

YUSUF ŞEFLERKÇİ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE KASPAZI
İZOFORMLARININ EKSPRESYON ANALİZİ**

YUSUF ŞEFLEKÇİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA SIRMA EKMEKÇİ**

**İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET GÜL**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve deney aşamaları süresince her zaman bilgi ve insani olarak örnek alacağım ve bana insan olmanın sadece unvan, bilgi ve makam gibi şeylerle olmadığını öğreten Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekçi ve Prof. Dr. Neslihan Abacı ‘ya ve ayrıca bilgi ve tecrübelerine saygı duyduğum Prof. Dr. Ahmet Gül’e,

Bu süreçte deneysel uygulamalardaki tecrübe ve bilgisiyle desteklerini esirgemeyen başta Dr. Zeliha Emrence olmak üzere, Dr. Aris Çakiris, Burcu Salman, Elifnur Özkaya, Şeyma Punar, Büneyan Tüzün’e

Deneysel süreçleri boyunca laboratuvar ortamında ilgilerini eksik etmeyen Dr. Ferda Paçal’a,

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesini sağladığı ve bugüne kadar aldığım akademik alt yapı için Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü Genetik ABD’na ve bölümde görevli olan tüm hocalarıma,

Çalışmanın verdiği yorgunluğu ve stresi üzerimden atmamda en önemli etken olan eşim Sinem Şeflekçi ve kızım Sara Şeflekçi’ye teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36613

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doğal Bağışıklık Sistemi	3
2.2. Otoinflatuar Hastalıklar	4
2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	6
2.3.1. Tanım	6
2.3.2. Prevalansı	8
2.3.3. AAA Tanısı	9
2.3.4. AAA Tedavisi	11
2.3.5. Genotip	13
2.3.6. Pirin.....	14
2.3.7. İnflamazom	17
2.3.8. Kaspaz-1 (IL-1b Dönüştürücü Enzim-ICE)	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	21
3.1.2. Kullanılan Kitler	22
3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Hasta Örnekleri	23

3.2.2. Hasta Kanlarından Nötrofil İzolasyonu	24
3.2.3. Hücre kültürü	25
3.2.4. RNA İzolasyonu.....	25
3.2.5. cDNA Sentezi	25
3.2.6. Kantitatif Real-time PZR (qRT-PZR).....	26
3.2.7. Western Blot	27
4. BULGULAR.....	30
4.1. Biyoinformatik Analizler	30
4.1.1. Protein	30
4.2. Kantitatif PZR Sonuçları.....	36
4.3. Western Blot Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	52
HAM VERİLER	58
FORMLAR	59
ETİK KURUL KARARI	61
PATENT HAKKI İZNİ	62
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	63
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Otoinflamatuar sendromların ve hastalıkların klinik sınıflandırılması	5
Tablo 2-2: Ailevi Akdeniz Ateşi semptomlarının farklı popülasyon ve ülkelere göre dağılımı	9
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan hasta bilgileri	23
Tablo 3-2: Kantitatif PZR için hazırlanan karışım	26
Tablo 3-3: Primer dizileri ve PZR ürün boyutları.....	26
Tablo 3-4: BSA standartlarının hazırlanması	28
Tablo 4-1: Hastalara ait nötrofillerde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon değerleri.....	38
Tablo 4-2: Hastalara ait nötrofillerde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon oranları.	39
Tablo 4-3: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon değerleri.	39
Tablo 4-4: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerin kaspaz1 izoformlarının ekspresyon oranları.	40
Tablo 4-5: Ataklı ve ataksız hasta örneklerinde kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tel Hashomer yöntemiyle AAA tanısı koyma	10
Şekil 2-2: Livneh Kriteri	10
Şekil 2-3: Türkiye’de tanımlanmış AAA pediatrik kriteri.....	11
Şekil 2-4: <i>Colchicum autumnale</i> bitkisi.....	12
Şekil 2-5: Kolşisinin yapısı	13
Şekil 2-6: MEFV geni mutasyonlarının ekzonlar üzerindeki dağılımı	14
Şekil 2-7: Pirin proteininin yapısı	15
Şekil 2-8: Rho-modifiye edici toksinlerin oluşturduğu pirin inflamazom kompleksi	16
Şekil 2-9: Pirin aracılı inflamazom düzenlenmesi	17
Şekil 2-10: Alternatif olarak kesilmiş kaspaz1 izoformları	19
Şekil 2-11: Kaspaz1’in yapısı	20
Şekil 2-12: Potansiyel aktif kaspaz1 türleri	20
Şekil 4-1: Kaspaz izoformlarının Clustal Omega ile yapılmış çoklu dizi hizalama ile elde edilen filogenetik ağacın şematik gösterimi.....	30
Şekil 4-2: Kaspaz-1 izoformlarına ait protein dizilerinin Clustal Omega ile hizalanması	31
Şekil 4-3: Kaspaz-1 izoformlarının DNA dizilerinin Clustal Omega programıyla hizalanması	36
Şekil 4-4: Hastalara ait nötrofil örneklerinin Kantitatif PZR sonucu elde edilen kaspaz1 izoformlarının ekspresyon grafiği.....	37
Şekil 4-5: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücre örneklerinin Kantitatif PZR sonucu elde edilen kaspaz1 izoformlarının ekspresyon grafiği.	37
Şekil 4-6: Hastalara ait nötrofillerde Kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyonları ...	41
Şekil 4-7: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 mRNA izoformlarının ekspresyonları	42
Şekil 4-8: BCA deneylerinde elde edilen absorbans değerleri ve standard eğrisi	43
Şekil 4-9: Nötrofil hücreleriyle kaspaz1 izoformlarına özgü antikorlarla yapılan western blot sonuçları.....	44
Şekil 4-10: Periferik kan mononükleer hücre örnekleri kullanılarak kaspaz1 izoformlarına özgü antikorlarla gerçekleştirilen Western Blot sonuçları	44

Şekil 4-11: LPS ile muamele edilmiş THP-1 hücreleriyle kaspaz1 izoformlarına spesifik antikorla yapılan western blot sonucu.	45
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AAA: Ailevi akdeniz ateşi
- PRR: Patern tanıma reseptörü
- PAMP: Patojen-ilişkili moleküler patern
- DAMP: Tehlike-ilişkili moleküler patern
- HSP: Isı şok proteini
- HMGB1: High mobility grup proteini B1
- ATP: Adenozin Trifosfat
- TLR: Toll benzeri reseptör
- CLR: C-tipi lektin reseptörü
- RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I
- RLR: Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-benzeri reseptör
- NOD: Nucleotide binding oligomerization domain
- NLR: NOD-benzeri reseptör
- IL-1: İnterlökin-1
- IL-1b: İnterlökin-1 beta
- CRP: C-reaktif protein
- SAA: Serum amiloid A
- NF-kB: Nükleer faktör kappa b
- FCAS: Ailevi soğuk algınlığı sendromu
- MWS: Muckle-Wells sendromu
- NOMID: Neonatal başlangıçlı multisistem enflamatuvar hastalık
- CINCA: Kronik infantil nörolojik kutanöz eklem sendromu
- FCAS2: Guadeloupe periyodik ateşi
- FHLH: Ailevi hemofagositik lenfhistiyositoz
- HLH: İkincil hemofagositik lenfhistiyositoz
- MEFV: Mediterranean FeVer
- FDA: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
- ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

AIM2: Absent in melanoma 2
ICE: IL-1b Dönüştürücü Enzim
IDL: Interdomain Linker
CDL: CARD Domain Linker
PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi
LPS: Lipopolisakkarit
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
RBL: Red Blood Cell Lysis
PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri
TBP: TATA binding protein
cDNA: complementary DNA
RNA: Ribonükleik asit
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TBST: Tris Buffered Saline with Tween
BCA: Bisinkoninik asit
PMN: Polimorfonükleer nötrofil

ÖZET

Şeflekçi, Y. (2022). Ailevi Akdeniz Ateşinde Kaspaz1 İzoformlarının Ekspresyon Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) otozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Hastalık pirin proteininin kodlanmasından sorumlu MEFV geninde meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır. Mutant pirin tarafından oluşturulan inflamazom kaspaz1'i aktive ederek kontrolsüz İnterlökin 1-beta (IL-1b) salınımını tetikleyip inflamasyona neden olur. Bu çalışmada ataklı ve ataksız dönemdeki hastalarda kaspaz1 izoformlarının ekspresyonları kantitatif PZR ve western blot yöntemleriyle incelendi. Nötrofillerde Kaspaz1 alfa izoformu mRNA ekspresyonu ataklı hastalarda ataksızlara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,835$). Nötrofillerde delta-gama ve epsilon izoformları ataklı hastalarda ataksızlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış bulundu (sırasıyla, $p=0.0047$ ve $p=0,004$). Western blot sonuçlarına göre yalnızca kaspaz1 alfa izoformunun eksprese olduğu gösterilirken ataklı ve ataksız hastalar arasında ekspresyon açısından belirgin bir fark görülmedi. Periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 izoformlarının (alfa, delta-gama ve epsilon) mRNA ekspresyonu ataklı hastalarda ataksız hastalara göre daha yüksek bulunsun da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,0583$ $p=0,0712$ ve $p=0,0549$). Western blot sonuçlarına göre ataklı hastalarda daha çok alfa izoformunun, ataksız hastalarda ise beta, delta ve gama izoformunun eksprese olduğu gösterildi. Ayrıca THP-1 hücrelerinde LPS uygulamasının kaspaz1 izoformlarının ekspresyonunda farklılığa neden olmadığı gösterildi. Çalışmamız kaspaz1 izoformlarının ekspresyonunu ataklı ve ataksız hastalarda değerlendiren ilk çalışma niteliğindedir. Kaspaz1 izoformlarının ekspresyonunun daha geniş hasta popülasyonunda değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), kaspaz1, pirin, MEFV, inflamazom

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36613

ABSTRACT

Şeflekçi, Y. (2022). Expression Analysis of Caspase-1 Isoforms in Familial Mediterranean Fever. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. İstanbul.

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive inherited disease. The disease is caused by mutation in the MEFV gene, which encodes pyrin. The inflammasome formed by mutant pyrin activates caspase-1 and cause inflammation by triggering the uncontrolled release of Interleukin 1-beta (IL-1b). In this study, the expressions of caspase-1 isoforms in patients during attack and attack-free period were analyzed by quantitative PCR and western blot. Although mRNA expression of alpha isoform in neutrophils was higher in patients with attacks than in attack-free patients, no statistically significant difference was found ($p=0.835$). However, delta-gamma and epsilon isoforms were found to be statistically significantly decreased in patients with attacks compared attack-free patients ($p=0.0047$ and $p=0.004$, respectively). Western blot results showed that only alpha isoform was expressed, but there was no significant difference in expression between patient with attack and attack-free. Although mRNA expression of caspase-1 isoforms (alpha, delta-gamma and epsilon) in peripheral blood mononuclear cells was higher in patients during attack than in attack-free patients, no statistically significant difference was found ($p=0.0583$, $p=0.0712$ and $p=0.0549$, respectively). According to the western blot results, alpha isoform was expressed more in patients with attacks, and beta, delta and gamma isoforms were expressed in attack-free patients. In addition, LPS treatment to THP-1 cells did not cause a difference in the expression of caspase-1 isoforms. Our study is the first to evaluate the expression of caspase-1 isoforms in patients during attack and attack-free periods. It will allow to evaluate the expression of caspase-1 isoforms in the wider patient population.

Key Words: Familial Mediterranean Fever (FMF), caspase-1, pyrin, MEFV, inflammasome

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 36613

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) tüm dünyada görülmekle birlikte sıklığı bölgesel olarak farklılık göstermektedir. Türkiye AAA prevalansının en yaygın olduğu ülke olup prevalansı yaklaşık olarak 1:400'den 1:1.000'e kadar değişmektedir. İsrail'de bu oran 1:1000'den fazla iken Ermenilerde ise yaklaşık olarak 1:500'dür. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), peritonit, plörezi, artrit veya erizipel-benzeri eritemin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Bu belirtiler genelde 12-72 saat sürer. AAA, semptomların başlamasından 1-2 gün önce ortaya çıkan prodromal semptomlara sahiptir. Bunlar arasında yapısal, nöropsikiyatrik veya fiziksel belirtiler, iştah ve tat değişiklikleri bulunur. En ağır komplikasyonlarından biri serum amiloid A (SAA) birikimi olup tüm hastalarda bu komplikasyon görülmez. SAA böbrekleri ve bazen de kalp, akciğer, dalak gibi organları da etkiler.

AAA'nde doğal bağışıklık sistemi öncelikli olarak etkilenmiştir. Bu hastalık monogenik kalıtım gösterir. Mutasyon sonucunda inflamazomlar anormal fonksiyon gösterirler. İnflamazomlar IL-1 beta salınımını sağlayan kaspaz1'i aktive ederler. Fakat otoinflamatuvar hastalık olan AAA'nde ise IL-1 beta salınımı kontrolsüz bir şekilde gerçekleştirilir. AAA'nin kesin prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte farklı çalışmalardan elde edilen verilerle tahmini bir sonuç ortaya çıkmıştır.

AAA tanısı koymada en önemli yöntem klinik değerlendirmedir. Tipik ateş ve serozit atakları ortalama 1-4 gün arası sürer. Bu da tanı koymada yararlanılabilecek etkenlerden biridir. AAA aile hikayesi ve kolşisin tedavisine olumlu yanıt da tanıyı destekleyici etkenlerdir. AAA otozomal resesif kalıtım gösterir. Fakat bazı durumlarda sadece bir mutant allel veya hiç mutasyonunun olmadığı durumlar da ortaya çıkabilir. AAA, Mediterranean FeVer (MEFV) geninde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır. MEFV geninin protein ürünü pirin proteindir. AAA hastalığında mutasyona uğrayan Pirin proteini 781 aminoasitten oluşmaktadır. Çoğunlukla nötrofil, monosit ve dentritik hücrelerde eksprese edilirken lenfositlerde ekspresyonu olmaz. Pirinin aktifleşmesi ile inflamazom kompleksi oluşur. İnflamazomlar kaspazların aktive olmaları için gereklidir. Kaspaz sınıfından olan kaspaz1 normalde

sitozolde pro-kaspaz1 formunda bulunmaktadır. İnflamazom kompleksleri ile aktif kaspaz1 formuna dönüştürülerek pro-IL-1b'yı IL-1 b'ya aktive eder. Böylece aktif IL-1b inflamasyona neden olur. Bu çalışmadaki amacımız AAA hastalarında atak sırasında ve ataksız dönemde kaspaz1 mRNA izoformlarının ekspresyon farklılıklarının Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) yöntemiyle ve protein ekspresyonlarının western blot yöntemiyle analiz edilmesidir. AAA hastalarında akut inflamasyonda kaspaz1 izoformları ve protein alt ünitelerindeki değişimin rolünün olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sistemi birçok mikroorganizmayı ve stres uyarıcılarını patern tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptor; PRR) aracılığıyla tanıyan bir sistemdir. Bu reseptörler patojen-ilişkili moleküler paternleri (PAMP) ve tehlike-ilişkili moleküler paternleri (DAMP) bağlayan ve germ hattı tarafından kodlanan reseptörlerdir. PAMP'ler patojen hücre duvarı bileşenleri, nükleik asit ve proteinlerden oluşurken, DAMP'ler ürik asit, ısı şok proteinleri (heat shock proteins; HSP), high mobility grup proteini B1 (HMGB1) ve hücre dışı Adenozin Trifosfat (ATP) olarak bilinen ve konak tarafından üretilen sinyallerdir (1).

Toll benzeri reseptörler (TLR), C-tipi lektin reseptörleri (CLR), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-benzeri reseptörler (RLR) gibi sitozolik reseptörler ve nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-benzeri reseptörler (NLR) gibi membran ilişkili reseptörler olmak üzere toplamda dört farklı PRR ailesi vardır (2). PRR'lerin uyarılması, sinyal yollarının aktivasyonu ile bağışıklık yanıtı tetikler, bu da proinflatuar sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimine yol açar (3).

Aşırı iltihaplanmayı ve doku hasarını önlemek için doğal bağışıklık yanıtı sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Doğal bağışıklık sisteminin kontrolsüz aktivasyonu, otoinflatuar sendromlar da dahil olmak üzere çeşitli inflammatuar hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (4).

Edinilmiş bağışıklık cevabının immünolojik bellek oluşturabildiği ancak doğal bağışıklığın bellek oluşturmadığı ileri sürülmektedir (5). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan birkaç çalışma, enfeksiyonlar veya aşılarından sonra immünolojik belleğin doğal bir versiyonunun indüklenebileceğini göstermiştir. Farklı patojenlerle ikincil bir uyarı daha geniş özgüllük ile daha güçlü bir inflammatuar yanıt ile sonuçlanır (6,7). Bu haftalar veya aylar süren hafıza, “eğitilmiş bağışıklık” (trained immunity) olarak adlandırılır ve esas olarak doğal bağışıklık hücrelerinin, özellikle miyeloid soyundan gelen hücrelerin epigenetik yeniden programlanması ile ilişkilidir (7). İlk enfeksiyonları veya aşılı takiben çeşitli mikrobiyal tetikleyicilere karşı oluşan daha güçlü inflammatuar yanıt, bu hücrelerde hem histon modifikasyonları (yani, H3K4me1, H3K4me3, H2K27Ac, H3K9me2) hem de metabolik değişiklikler (mTOR yolu üzerinden artan aerobik

glikoliz ve artan mevalonat üretimi) sonucu gelişir (7,8). Bununla birlikte, eğitilmiş bağışıklığın uygunsuz aktivasyonu, bağışıklık yetmezliği durumlarına veya hiperinflamatuvar yanıtlara neden olabilir (5–9). Eğitilmiş bağışıklığın uygunsuz indüklenmesine bağlı hiperinflamatuvar yanıtlar, bazı inflamatuvar durumların ve monogenik otoinflamatuvar hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir veya seyrini etkileyebilir (10,11). Çeşitli otoinflamatuvar bozuklukların moleküler temelini belirlenmesi ve bunların altta yatan inflamatuvar yollara göre sınıflandırılması, klinik bulguların patogenezi ve tedavi yanıtlarındaki değişkenliği açıklamada faydalı olmanın yanı sıra inflamatuvar İnterlökin-1 (IL-1) bloke edici ajanlar gibi hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine de katkıda bulunmuştur. Öte yandan, hiperreaktif veya otonom olarak aktif doğal immün hücrelerle ilişkili inflamatuvar yanıtın dinamikleri göz önünde bulundurarak sınıflandırmaya başka bir boyutun eklenmesi, klinik bulguların yorumlanmasında ve mevcut ilaçların optimum kullanımı ile daha iyi hasta yönetim stratejilerinin geliştirilmesinde fayda sağlayabilir (12).

2.2. Otoinflamatuvar Hastalıklar

Genellikle kalıtsal periyodik ateş sendromları olarak adlandırılan ailesel otoinflamatuvar sendromlar, ateş, karın ağrısı, ishal, döküntü veya artralji gibi inflamatuvar semptomlarla karakterize, yaşam boyu geniş bir fenotipe sahip olup tekrarlayan inflamatuvar atakların eşlik ettiği nadir ve kalıtsal monogenik hastalıklardır. Ateş ataklarının olmadığı dönemlerde hastalar genelde kendilerini sağlıklı hissederler ve normal fonksiyonlarını yerine getirebilirler. Ateş atakları boyunca yapılan rutin laboratuvar araştırmalarıyla yüksek oranda eritrosit sedimentasyon oranı, lökositoz gibi şiddetli akut faz yanıtı, C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid A (SAA) gibi akut faz proteinleri tespit edilir. İnflamatuvar ataklar genelde herhangi bir tetikleyiciyle meydana gelmemekle birlikte bazı hastalarda fiziksel uyarıcılar (ör. soğuğa maruz kalma), duygusal stres veya adet döngüsü gibi etkenler tetikleyici olabilir. Ataklar günler veya haftalar içinde kendiliğinden düzelirler (13).

Doğal bağışıklık sisteminde meydana gelen bozukluk otoinflamatuvar hastalıkların temel sebeplerinden biridir. Otoinflamatuvar hastalıkların adaptif bağışıklıkla herhangi bir ilişkisi yoktur. Bu tür hastalıklarda yüksek titreli otoantikorlar, antijene özgü T hücreleri ve enfeksiyon tetikleyicileri ile ilgili herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (12,14).

Otoinflamatuvar terimi 1999 yılında McDermott ve arkadaşları tarafından tekrarlayan akut inflamatuvar fenotipi tanımlamak için kullanılmıştır. Günümüzde ise birkaç kalıtsal otoinflamatuvar sendrom tanımlanmıştır. Bu hastalıkların temel tedavi yöntemi klinik değerlendirme üzerinden yapılmaktadır. Bunun dışında detaylı klinik inceleme ve aile öyküsü, etnik köken de tanı için yardımcı etkenlerdir (13).

Otoinflamatuvar hastalıklar, hücresel bağışıklığın doğrudan rolü olmadan, temel olarak direk patojenik otoantikorların veya kendi antijenlerine karşı hücresel immunitenin olmadığı, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin aşırı üretildiği doğal bağışıklık sistemi ile ilişkili patolojik durumlardır (12). Otoinflamatuvar bozuklukların sınıflandırması temel olarak doğal bağışıklık cevabının düzenlenmesini etkileyen mekanizmalara veya bunların patogeneğinde yer alan aşırı üretilmiş sitokin/inflamatuvar mediyatör tiplerine dayanmaktadır (15,16).

Patogeneze göre otoinflamatuvar sendromlar, inflamazomopatiler, Nükleer faktör kappa b (NF-kB) aktivasyon sendromları, doğal bağışıklık sisteminin protein katlanma bozuklukları, kompleman bozuklukları, sitokin sinyal bozuklukları ve makrofaj aktivasyon bozuklukları şeklinde Tablo 2-1’de sınıflandırılmıştır (15).

Tablo 2-1: Otoinflamatuvar sendromların ve hastalıkların klinik sınıflandırılması (15. kaynaktan uyarlanmıştır)

İnflamazomopatiler (IL 1 beta aktivasyonu)	Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Ailevi soğuk algınlığı sendromu (FCAS) Muckle-Wells sendromu (MWS) Neonatal başlangıçlı multisistem enflamatuvar hastalık (NOMID) / kronik infantil nörolojik kutanöz eklem sendromu (CINCA) Majeed sendromu
NF-kB aktivasyon sendromları	Crohn hastalığı CAMPS Blau sendromu Guadeloupe periyodik ateşi (FCAS2)
Doğal bağışıklık sistemin protein katlanma bozuklukları	TRAPS Spondiloartropatiler
Kompleman bozuklukları	aHUS AMD

	PFAPA
Makrofaj aktivasyon bozuklukları	Still sendromu, IJS Chediak-Higashi sendromu Griscelli sendromu X'e bağılı lenfoproliferatif sendrom Hermansky-Pudlak sendromu Ailevi hemofagositik lenfohistiyositoz (FHLH) İkincil hemofagositik lenfohistiyositoz (HLH) Ateroskleroz
Sitokin sinyal bozuklukları	Cherubism

Ailevi kalıtsal periyodik ateş sendromları, kalıcı genetik bozuklukları olan ve belli aralıklarla ortaya çıkan klinik belirtilere sahip benzersiz bir hastalık grubundan oluşur. Bozukluğun genetik yapısının yanında semptomların enflamatuvar karaktere sahip olması, otoenflamatuvar teriminin de bu sendromlar için kullanılmasına sebep olmuştur (17).

2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)

2.3.1. Tanım

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) dünya çapında görülen en yaygın otoenflamatuvar hastalıklardan biridir (18). 1945'te Sheppard Siegal, önceden beş Yahudi hastada da görülen hastalığa benzer kendi hastalığını "iyi huylu paroksizmal peritonit (benign paroxysmal peritonitis)" olarak nitelendirmişti. Bunların hepsinde de deri bulguları, tekrarlayan peritonit ve periyodik ateş atakları bulunmuştur. 1954'te Hobart Reimann AAA hastalığından bahseden ve onun periyodik olduğuna dair konuşan ilk klinisyendir. Ayrıca sıklık, ritmik, epizodik, tekrarlayan, paroksizmal vb. tabirler de bu hastalığı tarif etmek için kullanılmıştır. 1955'te Harry Heller ve arkadaşları tarafından tüm AAA klinik tablosunu detaylı bir şekilde tanımlanmış ve kalıtımı ortaya konmuştur. Ayrıca amiloid birikiminin AAA hastalığının en ağır komplikasyonu olduğu da tespit edilmiştir (14). Erken başlangıçlı, aile hikayesi olan ve artrit, plörit veya erizipel benzeri eritem olan ve kolsişin tedavisine uyumu zayıf olan hastalarda amiloidoz riski yüksektir (19).

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), tekrarlayan ateş ataklarıyla birlikte peritonit, plörezi, artrit veya erizipelaz-benzeri eritem gibi semptomların da eşlik ettiği otozomal resesif bir hastalıktır (20). Bahsi geçen semptomların etkisi genelde 12-72 saat arası sürmektedir. Ayrıca bu belirtiler başlamadan 1-2 gün önceden ortaya çıkan yapısal, nöropsikiyatrik veya fiziksel belirtiler, iştah ve tat değişiklikleri olarak bilinen prodromal semptomlar bulunmaktadır (21). En ağır semptomlarından olan ve böbrekleri etkileyen serum amiloid A (SAA) tüm hastalarda görülmemektedir (20).

AAA ataklarının genel tetikleyicileri duygusal stres, yorucu fiziksel aktivite, âdet kanamaları, beslenme değişiklikleri, kontraseptif kullanımı, hipovitaminoz D olarak bilinmektedir. Tek başına veya çeşitli kombinasyonlarda karın, göğüs veya bir veya birden fazla eklem ile ilgili ağrılı semptomları olan ateş nöbetleri, Akdeniz havzasının birçok bölgesinde yaşayan insanlar tarafından en sık bildirilen semptomlardır. Ateş, inflamatuvar nöbetlerin %96'sında görülmekle birlikte vücut ısı 40 °C'nin üzerine çıkar ve yaklaşık olarak 6 saatten 72 saate kadar sürer. Şu ana kadar üç çeşit bağımsız AAA fenotipi tanımlanmıştır. Bunlardan biri peritonit, plörezi veya artrit kaynaklı kısa süreli ve ağrılı ateş ataklarıdır. İkinci olarak nefropatik amiloidozis dediğimiz terminal böbrek yetmezliğine sebep olan fenotiptir. Sonuncu olarak da iki tane Mediterranean FeVer (MEFV) mutasyonu ile karakterize olan ve AAA ile ilgili klinik semptom göstermeyen ve amiloid ilişkili olmayan fenotiptir. Atakların düzenli bir periyodu olmamakla birlikte haftada bir kez ile on yılda bir kez arasında değişmektedir. Vakaların %50'si ilk on yılda başlamakla beraber semptomlar yaşamın ilk aylarında görülür. Klinik belirtileri çok erken dönemde ortaya çıkar ve pediyatrik dönemdeki birçok hastalıkla karıştırılabilir (14).

AAA'nin semptomlarını yaygın ve nadir görülen semptomlar olarak ikiye ayrılmaktadır (22).

Yaygın AAA belirtileri:

- Tekrarlayan ateş
- Karın atakları
- Eklem atakları
- Ön belirtiler (Atak öncesi semptomlar)
- Plevral ataklar
- Perikardit (kalp zarı iltihabı)

- Amiloidoz

Nadir semptomları:

- Uzun süreli ateşli miyalji
- Erizipel benzeri eritem
- Vaskülitler
- Azalan doğurganlık
- Azalmış atopi (Birkaç çalışma, AAA'nin astım, atopik duyarlılaşma ve alerjik rinit gelişimine karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir.)
- Kronik ascites ve peritoneal malign mezotelyoma

AAA'nden ilk kez bahseden Janeway ve Mosenthal olmuştur. Hastalık 6 yaşındaki bir Yahudi kız çocuğunda tekrarlayan ateş ve karın ağrısı şeklinde raporlanmıştır. AAA monogenik kalıtım gösteren bir hastalık olup öncelikli olarak doğal bağışıklık sistemi etkilenmiştir. Hastalıkla ilişkili gende meydana gelen mutasyon sonucu anormal fonksiyon gösteren inflamazomlar oluşur. İnflamazomlar IL-1 beta salınımından sorumlu olan kaspaz1'i aktive ederler. Fakat otoinflamatuvar hastalık AAA'nde ise IL-1 beta salınımı kontrolsüz bir şekilde olmaktadır (23).

2.3.2. Prevalansı

Genellikle Akdeniz bölgesinde yaşayan insanları (Araplar, Türkler, Ermeniler, Yunanlılar, Yahudiler ve İtalyanlar) etkilemesine rağmen, seyahat ve göç gibi nedenlerden dolayı tüm dünyada görülmeye başlanmıştır (18). AAA'nin kesin prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte farklı çalışmalardan elde edilen verilerle tahmini bir sonuç ortaya çıkmıştır. Türkiye prevalansın yaygınlığı açısından ilk sırada bulunmaktadır. Bu yaygınlık yaklaşık olarak 1:400'den 1:1.000'e kadar değişmektedir. İsrail'de bu değer 1:1000 değerinin üstünde iken, Ermenilerde ise yaklaşık olarak 1:500'dür. Diğer Ortadoğu ülkelerinde de görülmekle birlikte sayısal olarak kesin bir değer verilememektedir. Ayrıca, AAA farklı popülasyonlarda farklı klinik semptomlar gösterdiğinden popülasyonlardaki mutasyon çeşitliliği değişkenlik göstermektedir (20). Ayrıca erkeklerdeki prevalans kadınlardan daha yüksektir (24).

Ayrıca, farklı etnik gruplar arasında da AAA belirtileri farklılık gösterebilir (Tablo 2-2). Farklı popülasyonlardan elde edilen sonuçlara göre ateş ve peritonit hastalarının %90'ından fazlasında görülmüştür (20).

Tablo 2-2: Ailevi Akdeniz Ateşi semptomlarının farklı popülasyon ve ülkelere göre dağılımı (20.kaynaktan uyarlanmıştır)

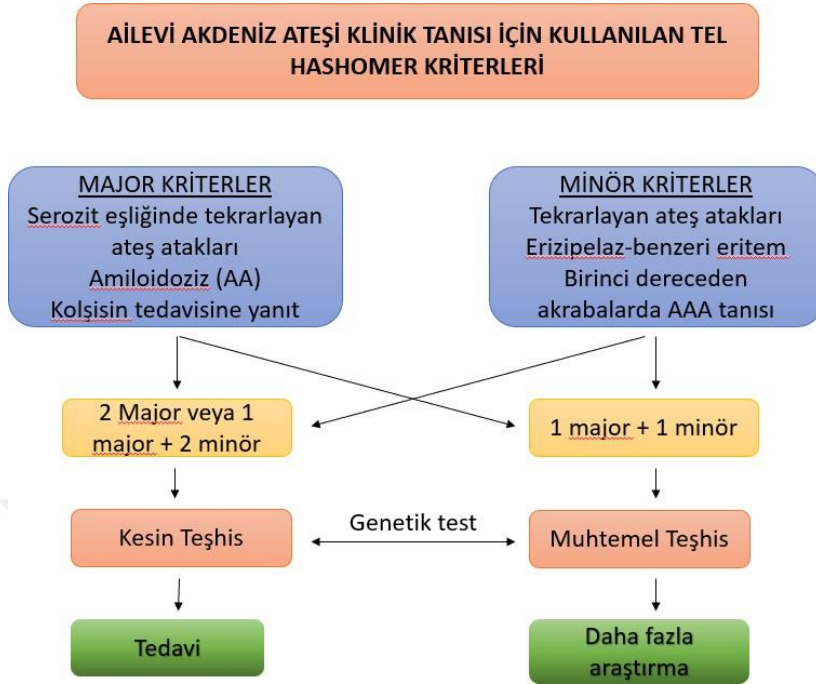
	Ermenistan	Türkiye	İsrail	Araplar	İtalya	Girit	Japonya
Hasta sayısı	335	2.838	576	175	71	71	80
Ateş %	94	92	100	100	92	80	98
Peritonit %	91	93	96	93	91	76	55
Plörezi %	84	31	43	32	52	21	61
Artrit %	39	47	70	33	63	38	27

2.3.3. AAA Tanısı

AAA tanısı koymada en etkili yöntem klinik değerlendirmedir. Tipik ateş ve serozit ataklar ortalama 1-4 gün arası sürer. Bu da tanı koymada yararlanılabilecek etkenlerden biridir. AAA aile hikayesi ve kolşisin tedavisine olumlu yanıt da tanıyı destekleyici etkenlerdir (20).

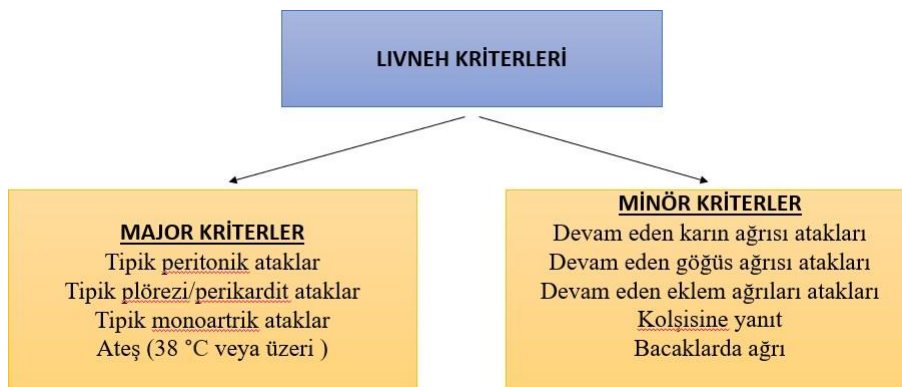
Kandaki fibrinojen seviyesi, SAA ve C-reaktif protein gibi etkenler spesifik olmadıkları için başlangıç tanısı koymada etkili değildirler. Fakat hastalık gidişatının takibinde ve hastanın tedaviye yanıtının izlenmesinde kullanılabilirler. Eğer bu bahsedilen belirti ve bileşenler yoksa, genetik tanı yöntemine başvurulur (20).

AAA tanısı için spesifik bir test olmamakla birlikte bazı tanı kriterleri önerilmiştir. Bu kriterlerin hepsi de klinik veri bazlı olup ve hastanın etnik kökeniyle veya aile hikayesiyle desteklenmektedir. Dolayısıyla farklı tanı kriterleri günümüze kadar geliştirilmiştir. Bunlardan biri Tel Hashomer Kriteridir (Şekil 2-1). Bu kriter Sohar ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve yetişkin İsrail nüfusunda klinik gözlemlerden başlayarak yayımlanmıştır. Bu kriter çoğu klinik ortamlarda en yaygın kullanılan kriterdir. Eğer 2 major kriter veya 1 major ve 2 minör kriter şartı sağlanırsa AAA tanısı doğrulanmış olur (14).



Şekil 2-1: Tel Hashomer yöntemiyle AAA tanısı koyma (24)

1997 yılında Livneh ve arkadaşları tarafından Tel Hashomer kriterinde bulunan klinik elementleri onaylamak için yeni bir kriter geliştirilmiştir (Şekil 2-2). Fakat bu kriterde amiloidoz gibi diğer belirtiler dışlanmıştır (14).



Şekil 2-2: Livneh Kriteri (14)

Çocuklarda AAA tanısı koymak için yetişkinlere uygulanan aynı klinik kriterler uygulanır. Bununla birlikte, çok küçük yaştaki çocuklarda tam klinik tablonun ortaya çıkmasında gecikme, atipik belirtilerin varlığı ve ailede anlamlı bir öykü bulunmaması ek zorluklara neden olabilir. Bu tür problemlerden dolayı 2009 yılında AAA pediatrik popülasyonu için yeni bir kriter olarak Türk AAA Pediatrik Kriteri formüle edildi (Şekil 2-3) (25).

Türk AAA Pediatrik Kriterleri
Ateş (38 °C üzerinde, 6-72 saat süreli, atak sayısı ≥ 3)
Karın ile ilgili ağrılar (6-72 saat süreli, atak sayısı ≥ 3)
Göğüs ağrısı (6-72 saat süreli, atak sayısı ≥ 3)
Oligoartrit (6-72 saat süreli, atak sayısı ≥ 3)
AAA aile hikayesi

Şekil 2-3: Türkiye’de tanımlanmış AAA pediatrik kriteri (26)

Tüm bu kriterler göz önüne alındığında, AAA tanısı koymada en önemli etkenin klinik zemin olduğu görülmektedir. Genetik testler de tanı için uygundur fakat klinik olarak AAA tanısı konmuş bazı hastalarda ya heterozigot ya da hiç MEFV geni mutasyonu bulunmayabilir. MEFV geninde 280 farklı varyant tanımlanmış olmakla birlikte bunların çoğu ekzon 10 üzerinde 680 ve 761 aminoasitleri arasındadır. MEFV geninde meydana gelen mutasyon sonucunda anormal pirin proteini oluşur. İlk üç MEFV mutasyonu 1997 yılında tanımlanan M694V, M680IGC ve V726A mutasyonlarıdır. M694V mutasyonunda 2080. nükleotidde bulunan A→G substitüsyonu ile valin yerine metiyonin, M680IGC mutasyonunda 2040. nükleotidde bulunan G→C değişimi ile metiyonin yerine izolösin kodlanır. V726A mutasyonunda 2177. nükleotidde T→C substitüsyonu ile valin yerine alanin kodlanır (24).

2.3.4. AAA Tedavisi

Kolşisin 1972’den beri AAA tedavisinde kullanılmaktadır. Kolşisin, pirin proteini ile ilişkili olup, tubulin monomerlerine bağlanarak polimer oluşumunu engelleyip aktin hücre iskeletinin organizasyonunu değiştirir. Kolşisin tedavisiyle ateş atakları tamamen durdurulamaz. Bu tedaviyle amiloid birikimi önlenemez (18).

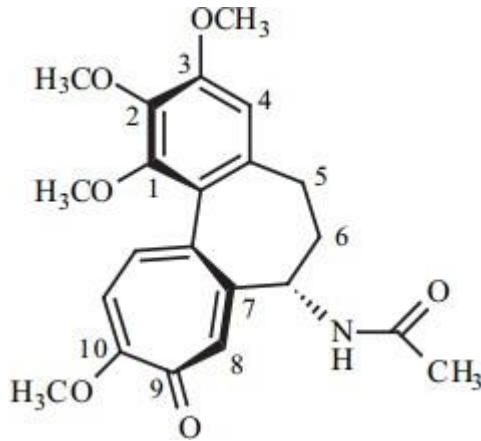
Kolşisin antigut ve antimitotik bir ajan olarak inflamatuvar yanıtta lökosit hareketliliğini ve fagositozu engeller. 2009 yılında, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) kolşisinin AAA hastalarını tedavi etmek için kullanılmasına onay vermiştir. Kolşisin, FMF tedavisinde altın standarttır, ancak hastaların önemli bir kısmı yeterince yanıt vermeyebilir veya dirençli olabilir (27). IL-1 beta inhibitörlerinin (anakinra, rilonacept, canakimumab) kolşisine dirençli veya kolşisine duyarlı hastalarda kullanılması önerilmiştir (24,28).

Kolşisin eski zamanlardan beri kullanılan bir anti-inflamatuardır. Bir alkaloid olan kolşisin *Colchicum autumnale* olarak adlandırılan bir bitkiden elde edilir (şekil 2-4) (29).



şekil 2-4: *Colchicum autumnale* bitkisi (29)

Kolşisin trisiklik bir alkaloiddir. şekil 2-5'te görüldüğü gibi kolşisin trimetoksifenil içeren A halkası, yedi pozisyonda asetamid bulunduran yedi üyeli B halkası ve tropolonik CC halkasından oluşmaktadır (29).



Şekil 2-5: Kolşisinin yapısı (29)

Kolşisin inflamatuvar süreci engelleyerek etkisini gösterir. Nötrofillerin aktivasyonunu, degranülasyonunu ve migrasyonunu engeller. Beta tübülüne bağlanarak tübülün-kolşisin kompleksini oluşturur. Böylece mikrotübül ve mitotik iplik oluşumu engellenir. Kolşisinin etki etmesi tübülüne bağlanan A ve C halkalarına bağlıdır. C halkasının analogu olan tropolone metil ester ve A halkasının analogu olan mescaline tübülüne bağlanarak mikrotübül polimerizasyonunu engeller (29).

2.3.5. Genotip

AAA, Mediterranean FeVer (MEFV) geninde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır (24). Bu gen 1977 yılında iki bağımsız çalışma grubu tarafından tanımlanmıştır (Fransız FMF Konsorsiyumu, 1997; Uluslararası FMF Konsorsiyomu, 1997). MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda p13.3 bölgesine lokalize olup, toplamda 10 ekzondan oluşmaktadır. 781 amino asitten oluşan 86 KDa'luk pirin (Uluslararası FMF Konsorsiyomu'nun adlandırması) veya marensotrin (Fransız FMF Konsorsiyumu'nun adlandırması) proteinini kodlar. Bu keşif AAA ve diğer otoinflamatuvar hastalıkların patojenezini anlamada başlangıç noktasını oluşturmuştur (14).

MEFV genine ait ekzon 10 üzerinde M680I, M694V, M694I ve V726A mutasyonları bulunmaktadır. E148Q mutasyonu ise ekzon 2 üzerinde sonradan tanımlanan MEFV geni mutasyonudur (Şekil 2-6). Bu mutasyonlar AAA'nın yaygın olduğu ülkelerde en yaygın bulunan MEFV geni mutasyonlarıdır. Bazı çalışmalarla bu 5 mutasyonun

Ortadoğu bölgesindeki AAA kaynaklı hastalıkların %85'inden fazlasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (20).

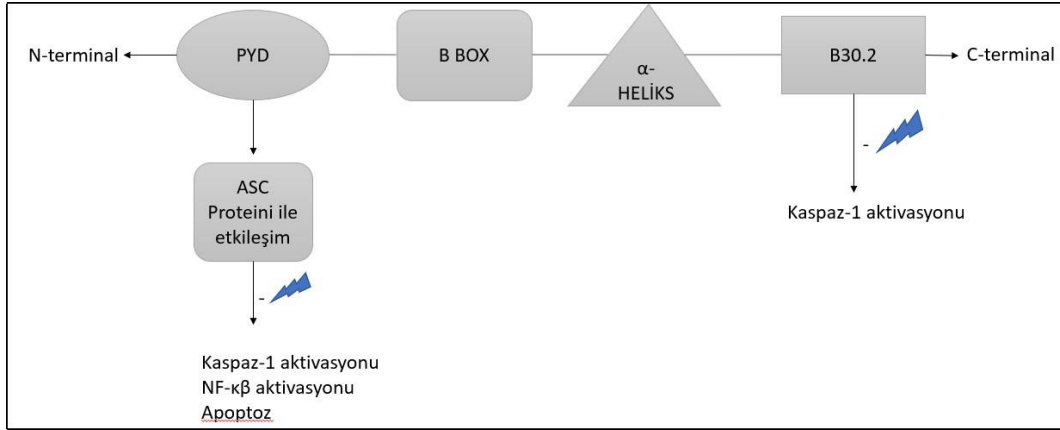


Şekil 2-6: MEFV geni mutasyonlarının ekzonlar üzerindeki dağılımı. Mutasyonlar daha çok ekzon 10 üzerinde yoğunlaşmış durumdadır. Bazı ekzonlarda (ekzon 4, ekzon 6, ekzon 7 ve ekzon 8) mutasyon saptanmamıştır. Bazılarında ise (ekzon 1, ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 9) bir veya birkaç tanımlanmış mutasyon bulunmaktadır (23).

2.3.6. Pirin

Pirin, AAA hastalığında mutasyona uğramış bir proteindir ve yukarıda da bahsedildiği gibi MEFV geninin protein ürünüdür. Bu protein 781 aminoasitten oluşmakla birlikte çoğunlukla nötrofil, monosit ve dentritik hücrelerde eksprese edilirken lenfositlerde ekspresyonu olmaz (30).

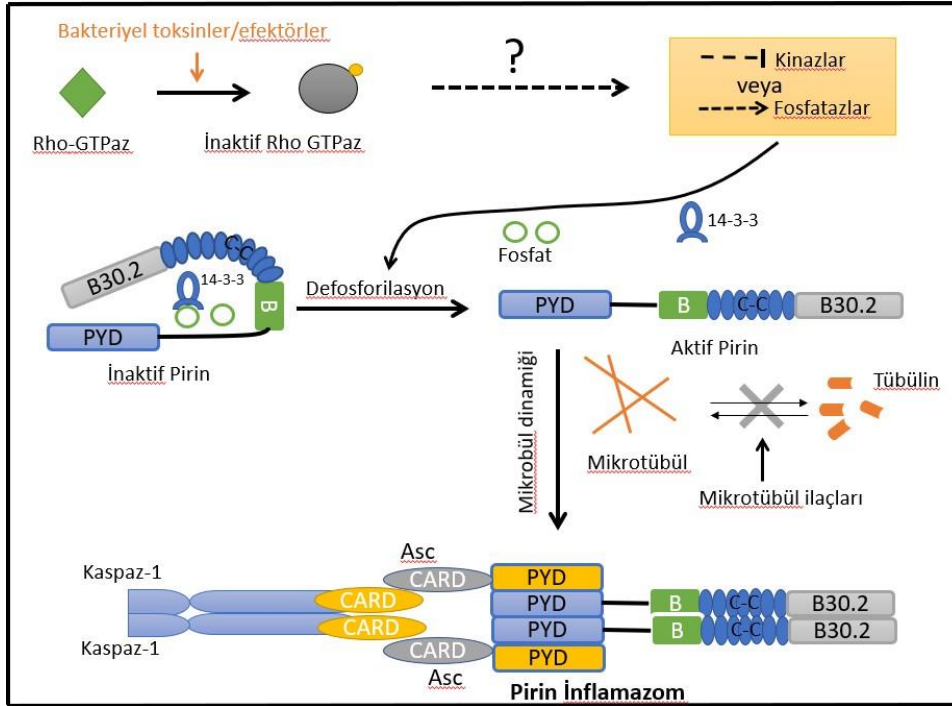
Pirin apoptozun, inflamasyonun ve sitokinlerin düzenlenmesinden sorumludur ve inflamatuvar yanıtı baskılayıcı bir role sahiptir. N ucunda bulunan pirin domaini (PYD); B kutusu (B box); alfa sarmal yapısı (Coiled coil) ve C ucunda bulunan B30.2 (PRYSPRY) domaini olmak üzere toplamda 4 domainden oluşur (Şekil 2-7). Bu domainlerin her biri spesifik protein-protein etkileşimine sahiptirler. PYD domaini terminal uçta ölüm domaini kıvrımı (death domain fold, DDF) bulundurur. Bu yapı apoptozda rol oynayan apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) proteini ile bağ oluşturur. Bu da nuclear factor kappa beta (NF- κ B) ve prokaspaz1'i aktif ederek IL-1 β üretimini baskılar. Mutasyona uğramış pirin ise bu baskılamayı yapamaz ve inflamatuvar yanıt oluşur. B30.2 domaini MEFV geni mutasyonlarının en çok olduğu yerdir (23).



Şekil 2-7: Pirin proteininin yapısı. Dört bölge içerir. B30.2 ve PYD kaspaz1 aktivasyonu ile ilgili önemli bölgeleridir (23).

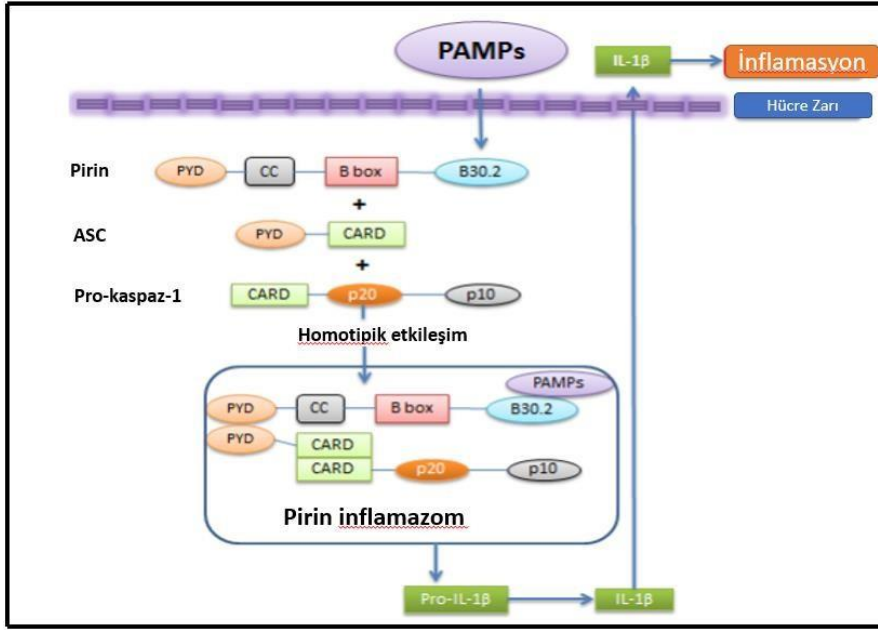
Pirin proteini sitozolik patern tanıma reseptörleri (PRRs) grubuna ait bir protein olup patojen/tehlike-ilişkili moleküler paternlerin (PAMPs/DAMPs) varlığına bağlı olarak doğal bağışıklık yanıtlarını kontrol eder. Aktive olduktan sonra multiprotein sinyal kompleksleri olan inflamazomların oluşumunu sağlar. İnflamazomlar da pro-kaspaz1'i aktif kaspaz1'e dönüştürür. Aktif forma geçen kaspaz1 de pro-IL1 β 'yı IL1 β 'ya dönüştürerek nekrotik hücre ölümü olan piroptozu başlatır (31).

Pirin proteini Rho A GTPaz inhibisyonunu tespit eden bir inflamazom sensörüdür. Rho A'nın çeşitli etkenler (bakteriyel toksinler vb.) sonucu inaktive edilmesi pirin inflamazomun aktivasyonunu tetikler. Pirin PKN1/2 kinazlarıyla fosforilasyona uğrayarak inaktif formda tutulur (32). Böylece pirin proteini Ser-205 ve Ser-241 aminositleri üzerinde fosforilasyona uğrar ve 14-3-3 şaperon proteinin bağlanması engellenir. Toksin stimülasyonu veya bakteriyel enfeksiyonla modifiye olan Rho inaktif hale gelir ve Ser-205 ve Ser-241 defosforilasyona uğrar. Defosforilasyon işlemi 14-3-3 proteinin ayrılmasını tetikleyerek pirini aktif hale getirip, Pirin-ASC inflamazom kompleksinin oluşmasını sağlar (Şekil 2-8). Bunun yanında, mikrotübüller de pirin aktivasyonunda önemli role sahiptirler (33). Pirin proteini mikrotübüllerle kolokalizdir. Bu yüzden, pirin de kolşisin gibi mikro-tübül destabilize ajan olarak aktivite gösterir. Böylece pirin ASC ile oligomerize olamaz ve inflamazomun aktif olması önlenir (24).



Şekil 2-8: Rho-modifiye edici toksinlerin oluşturduğu pirin inflamazom kompleksi
(33)

Pirin ASC'ye bağlanarak kaspaz1'in düzenlenmesinde rol oynayan bir proteindir. ASC pro-kaspaz1 aktivasyonunda önemli fonksiyona sahip olup, PYD ve CARD olmak üzere iki domainden oluşur. Pirinle etkileşimi sonucu meydana gelen Pirin-ASC kompleksi, ASC-bağımlı kaspaz1 aktivasyonu için ön koşuldur. Pirin proteinine ait B30.2 domaini patojenleri algılayarak (PAMPs) pirinin ASC'ye bağlanmasını sağlar. Bağlanma pirinin PYD domaini ile ASC'nin PYD domaini arasında gerçekleşir. Sonrasında pirin-ASC kompleksi pro-kaspaz1'in CARD domainine bağlanarak pirin inflamazomu oluşturur. Pirin inflamazom da pro-IL1 betayı IL-1 betaya dönüştürerek inflamasyona neden olur (Şekil 2-9) (30).



Şekil 2-9: Pirin aracılı inflamazom düzenlenmesi (30)

2.3.7. İnflamazom

İnflamazomlar sistein proteaz sınıfından olup kaspaz1'in aktivasyonundan sorumlu olan ve inflamasyonu uyaran multiprotein komplekslerdir. Kaspaz1 aktivasyonu sonucu pro-IL-1 betanın IL-1 betaya dönüşümünde rol alırlar (34). Ayrıca bu kompleksler olgun IL-18 üretiminden (35) ve bakteriyel patojenler tarafından tetiklenen piroptoz olarak adlandırılan hücre ölümünden de sorumludurlar (36).

İnflamazom terimi ilk kez 2002 yılında inflamatuvar kaspazların aktivasyonundan sorumlu moleküler mekanizmalar olarak tanımlanmıştır. İnflamazomlar inflamazom sensörü, ASC adaptör proteini ve kaspaz1'den oluşur. ASC proteini PYD ve CARD domaininden oluşan bir proteindir. Patojenlerin varlığında (DAMPs/PAMPs), inflamazom kompleksi oluşmaya başlar. ASC proteininin PYD domaini inflamazom sensörünün PYD domaini ile etkileşirken, CARD domaini ise kaspaz1'in CARD domaini ile etkileşir. Böylece oligomerizasyon sonucu inflamazom kompleksi meydana gelir. Kaspaz1'in inflamazom kompleksine dahil olmasıyla inaktif formdan aktif forma dönüşür ve proteolitik aktivite kazanırlar. Aktif kaspaz1 ise olgun IL-1 beta üretimini gerçekleştirir (37).

İnflamazomlar patofizyolojik uyarıcılara karşı oluşan komplekslerdir. İnflamazom aktivasyonunun ilk adımı PRR'ler aracılığıyla DAMP ve PAMP'ların tanınmasıdır. Farklı PAMP ve DAMP türlerini tanımak için belirli özgünlükler oluşmuştur. Şimdiye

kadar inflamazom sensörü olarak fonksiyon gösteren 5 tane PRR tanımlanmıştır. Bunlardan 3 tanesi NLR (NOD-benzeri reseptörler) ailesindendir: NLRP1, NLRP3, NLRC4. Diğer ikisi NLR ailesinden değildir. Bunlar absent in melanoma 2 (AIM2) ve pirindir. Bunlar dışında NLRP2, NLRP6, NLRP7 gibi inflamazom oluşumunda görevli başka sensörler de tanımlanmasına rağmen bunların mekanizmaları hakkında tam bir bilgi bulunmamaktadır (37).

2.3.8. Kaspaz-1 (IL-1b Dönüştürücü Enzim-ICE)

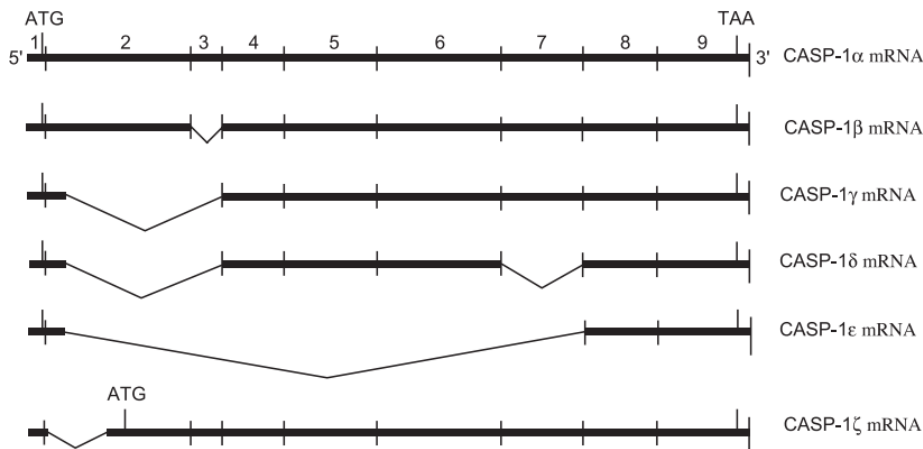
Kaspazlar (cysteiny aspartate-spesific protease family) sistein proteaz ailesinin bir üyesi olup apoptozda rol alan önemli enzimlerdir. Kaspazlar inaktif formda eksprese olup sonrasında aktif hale geçerler (38). Kaspazların bir üyesi olan kaspaz1, sitosolde pro-kaspaz1 (zimojen) olarak bulunur. Proteolitik olarak aktivite gösterebilmesi için inflamazom komplekslerine ihtiyaç duyar. Aktifleşen kaspaz1 pro-IL-1 beta ve pro-IL-18'in olgun IL-1 beta ve IL-18'e dönüşümü sağlar. Ayrıca kaspaz1 nekroz, piroptoz ve apoptozda rol oynar (39).

Kaspazların aktive olması için iki tane önemli adım kritiktir. Birinci adım kaspaz monomerlerinin büyük ve küçük alt birimlerini dimerize olup tam proteazı oluşturmasıdır. İkinci önemli adım ise kaspaza ait monomerlerin proteaz domaininde kesilmesidir. Kaspazın dimerizasyonu sonucu monomerlerin enzim aktivitesine sahip bölgesinde yapısal değişiklik meydana gelir. Ayrıca kaspazların aktivitesi IDL (Interdomain Linker) ve CDL (CARD Domain Linker) bölgelerinde meydana gelen çoklu spesifik kesilmelerle de düzenlenir. CDL CARD domainini büyük alt birime bağlarken; IDL büyük ve küçük alt birimlerini birbirine bağlar. IDL'de bazı bölgelerden kesilen kaspaz1 p33/p10 formu olan aktif tür oluşur. Bu tür birçok substratı (pro-IL-1b, pro-IL-18 ve GSDMD) keser. Fakat CDL bölgesinde kesilme sonucu aktif p33/p10 türü p20/p10 formu oluşur. Bu kesilme sonucu aktif kaspaz1 türünün proteaz aktivitesi sonlandırılır. CDL bölgesindeki kesilmesinin inhibisyonu sonucu ASC adaptör proteininin kaspaz1 p33/p10 türü ile olan etkileşimi stabilize olup artan kaspaz1 aktivitesi ile sonuçlanır. Fakat uyarılmış CDL'de p33/p10 kesilmesi sonucu p20/p10 formu oluşur ve kaspaz1 dimerleri ayrılarak kaspaz1 aktivitesinde kayba neden olur (40).

Kaspazların dimerizasyonla aktive olmasına bazal aktivite denir. Bazal aktivitenin tek başına kaspazların substratlarını kesmesi için yeterli değildir. Bazal aktivite kaspaz1

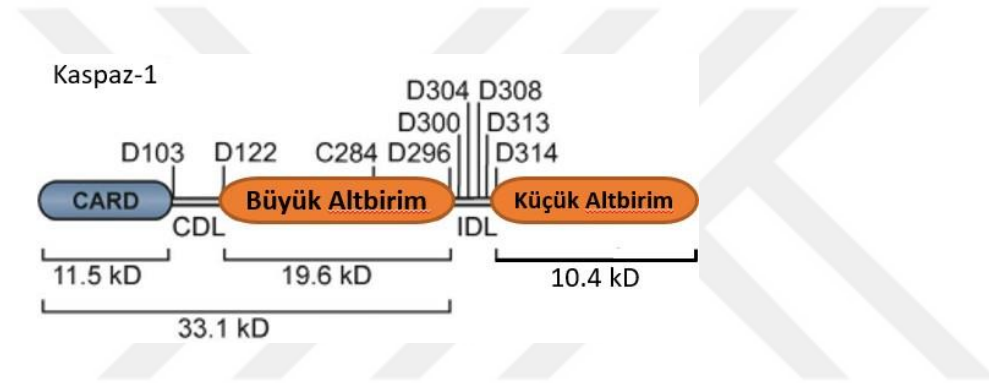
dimerlerinin IDL’de kesilmesi için yeterli aktiviteyi sağlar. Dimerizasyon dışında autoprocessing sürecinin de kaspazların aktivasyonunda ve pro-IL-1b’yı kesmesinde önemli bir süreç olduğu bildirilmiştir. Ayrıca IDL’de meydana gelen posttranslasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon vb.) IDL kesilmesini ve inflammatuar sinyali etkileyebilir. Fakat bu süreç deneysel olarak test edilmemiştir (40).

İnsan kaspaz1 cDNA’sı (CASP1) Cerretti ve arkadaşları tarafından ilk kez klonlanarak genomik dizisi belirlenmiştir. Lokalizasyonu 11q22-q23 kromozomal bölgesidir. Toplamda 10 ekzondan oluşan CASP1 yaklaşık 10.6 kb boyutundadır. Bu gende meydana gelen alternatif kesilmeler sonucu alfa, beta, gama, delta, epsilon ve zeta izoformları oluşmaktadır (Şekil 2-10) (41). En uzun izoform olan alfa 1346 bç içerir ve 404 aminoasit kodlar. En baskın izoform olarak da karşımıza çıkar. Beta izoformu 1158 bç içerir ve ekzon 3 tamamen kesilmiştir. Bu izoform 383 aminoasit kodlar. Gama izoformunda ise ekzon 2’nin büyük bir kısmı ve ekzon 3’ün tamamı yoktur. Bu izoform da 969 bç içerir ve 291 aminoasit kodlar. Delta izoformu 825 bç içerir ekzon 2’nin büyük bir kısmı, ekzon 3 ve ekzon 7’nin tamamı kesilmiştir ve 356 aminoasitten oluşur. Epsilon izoformunda ekzon 2’nin büyük bir kısmı ve ekzon 3’ten ekzon 7’ye kadar yoktur. 300 bç içerir ve 98 aminoasit kodlar. Zeta izoformu 1131 bç içerir ve 365 aminoasit kodlar. Bu izoformlardan alfa, beta, gama ve zeta proteolitik olarak aktive olup apoptozu uyarırlar. Fakat delta ve epsilon katalitik domain olmadığı için apoptozu uymazlar (42).



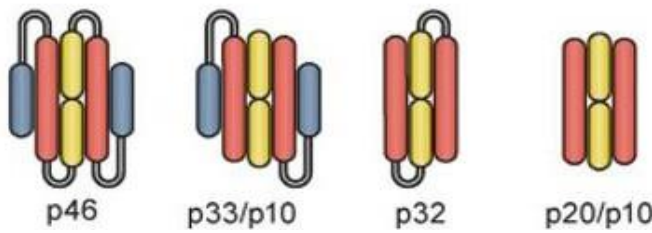
Şekil 2-10: Alternatif olarak kesilmiş kaspaz1 izoformları (41)

Kaspaz1, 45 kDa’luk bir proform olarak sitoplazmada bulunur. Aktive olduktan sonra küçük fonksiyonel parçalara bölünür (41). Kaspaz1, C-ucunda CARD domaini, büyük alt birim (p20) ve N-ucunda küçük alt birim (p10) olmak üzere üç bileşenden meydana gelen bir yapıdır. CARD domaini bağlayıcısı (CDL) CARD domaini ile büyük alt birimi birbirine bağlarken; interdomain bağlayıcı (IDL) da her iki alt birimi birbirine bağlar (Şekil 2-11). Kaspaz1’in proteaz aktiviteye sahip olması için dimerizasyona uğraması gerekir. Aktif kaspaz1 türleri bu bağlayıcı bölgelerdeki ayrılma ve kesilme sonucu oluşurlar (Şekil 2-12) (43).



Şekil 2-11: Kaspaz1’in yapısı (43)

Potansiyel kaspaz-1 dimerleri



Şekil 2-12: Potansiyel aktif kaspaz1 türleri (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- “Buz Makinası (Cornelius)”
- “Buzdolabı -80 °C (Thermo Scientific)”
- “Buzdolabı +4 °C / -20 °C (Beko)”
- “Distile Su Cihazı (Milipore)”
- “Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)”
- “Pipet Seti (Gilson)”
- “Vorteks (Stuart)”
- “CCD Kameralı Jel Görüntüleme Sistemi (UVP)”
- “Yatay elektroforez tankı”
- “Soğutmalı Santrifüj (Rotanta460r)”
- “Microfuge Soğutmalı Mikrosantrifüj”
- “Çeker Ocak”
- “Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı”
- “PZR Cihazı (Eppendorf, Mastercycler)”
- “Su Banyosu (Memert)”
- “Elektroforez Tankı (Biorad)”
- “İnkübatör (Thermo Electron Corporation)”
- “Sıvı azot tankı (StateBourne)”
- “Vi-Cell hücre sayım cihazı (Beckman coulter)”
- “Falkon tüp (15ml-50 ml)”
- “Ependorf tüp
- “Nanodrop-2000” cihazı (Thermo Scientific)”

“Fusion FX7 Imaging System (Vilber, France)”

“Mikrodalga fırın (Arçelik)”

“Real Time PZR (Light Cycler, 480-II, Roche)”

“Santrifüj (Hettich)”

“i-Blot jel transfer cihazı (Invitrogen)”

3.1.2. Kullanılan Kitler

“*PureLink, RNA Mini Kit*’ (Invitrogen)”

“*Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti* (Roche)”

“iBlot™ Transfer Stack, PVDF (Thermo Fisher Scientific)”

“Supersignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific)”

3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

“RPMI 1640 Besiyeri (Gibco)”

“RIPA Buffer (Protein Lysis Buffer ThermoFisher Scientific)”

“LDS sample buffer (ThermoFisher Scientific)”

“Color stained protein standard broad range (11-245 kDa) marker (ThermoFisher Scientific)”

“Bolt %4-12 Bis-Tris SDS-PAGE Jel (ThermoFisher Scientific)”

“20X Bolt SDS-MES running buffer (ThermoFisher Scientific)”

“Proteaz İnhibitör tablet (Roche)”

“PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi)”

“LPS (100 ng /ml)”

“HBSS (Hank’s Balanced Salt Solution)”

“RBL (Red Blood Cell Lysis) Buffer”

“TBST solüsyonu”

- 20X TBS Tween-20 (%0.05)
- Distile su
- Tween (%10)

“Bloklayıcı Solüsyonu (Blocking Buffer)”

- %0,1 TBST
- Süt tozu

3.2. Yöntem

3.2.1. Hasta Örnekleri

Bu çalışma için gerekli hasta örnekleri İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı tarafından sağlandı. Çalışmada gerekli olan etik kurul onayı İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan (22.11.2019, No.: 1264) alınmıştır. Hastalara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak, 10 ml periferik kan alınmıştır. Hastalara ait bilgiler Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan hasta bilgileri

Hasta No.	Atak Durumu	Cinsiyet	Yaş	Mutasyon
1	Ataksız	K	54	Yok
2	Ataksız	K	69	-
3	Ataksız	K	27	M694V Homozigot
4	Ataksız	K	44	M694V Homozigot
5	Ataksız	K	40	M680I Homozigot
6	Ataksız	K	52	-
7	Ataksız	K	38	M694V Heterozigot
8	Ataklı	K	33	-
9	Ataklı	K	29	-
10	Ataklı	K	34	-
11	Ataklı	K	43	-

12	Ataklı	K	44	-
13	Ataklı	K	38	M694V Homozigot
14	Ataklı	K	-	-
15	Ataklı	K	-	-
16	Ataklı	E	51	M694V Homozigot
17	Ataklı	E	39	-
18	Ataklı	E	32	M694V Homozigot

3.2.2. Hasta Kanlarından Nötrofil İzolasyonu

Nötrofiller 10 ml periferik kandan izole edildi. Tüm kimyasallar oda sıcaklığına getirildi. Hastaya ait 10 ml'lik kan 50 ml'lik falkon tüpe aktarılıp üzerine 3 katı kadar RBL (Red Blood Cell Lysis) eklendi. RBL ekledikten sonra falkon tüp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 1500 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı ve pellet kısmı elle tüpe vurularak çözündürüldü. Örnek miktarı kadar (10 ml) RBL eklenerek oda sıcaklığında tekrar 10 dakika inkübe edildi. Ardından 1500 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı ve pellete elle vurularak yavaş bir şekilde çözündürüldü. Ardından pellet 2 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) içinde çözündürüldü. Önceden 50 ml'lik falkonda hazırlanmış olan 15 ml Ficoll üzerine pastör pipetle 45 derecelik açı yapacak şekilde yavaş yavaş tabaka oluşturacak şekilde yayıldı. 2100 rpm 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra faz ayrımı oluştu. Serum ve ficol arasında tabaka oluşturan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) pastör pipetle 15 ml'lik falkona aktarıldı. Geriye kalan sıvı döküldü ve en dipte kalan nötrofil pelletine elle yavaşça vurularak çözündürüldü. Elde edilen PBMC ve nötrofil pelleti ayrı ayrı tüplerde 3 ml PBS içinde çözündürülerek RNA ve protein izolasyonu için ayrıldı.

- RNA izolasyonu için 1,5 milyon hücre ayrıldı. Hücre pelletine 500 ul denatüre edici solüsyon eklenip çözündürülerek -80°C'lik dondurucuya kaldırıldı.
- Protein izolasyonu için 2,5 milyon hücre ayrıldı. Hücre pelleti üzerine 250 ul "RIPA Buffer (Protein Lysis Buffer Thermo Scientific)" ve 1.5 ul Proteaz inhibitör eklenerek -80°C'lik dondurucuya kaldırıldı.

RNA ve protein eldesi için ayrılan periferik kan mononükleer hücrelerinden arta kalan hücreler kriyo tüpe 1 milyon/ml olacak şekilde %5 konsantrasyonda DMSO içeren medyunda -80°C’de dondurulduktan sonra ertesi gün sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.3. Hücre kültürü

Monositik lösemili bir hastadan elde edilmiş olan THP-1 (monosit) hücre soyu %10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyunda %5 CO₂ ve 37°C’lik inkübatörde kültüre edildi. Kültür ortamında 0, 3, 6, 12 ve 20. saatlerde Lipopolisakkarite (LPS) maruz bırakılarak inflamasyon tetiklendi. Uyarılan hücrelerden daha sonra RT-PZR için RNA ve Western Blot için protein elde edildi.

3.2.4. RNA İzolasyonu

“PureLink, RNA Mini Kit (İnvitrogen)” kitinin protokolüne uygun bir şekilde örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Önceden kültür ortamında RNA izolasyonu için hazırlanmış olan örnekler -80°C’lik dondurucudan alındı. Eşit hacimler %70’lik etanol eklendi. Homojenliği sağlamak için örnekler vortekslenildi. Örnekten 700 ul alınarak mini spin kolonlara aktarılıp oda sıcaklığında 12.000 g 15 saniye santrifüj edilip RNA’nın filtreye bağlanması sağlandı. Santrifüjden sonra altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun üzerine 700 ul “Wash Buffer I” eklenerek tekrar 12.000g’de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 ul “Wash Buffer II” eklenip 12.000g’de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon tekrar yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek hiçbir şey eklemeyen 12.000 g 2 dakika santrifüj edildi. Ardından toplama tüpü atıldı ve kolon RNase free ependorf tüpüne yerleştirildi. 25 ul RNase içermeyen seril su filtrenin tam ortasına gelecek şekilde bırakıldı. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 g 2 dakika santrifüj edildi. Böylece RNA’nın suda çözünerek filtreden ayrılıp ependorf tüpe geçmesi sağlandı. RNA miktarı “Nanodrop-2000” cihazıyla ölçüldü.

3.2.5. cDNA Sentezi

Nanodrop ölçümünden sonra RNA örneklerinden “Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche)” kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Öncelikle 500ng RNA örneği üzerine 2µl. Random hexamer eklenerek su ile 11,4µl’ye tamamlandı. PZR cihazında 10

dakika 65 °C’de inkübe edildi. PZR aşaması devam ederken, reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 3-2). Toplam hacim 20 ul olacak şekilde reaksiyon karışımından 8,6µl alınarak PZR’den alınan örnekler eklendi. Sonrasında örnekler PZR cihazında 30 dakika 55°C ve 5 dk 85°C’de inkübe edildi. Örnekler PZR’den alınıp -20°C’de saklandı.

Tablo 3-2: Kantitatif PZR için hazırlanan karışım

Reaktifler	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer ,5x conc.	4 µl	1X
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ul	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2 µl	1 Mm
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase, 20U/ul	1,1 µl	10 U
DTT	1 µl	5 mM
Toplam	8,6 µl	

3.2.6. Kantitatif Real-time PZR (qRT-PZR)

CASP-1 geninin izoformları için “NCBI primer designing tool” kullanılarak Forward ve Reverse yönlü primerler tasarlandı.

Primerler tasarlanırken kendi üzerine katlanma skorlarına, GC içeriğine, Tm bağlanma sıcaklığı özelliklerine dikkat edilerek ekzon bölgelerini kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Tasarlanan primer dizileri Tablo 3-3’te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Primer dizileri ve PZR ürün boyutları

İzoform Adı	Primerler	PZR Ürün Boyutu
Total kaspaz1 (30)	Forward: TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC Reverse: GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA	96 bç.
Kaspaz1alfa	Forward: TGGATGAATTATTACAGACAAGGGT Reverse: GTACTCCTTGAGAGTCTTGCAT	246 bç
Kaspaz1gama/delta	Forward: GTTCCATGGGTGAAGCTCCT	162 bç

	Reverse: TGCGGCTTGA CTTGTCCATT	
	Forward: CCGTTCCATGGGTGAAGATAA	
Kaspaz1epsilon	Reverse : CTCCTTCAGTGGTGGGCATCT	185 bp
	Forward: ATGGCCGACAAGGGACA	
Kaspaz1zeta	Reverse: AGTCAATCAAAGCTCGGGTC	99 bp

Kantitatif PZR için “*LightCycler 480*” cihazı ve “*Light Cycler 480 SYBR Green I*” kiti kullanıldı. Normalizasyon için kontrol geni olarak, TATA binding protein (TBP) genleri kullanıldı. qRT-PZR reaksiyonunu için karışım içeriği her gen için 5 µl SYBR Green I, 1 µl primer F, 1 µl primer R, 1 µl H₂O ve 2 µl cDNA olarak hazırlandı. Her PZR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanıldı. qRT-PZR koşulları 95°C’de 60 saniye (1 döngü) ön denatürasyonun ardından 45 döngü 95°C’de 10 saniye, 68°C’de 20 saniye ve 72°C’de 10 saniye amplifikasyon olacak şekilde uygulandı. 95°C’de 5 saniye, 65°C’de 1 dakika ve 95°C’de 5 sn melting curve analizi yapıldı. Her örnek ve negatif kontroller çift olarak çalışıldı. Ekspresyon değerleri ΔC_t değeri hesaplanarak belirlendi.

3.2.7. Western Blot

RIPA buffer eklenmiş halde -80°C dondurucuda saklanmış olan protein örnekleri alınıp 42°C’de çözündürüldü. Sonrasında çözündürülen örnek sıvı azot içinde donduruldu. Bu işlem her bir örnek için 3 kez tekrarlandı. Sonikasyon cihazıyla (Bandelin) %60 Amper, 30 saniye çalışma 30 saniye durdurma şeklinde 6 kez buz üzerinde sonikasyon gerçekleştirildi. Sonikasyondan sonra 1 dakika 14.000 rpm 4°C’de örnekler santrifüj edildi.

İzole edilen proteinlerden “*Pierce BCA Protein Assay Kiti (Thermo)*” protokolüne uygun bir şekilde Bisinkoninik asit (BCA) Deneyi ile protein tayini yapıldı (Tablo 3-4). Her bir standart ve örneklerden 10 uL alınarak 96’lık well-plate kuyularına eklendi. Ardından her bir kuyuya 200 uL “*Working Reagent*” (WR) eklendi ve 30 saniye çalkalayıcıda iyice çalkalandı. Ardından plate üstü kapatılarak 37 °C 30 dakika inkübe

edildi. İnkübasyondan sonra plate oda sıcaklığında soğutuldu ve 562 nm dalga boyunda plate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

Tablo 3-4: BSA standartlarının hazırlanması

Viyal	Dilüent (uL)	BSA (uL)	Final BSA Konsantrasyonu(ug/mL)
A	0	300 stok	2000
B	125	375 stok	1500
C	325	325 stok	1000
D	175	175 B dilüsyonu	750
E	325	325 C dilüsyonu	500
F	325	325 E dilüsyonu	250
G	325	325 F dilüsyonu	125
H	400	100 G dilüsyonu	25
I	400	0	0 (Blank)

18µl (3X) örnek üzerine 6µl LDS sample buffer (Thermo Scientific) eklenerek 95°C 5 dakika PZR cihazında denatüre edildi. Örnekler %4-12 Bis-Tris SDS-PAGE jelde kuyulara yüklendi. Color stained protein standard broad range (11-245 kDa) markerından 5µl yüklendi. Jel, 120 voltta yürütüldü. SDS-PAGE’de proteinler büyüklüğüne göre ayrıldıktan sonra PVDF membrana “i-Blot jel transfer cihazı (İnvitrogen)” kullanılarak P2 programında 7 dakikada transfer edildi. Membran ve filtre distille su ile yıkandı. Membran, bloklama solüsyonu içinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakılır. Bir saat sonra membran üzerini kaplayacak şekilde bloklama solüsyonu konuldu. Primer antikor (Rabbit, Cell Signaling Technology) 1:1000 oranında eklendi ve gece boyunca 4°C’de bekletildi. Ertesi gün membran üzerindeki bloklama solüsyonu döküldü ve yıkama aşamasına geçildi. Membran üzerine önceden hazırlanmış TBST (Tris Buffered Saline with Tween) eklendi. Membran çalkalayıcıda 5 dakika tutuldu ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. TBST döküldü ve membran üzerine 0.1 gr süt tozu (skim milk) içeren TBST döküldü. Sekonder antikor (Anti-rabbit, Cell Signaling Technology) 1:1500 oranında eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda

inkübe edildi ve yıkama aşamasına geçildi. Yıkama işlemi tekrar TBST ile (%0,1) 5 dakika çalkalayıcıda olacak şekilde yapıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Ardından görüntüleme aşamasına geçildi Görüntüleme için “Supersignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific)” kullanıldı. “Supersignal West pico luminol /enhancer solution” ve “Supersignal West Pico Plus stable peroxide solution’dan” 500’er ul alıp 1.5’luk ependorf tüpte karıştırarak working solüsyon oluşturuldu. Bu solüsyon membran üzerine dökülerek membrana tamamen yayılması sağlandı. Görüntüleme “Fusion FX7 görüntüleme (Vilber Lourmat)” cihazında yapıldı.

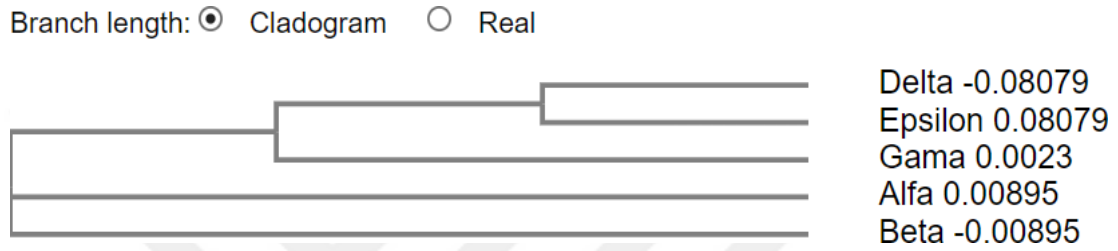


4. BULGULAR

4.1. Biyoinformatik Analizler

4.1.1. Protein

Kaspaz1 izoformlarının Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programında çoklu dizi hizalaması (MULTI SEQUENCE ALIGNMENT) sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4-1’de sunulmuştur (44).



Şekil 4-1: Kaspaz izoformlarının Clustal Omega ile yapılmış çoklu dizi hizalama ile elde edilen filogenetik ağacın şematik gösterimi.

Ayrıca aynı programla izoformların protein dizileri de hizalanarak izoformların ortak olan ve ortak olmayan bölgeleri de tespit edilmiştir (Şekil 4-2).

Delta	MADKVLKEKRK-----	11
Alfa	MADKVLKEKRKLFIRSMGEGTINGLLDELLQTRVLNKEEMKVKRENATVMDKTRALIDS	60
Beta	MADKVLKEKRKLFIRSMGEGTINGLLDELLQTRVLNKEEMKVKRENATVMDKTRALIDS	60
Gama	MADKVLKEKRK-----	11
Epsilon	-----	0
Delta	-----LFIRSMGEAPQAVQDN	27
Alfa	VIPKGAQACQICITYICEEDSYLAGTLGLSADQTSQVLSQGLSSFPAPQAVQDN	120
Beta	VIPKGAQACQICITYICEEDSYLAGTLGLS-----APQAVQDN	99
Gama	-----LFIRSMGEAPQAVQDN	27
Epsilon	-----	0
Delta	PAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNEEFDSIPRRT	87
Alfa	PAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNEEFDSIPRRT	180
Beta	PAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNEEFDSIPRRT	159
Gama	PAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNEEFDSIPRRT	87
Epsilon	-----	0
Delta	GAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLASDMTTELEAFahrPEHKTSdstflVfMSHGIR	147
Alfa	GAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLASDMTTELEAFahrPEHKTSdstflVfMSHGIR	240
Beta	GAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLASDMTTELEAFahrPEHKTSdstflVfMSHGIR	219
Gama	GAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLASDMTTELEAFahrPEHKTSdstflVfMSHGIR	147
Epsilon	-----	0
Delta	EGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIQACRGD-----	195
Alfa	EGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIQACRGDSPGVVWFKDSVG	300
Beta	EGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIQACRGDSPGVVWFKDSVG	279
Gama	EGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIQACRGDSPGVVWFKDSVG	207
Epsilon	-----	0
Delta	-----NVSWRHPTMGsvFIGRLIEHMqEY	219
Alfa	VSGNLSLPTTEEFEDDAIKKAHIEKDFIAFCSTPDNVSWRHPTMGsvFIGRLIEHMqEY	360
Beta	VSGNLSLPTTEEFEDDAIKKAHIEKDFIAFCSTPDNVSWRHPTMGsvFIGRLIEHMqEY	339
Gama	VSGNLSLPTTEEFEDDAIKKAHIEKDFIAFCSTPDNVSWRHPTMGsvFIGRLIEHMqEY	267
Epsilon	-----MADKVLKEKRKLFIRSMGEDNVSWRHPTMGsvFIGRLIEHMqEY	44

Delta	ACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPPTTERVTLTRCFYLFPGH	263
Alfa	ACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPPTTERVTLTRCFYLFPGH	404
Beta	ACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPPTTERVTLTRCFYLFPGH	383
Gama	ACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPPTTERVTLTRCFYLFPGH	311
Epsilon	ACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPPTTERVTLTRCFYLFPGH	88

Şekil 4-2: Kaspaz-1 izoformlarına ait protein dizilerinin Clustal Omega ile hizalanması.

Kaspaz-1 izoformlarının DNA dizileri de CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment programıyla hizalanmıştır (Şekil 4-3)

Delta	-----	0
Alfa	CAGTCACACAAGAAGGGAGGAGAGAGAAAAGCCATGGCCGACAAGGTCCTGAAGGAGAAGAG	60
Beta	CAGTCACACAAGAAGGGAGGAGAGAGAGAAAAGCCATGGCCGACAAGGTCCTGAAGGAGAAGAG	60
Gama	-----	0
Epsilon	-----	0
Delta	-----	0
Alfa	AAAGCTGTTTATCCGTTCCATGGGTGAAGGTACAATAAATGGCTTACTGGATGAATTATT	120
Beta	AAAGCTGTTTATCCGTTCCATGGGTGAAGGTACAATAAATGGCTTACTGGATGAATTATT	120
Gama	-----	0
Epsilon	-----	0
Delta	-----	0
Alfa	ACAGACAAGGGTGCTGAACAAGGAAGAGATGGAGAAAGTAAAACGTGAAAATGCTACAGT	180
Beta	ACAGACAAGGGTGCTGAACAAGGAAGAGATGGAGAAAGTAAAACGTGAAAATGCTACAGT	180
Gama	-----	0
Epsilon	-----	0
Delta	-----	0
Alfa	TATGGATAAGACCCGAGCTTTGATTGACTCCGTTATTCCGAAAGGGGCACAGGCATGCCA	240
Beta	TATGGATAAGACCCGAGCTTTGATTGACTCCGTTATTCCGAAAGGGGCACAGGCATGCCA	240
Gama	-----	0
Epsilon	-----	0
Delta	-----CAGTCACACAAGAAGGGAGGAGA-----	23
Alfa	AATTTGCATCACATACATTTGTGAAGAAGACAGTTACCTGGCAGGGACGCTGGGACTCTC	300
Beta	AATTTGCATCACATACATTTGTGAAGAAGACAGTTACCTGGCAGGGACGCTGGGACTCTC	300
Gama	-----CAGTCACACAAGAAGGGAGGAGA-----	23
Epsilon	-----	0

Delta	--GAAAAGCCATGGCCGACAAGGTCCTGAAGGAGAAGAGAAAGCTGTTTATCCGTTCCAT	81
Alfa	AGCAGATCAAACATCTGGAAATTACCTTAATATGCAAGACTCTCAAGGAGTACTTTCTTC	360
Beta	AGCA-----	304
Gama	--GAAAAGCCATGGCCGACAAGGTCCTGAAGGAGAAGAGAAAGCTGTTTATCCGTTCCAT	81
Epsilon	-----	0
Delta	GGGTGAAGCTCCTCAGGCAGTGCAGGACAACCCAGCTATGCCACATCCTCAGGCTCAGA	141
Alfa	CTTTCAGCTCCTCAGGCAGTGCAGGACAACCCAGCTATGCCACATCCTCAGGCTCAGA	420
Beta	-----GCTCCTCAGGCAGTGCAGGACAACCCAGCTATGCCACATCCTCAGGCTCAGA	357
Gama	GGGTGAAGCTCCTCAGGCAGTGCAGGACAACCCAGCTATGCCACATCCTCAGGCTCAGA	141
Epsilon	-----	0
Delta	AGGGAATGTCAAGCTTTGCTCCCTAGAGAAGCTCAAAGGATATGGAAACAAAAGTCGGC	201
Alfa	AGGGAATGTCAAGCTTTGCTCCCTAGAGAAGCTCAAAGGATATGGAAACAAAAGTCGGC	480
Beta	AGGGAATGTCAAGCTTTGCTCCCTAGAGAAGCTCAAAGGATATGGAAACAAAAGTCGGC	417
Gama	AGGGAATGTCAAGCTTTGCTCCCTAGAGAAGCTCAAAGGATATGGAAACAAAAGTCGGC	201
Epsilon	-----	0
Delta	AGAGATTTATCCAATAATGGACAAGTCAAGCCGCACACGTCTTGCTCTCATTATCTGCAA	261
Alfa	AGAGATTTATCCAATAATGGACAAGTCAAGCCGCACACGTCTTGCTCTCATTATCTGCAA	540
Beta	AGAGATTTATCCAATAATGGACAAGTCAAGCCGCACACGTCTTGCTCTCATTATCTGCAA	477
Gama	AGAGATTTATCCAATAATGGACAAGTCAAGCCGCACACGTCTTGCTCTCATTATCTGCAA	261
Epsilon	-----	0
Delta	TGAAGAATTTGACAGTATTCTAGAGAAGTGGAGCTGAGGTTGACATCACAGGCATGAC	321
Alfa	TGAAGAATTTGACAGTATTCTAGAGAAGTGGAGCTGAGGTTGACATCACAGGCATGAC	600
Beta	TGAAGAATTTGACAGTATTCTAGAGAAGTGGAGCTGAGGTTGACATCACAGGCATGAC	537
Gama	TGAAGAATTTGACAGTATTCTAGAGAAGTGGAGCTGAGGTTGACATCACAGGCATGAC	321
Epsilon	-----	0

Delta	AATGCTGCTACAAAATCTGGGGTACAGCGTAGATGTGAAAAAAAAATCTCACTGCTTCGGA	381
Alfa	AATGCTGCTACAAAATCTGGGGTACAGCGTAGATGTGAAAAAAAAATCTCACTGCTTCGGA	660
Beta	AATGCTGCTACAAAATCTGGGGTACAGCGTAGATGTGAAAAAAAAATCTCACTGCTTCGGA	597
Gama	AATGCTGCTACAAAATCTGGGGTACAGCGTAGATGTGAAAAAAAAATCTCACTGCTTCGGA	381
Epsilon	-----	0
Delta	CATGACTACAGAGCTGGAGGCATTTGCACACCGCCCAGAGCACAAAGACCTCTGACAGCAC	441
Alfa	CATGACTACAGAGCTGGAGGCATTTGCACACCGCCCAGAGCACAAAGACCTCTGACAGCAC	720
Beta	CATGACTACAGAGCTGGAGGCATTTGCACACCGCCCAGAGCACAAAGACCTCTGACAGCAC	657
Gama	CATGACTACAGAGCTGGAGGCATTTGCACACCGCCCAGAGCACAAAGACCTCTGACAGCAC	441
Epsilon	-----	0
Delta	GTTCTGCTGTTTCATGTCTCATGGTATTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAACACTCTGA	501
Alfa	GTTCTGCTGTTTCATGTCTCATGGTATTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAACACTCTGA	780
Beta	GTTCTGCTGTTTCATGTCTCATGGTATTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAACACTCTGA	717
Gama	GTTCTGCTGTTTCATGTCTCATGGTATTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAACACTCTGA	501
Epsilon	-----	0
Delta	GCAAGTCCCAGATATACTACAACCTCAATGCAATCTTTAACATGTTGAATACCAAGAACTG	561
Alfa	GCAAGTCCCAGATATACTACAACCTCAATGCAATCTTTAACATGTTGAATACCAAGAACTG	840
Beta	GCAAGTCCCAGATATACTACAACCTCAATGCAATCTTTAACATGTTGAATACCAAGAACTG	777
Gama	GCAAGTCCCAGATATACTACAACCTCAATGCAATCTTTAACATGTTGAATACCAAGAACTG	561
Epsilon	-----	0
Delta	CCCAAGTTTGAAGGACAAACCGAAGGTGATCATCATCCAGGCCTGCCGTGGTG-----	614
Alfa	CCCAAGTTTGAAGGACAAACCGAAGGTGATCATCATCCAGGCCTGCCGTGGTGACAGCCC	900
Beta	CCCAAGTTTGAAGGACAAACCGAAGGTGATCATCATCCAGGCCTGCCGTGGTGACAGCCC	837
Gama	CCCAAGTTTGAAGGACAAACCGAAGGTGATCATCATCCAGGCCTGCCGTGGTGACAGCCC	621
Epsilon	-----	0

Delta	-----	614
Alfa	TGGTGTGGTGTGGTTTAAAGATTCACTAGGAGTTTCTGGAAACCTATCTTTACCAACTAC	960
Beta	TGGTGTGGTGTGGTTTAAAGATTCACTAGGAGTTTCTGGAAACCTATCTTTACCAACTAC	897
Gama	TGGTGTGGTGTGGTTTAAAGATTCACTAGGAGTTTCTGGAAACCTATCTTTACCAACTAC	681
Epsilon	-----CAGTCACACAAG	12
Delta	-----	614
Alfa	AGAAGAGTTTGAGGATGATGCTATTAAGAAAGCCACATAGAGAAGGATTTTATCGCTTT	1020
Beta	AGAAGAGTTTGAGGATGATGCTATTAAGAAAGCCACATAGAGAAGGATTTTATCGCTTT	957
Gama	AGAAGAGTTTGAGGATGATGCTATTAAGAAAGCCACATAGAGAAGGATTTTATCGCTTT	741
Epsilon	AAGGGAGGAGAGAAAAGCCATGGCCGACAAGGTCCTGAAGGAGAAGAGAAAGCTGTTTAT	72
Delta	-----ATAATGTTTCTTGGAGACATCCCACAATGGGCTCTGTTTTTAT	657
Alfa	CTGCTCTTCCACACCAGATAATGTTTCTTGGAGACATCCCACAATGGGCTCTGTTTTTAT	1080
Beta	CTGCTCTTCCACACCAGATAATGTTTCTTGGAGACATCCCACAATGGGCTCTGTTTTTAT	1017
Gama	CTGCTCTTCCACACCAGATAATGTTTCTTGGAGACATCCCACAATGGGCTCTGTTTTTAT	801
Epsilon	CCGTTCCATGGGTGAAGATAATGTTTCTTGGAGACATCCCACAATGGGCTCTGTTTTTAT	132

Delta	TGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATATGCCTGTTCTGTGATGTGGAGGAAATTTT	717
Alfa	TGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATATGCCTGTTCTGTGATGTGGAGGAAATTTT	1140
Beta	TGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATATGCCTGTTCTGTGATGTGGAGGAAATTTT	1077
Gama	TGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATATGCCTGTTCTGTGATGTGGAGGAAATTTT	861
Epsilon	TGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATATGCCTGTTCTGTGATGTGGAGGAAATTTT	192

Delta	CCGCAAGGTTTCGATTTTCATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAGATGCCACCACTGA	777
Alfa	CCGCAAGGTTTCGATTTTCATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAGATGCCACCACTGA	1200
Beta	CCGCAAGGTTTCGATTTTCATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAGATGCCACCACTGA	1137
Gama	CCGCAAGGTTTCGATTTTCATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAGATGCCACCACTGA	921
Epsilon	CCGCAAGGTTTCGATTTTCATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAGATGCCACCACTGA	252

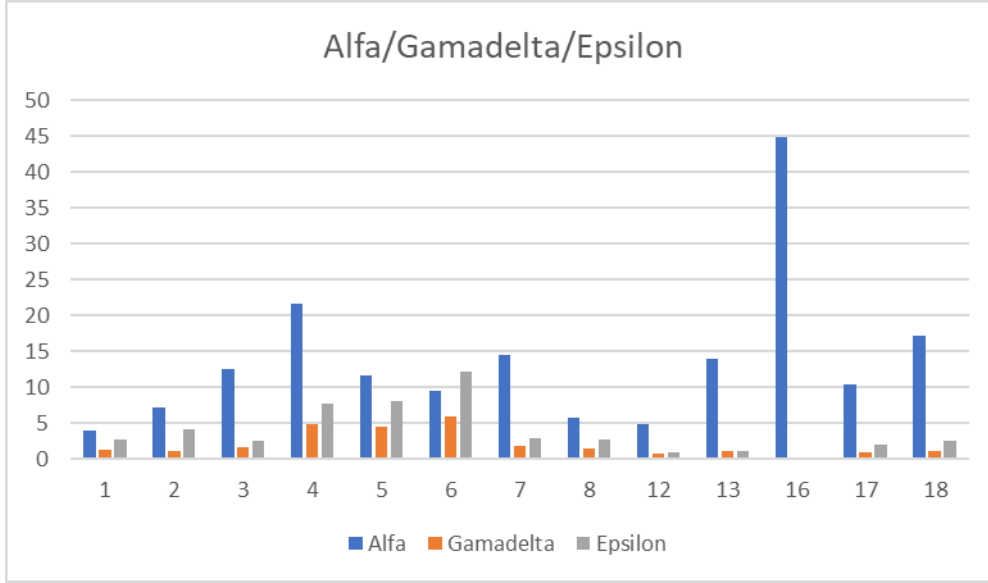
Delta	AAGAGTGACTTTGACAAGATGTTTCTACCTCTTCCCAGGACATTAATAAGGAACTGT	837
Alfa	AAGAGTGACTTTGACAAGATGTTTCTACCTCTTCCCAGGACATTAATAAGGAACTGT	1260
Beta	AAGAGTGACTTTGACAAGATGTTTCTACCTCTTCCCAGGACATTAATAAGGAACTGT	1197
Gama	AAGAGTGACTTTGACAAGATGTTTCTACCTCTTCCCAGGACATTAATAAGGAACTGT	981
Epsilon	AAGAGTGACTTTGACAAGATGTTTCTACCTCTTCCCAGGACATTAATAAGGAACTGT *****	312
Delta	ATGAATGTCTGTGGGCAGGAAGTGAAGAGATCCTTCTGTAAAGGTTTTGGAATTATGTC	897
Alfa	ATGAATGTCTGTGGGCAGGAAGTGAAGAGATCCTTCTGTAAAGGTTTTGGAATTATGTC	1320
Beta	ATGAATGTCTGTGGGCAGGAAGTGAAGAGATCCTTCTGTAAAGGTTTTGGAATTATGTC	1257
Gama	ATGAATGTCTGTGGGCAGGAAGTGAAGAGATCCTTCTGTAAAGGTTTTGGAATTATGTC	1041
Epsilon	ATGAATGTCTGTGGGCAGGAAGTGAAGAGATCCTTCTGTAAAGGTTTTGGAATTATGTC *****	372
Delta	TGCTGAATAATAAACTTTTTTGAATAATAAATCTGGTAGAAAAATGAAACTTGTCCTC	957
Alfa	TGCTGAATAATAAACTTTTTTGAATAATAAATCTGGTAGAAAAATGAAACTTGTCCTC	1380
Beta	TGCTGAATAATAAACTTTTTTGAATAATAAATCTGGTAGAAAAATGAAACTTGTCCTC	1317
Gama	TGCTGAATAATAAACTTTTTTGAATAATAAATCTGGTAGAAAAATGAAACTTGTCCTC	1101
Epsilon	TGCTGAATAATAAACTTTTTTGAATAATAAATCTGGTAGAAAAATGAAACTTGTCCTC *****	432
Delta	ATTTTTCTCCCACTGAAGAAACAGGGACTGGAACCTAGAGTGACTAAGGAATTT	1013
Alfa	ATTTTTCTCCCACTGAAGAAACAGGGACTGGAACCTAGAGTGACTAAGGAATTT	1436
Beta	ATTTTTCTCCCACTGAAGAAACAGGGACTGGAACCTAGAGTGACTAAGGAATTT	1373
Gama	ATTTTTCTCCCACTGAAGAAACAGGGACTGGAACCTAGAGTGACTAAGGAATTT	1157
Epsilon	ATTTTTCTCCCACTGAAGAAACAGGGACTGGAACCTAGAGTGACTAAGGAATTT *****	488

Şekil 4-3: Kaspaz-1 izoformlarının DNA dizilerinin Clustal Omega programıyla hizalanması

Alfa izoformu beta izoformunu tamamen içermektedir. Bundan dolayı sadece beta izoformunu saptayacak şekilde primer tasarlanamadı. Beta ile alfa izoformu için ortak primer yapılmaya çalışıldığında ya başka CARD domaini içeren genlere ya da gama ve delta izoformlarına da komplementerlik gösterdi. Dolayısıyla sadece beta izoformuna spesifik primer tasarlamak mümkün olmadı. Aynı şekilde gama ve delta izoformlarını ayırmak için gama ve delta izoformlarının farklılık gösterdiği bölgeye özgü tasarlanan primerler alfa ve beta izoformuna da komplementerlik gösterir. Bundan dolayı gama ve delta izoformlarına ortak primer tasarlandı. Bunun dışında sadece epsilon transkriptini çoğaltacak şekilde epsilona özgü primerler de tasarlandı.

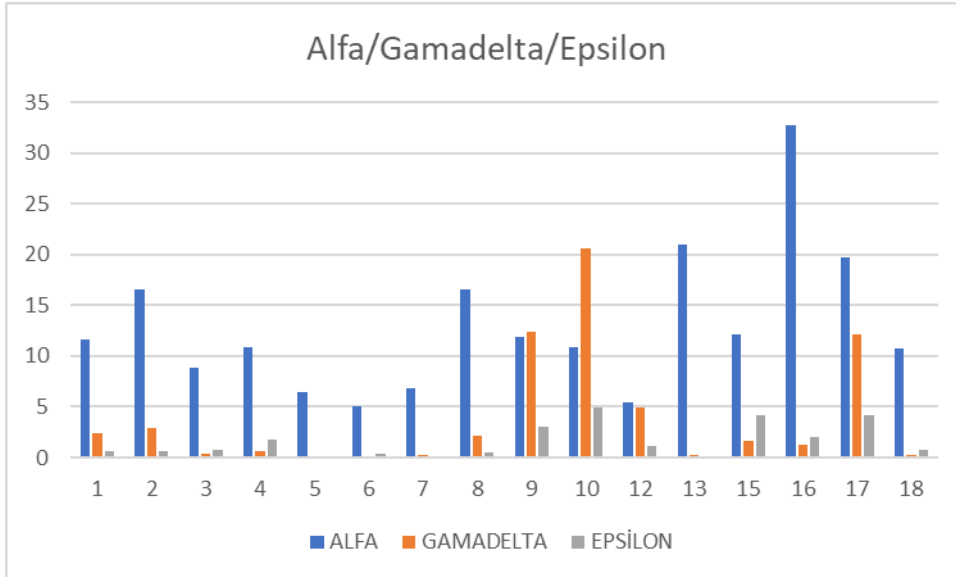
4.2. Kantitatif PZR Sonuçları

Ataklı ve ataksız hastalardan izole edilen nötrofil ve periferik kan mononükleer hücrelerinde Kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyonu analiz edildi. İzoformların mRNA ekspresyonları Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'te verilmiştir.



Şekil 4-4: Hastalara ait nötrofil örneklerinin Kantitatif PZR sonucu elde edilen kaspaz1 izoformlarının ekspresyon grafiği.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 12, 13, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı olan hasta örnekleri.



Şekil 4-5: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücre örneklerinin Kantitatif PZR sonucu elde edilen kaspaz1 izoformlarının ekspresyon grafiği.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı hasta örnekleridir.

Kantitatif PZR sonuçlarına göre nötrofillerde kaspaz1 alfa izoformunun ekspresyonu ataklı hastalarda (4,86-44,79 arasında), ataksız hastalara (3,87-21,55) göre daha yüksek bulundu. Delta-gama izoformunun mRNA ekspresyonu ise ataklı hastalarda (1,46-0,05 arasında) ataksız hastalara (1,14-5,86 arasında) göre daha düşük olduğu saptandı. Epsilon izoformu da ataklılarda (0,1-2,76 arasında) ataksızlara (2,60-12,21 arasında) göre daha düşük bulundu (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Hastalara ait nötrofillerde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon değerleri.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 12, 13, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı olan hasta örnekleri.

Örnek No.	Alfa	Delta-gama	Epsilon
1	3,87	1,34	2,64
2	7,21	1,14	4,21
3	12,60	1,69	2,60
4	21,55	4,82	7,78
5	11,67	4,42	8,02
6	9,55	5,86	12,21
7	14,47	1,87	2,90
8	5,70	1,46	2,76
12	4,86	0,81	0,95
13	13,98	1,02	1,11
16	44,79	0,05	0,1
17	10,45	1	2
18	17,14	1,12	2,5

Nötrofillerde 6 numaralı ataksız hasta hariç genel olarak kaspaz1'in alfa izoformu mRNA ekspresyonu diğer izoformlara göre daha yüksek bulundu (Tablo 4-1 ve Tablo 4-2). 6 numaralı hastada ise kaspaz1 alfa izoformunun ekspresyonu delta-gama ve epsilon izoformuna göre daha düşük bulundu (Tablo 4-1). 6 numaralı ataksız hasta haricinde alfa izoformunun mRNA ekspresyonu, delta-gama izoformları ile kıyaslandığında ataklı hastaların nötrofillerinde (3,89-817,46 kat) ataksızlara (1,63-7,75 kat) göre daha fazla olduğu görüldü. Alfa izoformunun ekspresyonu, epsilon izoformuyla

kıyaslandığında ise ataklı hastalarda (2,06-450,38 kat), ataksız hastalara (1,47-4,99 kat) göre daha fazla artmış bulundu (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Hastalara ait nötrofillerde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon oranları.
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 12, 13, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı olan hasta örnekleri.

Örnek No.	Alfa/Delta-gama	Alfa/Epsilon	Delta-gama/Epsilon
1	2,89	1,47	0,50
2	6,3	1,71	0,27
3	7,46	4,84	0,65
4	4,47	2,77	0,62
5	2,64	1,45	0,55
6	1,63	0,78	0,48
7	7,75	4,99	0,64
8	3,89	2,06	0,53
12	5,98	5,13	0,86
13	13,69	12,55	0,92
16	817,46	450,38	0,55
17	10,37	5,20	0,50
18	15,24	6,87	0,45

Periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 alfa izoformunun mRNA ekspresyonu ataklı hastalarda (5,40-32,78 arasında), ataksız hastalara (5,03-16,56 arasında) göre daha yüksek bulundu. Delta-gama izoformunun mRNA ekspresyonu da ataklı hastalarada (0,29-20,6 arasında) ataksız hastalara (0,05-2,96 arasında) göre daha yüksek olduğu görüldü. Aynı şekilde epsilon izoformu da ataklılarda (0.1-3 arasında) ataksızlara (0,05-1,8 arasında) göre daha düşük bulundu (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon değerleri.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı hasta örnekleridir.

Örnek No.	Alfa	Delta-gama	Epsilon
1	11,67	2,35	0,7
2	16,56	2,96	0,63
3	8,9	0,35	0,82
4	10,89	0,6	1,8
5	6,40	0,05	0,13
6	5,03	0,16	0,36
7	6,84	0,29	0,05
8	16,56	2,14	0,53
9	11,91	12,42	3
10	10,93	20,6	5
12	5,4	4,92	1,14
13	21,04	0,3	0,1
15	12,12	1,68	4,18
16	32,78	1,21	1,98
17	19,77	12,17	4,11
18	10,7	0,3	0,79

Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1'in alfa izoformu mRNA ekspresyonu 9 ve 10 numaralı ataklı hasta dışında diğer izoformlarından daha yüksek bulundu (Tablo 4-4). Kaspaz1 alfa izoformunun mRNA ekspresyonu, delta-gama izoformuyla kıyaslandığında ataklı hastalarda (0,53-69,07 kat) ataksızlara (4,96-128,89 kat) göre daha az olduğu görüldü. Alfa izoformu epsilon izoformu ile kıyaslandığında ise ataklı hastalarda (2,19-222 kat), ataksız hastalara (6,08-126,24 kat) göre daha fazla artmış bulundu (Tablo 4-4).

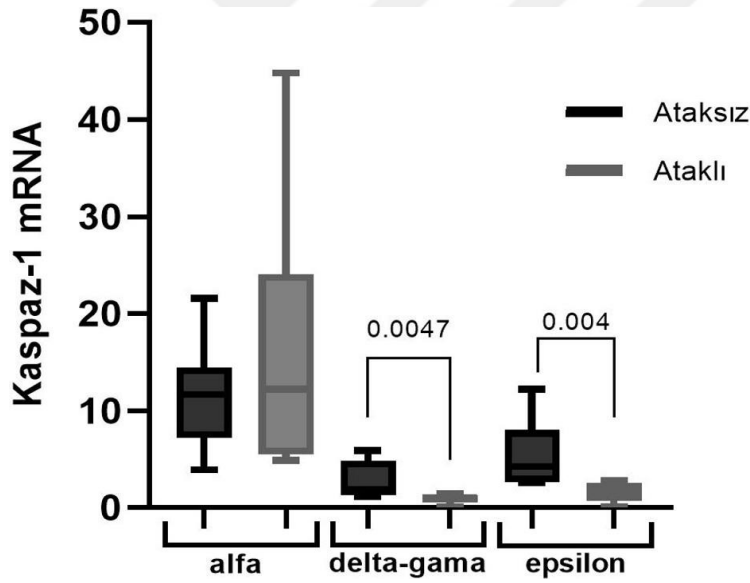
Tablo 4-4: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerin kaspaz1 izoformlarının ekspresyon oranları.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı örnekler ataksız; 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18 numaralı örnekler ataklı hasta örnekleridir.

Örnek No.	Alfa/Delta-gama	Alfa/Epsilon	Delta-gama/Epsilon
1	4,96	16,85	3,4
2	5,6	26,17	4,67
3	25,37	10,89	0,43
4	18,13	6,08	0,33
5	128,89	48,50	0,38
6	30,91	13,98	0,45

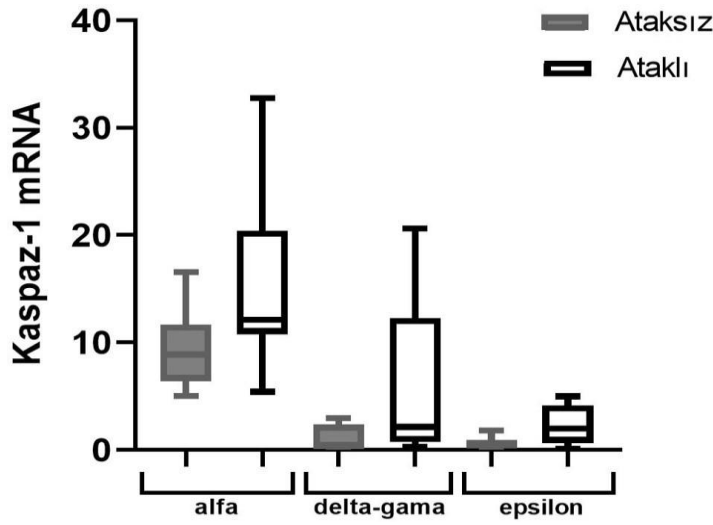
7	23,92	126,24	5,28
8	7,73	31,23	4,04
9	0,96	3,97	4,14
10	0,53	2,19	4,13
12	1,1	4,74	4,32
13	69,07	222,09	3,21
15	7,36	2,9	0,4
16	27,06	16,56	0,61
17	1,62	4,8	2,96
18	36	13,64	0,38

Hastalara ait nötrofillerde kaspaz1 alfa izoformunun mRNA ekspresyonu açısından ataklı hastalarla ataksızlar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmadı ($p=0,835$). Delta-gama izoformunun ataklı hastalarda ataksızlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış bulundu ($p=0,0047$). Epsilon izoformunun da ataklı hastalarda azaldığı görüldü ($p=0,004$) (Şekil 4-6 ve Tablo 4-5)



Şekil 4-6: Hastalara ait nötrofillerde Kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyonları

Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde ise kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyonu açısından ataklı hastalarla ataksız hastalar arasında istatistiksel fark bulunamadı ($P>0,05$) (Şekil 4-7 ve Tablo 4-5).



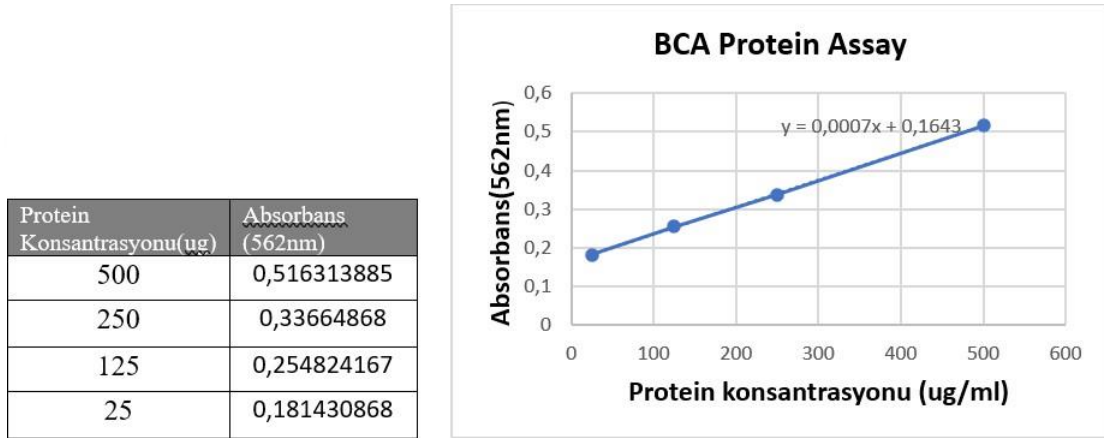
Şekil 4-7: Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 mRNA izoformlarının ekspresyonları

Tablo 4-5: Ataklı ve ataksız hasta örneklerinde kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

Hücre Tipi	İzoform	Grup	n	Median ekspresyon değeri	Mean ekspresyon değeri	Minimum-Maksimum	P değeri
Nötrofil	Kaspaz1 alfa	Ataksız	7	11,67	11,56	3,87-21,55	0,835
		Ataklı	6	12,21	16,15	4,85-44,78	
	Kaspaz1 delta-gama	Ataksız	7	1,87	3,02	1,14-5,85	0,0047
		Ataklı	6	1,01	0,91	0,05-1,46	
	Kaspaz1 epsilon	Ataksız	7	4,21	5,76	12,21-2,63	0,004
		Ataklı	6	1,56	1,57	0,09-2,76	
Periferik kan mononükleer hücreleri	Kaspaz1 alfa	Ataksız	7	8,91	9,47	5,02-16,56	0,0583
		Ataklı	9	12,13	15,69	5,40-32,78	
	Kaspaz1 delta-gama	Ataksız	7	0,35	0,97	0,04-2,95	0,0712
		Ataklı	9	2,14	6,19	0,29-20,60	
	Kaspaz1 epsilon	Ataksız	7	0,63	0,64	0,05-1,79	0,0549
		Ataklı	9	1,98	2,31	0,09-4,99	

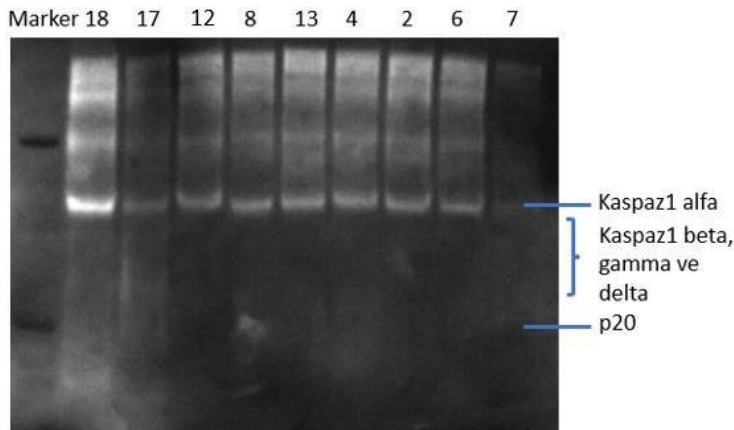
4.3. Western Blot Sonuçları

Western blot için altı ataksız (2, 3, 4, 5, 6, 7) ve altı ataklı (8, 12, 13, 16, 17, 18) hasta örneği kullanıldı. Western blot için 2,5 milyon hücre kullanıldı. SDS-PAGE jele yüklenecek protein miktarını eşitlemek için Bisinkoninik asit (BCA) deneyi ile protein miktarları belirlendi. BCA deneylerinde standartlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılarak BCA eğrisi çizildi (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: BCA deneylerinde elde edilen absorbans değerleri ve standard eğrisi

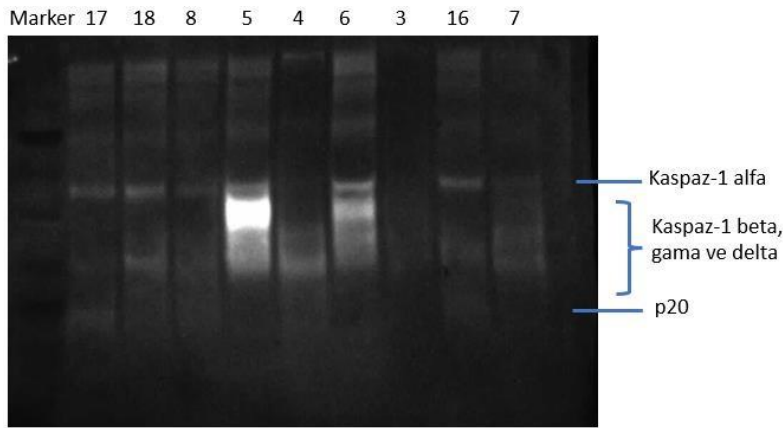
Kaspaz1 protein ekspresyonunun analizi için hazırlanmış nötrofil hücreleri ile kaspaz1 izoformlarına özgü antikorla western blot yapıldı (Şekil 4-9). Nötrofillerde kaspaz1 alfa izoformunun eksprese olduğu gösterildi. Ataklı ve ataksız hastalar arasında ekspresyon açısından belirgin bir fark görülmedi



Şekil 4-9: Nötrofil hücreleriyle kaspaz1 izoformlarına özgü antikorlarla yapılan western blot sonuçları.

18, 17, 12, 8 ve 13. ataklı, 4, 2, 6 ve 7. ataksız hastalara ait nötrofil örnekleri

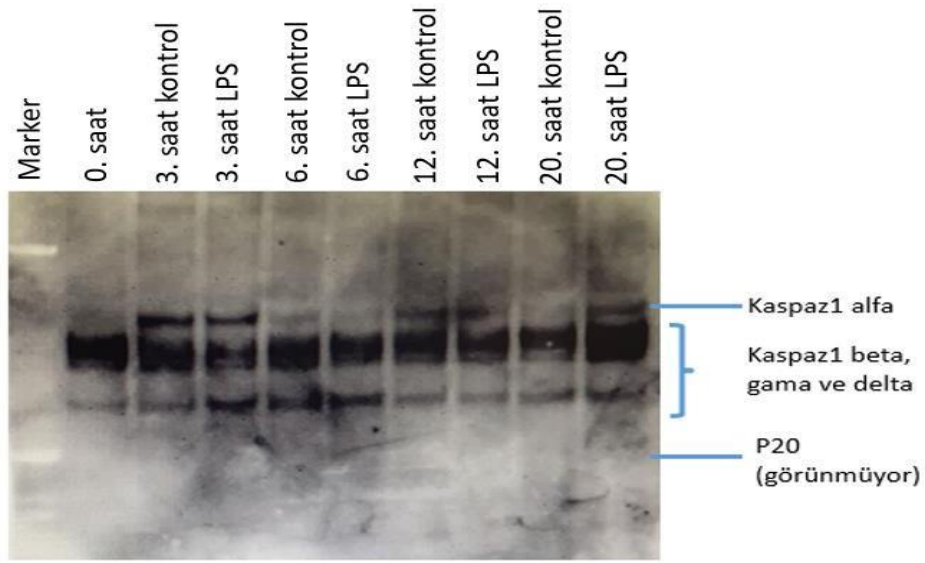
Kaspaz1 izoformlarına spesifik antikorla hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerinin örneklerinde western blot sonucu Şekil 4-10'da verilmiştir. İzoformların ekspresyon paternleri hastalar arasında farklılık gösterdiği belirlendi.



Şekil 4-10: Periferik kan mononükleer hücre örnekleri kullanılarak kaspaz1 izoformlarına özgü antikorlarla gerçekleştirilen Western Blot sonuçları

17, 18, 8 ve 16 ataklı; 5, 4, 6, 3 ve 7 ataksız hastalara ait nötrofil örnekleri

THP-1 hücreleri kültür ortamında LPS ile muamele edilderek, western blot ile kaspaz1 ekspresyonunda değişiklik olup olmadığı araştırıldı ve LPS'nin THP1 hücrelerinde kaspaz1 ekspresyonunu etkilemediği görüldü (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: LPS ile muamele edilmiş THP-1 hücreleriyle kaspaz1 izoformlarına spesifik antikorla yapılan western blot sonucu.

Kaspaz-1'e ait izoformların en büyüğü alfa izoformu olup 45 kDa'luk kütleyle sahiptir. Alfa izoformundan sonra en büyük izoform beta izoformu olup 42 kDa'dur. Üçüncü büyük kaspaz -1 izoformu olan gama izoformu da 35 kDa, en küçük izoformu olan delta ise 29 kDa'dur

5. TARTIŞMA

En yaygın ve bilinen en eski periyodik ateş sendromlarından olan Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (45) otozomal resesif (46) otoinflamatuvar bir hastalık olup doğal bağışıklık sistemde meydana gelen bozukluk sonucu ortaya çıkmaktadır (45). Sefarad Yahudileri, Ermeniler, Türkler ve Araplar'da AAA prevalansı yüksek olmakla birlikte dünyanın diğer bölgelerinde de düşük sıklıkta görülmektedir (47). AAA, pirin/marenostrin proteinini kodlayan (47) MEFV geninde meydana gelen nokta mutasyonları ile ilişkili bir hastalıktır (46). Bu protein, proinflamatuvar sitokinler olan IL-1b ve IL-18'in kesilmesinde ve salınmasında önemli rol oynayan pirin inflamazomun önemli bir parçasıdır (45). Mutasyona uğramış pirin, kaspaz1'i aktive ederek (47) kontrolsüz interlökin (IL-1) salgılanması sonucu aşırı bir inflamatuvar yanıtı neden olur (46).

AAA, peritonit, plörit, sinoviyal atak ve tekrarlayan ateş atakları olarak kendini gösteren bir hastalıktır (26,48). Ayrıca farklı dokularda anormal beta-tabaka fibriller protein birikimi olan amiloidoza yol açıp ölüm oranlarında artışa neden olabilir (47). Bugüne kadar 300'den fazla AAA varyantı tanımlanmış olmakla birlikte (49), pirinin bazı ekzonlarında (ekzon1, 2, 3 ve 9) bir veya birkaç tane mutasyon görülürken bazılarında da (ekzon 4, 6, 7 ve 8) ise mutasyon bulunmamaktadır (23). Ekzon 10 üzerinde de M680I, M694V, M694I, V726A, R761H, A744S ve I692del mutasyonları bulunmaktadır. Bu mutasyonlar patojenik varyantlar olarak tanımlanmaktadır. E148Q mutasyonu ise ekzon 2 üzerinde görülmekle birlikte patojenik etkiye sahip olup olmadığı tartışmalıdır (20). Ekzon 10 üzerinde bulunan mutasyonlara sahip AAA hastaların (özellikle M694V mutasyonu için homozigot olanlar) şiddetli bir fenotipe sahip olduğu bilinmektedir. Bu hastalar daha erken başlangıçlı olup daha sık atak geçirir ve daha yüksek dozlarda kolşisine ihtiyaç duymaktadırlar. M694V mutasyonu tüm AAA mutasyonlarında görülen en yaygın ve en patojenik varyanttır. M680I varyantı Türklerde ve Ermenilerde, V726A varyantı Aşkenazi Yahudilerinde ve M694I varyantı ise Araplarda daha yaygın olan mutasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (45,50,51). Ayrıca klinik olarak AAA tanısı konulmuş hastaların üçte birinden fazlası ya MEFV geni ile ilişkili heterozigot mutasyon taşıyıcı ya da bu mutasyonu taşımamaktadır (45).

AAA patogenezinde önemli rol oynayan IL-1b'nin aktivasyon ve salgılanmasına neden olan kaspaz1, MEFV geni tarafından kodlanan pirin (marenostrin) proteinin ASC ile

etkileşerek pirin inflamazom kompleksinin oluşmasıyla aktifleşir (52). Kaspaz1 aktivasyonuna bağlı olarak, proinflamatuvar araçların (IL-1 β ve IL-18) olgunlaşması ve salgılanması tetiklenerek bağışıklık sistemi aktive olur ve antimikrobiyal savunma ile sonuçlanan piroptoz indüklenir. İnflamazom kompleksinin aktive olması sonucu p20 ve p10 alt birimleri ortaya çıkmakta (53) ve bu birimlerden meydana gelen p20/p10 tetramer yapısının hücrelerde bulunan aktif kaspaz1 türü olduğu varsayılmaktadır (54). Boucher ve ark. (2018) aktif kaspaz1'i izole etmek için yaptıkları çalışma sonucunda beklenenin aksine p20/p10 izoformu yerine p33/p10 izoformunun aktif türü olduğunu ileri sürmüşlerdir. (43,55). Chae ve ark. (2008) sağlıklı kontrollere kıyasla AAA hastalarından alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 tarafından kesilen pirin miktarında önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir (56). Ayrıca, periferik kan mononükleer hücrelerinde AAA ile ilişkili B30.2 mutasyonlarını içeren mutant pirin proteinleri, kaspaz1 tarafından normal (wild type) pirinden daha verimli bir şekilde (% 70 oranında) parçalandığı da gösterilmiştir (57). Kaspaz1'in alfa, beta, gama, delta, epsilon ve zeta olmak üzere farklı izoformları bulunmaktadır. Bu çalışmadaki temel amacımız da AAA hastalarında atak sırasında ve ataksız dönemde aktif kaspaz1 izoformlarının ekspresyonunu analiz etmektir.

Ataklı ve ataksız dönemdeki AAA hastalarda kaspaz1 izoformlarının mRNA ve protein ekspresyonlarını karşılaştırmak için qRT-PZR yapıldı. AAA patogenezinde nötrofiller önemli rol oynadığı için hastalardan izole edilen nötrofillerde ve periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1 izoformlarının ekspresyon seviyesi ayrı ayrı analiz edilmiştir. AAA, inflamasyonun olduğu bölgeye büyük miktarda polimorfonükleer nötrofil (PMN) akışının aracılık ettiği, kendi kendini sınırlayan yoğun iltihaplanma dönemleri ile karakterize edilir (58). Pirin proteini özellikle nötrofiller (Polimorfonükleer hücreler), eozinofiller ve monositlerde eksprese olmaktadır (59). Kendi kendini sınırlayan inflamatuvar atakların temel etkeni nötrofiller olsa da fenotipik ve fonksiyonel özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir (60). Ayrıca hasta nötrofillerinin in vitro ortamda IL-1 β salgıladığı ve artmış kaspaz1 aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (61,62). Bu nedenle hastalardan nötrofiller izole edilerek kaspaz1 izoform ekspresyonları nötrofillerde analiz edildi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında ataklı ve ataksız hasta farkı olmaksızın tüm hastalarda alfa izoformunun mRNA ekspresyonu delta-gama ve epsilon izoformlarına göre daha yüksek bulundu (Tablo 4-1, Tablo 4-2 ve Şekil 4-9). Ataklı hastaların nötrofillerinde alfa izoformunun mRNA ekspresyonu

ataksız hastalara göre daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,835$, Tablo 4-5). Fakat delta-gama ve epsilon izoformlarının mRNA ekspresyonları ataksız hastalarda ataklılara göre istatistiksel olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.0047$ ve $p=0.004$, Şekil 4-4). Manukyan ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada AAA ataklı hastalarda kaspaz1 seviyesinin ataksız olanlara göre artmış olduğu gösterilmiştir. (63). Fakat literatüre bakıldığında kaspaz1 izoformlarının ekspresyonu ile AAA arasındaki ilişkiye dair herhangi bir veriye ulaşılamadı.

Hasta kanlarından elde edilen periferik kan mononükleer hücre örneklerinde de qRT-PZR yapılarak kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi. Periferik kan mononükleer hücrelerinde alfa izoformunun ekspresyonu ataksız hastaların tümünde ve ataklı hastaların büyük çoğunluğunda (9 ve 10 numaralı hastalar hariç) delta-gama ve epsilona göre daha yüksek bulundu (Tablo 4-3 ve Tablo 4-4). 9 ve 10 numaralı ataklı hastalarda delta-gama izoformunun ekspresyonu alfa ve epsilona göre daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4-5). Ataklı hastalarla, ataksız hastaların periferik kan mononükleer hücre örneklerinde kaspaz1 izoformlarının mRNA ekspresyonu karşılaştırıldığında ataksız hastalarda delta-gama ve epsilon izoformlarının ekspresyonları düşük iken ataklılarda nispeten daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunamadı (Tablo 4-5). Fakat p değerleri anlamlılık sınırına oldukça yakın bulundu (sırasıyla $p=0,0583$, $p=0,0712$ ve $p=0,0549$). Bu sonucun hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

M694V AAA'nde en yaygın mutasyon olup hastaların %80'i bu mutasyona sahiptir. Tablo 3-1'de mutasyon durumu bilinen hastaların büyük çoğunluğu M694V homozigot mutasyonuna sahip olduğu görülmektedir. Bir diğer yaygın mutasyon ise M680I mutasyonu olup çalışmamızda kullanılan hastalardan da biri de bu mutasyona sahiptir (64). Literatüre bakıldığında M694V homozigot mutasyonuna sahip hastalarda kaspaz1 seviyesi arttığı gösterilmiştir (61). Mutasyon bulunmayan 1 numaralı hastanın nötrofillerinde kaspaz1 mRNA ekspresyonu diğerlerine göre düşük bulunsada mutasyon bulunmayan sadece bir hasta olduğundan sağlıklı bir kıyaslama yapmak mümkün olmadı.

Nötrofil örnekleriyle gerçekleştirilen western blot sonucunda hem ataklı hem de ataksız hastalarda sadece alfa izoformunun protein ekspresyonu görülmüştür (Şekil 4-9). Ataklı ataksız hastaların nötrofillerinde protein ekspresyonu kıyaslandığında bariz bir farklılık

gözlemlenmedi. Gohar ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da AAA hastalarından alınan nötrofillerde, artan kaspaz1 aktivitesi in vitro olarak gösterilmiştir (62). Çaldıran ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada da kaspaz1 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (3-kat, $p=0.09$) (65). Çalışmamızın sonuçlarının farklı olmasının nedeni yöntemsel farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Çaldıran ve ark. (2021) ELİSA yöntemini kullanmışlardır. Çalışmamızda ise izoformları ayrı ayrı değerlendirmeye daha uygun olduğu için western blot yöntemini kullandık. Fakat ELİSA yöntemiyle daha kantitatif değerlendirme yapmak mümkündür. Aynı zamanda RT-PZR sonuçlarımız ataklı Çaldıran ve ark. (2021) sonuçlarıyla uyumlu olarak, ataklı hastalarda alfa mRNA ekspresyonu artmış olduğunu gösterdi.

Kaspaz1'e spesifik antikorla hastalara ait periferik kan mononükleer hücre örnekleriyle gerçekleştirilen western blot sonucunda izoformların protein ekspresyon paternlerinin farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4-9). Ataklı ve ataksız hastalarda protein ekspresyonu karşılaştırıldığında ataksız hastaların bazılarında (5 ve 6 numaralı hastalar) yüksek olduğu görülmektedir. Fakat bu hastalarda özellikle beta izoformunun ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Ataklı hastalarda ise (16 ve 17 numaralı hastalar) alfa izoformunun protein ekspresyonu diğer izoformlara göre daha yüksektir.

Ayrıca hastalara ait nötrofil ve periferik kan mononükleer hücre örneklerinin mRNA ekspresyon seviyesi ve protein seviyeleri arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. Hastalardan elde edilen nötrofillerle yapılan western blot sonuçlarına göre hem ataklı hem ataksız hastalarda sadece alfa izoformu eksprese olduğu görülmektedir. Kantitatif PZR sonuçlarına göre de nötrofillerde alfa izoformunun mRNA ekspresyonu western blot protein analizine dahil edilen 8, 12, 13, 17, 18 numaralı ataklı hastalarda (3,89-15,24) 4, 2, 6 ve 7 numaralı ataksız hastalara (1,63- 7,75) göre artmış bulundu (Tablo 4-1). Delta-gama izoformu ile kıyaslandığında alfa izoformunun mRNA ekspresyonundaki artışın ataklı hastaların nötrofillerinde (3,89-15,24 kat artış) ataksızlara (1,63-7,75 kat artış) göre daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4-2). Buna rağmen western blot'ta alfa izoformu dışındaki diğer izoformların protein ekspresyonu görülmediği için RT-PZR ile western blot sonuçları tam olarak uyuşmamaktadır. Bu durum western blot'un hassasiyetinin daha düşük olmasının yanı sıra gen ekspresyonunda post-transkripsiyonel düzenlenmeler nedeniyle mRNA ekspresyonunun

her zaman için protein ekspresyonunu yansıtmamasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4-4 ve Şekil 4-9).

Ayrıca periferik kan mononükleer hücrelerinde kantitatif PZR ve western blot sonuçları ataklı ve ataksız hastalar için değerlendirilmiştir. Periferik kan mononükleer hücrelerinde kaspaz1'in protein ekspresyonu incelendiğinde ataklı olan (17, 18, 8 ve 16 numaralı) hastalarda nötrofillerde olduğu gibi daha çok alfa izoformu ekspresyonu görülmektedir. Ataksız hastalarda (5, 4, 6 ve 7 numaralı) ise daha çok beta ve gama delta izoformunun ekspresyonu görülmektedir. Hastalara ait periferik kan mononükleer hücrelerde yapılan kantitatif PZR sonuçlarına göre yine alfa izoformu ataklı hastalarda ataksızlara göre daha yüksek bulundu. Western blot analizinde ağırlıklı olarak alfa izoformunun görüldüğü 8, 16, 18 numaralı ataklı hastalarda alfa izoformunun ekspresyonu delta-gama ile kıyaslandığında daha yüksek (7,73-36 kat) bulundu. 17 numaralı hastada ise alfa ekspresyonu, delta-gama ekspresyonuna yakın (1,62 kat) bulundu. Periferik kan mononükleer hücrelerinde western blot protein analizinde 4, 5, 6, 7 numaralı ataksız hastalarda beta ve delta-gama ekspresyonu alfa ekspresyonuna göre daha yüksek görünmesine rağmen bu hastalarda alfa izoformunun mRNA ekspresyonu delta-gama ekspresyonuna göre çok daha yüksek (18,13-128,89 kat) olduğu görülmektedir. Kaspaz1'in sadece beta izoformunu saptayacak spesifik bir primer tasarlanamadığı için mRNA ekspresyonu analiz edilememiştir. Alfa izoformu beta izoformunu tamamen içerdiğinden sadece beta izoformunu saptayacak şekilde primer tasarlanamadı. Beta ile alfa izoformu için ortak primer yapılmaya çalışıldığında ya başka CARD domaini içeren genlere ya da gama ve delta izoformlarına da komplementerlik gösterdiğinden beta izoformunun ekspresyonu analiz edilemedi. Gama ve delta izoformlarını ayırmak için gama ve delta izoformlarının farklılık gösterdiği bölgeye özgü tasarlanan primerler alfa ve beta izoformuna da komplementerlik gösterdiğinden gama ve delta izoformlarına ortak primer tasarlandı. Daha önce yapılan çalışmalarda izoformları ayrı ayrı ekspresyonu analiz edilecek şekilde primer tasarlanmamış, ortak bir primerle bütün izoformlar çoğaltılarak agaroz jelde görüntülenmiştir (66,67). Sonuç olarak elde edilen sonuçlara göre kaspaz1 izoformlarının protein ekspresyonu ile mRNA ekspresyonu arasında korelasyon bulunmamaktadır (Şekil 4-5 ve Şekil 4-10). Bu durum mRNA'ların proteinlere dönüşümünde yine post-transkripsiyonel düzenlenmelerin (miRNA, translasyonel düzenlenmeler gibi) etkisini düşündürmektedir.

LPS ile muamele edilmiş THP-1 hücreleriyle de kaspaz1 izoformlarına spesifik antikörler kullanılarak western blot gerçekleştirildi. THP-1 hücrelerinde inflamasyonu tetiklemek için değişen saat aralıklarında (0, 3, 6, 12, ve 20.saat) LPS ile muamele edilmiştir. Ardından kaspaz1 ekspresyonunu western blot ile analiz edilerek bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. LPS'nin kaspaz1 protein ekspresyonunu etkilenmediği gösterilmiştir (Şekil 4-11). THP-1 hücreleri insan monositik hücreleri olup (68) inflamatuvar ve bağışıklık yanıtında önemli role sahiptir. LPS ise güçlü bir makrofaj ve monosit aktivatörü olup inflamatuvar sitokinlerin (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-a) salınmasına neden olur (69). Netea ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada THP-1 hücreleri LPS (100 ng /mL) ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda kaspaz1 aktivasyonunda herhangi bir değişikliğin olmadığı ve THP-1 hücreleri sadece LPS ile uyarıldığında aktif IL-1b salınımı olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ile birlikte muamele edildiğinde THP-1 hücrelerini IL-1b salınımı gerçekleştirmişlerdir (70). Çalışmamız Netea ve erk. (2009) sonucu ile uyumlu olarak LPS muamele edildiğinde ile kaspaz1 ekspresyonunda herhangi bir değişiklik bulunamadı.

Çalışmamız kaspaz1 izoformlarının ekspresyonunu ataklı ve ataksız hastalarda değerlendiren ilk çalışma niteliğindedir. AAA hastalığında kaspaz1 ekspresyonunu değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır (63,65) ve bu çalışmalarda da izoformlar ayrı ayrı değerlendirilmemiştir. Bu konudaki araştırmaların kısıtlı olması sebebiyle yapılan çalışmamız kaspaz1 izoformlarıyla ilgili ileride yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayabilir. Ayrıca bu izoformların ekspresyonlarının nötrofil ve periferik kan mononükleer hücrelerde araştırılması da AAA hastalığı için önemli bir bilgi kaynağı olmuştur. Çünkü kaspaz1 izoformlarıyla nötrofillerde veya periferik kan mononükleer hücrelerde değerlendiren AAA ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Kaspaz1 izoformlarının diğer otoinflamatuvar hastalıklardaki rolleri de araştırılarak AAA ile karşılaştırılabilir ve izoformların diğer otoinflamatuvar hastalıklardaki ekspresyon ve protein seviyelerine de bakılabilir. AAA ve diğer otoinflamatuvar hastalıklarda periyodik bir şekilde kendini gösteren semptomlar bu tür hastalıklarla ilgili çalışmaları daha cazip hale getirmektedir. Çünkü gende mutasyon olmasında rağmen semptomlar belli aralıklarla kendini göstermektedir. Dolayısıyla otoinflamatuvar hastalıkların neden periyodik olduğuna dair yapılacak çalışmalar hastalığın tedavisi için önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007;27(4):549–59.
2. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317–37.
3. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137–61.
4. Kanazawa N. Rare hereditary autoinflammatory disorders: towards an understanding of critical in vivo inflammatory pathways. *J Dermatol Sci*. 2012;66(3):183–9.
5. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 352(6284):aaf1098.
6. Netea MG, van der Meer JWM. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe*. 21(3):297–300.
7. Song WM, Colonna M. Immune Training Unlocks Innate Potential. *Cell*. 172(1):3–5.
8. Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden CDCC, Li Y, et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell*. 172(1):135-146.e9.
9. Arts RJW, Joosten LAB, Netea MG. The Potential Role of Trained Immunity in Autoimmune and Autoinflammatory Disorders. *Front Immunol*. 2018;9.
10. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)*. 77(4):268–97.
11. Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, Tunca M, Livneh A, Cattani D, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1706–12.
12. Gül A. Dynamics of Inflammatory Response in Autoinflammatory Disorders: Autonomous and Hyperinflammatory States. *Front Immunol*. 2018;9.
13. Simon A, Van Der Meer JW, Drenth JP. Familial autoinflammatory syndromes. In: Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. Elsevier; 2017. p. 1666–84.

14. Manna R, Rigante D. Familial Mediterranean Fever: Assessing the Overall Clinical Impact and Formulating Treatment Plans. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019 May 1;11(1):e2019027.
15. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:621–68.
16. de Jesus AA, Canna SW, Liu Y, Goldbach-Mansky R. Molecular Mechanisms in Genetically Defined Autoinflammatory Diseases: Disorders of Amplified Danger Signaling. *Annu Rev Immunol*. 2015;33(1):823–74.
17. Abramovits W, Oquendo M. Introduction to autoinflammatory syndromes and diseases. *Dermatol Clin*. 2013;31(3):363–85.
18. El Hasbani G, Jawad A, Uthman I. Update on the management of colchicine resistant Familial Mediterranean Fever (FMF). *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):1–12.
19. Cefle A, Kamali S, Sayarlioglu M, Inanc M, Ocal L, Aral O, et al. A comparison of clinical findings of familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. *Rheumatol Int*. 2005;25(6):442–6.
20. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Care Res*. 2009;61(10):1447–53.
21. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *ASH Educ Program Book*. 2004;2004(1):118–45.
22. Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever—a review. *Genet Med*. 2011;13(6):487–98.
23. Sarı İ, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: an updated review. *Eur J Rheumatol*. 2014;1(1):21.
24. Wang DQ, Bonfrate L, de Bari O, Wang TY, Portincasa P. Familial Mediterranean fever: from pathogenesis to treatment. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2014;5(5):1.
25. Yalçinkaya F, Özen S, Özçakar ZB, Aktay N, Çakar N, Düzova A, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology*. 2009;48(4):395–8.
26. Yalçinkaya F, Özen S, Özçakar ZB, Aktay N, Çakar N, Düzova A, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology*. 2009 Apr 1;48(4):395–8.
27. Ozen S, Kone-Paut I, Gül A. Colchicine resistance and intolerance in familial mediterranean fever: Definition, causes, and alternative treatments. *Semin Arthritis Rheum*. 2017;47(1):115–20.

28. Gül A, Ozdogan H, Erer B, Ugurlu S, Kasapcopur O, Davis N, et al. Efficacy and safety of canakinumab in adolescents and adults with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):243.
29. Cerquaglia C, Diaco M, Nucera G, Regina ML, Montalto M, Manna R. Pharmacological and clinical basis of treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with colchicine or analogues: an update. *Curr Drug Targets-Inflamm Allergy*. 2005;4(1):117–24.
30. Duisembekova A. Critical review on “pyrin” protein: its role in NLRP3 inflammasome activation. 2015;
31. Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol*. 2018;48(2):230–8.
32. Magnotti F, Lefeuvre L, Benezech S, Malsot T, Waeckel L, Martin A, et al. Pyrin dephosphorylation is sufficient to trigger inflammasome activation in familial Mediterranean fever patients. *EMBO Mol Med*. 2019;11(11):e10547.
33. Gao W, Yang J, Liu W, Wang Y, Shao F. Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(33):E4857–66.
34. Fusco WG, Duncan JA. Novel aspects of the assembly and activation of inflammasomes with focus on the NLRC4 inflammasome. *Int Immunol*. 2018;30(5):183–93.
35. Yu HB, Finlay BB. The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe*. 2008;4(3):198–208.
36. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009;10(3):241–7.
37. Ramachandran RA, Lupfer C, Zaki H. The inflammasome: regulation of nitric oxide and antimicrobial host defence. *Adv Microb Physiol*. 2018;72:65–115.
38. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkievicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immun*. 2014;20(2):115–25.
39. Wang L, Fu H, Nanayakkara G, Li Y, Shao Y, Johnson C, et al. Novel extracellular and nuclear caspase-1 and inflammasomes propagate inflammation and regulate gene expression: a comprehensive database mining study. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2016;9(1):1–18.
40. Ross C, Chan AH, von Pein JB, Maddugoda MP, Boucher D, Schroder K. Inflammatory Caspases: Toward a Unified Model for Caspase Activation by Inflammasomes. *Annu Rev Immunol*. 2022;40(1):null.
41. Feng Q, Li P, Leung PC, Auersperg N. Caspase-1ζ, a new splice variant of the caspase-1 gene. *Genomics*. 2004;84(3):587–91.

42. CASP1 (caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)) [Internet]. [cited 2022 Jan 26]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CASP1ID145ch11q22.html>
43. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*. 2018;215(3):827–40.
44. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011 Oct 11;7:539.
45. Aydin O, Egeli BH, Ozdogan H, Ugurlu S. Late-onset familial mediterranean fever: single-center experience and literature review. *Intern Emerg Med*. 2022;
46. Schmidt J, Berghaus S, Blessing F, Herbeck H, Blessing J, Schierack P, et al. Genotyping of familial Mediterranean fever gene (MEFV)—Single nucleotide polymorphism—Comparison of Nanopore with conventional Sanger sequencing. *PLOS ONE*. 2022;17(3):e0265622.
47. Masri DE, Alsaayed B, Masri JE, Zreika B, Chanbour H, Salameh P. Contribution of Arab Countries to Familial Mediterranean Fever Research: a PubMed-based bibliometric analysis. *Rheumatol Int*. 2022;42(1):95–100.
48. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever: A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med*. 1967;43(2):227–53.
49. Fujikura K. Global epidemiology of Familial Mediterranean fever mutations using population exome sequences. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(4):272–82.
50. Ozdogan H, Ugurlu S. Familial Mediterranean Fever. *Presse Médicale*. 2019;48(1, Part 2):e61–76.
51. Özen S, Batu ED, Demir S. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Front Immunol*. 2017;8.
52. Durcan G, Barut K, Haslak F, Yıldız M, Doktor H, Kadak MT, et al. A preliminary study: relationship between inattention/hyperactivity and familial mediterranean fever in children and adolescents. *Child Neuropsychol*. 2022;1–15.
53. Datta D, McClendon CL, Jacobson MP, Wells JA. Substrate and Inhibitor-induced Dimerization and Cooperativity in Caspase-1 but Not Caspase-3. *J Biol Chem*. 2013;288(14):9971–81.
54. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*. 1992;356(6372):768–74.

55. Sandstrom A, Vance RE. Defusing inflammasomes. *J Exp Med*. 2018;215(3):723–4.
56. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF- κ B through its N-terminal fragment. *Blood*. 2008;112(5):1794–803.
57. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*. 2009;146(5):467–78.
58. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*. 2011;34(5):755–68.
59. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*. 2000;95(10):3223–31.
60. Molad Y, Fridenberg A, Bloch K, Langevitz P, Mukamel M, Sulkes J, et al. Neutrophil Adhesion Molecule Expression in Familial Mediterranean Fever: Discordance between the Intravascular Regulation of β 2 Integrin and L-Selectin Expression in Acute Attack. *J Investig Med*. 2004;52(1):58–61.
61. Stoler I, Freytag J, Orak B, Unterwalder N, Henning S, Heim K, et al. Gene–Dose Effect of MEFV Gain-of-Function Mutations Determines ex vivo Neutrophil Activation in Familial Mediterranean Fever. *Front Immunol*. 2020;11.
62. Gohar F, Orak B, Kallinich T, Jeske M, Lieber M, von Bernuth H, et al. Correlation of Secretory Activity of Neutrophils With Genotype in Patients With Familial Mediterranean Fever: CORRELATION OF NEUTROPHIL SECRETION WITH FMF GENOTYPE. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(12):3010–22.
63. Manukyan G, Petrek M, Kriegova E, Ghazaryan K, Fillerova R, Boyajyan A. Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. *Immunobiology*. 2013;218(6):892–8.
64. Arakelov GG, Osipov OV, Nazaryan KB. Influence of M680I and M694V mutations on pyrin's domain B30.2 tertiary structure and it's complex formation ability with caspase-1. *Mol Biol (Mosk)*. 2015;49(5):826–31.
65. Çaldıran FY, Çtlı Ş, Çağan E, Deveci K. IL-1 β , IL-18 and Caspase-1 Levels in Serum as an Early Marker in Familial Mediterranean Fever Patients with Attack and Attack-free Period. *J Contemp Med*. 2021;11(4):494–9.

66. Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Litwack G. Cloning and Expression of Four Novel Isoforms of Human Interleukin-1 β Converting Enzyme with Different Apoptotic Activities (*). J Biol Chem. 1995;270(9):4312–7.
67. Dang WT, Xu D, Xie WG, Zhou JG. Expression of Caspase-1 Gene Transcript Variant mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Gout in Different TCM Syndromes. Evid-Based Complement Altern Med ECAM. 2015;2015.
68. Jahan H, Siddiqui NN, Iqbal S, Basha FZ, Khan MA, Aslam T, et al. Indole-linked 1,2,3-triazole derivatives efficiently modulate COX-2 protein and PGE2 levels in human THP-1 monocytes by suppressing AGE-ROS-NF-k β nexus. Life Sci. 2022;291:120282.
69. Tucureanu MM, Rebleanu D, Constantinescu CA, Deleanu M, Voicu G, Butoi E, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. Int J Nanomedicine. 2017;13:63–76.
70. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. Blood. 2009;113(10):2324–35.

HAM VERİLER

FORMLAR

GENETİK BİLİMSEL ARAŞTIRMA AMAÇLI KAN VEYA DOKU ÖRNEĞİ ALINAN KİŞİLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

1. “Ailevi Akdeniz Ateşinde Kaspaz 1 İzoformlarının Ekspresyon Analizi” başlıklı klinik çalışmada kullanılmak üzere kolunuzdan 10 (1 tüp) ml. kan alınması gerekmektedir. Bu kandan, genetik materyal (DNA/RNA) ve/veya hücre elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.
 2. Tanı örneğiniz bölümümüze ulaştıktan sonra kayıt edilip, numaralandırılarak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak şekilde saklanmaktadır.
 3. Alınan biyolojik örneklerden DNA/RNA/hücre materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu arşivde kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
 4. Tanı örneğinizde istenen tetkikler tamamlandıktan sonra yasal süre boyunca saklanacak şekilde arşivlenecektir. Tanı amaçlı yapılan analizler raporlandıktan sonra artan materyal hastalıkların genetiğini aydınlatmak ve tedaviye yönelik yeni hedeflerin belirlenmek amacıyla DETAE’de gerçekleştirilecek başka bilimsel araştırma projelerinde kullanılabilir.
 5. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir. Ancak arzu ederseniz kişisel bulgularınıza ulaşma hakkına sahipsiniz.
 6. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
 7. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan kendi isteğiniz ile ve istediğiniz an ayrılabilirsiniz.
 8. Bu çalışmada sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumundan herhangi bir ödeme alınması söz konusu olmadığı gibi size de çalışmaya katılmanız nedeniyle herhangi bir ödemede bulunulmayacaktır.
 9. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu talebinizin/kararınızın gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz bir etkisi olmayacaktır.
 10. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.
-

A. Benden alınan kan örneğinin yukarıda adı belirtilen bilimsel çalışmada kullanılmasını

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

B. Benden alınan kan örneğinin bundan sonra yapılabilecek genetik çalışmalarda kullanılmasını

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

C. Yukarıda adı belirtilen çalışma ve örneğimin kullanıldığı diğer çalışmalarda tespit edilen benimle ilgili

bulguları öğrenmek

İstiyorum ☐

İstemiyorum ☐

Burada attığım imza ile genetik testlerimin yapılması, materyalimin saklanması ve gereği halinde kimlik bilgilerim saklı kalmak koşulu ile elde edilen verilerin İ.Ü. AZİZ SANCAR DETAE Genetik AD tarafından yürütülen veya desteklenen bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum ve bu onayı verirken yukarıda tarafıma verilen bilgileri okuduğumu, anladığımı ve kabul ettiğimi de tasdik ediyorum.

(Bu belge 1 sayfadan oluşmaktadır)

NOT:

Zihinsel özürlü kişiler, bilinci kapalı olanlar ve reşit olmayan çocuklar için bu belge velisi veya vasisi tarafından doldurulacaktır. Kararınızdan önce aşağıdaki bilgileri lütfen okuyunuz.

Formu Okuyup İmzalayan Kişinin;

Bilgilendiren Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Ahmet GÜL

Hastaya Yakınlık Derecesi:

Telefon: 0212 6318699-32892

İletişim Bilgileri:

Tarih:

Tarih:

İmza

İmza:

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİNDE KASPAZ1 İZOFORMLARININ
EKSPRESYON ANALİZİ**

ORJİNALLİK RAPORU

%12
BENZERLİK ENDEKSİ

%12
İNTERNET KAYNAKLARI

%4
YAYINLAR

%4
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ





