

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**EPIGENETİK REGÜLASYONUN
AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ'NDE
FENOTİPİK EKSPRESİVİTE
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Eser DOĞAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**EPİGENETİK REGÜLASYONUN
AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ'NDE
FENOTİPİK EKSPRESİVİTE
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Eser DOĞAN

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Özlem GİRAY BOZKAYA

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2014.KB.SAG.066
proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hale Ören olmak üzere, kliniğimiz içinde ve rotasyonlarda çalışma imkanı bulduğum tüm öğretim görevlilerine,

Tezimin ortaya çıkmasını sağlayan ve her aşamasında bana destek olan, kendisi ile çalışmaktan onur duyduğum, bilimsel yol göstericiliğinden faydalanabildiğim için kendimi şanslı saydığım tez danışmanım Doç Dr Özlem Giray Bozkaya'ya,

Emeğini ve Genetik Anabilimdalı'nın imkanlarını esirgemeyen, Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp' e,

Bu zorlu süreçte desteğini hissettiğim Uzm Dr Semra Gürsoy'a, uyum içinde çalıştığım ve tezimde emeği çok olan Dr Özge Aksel'e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, her zaman bir parçası olarak kalacağım; tüm doktor, hemşire ve personeli ile DEÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ailesine,

Uzakta da olsa dayanağım, canlarım; anneme, babama ve kardeşlerime,

Tanıdığım anda bugünleri hissettiğim, hayat arkadaşım eşim, Bahar'a

Sabahları arkamdan el sallayan oğlum Deniz Batu'ya

Teşekkür Ederim

Dr. Eser DOĞAN

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
KISALTMALAR:	V
ÖZET	1
SUMMARY.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi.....	7
2.1.1. Tanımı	7
2.1.2. Tarihçesi	7
2.1.3. Epidemiyoloji	8
2.1.4. Patogenez	10
2.1.5. Klinik.....	13
2.1.6. Laboratuvar bulguları	16
2.1.7. Tanı.....	16
2.1.8. Tedavi.....	20
2.1.9. İzlem.....	21
2.1.10. Genetik	21
2.2. MEFV geninin yapısı	25
2.3. MEFV geninin transkripsiyon ürünü.....	26
2.4. Pyrin; MEFV geninin translasyon ürünü	27
2.5. Epigenetik.....	28
2.5.1. DNA Metilasyonu	31
2.5.2. Gen ekspresyonunun DNA metilasyonu ile düzenlenmesi	33

3. MATERYAL METOD	35
3.1. Çalışma grupları	35
3.1.1. Hasta ve kontrol gruplarının belirlenmesi	35
3.1.2. Örnek toplanması	35
3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar, gereçler ve kimyasal maddeler	36
3.3. Yöntemler.....	37
3.3.1. MEFV Geni Ekspresyonunun RNA Düzeyinde Belirlenmesi	37
3.3.2. MEFV Geni Metilasyon Oranlarının Belirlenmesi	42
3.3.3. ELISA yöntemiyle Pyrin ölçümleri	47
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	64
KAYNAKLAR.....	66
EKLER DİZİNİ.....	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Tel-Hashomer tanı kriterleri.	18
Tablo 2: Livneh ve arkadaşlarının önerdiği yeni kriterler.....	19
Tablo 3: Hastalık şiddetinin belirlenmesi amacıyla kullanılan skorlama Değerlendirilmesi.....	20
Tablo 4: MEFV geni ekspresyon ve metilasyon paterninin belirlenmesi için kullanılan cihaz ve gereçler.....	37
Tablo 5: MEFV geni ekspresyon ve metilasyon paterninin belirlenmesi için kullanılan malzemeler	37
Tablo 4: Total RNA’lardan cDNA sentezlenmesi aşamasında kullanılan malzemeler	40
Tablo 7: RealTime PCR hedef gen (MEFV geni) protokolü malzemeleri.....	40
Tablo 5: RealTime PCR referans gen (ACTB geni) protokolü malzemeleri	41
Tablo 9: PCR için hazırlanan karışım	44
Tablo 10 : Kullanılan PCR programı	44
Tablo 11 : MEFV geni ekzon 2 PCR primer dizileri	45
Tablo 6: Birinci sütunda kullanılan malzemeler	46
Tablo 13: Sekans PCR için kullanılan malzemeler	46
Tablo 14: Hastaların yaş dağılım özellikleri	49
Tablo 15: Ailesel Akdeniz Ateşi olan hastalarımızın klinik özellikleri	50
Tablo 16: Ailesel Akdeniz Ateşi hastalarının mutasyon analiz sonuçları.....	51
Tablo 17: AA hastalarımızın allel frekansları	52
Tablo 18: Allel frekanslarının grafik görünümü	52
Tablo 19: Hasta ve kontrol grubu mRNA ekspresyon oranları.....	55
Tablo 20: Grup A1 ve grup A2’nin mRNA ekspresyon oranları	56
Tablo 21: Hasta ve kontrol grubunun pyrin düzeyleri	57
Tablo 22: Grup A1 ve A2’nin pyrin düzeyleri	57
Tablo 23: Hasta ve kontrol grubu metilasyon oranları.....	58
Tablo 24: Grup A1 ve A2 metilasyon oranları.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: AAA hastalarında farklı popülasyonlara göre mutasyon oranlarının dağılımı.....	9
Şekil 2: MEFV mutasyonun popülasyonlara göre dağılımı.....	10
Şekil 3: MEFV mutasyonları, aşırı inflamasyon yanıtına neden olarak organ fonksiyonlarında bozulmaya yol açar.	11
Şekil 4: Pyrin proteininin de yer aldığı inflamasyon yolağı	12
Şekil 5: AAA’nde klinik bulgular.....	15
Şekil 2 : MEFV geninin genomik lokalizasyonu.....	22.
Şekil 7: AAA hastalarında MEFV geninin farklı ekzonlarına dağılmış 306 mutasyon, 29 Ekim 2014 verileri	23
Şekil 8: MEFV geni ve pyrin proteini	25
Şekil 9: MEFV geninin ve ekspresyon ürünlerinin RNA ve protein düzeyinde Şematizasyonu.....	26
Şekil 10: Pyrin proteini fonksiyonel domainlerinin şematizasyonu	27
Şekil 11: Genin ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar	30
Şekil 12: Histon modifikasyonu	30
Şekil 13: DNA üzerindeki CpG adalarının sitozinlerinin metillenerek sessizleştirilmesi..	32
Şekil 14: A. DNA metil tansferazlar yardımıyla metillenme B. Metile olmayan DNA’da kromatin yapısı gevşektir böylelikle, histon asetilasyonu ve transkripsiyon komplekslerinin bağlanması kolaylaşır. C. Hipermetilasyon ise o bölgedeki kromatinin kondanase olmasına ve transkripsiyonda azalmaya neden olur	34
Şekil 15: Relative Expression Software Tool” (REST) istatistiksel analiz programı örnek ..	41
Şekil 16: Bisülfıt modifikasyonu yapılmamış örnek DNA’ sı ekzon 2 bölge sekansı	47
Şekil 17: Bisülfıt modifikasyonu yapılmış örnek DNA’sı ekzon 2 bölge sekansı	47

KISALTMALAR:

AAA	: Ailesel Akdeniz Ateşi
AML	: Akut Myelositer Lösemi
ASC	: Apoptosis associated speck like protein with a CARD
BB-ZF	: B Box Zinc Finger
bp	: Baz çiftleri
C	: Karboksi
C3	: Kompleman 3
C4	: Kompleman 4
C5a	: Kompleman 5a
CARD	: Caspase recruitment domain
CC	: Coiled coil
cDNA	: Komplamenter deoksiribonükleik asit
CH3	: Metil
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
CRP	: C-Reaktif Protein
cT	: Cycle Threshold
DD	: Death Domain
DED	: Death effector domain
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT	: Deoksiribonükleik asit metiltransferaz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EKG	: Elektrokardiyografi
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESH	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
HLA –B27	: Human Leukocyte Antijen B27

IgA	: İmmünglobulin A
IL	: İnterlökin
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
Kb	: Kilobaz
LPS	: Lipopolisakkarid
MEFV	: Mediterranean Fever geni
Mg	: Miligram
μl	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
nc-RNAs	: Nonkoding ribonükleik asit
NF	: Nekrozis faktör
NF-kappa B	: Nekrozis Faktör Beta
Nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PYD	: Pyrin parçası
Rasi RNA	: Repeat associated siRNA
REST	: Relative Expression Software Tool
RLF	: Relative Centrifugal Force
RNA	: Ribonükleik asit
RPM	: Revolutions Per Minute
RT-PCR	: Real Time PCR
SAA	: Serum Amiloid A
SAM	: S-adenozilmetionin
SiRNA	: Small interference RNA
SnoRNA	: Small nucleolar RNA

SnRNA	: Small nuclear RNA
TGF-β	: Transforming growth faktör beta
TNF	: Tümör nekrosis faktör
WBC	: White Blood Cell

ÖZET

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) ataklar halinde gelen ateş ve ona eşlik eden seröz zarların inflamasyonu, “peritonit“, “artrit“, “plörit” ve “erizipel benzeri eritem” ile karakterize otozomal resesif geçişli herediter bir hastalıktır.

MEFV geni mutasyonları saptanan hastalar geniş bir fenotipik yelpazede karşımıza çıkmakta ve farklı bulgu ve şiddette AAA tanısı almaktadırlar. Bu çalışmada mutasyonlarının AAA’ne neden olduğu MEFV geninin, transkripsiyon ve translasyon ürünlerinin kantitatif ölçülmesi ve metilasyon durumunun incelenmesi, bu verilerin fenotip üzerine etkilerinin saptanması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda MEFV geninin gen ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde ölçüldü ve metilasyon oranları belirlendi.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Nefroloji polikliniğine başvuran 40 FMF hastası ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniklerine kontrol amaçlı başvuran 32 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edildi.

Hasta ve kontrol grubu MEFV mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0.049$) oranda azaldığı gösterildi. Bu sonuçla uyumlu olarak hasta grubunda pyrin seviyesinin de istatistiksel olarak anlamlı ($p:0.037$) oranda azaldığı görüldü. Hasta grubu ve kontrol grubu metilasyon oranları karşılaştırıldığında hasta grubunda metilasyonun daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p:0.376$) olmadığı saptandı.

Çalışmaya katılan hastalar öncelikle MEFV geninde iki ya da daha çok mutasyon taşıyan (grup A1) ya da MEFV geninde sadece 1 mutasyon taşıyan hastalar (grup A2) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplar hastalık başlangıç yaşı, atak sıklığı, tedavi yanıtı, ateş yüksekliği, karın ağrısı, göğüs ağrısı, eklem ağrısı ve erizipel benzeri eritem gibi bulguların varlığı açısından karşılaştırıldı. İki grup arasında yalnızca tedaviye yanıt açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptandı ($p= 0.021$).

Ek olarak, literatürde Türk toplumunda en sık görülen mutasyon M694V olması ve AAA kliniğinin ağırlığıyla ilişkili bulunması nedeniyle grup 1’deki hastalar M694V homozigot olanlar ve olmayanlar olarak 2’ye ayrılarak klinik ve laboratuvar sonuçları karşılaştırıldı. M694V homozigot olan grupta metilasyon oranı hafif ($p= 0,07$) düzeyde düşük olup bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ekspresyon ve pyrin düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Hastalar AAA'deki ağır fenotip ile ilişkili olduğunu bildiğimiz M694V mutasyonu ve hafif klinikle ilişkili olduğu gösterilmiş olan R202Q mutasyonu varlığına göre sınıflandığında da, klinik şiddet, mRNA, pyrin düzeyi ve metilasyon oranları arasında farklılıklar saptanmasına rağmen hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak bu sonuçlar yorumlanırken hasta sayımızın kısıtlılığı ve mutasyon dağılımının genişliğinin de göz önünde bulundurulması uygun olacaktır.

SUMMARY

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessively inherited disease which is characterized with periodic fever and inflammation of the serous membranes such as 'peritonitis', 'arthritis', 'pleuritis' and 'erysipelas-like erythema'.

Patients with MEFV gene mutations show wide phenotypic variations and are diagnosed with FMF with different symptoms and severity. Quantitative measures of the products of transcriptions and translations of MEFV gene, investigating of the methylation status and determining the effect of these factors on phenotype was aimed in this study. For that purpose gene expression of the MEFV gene was measured at the level of mRNA and protein and the methylation rates were determined.

Forty FMF patients who consulted in Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Division of Pediatric Nephrology and 32 healthy children who consulted for control in various clinics in Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics were included in the study.

When the levels of MEFV gene expression were compared between patients and healthy controls, it was seen that the expression levels were statistically significantly lower in the patient group ($p=0.049$). The pyrin levels were found statistically significantly lower in the patient group when compared with the controls ($p=0.037$). Methylation rates were observed higher in the patient group, but it was not statistically significant ($p=0.376$).

Patients were divided into two groups as Group A1 (patients with 2 or more mutations of MEFV gene) and Group A2 (patients with only one mutation of MEFV gene). These two groups were compared in terms of disease onset, frequency of the attacks, treatment response, severity of fever, stomachache, chest pain, arthralgia and erysipelas-like erythema. Only the treatment response was found statistically significantly different in the Group 1 compared to Group 2 ($p=0.021$).

As the M694V mutation is the most frequent mutation in the Turkish population and it is related to the severity of FMF, the patients in Group 1 were divided into 2 groups as M694V homozygote and others. The clinical and laboratory findings were compared between groups. The methylation rate was found lower in the M694V homozygote group but it was not

statistically significant. There was no statistically significant differences between groups in expression and pyrin levels.

When the patients were grouped as severe phenotype related M694V mutation and mild phenotype related R202Q mutation there were no significant difference between groups in terms of mRNA, pyrin levels and methylation rates.

It should be taken into account the limited number of the patients and wide range of mutations while interpreting our results.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) ataklar halinde gelen ateş ve ona eşlik eden seröz zarların inflamasyonu, “peritonit“, “artrit“, “plörit” ve “erizipel benzeri eritem” ile karakterize otozomal resesif geçişli hereditör bir hastalıktır. Bu hastalık Akdeniz bölgesinden köken alan populasyonlarda; Türkler, Ermeniler, Askenazi olmayan Yahudiler ve Araplarda yaygın olarak görülür (1; 2).

AAA semptomları genellikle hayatın ilk on yılında ortaya çıkar. Hastaların % 80’inden fazlasında çocukluk ve ergenlik döneminde, % 5’inde ise 30 yaşından sonra görülmektedir (3).

Ateş ve serözit atakları 1-4 gün sürer ve kendiliğinden kaybolur. Ataklar arasında hastalar genellikle semptomsuzdur. Tekrarlayan ataklar, menstrüasyon, stres, ağır fiziksel aktiviteler ve enfeksiyonlara bağlı olarak sıklaşabilir. Atakların sıklığı ve şiddeti hastalar arasında, hatta hayatlarının farklı periyotlarında dahi değişiklik gösterebilmektedir. Hastalığın şiddeti genellikle yaş ile azalmaktadır (4). AAA’nın en önemli ve prognozu belirleyen komplikasyonu amiloidozistir (5; 6). Amiloidozis genellikle böbrekte oluşmakla birlikte progresyon göstererek renal yetmezliğe yol açabilmektedir (7).

AAA klinik olarak 2 fenotipe ayrılır: **Fenotip 1** peritonit, sinovit, plörezi ve nadiren perikardit ve menenjit epizodları ile ilişkilidir. **Fenotip 2** olarak gruplanan hastalarda ise tipik AAA atakları olmadan amiloidoz gelişimi gözlenir. Tanıda Tel-Hashomer kriterleri kullanılmakta ve kesin tanı için 2 major veya 1 major, iki minör kriter; muhtemel tanı için de 1 major ve 1 minör kriter gerekmektedir.

AAA’dan sorumlu gen 1991 yılında 16. Kromozomun kısa kolunda tanımlanmış ve 1997 yılında ilk kez klonlanmıştır (8). **MEFV** (Mediterranean Fever) geni olarak isimlendirilen bu genin, **pyrin/marenostrin** adı verilen bir proteini kodladığı gösterilmiştir. Pyrin/Marenostrin inflamasyonda, IL-1 β maturasyonu ve NF-kappa B aktivasyonu sağlayan kaspase-1’i aktive ederek rol oynar (9; 10). MEFV geninde hastalığa yol açan çok sayıda mutasyon bildirilmiştir. Bunlardan en sık görülen 5 tanesi; M694V, M694I, M680I, V726A ve E148Q olup, AAA kliniğiyle başvuran hastaların yaklaşık olarak % 80’inden sorumlu bulunmuştur (11; 12).

DNA metilasyonu en sık görülen epigenetik mekanizma olup büyük oranda genlerin CpG adalarındaki sitozin bazlarında meydana gelmektedir (13). Metilasyon, RNA polimeraz

2 transkripsiyon uzamasının engellenmesi ile transkripsiyonel sessizliğe neden olmaktadır (14). AAA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, AAA mutasyonu saptanan hastalarda mRNA ekspresyonun azaldığını gösteren çalışmalar var olmasına rağmen, hastalarda mRNA ekspresyonun arttığı da rapor edilmiştir (15; 16).

MEFV geninde saptanan farklı mutasyonların, klinik olarak değişken fenotipe sahip olabileceği bilinmektedir. Örneğin homozigot M694V mutasyonu saptanan bireylerde daha ağır klinik gözlenmektedir. Bunun yanında AAA tanısı almış hastaların belirlenen genotipleri benzer olmasına rağmen (hatta aynı anne ve babadan olup, aynı mutasyonları taşımalarına rağmen) belirgin klinik farklılıklar gösterebildikleri de bilinmektedir. Biz çalışmamızda toplumda en sık görülen AAA mutasyonlarında, DNA metilasyonunun hastalığın fenotipi ve klinik seyir ile olan ilişkisini araştırmayı planladık. Mutasyon analizi sonuçlarına göre sınıflanan hastalarda, MEFV geni metilasyon paterni ve ekspresyon analizlerini yaparak, metilasyon oranlarının mutasyonlara ve kliniğe etkisini analiz ettik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi

2.1.1. Tanımı

Ailesel Akdeniz ateşi (AAA; Familial Mediterranean Fever, FMF) kalıtsal periyodik ateş sendromlarının en sık görülenidir (17). AAA, özellikle Akdeniz etrafında yerleşim gösteren Yahudileri, Arapları, Türkleri ve Ermenileri etkiler. Hastalığa dünyanın farklı bölgelerinde de nadir olarak rastlanılır (18). AAA; otozomal resesif kalıtmı, akut, kendini sınırlayan ateş atakları ile karakterize, inflamatuvar bir hastalıktır. Bu ataklara genellikle steril bir peritonit, plörit, mono veya oligo-artiküler artrit ve/veya deri döküntüleri eşlik eder (19).

2.1.2. Tarihçesi

Hastalık ilk kez 1908 yılında Janeway ve Rosenthal tarafından, tekrarlayan ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan 16 yaşında Yahudi bir kızda “paroksizmal bir hastalık” olarak bildirilmiştir. İlk olgudan sonra 1945 yılında Amerikalı araştırmacı Siegal, ‘Benign Paroksizmal Peritonitis’ adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları ile seyreden bir klinik antite tanımlamıştır. Yaklaşık bir yıl sonra Türkiye’den bir rapor bildirilmiştir. 1948 yılında Reiman ‘Periyodik Hastalık’ tanımlamasını kullanmıştır. Rekürren poliserozit, rekürren hereditör poliserozit, periyodik peritonit literatürde karşılaşılan diğer isimleridir. 1951 yılında Catton ve Mamou ailevi bir hastalık olduğuna dikkati çekmişler ve 1956 yılında aynı yazarlar hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir Heller ve Sohar 1958 yılında Ailevi Akdeniz Ateşi tanımını ilk kez kullanmışlardır (20; 21; 22)

1997 yılında AAA’ne yol açan gen iki ayrı grup tarafından klonlanmıştır. Uluslararası AAA Konsorsiyum’u ve Fransız AAA Konsorsiyum’u 16. kromozomun kısa kolu 16p13.3’de bir proteini kodlayan genin AAA hastalığı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. AAA gelişiminden sorumlu tutulan bu gen “**MEditerranean FeVer**” (MEFV) geni olarak adlandırılmakta ve ürünü olan proteine Uluslararası Konsorsiyum, ateş (pyrexia) patogenezendeki rolü nedeniyle ‘pyrin’, Fransız Konsorsiyum’u ise ‘marenostrin’ (Mare Nostrum, Akdeniz için “Bizim Deniz”) adını vermektedir (1; 8; 23; 24)

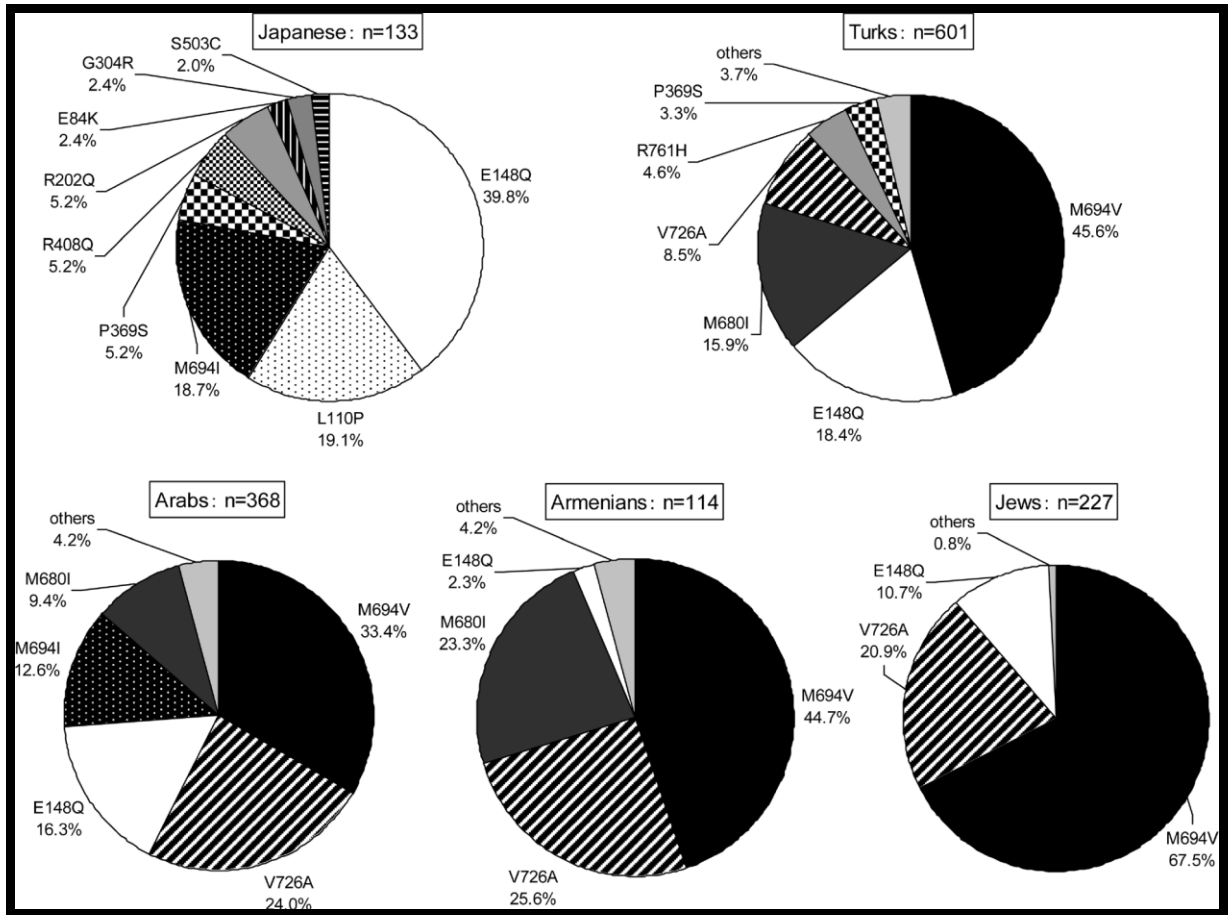
Kolşisinin tedavideki faydaları 1972 yılında Goldfinger tarafından ortaya konulmuştur. Goldfinger 25 ay süreyle kolşisin tedavisi alan hastalarında atakları önlediğini göstermiştir (25). Kolşisin üzerine birçok araştırma yapılmıştır ve tedavinin temel taşı olmuştur. Kolşisinin AAA hastalarında amiloidozu önlediğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır (26).

2.1.3. Epidemiyoloji

AAA'nın dünya çapında 150.000 üzerinde insanı etkilediği tahmin edilmektedir (27). Taşıyıcılık oranı popülasyonlara göre farklılıklar gösterir; Sefardik Yahudilerde 1:5, Araplarda 1:16, Türklerde 1:5, Ermenilerde 1:7 ve Askenazi Yahudilerinde 1:11'dir. Günümüzde popülasyon hareketlerinden dolayı dünyanın her tarafında gözlenmektedir (28; 29). Non-Askenazi Yahudilerde AAA prevalansı 1:250 ile 1:500 arasında değişmektedir (28). Hastalığın Türk popülasyonundaki genel prevalansının ~1:1073 olduğu tahmin edilmektedir (30). Ülkemizde yaygın olmakla birlikte, hastaların çoğu orta Anadolu kökenlidir ve orta Anadolu'da prevalansın 1:395 kadar yüksek olduğu belirlenmiştir (31).

AAA her iki cinsiyette de benzer oranlarda görülmektedir. Ancak bazı çalışmalarda hastalığın erkeklerde daha yaygın olduğu rapor edilmektedir (1; 32).

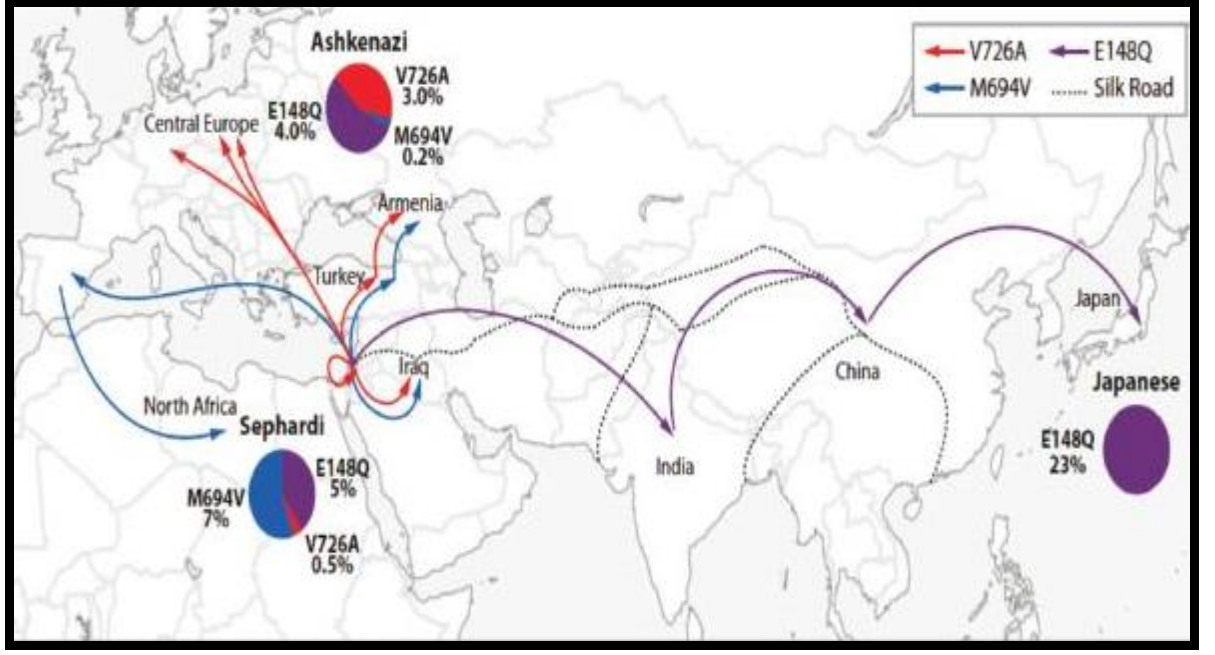
AAA prevalansı gibi mutasyonların frekansı da, popülasyonlar arasında farklılıklar gösterir. Örneğin M694V mutasyon sıklığı Türkler'de %51.4 iken Japonya'daki AAA hastalarında hemen hemen hiç görülmemektedir (Şekil 1) (33). AAA'nın mutasyon oranlarının sadece etnik açıdan farklı olmadığı, aynı etnik yapının bölgesel grupları arasında da farklılıklar bulunduğu gösterilmiştir. Türk kökenli hastalarda AAA'nın genetik heterojenitesi konusunda az sayıda bilgi bulunmaktadır. Bazı bilgiler vakaların çoğunluğunun diğer etnik gruplarda hastalıktan sorumlu olan lokuslara atfedilebileceğini göstermektedir. Buna karşılık Türklerdeki mutasyonların orijini muhtemelen heterojendir (7; 23; 34; 35; 36).



Şekil 3: AAA hastalarında farklı popülasyonlara göre mutasyon oranlarının dağılımı (33).

AAA hastalarında görülen klinik tablo, MEFV genindeki mutasyon, diğer genlerde gözlenen değişiklikler, hastanın cinsiyeti, yerleşim bölgelerine has özel iklimsel ve coğrafik özelliklerin yanında, genetik yapı ve nüfusların demografik tarihi gibi multifaktöryel etmenlerden de etkilenmektedir. Bu durum çevresel faktörlerin hastalığın klinik tablosu üzerinde etkisinin olabileceğini, tek başına gen dizisindeki değişikliklerin klinik gidişten sorumlu olamayacağı görüşünü desteklemektedir (37; 36).

Çeşitli popülasyonlardaki mutasyon prevalansı ve AAA hastalığının etnik kökenlerle ilişkisi hakkında bugüne kadar az sayıda araştırma yürütülmüştür. Bu araştırmalar MEFV mutasyonlarının orjinlerinin zamanı ve yeri konusunda sadece dolaylı kanıtlar göstermektedirler. İki MEFV mutasyonunun kökeni (M694V ve V726A) muhtemelen 2000-2500 yıl öncesine dayanmaktadır. Yüzyıllar boyunca birbirinden ayrılan popülasyonlarda özellikle Akdeniz ve Yakındoğu bölgelerinde yaşayan insanların antik dönemdeki temasları, farklı MEFV mutasyonlarının yayılımındaki rolünü aydınlatmaktadır (36) (Şekil 2).



Şekil 4: MEFV mutasyonun popülasyonlara göre dağılımı (33)

MEFV mutasyonları ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, hastalıktan yaygın şekilde etkilenen popülasyonlara yani Araplara, Ermenilere, non-Askenazi Yahudilere ve Türklere odaklanmıştır. Sadece MEFV mutasyonlarının prevalansının yüksek olmasından dolayı değil, aynı zamanda klinik tablolarının genellikle tüm belirtilerinin gözlenebileceği şekilde kendini göstermesi nedeniyle, hastalık bu dört etnik grupta daha fazla tanınmıştır (19).

2.1.4. Patogenez

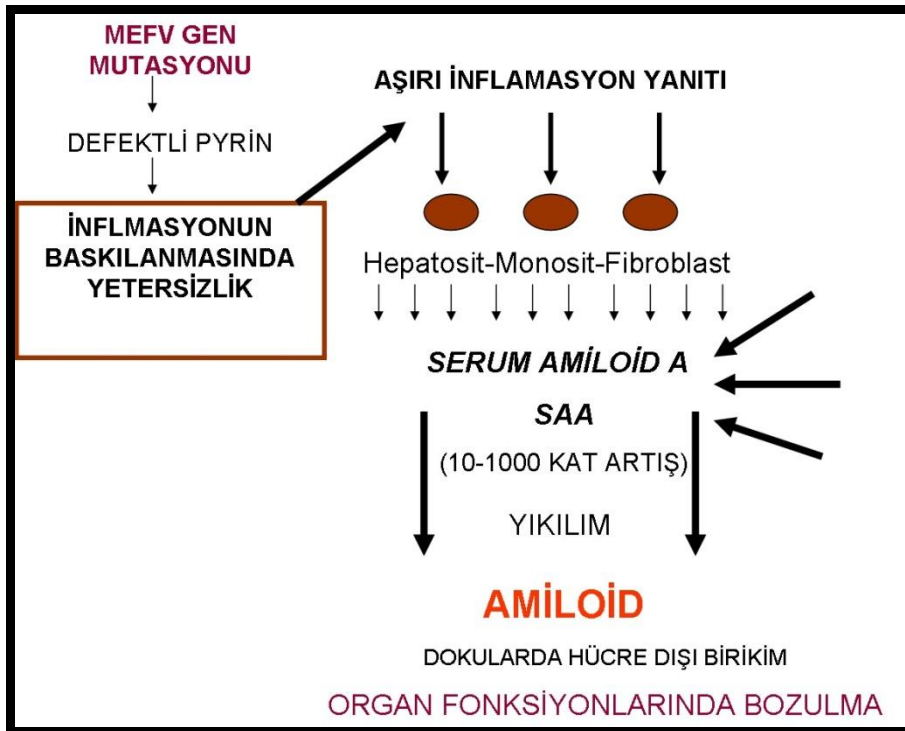
Yapılan çalışmalar AAA'nin patogenezini ve altta yatan moleküler mekanizmanın büyük ölçüde anlamamız sağlamasına rağmen, cevap bekleyen pek çok soru olduğu gerçeği de yadsınamaz.

Henüz MEFV geni ve pyrin proteini hakkında bilginiz yok iken bile, ataklar sırasında inflamasyonun bulunduğu bölgelerde nötrofillerin artışının gözlenmesi üzerine nötrofil fonksiyonları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda AAA'de nötrofil fonksiyonlarının normal olduğu, ancak AAA olmayan hastaların nötrofilleri ile karşılaştırıldıklarında bazı fonksiyonel farklılıkları olduğu gösterilmiştir (38; 39)

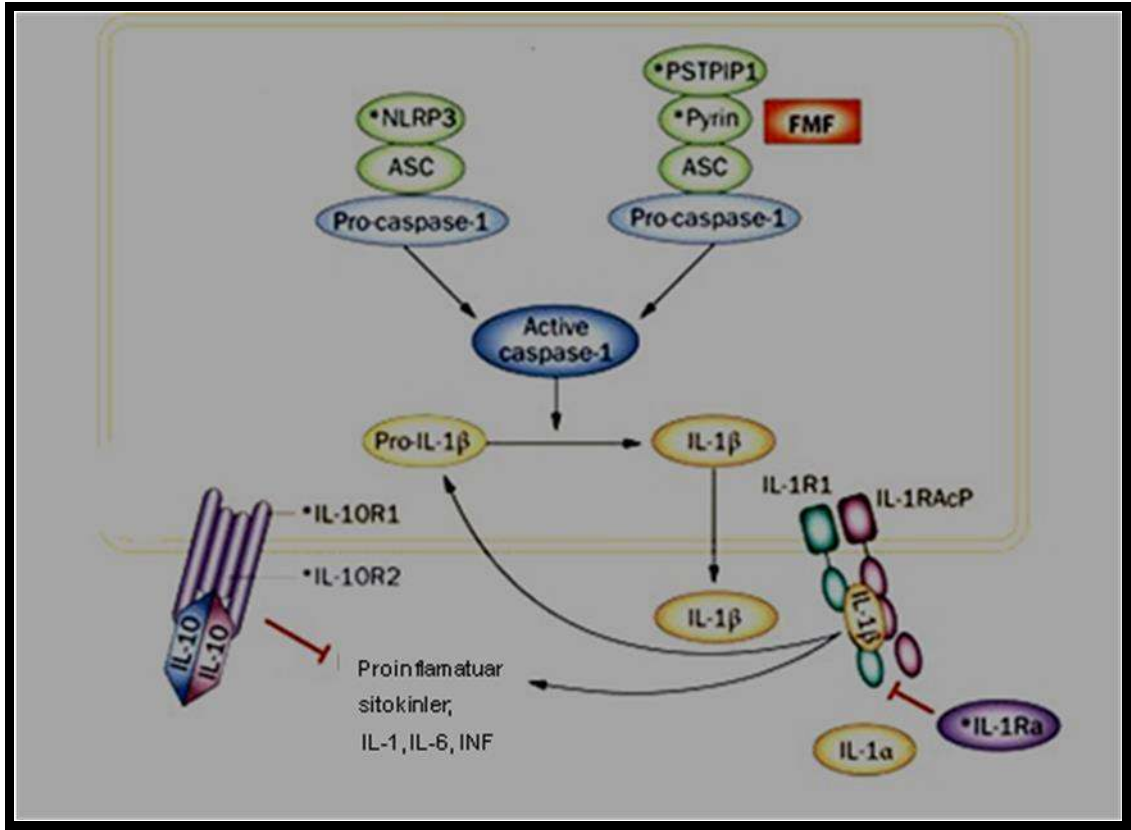
AAA atak döneminde C-Reaktif Protein (CRP), Serum Amiloid A (SAA), β -2 mikroglobulin, fibrinojen ve sedimentasyon gibi akut faz reaktanlarının yükseldiği

belirlenmiştir. Atak döneminde İnterlökin-2 (IL-2), IL-6, IL-8 ve Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır (40; 41).

Fonksiyonel bozuklukların AAA patogenezi açıklamada yetersiz kalması ve hastalığın ailevi geçiş göstermesi nedeniyle ataklara neden olabilecek genetik bir faktörün gösterilmesine çalışılmıştır. 1997 yılında AAA ilişkili gen (MEFV gen) bulunmuştur. MEFV geni 16. kromozom üzerinde yer almaktadır. Bu gen esas olarak nötrofil ve kemik iliğinin myelositer prekürsör hücrelerinde “Pyrin ya da Marenostin” denilen 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (3; 8). Bu proteinin çekirdeğe ait bir faktör olduğu ve olası fonksiyonunun da inflamasyonda rol alan proteinlerin transkripsiyonunun düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir (42; 43). Bu proteinin proinflamatuvar moleküllerin inhibisyonunu ve antiinflamatuvar proteinlerin transkripsiyonunu artırarak inflamatuvar yanıtı inhibe ettiği düşünülmektedir. MEFV geninin mutasyonu sonucu oluşan anormal pyrin proteini, inflamasyonun etkin olarak baskılanmasını engellemektedir. Böylece artmış ve kontrolsüz inflamasyon ile seyreden durum gelişmektedir (Şekil 3).



Şekil 5: MEFV mutasyonları, aşırı inflamasyon yanıtına neden olarak organ fonksiyonlarında bozulmaya yol açar.



Şekil 6: Pyrin proteininin de yer aldığı inflamasyon yolağı (44).

Pyrin, N-terminalinin pyrin domaini aracılığı ile “ASC” proteinine (“Apoptosis associated speck like protein with a CARD”) bağlanır. ASC’ın üç önemli görevi; apoptoz, interleukin (IL)-1β’nin salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1’in oluşturulması ve aktivasyonu, inflammatuar cevabın başlaması ve yayılmasında görevli olan nükleer faktör kappa-B (NF κ -B) aktivasyonudur (45). Ağır inflamasyonun olduğu bölgelerde nötrofil içi ASC düzeyi yükselmiştir. Aktif kaspaz-1 pro-IL-1β’yı IL-1-β’ya çevirmekte ve salgılanan IL-1β inflamasyonu başlatmaktadır. Kaspaz-1 ve ASC ilişkisini önleyen pyrin, IL-1β molekülünün aktifleşmesini engeller (46).

2.1.5. Klinik

2.1.5.1. Tekrarlayan ateş

AAA, tekrarlayan ateş atakları, steril peritonit, plörit ve artrit ile karakterizedir. Ateş yüksekliği hastalığın en tipik bulgularından biridir. Diğer belirti ve bulgulardan önce meydana gelebilir. Genellikle 38-40°C'ye kadar yükselebilir. Hafif ataklarda tek bulgu olarak gözlenebilir. Ataklar ortalama olarak 12-96 saat sürer. Atak sıklığı haftada birden 3-4 ayda bire kadar değişebilir. Zorlu egzersiz ve aktivite, stres, soğuk ortam, kadınlarda menstrasyon dönemleri FMF atağını provake edebilir (7).

2.1.5.2. Karın ağrısı

Abdominal ataklar, hastaların yaklaşık % 95'inde gözlenir ve en yaygın meydana gelen atak şeklidir. Klinik ve patolojik bulgular, generalize akut peritonitin tanısı ile karışabilir. Aniden yükselen ateşle birlikte karının bir bölgesinden başlayan ağrı hızla bütün batına yayılır. Ağrı lokalize kalarak apendisit ya da kolesistiti taklit edebilir. Muayenede akut batını düşündürecek tarzda distansiyon, rebound, barsak seslerinde azalma saptanır (47; 48). Akut batına benzeyen klinik görüntü, laparotomi ve apendektomiye sebep olabilir.

2.1.5.3. Eklem ağrısı

Eklem ağrısı ve artrit, AAA'nın yaygın bir özelliğidir. Genellikle en sık alt ekstremitelerde, büyük eklemleri etkileyen monoartrit olarak kendini gösterir. Başlangıç anidir ve 39-40°C civarında ateş vardır. Yineleyen akut ataklarda, tek eklemde bir kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve hassasiyet ile kendini gösterir. Genellikle bir hafta içinde iyileşir.

Hastaların yaklaşık % 5'inde, uzamış artrit olabilir. Genellikle diz veya kalçayı kuşatır. Ayak bileği ve nadir olarak temporomandibular eklem gibi diğer eklem tutulumları da bildirilmiştir. Semptomlar bir aydan daha fazla devam eder. Klasik klinik görüntü, kronik monoartrit. Kronik oligoartrit nadir olarak görülebilir. Uzamış bazı vakalar, özellikle kalça ve nadiren diğer eklemlerde olmak üzere, yetmezlik ve eklem replasmanına sebep olan yıkıcı artrite maruz kalmasına rağmen; vakaların çoğunda, artrit tamamen düzelir (48).

Artritli AAA hastaları arasında; daha genç başlangıç yaşı, daha fazla erizipel benzeri eritem ve daha fazla myalji gözlenir. Kronik artritli bazı AAA hastaları, spondilartritin kriterlerine uyar. Onlarda genellikle, unilateral veya bilateral sakroileit, entezit, minimal radyografik spinal tutulumlu sırt ve boyun ağrısı gözlenebilir ve diğer spondiloartritli vakalar ile kıyaslandığında hemen daima HLA-B27 negatiftir (48).

2.1.5.4. Plörit-Perikardit

Unilateral plörit yüzünden oluşan göğüs ağrısının akut febril atakları, yalnız başına veya karın ve eklem atakları ile birlikte oluşabilir. Perikardit AAA hastalarının % 24'ünde gelişir. AAA'de sadece tekrarlayan perikardit, çok nadir olarak bildirilmiştir. Perikardiyel atakların, nadiren perikardiyal tamponat ve konstriktif perikardite dönüşebildiği bildirilmiştir (48).

2.1.5.5. Vaskülit

AAA'ne vaskülit eşlik edebilmektedir. Vaskülit, artriti olan hastalarda artritsiz hastalardan daha sık saptanır. AAA'nde en sık Henoch-Schönlein purpurası görülmektedir ve sıklığı % 5-7 arasındadır. Poliarteritis nodosa ise %1 oranında bildirilmiştir (49).

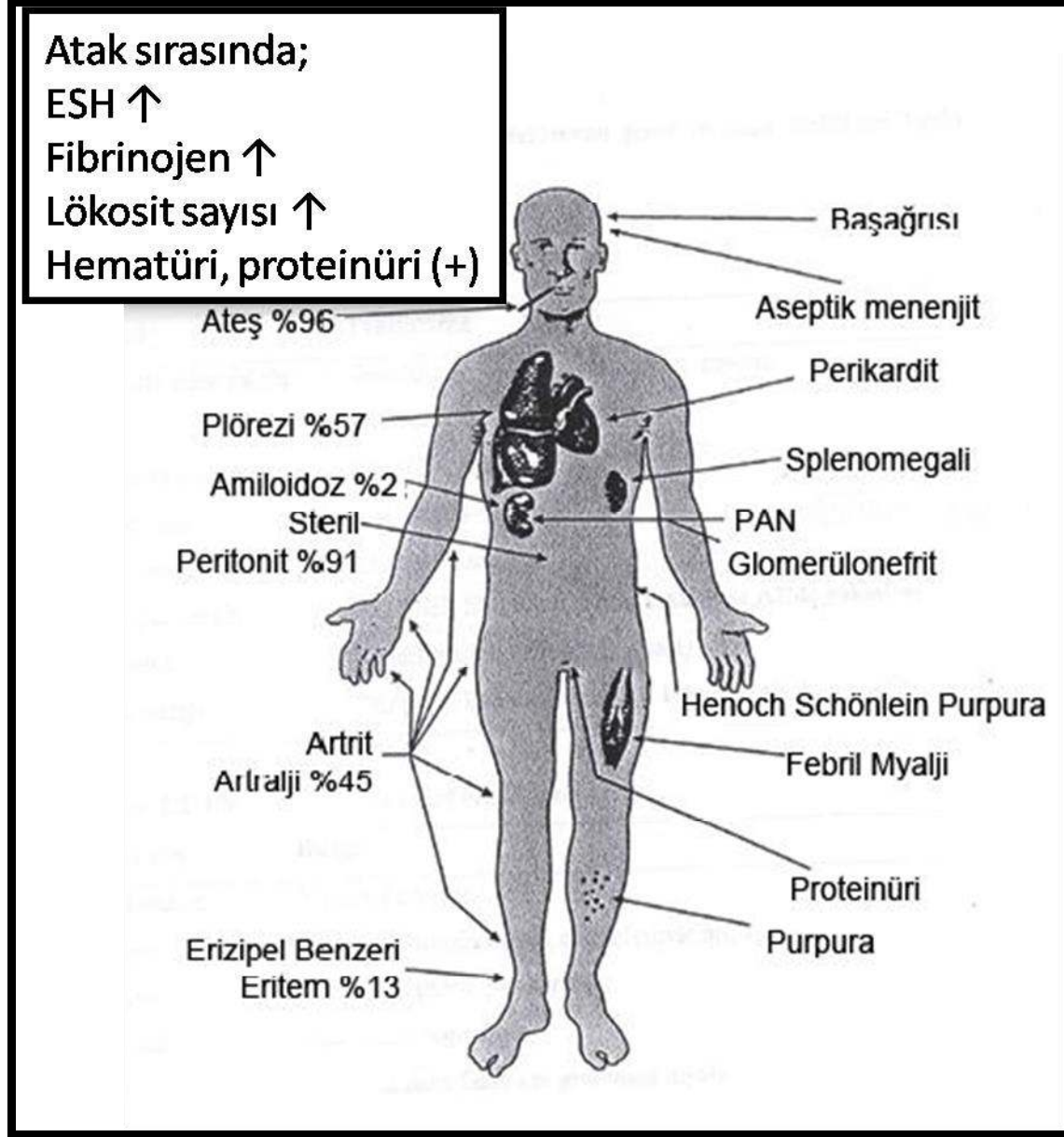
2.1.5.6. Erizipel benzeri eritem

AAA'nin karakteristik bulgularından birisi de, alt ekstremitelerde özellikle ayak sırtı ve ayak bileği yerleşimli olan erizipel benzeri eritemdir. Lezyon çoğunlukla ateş, bazen de artrit ile birlikte bulunur (48).

2.1.5.7. Amiloidoz

AAA'nın en sık hasar verici komplikasyonu, genellikle böbrekleri etkileyen ve kronik renal yetmezliğe ilerleyen amiloidozdur. Amiloid, sekonder amiloid tipi olan AA tipindedir. Amiloidozun prevalansı, etnik gruplar arasında farklılıklar gösterir (48). Türk AAA hastalarında %12,9'dan daha yüksek oranda bildirilmiştir. Geç başlangıçlı AAA hastalarının amiloidoz için düşük riske sahip olduğu bilinir ancak 7 yaşından sonra hastalık başlangıcı olan Türk hastalarda amiloidoz gelişme riski halen yüksektir. Tanıdaki gecikme ve kolşisin tedavisindeki yetersizlik amiloidoz riskini artırır (50).

Glomerulonefrit, AAA hastalarında nadiren gelişir. Persistan proteinürisi olan glomerulonefritli bazı AAA hastaları, amiloidoz olarak yanlış tanı alabilirler (24).



Şekil 7: AAA'nde klinik bulgular (<http://www.burclab.com/tr/genetik/teknik-bultenler/fmf>)

2.1.6. Laboratuvar bulguları

AAA hastalığı için kesin tanı koydurucu laboratuvar testi bulunmamaktadır. Akut ataklar sırasında sık rastlanılan laboratuvar bulguları sola kayma ile birlikte olan lökositoz, eritrosit sedimantasyon hızındaki artış ve akut faz yanıtındaki artıştır (CRP, Serum amiloid A, fibrinojen, haptoglobulin, C3,C4). Bu tetkiklerin tamamının akut ataklar arasındaki dönemde normal olduğu bildirilmesine karşın son zamanlarda serum amiloid A'nın (SAA) subklinik inflamasyonu saptamada en iyi gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (51; 52).

İdrar tetkiki genellikle normaldir. Atak sırasında transiyent proteinüri ve mikroskopik hematüri olabilir. Persistan proteinüride amiloidoz, hematüride IgA nefropatisi akla gelmelidir.

IL-1, IL-6 ve TNF- α atak sırasında hastalarda yüksek bulunurken, IL-6'nın ataklar arasındaki dönemde de kontrol grubundan yüksek olduğu ve bunun devam eden subklinik inflamasyonun göstergesi olabileceği düşünülmüştür (53).

Özellikle periton veya sinovya gibi serozal sıvılarda C5a inhibitör aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (38). AAA'ya bağlı gelişen sinovitte sinovyal sıvı oldukça bulanık olup inflamatuvar sıvı özelliğinde görülür ancak viskozitesi korunmuştur ve sterildir (54). Uzamış artritde osteoporoz, skleroz, eklem mesafesinde daralma, kayma, erozyon ve kalça ekleminde aseptik nekroz gelişebilir.

Abdominal bilgisayarlı tomografide nefrotik safhada büyük hipodens böbrekler, üremik safhada küçük hiperdens böbrekler saptanır. Proteinüri varlığında amiloidoz göz önüne alınarak renal veya rektal submukozal biyopsi yapılmalıdır. Kardiyak amiloidozda ekokardiyografide myokartta artmış dansiteler, sol ventrikül duvar kalınlığında artış, EKG'de düşük voltaj, sintigrafide Tc-pirofosfat uptake'inde artış saptanır (55; 56; 57; 58).

2.1.7. Tanı

AAA tanısı; klinik tanı kriterlerine uyum, aile öyküsü, kolşisin tedavisine yanıt ve mutasyon analizi sonuçlarının tarihsel, coğrafik ve etnik bilgilerimiz ışığında değerlendirilmesine dayanır.

MEFV geni 1997 yılında klonlanana kadar Ailevi Akdeniz Ateşi'nin tanısı moleküler düzeyde yapılamamaktaydı. 1997 yılına kadar AAA ile ilgili spesifik patognomonik bir belirtinin olmaması ve yapılan biyokimyasal testlerin de tanı için tek başına yeterli olmaması nedeniyle hastalığın tanısı, bir grup klinik ve laboratuvar değerlendirmenin bir arada değerlendirilmesiyle koyuluyordu. AAA'dan şüphelenen hastalara kolşisin başlanıyor tedaviden fayda gören hastalarda ilaç tedavisine devam ediliyordu (59; 60).

Barakat ve arkadaşları tarafından bulunan Metaraminol testi de AAA şüphesi olan bir grup hasta üzerinde denenmiş ve başarılı olmuştur (60). Yapılan plasebo kontrollü çalışmada 500 ml normal salin solüsyonu içinde verilen 10 mg metaraminol biartrat'ın (Aramin) 3-4 saatlik infüzyonu sonrası hasta olduğundan şüphelenilen 21 kişide tipik AAA atağı oluşması sağlanmış 21 kişilik kontrol grubunda ise ilaca yanıt alınamamıştır.

Günümüzde hastalığın tanısında klinik bulgular, aile öyküsü ve moleküler tarama birlikte kullanılmaktadır. MEFV genindeki mutasyonlar ile hastalık arasındaki ilişki bulunmuş olmasına rağmen AAA tanısında klinik bulgular en önemli etken olmaya devam etmektedir. Çünkü yapılan taramalar hastalıktan sorumlu başka genlerin de varlığını açıkça göstermektedir. Tanı için yapılan uzun süreli çalışmalar sonucu Livneh ve Tel-Hashomer kriterleri geliştirilmiştir. En sık kullanılan Tel-Hashomer kriterleridir (Tablo 1; 2) (61; 62; 60).

Tablo 1: Tel-Hashomer tanı kriterleri. 2 major veya 1 majorle birlikte 2 minör kriter varlığında **kesin tanı**, 1 major ve 1 minör kriter varlığında **olası tanı** konulabilir

Tel-Hashomer Kriterleri:
Major kriterler 1. Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları 2. Predispozan hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması 3. Sürekli kolşisin tedavisine anlamlı yanıt
Minör kriterler: 1. Tekrarlayan ateşli ataklar 2. Erizipel benzeri eritem 3. Birinci derece akrabalarda AAA varlığı

Tablo 2: Livneh ve arkadaşlarının önerdiği yeni kriterler. Kesin tanı için; 1 major kriter veya en az 2 minör kriter veya 1 minör 5 destekleyici kriter veya 1 minör ve destekleyici kriterlerden ilk 5’inden 4 tanesinin bulunması gerekir.

Livneh ve arkadaşlarının önerdiği yeni kriterler	
Majör Kriterler 1. Tipik ataklar (≥ 3 kez tekrarlayan aynı karakterde, atak süresinin 12-72 saat olması ve ateşli olması, ateşin 38°C ve üzerinde olması) 2. Yaygın peritonit 3. Plörit (tek taraflı) veya perikardit 4. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği) 5. Yalnızca ateş 6. İnkomplet abdominal ataklar	Destekleyici Kriterler: 1. Ailesinde AAA bulunması 2. Etnik köken 3. Atakların 20 yaşından önce başlaması 4. Atağın ciddi yatak istirahati gerektirmesi 5. Atakların kendiliğinden geçmesi 6. Ataklar arası semptom olmaması 7. Geçici inflamasyonu gösteren anormal test cevabı (lökositoz, ESH, fibrinojen, SAA artışı) 8. Tekrarlayan proteinüri ya da hematüri 9. Gereksiz laparotomi veya apendektomi öyküsü 10. Akraba evliliği
Minör Kriterler 1. İnkomplet göğüs atakları 2. İnkomplet artrit atakları 3. Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı 4. Kolşisine iyi yanıt	İnkomplet ataklar 1. Vücut ısısının <38°C olması 2. Sürenin daha uzun veya kısa olması (6 saat-1 hafta) 3. Abdominal atak boyunca peritoneal bulguların olmaması 4. Lokalize abdominal ataklar 5. Spesifik eklemlerin dışındaki eklemlerin tutulumu

Hastada mutasyon tespit edilsin edilmesin klinik bulguları AAA ile tam uygunluk gösteriyorsa ve hasta Tel-Hashomer kriterlerini sağlıyorsa AAA tanısı alır ve tedavi başlanmasını hak eder. Ayrıca eritrosit sedimentasyon hızı, etnik köken akut faz reaktanlarında yükselme de tanıyı destekler (63).

Hastalık Ağırlık Skorlaması

AAA hastalarında hastalığın ağırlığını belirleyebilmek amacıyla aşağıdaki kriterler ve puanlama sistemi geliştirilmiştir.

Tablo 3: Hastalık şiddetinin belirlenmesi amacıyla kullanılan skorlama değerlendirilmesi

Başlangıç yaşı		Atakları kontrol eden kolşisin dozu	
5 yaş altı:	3 puan	Yanıt yok:	4 puan
5-10 yaş arası:	2 puan	2 mg/gün:	3 puan
10-20 yaş arası:	1 puan	1,5 mg/gün:	2 puan
20 yaş üstü:	0 puan	1mg/gün:	1 puan
Atak sıklığı		Eklem tutulumu	
Ayda ikiden fazla atak:	3 puan	Uzamış artrit:	3 puan
Ayda 1-2 atak:	2 puan	Akut eklem tutulumu:	2 puan
Ayda bir ataktan az:	1 puan		
Erizipel benzeri eritem		Amiloidoz	
Varsa:	2 puan	Varsa:	3 puan
		Fenotip II şeklinde ortaya çıkarsa:	4 puan
<u>SKORLAMA</u>			
Hafif hastalık: 2-5 puan			
Orta ağırlıkta hastalık: 6-10 puan			
Ağır hastalık: 10 puan üstü			

2.1.8. Tedavi

Hastalığın tanımlanmasından 1970'li yılların başına gelene dek çeşitli tedavi yöntemleri tanımlanmış olsa da bu tarihten itibaren hastalığın tek tedavi ajanı kolşisindir. Kolşisinin, AAA tedavisinde ancak sürekli kullanılırsa etkili olabileceği ilk kez Emir Özkan ve bunu izleyerek SE Goldfinger tarafından 1974'de bildirilmiştir (27; 64). Bitkisel kökenli bir

fenantren derivesi olan kolşisin mitozu metafazda keserek hücre bölünmesini durdurur. AAA'ndeki etkisinin ise tam olarak bilinmemesine karşın lizozomal degranulasyonu engellemek ve hücre duvarını sağlamlaştırmak yolu ile olduğu sanılmaktadır. Bir diğer önemli etkisi ise akut faz proteinlerinden serum amiloid A düzeyini baskılamasıdır (65; 66).

Kolşisin tedavisi ile AAA'li hastalarda hem nöbet şiddeti, hem de nöbet sıklığı belirgin olarak azalmaktadır. Hastaların yarısında nöbetler tamamen kaybolurken, % 30-40 kadarında kısmi baskılanma sağlanmakta, % 10 kadarında ise ataklar kontrol altına alınamamaktadır. Kolşisin sadece atak sırasında kullanılırsa, ya da o sırada doz arttırılırsa etkili değildir, esas etkisi ancak sürekli kullanıldığı zaman ortaya çıkmaktadır. Kolşisinin tüm yaşam boyunca kullanılması zorunludur. Tedaviye ara verilir verilmez ataklar yeniden başlamaktadır. Kolşisinin tedavide kullanılacak en düşük dozu 1 mg/gün ve en yüksek dozu ise 2 mg/gün olmalıdır.

İlacın bulantı, kusma, ishal gibi gastrointestinal ve çok nadiren geçici lökopeni ve trombositopeni, miyozit, aminotransferazlarda yükselme gibi yan etkileri bulunmaktadır. İshalin ortaya çıktığı durumlarda doz azaltımına gidilebilir. İlaç dozu ishal geçtikten sonra arttırılır. Kolşisin özellikle glomerül filtrasyon hızı düşük olgularda ciddi miyopatilere yol açabilmektedir. AAA'ne bağlı olarak ortaya çıkan artritlerde kolşisin tedavisine non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar eklenmelidir. Bu noktada en çok kullanılan ilaçlar indometazin ve ibuprofendir (67).

2.1.9. İzlem

Ailesel Akdeniz ateşli olgular kolşisin tedavisi altında ortalama 4-6 aylık aralar ile mutlaka görülmelidir. İzlem sırasında olguların her birinde oluşabilecek olan anemi, lökopeni, trombositopeni ve idrar değişiklikleri kontrol edilmelidir (67).

2.1.10. Genetik

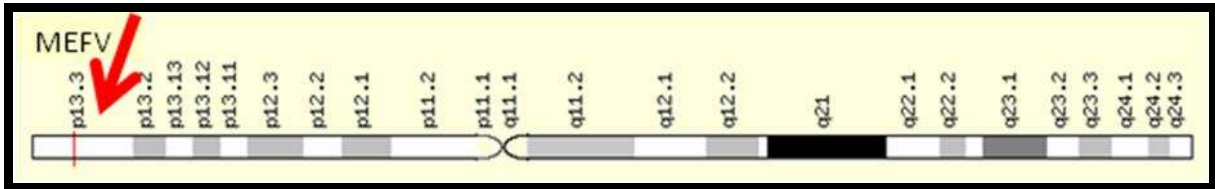
AAA otozomal resesif geçişli bir hastalık olarak bilinmektedir. AAA hastalarında %18-41 pozitif aile hikayesi bulunmuştur (68).

Hastalığın moleküler temeli için yapılan çalışmalar sonucunda sorumlu genin, birbirinden bağımsız olarak 1997 yılında uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA

Konsorsiyumu tarafından 16. kromozomun subtelomerik bölgesinde yer aldığı (16p13.3-p13.1) belirlenmiştir (Şekil 6) (8; 69). Bu bölgedeki 3.7 kb (kilo baz)“lık bir genin (Ailevi Akdeniz Ateşi geni=MEditerranean FeVer geni = MEFV geni) kodladığı 781 amino asitlik proteine, ateşle ilişkisinin olduğunu ima ederek “pyrin” adı verilmiştir. Fransız AAA konsorsiyomu eş zamanlı olarak 16. kromozomda MEFV genini içeren bölgeyi belirlemiş. Bu grup bu genin üretmiş olduğu aminoasit birimine Akdeniz anlamına gelen “Mare Nostrum”dan esinlenerek “marenostin” adını vermiştir. İnternasyonal AAA konsorsiyomu MEFV geninin 10. ekzonunda 3 missens mutasyon tanımlamıştır. Fransız AAA konsorsiyomu ise 4 farklı sekans varyasyonu bildirmiştir (24; 25).

Fransız AAA Konsorsiyumu kendi çalışma gruplarında, hastalarının %85’inde; M694V, M680I, M694I ya da V726A mutasyonlarını saptamıştır. 1998’de bu mutasyonlara ek olarak ekson 10’da dört yeni mutasyon daha tanımlanmıştır. O dönemden günümüze 306 varyasyon tespit edilmiştir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>) (Şekil 7).

Bildirilen mutasyonların büyük çoğunluğu 10. ekzon üzerinde, 681. aa ile 761. aa arasındadır.



Şekil 8 : MEFV geninin genomik lokalizasyonu (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEFV>)

Onuncu ekzonda ilk tanımlanan ve hastalıkla ilişkili olduğu kanıtlanmış 4 önemli mutasyon tek nükleotid değişimine bağlı olup, pyrinin B30.2 domaininde yer almaktadır. Bu 4 önemli mutasyondan ikisi 694. amino asidi etkilemektedir. M694V ve M694I mutasyonlarında 694. amino asitte sırası ile metiyonin yerine valin yada izolösin değişimi söz konusudur. Diğer iki mutasyon 680. amino asitte metiyonin yerine izolösin geçmesi (M680I), 726. amino asitte valin yerine alanin geçmesi (V726A) ile gerçekleşmektedir.

10. eksondaki M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları, hastalığın yaygın olarak görüldüğü dört etnik grupta taşıyıcı ya da hasta kromozomlardaki AAA mutasyonlarının %85'ini oluşturur (63; 64; 65). M694V, birçok etnik grupta en sık görülen mutasyon olarak saptanmıştır. Türk AAA Çalışma Grubu'nun yaptığı çok merkezli çalışmada %51.4 oranı ile M694V en sık saptanan mutasyondur (1). Fakat Askenaz Yahudilerinde %38 oranı ile V726A mutasyonu en sık saptanan mutasyondur. M680I mutasyonu Ermenilerde ikinci sıklıkla görülen mutasyondur. Ortadoğu kökenli Araplarda, Afrika kökenlilere göre daha sık V726A mutasyonu görülür (19).

İkinci ekzonda yer alan, 148. amino asitte glutamik asit yerine glutamin geçmesi ile gerçekleşen E148Q mutasyonu Akdeniz toplumunda sık görülen bir varyant olup, nonpatojen olduğu veya E148Q mutasyonu varlığının daha hafif hastalığa neden olduğu düşünülmektedir. E148Q mutasyonunu homozigot taşıyan bireylerin %55'i asemptomatiktir ve bu hastalarda amiloidoz gelişimi bildirilmemiştir (19). Ancak homozigot E148Q taşıyıcılarında AAA klinik bulguları görülebilmektedir. E148Q bazen tek bir ekzon 10 mutasyonu taşıyan AAA hastalarında "trans" halinde saptanabilmektedir. Bazı ekzon 10 mutasyonları ile "cis" şeklinde görülebilmektedir. Bazı hastalarda E148Q kompleks alleli taşıyıcılığı, tek başına E148Q mutasyonu taşıyıcılığından daha ağır seyirli fenotiple ilişkili bulunmuştur (19).

Otozomal resesif kalıtılan hastalıkların klinik bulgularının ortaya çıkabilmesi için her 2 allelinin de mutant olması gereklidir. Ancak yapılan çalışmalar, belirgin bir genotipik çeşitlilik gösteren bu hastaların bir kısmında sadece tek bir mutasyon saptanabildiğini net olarak göstermektedir (70; 3) Hatta klinik kriterlere tam uyumlu olup tanı almış, tedavi başlanmış pek çok hastada MEFV geninde mutasyon saptanamamıştır. Bu durum

1. Genlerin regülatuar bölgelerinde rutinde taranmayan bir bölgede mutasyon varlığına,
2. Epigenetik faktörlere,

3. Genin ekspresyonunu düzenleyen diğer genlerde bulunan bir soruna,
4. Hastalığın poligenik ya da multigenik olmasına,
5. Bu proteinlerin bulundukları yere taşınırken kullandıkları transporterlardaki sorunlara, bağlı olabilir.

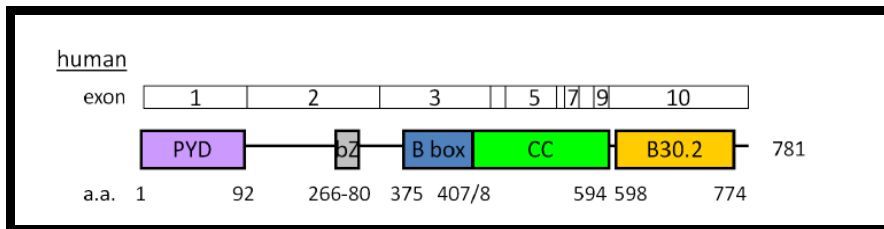
Bazı çalışmalarda V726A-E148Q kompleks allelinin amiloidoz için risk oluşturduğu bildirilmiştir. M694I-E148Q kompleks alleli taşıyıcılığının dominant geçişli AAA hastalığı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (71; 72).

En sık görülen M694V homozigot mutasyonunun Yahudi, Arap, Ermeni popülasyonlarındaki sistemik amiloidoz gelişme riskini arttırdığı gözlenmiştir. Birçok grup tarafından homozigot M694V mutasyonunun şiddetli hastalık formu ve artan amiloidoz riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (39).

E148Q ve V726A mutasyonlarının düşük penetranslı ve düşük amiloidoz geliştirme riskine sahip oldukları düşünülmektedir. Ancak bazı araştırmacılar, V726A/M680I, M694I/M694I, V726A/V726A gibi kompaund heterozigot mutasyonlara sahip hastalarda da amiloidoz geliştiğini bildirmişlerdir (73; 74). M694V homozigot mutasyonunun erken başlangıç yaşı, sık atak, artrit ve erizipel benzeri eritem riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (1).

2.2. MEFV geninin yapısı

Patolojik varyantlarının AAA'nden sorumlu olduğu bilinen tek gen MEFV genidir. MEFV sağlıklı kişilerde inflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan, pyrin adlı bir proteini kodlamaktadır. Bu yüzden bu gende oluşacak mutasyonlar, pyrinin lökositler üzerindeki otoregülatuar görevini yapamamasına ve inflamasyon kontrolünün bozulmasına neden olur (4).



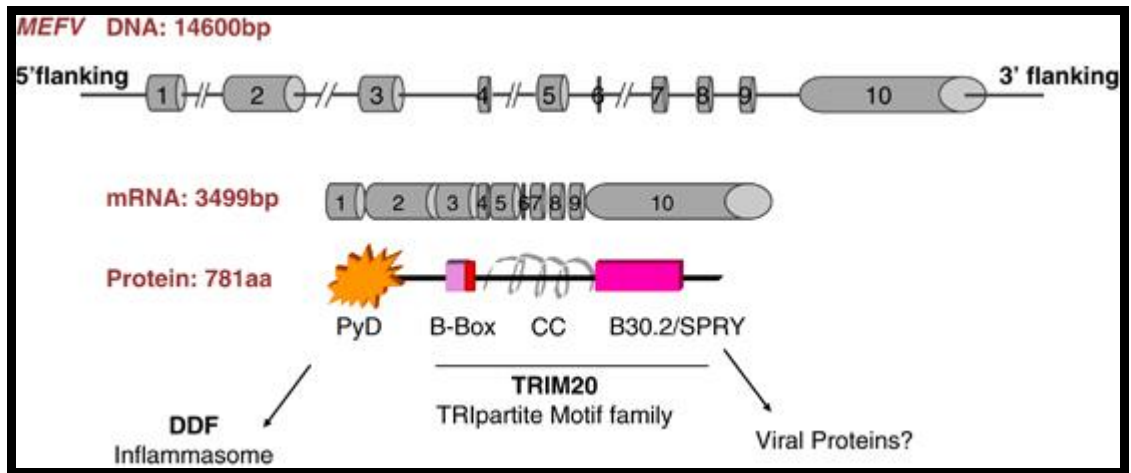
Şekil 8: MEFV geni ve pyrin proteini

Şekil 8’ de MEFV geninin ekzonları, içi boş kutucuklar olarak 1’den 10’a kadar numaralandırılmış kutucuklar şeklinde resmedilmiştir. Alttaki renkli kutucuklar, genin translasyon ürünü olan pyrin proteinini simgelemektedir

MEFV geni 16. kromozomun 15 kb’lık genomik DNA’sını kapsayan bir bölgede yer alır ve 10 ekzon içermektedir. Bu genin kodladığı 3.7 kb’lık transkriptin oluşturduğu protein ürünü olan “pyrin/ marenostrin” 86 kilodalton’luk, 781 aminoasitten oluşan, arginin ve lizin aminoasitlerince zengin, pozitif yüklü bir proteindir. Pyrinin monositlerde sitoplazmada; sinovyal fibroblastlar, dentritik hücreler ve nötrofillerde ise çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir (75; 76). Pyrinin bulunduğu hücreye göre farklı proteinlerle etkileşime girerek, farklı fonksiyonları üstlenebileceği düşünülmüştür.

2.3. MEFV geninin transkripsiyon ürünü

MEFV geninin transkripsiyon ürünü 3499 baz çifti uzunluğunda bir RNA dizisidir.



Şekil 9: MEFV geninin ve ekspresyon ürünlerinin RNA ve protein düzeyinde şematizasyonu

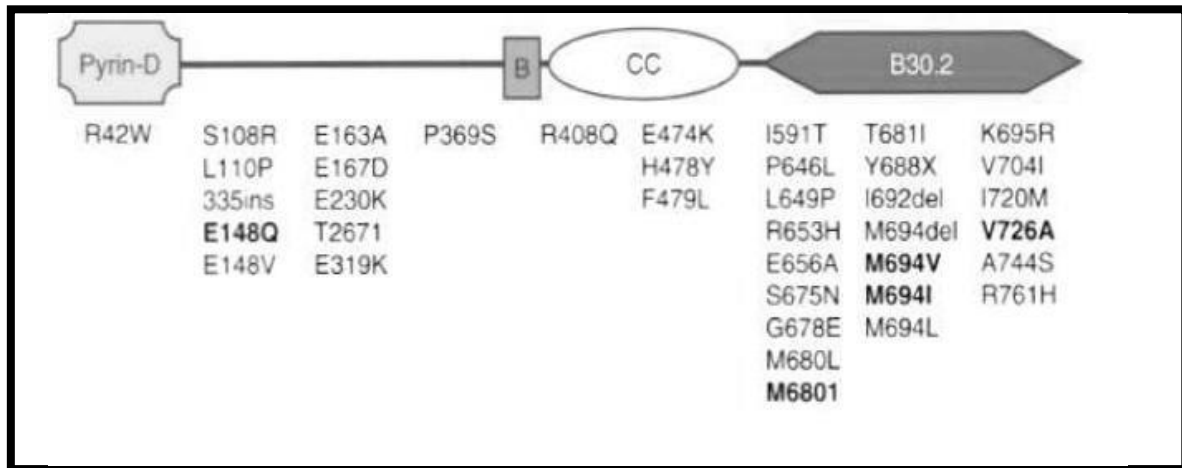
MEFV cevabı hücreden hücreye veya türler arasında farklılık gösterebilmektedir. İnsan monositlerinde; lipopolisakkarid (LPS), tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interferon (IFN)- γ ile inkübasyon sonucu 24. saatte MEFV geni ekspresyonu artmakta, antiinflamatuvar sitokinler olan interlökin IL-4, IL-10 ve transforming growth faktör (TGF)- β ile ekspresyon düşmektedir. Nötrofillerde; IFN- γ , MEFV geni ekspresyonunu artırırken, LPS, TNF- α , IL-4 ve IL-10’un MEFV geninin ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisi olmamaktadır (77).

2.4. Pyrin; MEFV geninin translasyon ürünü

Pirin/Marenostrin nötrofillerde, monositlerde ve (peritoneal ve sinovial fibroblastlarda) eksprese edilmektedir. Yerleşim: sitoplazma, mikrotubuluslar İşlev: Nötrofillere bağlı yangısal yanıtın düzenlenmesi (down-regulasyon)

Pyrin proteini, dört fonksiyonel domain (bölge) içermektedir (Şekil 10).

1. Amino (N) ucu PYRIN domaini (PAD, PyD veya DAPIN olarak da isimlendirilir)
2. “B box zinc finger” domain (BB-ZF)
3. “Coiled coil” domain (CC)
4. Karboksi (C) ucu



Şekil 10: Pyrin proteini fonksiyonel domainlerinin şematizasyonu. Her bir domainin hastalıktan sorumlu mutasyonları, o domainin altında neden olduğu aminoasit değişimini belirtecek şekilde sıralanmıştır. Koyu renkli bölgeler en sık 5 mutasyonu göstermektedir.

Pyrinin N-terminalinin ilk 92 aminoasitlik bölgesinde yer alan bir motife “pyrin domain” adı verilmiştir. Bu motif son zamanda klonlanan bazı proteinlerin yapısında da yer almaktadır. Pyrin domaininin görevi; sitokin aktivasyonunda ve apoptozun regülasyonunda rol oynayan proteinlerin etkileşimini kolaylaştırmaktır. Pyrin domaini adı verilen bu N-terminal domaini; Pyrin proteinin ”pyrin parçası” (pyD) olarak adlandırılan bölümü, özellikle apoptozisde görev alan ölüm domainlerine DD (death domain), ölüm efektör domainlerine

DED (death effector domain) ve kaspaz toplama domainlerine CARD (caspase recruitment domain) yapısal olarak benzemektedir.

Pyrinin C-terminal kısmında yer alan “B-box” ve “coiled coil” proteinleri birçok proteinde olduğu gibi multimerizasyonda rol oynar. Yine C-terminal kısmında yer alan B30.2 domainin fonksiyonu ise protein/protein etkileşimine katkıda bulunmaktır. AAA ile ilgili mutasyonların büyük çoğunluğu bu bölümde meydana gelmektedir. Pyrin, N-terminalinin pyrin domaini aracılığı ile “ASC” proteinine (Apoptosis associated speck like protein with a CARD) bağlanır. ASC; amino ucunda pyrin domaini, karboksi ucunda CARD içeren adaptör bir proteindir. Nötrofillerde ve monositlerde eksprese edilir. ASC’nın üç önemli görevi; apoptoz, interleokün(IL)-1 β ’nin salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1’in oluşturulması ve aktivasyonu, inflamatuvar cevabın başlaması ve yayılmasında görevli olan nükleer faktör kappa-B (NF κ -B) aktivasyonudur (46). Ağır inflamasyonun olduğu bölgelerde nötrofil içi ASC düzeyi yükselmiştir. ASC prokaspaz-1’e (IL-1 β dönüştürücü enzim) bağlanarak onun agregasyonu ve otoaktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif kaspaz-1 pro-IL-1 β ’yı IL-1 β ’ya çevirmekte ve salgılanan IL-1 β inflamasyonu başlatmaktadır. Kaspaz-1 ve ASC ilişkisini önleyen pyrin, IL-1 β molekülünün aktifleşmesini engeller (78). Ayrıca pyrin “ASC” ve “kaspaz 1” arasındaki ilişkiyi bozarak NF κ -B aktivasyonunu ve apoptosisi önler (78). Mutasyona uğramış pyrin, IL-1 β üretimini artırır, lökositlerin apoptozisini geciktirerek kontrolsüz inflamasyona neden olur.

2.5. Epigenetik

Organizmayı oluşturan bütün hücreler aslında aynı DNA dizisine sahip olmasına rağmen, hücre tipi ve fonksiyonları gen ifadesindeki kalitatif ve kantitatif farklılıklardan ötürü değişiklik gösterir. Gen ifadesinin kontrolü bu açıdan gelişim ve farklılaşmanın temelinde yer alır. Farklılaşmış hücreleri karakterize eden gen ifade modelleri gelişim süresince ortaya çıkarlar ve mitoz ile bölünen hücrelerde bu modeller korunur. Bu nedenle, kalıtsal genetik bilgiye ek olarak hücreler DNA’nın nükleotit dizisinde kodlanmayan bu bilgiyi de aktarırlar.

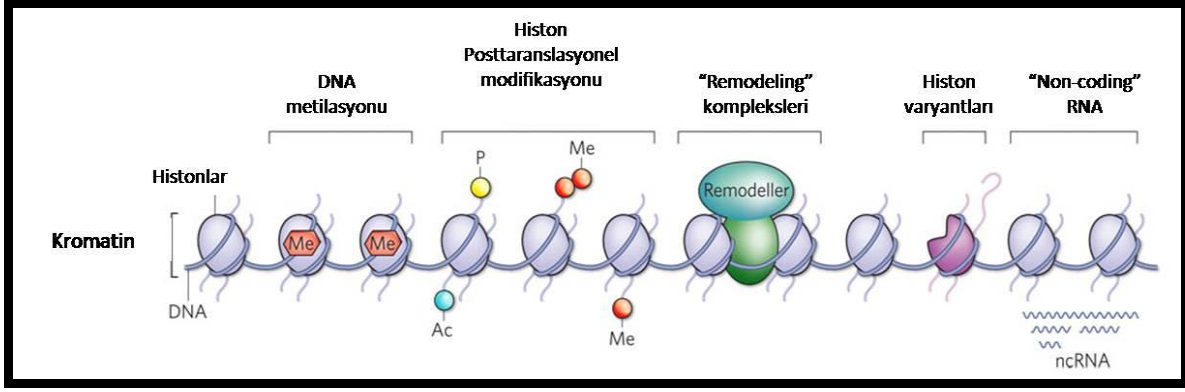
Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, stabil kalabilen ve gen ifadesini düzenleyici mekanizmada meydana gelen, mitotik ve imkân dahilinde mayotik olarak kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (79; 80). Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü ise son çalışmalarında epigenetiği, gen aktivitesi ve ifadesindeki kalıtsal

değişiklikler ve kalıtsal olmasa da hücrenin transkripsiyonel potansiyelindeki stabil, uzun süreli değişimler olarak tanımlamaktadır (81). Gen ifadesindeki bu değişimler doğal gelişim süreci olan embriyogenezde önemli rol oynar, epigenetik kodun yeniden oluşturulduğu bu süreç, döllenme gerçekleşikten kısa bir süre sonra meydana gelir ve bu şekilde hücrenin kaderi, hangi hücre tipine farklılaşacağı belirlenir. Epigenetik aynı zamanda genetik olarak aynı bireyler arasında fenotipik varyasyona neden olarak biyolojik çeşitlilikte de rol oynamaktadır (82).

Normal hematopoez süresince gen ifadesindeki muntazam kontrolü ve düzenli işleyişi, “epigenetik gen regülasyonu” olarak bilinen DNA dizisinden bağımsız biyokimyasal olaylar yoluyla kısmen kontrol edilir. DNA dizisindeki genetik bilgiye benzer şekilde, epigenetik bilgi de nesiller boyunca kalıtılabilir, anneden yavru hücreye aktarılabilir ve bu kalıtım yaşamın devamlılığı için gereklidir (76).

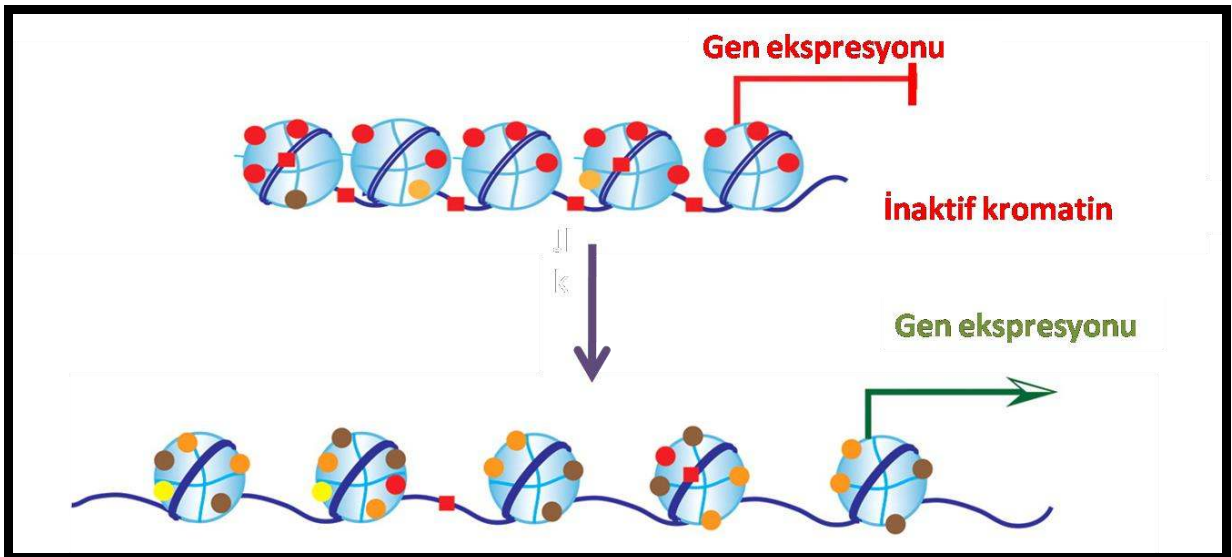
Epigenetik mekanizmalar arasında; DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu, metilasyonu, fosforilasyonu, übikitinasyonu ve sumolasyonu sayılabilir. DNA metilasyonu oldukça stabildir ve embriyogenez gibi özel durumlar haricinde ilk oluştuğunda meydana gelen profil korunmaktadır. Histon modifikasyonları, gen ifadesinin düzenlenmesinde görülen daha dinamik biyokimyasal değişikliklerdir. Daha esnek olan bir başka epigenetik mekanizma ise, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen susturulmasını gerçekleştiren kodlanmayan RNA’lardır. Son yıllarda, lösemnin oluşum sürecinde DNA metilasyonundaki ve histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır ve AML ve diğer hematolojik hastalıkların tedavisi için hedef olarak belirlenmiştir (81).

Histon modifikasyonu; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikinitasyon yoluyla oluşmaktadır. En çok üzerinde çalışma yapılanlar asetilasyon ve metilasyondur. Beş tip histon proteini H1, H2A, H2B, H3 ve H4 nükleosom yapar ve 146 bp DNA’yı sarmalayarak kromatin yapısını oluşturur (80).



Şekil 11: Genin ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar; DNA, RNA üzerinden ya da posttranskripsiyonel etki edebilir. Ac: asetilasyon, P: fosforilasyon, Me: metilasyon, ncRNA: non-coding RNAs.

Normalde pozitif yüklü histon proteini ile negatif yüklü DNA arasındaki elektrostatik çekim, kromatinin kompaktlaşmasına ve gen ekspresyonunun azalmasına neden olur. Histon kuyruklarına histon deasetilaz ile asetil grubu eklenmesiyle kromatin yapısı açılır ve histon preoteinin elektiriksel yükü değiştirilerek gen ekspresyonu uyarılır. Histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu birbiriyle bağlantılıdır ve kromatin remodelinginde rol oynamaktadır. Histon modifikasyonu kromatin yapısının paketlenmesinde değişiklik yaparak gen ekspresyonunu düzenlemektedir (83) (Şekil 12).



Şekil 12: Histon modifikasyonu

DNA ve kromatin modifikasyonuna ek olarak non-coding RNA (nc-RNAs)'lar gen ekspresyon düzenlemesinde rol oynamaktadır. Transkripsiyon sırasında ve posttranskripsiyonel genlerin susturulmasında nc-RNA'lar rol oynamaktadır. “Noncoding RNA”lar “microRNA”lar (miRNA), “small nuclear RNA”lar (snRNA), “small nucleolar RNA”lar (snoRNA), “repeat associated siRNA”lar (rasiRNA) olarak sınıflandırılır (84)

Yapılan çalışmalarda nc-RNA'daki aksamaların birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiş miRNA ekspresyonu bazı kanserlerle; karaciğer, kolon, meme hematopoetik ve beyin ilişkili bulunmuştur (85).

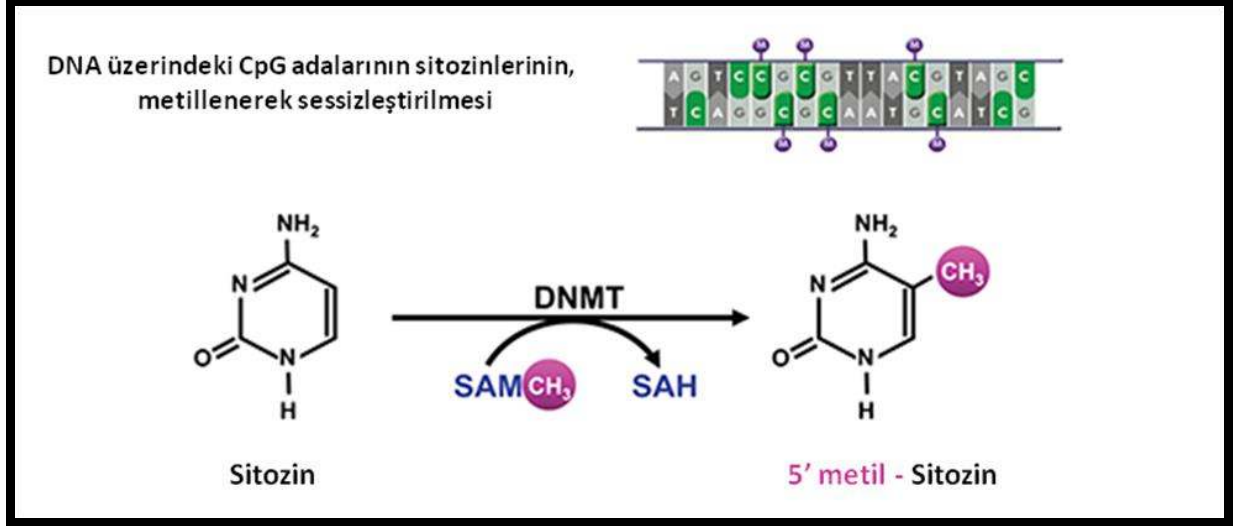
2.5.1. DNA Metilasyonu

Çalışmamızda bu epigenetik mekanizmalardan en sık görülenlerinden biri olarak, AAA hastalarında metilasyonun patofizyolojide oynadığı rolü aydınlatmaya çalıştık. Bu sebeple bu mekanizmadan biraz daha ayrıntılı bahsetmek istedik. DNA metilasyonu, 5'-sitozin-guanozin (CpG) dizisindeki 5. pozisyondaki karbon atomuna bir metil (CH₃) grubunun DNA metiltransferazlar (DNMT) aracılığıyla enzimatik olarak eklenmesiyle gerçekleşmektedir (77). 5' pozisyonundaki sitozinlerin metilasyonları DNA'nın geri çevrilebilir kovalent modifikasyonudur (86; 87) DNMT'ler aracılığıyla katalizlenen metil grubu transferi replikasyon bağımlı bir reaksiyon olup, S fazı süresince replikasyonda CpG dinükleotitleri DNA metilasyonunun hedefi olmaktadır (82).

DNA metiltransferazlar, DNA metilasyonundan sorumlu enzim ailesidir. Bugüne kadar memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B olmak üzere dört DNMT enzimi tanımlanmıştır. DNA metiltransferaz aracılığıyla sitozinin 5-metilsitozine dönüşümü, DNMT'ın S-adenozilmetioninden (SAM) bir metil grubunu sitozinin 5. karbonuna aktarmasıyla gerçekleşmektedir (ŞEKİL 13) (81).

DNMT3A ve DNMT3B, yeni oluşan DNA zincirindeki de novo metilasyonu kontrol ederken, DNMT1'in var olan metilasyon profilinin sürdürülmesinde görev aldığı düşünülmektedir (80). Bir diğer DNMT tipi olan DNMT3L'nin katalitik aktivitesi olmayıp, DNMT3A ve DNMT3B'nin katalitik aktivitesinin stimülatörü olduğu düşünülmektedir.

DNA’da CpG dinükleotitleri bir kez metillendiğinde, DNMT’ler replikasyon çatalında lokalize olup yeni sentezlenen hemi-metile zincir üzerinde çalışarak metilasyon profilinin hücre bölünmesinden sonra sürdürülmesini sağlarlar (86).



Şekil 13: DNA üzerindeki CpG adalarının sitozinlerinin metillenerek sessizleştirilmesi (86)

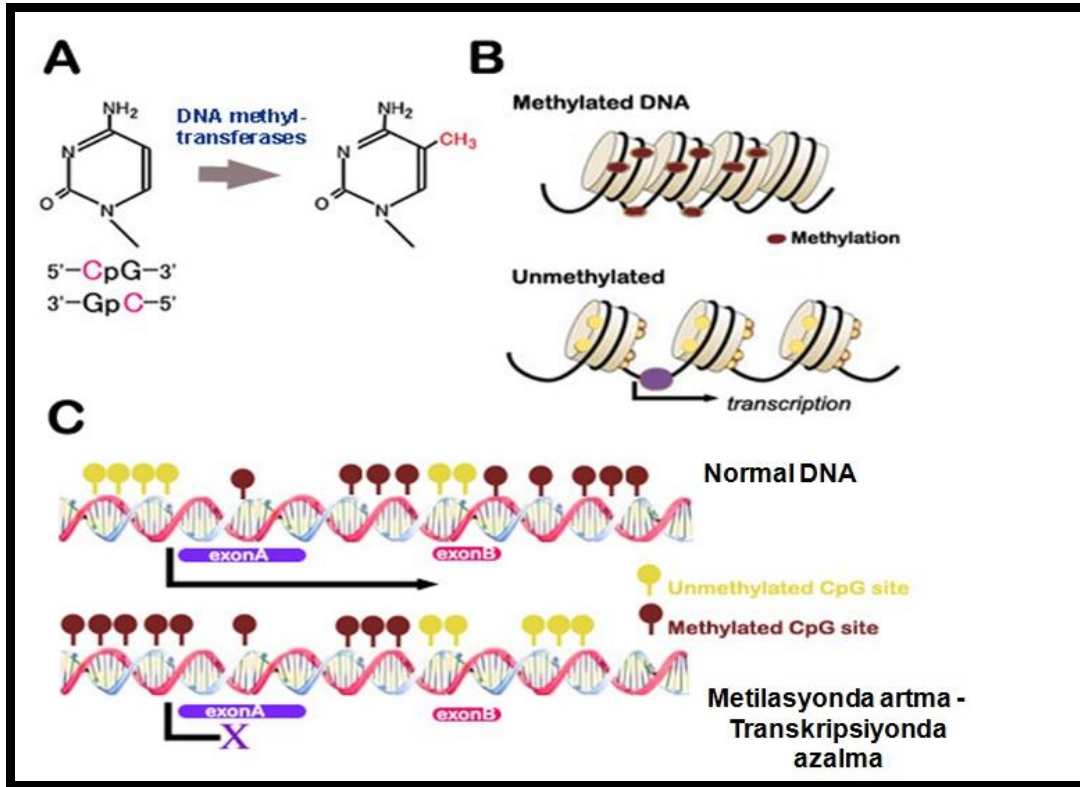
İnsan DNA’sındaki sitozinlerin % 3’ü metiledir. Sitozine bir metil grubu eklenerek DNA’da 5-metilsitozin oluşması hücrel gelişim, farklılaşma ve karsinogenez üzerinde genetik ve epigenetik etkiye sahiptir. Memeli DNA’sında sitozin metilasyonu için, sitozini takip eden bir guanozinden oluşan bir CpG dinükleotiti (CpG adalarını temsil eden “p” sitozin ve guanin nükleotitlerini bağlayan fosfodiester bağı göstermektedir) olması gerekir (81) Metil grupları, normal hidrojen bağı oluşumuna imkan verir ve DNA’nın biyofiziksel özelliğini değiştirmek üzere DNA’nın büyük oluğuna yerleşir.

Dört nükleotidin (A, T, G, C) DNA’da 16 farklı dinükleotit çifti oluşturma ihtimali vardır. CpG çiftleri tüm genomda beklenenden daha az sıklıkla meydana gelmektedir ama genomda yoğun olarak bulundukları bazı bölgelerde “CpG adaları” olarak adlandırılmaktadırlar. CpG adaları ortalama 1000 baz çiftinden oluşmaktadır ve genlerin yaklaşık %50’sinin promotor bölgelerinde bulunmaktadır. Illingworth ve arkadaşları yaptıkları son çalışmada CpG adalarının yaklaşık yarısının genomda promotorlarla bağlantılı olmadığını ama gen içi (intergenik) veya genler arası (intragenik) bölgelerde lokalize olduklarını göstermiştir. CpG adalarının kodlanmayan RNA’lar için transkripsiyon başlama bölgelerini gösterebileceğini de önermektedirler (81; 86)

Birçok durumda CpG adalarının gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İfadelenen genlerin yaklaşık yarısı, kodlayan bölgelerinde CpG adalarına sahiptir ve CpG adaları yüksek oranda ifadesi görülen tüm genlerde ve yarısından azı ise doku bağımlı olarak ifade edilen genlerde yer almaktadır (81). Normal memeli hücrelerinde DNA metilasyonunun asıl hedefi tekrarlı transpozon dizileridir, ancak “imprinting” ve X kromozomu inaktivasyonunda da rol oynamaktadırlar. CpG bölgelerinin insanda tahmin edilenden daha az sıklıkta görülmesinin nedeni, evrim süresince metilsitozinin mutasyonu ile sitozinin timine dönüşerek elimine olmasıdır. Diğer bir taraftan insan genomu, beklenenden daha fazla sıklıkla küçük CpG bölgeleri içermektedir. İnsandaki tüm genlerin yaklaşık yarısı promoter bölgelerinde CpG adalarına sahiptir ve bunlar normal dokularda genin transkripsiyonel durumuna bağlı olarak genellikle metile değildir. Bir CpG adasındaki metilasyon, kromatin organizasyonundaki değişikliğe ve gen transkripsiyonunun baskılanmasına bağlı olarak değişir.

2.5.2. Gen ekspresyonunun DNA metilasyonu ile düzenlenmesi

Gen ekspresyonu memeli hücrelerinde yaygın olarak DNA metilasyonu yoluyla düzenlenir. Metilasyon genellikle CpG adaları aracılığı ile gerçekleşmektedir. DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu üzerine etkisini, direk transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını inhibe ederek veya kromatin remodelesyonunu baskılayarak gösterir (88). Yapılan çalışmalarda metilasyonun birçok hastalıkla (kanserler, otoinflamatuar hastalıklar) ilişkisi ortaya konmuştur (84; 89) Tümör supresör genlerin promoter bölgelerinde hipometile alanların hepatosellüler kanser ve meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur (90; 91). Ekson 2’de BCL-2 gendeki anormal metilasyonunun kolorektal kanser ile ilişkisi bulunmuştur (92).



Şekil 14: A. DNA metil transferazlar yardımıyla metillenme B. Metile olmayan DNA'da kromatin yapısı gevşektir böylelikle, histon asetilasyonu ve transkripsiyon komplekslerinin bağlanması kolaylaşır. C. Hipermetilasyon ise o bölgedeki kromatinin kondanase olmasına ve transkripsiyonda azalmaya neden olur (89).

Normal hücrelerde DNA metilasyonunun genellikle CpG adalarında (sitozin guanin tekrarlarından oluşan genomik bölgeler), özellikle satellit DNA'da ve düzenleyici segmentlerde olduğu gösterilmiştir (89). İntragenik metilasyonun transkripsiyona olan etkisi hakkında yapılan çalışmalarda promoter bölgedeki metilasyonun gen ekspresyonunu azalttığı şeklindedir. Ek olarak RNA polimeraz II promoter bölgede metile olan alanda azalmış olarak saptanmıştır. Promoter bölgedeki metilasyonun transkripsiyonun başlangıcına etki etmediği ancak transkripsiyonel uzamayı etkilediği öne sürülmüştür (14). Benzer şekilde hipometilasyon da genin ifade edilmesini yani ekspresyonunu artırır (84; 83).

3. MATERYAL METOD

3.1. Çalışma grupları

Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nefroloji Bilim Dalının izleminde olan, Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre Ailesel Akdeniz Ateşi tanısı konulan yaşları 2-17 yıl arasında olan hastalar dahil edildi. Kontrol grubu olarak Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniklerine, tarama amacıyla başvuran sağlıklı çocuklar kullanıldı. Çalışma Ocak-Haziran 2015 tarihleri arasında yürütüldü.

Hasta ve kontrol gruplarındaki çocuklar ve ailelerinden onam alındıktan sonra EDTA'lı tüpe 4mL, düz tüpe 2 mL kan örneği alındı.

Rutin hasta viziti için başvuran Ailesel Akdeniz Ateşi hastalarının demografik özellikleri, moleküler inceleme sonuçları, şikayetleri, fizik muayene bulguları, atak sayıları, tedaviye cevapları, hemogram, lökosit ve idrarda protein ölçümü sonuçları kaydedildi (FORM 1).

3.1.1. Hasta ve kontrol gruplarının belirlenmesi

Bu klinik çalışmada “Ocak- Haziran 2015” tarihleri arasında polikliniklerimize başvuran ve onam veren, hasta ve kontrol grubundan örnekler dahil edildi:

1. Hasta grubu (n=40): Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre AAA tanısı almış hastalar.

2. Kontrol grubu (n=32): Başka bir nedenle kan alınan sağlıklı çocuklar.

3.1.2. Örnek toplanması

Ailesel Akdeniz ateşli olgular kolşisin tedavisi altında ortalama 4-6 aylık aralar ile mutlaka görülmelidir. İzlem sırasında olguların her birinde oluşabilecek olan anemi, lökopeni, trombositopeni ve kas enzim düzeyleri ile idrar değişiklikleri kontrol edilmelidir. Çalışma için, dâhil edilen hasta ve ebeveynlerine sözlü ve yazılı bilgi verildikten ve onamları alındıktan sonra bu rutin tetkikler alınırken K₂-EDTA'lı tüpe 4 mL, düz tüpe 2 mL kan alındı. Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi örnek alındığı tarihlerde, atak dışı periyotta idi.

Kontrol grubu olarak hastanemiz polikliniklerinde muayene edilen ve herhangi bir tarama için (kan sayımı, tiroid testleri, kan şekeri, hepatit, hiperlipidemi vb.) kan alınması planlanan sağlıklı çocuklar alındı. Bu çocuklara ve ebeveynlerine sözlü ve yazılı bilgi verildikten ve onamları alındıktan sonra istenilen incelemelerine ek olarak K₂-EDTA'lı tüpe 4mL, düz tüpe 2 mL kan alındı.

3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar, gereçler ve kimyasal maddeler

Bu tez çalışmasının deneyleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında mutasyonlarının AAA'ne neden olduğu MEFV geninin, transkripsiyon ve translasyon ürünlerinin kantitatif ölçülmesi ve metilasyon durumunun incelenmesi amaçlanmıştır. MEFV geni mutasyonları saptanan hastalar geniş bir fenotipik yelpazede karşımıza çıkmakta ve farklı bulgu ve şiddette AAA tanısı almaktadırlar. Bundan yola çıkarak bu tez çalışmasında, AAA'li hastalarının kan örneklerinde laboratuvarımızda yapılan moleküler incelemeler sonucunda saptanmış olan MEFV geni mutasyonlarının ve metilasyon durumunun gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda MEFV geninin gen ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde ölçülmüş ve metilasyon durumu incelenmiştir.

Çalışmamız gen ekspresyonu, metilasyon analizi ve pyrin ölçümleri olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Deneyin gen ekspresyonu aşamasını; total RNA izolasyonu, total RNA konsantrasyonunun hesaplanması, total RNA'lerden cDNA sentezlenmesi, Real Time PCR (RT-PCR) analizi ve istatistiksel analiz ve metilasyon analiz aşamasını; DNA izolasyonu, DNA konsantrasyonunun hesaplanması, bisüfit modifikasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu, PCR saflaştırma, sekans polimeraz zincir reaksiyonu, sekans PCR saflaştırma, otomatik kapiller elektroforezi, metilasyon analizi ve istatistiksel analiz oluşturmaktadır. Pyrin proteini ölçümleri ise Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemiyle yapılmıştır.

Tablo 4: MEFV geni ekspresyon ve metilasyon paterninin belirlenmesi için kullanılan cihaz ve gereçler

Spektrofotometre	Pipet ucu
Santrifüj	0.2 ml PCR Tüpleri
Buzdolabı	1.5 ml ependorf tüp
Kuru ısı bloğu	2 ml ependorf tüp
Vorteks	96'lık PCR plakları
Kabin	Otomatik pipetler
ThermalCycler	
3130 DNA Dizi Analizi Cihazı	
Real Time PCR cihazı	

Tablo 5: MEFV geni ekspresyon ve metilasyon paterninin belirlenmesi için kullanılan malzemeler

DNA İzolasyon Kiti	PCR Purifikasyon Kiti
RNA izolasyon kiti	Sekans PCR Kiti
cDNA Sentez Kiti	Sekans Purifikasyon Kiti
LC 480 Probe Master Kit	Saf etanol
Bisülfite Modifikasyon Kiti	RNase-free water (1ml)
Taq™ DNA Polymerase	

3.3. Yöntemler

3.3.1. MEFV Geni Ekspresyonunun RNA Düzeyinde Belirlenmesi

Tablo 4 ve 5'deki malzemeler kullanılarak, MEFV geni ekspresyonunun RNA düzeyleri 3 aşamalı bir çalışma sonucunda belirlendi; total RNA izolasyonu, total RNA'lerden cDNA sentezlenmesi, Real Time PCR (RT-PCR) analizi ve sonuçların istatistiksel analizi.

3.3.1.1. Total RNA İzolasyonu

AAA tanısı almış hastalarımızın ve kontrol grubundaki sağlıklı çocukların periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu, “*Prime Perfect Pure RNA Blood Kit*” (katalog no 2302110) protokolü uygulanarak yapıldı.

A. Yöntemin uygulanması

a. Lizat hazırlanma aşaması:

mRNA izolasyonu için çalışmaya dahil edilen bireylerden EDTA’lı tüplere alınan kan örneklerinden tam kan sayımı bakılarak hastaların lökosit (WBC) sayıları belirlendi. Her hasta 3.000.000/lökosit sayısı x1000 formülüyle, 3 milyon hücreye eşitlendi. Hesaplanan miktarda kan 15 ml’lik falkon tüplere konuldu. Üzerine kan hacminin 3 katı kadar “*RBC Lysis Solution*” eklendi ve karıştırıldı. On dakika oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edildi. Tüpler 2000 “Relative Centrifugal Force” (RCF)’da 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atılarak, kurutma kağıdı üzerine ters çevirilerek kalan sıvının akması sağlandı. Üzerine 200 µl Lysis/TCEP karışımı eklendi ve homojenize olana kadar vortekslendi.

b. İzolasyon aşaması

Kullanım zamanına dek buzdolabında -20°C’de saklanan lizatlar çıkarılarak eritildikten sonra 10’ar kez pipetaj yapıldı ve “Purification Column” tüpüne aktarıldı. 13 000- 16 000 devir hızında= “Revolutions per Minute” (RPM)’de, 1 dakika santrifüj edildikten sonra, kolon 180° çevrilerek 13 000- 16 000 RPM’de tekrar 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet temiz bir tüpe aktarıldı. 400 µl yıkama solüsyonu (“*Wash 1 Solution*”) eklenerek, 13 000- 16 000 RPM’de 2 dakika santrifüj edildi. Ardından kolon 180° çevrilerek 13 000- 16 000 RPM’de işlem tekrarlandı. Kolon üzerine 50 µl DNase solüsyonu eklendi ve kolonlar 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmasının ardından bitiminde kolon üzerine 200 µl DNase yıkama solüsyonu eklendi ve 13 000- 16 000 RPM’de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında kolon üzerine 200 µl DNase yıkama solüsyonu eklenerek, 13 000- 16 000 RPM’de 2 dakika daha işlem tekrar edildi.

Elde edilen yeni pellet temiz bir tüpe aktarıldı. 200 µl yıkama solüsyonu “*Wash 2 solution*” eklenerek, 13 000- 16 000 RPM’de 1 dakika ve yine 200 µl yıkama solüsyonu

“Wash 2 solution” eklenerek 13 000- 16 000 RPM de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlemler sonucunda elde edilen pellet temiz bir tüpe aktarılarak, 50µl “elution solution spin” kolonun tam ortasına konuldu. 13 000- 16 000 RPM’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra saflaştırılmış kısım alındı. Elde edilen RNA’lar ölçüm yapıldıktan sonra buzdolabına, - 20°C’ye kaldırıldı.

c. Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Saflık değerinin sonraki aşamaya uygunluğunun denetlenmesi amacıyla RNA konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm’de “Nanodrop spektrofotometre cihazı” kullanılarak ölçüldü. RNA’nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir RNA örneğinden 1,5 µl, alınarak 260 ve 280 nm’de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçüldü. Ölçüm sonrasında “RNase free water” eklenerek son konsantrasyonu 0,125 µg/µl olacak şekilde ayarlandı. RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm’deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280 nm’deki absorpsiyon değeri kullanıldı. Saf RNA eldesi için OD260/OD280 değerinin 1,8-2,0 arasında olması sağlandı.

3.3.1.2. Total RNA’lardan cDNA Sentezlenmesi Aşaması

RNA’nın kolay degrade olma özelliğinden dolayı, hasta ve kontrol grubundaki çocukların periferik kanlarından izole edilen total RNA’lar, “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (ABI Kat No 4368814) kullanılarak, cDNA’ya çevrildi.

Yöntemin Uygulanması

Tablo 6’daki malzemeler sırayla PCR tüplerine eklenerek, denatürasyon, reverse transkriptaz inaktivasyonu aşamaları “thermal cycler”da uygun sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

Tablo 6: Total RNA’lardan cDNA sentezlenmesi aşamasında kullanılan malzemeler

10 X Reverse Transcription Buffer	2 µL
25 X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
10 X random primers	2 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µL	1 µL
RNAse Inhibitor	1 µL
Nuclease-free H ₂ O	3.2 µL
RNA (0,125 µg/µl)	10 µL



3.3.1.3. RT-PCR Analizi ve Sonuçların İstatistiksel Analizi Aşaması

Elde edilen cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak MEFV geninin ekspresyon profili, tablo 7 ve 8’ deki malzemeler kullanılarak, RT-PCR ile (25 °C de 10 dakika, 37 °C ’de 120 dakika, 85 °C ‘de 5 dakika, 4 °C de analiz edildi. RT-PCR *Real Time Ready Custom Assays* (Roche) hazır probe ve primer setleri ile LC 480 II sistemi kullanılarak yapıldı.(Ek 2- Real-Time PCR Yönteminin Prensibi)

A. Yöntemin Uygulanması

“Real Time PCR” çalışması amacı ile, gen ekspresyonları için izole edilen mRNA’lar “Universal probe Library” (UPL) hazır probe ve primer dizaynları ile LC 480 II cihazında çalışıldı. Bu ekspresyona uygun “ROCHE UPL House Keeping” gen seti belirlenerek (ACTB geni) her hasta için hedef gen olan MEFV ekspresyonu ve referans “housekeeping” gen olan ACTB gen ekspresyonu çalışıldı.

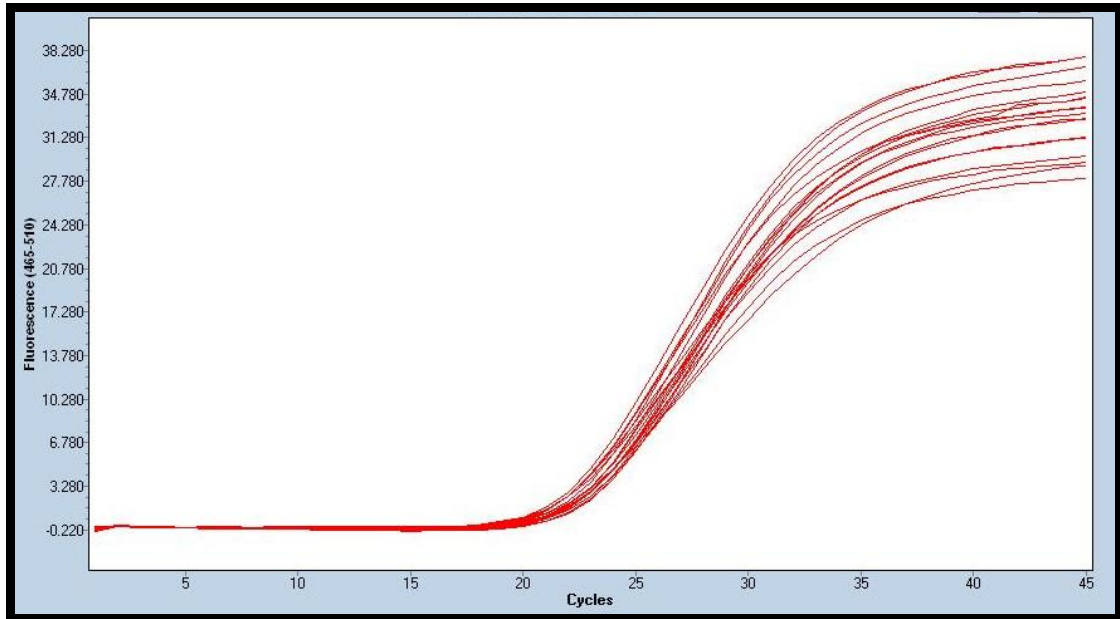
Tablo 7:RealTime PCR hedef gen (MEFV geni) protokolü malzemeleri

MIKS I	Hacim
LightCycler® 480 Probes Master	10 µl
Real Time Ready Assay - MEFV	1µl
ddH ₂ O	4µl
Toplam	15µl + 5µl cDNA

Tablo 8: RealTime PCR referans gen (ACTB geni) protokolü malzemeleri

MIKS II	Hacim
LightCycler® 480 Probes Master	10 µl
Real Time Ready Assay - ACTB	1µl
ddH2O	4µl
Toplam	15µl+ 5µl cDNA

Real Time PCR protokolünde; ekspresyon için başlangıç denaturasyonu 95°C’de 600 sn kantitasyon protokolü 45 döngü denaturasyon 95 °C’de 10 sn, annealing 60 °C’de 30 sn ve extension 72 °C’de 1 sn, “ramping rate” de 4.4 °C/s idi. Son olarak 40 °C’ de 30 sn soğutma uygulandı.



Şekil 15: Relative Expression Software Tool” (REST) istatiksel analiz programı örnek

Bu çalışılan gen ekspresyon bölgelerinin LC480 II Real Time PCR cihazında elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri alınarak “Relative Expression Software Tool” (**REST**) analiz programı kullanılarak ekspresyon sonuçları alındı (Şekil 15).

3.3.2. MEFV Geni Metilasyon Oranlarının Belirlenmesi

3.3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu 2 ml'lik EDTA'lı tüplere alınmış tam kan örneklerinden spin kolon yöntemi ile üretilmiş “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche) protokolü uygulanarak yapıldı.

A. Yöntemin uygulanması

Öncelikle “*high pure wash buffer*” içerisine 80 ml, inhibitör “*removal buffer*” içerisine 20 ml % 96-100'lük etanol eklendi, iyice karıştırılarak kapakları sıkıca kapatılmış şekilde saklandı. Proteinaz K'ya 4,5 ml distile su eklendi ve porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı. Buzdolabında -20 °C'de hasta toplanması aşaması tamamlanana kadar bekletilen örnekler çıkarılarak eritildi. “*Elution buffer*” örnek başına 200 µl olacak şekilde eppendorf tüpe konularak 70°C'de çalışma sonuna kadar bekletildi. Her bir hasta için 200 µl kan örneği eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerine 200 µl “*binding buffer*” ilave edildi. Üzerine 40 µl proteinaz K ilave edilerek vortekslendi ve 10 dk 70 °C'de inkübasyona bırakıldı. 100 µl izopropanol eklendi ve kısa bir süre vortekslenerek karıştırılıp spine aktarıldı, 8 000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı dolu tüpler atılarak filtreli tüpler yeni tüplere aktarıldı. 500 µl inhibitör “*removal buffer*” ilave edilerek 8000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı dolu tüpler atılarak filtreli tüpler yeni tüplere aktarıldı. Yıkama solüsyonundan 500 µl ilave edilerek 8000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı dolu tüpler atılarak filtreli tüpler yeni tüplere aktarıldı. 500 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 8000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı dolu tüpler atılarak filtreli tüpler yeni tüplere aktarıldı. Tamamen kurutulmak üzere bir şey eklemeyen tüpler 13 000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Bir buçuk ml'lik tüplere hasta ismi yazılarak filtreli tüplere aktarıldı. Her bir örneğe önceden 70°C'ye ısıtılan “*Elution Buffer*”dan pipetlendi ve 1-2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 8000 RPM'de 1 dk santrifüj edilerek filtreli tüpleri atıldı.

B. DNA konsantrasyonunun hesaplanması

Sonraki aşamaya uygunluğunun denetlenmesi amacıyla DNA konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm'de “*Nanodrop*” spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü. DNA'nın

miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir DNA örneğinden 1.5 µl, alınarak 260 ve 280 nm’de spektrofotometrik absorpsiyonları hesaplandı. Ölçüm sonrasında “*DNAse/ RNAase free water*” eklenerek son konsantrasyonu 0.5 µg/µl olacak şekilde ayarlandı. DNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm’deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280 nm’deki absorpsiyon değeri kullanıldı. Saf DNA eldesi için OD260/OD280 değerinin 1.8 - 2.0 arasında olması sağlandı.

3.3.2.2. Bisülfıt modifikasyonu

İzole edilen DNA örnekleri alınarak, “*EZ DNA Methylation-Gold™ Kit*” (Zymo Research) protokolü uygulanarak bisülfıt modifikasyonu yapıldı.

Bisülfıt yöntemi DNA metilasyon seviyesini ölçmek için, metile olmayan sitozinin bisülfıt uygulandığında urasile dönüşmesi, metile olan sitozinin ise urasile dönüşümünün gerçekleşmemesi esasına dayanır. Bizim çalışmamızın sonucunda da, metillenmiş ve metillenmemiş olarak iki farklı DNA dizisi oluştu.

Metilasyon oranlarının ölçümü için, MEFV geninin CpG adalarından en zengin bölgesi olan 2. ekzon tarandı.

A. Yöntemin uygulanması

Başlangıçtaki DNA miktarı bisülfıt testinin verimliliği açısından çok önemlidir. Bu amaçla; 1 µg DNA, 20 µl dH₂O içerisinde çözüldü ve her reaksiyon için kullanıldı. 130 µl “*CT Conversion Reagent*” 20 µl DNA örneği içine konularak karıştırıldı. Tüp termal döngü cihazı içine yerleştirilerek 98 °C 10 dakika ve 64 °C 2.5 saat inkübasyon için bekletildi (Bu aşamada örneklerin bir kısmı 4 °C’de 24 saat bekletilebilir). 600 µl “*Binding solüsyon*”, “*Zymo – Spin TM IC Column*” tüpüne eklendi ve örnek de “*Zymo – Spin TM IC Column*” tüpüne konularak birkaç kez karıştırılıp maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi. 100 µl yıkama solüsyonu “*column*” tüpüne eklenerek en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi. 200 µl M “*Desulphonation*” solüsyonu “*column*” tüpüne eklenerek 15-20 dakika oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrası column tüpü maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi. 200 µl M yıkama solüsyonu tüpe tekrar ilave edilerek 30 saniye santrifüj tekrarlandı.

“Column” tüpündeki materyal mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 10 µl M “*Elution*” solusyonu tüpe eklenerek 30 sn maksimum hızda santrifüj uygulandı. DNA -20 derecede kullanım için, -80 derecede uzun süreli kullanım için saklandı.

a. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bisülfite modifikasyonu yapılan DNA örneklerinden aşağıdaki metilasyon spesifik oligonükleotidler (Tablo 9) ile “*ZymoTaq™ DNA Polymerase*” (Zymo Research) protokolü ile PCR uygulandı. Bisülfite modifikasyonunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacı ile her bir örneğin bisülfite modifikasyonu yapılmamış DNA’sı ile MEFV ekzon 2 spesifik PCR primerleri ile PCR yapıldı. PCR reaksiyonu için marka “*Master Cycler PCR*” cihazı (Eppendorf) kullanıldı.

Tablo 9: PCR için hazırlanan karışım (örnek başına)

2X ReactionBuffer	25 µl
1X dNTPMix	0.5 µl (0.25 mM her bir dNTP’den)
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Template DNA	2 µl (100 ng/µl)
ZymoTaq™ DNA Polymerase (5 U/µl)	0.4 µl 2 U/50 µl
ddH2O	20.1 µl
Total volüm	50 µl

Tablo 10: Kullanılan PCR programı

Etki	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35 döngü
Bağlanma	55 °C	45 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final Uzama	72 °C	7 dakika	1 döngü

Tablo 11: MEFV geni ekzon 2 PCR primer dizileri

MEFV Ekzon 2 Forward Primer :	5' AGCTCCCTGGGGGAGAACAAGCCCA'3
MEFV Ekzon 2 Reverse Primer :	5' GTTCTGGATTTCAGGGCCTTCCTT3'
MEFV geni ekzon 2 metilasyon spesifik PCR primer dizileri	
MEFV Ekzon 2 Metilasyon Spesifik Prime F :	5' GTTTTTTGGGGGAGAATAAG '3
MEFV Ekzon 2 Metilasyon Spesifik Primer R	5' TTTCCAAAACCTTCCTTCAAAT '3

a. Agaroz Jel Elektroforezi

MEFV ekzon 2 metilasyon spesifik PCR primerleri ve metilasyon spesifik olmayan PCR primerleri ile yapılan PCR reaksiyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri % 2 lik agaroz jelde 120 W da 20 dakika yürütülerek PCR ürünleri kontrol edildi.

b. PCR Saflaştırma

PCR ürünleri *ExoSap-IT (Affymetrix)* enzim miksi protokolü uygulanarak pürifiye edildi. PCR saflaştırma işlemi için "Master Cycler PCR" cihazı (Eppendorf) kullanıldı (Tablo 12).

Tablo 12: Birinci sütunda kullanılan malzemeler, 2. Sütunda ise PCR sikluslarında uygulanan sıcaklık ve süreler not edilmiştir

ExoSap-IT	2 µl	37 °C	30 dakika
PCR ürünü	5 µl	80 °C	15 dakika

c. Sekans Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pürifiye edilen PCR ürünlerine “*Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems) protokolü uygulanarak forward PCR primeri kullanılarak sekans PCR reaksiyonu yapıldı. Sekans PCR reaksiyonu için “Master Cycler PCR” cihazı (Eppendorf) kullanıldı.

Tablo 13: Sekans PCR için kullanılan malzemeler

Ready ReactionPremix	2 µl
Big Dye Sequencing 5X Buffer	2 µl
Primer (3.2 pmol)	1 µl
Pürifiye PCR Ürünü	2 µl (50 ng/µl)
ddH2O	3 µl

d. Sekans PCR Saflaştırma

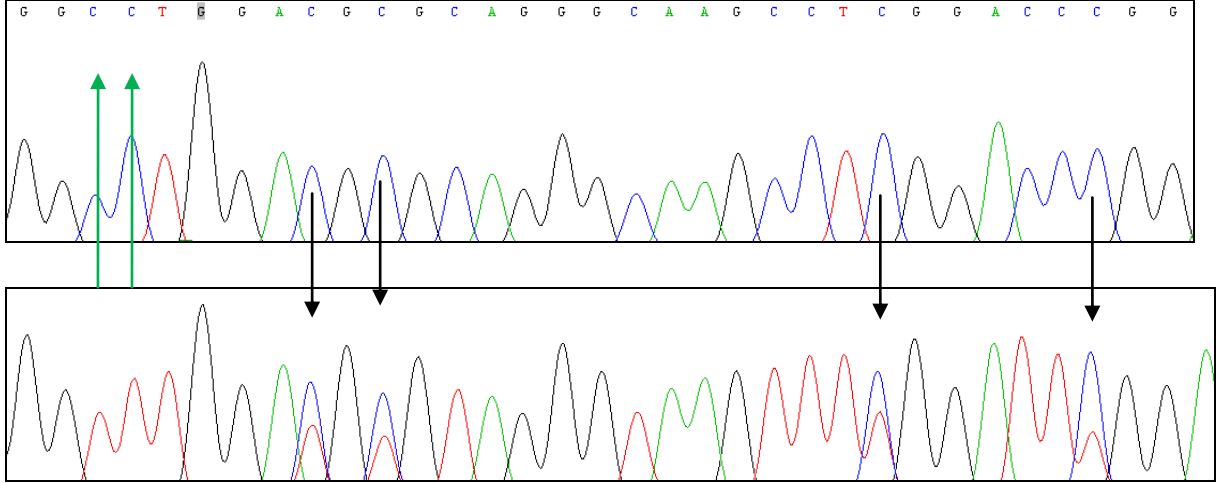
Sekans PCR reaksiyonu yapılan örnekler “*ZR DNA Sequencing Clean-up Kit*” (Zymo Research) protokolü uygulanarak pürifiye edildi.

e. Otomatik Kapiller Elektroforezi

Pürifiye edilen sekans PCR ürünlerine “*ABI 3130 Genetic Analyser*” DNA dizi analizi cihazında otomatik kapiller elektroforezi yapıldı. MEFV geni ekzon 2 bölgesi metilasyon spesifik ve metilasyon spesifik olmayan primerler kullanılarak elde edilen DNA dizileri ilk olarak bisülfıt modifikasyonunun tam olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek açısından

karşılaştırıldı. Çalışmada DNA dizi analizi yapılan tüm örneklerin bisülfite modifikasyonunun başarılı olduğu görüldü. Elde edilen DNA dizilerinde var olan 30 adet CpG metilasyon bölgelerinin C (sitozin) ve T (timin) baz yüksekliklerinin $C/(C+T)$ oran formülasyonu ile yüzde olarak metilasyon oranları hesaplandı.

Şekil 16: Bisülfite modifikasyonu yapılmamış örnek DNA'sı ekzon 2 bölge sekansı



Şekil 17: Bisülfite modifikasyonu yapılmış örnek DNA'sı ekzon 2 bölge sekansı

↓ Ok ile belirtilen CpG adacıklarında metillenmiş Sitozin bazlarının Timin bazına tam olarak dönmedikleri görülmektedir. ↑ Ok ile belirtilen bazlarda metillenmemiş Sitozin bazlarının bisülfite modifikasyonu sonucu Timin bazına döndüğü görülmektedir.

3.3.3. ELISA yöntemiyle Pürin ölçümleri

Hasta ve kontrol grubunun venöz kanları ortalama 10 saatlik açlık sonrası 8mL'lik vakumlu ve jel seperatörlü tüplere alındı (*Vacurette, Greiner Bio-One, Avusturya*). Kan örnekleri 30 dakika kadar pıhtılaşması için beklendikten sonra dakikada 3000 devir olmak üzere 10 dakika süreyle oda sıcaklığında santrifüj edildi. Elde edilen serumlar porsiyonize edilerek pürin düzeyleri çalışılana kadar -20 derecede saklandı. Serum pürin düzeyleri için sandviç ELISA yöntemi ile çalışan ticari bir kit (*Sunred, Republic of China*) kullanıldı. Çalışmalar kit prospektüslerindeki talimatlara göre yapıldı. Spektrofotometrik ölçüm 450 nm dalga boyunda "Thermo Scientific Multiskan GO" model ELISA okuyucusunda

gerçekleştirildi. Dilue edilmiş standart absorbanları kullanılarak çizilen standart eğriden yararlanılarak örneklerin pyrin konsantrasyonları belirlendi. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Verilerin Değerlendirilmesi

İncelenen varyasyonlar, SPSS 15 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) istatistik programında yapıldı. Verilen ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verildi. Grup oranlarının karşılaştırılmasında ki-kare testi, gözlerde beklenen değerler 5'in altında ise Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. İki grup ortalamasının karşılaştırılmasında Student-t testi, gruplardaki değişkenler 30'un altında ise Mann-Whitney U-testi kullanıldı. $p < 0.05$ bulunması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinde Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre Ailesel Akdeniz Ateşi tanısı konulan ve yaşları 2-17 yıl arasında olan 40 çocuk alındı. Kan örneklerinin alındığı dönemde hiçbir hastanın Ailesel Akdeniz Ateşi klinik semptomları yoktu. Ayrıca kontrol grubu olarak da hasta grubu ile yaş ve cinsiyet açısından benzer özelliklere sahip sağlıklı 32 çocuk alındı. Kontrol grubu olarak seçilen çocuklar Tel-Hashomer kriterlerine göre sorgulandı ve hiç birinin bu bulguların olmadığı öğrenildi.

Hasta grubun 24'ü kız (% 60), 16'sı erkek (% 40) erkek cinsiyetteydi. Kontrol grubunda bu oran 15 kız (% 46.9), 17 erkek (% 53.1) şeklindeydi.

Hastalardan 14'ünün (% 35) ailesinde AAA öyküsü mevcuttu. Aile öyküsünde AAA öyküsü en fazla kardeş ve annede vardı. Beş hastanın (%12.5) anne baba arasında akraba evliliği mevcuttu.

Hastalarımızın yaş ortalaması 10.2 ± 3.6 yıl (3-17); kontrol grubunun yaş ortalaması 12 ± 3.8 yıl (3-17) idi.

Hasta öyküleri ayrıntılı olarak sorgulandığında; şikayetlerin başlama yaşı ortalama 6.6 ± 3.1 yıl (2-14), tanı alma yaşı ortalama 7.3 ± 3.2 yıl (2-15) idi (Tablo 14). Atak sayıları ortalama yılda 9.2 ± 5.8 olarak saptandı.

Tablo 14: Hastaların yaş dağılım özellikleri

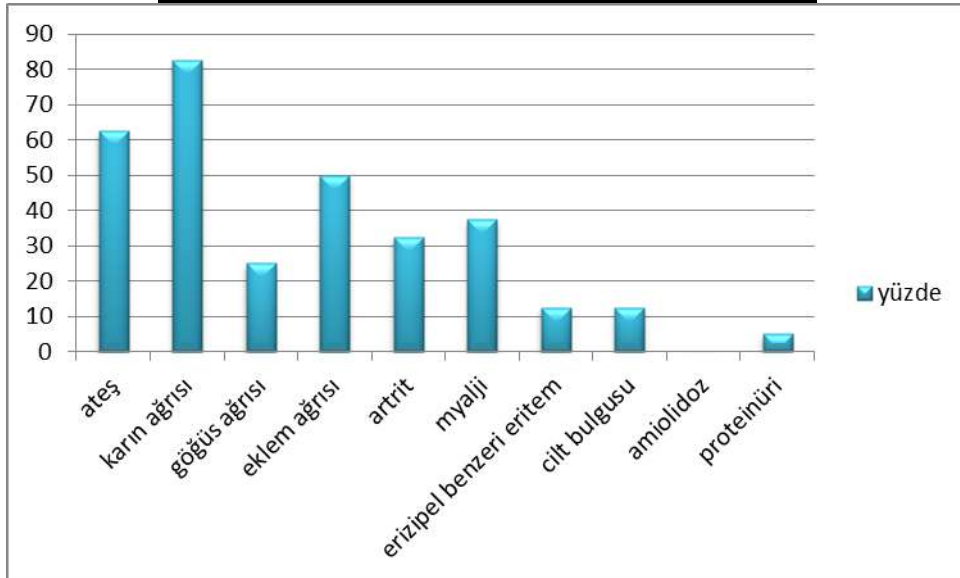
ÖZELLİKLER	Yaş ortalaması(yıl)	Yaş aralığı(yıl)
Çalışma anındaki yaş	10.2 ± 3.6	3-17
Bulguların başlangıç yaşı	6.6 ± 3.1	2-14
Tanı alma yaşı	7.3 ± 3.2	2-15

Çalışmaya katılan hastalarda en sık görülen semptom karın ağrısı (%82.5) ikinci sıklıkta ateş yüksekliği % 62.5 olarak saptandı. Hastaların %50'sinde eklem ağrısı, %37.5'inde myalji, %32.5'inde artrit, %25 inde göğüs ağrısı, % 12.5 inde erizipel benzeri

eritem yakınması mevcuttu. Hastalarımızın hiçbirinde amiloidoz saptanmadı. Klinik olarak hastalarımız değerlendirildiğinde sonuçlar tablo 15'deki gibiydi.

Tablo 15: Ailesel Akdeniz Ateşi olan hastalarımızın klinik özellikleri

ÖZELLİKLER	N	%
Ateş	25	62.5
Karın ağrısı	33	82.5
Göğüs ağrısı	10	25
Eklemler ağrısı	20	50
Artrit	13	32.5
Myalji	15	37.5
Erizipel benzeri eritem	5	12.5
Cilt bulgusu	5	12.5
Amiloidoz	0	0
Proteinüri	2	5



Çalışmaya alınma kriteri Tel-Hashomer kriterlerini sağlamak olduğu için kontrol grubundaki çocuklara FMF mutasyon analizi uygulanmadı.

AAA hastalarımızın mutasyon analizi sonuçları değerlendirildiğinde oldukça heterojen bir dağılım gösterdikleri görüldü (Tablo 16). Hastalar allel frekansına göre değerlendirildiğinde tablo 17- 18'deki sonuçlar elde edildi.

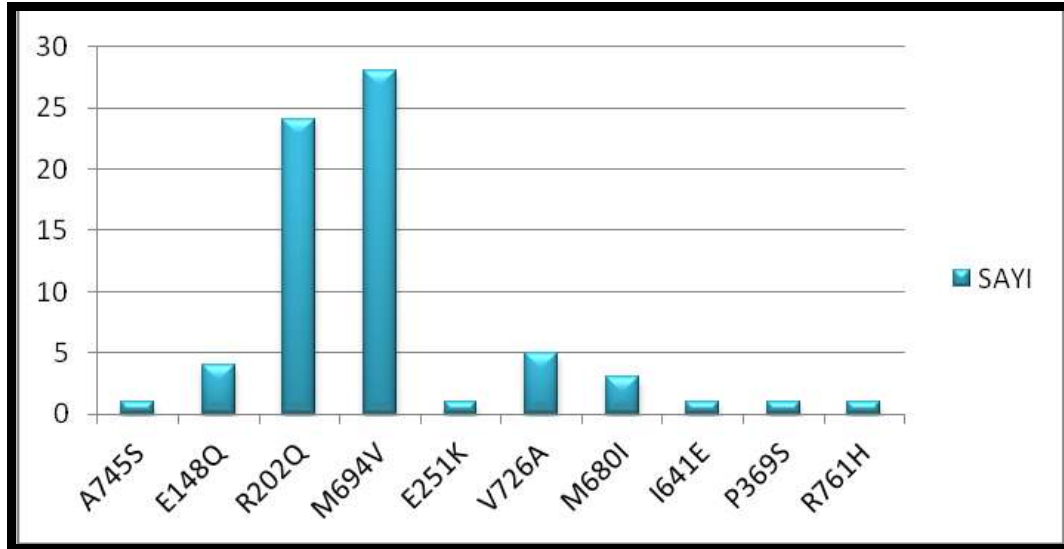
Tablo 16: Ailesel Akdeniz Ateşi hastalarının mutasyon analiz sonuçları

MUTASYON	HASTA SAYISI	GÖRÜLME SIKLIĞI (%)
A745S heterozigot	1	2.5
E148Q heterozigot	2	5
E148Q, R202Q, M694V heterozigot	1	2.5
E251K, V726A heterozigot	1	2.5
M680I heterozigot	1	2.5
M680I, I641E heterozigot	1	2.5
M694V heterozigot	4	10
M694V homozigot	4	10
M694V, M680I heterozigot	1	2.5
R202Q heterozigot	8	20
R202Q, E148Q, P369S heterozigot	1	2.5
R202Q, M680I, M694V heterozigot	1	2.5
R202Q, M694V heterozigot	8	20
R202Q, M694V homozigot	2	5
R202Q, M694V, V726A heterozigot	1	2.5
R761H heterozigot	1	2.5
V726A heterozigot	1	2.5
V726A homozigot	1	2.5
Toplam	40	100

Tablo 17: AA hastalarımızın allel frekansları

MUTASYON	ALLEL SAYISI	ALLEL SIKLIĞI (%)
A745S	1	1.44
E148Q	4	5.79
R202Q	24	34.78
M694V	28	40.57
E251K	1	1.44
V726A	5	7.24
M680I	3	4.34
I641E	1	1.44
P369S	1	1.44
R761H	1	1.44
TOPLAM	69	100

Tablo 18: Allel frekanslarının grafik görünümü



Genotip Fenotip İlişkisi

Örnek sayısının yetersiz ve mutasyon dağılımının da çok geniş olması nedeniyle her bir mutasyon tek başına değerlendirilemedi ve farklı mutasyonların kliniğe etkisini karşılaştırmak amacıyla hastalar, mutasyon analizi sonuçlarına göre öncelikle 2 gruba ayrıldı:

Grup A1: MEFV geninde 2 ya da daha çok mutasyon taşıyan hastalar (MEFV geninde hastalığa neden olduğu bilinen 2 ya da daha fazla allelik değişiklik taşıyan hastalar)

Grup A2: MEFV geninde sadece 1 mutasyon taşıyan hastalar (MEFV geninde hastalığa neden olduğu bilinen tek bir allelik değişiklik taşıyan hastalar)

Birinci grupta 22 hasta (% 55), 2. grupta 18 hasta (%45) mevcuttu. Bu iki grubu hastalık şiddeti açısından karşılaştırılmak amacıyla tablo 3'deki kriterlerden yararlanıldı. Buna göre:

Hastalık başlangıç yaşı 1. grupta 6.31 ± 2.5 yıl, 2. grupta ise 7 ± 3.4 yıl olarak saptandı. Birinci gruptaki hastalarda semptomların daha erken başladığı görülmesine rağmen 2 grup arasında istatistiksel olarak ($p = 0.513$) anlamlı bir fark bulunamadı.

Birinci grup ve 2. gruptaki hastalar ateş yüksekliği ($p = 0.25$), karın ağrısı ($p = 0.07$), göğüs ağrısı ($p = 0.27$), eklem ağrısı ($p = 1.00$) ve erizipel benzeri eritem ($p = 0.03$) semptomlarının sıklığı açısından karşılaştırıldığında; yalnızca erizipel benzeri eritem sıklığının grup 1'deki hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandığı ($p = 0.03$), diğer semptomlar açısından aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Birinci ve 2. grup arasında yıllık atak sayıları arasında da anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.10$).

Birinci ve 2. grubun tedaviye yanıtları karşılaştırıldığında, grup A2'deki hastaların tedavi yanıtının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kötü olduğu saptandı ($p = 0.021$).

Grup A1'deki hastalar homozigot M694V taşıyanlar (5 hasta) ve taşımayanlar (17 hasta) olarak sınıflandırılarak karşılaştırıldığında aralarında; ateş yüksekliği ($p = 0.46$), karın ağrısı ($p = 0.47$), göğüs ağrısı ($p = 0.24$), eklem tutulumu ($p = 0.13$), erizipel benzeri eritem ($p = 0.17$) varlığı açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bu 2 grup arasında atak sayısı ($p = 0.44$) ve tedaviye yanıt açısından da anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak sonuçlar

değerlendirilirken, hasta sayısının yetersiz ve dağılımının düzensiz olması gibi faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Hastalar MEFV geninin en az bir allelinde M694V mutasyonu bulunanlar (**Grup B1= 22 hasta**) ve diğerleri yani hiçbir allelinde M694V mutasyonu taşımayanlar (**Grup B2= 18 hasta**) olarak gruplandırıldı.

Hastalık bulgularının başlangıç yaşları arasında 1. grup (6.45 ± 3.0 yıl) ile 2. Grup (6.83 ± 3.4 yıl) arasında anlamlı bir fark yoktu ($p= 0.71$).

Birinci grup ve 2. gruptaki hastalar ateş yüksekliği ($p= 0.25$), karın ağrısı ($p= 0.07$), göğüs ağrısı ($p= 0.27$), eklem ağrısı ($p= 1.00$) ve erizipel benzeri eritem ($p= 0.47$) semptomlarının sıklığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. M694V mutasyonu taşıyan grupta tedaviye yanıt diğer gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tam yanıt olarak saptandı ($p= 0.02$). Grup B1 ile B2 birbiri arasında karşılaştırıldığında yıllık atak sayısı ortalaması, M694V içermeyen hastalarda daha fazla olmakla birlikte aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p= 0.79$).

Hastalarımızı; MEFV geninin en az 1 allelinde, R202Q varyasyonu olmaksızın M694V varyasyonu bulunan hastalar (**grup C1= 9**) ve yine en az 1 allelinde M694V varyasyonu ile beraberinde en az 1 allelinde R202Q varyasyonu bulunan hastalar (**grup C2= 13**) olarak sınıflandığında; hastalık bulgularının başlangıç yaşı olarak her 2 grup arasında anlamlı bir fark yoktu ($p= 0.71$).

Birinci grup ve 2. gruptaki hastalar ateş yüksekliği ($p= 0.93$), karın ağrısı ($p= 0.16$), göğüs ağrısı ($p= 0.48$), eklem ağrısı ($p= 0.67$) ve erizipel benzeri eritem ($p= 0.13$) semptomlarının sıklığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Her 2 gruptaki hastaların % 100'ünde tedaviye tam yanıt olduğu görüldü.

Grup C1 ile C2 birbiri arasında karşılaştırıldığında yıllık atak sayısı ortalaması, Grup C2'de daha fazla olmakla birlikte aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p= 0.18$).

Hastalar MEFV geninin en az bir allelinde R202Q mutasyonu bulunanlar (**Grup D1= 22 hasta**) ve diğerleri yani hiçbir allelinde R202Q mutasyonu taşımayanlar (**Grup D2= 18 hasta**) olarak gruplandırıldı.

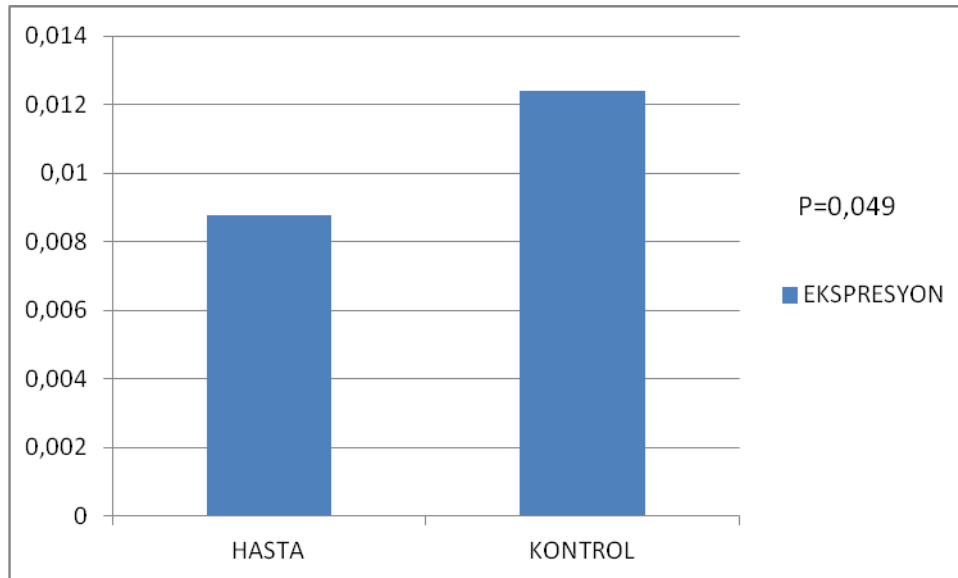
Hastalık bulgularının başlangıç yaşları arasında fark yoktu. Ateş yüksekliği ($p= 0.41$), karın ağrısı ($p= 0.07$), göğüs ağrısı ($p= 0.34$), eklem ağrısı ($p= 0.53$) ve erizipel benzeri eritem ($p= 0.06$) semptomlarının sıklığı açısından karşılaştırıldıklarında, tüm bu semptomların görülme sıklığı grup D1'deki hastalarda daha fazla olmasına rağmen 2 gruptaki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. R202Q mutasyonu taşıyan grupta tedaviye tam yanıt oranı diğer gruba göre daha yüksek saptandı ($p= 0,06$). Grup D1 ile D2 birbiri arasında karşılaştırıldığında yıllık atak sayısı ortalaması, hiçbir allelinde R202Q içermeyen hastalarda daha az idi ($p= 0.14$).

MEFV Geni Ekspresyon Paternlerinin Karşılaştırılması

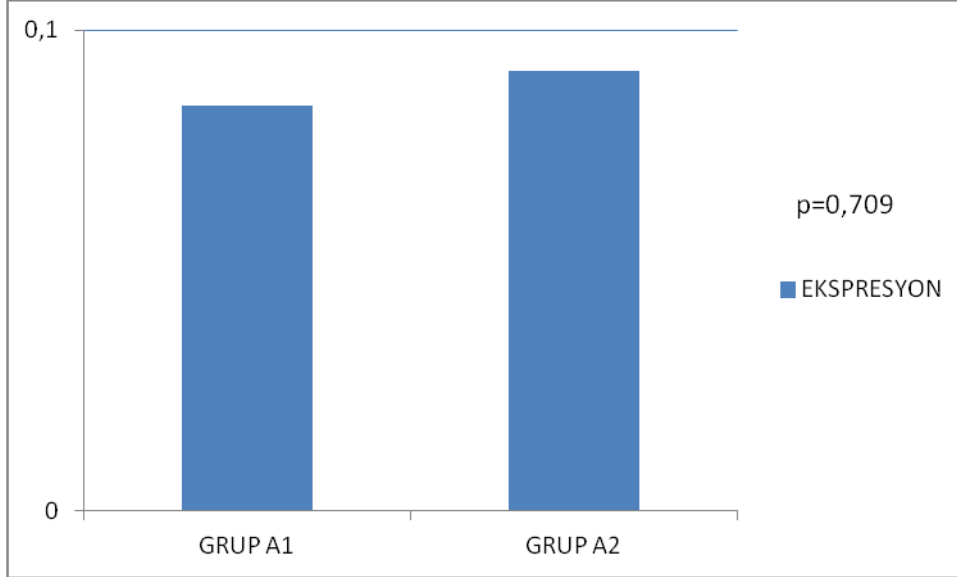
Hasta grubundaki 40 hasta ile kontrol grubundaki 32 sağlıklı çocuğun MEFV gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda mRNA ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0.049$) oranda azaldığı gösterildi (Tablo 19).

Grup A1 ve grup A2'deki hastalar, mRNA ekspresyon oranlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0.070$)(Tablo 20).

Tablo 19: Hasta ve kontrol grubu mRNA ekspresyon oranları



Tablo 20: Grup A1 ve grup A2'nin mRNA ekspresyon oranları



Grup B1 ve grup B2'deki hastalar, mRNA ekspresyon oranlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0,73$).

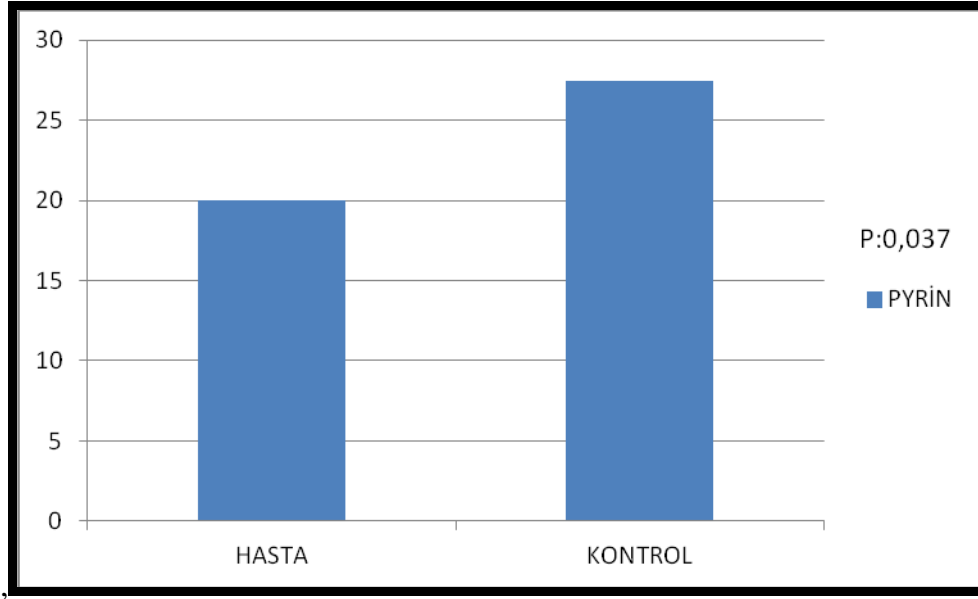
Grup C1 ve grup C2'deki hastalar, mRNA ekspresyon oranlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0,51$).

Grup D1 ve grup D2'deki hastalar, mRNA ekspresyon oranlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0,67$).

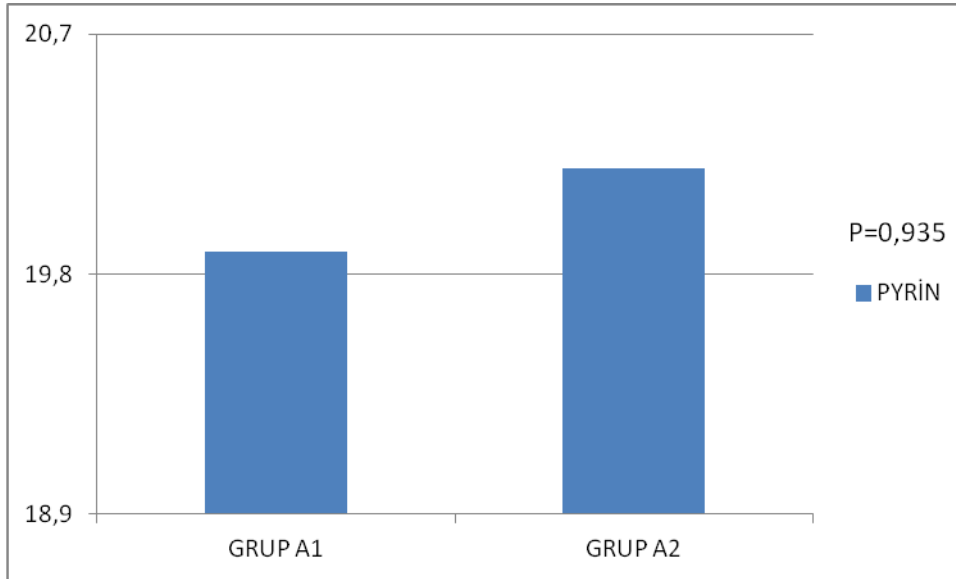
Pyrin ölçümlerinin karşılaştırılması

Hasta grubundaki 40 hasta ile kontrol grubundaki 32 sağlıklı çocuğun pyrin seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda pyrin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0.037$) oranda azaldığı gösterildi (Tablo 21). Grup A1 ve A2 pyrin seviyeleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p= 0.93$) (Tablo 22).

Tablo 21: Hasta ve kontrol grubunun pyrin düzeyleri



Tablo 22: Grup A1 ve A2'nin pyrin düzeyleri



Grup C1'deki 9 hastanın pyrin değerlerinin ortalaması 12.50 ng/dl iken grup C2'deki 13 hastada bu değer 10.81 ng/dl olarak saptandı ($p=0,51$).

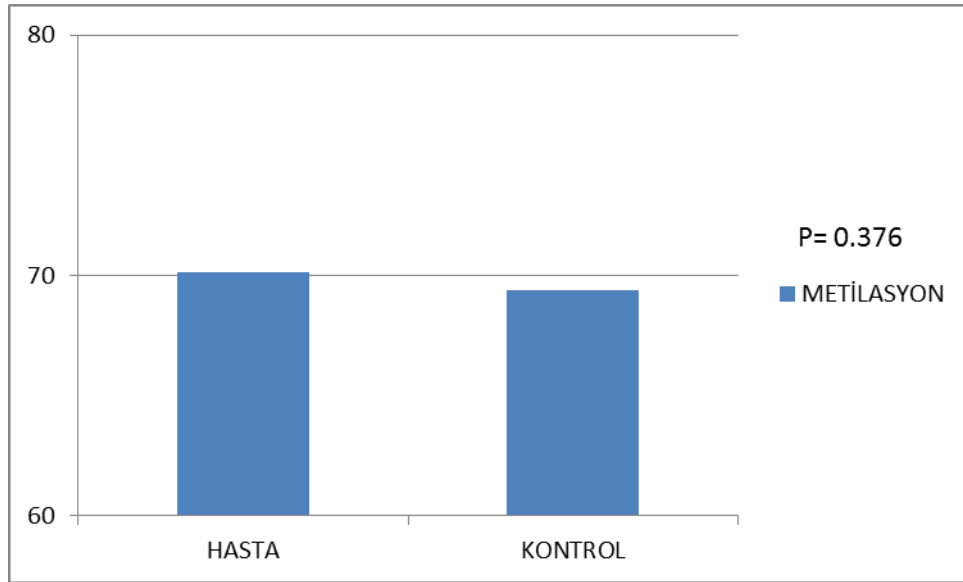
Grup D1'deki 22 hastanın pyrin değerlerinin ortalaması 18.43 ng/dl iken grup D2'deki 18 hastada bu değer 23.03 ng/dl idi ($p=0,55$).

MEFV Geni Metilasyon Paternlerinin Karşılaştırılması

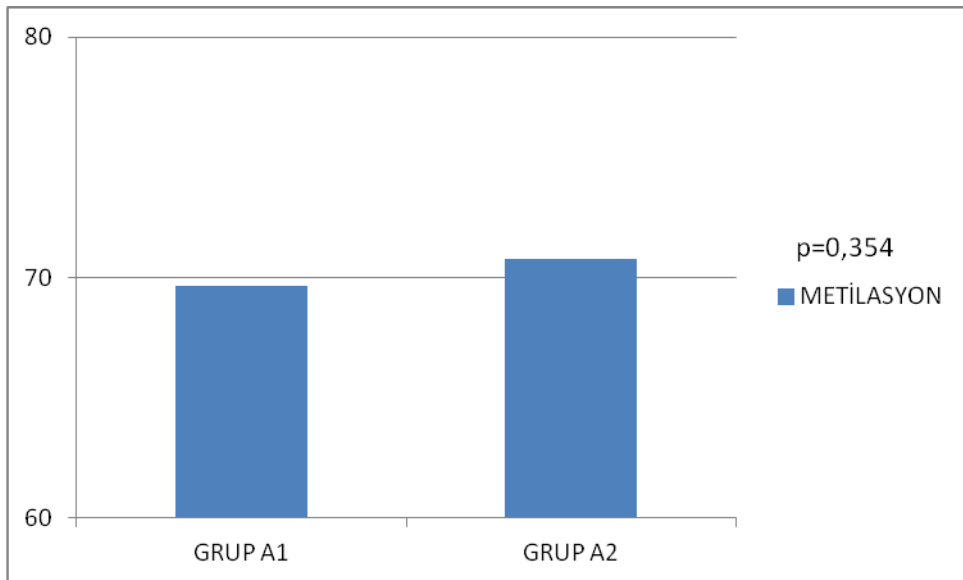
Hasta grubundaki 40 hasta ile kontrol grubundaki 32 sağlıklı çocuğun metilasyon oranları karşılaştırıldığında hasta grubunda metilasyonun bir miktar daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0.376$) (Tablo 23).

Hasta grubu mutasyon sonuçlarına göre grup A1 ve grup A2 olarak 2 gruba ayrılmıştı. Bu iki grup metilasyon oranları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.354$) (Tablo 24).

Tablo 23: Hasta ve kontrol grubu metilasyon oranları



Tablo 24: Grup A1 ve A2 metilasyon oranları



Metilasyon oranları açısında karşılaştırıldığında Grup C1'deki hastalarda bu oran % 9.67, grup C2'deki hastalarda % 12.77 iken aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p= 0.29$).

Grup D1'deki hastalarda metilasyon oranlarının ortalaması (%23.50), D2'deki hastaların metilasyon oranlarının ortalaması (16.83)'ndan yüksek idi ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (0.07).

5. TARTIŞMA

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) ataklar halinde gelen ateş ve ona eşlik eden seröz zarların inflamasyonu, “peritonit“, “artrit“, “plörit” ve “erizipel benzeri eritem” ile karakterize otozomal resesif geçişli hereditör bir hastalıktır.

AAA hastalarının %18-41’inde ailesinde AAA’li hasta öyküsünün pozitif bulunduğu (birinci sıklıkla kardeş 2.sıklıkta anne) rapor edilmiştir (68). Bizim hasta grubumuzda bu oran %35 olarak bulundu. Ayrıca hastalarımızın %12.5’unun anne ve babaları arasında akrabalık olduğu belirlendi.

Türk AAA Çalışma Grubu’nun 35 merkezde 2838 vakalık çok merkezli çalışmasında, Türk popülasyonunda AAA hastalığında semptomların başlangıç yaşının ortalama 9.6 yıl, tanı alma yaşının ise 16.4 yıl olduğu tespit edilmiştir (1). Bizim çalışmamızda hastalık bulgularının ortaya çıkma yaşı ortalama 6.6 yıl, tanı alma yaşı ise 7.3 yıl olarak saptandı.

Ateş AAA atağı sırasında genellikle yüksek olup 12-72 saat sürer. Hafif geçen ataklarda ve kolşisin kullanan hastalarda ateş daha düşük olup fark edilmeyebilir. Bizim çalışmamızda tekrarlayan ateş yüksekliği, 40 hastanın 25’inde (% 62.5) saptandı. Türk AAA Çalışma Grubunun 2005 yılında yaptığı araştırmada, AAA hastalarında tekrarlayan ateş yüksekliği yakınması % 92.5 olarak bildirilmiştir (1).

Karın ağrısı AAA’da en sık görülen semptomlardan biridir. Klinik tablo ve laboratuvar bulguları akut peritonit ile uyumludur. Çalışmamızda karın ağrısı sıklığı, 40 hastanın 33’ünde (% 82.5) saptanmıştır. Türk Çalışma Grubunun verilerine göre AAA hastalarında karın ağrısı sıklığı %93.7 olarak saptanmıştır (1). Eldad ve arkadaşlarının 1558 hastayı dahil ederek yaptığı bir çalışmada karın ağrısı sıklığı % 95 oranında bildirilmiştir (7).

Eklem ağrısı ve artrit, AAA’nın yaygın bir özelliğidir. Artrit klasik olarak monoartikülerdir ve en sık olarak diz, dirsek veya kalça tutulur. Bizim çalışmamızda eklem ağrısı yakınması 40 hastanın 20’ sinde %50 oranında saptanmıştır. AAA olan Kuzey Afrika Yahudileri’nde eklem ağrısı yaklaşık % 75 oranında bildirilmekle birlikte diğer AAA popülasyonlarında eklem ağrısı görülme oranı % 50’den daha olarak bildirilmiştir (93). Ben-Chetrit ve ark. bu oranı % 27-70 olarak rapor etmişlerdir (94).

Unilateral veya bilateral göğüs ağrısı genellikle plörit nedeni ile oluşur ve hastaların % 25-50’sinde görülür. Semptomlar 24-72 saat sürer ve sıklıkla tek taraflıdır. Perikardit ise

AAA'in nadir bir özelliği olup tamponatla komplike olmadıkça tanısı zordur (95; 96). Bizim çalışma grubumuzdaki 40 hastanın 10'unda (% 25) göğüs ağrısı yakınması saptandı.

Cilt ile ilgili bulguların sıklığı çeşitli yayınlarda % 12 ile % 43 arasında bildirilmiştir (97). Bu cilt bulguları arasında en sık görülen erizipel benzeri eritemdir. Çalışmamızda erizipel benzeri eritem 40 hastanın 5'inde (% 12.5) mevcut idi.

En çok görülen 5 mutasyon; M694V, M680I, M694I, E148Q ve V726A olup bunların çoğu 10. ekzon üzerinde kümelenmiştir. Çalışmalarda Türkler'de ve Akdeniz Bölgesi'nde yaşayan Yahudiler arasında M694V mutasyonunun çok yaygın görüldüğü gösterilmiştir (1; 7). Türk çalışma grubu tarafından yapılan bir çalışmada 1090 hastanın genetik analizinde Türk hastalarda M694V'den sonra sık olarak M680I ve V726A mutasyonlarının bulunduğu gösterilmiştir (1). Bizim çalışmamızda en sık saptanan mutasyonlar M694V ve R202Q olarak tespit edildi.

Biz çalışmamızda AAA'li hastalarda ve kontrol grubundaki çocuklarda MEFV geninin ekspresyonunu, metilasyon paternini ve pyrin düzeylerini araştırmayı planladık. Bizim çalışmamızda AAA'li 40 hastalık grup ile 32 sağlıklı çocuktan oluşan kontrol grubu metilasyon oranları karşılaştırıldığında metilasyon oranının bir miktar arttığı ancak istatistiksel olarak ($p= 0.376$) anlamlı fark saptanamadığı görüldü. Metilasyon oranlarının gerek hasta ve kontrol grubunda, gerekse çeşitli hasta grupları arasında belirgin bir farklılık göstermemesi, metilasyonun bu hastalığın oluşumunda ya da klinik farklılıkların belirlenmesinde bir etkisi olmadığını düşündürmektedir. Daha önce Kireçtepe ve ark. yaptığı çalışmada 30 FMF hastası ile 21 kontrol grubu karşılaştırıldığında metilasyon düzeyinin FMF hastalarında bir miktar arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir (98).

Hasta grubundaki 40 hasta ile kontrol grubundaki 32 sağlıklı çocuğun MEFV gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,049$) oranda azaldığı gösterildi. Notarnicola ve ark yaptığı çalışmada da MEFV RNA ekspresyonunun sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AAA hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (15). Notarnicola ve ark. yaptığı çalışmada AAA ile ilişkili semptomları olan özellikle mutasyon saptanmış olan hastalarla sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında MEFV RNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu saptanmışlardır (15). M694V mutasyonuna sahip AAA hastalarında

kliniğin daha ağır, E148Q, R202Q mutasyonuna sahip hastalarda kliniğin daha hafif seyrettiği gösterilmiştir (99; 100).

Bizim çalışmamızda M694V mutasyonu homozigot saptanan hastalar (grup B1) ile, her iki allelinde MEFV geni üzerinde M694V dışında 2 ya da daha fazla mutasyon saptanan hastalar (grup B2), MEFV RNA ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Grup B2'deki hastaların MEFV RNA ekspresyon düzeylerinin bir miktar daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p=0,070$). Literatürde yapılan çalışmalarda FMF mutasyon tipiyle MEFV RNA ekspresyon düzeyi arasında ilişki bulunmuştur. Daha ağır klinikle seyreden M694V mutasyonu olanlarla (özellikle homozigot mutasyona sahip olan hastalarda) MEFV RNA ekspresyon düzeyi daha düşük bildirilmiştir. Hasta daha hafif kliniğe sahip E148Q mutasyonuna sahipse hastanın MEFV RNA ekspresyon düzeyi daha yüksek saptanmış. Ancak herhangi bir FMF mutasyonuna sahip olan hastalar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MEFV RNA ekspresyon düzeyi düşük saptanmıştır (15).

Bizim çalışmamızda M694V homozigot mutasyona sahip hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı. Bu bulgular hastaların MEFV geninde mutasyonu olmadan, MEFV geni üzerinde metilasyonun azalmasıyla FMF fenotipinin ortaya çıkabileceğini desteklemektedir. MEFV geni regülatuar bölgesindeki veya diğer genlerin üzerindeki genetik varyasyonlar MEFV geni ekspresyonunu etkileyerek benzer FMF fenotiplerini oluşturabileceği ileri sürülmektedir.

Yalnızca bir allelinde M694V mutasyonu ya da M694V homozigot saptanan hastalarda MEFV geni ekspresyon derecesiyle hastalığın ağırlığı arasında anlamlı ilişki olduğu rapor edilmiştir (101). M69V mutasyonu ile birlikte, kliniği daha hafif seyreden V726A, E148Q, R202Q gibi mutasyonu olan hastalarda bu ilişki saptanamamış. Bu diğer mutasyonların koruyucu etkisinden olabileceği olarak yorumlanmıştır (19).

Hastaların kolşisin tedavisi kullanması ya da kullanmaması arasında MEFV RNA ekspresyon düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır. Bizim hastalarımızın tümü ilaç kullanıyor olmaları nedeniyle bu karşılaştırma yapılamadı.

AAA'nin etiyolojisinde rol oynayan birçok hipotez öne sürülmüştür. Patogenezinde pyrin proteininin en önemli rolü oynadığı bilinmektedir. Esas olarak nötrofil ve kemik iliğinin myelositer prekürsör hücrelerinde "Pyrin ya da Marenostin" denilen 781 aminoasitlik bu protein, MEFV geni tarafından kodlanmaktadır (3; 8). Bu proteinin çekirdeğe ait bir faktör olduğu ve olası fonksiyonunun da inflamasyonda rol alan proteinlerin transkripsiyonunun düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir (42; 43). Bu proteinin proinflamatuvar moleküllerin

inhibisyonunu ve antiinflamatuvar proteinlerin transkripsiyonunu artırarak inflamatuvar yanıtı inhibe ettiği düşünülmektedir. MEFV geninin mutasyonu sonucu oluşan anormal pyrin proteini, inflamasyonun etkin olarak baskılanmasını engellemektedir. Böylece artmış ve kontrolsüz inflamasyon ile seyreden durum gelişmektedir.

Hasta grubundaki 40 hasta ile kontrol grubundaki 32 sağlıklı çocuğun pyrin seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda pyrin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,037$) oranda azaldığı gösterildi. Literatür verilerine baktığımızda pyrin proteini seviyesi hasta grubunda genellikle daha düşük saptanmasına rağmen, kontrol grubunda daha düşük olarak saptandığı da rapor edilmiştir. Boty ve ark. yapmış olduğu çalışmada; AAA'li hastalarda grubunda pyrin seviyesini daha yüksek saptamışlardır. Yine aynı çalışmada hastanın tek ya da 2 mutasyona sahip olması ile pyrin seviyeleri arasında fark saptanmamış. Hasta grubuyla; sağlıklı kontrol grubu ve AAA dışı inflamasyonu olan hastalar karşılaştırıldığında hasta grubunun pyrin seviyeleri daha yüksek olduğu görülmüştür (16).

6. SONUÇLAR

Tel-Hashomer kriterlerine göre tanı alan AAA hastalarımız ile kontrol grubundaki sağlıklı çocukların değerlendirilmesi sonucunda;

1. Hastalarımızın hepsinde MEFV geninin en az 1 allelinde mutasyon saptandı.
2. Allel frekansları değerlendirildiğinde MEFV geninde en sık görülen mutasyonlar; M694V ve R202Q varyasyonları idi.
3. Hasta grubundaki çocukların mRNA ve pyrin düzeyleri, kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmış saptandı.
4. Hasta ve kontrol grubundaki çocukların MEFV geni 2. ekzonunda metilasyon oranları arasında anlamlı bir fark yoktu.
5. Hasta grubundaki örnekler arasında genotiplerine göre gruplayarak yapılan karşılaştırmaların hiçbirinde; mRNA, pyrin ve metilasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

ÇALIŞMANIN ANALİZİ

Çalışmaya başlarken amacımız:

- En az 100 AAA hastası toplayarak mutasyon profillerini belirlemek, klinik bulgularla mutasyonlar arasındaki genotip-fenotip ilişkisini ortaya çıkarmak,
- Farklı mutasyonların, farklı kliniğe neden olmasını sağlayan olası bir faktör olarak metilasyonun etkisini araştırmak,
- Aynı mutasyona sahip hastalar arasında farklı şiddette bulgular saptanmasına olası neden olarak metilasyonun etkisini araştırmak,
- AAA hastaları ile sağlıklı çocuklar arasında, hastalıktan sorumlu MEFV geninin transkripsiyon ürünü mRNA ve pyrin düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemek ve bu farklılıkların oluşumunda metilasyonun rolünü test etmek.
- Farklı mutasyonları taşıyan hastalarda, MEFV geni ürünlerinin (mRNA, pyrin) aralarındaki farklılıkları araştırmak. Fark varsa bu farkın oluşumunda metilasyonun rolünü test etmek idi.

Çalışmamızın Kısıtlılıkları

- Çalışma ve hasta grubunda yeterli sayı (100) elde edilememesi
- Mutasyon dağılımının çok geniş olması

- Kontrol grubuna dahil edilen sağlıklı çocuklarda mutasyon analizi yapılmamış olması
- Teknik sorunlar nedeniyle metilasyon çalışmasının “2. Ekzon” ile sınırlandırılmak zorunda kalınması.

KAYNAKLAR

1. **Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, ve ark.** Familial Mediterranean fever(FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005; 84:1-11.
2. **Sav T, Ozbakir O, Kelestimur F, Gursoy S, Baskol M, ve ark.** Adrenal axis functions in patients with Familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 2006; 25:458-61.
3. **Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, ve ark.** Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine* 1998;77:268-97.
4. **Pras M.** Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 1998;27:92-7.
5. **Kavukcu S, Turkmen M, Eroglu Y, Canda T ve ark.** Renal , gastric and thyroidal amyloidosis due to familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 1997; 11:210-2.
6. **Simsek B, Islek I, Simsek T, Kucukoduk S, Cengiz K.** Regression of nephrotic syndrome due to amyloidosis econdary to familial Mediterranean fever following colchicine treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:281-2.
7. **Eldad B, Chetrit M L.** Familial Mediterranean Fever. *Lancet* 1998;351:659-64.
8. **Consortium, The International FMF.** Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90:797-807.
9. **Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, ve ark.** The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 beta production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:9982-7.
10. **Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL.** Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol* 2009; 146: 467-78.
11. **Sarrauste de Menthier C, Terrière S, Pugnere D, Ruiz M, Demaille J, ve ark.** INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:282-5.

12. **Touitou I, Lesage S, McDermott M, Cuisset L, ve ark.** Infevers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Hum Mutat* 2004; 24:194-8.
13. **Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K, Bruneau B.** Epigenome mapping in normal and disease States. *Circ Res* 2010; 107:327-39.
14. **Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M.** Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:1068-75.
15. **Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, Seguret F, ve ark.** Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2785-93.
16. **Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, ve ark.** Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum* 2009; 60:1851–61.
17. **Grateau G.** Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology* 2004; 43:410-415.
18. **Ergüven M, Üçel R, Cebeci N, Pelit M.** Ailevi Akdeniz Ateşi'nin demografik, klinik ve genetik özellikleri ile tedaviye yanıtı: 120 vakalık tek merkez deneyimi, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006; 49:283-290.
19. **Touitou I.** The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:473-83.
20. **Örün E, Yalçinkaya F, Özkaya N, Akar N, Gökçe H.** Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında akut faz yanıtı ile tümör nekrozis faktör- α , interlekin-8 ve interlekin-6 düzeylerinin değerlendirilmesi, *AÜTF Mecmuası* 2002; 55:123-128.
21. **Mamou H, R. Cattan.** The periodic disease. *Br Med J* 1957; 28:398-9.
22. **Siegal S.** Benign paroxysmal peritonitis. *Ann Intern Med* 1945; 23:1-21.
23. **Consortium, The French FMF.** A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 1997;17:25-31.
24. **Onen F.** Familial Mediterranean feve. *Rheumatol Int* 2006; 26:489-96.

25. **Goldfinger SE.** Colchicine for familial Mediterranean fever. The New England journal of medicine 1972; 287:1302.
26. **Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, ve ark.** Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. The New England journal of medicine 1986; 314:1001- 5.
27. **Haghighat M, Derakhshan A, Karamifar H.** Familial Mediterranean Fever. Shiraz E Medical Journal 2006; 7:1-18.
28. **Daniels M, Shohat T, Brenner-Ullman A , Shohat M.** Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. Am J Med Genet 1995; 55:311–14.
29. **Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, ve ark.** Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. Am J Med Genet 1989; 34:168–72.
30. **Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, ve ark.** Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. J Rheumatol 1998; 25:2445–9.
31. **Onen F, Sumer H, Turkay S, Akyurek O, ve ark.** Increased frequency of familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:31–3.
32. **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; 43:227–53.
33. **Kishida D, Nakamura A, Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, ve ark.** Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever:differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean. Arthritis Research & Therapy 2014; 16:439.
34. **Akarsu AN, Saatci U, Ozen, Bakkaloglu A, Besbas N, ve ark.** Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. J Med Genet 1997; 34:573-8.
35. **Akar N, Misiroglu M, Yalcinkaya F, Akar E, ve ark.** MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. Hum Mutat 2000; 15:118– 9.

36. **Yepiskoposyan L, Harutyunyan A.** Population genetics of familial Mediterranean fever: a review. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:911-6.
37. **Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, ve ark.** Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics* 2000; 105:70.
38. **Bar-Eli M, Ehrenfeld M, Levy M, Gallily R, ve ark.** Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (Familial Mediterranean Fever). *Am J Med Sci* 1981; 281:15-8.
39. **Bar-Eli M, Wilson L, Peters RS, Schwabe AD, ve ark.** Microtubules in PMNs from patients with familial Mediterranean fever. *Am J Med Sci* 1982; 284:2-7.
40. **Baykal Y, Saglam K, Yilmaz MI, Taslipinar A, ve ark.** Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF-alpha level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2003; 22:99-101.
41. **Direskeneli H, Ozdogan H, Korkmaz C, Akoglu T, ve ark.** Serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999; 26:1983-6.
42. **Henry J, Ribouchon MT, Offer C, Pontarotti P.** B30.2-like domain proteins: a growing family. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:162-5.
43. **Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, ve ark. Kastner DL.** Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003; 11:591-604.
44. **Ivona Aksentijevich, Daniel L, Kastner DL.** Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nature Reviews Rheumatology* 2011; 7:469-78.
45. **Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, ve ark.** Fire and ICE: the role of pyrin domain containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20:45-51.
46. **Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, ve ark.** The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 2002; 277:21119-22.
47. **Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, ve ark.** The Changing Face Of The Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26:612-27.

48. **Pras M, Sohar E** (1994) Familial Mediterranean fever. in Rheumatology. eds Klippel JH, Dieppe PA (Mosby, St Louis), pp 30.1–30.4,
49. **Ihan İ, Tınaztepe B.** Poliarteritis nodoza ve Ailevi Akdeniz Ateşi. Çocuk sağlığı ve Hastalığı Dergisi 1989; 32:151-7.
50. **Campen DH, Horwitz DA, Quismorio FP, Ehresmann GR, ve ark.** Serum levels of interleukin-2 receptor and activity of rheumatic diseases characterized by immune system activation. Arthritis Rheum 1998; 31:1358-64.
51. **Shiora M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, ve ark.** ASC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 2002; 293:1314-18.
52. **Bakkaloğlu A.** Familial Mediterranean Fever. Pediatric Nephrol 2003; 18:853-59.
53. **Celkan T, Çelik M, Kasapçopur Ö, Ozkan A, ve ark.** The anemia of familial Mediterranean fever disease. Ped Hematol Oncol 2005; 22:657-65.
54. **Matzner Y, Brezizinski A.** C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with Familial Mediterranean Fever N Engl J Med 1984; 311:287-290.
55. **Erdoğan Ö, Öner A.** Ailevi Akdeniz Ateşi. T Klin Pediatri 2002; 11:160-170.
56. **Sneh E, Pras M, Michaeli D, Sham N, ve ark.** Protracted arthritis in familial Mediterranean fever. Rheumatol Rehabil 1977; 16:102-6.
57. **Yalçinkaya F, Tekin M, Turner N, Ozkaya N.** Protracted arthritis of Familial Mediterranean fever (anunusual complication). Br J Rheum 36: 1228-30.
58. **Salai M, Langevitz P, Blankstein A, Zemer D, ve ark.** Total hip replacement in familial Mediterranean fever. Bull Hosp Jt Dis 1993; 53:25-28.
59. **56. Yazıcı H, Özdoğan H. Sohar E, Gafni J, ve ark.** Familial Mediterranean fever in Turkey. Proceeding of the I. International Conference on FMF, Tel Aviv: Freund, 1997; 66-71.
60. **Barakat M. H, El-Sobki N. I, El-Khawad A. O , Gumma K. A , ve ark.** Diagnosing familial Mediterranean fever. (Letter) Lancet 1984; 2: 41-42.

61. **Consortium, French FMF.** Localization of the familial Mediterranean fever (FMF) gene to a 250-kb interval in non-Ashkenazi Jewish founder haplotypes: *Am J Hum Genet* 1996; 59: 603-12.
62. **Boyajyan AS, Mkrtchyan GM, Hovhannisyan LP, Hovsepyan TJ. J.** *Inflamm (Lond).* Increased levels of circulating Annexin 5 in famillial mediterranian fever 2010 Nov 23; 7: 55.
63. **Wan der Hilst JC, Simon A, Drenth JP.** Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis *Clin Exp Med* 2005; 5(3): 87-98.
64. **Ozkan E, Okur O, Ekmekci A, Ozcan R, ve ark.** A new approach to the treatment of periodic fever. *Med Bull Istanbul* 1972; 5: 44- 9.
65. **Ruokonen E, Ilkka L, Niskanen M, Takala J.** Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand.*2002; 46:398-404.
66. **Carrol ED, Thomson AP, Hart CA.** Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 20:1-9.
67. **Kasapcopur O, Arısoy N.** Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuar hastalıklar. *Türk Pediatri Arşivi* 2006; 41:9-17.
68. **Shohat T, Shohat M, Petersen GM, Tyan DB, ve ark.** Familial Mediterranean fever-linkage studies with genetic markers on chromosome 6. *Tissue Antigens* 1990; 36:103-107.
69. **Pras E, Aksentievich I, Gruberg L, Balow JE, ve ark.** Mapping of gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N EnglJMed* 1992; 326:1509-1513.
70. **Padeh S, Shinar Y, Pras E, Zemer D, ve ark.** Clinical and diagnostic value of genetic testing in 216 Israeli children with Familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 30: 185-190.
71. **Yalçınkaya F, Akar N, Mısırhoğlu M.** Familial Mediterranean fever amiloidosis and the Val726 Ala mutation. *N Engl J Med* 1998; 338(14):993-994.
72. **Zaks N, Shinar Y, Padeh S, Lidar M, ve ark.** Analysis of the three most common MEFV mutations in 412 patients with familialMediterranean fever. *Isr Med Assoc J* 2003; 5(8): 585-588.

73. **Akar N, Akar E, Yalçınkaya F.** E148Q of the MEFV gene causes amyloidosis in familial Mediterranean fever patients *Pediatrics* 2001; 108;215.
74. **Sohat M, Magal N, Shohat T, ve ark .** Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 1999 ;7:287-92.
75. **Melnick A.** Epigenetics in AML. (2010). *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 23.
76. **Blum W., Marcucci G.** Targeting Epigenetic Changes in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Advances in Hematology&Oncology*. 2005 ;3:855- 882.
77. **Schaner PE, Gumucio DL.** Familial Mediterranean fever in the postgenomic era: how an ancient disease is providing new insights into inflammatory pathways. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4:45-52.
78. **Masumoto J, Dowds TA, ve ark.** ASC is an activating adaptor for NFkappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303:69–73.
79. **Waterland RA.** Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J.Pediatr* .2006 Nov;149(5 Suppl):S137-42.
80. **Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, Collector MI.** The Estrogen Receptor CpG Island Is Methylated in Most Hematopoietic Neoplasms. *Cancer Research*. 56; 973-977.
81. **Gibney E.R, Nolan C.M.** Epigenetics and gene expression. *Heredity*. 2010 105; 4–13.
82. **Rodolphe T, Issa JP.** Cancer Epigenetics. *Cancer Journal for Clinicians*. 60; 376–392.
83. **Wilson A. G.** Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases, *J Periodontol*, 79:1514-9.
84. **Trenkmann M, Brock M, Ospelt C, Gay S.** Epigenetics in reumatoid arthritis, *Clin Rev Allergy Immunol* 2009.
85. **Taft R. J, Pang K. C, Mercer T. R, Dinger, M, ve ark.** Non-coding rnas: Regulators of disease, *J Pathol*, 220: 126-39.

86. **Okı Y, Issa JP.** Epigenetic Mechanisms in AML-A Target for Therapy. *Cancer Treatment and Research*. 145; 19-40.
87. **Staoffman N, Magal N.** Higher than expected carrier rates for FMF in various Jewish ethnic groups. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:307-10.
88. **Santos-Reboucas C. B. Pimentel M. M.** Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases, *Eur J Hum Genet*, 2007; 15: 10-7.
89. **Robertson K. D.** DNA methylation and human disease, *Nat Rev Genet*, 6:597-610.
90. **Garcia-Manero G, Daniel J, Smith T. L, Kornblau S, ve ark.** DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia, *Clin Cancer Res*, 8:2217-24.
91. **Kang J. H, Kim S. J, Noh D. Y, Park I. A, ve ark.** Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: Correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma, *LabInvest* 81:573-9.
92. **Babidge W. J, Butler L. M, Burton M. A, Cowled P. A.** Methylation of CpG sites in exon 2 of the bcl-2 gene occurs in colorectal carcinoma, *Anticancer Res*, 21:2809-14.
93. **Heler H, Gafni J, Michaeli D, Shanin N, ve ark.** The arthritis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1996; 9:1-17.
94. **Ben-Chetrit E, Touitou I.** Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009; 61(10):1447-53.
95. **Zimand S, Tauber T, Hegesch T, Aladjem M.** Familial Mediterranean fever presenting with massive cardiac tamponade. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12:67.
96. **Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, ve ark.** Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever(FMF). *Q J Med* 1997; 90:643–7.
97. **Majeed HA, Rawashdeh M, El Shanti H, Qubain H, ve ark.** Familial Mediterranean fever in children: the expanded profile. *Q J Med* 1999; 92:309-18.

98. **Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, Celikyapi Erdem G, ve ark.** Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet.* 2011 Aug 7;12:105.
99. **Ben-Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, ve ark.** The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat* 2000; 15:385–6.
100. **Tamir N, Langevitz P, Zemer D, Pras E, ve ark.** Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): a subset with distinct clinical, demographic, and molecular genetic characteristics. *Am J Med Genet* 1999; 87:30–5.
101. **Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, ve ark.** The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 2000; 93:217–21.

EKLER DİZİNİ

Ek: 1 FORM 1: NEFROLOJİ VE GENETİK POLİKLİNİKLERİNE BAŞVURAN AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARININ VERİ DEĞERLENDİRME FORMU

Adı/ Soyadı:	Tarih:
Hasta no:	
Telefon:	
Yaş/ Cinsiyet:	
Vücut ağırlığı:	kg persantil SDS W/H: %
Vücut boyu:	kg persantil SDS BMI:
Aile öyküsü(akrabalık derecesi-hasta ismi):	var yok
Hastalığın başlangıç yaşı/ Faklıysa tanı yaşı	
Atak sıklığı :	
Ateş yüksekliği:	var yok
Karın ağrısı:	var yok
Göğüs ağrısı:	var yok
Eklem ağrısı:	var yok
Artrit:	var yok
Myalji.	var yok
Erizipel:	var yok
Cilt bulgusu:	var yok
Amiloidoz:	
Hemoglobin değeri:	
Tedavi :	var yok
Tedavi uyumu:	var yok
Tedaviye yanıt:	kısmi tam
Eşlik eden hastalık:	
Anne sütü alımı:	var (ne kadar süre aldığı) yok

Ek-2: Real-Time PCR Yönteminin Prensibi

Real-Time PCR Yönteminin Prensibi

Kantitatif Real-Time PCR (gerçek zamanlı) teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren ve hassasiyeti yüksek olan bir uygulamadır. RT-PCR, amplifikasyon sonuçlarına ulaşmak için harcanan zaman amplifikasyon ve analizle birlikte yapıldığı için daha kısadır. Diğer kantitatif metodlara oranla verim daha iyidir. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilgi miktarını en üst düzeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Temel olarak amplifikasyonun ürünlerini aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyonun gidişini ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da probalar ile oluşan floresansı saptayabilen ısı döngü aygıtları (thermal cyclers) kullanılır. Real-Time PCR tekniği kolaylıkla otomatize edilebilmekte ve PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırmaktadır. “Melting curve” analizine dayalı hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri ve “Molecular Beacons” gibi farklı formatlar uygulanabilmektedir. Real-Time PCR ile tek nükleotid polimorfizminin saptanması, gen ekspresyonunun miktarını belirleme, DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi), anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı, hemoglobinopatilerin prenatal tanısında, farmakogenetikte, klinik mikrobiyolojide ve ilaç geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda dizileme, tek iplik konformasyonpolimorfizmi ve restriksiyon enzim kesimleri gibi tekniklerinde yerini almıştır. Real-Time PCR'ın avantajları ise; entegre bir sistemde amplifikasyon ve analiz, sabit reaksiyon monitörizasyonuna olanak veren floresan boyalar ve probalar, hızlı siklus süresi (35 siklus için 20-40 dakika), yüksek örnek verimliliği, kapalı reaksiyon ortamlarına bağholarak düşük kontaminasyon riski, sonuçların kantitatif analizine olanak vermek ve yazılım sistemine sahip olmasıdır.

Ek.3: Etik Kurul

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/25-12	Tarih: 24.07.2014
	Doç.Dr.Özlem Giray BOZKAYA'nın sorumlusu olduğu "Epigenetik Regülasyonun, Ailesel Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever=FMF) nde Fenotipik Ekspresivite Üzerine Etkileri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	