amaryan, G., Woo, P., Koné-Paut, I., Dewarrat, N., Cantarini, L., Insalaco, A., Uziel, Y., Rigante, D., Quartier, P., Demirkaya, E., Herlin, T., Meini, A., Fabio, G., Kallinich, T., Martino, S., ... Bou, R. (2015). Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(5), 799–805. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206580>
- FERRUCCI, L., Gonzalez-Freire, M., Fabbri, E., Simonsick, E., Tanaka, T., Moore, Z., Salimi, S., Sierra, F., & de Cabo, R. (2020). Measuring biological aging in humans: A quest. İçinde *Aging Cell* (C. 19, Sayı 2). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/accel.13080>
- FİELD, A., Robertson, N., Wang, T., Havas, A., cell, T. I.-M., & 2018, undefined. (2018). DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Elsevier*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276518306427>
- FONTECHA-BARRİUSO, M., Martin-Sanchez, D., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., Sanchez-Niño, M. D., Valiño-Rivas, L., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., & Sanz, A. B. (2018). Targeting epigenetic DNA and histone modifications to treat kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 33(11), 1875–1886.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfy009>
- FRENCH FMF Consortium. (1997). a-candidate-gene-for-familial-mediterranean-fever-1997. *Nat Genet* ., Sep;17(1), 25–31.
- GIANCANE, G., Haar, N. M. T., Wulffraat, N., Vastert, S. J., Barron, K., Hentgen, V., Kallinich, T., Ozdogan, H., Anton, J., Brogan, P., Cantarini, L., Frenkel, J., Galeotti,

- C., Gattorno, M., Grateau, G., Hofer, M., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J., Lachmann, H. J., ... Ozen, S. (2015). Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(4), 635–641. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206844>
- GNYSZKA, A., JASTRZEBSKI, Z., & FLIS, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Research*, 2989–2996(33), 8.
- GOHAR, F., Orak, B., Kallinich, T., Jeske, M., Lieber, M., von Bernuth, H., Giese, A., Weissbarth-Riedel, E., Haas, J. P., Dressler, F., Holzinger, D., Lohse, P., Neudorf, U., Lainka, E., Hinze, C., Masjosthusmann, K., Kessel, C., Weinhage, T., Foell, D., & Wittkowski, H. (2016). Correlation of Secretory Activity of Neutrophils With Genotype in Patients With Familial Mediterranean Fever. *Arthritis and Rheumatology*, 68(12), 3010–3022. <https://doi.org/10.1002/art.39784>
- GOLDFINGER, S. E. (1972). Colchicine for Familial Mediterranean Fever. İçinde *New England Journal of Medicine* (C. 287, Sayı 25, s. 1302). N Engl J Med. <https://doi.org/10.1056/NEJM197212212872514>
- GORP, H. Van, Kuchmiy, A., Hauwermeiren, F. Van, & Lamkanfi, M. (2014). *NOD-like receptors interfacing the immune and reproductive systems*. 281, 4568–4582. <https://doi.org/10.1111/febs.13014>
- GRANDEMANGE, S., Aksentijevich, I., Jeru, I., Gul, A., & Touitou, I. (2011). The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes and Immunity*, 12(7), 497–503. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.53>
- GREER, E., Becker, B., Latza, C., Antebi, A., research, Y. S.-C., & 2016, undefined. (2016). Mutation of *C. elegans* demethylase spr-5 extends transgenerational longevity. *nature*. <https://www.nature.com/articles/cr2015148>
- GRØNDAHL, M. L., Borup, R., Vikesa, J., Ernst, E., Andersen, C. Y., & Lykke-Hartmann, K. (2013). The dormant and the fully competent oocyte: Comparing the transcriptome of human oocytes from primordial follicles and in metaphase II. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 600–617.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gat027>

GROS, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Biochimie, A. E., & 2012, undefined. (2012).

DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Elsevier*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908412003070>

HASHKES, P. J., Spalding, S. J., Giannini, E. H., Huang, B., Johnson, A., Park, G.,

Barron, K. S., Weisman, M. H., Pashinian, N., Reiff, A. O., Samuels, J., Wright, D.

A., Kastner, D. L., & Lovell, D. J. (2012). Rilonacept for colchicine-resistant or -

intolerant familial Mediterranean fever: A randomized trial. *Annals of Internal*

Medicine, 157(8), 533–541. [https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-8-201210160-](https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-8-201210160-00003)

00003

HATEMİ, G., Masatlioglu, S., Gogus, F., & Ozdogan, H. (2004). Necrotizing vasculitis

associated with familial Mediterranean fever. *American Journal of Medicine*, 117(7),

516–519. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.02.050>

HEİLİG, R., & Broz, P. (2018). Function and mechanism of the pyrin inflammasome.

European Journal of Immunology, 48(2), 230–238.

<https://doi.org/10.1002/eji.201746947>

HESKER, P. R., Nguyen, M. T., Kovarova, M., Ting, J. P. Y., & Koller, B. H. (2012).

Genetic Loss of Murine Pyrin, the Familial Mediterranean Fever Protein, Increases Interleukin-1 β Levels. *PLoS ONE*, 7(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051105>

HODAK, E., Atzmony, L., Pavlovsky, L., Comaneshter, D., & Cohen, A. D. (2017).

Hidradenitis Suppurativa Is Associated with Familial Mediterranean Fever—A

Population-Based Study. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), 2019–2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.024>

HOLLENBACH, P. W., Nguyen, A. N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N.,

Krushel, L., Aukerman, S. L., Heise, C., & MacBeth, K. J. (2010). A comparison of

azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS ONE*,

5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009001>

- HOLLEY, C. L., & Topkara, V. K. (2011). An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA. İçinde *Cardiovascular Drugs and Therapy* (C. 25, Sayı 2, ss. 151–159). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10557-011-6290-z>
- HOLLİDAY, R., & Pugh, J. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173), 226–232. <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>
- HORTU, H. O., Karaca, E., Sozeri, B., Gulez, N., Makay, B., Gunduz, C., Atik, T., Tekin, I. M., Unsal, S. E., & Cogulu, O. (2019). Evaluation of the effects of miRNAs in familial Mediterranean fever. *Clinical Rheumatology*, 38(3), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3914-0>
- JAMİLLOUX, Y., Lefeuvre, L., Magnotti, F., Martin, A., Benezech, S., Allatif, O., Penel-Page, M., Hentgen, V., Sève, P., Gerfaud-Valentin, M., Duquesne, A., Desjonquères, M., Laurent, A., Rémy-Piccolo, V., Cimaz, R., Cantarini, L., Bourdonnay, E., Walzer, T., Py, B. F., ... Henry, T. (2018). Familial Mediterranean fever mutations are hypermorphic mutations that specifically decrease the activation threshold of the Pyrin inflammasome. *Rheumatology*, 57(1), 100–111. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex373>
- JÉRU, I. (2019). Update on the Genetics of Autoinflammatory Disorders. İçinde *Current Allergy and Asthma Reports* (C. 19, Sayı 9). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0874-2>
- JÉRU, I., Hentgen, V., Cochet, E., Duquesnoy, P., Le Borgne, G., Grimprel, E., Stojanovic, K. S., Karabina, S., Grateau, G., & Amselem, S. (2013). The Risk of Familial Mediterranean Fever in MEFV Heterozygotes: A Statistical Approach. *PLoS ONE*, 8(7), e68431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068431>
- JİANG, S., & Guo, Y. (2020). Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. İçinde *Stem Cells International* (C. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/1047896>
- JONES, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>

- JOSÉ-ENÉRİZ, E. S., Gimenez-Camino, N., Agirre, X., & Prosper, F. (2019). HDAC inhibitors in acute myeloid leukemia. İçinde *Cancers* (C. 11, Sayı 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11111794>
- KAİSER, J., Science, W. J.-, & 2008, undefined. (2008). A plan to capture human diversity in 1000 genomes. *AMER ASSOC ADVANCEMENT ...*, 319–395.
- KARKİ, R., & Kanneganti, T. D. (2019). Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nature Reviews Cancer*, 19(4), 197–214. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0123-y>
- KAROUZAKİS, E., Gay, R. E., Michel, B. A., Gay, S., & Neidhart, M. (2009). DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism*, 60(12), 3613–3622. <https://doi.org/10.1002/art.25018>
- KERR, N., Lee, S. W., Perez-Barcena, J., Crespi, C., Ibañez, J., Ross Bullock, M., Dietrich, W. D., Keane, R. W., & Pablo de Rivero Vaccari, J. (2018). Inflammasome proteins as biomarkers of traumatic brain injury. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210128>
- KİRECTEPE, A. K., Kasapcopur, O., Arisoy, N., Celikyapi Erdem, G., Hatemi, G., Ozdogan, H., & Tahir Turanlı, E. (2011). Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Medical Genetics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-105>
- KIŞLA Ekinçi, R. M., Balcı, S., Yılmaz, M., Ufuk Altıntaş, D., & Doğruel, D. (2019). Ailevi Akdeniz Ateşi Olan Çocuklarda Ortalama Trombosit Hacminin Klinik Önemi. *Acibadem Universitesi Saglik Bilimleri Dergisi*, 0–0. <https://doi.org/10.31067/0.2019.208>
- KOGA, T., Migita, K., Sato, T., Sato, S., Umeda, M., Nonaka, F., Fukui, S., Kawashiri, S. Y., Iwamoto, N., Ichinose, K., Tamai, M., Nakamura, H., Origuchi, T., Ueki, Y., Masumoto, J., Agematsu, K., Yachie, A., Yoshiura, K. I., Eguchi, K., & Kawakami, A. (2018). MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology (United Kingdom)*, 57(4), 718–726.

<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex451>

KORNIENKO, A. E., Guenzl, P. M., Barlow, D. P., & Pauler, F. M. (2013). Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. İçinde *BMC Biology* (C. 11). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-59>

KOZOMARA, A., ... M. B.-N. acids, & 2019, undefined. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *academic*. <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/47/D1/D155/5179337>

KUCHİBA, A., Iwasaki, M., Ono, H., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., Kusama, R., Tsugane, S., & Yoshida, T. (2014). Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: A case-control study in Japanese women. *British Journal of Cancer*, 110(11), 2765–2771. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.223>

LACHMANN, H. J., Şengül, B., Yavuzşen, T. U., Booth, D. R., Booth, S. E., Bybee, A., Gallimore, J. R., Soytürk, M., Akar, S., Tunca, M., & Hawkins, P. N. (2006). Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations. *Rheumatology*, 45(6), 746–750. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei279>

LAGOS-QUİNTANA, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. İçinde *science.sciencemag.org*. www.sciencemag.org

LAGOS, C., Aguilera, S., Carvajal, P., Jara, D., Castro, I., González, S., Urzua, U., Barrera, M. J., Molina, C., Leyton, C., & González, M.-J. (2018). *FRI0290 Pro-inflammatory cytokines promote global and gene-specific changes in dna methylation in salivary glands from sjÖgren's syndrome patients*. June, 682.1-682. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.3784>

LAMKANFİ, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. İçinde *Cell* (C. 157, Sayı 5, ss. 1013–1022). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>

- LEE, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14* Ambros and Horvitz, 1987). Animals carrying a *lin-4* loss-of-function (*lf*) mutation, *lin-4(e912)*, display reiterations of early fates at inappropriately late developmental stages; cell lineage patterns normally specific for the L1 are reiterated. *Cell* (C. 75).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390529Y>
- LEI, Y., Lui, V. W. Y., Grandis, J. R., & Egloff, A. M. (2014). Identification of mutations in the PYRIN-containing NLR genes (NLRP) in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085619>
- LIU, B. L., Cheng, J. X., Zhang, X., Wang, R., Zhang, W., Lin, H., Xiao, X., Cai, S., Chen, X. Y., & Cheng, H. (2010). Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 19(11), 2888–2896. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0454>
- LIVNEH, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., & Pras, M. (1997). Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatism*, 40(10), 1879–1885.
<https://doi.org/10.1002/art.1780401023>
- MA, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924–933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>
- MANSFIELD, E., Chae, J. J., Komarow, H. D., Brotz, T. M., Frucht, D. M., Aksentijevich, I., & Kastner, D. L. (2001). The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood*, 98(3), 851–859. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.851>
- MÁRQUEZ, V., Kelley, J., & Casadellà, R. E. (2003). *Potent inhibition of HhaI DNA methylase by the aglycon of 2-(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) at the GCGC recognition domain*. <https://digital.csic.es/handle/10261/124806>
- MARTÍNEZ, V. D., Vucic, E. A., Thu, K. L., Hubaux, R., Enfield, K. S. S., Pikor, L. A., Becker-Santos, D. D., Brown, C. J., Lam, S., & Lam, W. L. (2015). Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type

- specific biology. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep10423>
- MARTINON, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- MCVICKER, G., Van De Geijn, B., Degner, J. F., Cain, C. E., Banovich, N. E., Raj, A., Lewellen, N., Myrthil, M., Gilad, Y., & Pritchard, J. K. (2013). Identification of genetic variants that affect histone modifications in human cells. *Science*, 342(6159), 747–749. <https://doi.org/10.1126/science.1242429>
- MIGITA, K., Asano, T., Sato, S., Koga, T., Fujita, Y., & Kawakami, A. (2018). Familial Mediterranean fever: overview of pathogenesis, clinical features and management. *Immunological Medicine*, 41(2), 55–61. <https://doi.org/10.1080/13497413.2018.1481579>
- MOGAL, A., & Abdulkadir, S. A. (2006). Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.008>
- MOGHADDAS, F, Llamas, R., & ... D. D. N. (2017). A novel Pyrin-Associated Autoinflammation with Neutrophilic Dermatositis mutation further defines 14-3-3 binding of pyrin and distinction to Familial Mediterranean. *ard.bmj.com*. <https://ard.bmj.com/content/76/12/2085.abstract>
- MOGHADDAS, Fiona, & Masters, S. L. (2018). The classification, genetic diagnosis and modelling of monogenic autoinflammatory disorders. *Clinical Science*, 132(17), 1901–1924. <https://doi.org/10.1042/CS20171498>
- MOR, A., Shinar, Y., Zaks, N., Langevitz, P., Chetrit, A., Shtrasburg, S., Rabinovitz, E., & Livneh, A. (2005). Evaluation of disease severity in familial MeMor, A., Shinar, Y., Zaks, N., Langevitz, P., Chetrit, A., Shtrasburg, S., Rabinovitz, E., & Livneh, A. (2005). Evaluation of disease severity in familial Mediterranean fever. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 35(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2005.02.002>

- MUNSHİ, A., Tanaka, T., Hobbs, M. L., Tucker, S. L., Richon, V. M., & Meyn, R. E. (2006). Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of γ -H2AX foci. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1967–1974. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0022>
- NAKAMURA, A., Matsuda, M., Tazawa, K., Shimojima, Y., & Ikeda, S. (2007). Successful Treatment with Infliximab and Low-dose Methotrexate in a Japanese Patient with Familial Mediterranean Fever. *Internal Medicine*, 46(15), 1247–1249. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.46.0064>
- NAKANO, K., Whitaker, J. W., Boyle, D. L., Wang, W., & Firestein, G. S. (2013). DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(1), 110–117. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201526>
- NAN, H., Giovannucci, E. L., Wu, K., Selhub, J., Paul, L., Rosner, B., Fuchs, C. S., & Cho, E. (2013). Pre-Diagnostic Leukocyte Genomic DNA Methylation and the Risk of Colorectal Cancer in Women. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059455>
- NATURE, I. C. (2005). A haplotype map of the human genome. *nature*.
- OBİCİ, L., & Merlini, G. (2012). Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.016>
- OMENETTİ, A., Carta, S., Delfino, L., Martini, A., Gattorno, M., & Rubartelli, A. (2014). Increased NLRP3-dependent interleukin 1 β secretion in patients with familial Mediterranean fever: Correlation with MEFV genotype. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(2), 462–469. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202774>
- ÖRÜN, E., & Yalçinkaya, F. (2003). TÜRK TIBBINDA AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞI VE AMİLOİDOZ FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND AMILOIDOSIS IN TURKISH MEDICINE. İçinde *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi / Official Journal of the Turkish Society of Nephrology* (C. 12, Sayı 1).

- ÖZÇAKAR, Z. B., Yalçinkaya, F., Yüksel, S., Acar, B., Gökmen, D., & Ekim, M. (2006). Possible effect of subclinical inflammation on daily life in familial Mediterranean fever. *Clinical Rheumatology*, 25(2), 149–152. <https://doi.org/10.1007/s10067-005-1148-z>
- OZDOĞAN, H., & Ugurlu, S. (2019). Familial Mediterranean Fever. *Presse Medicale*, 48(1), e61–e76. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.08.014>
- OZEN, S, Demirkaya, E., ... G. A.-A. of the, & 2014, undefined. (2014). Results from a multicentre international registry of familial Mediterranean fever: impact of environment on the expression of a monogenic disease in children. *ard.bmj.com*. <https://ard.bmj.com/content/73/4/662.short>
- OZEN, Seza. (2004). Renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Kidney International*, 65(3), 1118–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00485.x>
- PAPÏN, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H. D., Grütter, C., Grütter, M., & Tschopp, J. (2007). The SPRY domain of pyrin, mutated in familial mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death and Differentiation*, 14(8), 1457–1466. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402142>
- PAVET, V., Portal, M., Moulin, J., Oncogene, R. H.-, & 2011, undefined. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. *nature*. <https://www.nature.com/articles/onc2010460>
- PESCHANSKY, V. J., & Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *epigenetics*, 3(9), 3–12. <https://doi.org/10.4161/epi.27473>
- PÏCARD, N., & Fagiolini, M. (2019). MeCP2: an epigenetic regulator of critical periods. İçinde *Current Opinion in Neurobiology* (C. 59, ss. 95–101). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.04.004>
- PONJAVÏC, J., Ponting, C. P., & Lunter, G. (2007). Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *genome*.

<https://doi.org/10.1101/gr.6036807>

- PRAS, E., Livneh, A., Balow, J. E., Pras, E., Kastner, D. L., Pras, M., & Langevitz, P. (1998). Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *American Journal of Medical Genetics*, 75(2), 216–219. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980113\)75:2<216::AID-AJMG20>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980113)75:2<216::AID-AJMG20>3.0.CO;2-R)
- RATHINAM, V. A. K., Zhao, Y., & Shao, F. (2019). Innate immunity to intracellular LPS. *Nature Immunology*, 20(5), 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
- RAVELLI, R. B. G., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., & Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, 428(6979), 198–202. <https://doi.org/10.1038/nature02393>
- REIMANN, H. A. (1947). Regularly Periodic Fever of Eleven Years' Duration: Report of a Case. *Acta Medica Scandinavica*, 128(196 S), 666–673. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1947.tb14701.x>
- REPA, A., Bertsias, G. K., Petraki, E., Choulaki, C., Vassou, D., Kambas, K., Boumpas, D. T., Goulielmos, G., & Sidiropoulos, P. (2015). Dysregulated production of interleukin-1 β upon activation of the NLRP3 inflammasome in patients with familial Mediterranean fever. *Human Immunology*, 76(7), 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.007>
- ROBERTSON, K. D., & Jones, P. A. (2000). DNA methylation: Past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 461–467. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.461>
- RÖTHER, S., & Biochimie, G. M.-. (2011). Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908411002902>
- ROZENBAUM, M., Director, A., & Rozenbaum, M. (2004). Severe outcome of juvenile idiopathic arthritis (JIA) associated with familial Mediterranean fever (FMF). İçinde *Clin Exp Rheumatol* (C. 22). <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=2473>

- SANTÌ, D. V., Norment, A., & Garrett, C. E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22 I), 6993–6997. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.22.6993>
- SARCAR, B., Kahali, S., & Chinnaiyan, P. (2010). Vorinostat enhances the cytotoxic effects of the topoisomerase i inhibitor SN38 in glioblastoma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 99(2), 201–207. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0127-7>
- SARİ, I., Birlik, M., & Kasifoglu, T. (2014). Familial Mediterranean fever: An updated review. *European Journal of Rheumatology*, 1(1), 21–33. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2014.006>
- SAYARLIOĞLU, H., Erkoc, R., Sayarlioglu, M., Dogan, E., & Soyoral, Y. (2006). Successful treatment of nephrotic syndrome due to FMF amyloidosis with azathioprine: Report of three Turkish cases. *Rheumatology International*, 27(2), 197–199. <https://doi.org/10.1007/s00296-006-0188-2>
- SCHNAPPAUF, O., Chae, J. J., Kastner, D. L., & Aksentijevich, I. (2019). The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers in immunology*, 10(August), 1745. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01745>
- SCHWABE, A. D. (1974). FAMILIAL_MEDITERRANEAN_FEVER_IN_ARMENIANS_.5.pdf. İçinde *medicine*.
- SCIENCE, J. W.-, & 1990, undefined. (1990). The human genome project: past, present, and future. *science*. <https://science.sciencemag.org/content/248/4951/44.abstract>
- SEYAHİ, E., Ozdogan, H., Celik, S., Ugurlu, S., & Yazici, H. (2006). Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients: Thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24(5 SUPPL. 42).
- SHİNAR, Y., Obici, L., Aksentijevich, I., Bennetts, B., Austrup, F., Ceccherini, I., Costa, J. M., De Leener, A., Gattorno, M., Kania, U., Kone-Paut, I., Lezer, S., Livneh, A., Moix, I., Nishikomori, R., Ozen, S., Phylactou, L., Risom, L., Rowczenio, D., ...

- Touitou, I. (2012). Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(10), 1599–1605.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201271>
- SHOHAT, M., Livneh, A., Zemer, D., Pras, M., & Sohar, E. (1992). Twin studies in familial mediterranean fever. *American Journal of Medical Genetics*, 44(2), 179–182.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320440212>
- SKVORTSOVA, K., Zotenko, E., Luu, P. L., Gould, C. M., Nair, S. S., Clark, S. J., & Stirzaker, C. (2017). Comprehensive evaluation of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine profiling approaches in human DNA. *Epigenetics and Chromatin*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0123-7>
- SMITH, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *nature.com*. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>
- SOHAR, E., Gafni, J., Pras, M., & Heller, H. (1967a). Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. İçinde *The American Journal of Medicine* (C. 43, Sayı 2, ss. 227–253). Am J Med. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(67\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(67)90167-2)
- SOHAR, E., Gafni, J., Pras, M., & Heller, H. (1967b). Familial Mediterranean fever. *The American Journal of Medicine*, 43(2), 227–253. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(67\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(67)90167-2)
- SÖNMEZ, H. E., Armağan, B., Ayan, G., Barut, K., Batu, E. D., Erden, A., Uğurlu, S., Bilginer, Y., Kasapçopur, Ö., Karadağ, Ö., Bilgen, S. A., Özdoğan, H., & Özen, S. (2018). FRI0496 Polyarteritis nodosa: over 20 years' clinical experience. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(Suppl 2), 775.2-776.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.5533>
- ŠORM, F., Pískala, A., Čihák, A., & Veselý, J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, 20(4), 202–203.
<https://doi.org/10.1007/BF02135399>
- STAMMLER, D., Eigenbrod, T., Menz, S., Frick, J. S., Sweet, M. J., Shakespear, M. R.,

- Jantsch, J., Siegert, I., Wolfle, S., Langer, J. D., Oehme, I., Schaefer, L., Fischer, A., Knievel, J., Heeg, K., Dalpke, A. H., & Bode, K. A. (2015). Inhibition of Histone Deacetylases Permits Lipopolysaccharide-Mediated Secretion of Bioactive IL-1 via a Caspase-1-Independent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 195(11), 5421–5431. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501195>
- STRESEMANN, C., & Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. İçinde *International Journal of Cancer* (C. 123, Sayı 1, ss. 8–13). <https://doi.org/10.1002/ijc.23607>
- SUN, Q., Huang, S., Wang, X., Zhu, Y., Chen, Z., & Chen, D. (2015). N⁶-methyladenine functions as a potential epigenetic mark in eukaryotes. *BioEssays*, 37(11), 1155–1162. <https://doi.org/10.1002/bies.201500076>
- SURACE, A. E. A., & Hedrich, C. M. (2019). The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01525>
- TARTEY, S., & Kanneganti, T. D. (2020). Inflammasomes in the pathophysiology of autoinflammatory syndromes. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(3), 379–391. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR0919-191R>
- TOUITOU, I. (2001). The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. İçinde *European Journal of Human Genetics* (C. 9, Sayı 7, ss. 473–483). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200658>
- TUNCA, M., Akar, S., Soytürk, M., Kirkali, G., Resmi, H., Akhunlar, H., Gönen, Ö., Gallimore, J. R., Hawkins, P. N., & Tankurt, E. (2004). The effect of interferon alpha administration on acute attacks of familial Mediterranean fever: A double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22(4 SUPPL. 24).
- TUNCA, M., Ozdogan, H., Kasapcopur, O., Yalcinkaya, F., Ozen, S., Topaloglu, R., Yilmaz, E., Arici, M., Bakkaloglu, A., Besbas, N., Akpolat, T., Dinc, A., Erken, E., Tirpan, K., Birlik, M., Soyturk, M., Senturk, T., Balci, B., Ozguc, M., ... Cobankara, V. (2005). Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1097/01.md.0000152370.84628.0c>

- USLU, A. U., Deveci, K., Korkmaz, S., Aydin, B., Senel, S., Sancakdar, E., & Sencan, M. (2013). Is neutrophil/lymphocyte ratio associated with subclinical inflammation and amyloidosis in patients with familial mediterranean fever? *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/185317>
- VAN DER HILST, J., Moutschen, M., Messiaen, P., Lauwerys, B., & Vanderschueren, S. (2016). Efficacy of anti-IL-1 treatment in familial Mediterranean fever: a systematic review of the literature. *Biologics: Targets and Therapy*, 10, 75. <https://doi.org/10.2147/BTT.S102954>
- VAN GORP, H., Saavedra, P. H. V., De Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Walle, L. Vande, Matusiak, M., Prencipe, G., Insalaco, A., Van Hauwermeiren, F., Demon, D., Bogaert, D. J., Dullaers, M., De Baere, E., Hochepped, T., Dehoorne, J., Vermaelen, K. Y., Haerynck, F., De Benedetti, F., Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2016). Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(50), 14384–14389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613156113>
- VENTO-TORMO, R., Álvarez-Errico, D., Garcia-Gomez, A., Hernández-Rodríguez, J., Buján, S., Basagaña, M., Méndez, M., Yagüe, J., Juan, M., Aróstegui, J. I., & Ballestar, E. (2017). DNA demethylation of inflammasome-associated genes is enhanced in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1), 202-211.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.016>
- WADA, T., Toma, T., Matsuda, Y., Yachie, A., Itami, S., Taguchi, Y. H., & Murakami, Y. (2017). Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Modern Rheumatology*, 27(6), 1040–1046. <https://doi.org/10.1080/14397595.2017.1285845>
- WATERHOUSE, P. M., Graham, M. W., & Wang, M.-B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and

antisense RNA. İçinde *Plant Biology Communicated by W. James Peacock, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* (C. 95).
www.pnas.org.

- XIAO, C., Zhu, S., He, M., Chen, D., Zhang, Q., Chen, Y., cell, G. Y.-M., & 2018, undefined. (2018). N6-methyladenine DNA modification in the human genome. *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109727651830460X>
- XIONG, W., Meng, X. F., & Zhang, C. (2020). Inflammasome activation in podocytes: a new mechanism of glomerular diseases. *Inflammation Research*, 69(8), 731–743. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01354-w>
- YAO, Q., & Furst, D. E. (2008). Autoinflammatory diseases: An update of clinical and genetic aspects. *Rheumatology*, 47(7), 946–951. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken118>
- ZHANG, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. İçinde *Journal of integrative bioinformatics* (C. 16, Sayı 3). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027>
- ZHEN, Y., & Zhang, H. (2019). NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00276>
- ZHOU, L., Cheng, X., Connolly, B., ... M. D.-J. of molecular, & 2002, undefined. (2002). Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602006769>
- ZIEVE, G., Cell, S. P., & 1976, undefined. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867476901811>

7. EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU HASTA GRUBU

Araştırmacının/Hekimin Açıklaması

FMF hastalığında hastalığın nedeni olabilecek olan bazı genlerle ilişkilisini incelemek amacıyla bir bilimsel araştırma yapmayı planlamaktayız. Yapılması planlanan araştırmanın ismi “Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında; NLRP13 Geninin Düzenlenmesi ve Proptozda Rol Oynayan Proteinlerin Hastalıkla İlişkisinin Değerlendirilmesi” dir.

FMF tanısı konan ve/veya FMF nedeniyle klinik takibi yapılan hastalar üzerinde uygulanacak olan bu çalışmaya, tıbbi durumunuz bu koşullara uyduğu için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz.

Kararınızdan önce söz konusu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel çalışma hakkında bilgiler

Araştırmaya davet edilmenizden nedeni, 18-60 yaş aralığında, FMF rahatsızlığı bulunan FMF tanısı konmuş bir birey olmanızdır. Bu araştırma Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı iş birliği ile gerçekleştirilecektir.

Bu araştırmada FMF hastalığının nedeni olarak görülen MEFV geninin kodladığı pyrin proteinin inflamazom sensörü olarak görev yaptığı bilinmektedir. İnflamazomlarda vücutta enflamasyona neden olmaktadır. NLRP13 inflamazomunun ve RGS10 geninin AAA üzerindeki etkisi araştırılacaktır. Özellikle Türk toplumunda FMF hastalığının görülme sıklığı 1/1000, taşıyıcılık oranı ise 1/5 olduğu düşünüldüğünde bu hastalık üzerine yapılan çalışmaların ne denli önemli olduğu görülmektedir. Otozomal resesif karakter gösteren FMF hastalığının patolojisinde aktifleşen inflamazom mekanizmasının aydınlatılması tedaviye giden süreci hızlandırmada da son derece önemli olacaktır.

Bu amaçla tasarlanan bu projede toplanan hasta serum ve kan örneklerinde NLRP13 ve RGS10'un gen ekspresyonu incelenecek ve bu gende herhangi bir metilasyon olup olmadığı araştırılacak ve istatistiksel analizler yapılacaktır.

Çalışma için sizden kan alınacak mı? *

Evet

Eğer araştırmayı kabul ederseniz sizden söz konusu çalışma için bir kereye mahsus kan alınacaktır. Daha sonra sizden hiçbir şekilde kan alınmayacaktır.

Çalışma kapsamında bilinmesi gereken durumlar ve araştırmacılar ile gönüllülerin uyması gereken kurallar

Araştırmaya katılmanız durumunda;

1. Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
2. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
3. Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
4. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır.
5. Çalışma sırasında meydana gelebilecek sağlığınız ile ilgili ve diğer olumsuzlukların sorumluluğu araştırmacılara aittir.

6. Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
7. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemlerinizde hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtimam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beyanı

Sayın Dr. Köksal DEVECİ tarafından, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı iş birliği ile bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını da bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

İster doğrudan ister dolaylı olsun, araştırma sürecinde araştırma ile ilgili ortaya çıkabilecek sağlık durumuyla ilgili olumsuzluklarda sorumluluk araştırmacılara ait olup parasal bir yük altına girmeyeceğim.

Araştırma sırasında araştırma ile ilgili bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; günün herhangi bir saatinde Dr. Köksal DEVECİ'ye, 5057570305 numaralı telefondan ulaşarak danışabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Tarih

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı :

Adres :

Telefon :

İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, Soyadı :

Adres :

Telefon :

İmza :

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı :

Adres :

Telefon :

İmza :

(Tüm sayfaları imzalı bu formun bir kopyası katılımcıya verilecektir)

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU KONTROL GRUBU

Araştırmacının/Hekimin Açıklaması

FMF hastalığında hastalığın nedeni olabilecek olan bazı genlerle ilişkisini incelemek amacıyla bir bilimsel araştırma yapmayı planlamaktayız. Yapılması planlan araştırmanın ismi “Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında; NLRP13 ve RGS10 Geninin Düzenlenmesi ve Proptozda Rol Oynayan Proteinlerin Hastalıkla İlişkisinin Değerlendirilmesi” dir.

Çalışmamızda kontrol grubu, gönüllü olarak kan vermek isteyen ve hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyet oranlarında herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden oluşturulacaktır. Tıbbi durumunuz bu koşullara uyduğu için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz.

Kararınızdan önce söz konusu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel çalışma hakkında bilgiler

Araştırmaya davet edilmenizden nedeni, 18-60 yaş aralığında, FMF rahatsızlığı veya herhangi bir otoinflamuar rahatsızlığı bulunmayan bir birey olmanızdır. Bu araştırma Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı iş birliği ile gerçekleştirilecektir.

Bu araştırmada FMF hastalığının nedeni olarak görülen MEFV geninin kodladığı pyrin proteinin inflamazom sensörü olarak görev yaptığı bilinmektedir. İnflamazomlarda vücutta enflamasyona neden olmaktadır. Enflamasyon kısıtlayıcı protein ailesinden olan RGS10'un ve NLRP13 inflamazomunun FMF hastalığı üzerindeki etkisi araştırılacaktır. Özellikle Türk toplumunda FMF hastalığının görülme sıklığı 1/1000, taşıyıcılık oranı ise 1/5 olduğu düşünüldüğünde bu hastalık üzerine yapılan çalışmaların ne denli önemli olduğu görülmektedir. Otozomal resesif karakter gösteren FMF hastalığının patolojisinde aktifleşen inflamazom mekanizmasının aydınlatılması tedaviye giden süreci hızlandırmada da son derece önemli olacaktır.

Bu amaçla tasarlanan bu projede toplanan hasta serum ve kan örneklerinde RGS10 geninin ve NLRP13 inflamazomunun ekspresyonu incelenecek ve bu genlerde herhangi bir metilasyon olup olmadığı araştırılacak ve istatistiksel analizler yapılacaktır.

Çalışma için sizden kan alınacak mı? *

Evet

Eğer araştırmayı kabul ederseniz sizden söz konusu çalışma için bir kereye mahsus kan alınacaktır. Daha sonra sizden hiçbir şekilde kan alınmayacaktır.

Çalışma kapsamında bilinmesi gereken durumlar ve araştırmacılar ile gönüllülerin uyması gereken kurallar

Araştırmaya katılmanız durumunda;

8. Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
9. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
10. Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
11. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır.

12. Çalışma sırasında meydana gelebilecek sağlınız ile ilgili ve diğer olumsuzlukların sorumluluğu araştırmacılara aittir.
13. Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
14. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemlerinizi hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtimam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beyanı

Sayın Dr. Köksal DEVECİ tarafından, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı iş birliği ile bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının da bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

İster doğrudan ister dolaylı olsun, araştırma sürecinde araştırma ile ilgili ortaya çıkabilecek sağlık durumuyla ilgili olumsuzluklarda sorumluluk araştırmacılara ait olup parasal bir yük altına girmeyeceğim.

Araştırma sırasında araştırma ile ilgili bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; günün herhangi bir saatinde Dr. Köksal DEVECİ'ye, numaralı telefondan ulaşarak danışabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Tarih

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı :
Adres :
Telefon :
İmza :

(Tüm sayfaları imzalı bu formun bir kopyası katılımcıya verilecektir)

EK-3

ETİK KURUL İZNİ

