

BÜŞRA KARAÇAM

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HİPOKOMPLEMENTEMİK ÜRTİKERYAL VASKÜLİT
SENDROMLU HASTALARDA AGL3 MUTASYONU
ANALİZİ**

BÜŞRA KARAÇAM

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEMA SIRMA EKMEKCİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

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

BÜŞRA KARAÇAM (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde benden hiçbir yardımı esirgemeyen, bilgisiyle beni aydınlatan, tecrübesiyle yol gösteren, kendilerini tanımaktan çok mutlu olduğum kıymetli hocalarım Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekci, Prof. Dr. Ahmet Gül ve Doç. Dr. Neslihan Abacı'ya,

Bu süreçte hem varlıklarıyla bana destek olan hem de tecrübeleriyle bana yol gösteren başta Dr. Zeliha Emrence, M.Sc. Burcu Salman ve Dr. Melda Sarıman olmak üzere, Dr. Ferda Paçal, Dr. Aris Çakiris, Atilla Mehmet Güler, M.Sc. Elifnur Özkaya, M.Sc. Sümbül Gezer, İrem Coşkuntan, Büneyan Tüzün'e,

Deneylerimde benden yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen dostlarım Şeyma Punar ve Duygu Savaş'a,

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

Benden manevi desteklerini ve bilgilerini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Dr. İmran Khan, Burçe Elbasan ve Dr. Sadaf Mahfooz'a ve kıymetli hocam Doç. Dr. Mustafa Aziz Hatiboğlu'na,

Bu serüvende her daim yanımda olan, beni destekleyen, zorlu anlarda motive eden, benimle beraber uykusuz kalan, derdimi dert edinen canım Annem, Babam, Ablam ve bütün aile fertlerime,

Her aradığımda telefonlarımı açan, derdime koşan, çocukluğumdan beri yanımda olan canım kuzenim Zeynep Karaçam'a,

Koşulsuz şartsız yanımda olan, varlığı ve sözleriyle bana güç veren, her anımda beni destekleyen, serüvenimin en başından beri yanıbaşımdaya olan can dostum örnek insan Elif Kılıç'a sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36201

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. OTOİMMÜN VE OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLAR.....	2
2.1.1. Genetik Altyapı.....	3
2.1.2. Çevresel Tetikleyiciler	4
2.1.3. Etki Mekanizması	5
2.1.4. Klinik Özellikler	6
2.1.5. Biyobelirteç	7
2.1.6. Tedavi.....	7
2.2. ÜRTİKERYAL VASKÜLİT	8
2.2.1. Normokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit (NUV)	9
2.2.2. Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit (HUV)	9
2.2.3. Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit Sendromu (HUVS)	10
2.2.3.1. İnsidans	10
2.2.3.2. Patofizyoloji.....	10
2.2.3.3. Klinik Özellikler.....	15
2.2.3.4. Teşhis.....	17
2.2.3.5. Ayırıcı Tanı.....	18
2.2.3.6. Tedavi	19
2.3. METALLOKARBOKSİPEPTİDAZLAR	21

2.3.1. Sitolik Karboksipeptidazlar	21
2.3.1.1. Sitolik Karboksipeptidaz 3 (CCP3/AGBL3).....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. GEREÇ.....	27
3.1.1. Kitler ve Kullanılan Kimyasallar	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	27
3.2. YÖNTEM.....	28
3.2.1. Hasta Örnekleri	28
3.2.2. Kandan DNA İzolasyonu	29
3.2.3. Primer Tasarlanması.....	30
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	32
3.2.5. Jel Elektroforezi	34
3.2.6. Sanger Dizileme	34
3.2.7. Biyoinformatik Araçlarla AGBL3 Proteinini 3D Yapı Modellemesi	34
3.2.8. Modellemesi Yapılan Proteinlerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Jel Elektroforezi Görüntüleri.....	36
4.2. Sanger Dizileme Sonuçları.....	38
4.3. Protein Modelleme.....	45
4.4. Doğal ve <i>Truncated</i> Protein Arasındaki Yapısal Farklar	46
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	55
FORMLAR	62
ETİK KURUL KARARI	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Otoinflatuar ve Otoimmün Hastalık Çeşitleri (1).....	2
Tablo 2: AGBL3 geni tanımlanmış varyasyonlar (GRCh38 referans alınmıştır).....	26
Tablo 3: Primer Dizileri.....	30
Tablo 4: PZR karışımı (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Ekzon bölgelerinin amplifikasyonu için)	32
Tablo 5: PZR koşulları (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Ekzon bölgelerinin amplifikasyonu için)	32
Tablo 6: PZR karışımı (8. Ekzon için)	33
Tablo 7: PZR koşulları (8. Ekzon için)	33
Tablo 8: Hastaların Özellikleri.....	38
Tablo 9: 4. hastanın varyasyon tablosu (GRCh38.p12 referans alınmıştır)	39
Tablo 10: 5. hastanın varyasyon tablosu (GRCh38.p12 referans alınmıştır)	42
Tablo 11: SPPIDER Tarafından Öngörülen doğal ve <i>Truncated</i> AGBL3 Proteininin İkincil Yapıları ve Solvent Erişilebilirliğinin) Karşılaştırmalı Analizi	46
Tablo 12: SRide ile Analiz Edilen Doğal ve <i>Truncated</i> AGBL3 Proteinlerinin Stabilize Edici Rezidüleri.....	46
Tablo 13: Doğal ve <i>Truncated</i> AGBL3 Protein Yapılarında Esnek Rezidü Pozisyonlarındaki Değişiklikler	47
Tablo 14: HBAT ile Doğal ve <i>Truncated</i> AGBL3 Proteinlerinde Moleküller Arası Hidrojen Bağı Frekans Tahminleri.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Otoinflamatuvar ve Otoimmün Hastalıklarda Patojenik Yolak (1)	3
Şekil 2: IL-1 ve IL-18'in Adaptif Immün Sisteme Etkisi (2)	5
Şekil 3: Ürtikeryal Lezyonların Sıklıkları (19).	9
Şekil 4: Kompleman sisteminin klasik yolla aktivasyonu.....	13
Şekil 5: Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit gelişimi (18)	20
Şekil 6: CCP3'ün yapısal modellemesi (58).....	23
Şekil 7: CCP'lerin aktif bölgesindeki susbstrat bağlanma kısmı (58)	23
Şekil 8: AGBL3 proteini ve ilişkili olduğu proteinler.....	25
Şekil 9: AGBL3 proteini domainleri.....	25
Şekil 10: Aile Ağacı	29
Şekil 11: AGBL3 geni 2. ve 4. ekzon bölgeleri jel görüntüsü.....	36
Şekil 12: AGBL3 geni 8. ekzon bölgesi jel görüntüsü.....	36
Şekil 13: AGBL3 geni 5, 7.2, 9, 10.ekzon bölgeleri jel görüntüsü	37
Şekil 14: AGBL3 geni 6. Ekzon ve 7.ekzon 1.bölge jel görüntüsü	37
Şekil 15: AGBL3 proteininde c.769C>T mutasyonu konumu	38
Şekil 16: 4. hastada AGBL3 geni 2. İntronunda rs12671813 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	40
Şekil 17: 4. hastada AGBL3 geni 5. Ekzonda rs4236655 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.	40
Şekil 18: 4. hastada AGBL3 geni 7. Ekzonda rs9656447 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	41
Şekil 19: 4. hastada AGBL3 geni 13. İntronda rs146909058 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	41
Şekil 20: 4. hasta; 7. ekzonda cDNA'nın 769. Pozisyonunda C alleli.	42
Şekil 21: 5. hastada AGBL3 geni 2. İntronda rs12671813 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	43
Şekil 22: 5. hastada AGBL3 geni 5. Ekzonda rs4236655 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	43
Şekil 23: 5. hastada AGBL3 geni 7. Ekzonda rs9656447 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.....	44
Şekil 24: 5. hasta; 7. ekzonda cDNA'nın 769. Pozisyonunda C alleli.	44

Şekil 25: Doğal ve <i>Truncated</i> AGBL3'ün 3D yapısı	45
--	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAA: Ailevi akdeniz anemisi

TRAPS: TNF-reseptörü ile ilişkili periyodik sendrom

CAPS: Kriyoprin ilişkili periyodik sendrom

FCAS: Ailevi soğuk otoinflamatuar sendrom

MWS: Muckle–Wells sendromu

NOMID: Yenidoğan başlangıçlı multisistemik inflammatuar hastalık

HIDS: Hiperimmünglobülinemi D ve periyodik ateş sendromu

KRMO: Kronik tekrarlayan multifokal osteomyelit

DIRA: IL-1 reseptör antagonist eksikliği

IL: İnterlökin

SJIA: Sistemik juvenil idiyomatik artrit

APS: Otoimmün poliglandüler sendrom

IPEX: İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçen sendrom

OLPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom

SLE: Sistemik lupus eritematozus

MBDH: Mix bağ dokusu hastalığı

OİH: Otoinflamatuar hastalıklar

OH: Otoimmün hastalıklar

RA: Romatoid artrit

UV: Ultraviyole

PRR: Pattern recognition receptors

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns

DAMP: Damage-associated molecular patterns

TLR: Toll-like receptors

NLR: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

RIG-I-like: Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors

NLRC4: NLR family CARD domain-containing protein 4

IL: İnterlökin

TNF: Tümör nekrozis faktör

NF-kB: Nükleer faktör kappa b

Th: T helper

ESR: Eritrosit sedimantasyon hızı

CRP: C-reaktif protein

SAA: Serum amiloid A proteini

C: Kompleman

NSAID: Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar

IFN-a: İnterferon alfa

ÜV: Ürtikeryal vaskülit

KÜ: Kronik ürtikeryal lezyon

KÜ (Otoant +): IgE veya IgE reseptörüne karşı otoantikor içeren kronik ürtiker

HUV: Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit

HUVS: Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit sendromu

NUV: Normokomplementemik ürtikeryal vaskülit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ANA: Antinükleer antikor

dsDNA: Çift sarmallı DNA

IgM: İmmünoglobulin M

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

LCV: Lökositoklastik vaskülit

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

IVIG: İntravenöz immünoglobulin

CP: Karboksipeptidaz

MT: Mikrotubul

CCP: Sitozolik karboksipeptidaz

TTLL: Tubulin tirozin ligaz benzeri

AGBL3: ATP/GTP binding protein like 3

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

dNTP: Deoxynucleotide

PZR: Polimeraz zincir reaksiyon

RNAz: Ribonükleaz

NCBI: National Center for Biotechnology Information

dH₂O: Distile su

TAE: Tris asetat

EtBr: Etidium Bromür

ÖZET

Karaçam, B. (2020). Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit Sendromlu Hastalarda Agbl3 Mutasyonu Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit Sendromu (HUVS), ürtikeryal vaskülitin alt tipi olan otoimmün bir hastalıktır. Oldukça nadir görülen HUVS için literatürde 200'den az vaka bildirilmiştir. Bu hastalık kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülürken çocuklarda daha nadir görülmektedir. Düşük kompleman seviyeleri, serumda anti-C1q çöktelleri ve bunlara eşlik eden ateş, halsizlik, yorgunluk, kas romatizması, tekrarlayan ürtiker gibi sistemik bulgularla karakterize olan HUVS'nin patofizyolojisi ve genetik etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. HUVS'li çocuğu olan trio bir ailede yaptığımız tüm ekzom dizileme çalışması analizlerinde AGBL3 aday gen olarak belirlenmiştir. AGBL3 proteini tubulinlerin post-translasyonel modifikasyonlarında görevlidir ve $\Delta 2$ -tubulin oluşturur. Tubulinlerin otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıklar ile olan ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum AGBL3'ün mikrotubüller üzerinden inflamasyonla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Tüm ekzom dizileme çalışmasında AGBL3 genindeki c.769.C>T mutasyonu HUVS'li çocukta homozigot, Mukokütöz Behçet öykülü babada ve sağlıklı annede heterozigot olarak görülmüştür. Bu tez çalışmasında 2 HUVS'li hastada AGBL3 geni ekzon bölgeleri Sanger dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Dizileme sonucunda hastalarda farklı intron ve ekzon bölgelerinde varyasyonlar bulunmuştur. Ayrıca, c.769.C>T bölgesindeki mutasyonun sebep olduğu p.Gln257Ter protein değişikliği için çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak tahminlerde bulunulmuştur. Sonuçlar HUVS'nin genetik etiyolojisinin heterojen olduğunu ve AGBL3 geni mutasyonlarının HUVS ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: HUVS, AGBL3, CCP3, AGBL3 Mutasyonu, Ürtikeryal Vaskülit

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36201

ABSTRACT

Karaçam, B. (2020). Analysis of AGBL3 Mutations in Patients with Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. 2020. İstanbul.

Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome (HUVS), a rare autoimmune disease, is characterized by complement deficiency and the presence of C1q antibody in serum. Less than 200 cases have been reported in the literature for extremely rare HUVS. While this disease is more common in women than in men, it is rarely seen in children. The pathophysiology and genetic etiology of HUVS, which is characterized by low complement levels, anti-C1q precipitates in serum and accompanying fever, weakness, fatigue, muscle rheumatism, recurrent urticaria, have not been fully elucidated. AGBL3 was determined as a candidate gene in whole exome sequencing studies we conducted in a trio family with a child with HUVS. AGBL3 protein is involved in post-translational modifications of tubulins and forms $\Delta 2$ -tubulin. It has been reported that Tubulins associated with autoinflammatory and autoimmune diseases. This suggests that AGBL3 may be associated with inflammation through microtubules. In “whole exome sequencing” study, the c.769.C> T mutation in AGBL3 gene was homozygous in the child with HUVS, and heterozygous in the father with mucocutaneous Behçet's and healthy mother. In this thesis, AGBL3 gene exon regions are examined by Sanger sequencing method in 2 HUVS patients. As a result of sequencing, variations were found in different introns and exons regions in patients. In addition, estimates have been made using various bioinformatics tools for p.Gln257Ter protein change caused by mutation in c.769.C>T region. The results show that genetic etiology of HUVS is heterogeneous and AGBL3 gene mutations may be related to HUVS.

Key Words: HUVS, AGBL3, CCP3, AGBL3 Mutation, Urticarial Vasculitis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36201

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otoimmün nadir bir hastalık olan Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit Sendromu (HUVS), kompleman eksikliği ve serumda C1q antikoru varlığı ile karakterize bir hastalıktır. Ürtikeryal vaskülitin bir alt tipi olan bu hastalıkta cilt, eklem, böbrek, vasküler ve gastrointestinal sistem tutulumları görülebilmektedir. HUVS'nin patafizyolojisi ve genetik etiyojisi tam olarak açıklanamamıştır. HUVS için majör tanı kriterleri; 6 aydan uzun süren ürtiker ve hipokomplementemidir. Minör tanı kriterleri (en az ikisi tanı için gerekli olan) lökositoklastik vaskülit, artralji veya artrit, üveit veya episklerit (veya konjonktivit), hafif glomerülonefrit, tekrarlayan karın ağrısı veya pozitif C1q antikor testidir. Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. Antihistaminikler, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar, teröpatik ajanlar hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır ancak tedavi çoğunlukla hastalığın seyrine göre uygulanmaktadır. HUVS'nin genetik alt yapısını aydınlatmak ve patofizyolojisinin altında yatan sebepleri anlamak amacıyla HUVS'li çocuğu olan bir ailede daha önce yapılan tüm ekzom dizileme verisi analizinden AGBL3 geni aday gen olarak seçildi. Bu gende c.769C>T bölgesindeki mutasyon HUVS'li çocukta homozigot, Mukokütanöz Behçet öykülü babada ve sağlıklı annede heterozigot olarak tespit edildi. Bu tez çalışmasında bu verilerden faydalanarak iki pediatrik HUVS'li vakada daha AGBL3 geninde önce mutasyon bölgesi ve ardından AGBL3 geni ekzom bölgeleri Sanger dizileme yöntemi ile taranmıştır. Ayrıca c.769C>T mutasyonunun oluşturduğu p.Gln257Ter *truncated* proteini modellenmiş ve farklı araçlar kullanılarak doğal ve *truncated* protein arasındaki farklar tahmin edilmiştir. AGBL3 (CCP3), sitozolik karboksipeptidaz ailesinin alt üyesi olan bir proteindir. AGBL3, tubulinlerin modifikasyonlarında görevlidir. Yapılan bu çalışma ile genetik etiyojisi bilinmeyen ve nadir olarak görülen HUVS'nin genetik etiyojisinin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OTOİMMÜN VE OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLAR

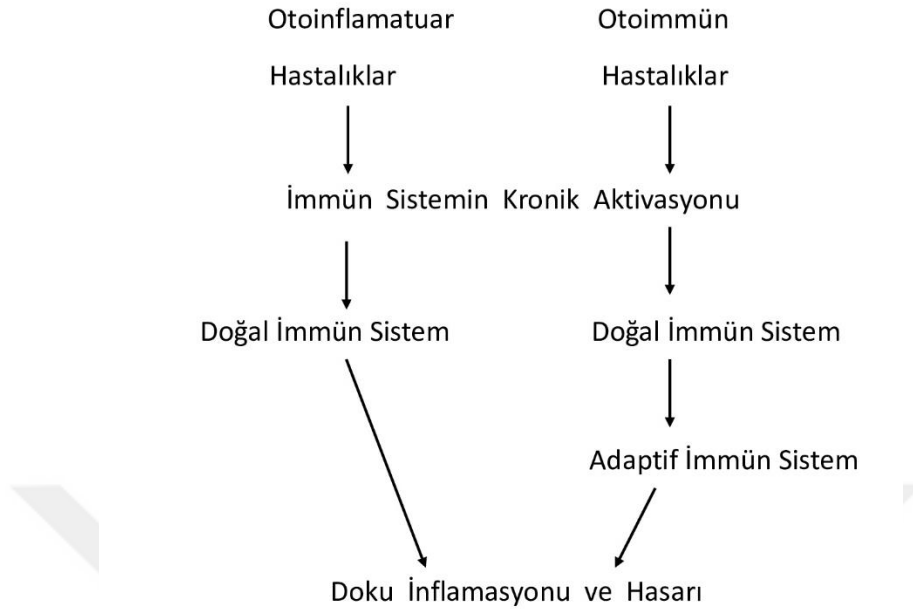
Periyodik ateş sendromları olarak da adlandırılan otoinflatuar hastalıklar (OİH), enfeksiyon yokluğunda ortaya çıkan nadir, kalıtsal, tekrarlayan inflamatuvar bozukluklardır. Bu hastalıklar öncelikle Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), TNF-reseptörü ile ilişkili periyodik sendrom hastalığı (TRAPS), Hiperimmünoglobülinemi D ve periyodik ateş sendromu (HIDS) gibi hastalıklar olmak üzere tipleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Otoinflatuar ve Otoimmün Hastalık Çeşitleri (1)

Otoinflatuar Hastalıklar		Otoimmün Hastalıklar	
Monogenik hastalıklar	Poligenik hastalıklar	Monogenik hastalıklar	Poligenik hastalıklar
AAA	Still hastalığı	APS tip 1	Romatoid artrit
TRAPS	Crohn hastalığı	IPEX sendromu	SLE
CAPS, FCAS,	Behçet hastalığı	OLPS	Sistemik skleroz
MWS,NOMID	Gut	C1q eksikliği	Polimiyozit
HIDS	SJİA		Dermatomyozit
Blau sendromu			Sjögren sendromu
PAPA sendromu			Farklılaşmamış bağ dokusu hast.
KRMO			MBDH
DIRA			Overlap sendromu
Majeed sendromu			
IL-10 eksikliği			

AAA: Ailevi akdeniz anemisi; TRAPS: TNF-reseptörü ile ilişkili periyodik sendrom; CAPS: Kriyoprin ilişkili periyodik sendrom; FCAS: Ailevi soğuk otoinflatuar sendrom; MWS: Muckle–Wells sendromu; NOMID: Yenidoğan başlangıçlı multisistemik inflamatuvar hastalık; HIDS: Hiperimmünglobülinemi D ve periyodik ateş sendromu; KRMO: Kronik tekrarlayan multifokal osteomyelit; DIRA: IL-1 reseptör antagonisti eksikliği; IL: İnterlökin; SJİA: Sistemik juvenil idiyomatik artrit; APS: Otoimmün poliglandüler sendrom; IPEX: X’e bağlı İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, sendromu; OLPS: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom; SLE: Sistemik lupus eritematozus; MBDH: Miks bağ dokusu hastalığı

Otoinflatuar hastalıklar (OİH) ve otoimmün hastalıklar (OH), bağışıklık sisteminin anormal kronik aktivasyonu ile karakterizedir, böylece doku iltihaplanması ve hasarı oluşur. Otoinflatuar hastalıklarda, doğal immün sistem doku inflamasyonundan doğrudan sorumludur; otoimmün hastalıklarda ise doğal immün sistem adaptif immün sistemi aktive ederek inflamatuvar sürecin ana etkileyicisi haline gelir (1,2).



Şekil 1: Otorhinolaryngeal İnflamatuvar ve Otorhinolaryngeal Otoimmün Hastalıklarda Patojenik Yolak (1)

OİH ve OH arasında benzerlikler ve farklılıklar vardır. Bu hastalıklar kendilerine yönelik patolojik bir süreci tanımlamak için “oto” ön ekiyle başlarlar; bunlar genellikle deri ve kas iskelet sisteminin dahil olduğu sistemik hastalıklardır. Patogenetik bakış açısından, hasta bireylerde bağışıklık sisteminin kronik aktivasyonu ile doku iltihabı gerçekleşir. Bununla birlikte, iki farklı hastalık grubunda spesifik hasar vericiler farklıdır: OİH’de doğal immün sistem doğrudan doku iltihabına neden olurken, OH’lerde doğal immün sistem iltihaplı süreçten sorumlu olan adaptif bağışıklık sistemini aktive eder (Şekil 1). OİH’lerden etkilenen hastalar, hastalık sürecini yönlendiren otoantikorlara veya otoreaktif antijene spesifik T hücrelerine sahip değildir; bunun yerine monosit-makrofajlar iltihaplanma ve hasardan sorumludur (1).

2.1.1. Genetik Altyapı

Genetik çalışmalar, hem OİH hem de OH hastalıklarının gelişmesinde etkili olan gen mutasyonlarının varlığını vurgulamıştır (3). OİH, kalıtsal monogenik hastalıklar ve multifaktöriyel poligenik hastalıklar olarak sınıflandırılmıştır. OİH’lerle ilişkili genler, inflamazomun proteinlerini kodlar. OİH’lerin gelişimine katılan tüm genler, sitokin sinyal yolları içindeki ortak yapısal motifleri ve fonksiyonları taşır (4).

Otoinflamatuvar klinik özellik sergileyen hastaların yaklaşık %60'ında bilinen OİH ile ilişkili genetik lokasyonlarda mutasyon bulunmaz. Bu hastaların henüz tanımlanmamış genlerde mutasyonları bulunması olasıdır.

Otoimmün hastalıklarda poligenik hastalıklar monogenik hastalıklardan daha sık görülmektedir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklığın tetikleyicilerinin hastalık patogenezinin katılımı ve OH'lerin multifaktöriyel yapısı bu durumu açıklayabilir. Bugüne kadar üç otoimmün monogenik hastalık tanımlanmıştır: APS tip 1, IPEX sendromu ve OLPS (1).

2.1.2. Çevresel Tetikleyiciler

Hem otoinflamatuvar hem de otoimmün hastalıklarda, çevresel ve endojen faktörler hastalığın başlaması ve şiddetlenmesine neden olabilir. Ek olarak OİH ve OH, fiziksel ajanlar ve bağışıklık sistemi homeostazını değiştirebilen ilaçlara ve diğer kimyasal ajanlara maruziyetle tetiklenebilir (2).

Enfeksiyonlar ve aşılama, MWS, HIDS, NOMID, DIRA, Behçet, Crohn hastalığı, gut, SLE, romatoid artrit (RA), vaskülit, primer Sjögren sendromu gelişimi ve bazı otoimmün monogenik hastalıkların (IPEX ve ALPS) gelişimi ile ilişkilendirilmiştir.

İlaça maruz kalma SLE'nin gelişimini tetikler; gut ve Crohn hastalığı için de olası bir uyaran olarak tanımlanabilir.

Fiziksel ajanlar OİH'leri ve OH'leri tetikleyebilir. Soğuğa maruz kalma MWS, FCAS ve Raynaud fenomenini tetiklemede rol oynamıştır. Fiziksel travma DIRA, HIDS, TRAPS ve Behçet hastalığını tetikleyebilir; cilt ve gastrointestinal sistemin mekanik etkiye maruz kalması DIRA'yı tetikleyebilir. UV ışığına maruz kalma SLE'nin başlamasını ve alevlenmesini tetikleyebilir (1).

Sigara içmek SLE ve diğer otoimmün hastalıklar (Sjögren Sendromu, RA, multipl skleroz, otoimmün tiroidit gibi) için bir risk faktörüdür, ancak OİH'lerde etkili gibi görünmemektedir (5).

Yorucu fiziksel efor ve psikolojik stres, AAA krizini tetikleyebilir ve adet döngüsünün OH'lerin yanı sıra birçok OİH'yi de kötüleştirebileceği gözlenmiştir.

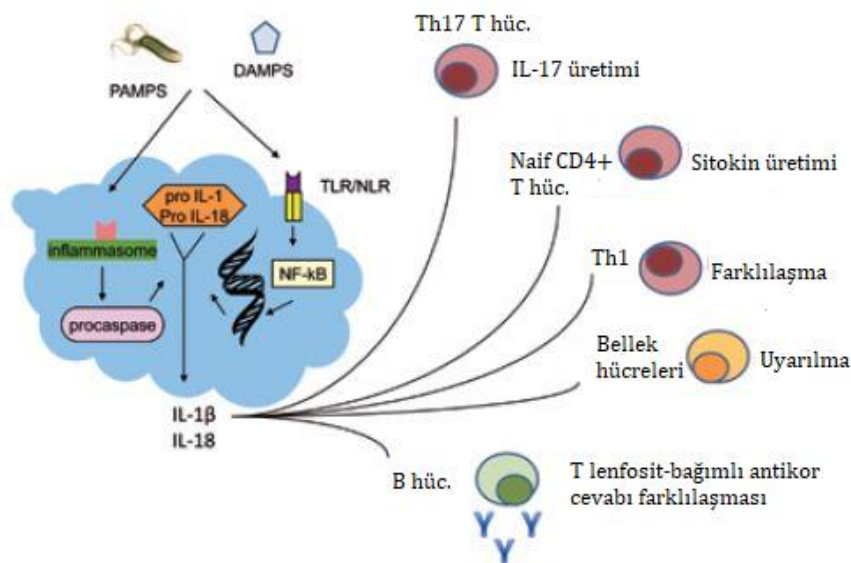
Stres birçok otoinflatuar (NOMID, MWS, HIDS, TRAPS, AAA, Crohn ve Behçet hastalığı) ve otoimmün hastalıkların (SLE, RA, overlap sendromu) gelişimi ve kötüleşmesi ile bağlantılı olmuştur (3).

2.1.3. Etki Mekanizması

Doğal immün sistem sensörleri, *pattern recognition receptors* (PRR'ler) olarak adlandırılır ve *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) veya hasarlı hücrelere (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) bağlanırlar. Efektör hücreler makrofajlar, dendritik hücreler ve diğer antijen sunan hücrelerdir. PRR'ler üç tip reseptör içerir: *toll-like receptors* (TLR'ler), *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NLR'ler) ve *retinoic acid-inducible gene-I-like receptors* (RIG-I-like).

NLRP (yani, NLRP1, NLRP3) ve *NLR family CARD domain-containing protein 4* (NLRC4) aktivasyonu, patojenlere karşı savunma için kritik olan inflamazom yapılarının oluşmasına neden olur. Prokaspaz-1 aktivasyonuna aracılık ederler ve bunun sonucu olarak IL-1 β ve IL-18 proformları aktif formlara dönüşür (Şekil 2).

Adaptif bağışıklık, en başta T ve B hücre reseptörleri olmak üzere oldukça spesifik antijen reseptörleri yoluyla etki eder. OH hastalıklarda otoreaktif antijen-spesifik T hücreleri bulunur ve otoantikorlar üretilir (2).



Şekil 2: IL-1 ve IL-18'in Adaptif Immün Sisteme Etkisi (2)

PAMP ve DAMP'ler, hücre yüzeyinde bulunan TNF veya TLR'yi uyarır, bu da NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonu ile sonuçlanır, IL-1 ve IL-18'in olgunlaşmamış (pro-) formlarının ekspresyonu indüklenir. PAMP'ler ve DAMP'ler sırasıyla prokaspaz 1'in kesilmesine ve aktif haline gelmesine neden olur. Kaspaz 1 ile pro-IL1 ve pro-IL18 aktifleştirilir. Bu yolla inflamazomun aktivasyonunu indükleyerek hücrelere girebilirler. IL-1 ve IL-18'in etkileri doğal immün sistemle sınırlı değildir, farklı efektör T ve B lenfosit alt gruplarının farklılaşması, aktivasyonu ve çoğalmasında rol oynarlar. Böylece otoimmün hastalıklarda inflamatuvar fenotipleri tetikler. PAMPS: *pathogen-associated molecular patterns*, DAMPS: *damage-associated molecular patterns*, TLR: *toll like receptor*, NLR: *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*, IL: interlökin, TNF: tümör nekrozis faktör, NF- κ B: nükleer faktör kabba b, Th: *T helper*

2.1.4. Klinik Özellikler

OIH ve OH'ler cilt, kas-iskelet sistemi veya gastrointestinal tutulumun sıklıkla gözlemlendiği multisistemik hastalıklardır. OH'de yaygın olarak deri, kas-iskelet sistemi ve gastrointestinal semptomlar görülürken, akciğer, göz, kulak, hematopoetik ve sinir sistemi gibi diğer organların tutulumu daha az görülür (1). OH'ler kalp ve böbreği doğrudan etkileyebilir (6), OIH'lerde kronik inflamasyon nedeniyle amiloid birikimi, kalp ve böbrek hasarının ana nedenidir (7).

OIH ve OH'li hastalarda cilt belirtileri sıklıkla gözlenir. Klinik tablo benzer olabileceğinden, doğru bir ayırıcı tanı için dikkatli bir fiziki muayene çok önemlidir. Deri biyopsisi faydalı olabilir, ancak bazı OIH ve OH vakalarında histolojik bulgular benzer olabilmektedir.

OIH ve OH'ler sıklıkla artropatiler, miyaljiler ve artrit dahil olmak üzere geniş bir belirti yelpazesine sahip olan kas-iskelet sistemini etkiler.

Hem OIH hem de OH'den etkilenen hastalar gastrointestinal semptomlardan şikayet edebilir. En sık görüleni akut karın teşhisine neden olabilen karın ağrısıdır (1).

Tekrarlayan ateş, halsizlik, grip benzeri semptomlar, kilo kaybı, miyalji, halsizlik, lenfadenopati ve splenomegali gibi esas semptomlar her iki hastalıkta da sık görülür. OIH ve OH hastalıklarda belirti ve bulgular sıklıkla benzer olsa da, biyolojik araştırmalar daha belirgin özellikler ortaya çıkarabilir (1).

OIH ve OH hastalarında hastalık komplikasyonları nedeniyle morbidite ve mortalite riski daha yüksektir. Özellikle, AA amiloidoz, uzun süren inflamatuvar koşulları olan hastalarda gelişir (2). AA amiloidoz, uzun süredir devam eden inflamatuvar durumu olan hastalarda gelişir. OIH'lerde ve OH'lerde gözlemlendiği gibi kronik inflamasyon, AA amiloid proteininin yanlış katlanmasına neden olur ve çeşitli dokuların hücre dışı matrislerinde AA proteininin birikmesine neden olarak çoklu organ

fonksiyon bozukluğuna yol açar. Genellikle tedavi edilmeyen hastalarda ortaya çıkar (8). AA amiloidoz SLE'de ve sistemik vaskülitte nadiren gözlenmiştir (9).

2.1.5. Biyobelirteç

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein (CRP) genellikle aktif hastalık döneminde artar. Yüksek serum ferritin seviyeleri tipik olarak Still hastalığında ortaya çıkar. Yüksek immunoglobulin serum seviyeleri SLE, primer Sjögren sendromu, HIDS ve AAA'da bulunur. Serum amiloid A proteini (SAA), OIH'de sıklıkla artarken, düşük kompleman bileşen 3 ve 4 (C3 ve C4) serum seviyeleri SLE'de daha sık gözlenir (10).

2.1.6. Tedavi

İmmün sistem bozukluğu, OIH ve OH'lerin ortak patogenetik arka planı olduğundan, bazı ilaçlar her iki hastalık türünde de kullanılmaktadır. Bunların arasında, glukokortikoidler ve steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) bulunur ve bu hastalıkların inflamatuvar orijini tespit edilir edilmez kullanılır (11).

Kolşisin, OIH'de başka bir terapötik seçenektir. Oral kolşisin tedavisi, AAA'lı hastaların çoğunda tam remisyon sağlar, çoğu vakada amiloidoz gelişimini önler ve hastaların %95'inde klinik iyileşmeyi sağlar (12).

Hidroksiklorokin, OIH ve OH'lerin tedavisinde kullanılmıştır. Bu ilaç TLR aktivasyonunu inhibe ederek interferon alfa (IFN-a)'nın downregölasyonuna yol açar ve antijen işlemeyi inhibe ederek otoantijen sunumunu etkiler (13).

İmmün baskılayıcı tedavinin, yani siklofosfamid, azatiyoprin, metotreksat ve mikofenolat mofetilin, OH'ler ve OIH'li hastalarda ciddi belirtilerin çoğunun tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (14).

Son yıllarda, biyoteknolojik ajanlar, özellikle anti-sitokin ilaçları, OIH ve OH'den etkilenen hastalarda tedavisi güç belirtileri tedavi etmek için kullanılmıştır. OIH'lerde anti-IL1 tedavisinin etkinliğine dair klinik kanıtlar ortaya çıkmaktadır ve halen kolşisin dirençli hastalarda uygun bir seçenek olarak düşünölebilir. Üç farklı anti-IL-1β ajanı, anakinra (IL-1 reseptörünü bloke eden), rilonacept (IL-1β 'yi nötrleştiren çözüner bir IL-1 reseptörü) ve canakinumab (anti-IL-1β monoklonal antikoru) OIH'lerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (15). Anakinra ile IL-1 blokajının RA ve SLE hastalarında terapötik fayda sağladığı gösterilmiştir (16).

2.2. ÜRTİKERYAL VASKÜLİT

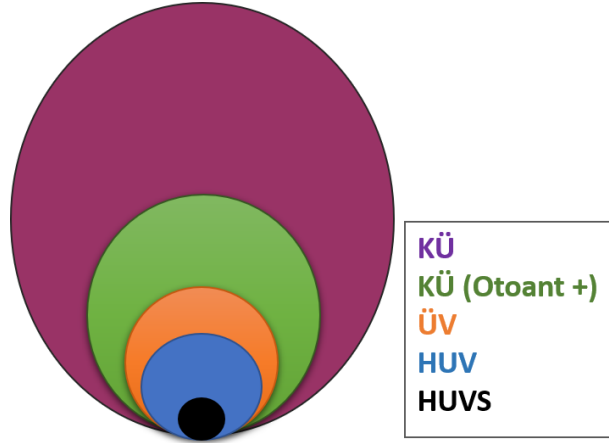
Ürtikeryal vaskülit (ÜV), lökositoklastik vaskülit histopatolojik özelliğine sahip tekrarlayan ürtiker atakları ile karakterize klinikopatolojik bir durumdur (17). Hastalık genç ve orta yaşlı kadınlarda ortaya çıkma eğilimindedir ve hafif lezyonlu, şiddetli sistemik, organ spesifik tiplere kadar farklılık gösteren heterojen bir hastalıktır (18). Hastaların çoğunda ÜV sistemik bir hastalığın ortaya çıkış belirtisidir veya kronik sistemik bir hastalığın bileşeni olarak gelişir. ÜV'deki vasküler hedefler üst dermisteki dermal kılcal damarlar ve postkapiller venüllerdir.

Ürtikerde ÜV'den farklı özellikler görülür. Normal ürtiker 2-8 saat sürer, lezyonlar kaşıntılıdır ve iz bırakmaz. Bu lezyonlar birleşebilir veya 10 cm'den büyük dev ürtiker olarak gelişebilirler. ÜV'de deri lezyonları koyu esmer renkli, ağrılı, yangılı veya kaşıntılı şekilde görülebilir ve kalıcılığı 24 saatten fazladır. Bu lezyonlar kırmızı kan hücresi ekstrasvazasyonunu gösteren hiperpigmentasyon yaparak düzelir. Ürtikeryal vaskülit lezyonları tipik olarak 0.5-5 cm çapındadır. ÜV'li hastalarda *palpable purpura* da görülmektedir.

ÜV'de klasik kompleman yolağının aktifleşmesiyle serum hemolitik kompleman aktivitesi düşer ve böylece ekstrakutanöz hastalıklar görülür. Bunlar arasında karın ağrısı, mide bulantısı, kusma ve ishali içeren gastrointestinal şikayetler; artralji ve artrit gibi muskuloskeletal şikayetler; genelde geçici ve göç eden el, el bileği, ayak, ayak bileği, dizi tutan eklem şikayetleri; proteinüri, hematüri, böbrek yetmezliği gibi böbrek şikayetleri; KOAH, hemoptizi (kanlı balgam) gibi akciğer ile ilgili şikayetler; episklerit, üveit veya konjonktivit gibi göz ile ilgili şikayetler görülmektedir.

Artmış ESR seviyeleri ve hipokomplementemi (kompleman seviyesi düşüklüğü) ÜV'de görülen en yaygın laboratuvar bulgularıdır. Kompleman profili azalmış C1, C2, C3, C4 ve CH50/100 seviyeleri ile klasik kompleman aktivasyon yolağının karakteristiğidir. C1q genelde C1r ve C1s seviyelerinden düşüktür. Dolaşımdaki immün kompleksler, otoantikörler ve anemi laboratuvar bulguları arasındadır (19,20)

Şekil 3'te kronik ürtiker, ürtikeryal vaskülit ve alt tiplerinin sıklıkları gösterilmiştir.



Şekil 3: Ürtikeryal Lezyonların Sıklıkları (19).

KÜ: kronik ürtikeryal lezyon (%60), KÜ (Otoant +): IgE veya IgE reseptörüne karşı otoantikor içeren kronik ürtiker (%30), ÜV: ürtikeryal vaskülit (%10), HUV: hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit, HUVS: hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit sendromu (< %5) (19).

2.2.1. Normokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit (NUV)

Normokomplementemik ürtikeryal vaskülitli hastalar ürtikeryal vaskülit ile uyumlu ve biyopsi ile doğrulanan cilt lezyonları gösterirler. Bununla birlikte, C1q ve C4 de dahil olmak üzere kompleman seviyeleri normaldir ve çok az deri dışı hastalık vardır. Bu hastalık antihistaminikler, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar, kolşisin veya glukokortikoid ile tedavi edilebilir (18).

2.2.2. Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit (HUV)

Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülitli hastalar tipik bir vaskülit deri döküntüsüne, düşük kompleman seviyelerine ve düşük C1q antikor seviyelerine sahiptir. Artrit veya artralji, karın ağrısı ve astım semptomları görülebilir. Sistemik lupus eritematozus (SLE) ile karıştırılabilir, ancak HUV'de antinükleer antikorların tespit edilme olasılığı daha düşüktür. 57 HUV'li hastada yapılan bir çalışmada anjiyoödem (%51), purpura (%35) ve livedo reticularis (%14) oranlarında görülmüştür. Ayrıca kas iskelet sistemi hastalığı (%82), oküler komplikasyonlar (%56), pulmoner (%19), gastrointestinal (%18) ve renal hastalıklar (%14) görülmüştür. Hastaların %55'inde saptanabilir C1q otoantikorları bulunmuştur. Hidroksiklorokin ya da kolşisin hastaların tedavisinde etkili olmuştur (21).

2.2.3. Hipokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit Sendromu (HUVS)

ÜV ile birlikte hipokomplementeminin varlığı Mayo Clinic'ten McDuffie tarafından ÜV'nin daha ciddi ve sistemik bir formu olarak sunulmuştur (22). McDuffie sendromu olarak da adlandırılan HUVS, SLE'ye benzeyen sistemik bulgular gösteren nadir görülen bir otoimmün hastalıktır (23).

HUVS için majör ve minör tanı kriterleri ilk olarak Schwartz tarafından tanımlanmıştır (24). HUVS için majör kriterler; 6 aydan uzun süren ürtiker ve hipokomplementemidir. Minör kriterler (en az ikisi tanı için gerekli olan) lökositoklastik vaskülit, artralji veya artrit, üveit veya episklerit (veya konjonktivit), hafif glomerülonefrit, tekrarlayan karın ağrısı veya pozitif C1q antikor testidir (23, 24). Diğer klinik bulgular anjiyoödem, obstrüktif akciğer hastalığı ve çeşitli nörolojik problemleri içerir (27).

Dışlama kriterleri, yüksek kriyoglobülinemi (kriyokrat, >%1), yüksek anti-DNA antikor seviyesi, yüksek antinükleer antikor (ANA), hepatit B virüsü antijenemi, düşük C1 esteraz inhibitör seviyesi ve kalıtsal kompleman eksikliğidir. Tipik olarak, HUVS'li hastalar çift sarmallı DNA (dsDNA) veya Sm antikorlarına sahip değildir; ancak, hastaların %50'sinin serumlarında ANA olabilir (23). Bazı ÜV'li hastalarda hipokomplementemi olabilir, ancak HUVS tanısı için gereklilikleri karşılamaz. Bu hastalara HUV tanısı konabilir (26).

2.2.3.1. İnsidans

Literatüre göre, HUVS'nin tam insidansı ve prevalansı bilinmemekle birlikte 200'den az vaka kaydedilmiştir. SLE hastalarının yaklaşık %7-8'inde HUVS gözlenirken; HUVS'li hastaların %54'üne SLE teşhisi konmuştur (28). HUVS başlıca genç kadınlarda görülür. HUVS'li olgular arasında kadın:erkek oranı 8:1'dir. Yaşamın 5. dekatında en yüksek insidansa sahiptir. Yayınlanan bir raporda, HUVS ve NUV hastaları için ortalama tanı yaşı sırasıyla 43 ve 51'dir (27,28). HUVS, çocuk popülasyonunda nadiren bildirilmektedir (31).

2.2.3.2. Patofizyoloji

ÜV, kütanöz vaskülite benzeyen immün kompleks bir hastalık olarak kabul edilir. Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonu ÜV patogeneğinde önemli rol oynar. İmmün komplekslerin ÜV'ye neden olup olmadığı veya immün komplekslerin vaskülitin bir

sonucu olarak üretilip üretilmediği araştırılmaktadır (32). ÜV ve hepatit B virüs enfeksiyonu olan hastaların damar duvarlarında hepatit B virüsü yüzey antijeni, IgM birikintileri ve dolaşımdaki hepatit B virüsü yüzey antijen-antikor immün kompleksleri bulunmuştur, immün komplekslerin ÜV patogeneğinde doğrudan rol oynadığı ileri sürülmüştür (33).

Pek çok ek kanıt, bağışıklık komplekslerinin doğrudan dahil olduğu sonucunu desteklemektedir. İmmün kompleksler, ÜV'li hastaların %30-75'inde dolaşımda bulunmuştur (32). İmmün reaktif maddelerin ve komplemanların damar duvarlarında birikmesi ve kompleman kaskadı aktivasyonu ÜV'de sık görülen bulgular iken yaygın ürtikerde böyle değildir. Bağışıklık komplekslerini dolaşımdan uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntem olan plazmaferez, ürtikeryal lezyonların hızlı ancak geçici olarak düzelmesini sağlar. Bu güçlü kanıt ayrıca bağışıklık komplekslerinin doğrudan ÜV'de etkili olduğu sonucunu da desteklemektedir (26).

Bu bağışıklık kompleksleri, otoantikörler yoluyla oluşturulur, ancak aynı zamanda ilaçlar ve enfeksiyonlar yoluyla dışsal olarak da indüklenebilir. Hepatit C ve hepatit B virüsleri, bu tür antikörlerin oluşumunu indükleyebilen enfeksiyöz ajanlar arasındadır. Her ne kadar kollajen benzeri C1q bölgesinin, enfeksiyonların ve ilaçların antikör indükleyicileri olduğu keşfedilse de, ÜV'li hastaların çoğunda immün komplekslerin antijeni bulunamamıştır (20).

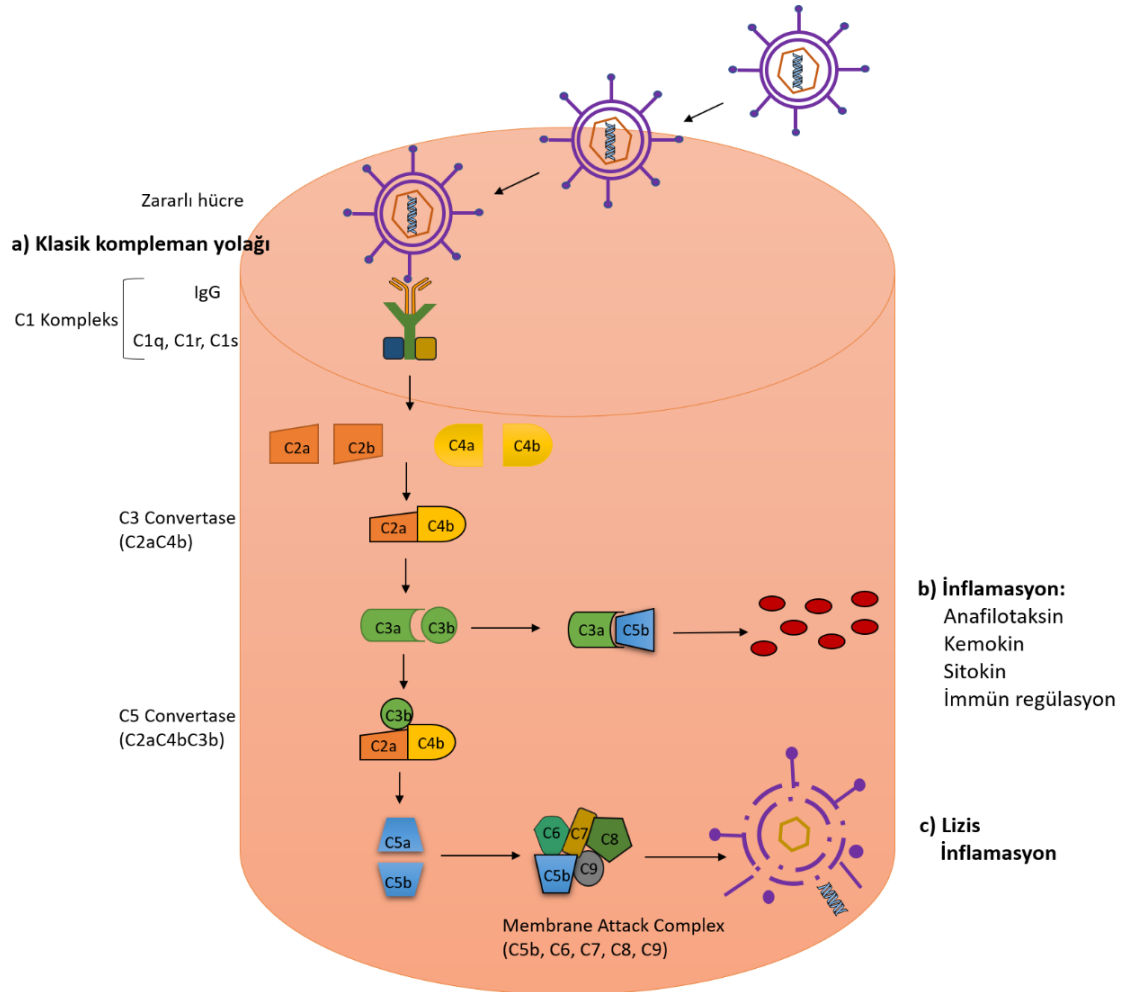
Kompleman sisteminin aktifleşmesi için klasik yolak, lektin yolağı ve alternatif yolak olmak üzere üç farklı yolak vardır. C1q, klasik yolda görevlidir. Kompleman sisteminin klasik yolla aktivasyonu Şekil 4'te verilmiştir.

C1q, ÜV'li hastaların serumunda bulunan otoantikörler için bağlayıcı bölge olan kollajen benzeri bir bölgeye sahiptir. Bu otoantikörler, C1q'nun Fc kısmına bağlanan, kompleman sistemini kan damarlarının içindeki ve etrafındaki klasik yolla aktive eden bağışıklık kompleksleri oluşturan IgG molekülleridir (30,41). Klasik kompleman yolu etkinleştirildikten sonra, C3a ve C5a üretilir. Bu anafilotoksinlerin ÜV ile birlikte görülen şok, lökopeni ve trombositopeniden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (36). Aktive olmuş kompleman ürünleri mast hücre degranülasyonunu ve yeni kemokin ve sitokinlerin oluşumunu indükler. Bu maddelerin oluşumu, damar geçirgenliğinin artmasına, nötrofillerin kemotaksisine ve bağışıklık komplekslerinin birikiminin artmasına neden olur. Nötrofiller iltihap bölgesine vardıklarında fagositik hale gelirler

ve doku yıkımını ve ödemi daha da şiddetlendiren proteolitik enzimler (örneğin kollajenaz ve elastaz gibi) salgırlar (32). Anti-C1q otoantikorlarının akciğer hastalığıyla da ilişkisi bulunmaktadır. Bu antikorların, bir C1q kollajen benzeri bağlama bölgesi içeren pulmoner sürfaktan apoprotein ile çapraz reaksiyona girdiği öne sürülmüştür. Alveoler yüzey gerilimini düzenleyen pulmoner sürfaktanların, ÜV'de pulmoner hastalığın oluşumunda rolü olduğu düşünülür (37).

İsminden de anlaşıldığı gibi HUVS'de düşük kompleman seviyeleri görülür. C3 ve C4 seviyeleri aktif hastalık sırasında bile tespit edilemeyecek seviyeden normal limitlere kadar değişiklik gösterebilir. Bütün HUVS hastaları ciddi anlamda azalmış C1q seviyelerine sahiptir, azalmış C3 ya da C4 seviyelerine sahip olmalarına rağmen C1q çökeltileri (IgG otoantikorları) bütün HUVS'li hastalarda tespit edilmelidir. Anti-C1q antikorları bir çok otoimmün hastalıkta bulunmasına rağmen HUVS ve SLE için spesifik markerlardır. Anti-C1q antikorları klasik kompleman yolağını sıvılardaki ve dokudaki C1 aktivasyonu ile tetikleyebilir. Bu antikorların HUVS'de görülen ÜV lezyonlarının patogenezindeki olası rollerini kanıtlamak için direkt kanıtlara ihtiyaç vardır.

HUVS'un genetik alt yapısı tam olarak bilinmemektedir. Literatürde HUVS ile ilişkilendirilmiş yalnızca DNASE1L3 geni bulunmaktadır (38).



Şekil 4: Kompleman sisteminin klasik yolla aktivasyonu

a) Klasik kompleman yolu, IgG'nin vücuda giren zararlı hücre ile antijen-antikor kompleksi oluşturmasıyla başlar. C1q, antijen-antikor kompleksi, β -amiloid, C reaktif protein (CRP), DNA ya da apoptotik hücrelere bağlanabilir. Bağlanmadan sonra yapıya C1r ve C1s moleküllerinin katılmasıyla C1 kompleksi oluşur. Bu kompleks C2 ve C4'ü parçalayarak C2a, C2b, C4a, C4b alt birimlerini oluşturur. C2a ve C4b alt birimleri bir araya gelerek C3 convertase (C2aC4b) kompleksini oluşturur. Bu kompleks, C3'ü C3a ve C3b alt birimlerine böler. C3b, C3 convertase kompleksine bağlanarak C5 convertase (C2aC4bC3b) kompleksini oluşturur. Bu kompleks C5'i C5a ve C5b alt birimlerine böler. C5b, C6, C7, C8, C9 molekülleri bir araya gelerek Membrane Attack Complex (MAC)'ı oluştururlar. Bu kompleks hücrenin direkt parçalanmasını sağlar (39). **b)** C3a ve C5b moleküllerinin bir araya gelmesiyle immün hücreler etkinleşir, endotelial ve epitelyal hücreler ve trombositler aktive olarak anafilotoksinler, kemokinler, sitokinlerin salınımı sağlanır. Böylece inflamasyon yanıtı oluşur (40).

HUVS ile ilişkili olarak dolaşımda C1q'nun azaldığı ve C1r ve C1s'nin normal seviyede olduğu gösterilmiştir. Hastaların dolaşımında düşük moleküler ağırlıklı C1q çöktelleri (7S) bulunur (41,42,43). Hasta dolaşımında bulunan azalmış C1q seviyelerine ek olarak, toplam hemolitik kompleman seviyeleri (CH50) ve C2 ve C4 faktörleri sıklıkla azalır (43).

Anti-C1q antikorları, C1q'nun kollajen benzeri kısmına bağlanan IgG molekülleridir. Anti-C1q antikorları HUVS (%100), Karışık bağ dokusu hastalığı (%94), Felty's sendromu (%76), Sistemik lupus eritematozus (%30-60) ve Romatoid artrit (%32) görülmektedir. Anti-C1q'nun vaskülit patogenezindeki rolü açık değildir (44).

HUVS'li hastalar klasik yolla kompleman aktivasyonuna bağlı olarak azalmış C1q, C2, C3 ve C4 seviyelerine sahiptir. Ayrıca immün kompleks oluşumu ve vasküler inflomasyonun patogenezi ile ilişkili olabilecek anti-C1q antikorları bulunur. Ancak bunların patogeneze katkısı kesinleşmemiştir. Bununla uyumlu olarak vaskülit ve glomerulonefritte bulunan immün çökeltiler C1q, C3 ve IgG içerir (45).

Anti-C1q antikorları ÜV'ye özgü değildir ve vasküler hastalık olmasa bile, SLE'li hastaların dolaşımında bulunur. Dolaşımdaki anti-C1q antikorlarına sahip olabilecek diğer hastalıklar arasında Goodpasture sendromu (46) ve idiyopatik membranoproliferatif glomerülonefrit (ÜV ile ilişkili değildir) bulunmaktadır (47). Kompleman C1q bileşenine karşı antikorlar genel olarak IgG antikorlarıdır ve genellikle hipokomplementemik hastalarda bulunur. Bu korelasyon, HUV ve SLE'nin benzer otoimmün süreçleri içerdiğine dair düşüncayı güçlendirir. C1q otoantikorlarının SLE ve ÜV patogenezindeki rolü belirsizliğini koruyor. Bu otoantikorlar pulmoner inflamasyonun patogenezinde önemli bir role sahiptir. Otoantikorlar bazen ÜV ile ilişkili böbrek hastalığında rol oynayabilir.

ÜV'li hastalarda elektron mikroskobu ile agregatlarda aktive olmuş trombositler gösterilmiştir. Bu durum trombositlerin ÜV patogenezinde bir aracı olarak olası bir rol oynadığını göstermektedir. Trombosit aktive edici faktörün etkisi intradermal enjeksiyon kullanılarak incelenmiştir. Bu yaklaşım ile endotel şişmesiyle birlikte nötrofiller ve mononükleer hücrelerden oluşan bir sızıntı ve enjeksiyondan 32 saat sonra damar yıkımı gösterildi (26). Ürtikeryal lezyonların varlığı nedeniyle mast hücrelerinin aktive olduğuna inanılmaktadır. Mast hücreleri potansiyel olarak TNF-a ve diğer güçlü inflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla sonuçlanan kompleman ile tetiklenebilir. TNF-a, endotel hücrelerinde E-selektinin ve mast hücrelerinde *intercellular adhesion molecule 1*'in (ICAM-1) ekspresyonunu artırabilir. Artan ICAM-1 seviyeleri eozinofillerin göçünde önemli olabilir (48). Bu senaryo, ÜV'de ürtikeryal lezyonun ilk 24 saati içinde görülen baskın nötrofilik infiltrat ile uyumludur (49).

2.2.3.3. Klinik Özellikler

HUVS'de ana semptomlar ateş, halsizlik, yorgunluk, miyalji (kas romatizması) dir. HUVS'de baskın klinik bulgu tekrarlayan ürtikerdir. Anjiyoödem hastaların %50'sinde görülür; sıklıkla dudak, dil, periorbital doku ve ellerde ortaya çıkar ve HUVS'nin ilk belirtisi olabileceği düşünülmektedir (50). HUVS hastalarında sıklıkla postinflamatuvar hiperpigmentasyon ile düzelebilen, 24 saatten uzun süre kalıcı, yaygınlaşmış kabarcıklar görülmektedir. ÜV postinflamatuvar hiperpigmentasyon veya purpura (mor deri döküntüsü) ile düzelirken, yaygın ürtiker kalıntı olmadan düzelir (26).

HUVS'de ÜV lezyonlarına lökositoklastik vaskülit (LCV) neden olur. ÜV lezyonları 48 saatten daha uzun süre kalıcıdır. Yaygın ürtikerde lezyonların 8 ile 24 saat içinde düzeldiği görülürken, ÜV'de genellikle 24 ile 72 saat arasında düzelme görülür. ÜV lezyonlarının dizestezi (duyu uyarılarını algılama bozukluğu) ve yaygın ürtiker ile daha çok ilişkili olan pruriteye (şiddetli kaşıntı) yol açtığı tespit edilmiştir (51). ÜV lezyonları, herhangi bir yerde ortaya çıkma eğilimindedir ve palpe edilebilir purpurada olduğu gibi alt ekstremiteleri etkileyen yaygın ürtikerden farklı olarak, gövdede ve daha fazla merkezci olma eğilimindedir.

HUV'nin kabarmaları (HUVS'nin aksine), öncelikle yüz, üst ekstremiteler ve gövdeyi etkiler. Ayrıca avuç içi ve tabanlar üzerinde de bulunabilirler. Her şiddetlenmede 2 ile 4 gün süren ürtikeryal lezyonlar daha sonra iz bırakmadan kaybolurlar (28). Vaskülit daha derin damarlar içerdiğinde anjiyoödem görülebilir. İmmünohistokimya, damar duvarlarında veya endotelde immünoglobulin ve kompleman birikintilerini gösterir. Bu tür birikintiler SLE'de vaskülit ile birlikte ortaya çıkar, ancak SLE hastalarında tipik olarak bazal membran boyunca bulunurlar (23).

HUVS'yi SLE'den ayırt eden özellik, kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) SLE'nin yaygın bir tezahürü olmasıdır.

Artralji (eklem ağrısı) ve çeşitli eklemlerin artriti (iltihap), HUVS'nin en sık görülen sistemik belirtileridir ve vakaların %50'sinde görülür. Eklem ağrısı dolaşır ve genellikle geçicidir. Tipik olarak dirsekler, bilekler, dizler ve ayak bilekleri tutulur. Jaccoud artropatisini içeren eklem deformiteleri olabilir; bu durumda aort ve mitral valvülopati gibi kalp kapakçığı da etkilenir (52).

Renal tutulum genellikle hafiftir, ancak bazen diyaliz gerekli olabilir (53). Sıkça bulunan proteinüri ve hematüri, akantosit ile histolojik olarak membranöz,

membranoproliferatif veya intra- ve ekstrakapiller glomerülonefrit olarak görülür. Bununla birlikte, renal biyopsi sadece proteinüri ($> 1\text{g} / \text{gün}$), akut veya kronik progresif böbrek yetmezliğinde gereklidir. Böbrek tutulumu çocuklarda daha şiddetli görülmektedir (25).

HUVS'nin böbrek değişikliklerinin paterni görünüşte SLE nefropatisinden ayırt edilemez. Klinik olarak saptanabilen glomerülonefrit, SLE'li hastaların üçte birinden fazlasında görülür ve otopside %75'inde nefrit kanıtı bulunur (23). SLE ve glomerülonefrit hastalarının yaklaşık %30'u, glomerüler bazal membrandaki önceden var olan ds-DNA ve anti-dsDNA immün komplekslerine cevap olarak C1q çökeltilere sahiptir (30). Yine de, HUVS vakalarının %50'sinde, çoğunluğu iyi huylu bir şekilde tezahür eden böbrek tutulumu vardır (31).

Akciğer tutulumu dispne (nefes darlığı), öksürük, hemoptizi, plevral efüzyon ve KOAH'ı içerir. KOAH, HUVS hastalarının %50'sinde ortaya çıkmaktadır. Görünüşe göre HUVS'de C1q presipitanların prevalansı yüzde 80 ile 100 arasındadır ve bunun obstrüktif akciğer hastalığı ile ilişkisi olabilir (23). Amfizem, HUVS'li hastaların yarısından fazlasında ortaya çıkmıştır. Sigara içmek amfizem gelişimini belirgin şekilde hızlandırırsa da, sigara içmeyenlerde de HUVS ile ilişkili amfizem oluşabilir (24). HUVS ile ilişkili amfizem erken başlar (genellikle 30 yaş) ve ÜV tanısı konulduktan sonraki iki yıl içerisinde klinik olarak anlamlı olabilir (54). KOAH, HUVS'de progresiftir ve hastalığın en sık ölüm nedenidir (25).

HUVS'li hastaların yaklaşık %30'unda ağrı, bulantı, kusma, ishal, serozit ile ilgili olarak asit, hepatomegali ve splenomegali gibi gastrointestinal semptomlar görülür (25).

Hastaların yüzde 30'unun oküler iltihabı, özellikle de uveal sistemin yanı sıra konjonktivit ve episklerit de vardır (20,21).

Kardiyak tutulum, kapak anomalileri (eklem deformitelerinin varlığında bulunur) ve konjestif kalp yetmezliği şeklinde ortaya çıkar (52).

Santral sinir sistemi nadiren etkilense de, nörolojik bulgular nöbet bozukluğu, mononeurit, kranyal sinir felçleri, aksonal nöropati, aseptik menenjit, psödotümör serebri, transvers miyelit ve periferik nöropatidir (24,53,57).

HUVS ayrıca, özellikle Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomalar gibi malignitelerle de ilişkilendirilebilir. Uzun süreli B lenfosit stimülasyonuna neden olabilir, bu nedenle lenfomaya dönüşebilir, ancak bu mekanizma hala tam olarak açıklanamamıştır (56).

Eğer böbrek tutulumundan şüpheleniliyorsa, mikroskopi ile idrar tahlili, protein miktar belirtmesi ve mümkünse protein analizi yapılmalıdır. Nefritik bir sendrom bulunursa böbrek biyopsisi düşünülmelidir (25).

2.2.3.4. Teşhis

ÜV tanısı, lökositoklastik reaksiyon, damar duvarı yıkımı ve fibrinojen birikimini içeren dermal biyopsi örneklerinde LCV'nin gösterilmesi ile konur. İmmünohistokimyasal analiz ile, kan damarlarında immün kompleksler ve kompleman gösterilir (23,40).

HUVS tanısı ile ilgili olarak, 1982 yılında (24) HUVS için tanı ölçütleri oluşturulmuştur. HUVS tanısı için 2 majör kriter ve en az 2 minör kriter gereklidir. HUVS ile ilişkili diğer klinik bulgular arasında obstrüktif akciğer hastalığı, anjiyoödem ve transvers miyelit ve Normokomplementemik Ürtikeryal Vaskülit periferik nöropatisi dahil olmak üzere çeşitli nörolojik problemler bulunmaktadır (25,52).

Majör Kriterler:

- Kronik ürtiker eksantemi
- Hipokomplementemi

Minör Kriterler:

- Lökositoklastik vaskülit
- Artralji ve artrit
- Üveit veya episklerit (veya konjonktivit)
- Glomerülonefrit
- Karın ağrısı
- Pozitif C1q antikoru

Dışlama kriterleri, yüksek kriyoglobulinemi (kriyokrit,>%1), anti-dsDNA veya Sm antikorlarının yüksek titresi, hepatit B virüsü antijenemi, C1 esteraz seviyeleri veya

konjenital kompleman defekti eksikliği ve yüksek ANA titresidir; bununla birlikte, hastaların %50'sinin serumlarında ANA olabilir (29,53).

2.2.3.5. Ayırıcı Tanı

Akut ve kronik ürtikeri ayırt etmek, olası bir ÜV vakası başvurduğunda ilk adımdır. Akuajenik, androjenik, basınç, soğuk kaynaklı ve kolinerjik dahil çeşitli ürtiker türleri mevcuttur. Bu ürtikerlerin birçoğu ÜV ile de ilişkilendirilmiştir. Klinik farklılık tanımlandıktan sonra, başka birkaç sendrom da keşfedilebilir.

HUVS; SLE, Muckle-Wells sendromu, Cogan sendromu, Schnitzler sendromu, AHA sendromu ile karıştırılabilmektedir.

Muckle-Wells sendromu, kriyopirin proteininin kodlamasından sorumlu olan 1q44 kromozomundaki genetik mutasyondan kaynaklanır. Bu sendrom, progresif işitme kaybı ve böbrek tutulumu içerebilen sekonder amiloidoz ile HUVS'den klinik olarak ayırt edilir.

Cogan sendromunda, iç kulak ve göz dokusu ile reaksiyona giren, işitme kaybına ve görme bozukluklarına neden olan rheovirüs-III enfeksiyonuna karşı antikor oluşur.

Schnitzler sendromu, artralji ve ateşin yanı sıra ÜV ve monoklonal IgM gamopati ile birlikte ortaya çıkan bir hastalıktır.

AHA sendromu az anlaşılmış bir hastalıktır; ancak, C1 esterase inhibitörünün normal fonksiyonu ile HUVS'den ayırt edilebilir.

HUVS'yi SLE'den ayırt etmek çok zordur. HUVS'nin nadir bir hastalık mı yoksa SLE'nin bir alt tipi mi olduğu konusundaki tartışmalar hala devam etmektedir. Bazı çalışmalar, HUVS bulgularının SLE'nin atipik bir versiyonu olduğunu ve çoğu durumda klasik seroloji eksikliği göz önüne alındığında HUVS'nin ayrı bir hastalık olarak kabul edileceğini belirtmektedir. Ayrıca, farklı cilt lezyonları ve patolojik durumlar görülmektedir. C1q antikorları, SLE vakalarının %30'unda pozitif olabilir. Bununla birlikte, çift sarmallı DNA antikorları yüksek titrelerde mevcutsa, bu iki hastalığı ayırt etmek için gerekli olan tek ayırt edici faktör olabilir. Bazı yazarlar HUVS'nin SLE'ye olası gelişimini vurgularken, diğerleri HUVS'nin SLE'nin öncüsü olduğunu belirtiyor. Bir çalışmada SLE ve HUVS'nin klinik ve laboratuvar özelliklerini paylaştığı, klinik ilerleme ve tedavisinin benzer olduğu, muhtemelen aynı otoimmün

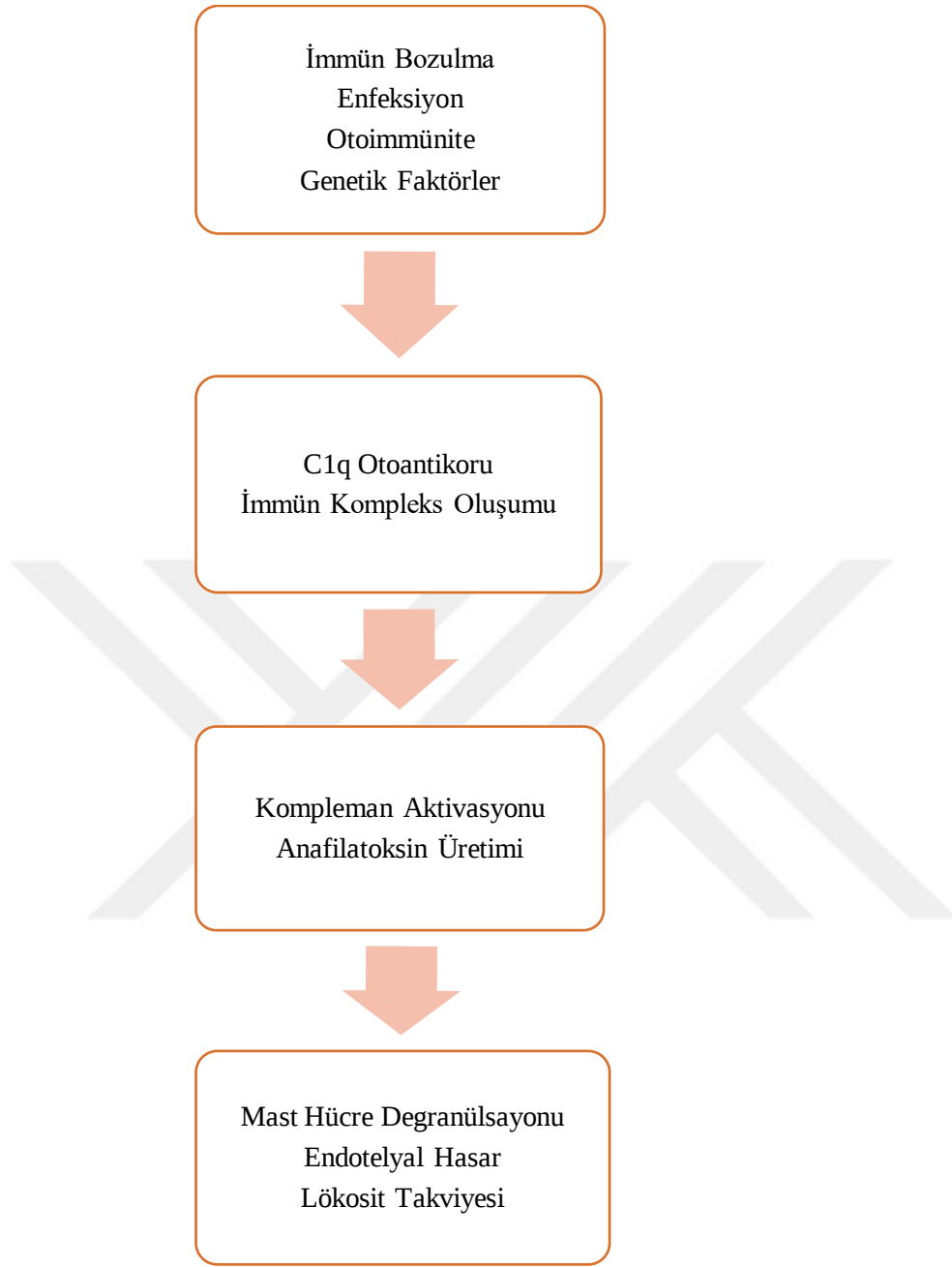
hastalık spektrumuna düştüğü sonucuna varılmıştır. HUVS'nin klinik ve immünolojik olarak SLE'ye benzer olduğu ve SLE ile ilişkili bir sendrom olabileceği iddia edilmektedir (28).

2.2.3.6. Tedavi

HUVS için spesifik bir tedavi yoktur, ancak birçok tedaviye teşebbüs edilmiş olmasına rağmen, etkili bir terapötik yaklaşıma ilişkin bir fikir birliği yoktur. Antihistaminikler geçici bir rahatlama sağlayabilir, ancak hastalık ilerledikçe antihistaminiklerin etkisiz olduğu düşünülmektedir. Eklem ağrısının semptomatik rahatlama için steroid olmayan anti-inflamatuar ajanlar etkili olabilir (51). Bu tür hastalıklara özgü tedavileri ve ayrıca yoğun immünosüpresyon durumlarını gerektirebilecek, akciğerleri (yani, KOAH) veya diğer organları hayati tehlike içine sokacak durumlar oluşabilir. Bu nedenle, HUVS'deki tedavi kararları hastanın klinik durumuna göre kişiselleştirilmelidir (28).

Bazı HUVS vakaları, düşük doz prednizon, hidroksiklorokin, dapson veya diğer immünomodülatör ajanlar gibi SLE tedavisinde yaygın olarak kullanılan tedavilere cevap verir. Ciddi HUVS vakaları, özellikle glomerülonefrit veya diğer ciddi organ tutulum formlarına sahip olanlar, yüksek dozlarda glukokortikoid ve sitotoksik ajan gerektirebilir. Tercih edilen sitotoksik ajanlar aşağıdakileri içerir: tek başına veya prednizolon ile kombine halde siklofosfamid, siklosporin A, azatiyoprin, mikofenolat mofetil ve metotraksat uzun süre kullanılırsa hastalığı kontrol eder. Lezyonların tedavisi güç ise diğer tedavi seçenekleri, kolşisin ve rituksimab düşünülebilir (28). Plazmaferez ve intravenöz immünoglobulin (IVIG), böbrek fonksiyonlarında hızlı bozulma veya kresantik glomerülonefrit vakalarında özellikle dikkate alınması gereken değerli alternatifler olarak önerilmiştir (31).

Şekil 5'de Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit gelişim mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 5: Hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit gelişimi (18)

2.3. METALLOKARBOKSİPEPTİDAZLAR

Karboksipeptidazlar (CPs) , çeşitli organizmalarda birçok önemli fonksiyona sahiptir. Gıdaların sindiriminden nöroendokrin peptidlerin seçici biyosentezine kadar değişen fonksiyonlara sahip insan metalokarboksipeptidaz gen ailesinin bilinen 14 üyesi vardır. Bakterilerden ve bitkilerden elde edilenler de dahil olmak üzere bütün metalokarboksipeptidazlar, genel domain yapısının yanı sıra amino asit sekansı benzerlikleri dikkate alınarak iki alt aileye ayrılabilir. Sindirim enzimleri CPA1, CPA2 ve CPB1'i içeren grup A/B alt ailesi olarak adlandırılmıştır. A/B alt ailesinin tüm üyeleri, aktif CP domaininin katlanmasına yardımcı olmak için bir şaperon görevi gören 90 amino asit uzunluğunda bir N-terminal pro bölgesi içerir.

Metalokarboksipeptidazların diğer alt ailesi CPN, CPE, CPM, CPD proteinlerini içerir ve bu grup N/E alt ailesi olarak adlandırılır. Bu alt aileye düzenleyici CP'ler denir. A/B alt ailesi üyelerinin aksine, N/E alt ailesinin tüm üyeleri aktif CP domainine ve sinyal peptidine ek olarak birkaç domain daha içerir. Ayrıca, N/E alt ailesinin üyeleri, enzim inhibitörleri olarak işlev gören pro-domainlerden yoksundur; CPM, CPN ve CPD bu bölgeden tamamen yoksundur, oysa CPE bilinmeyen bir işlevi olan kısa bir pro-domaini içerir. N/E alt ailesinin üyeleri, protein-protein ve/veya protein-zar etkileşimlerinde işlev gördüğü düşünülen ve proteini salgı yolu içindeki veya hücre dışındaki belirli bölümlere hedefleyen domainler içerir (57).

2.3.1. Sitozolik Karboksipeptidazlar

Mikrotubuller (MT'ler), α/β -tubulin heterodimerlerinden oluşan dinamik, polarize polimerlerdir ve hücre iskeletinin en büyük filamentlerini oluştururlar. MT'ler ökaryotik hücrelerde hücre şekli ve hareketliliği, hücre içi organizasyon ve taşıma gibi çeşitli hücre yapılarına ve fonksiyonlarına katılır. Dahası, MT'ler, kompleks organelerin, siliaların ve flagellaların bel kemikleri olan aksonomların kilit yapılarıdır.

Sitozolik karboksipeptidazlar (CCP1-CCP6), özellikle tubulin gibi poliglutamile edilmiş proteinlerin deglutamilasyonundan sorumludur. Poliglutamat zincirlerinin oluşumu, tubulin tirozin ligaz benzeri (TTLL) enzim ailesi tarafından katalizlenir. Buna karşılık, CCP'ler poliglutamat zincirlerinin bozulmasından ve glutamat rezidülerinin uzaklaştırılmasından sorumludur (58).

Şimdiye kadar, M14 metalokarboksipeptidazların bir alt ailesi olan sitozolik karboksipeptidazlar (CCP'ler) ailesinde sadece deglutamilazlar tanımlanmıştır. Daha

önce yapılan çalışmalarda CCP1, CCP4 ve CCP6'nın deglutamilasyon aktivitesi gösterilirken, CCP2 ve CCP3 (AGBL3)'ün deglutamilasyon aktivitesi göstermemiştir. Bunun sebebi olarak bu proteinlerin hücre hatlarında ifade edilmesinin zorluğu olabilir. Bu sorunun üstesinden gelmek için yapılan bir çalışmada CCP2 ve AGBL3'ün insan izoformunu kullanmışlardır. Yapılan deneyler sonucunda CCP2 ve AGBL3'ün mikrotübül düzeyinde uzun Glutamat zincirlerini hidrolize edebildiği (deglutamilasyon) ve $\Delta 2$ -tubulin üretebildiği gösterilmiştir.

AGBL3 Glutamat'ın yanı sıra C-terminaldeki Aspartat rezidülerini de hidrolize (deaspartilasyon) edebilir. AGBL3 Glutamat ve Aspartat uzaklaştırmasını eşit verimlilikle katalize eder. Oysa CCP ailesindeki diğer enzimler Aspartat uzaklaştırması için zayıf aktivite gösterirler. AGBL3 dışında diğer CCPler bu reaksiyonu etkin bir şekilde katalize etmek için özel kofaktörler veya düzenleyiciler gerektirebilir.

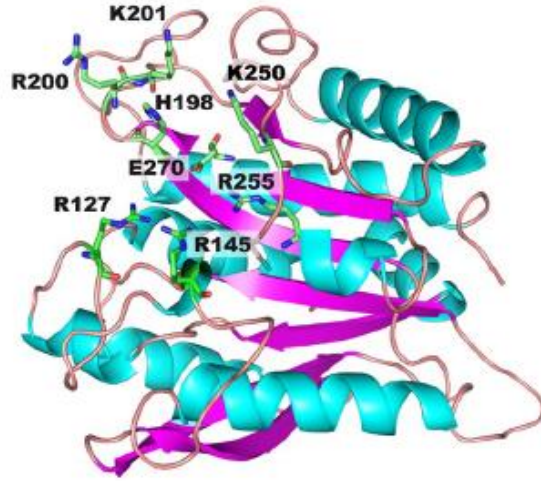
CCP2 ve AGBL3 silli dokularda; testis, trake ve akciğerde ifade edilir. AGBL3, retina ve adipoz dokuda nispeten daha kuvvetli bir şekilde ifade edilir. CCP2/3, CCP1 ile kıyaslandığında organlarda nispeten daha düşük ifade edilir. CCP1'in bu yüksek ifadesi, deglutamilasyon reaksiyonlarının büyük bir kısmını katalize ettiğini göstermektedir.

Agbl2/3 *double knockout* (KO) farelerde belirgin fenotipik değişiklik bulunmaz. *Yabanıl tip* (WT) farelere kıyasla KO farelerin testislerinde ve spermalarında tubulin poliglutamilasyonu arttığı gözlenmiştir. Testis ve sperm dışında başka hiçbir organda tubulin poliglutamilasyon seviyelerinde tespit edilebilir değişiklikler olmamıştır. CCP2/3'ün spermda *Myosin light-chain kinase 1* (MLCK1)'in deglutamilasyonuna tamamlayıcı olarak dahil olduğu, ancak diğer enzimlerin (CCPlerin) yetişkin farelerde bu iki enzimin yokluğunu telafi edebileceği ileri sürülmüştür. Bazı organlarda CCP2, AGBL3 veya her ikisinin de MLCK1'in deglutamilasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Aynı çalışmada CCP'ler farklı bakteri proteinlerinden yararlanarak modellenmiştir. Bu modellerde 255.pozisyonadaki Arjinin (S1' altbiriminde bulunan) CCP'lerin substrat tercihlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Metallokarboksipeptidazlarda 255. pozisyonadaki rezidü direkt olarak substratın C-terminal yan zincirine bağlanır. Bu pozisyonda bazik amino asit olmasının CCP2 ve

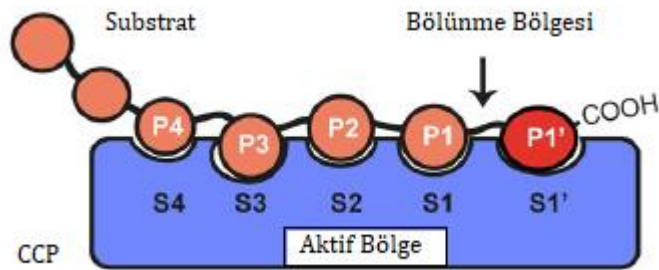
AGBL3'ün asidik amino asitleri tercih etmesine neden olduğu ileri sürülmüştür. Şekil 6'da AGBL3'ünün yapısal modellemesi gösterilmiştir.

Şekil 7'de ise karboksipeptidazların aktif bölgesine bağlanan substratın bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. P1' altbirimi substratın parçalanacak olan C-terminal substrat kalıntısıdır (59).



Şekil 6: CCP3'ün yapısal modellemesi (59)

R255: 255.pozisyonundaki korunmuş Arjinin



Şekil 7: CCP'lerin aktif bölgesindeki substrat bağlanma kısmı (59)

Substrat rezidüleri: P4-P3-P2-P1-P1'; CCP karşılığı: S4-S3-S2-S1-S1'; P1': parçalanacak olan C-terminal substrat kalıntısı

293T insan embriyonik böbrek hücre hattında CCP1'in aşırı eksprese edilmesi veya *knockout* edilmesi hücre içi peptidlerin seviyesini değiştirmemiş, ancak $\Delta 2$ -tubulin

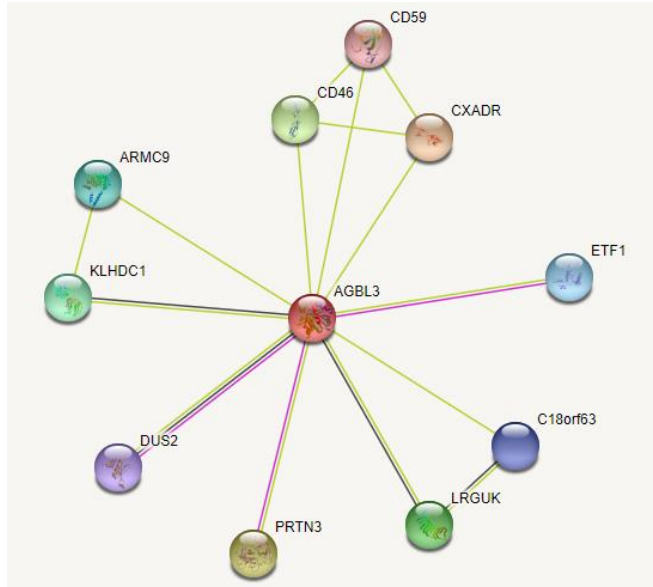
seviyelerini 5 kattan fazla değiştirmiştir. CCP1'in birincil işlevinin peptid degradasyonu değil tubulin işlenmesi olduğu ileri sürülmüştür. Saflaştırılmış CCP1, domuz beyni α -tubulini veya polimerize HEK293T hücrelerinin mikrotübüllerinde $\Delta 2$ -tubulin üretir. Ayrıca CCP'in domuz beynindeki α - ve β -tubulin poliglutamil yan zincirlerinden Glutamat rezidülerini çıkardığı ve α -tubulinin C-terminalinden 2 tane Glutamat çıkarıldığı $\Delta 3$ -tubulin formunu oluşturduğu gösterilmiştir.

Zebra balığında ccp genleri tanımlanmıştır. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile (qPCR) yapılan analizde ccp1, ccp2, ccp5 ve ccp6 mRNA'ları fertilizasyondan sonra 5-8 gün aralığında en yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. ccp1, ccp2 ve ccp5 mRNA'ları ağırlıklı olarak beyin, koku alma plakodları ve pronefrik kanallar gibi dokularda ifade edildi. Zebra balığında ccp1 ve ccp5 mRNA'larının morfolino oligonükleotid aracılı olarak *knockdown* edilmesi ventral vücut eğriliği ve hidrocefali fenotipi ile sonuçlanmıştır. Morfant zebra balığının konfokal mikroskobu görüntüsünde koku alma plakodlarda bozuk morfoloji ve pronefrik kanallarsa artmış poliglutamilasyon saptandı. Bu veriler CCP1 ve CCP5'in gelişimsel süreçlerde özellikle siliaların gelişimi ve işleyişinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Bu benzer sonuçlar her CCP'nin mikrotübül modifikasyonlarında ve siliyer fonksiyonda bir görevi olabileceğini ve diğer CCP'lerin bir diğer CCP kaybını telafi edemediğini göstermektedir (60).

2.3.1.1. Sitozolik Karboksipeptidaz 3 (CCP3/AGBL3)

Yapısal modelleme ve enzimatik analizler CCP2 ve AGLB3'ün asidik amino asitleri spesifik olarak hidrolize eden karboksipeptidazlar olduğunu göstermiştir. CCP2 ve AGLB3 post-translasyonel protein düzenlemesinde önemli bir fonksiyonel rolü olduğunu ileri sürülmüştür.

AGLB3'ün deglutamilasyon ve deaspartilasyon aktivitesi gösterdiği kanıtlanmıştır. AGLB3'ün testis, trake, akciğer, retina, adipoz dokuda yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (59). AGLB3 proteinin ilişkili olduğu diğer proteinler String programından yararlanarak şekil 8'de gösterilmiştir.

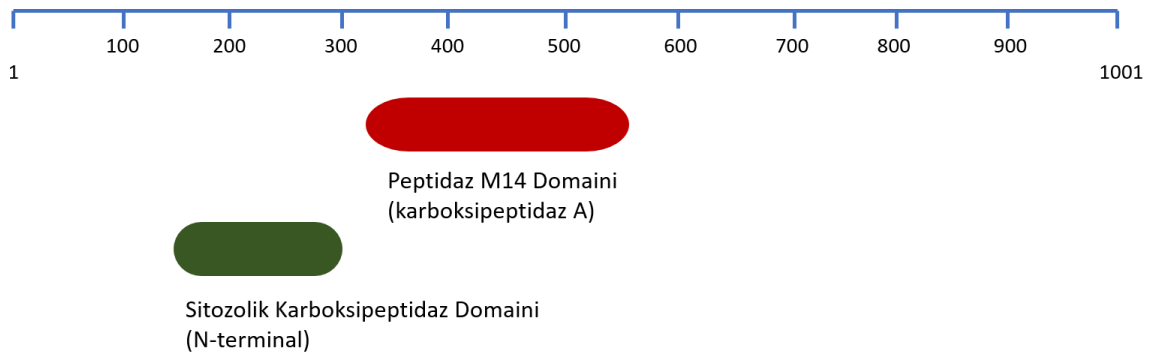


Şekil 8: AGBL3 proteini ve ilişkili olduğu proteinler

*(String-db database version 11.0'dan alınmıştır)

AGBL3 proteini, 1001 amino asitten ve iki fonksiyonel domainden oluşmaktadır. Diğer karboksipeptidazlarda bulunmayan sitozolik karboksipeptidaz domaini CCP'lere özgüdür. Bu domain katlanmaya katkıda bulunabilir, düzenleyici bir etkisi olabilir ve/veya diğer proteinlere bağlanabilir. Metallokarboksipeptidazlar M14 peptidaz domaini ile polipeptid zincirlerinin C-terminal ucundan tek amino asit hidrolize eden ve C-terminal karboksil grubu için tanıma bölgesi olan (spesifitenin belirleyicisi) *zinc-binding* karboksipeptidazlardır. Bu bölgeler Şekil 9'da gösterilmiştir.

AGBL3 geninde tanımlanmış varyantlar Tablo 2'de gösterilmiştir.



Şekil 9: AGBL3 proteini domainleri

Sitosolik karboksipeptidaz domaini 171-297.amino asitler arasındır. Peptidaz M14 domaini 322-540.amino asitler arasındır. *ebi database'inden yararlanılmıştır

Tablo 2: AGL3 geni tanımlanmış varyasyonlar (GRCh38 referans alınmıştır)

Nükleotid	Genomik lokasyon	Amino asit değişikliği	Durum
NC_000007.14:g.135032897T>C	7: 135032897	Sessiz mutasyon	Olası benign
NC_000007.13:g.134718954C>T	7: 135034203	Sessiz mutasyon	Benign
NC_000007.13:g.134730252C>T	7: 135045501	Yanlış anlamli mutasyon	Benign
NC_000007.13:g.134764969G>A	7: 135080217	Sessiz mutasyon	Benign
NC_000007.13:g.134819584C>A	7: 135134832	Belirtilmemiş	Benign
NC_000007.13:g.134819601C>T	7: 135134849	Yanlış anlamli mutasyon	Olası benign

*(ClinVar'dan alınmıştır) NM_178563.4

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kitler ve Kullanılan Kimyasallar

Genomik DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen)

Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher)

Taq DNA Polimeraz PZR Buffer 10X (Thermo Fisher)

Platinum Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher)

dNTP (Thermo Fisher)

MgCl₂ (Thermo Fisher)

Integrated DNA Technologies Primer (Sentebiolab)

DNAsize Marker (Gene Ruler)

Agaroz (Thermo Fisher)

DNA Jel Loading Dye 6X (Thermo Fisher)

Etidyum Bromür (Thermo Fisher)

EDTA'lı tüp

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Buz Makinası (Cornelius)

Buz dolabı -80 °C (Thermo Scientific)

Buzdolabı +4 °C / -20 °C (Beko)

Distile Su Cihazı (Milipore)

Spektrofotometre (Nanodrop - Thermo Fischer Scientific)

Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)

Otoklav

Pipet Seti (Gilson)

Vorteks (Stuart)

CCD Kameralı Jel Görüntüleme Sistemi (UVP)

Sıcak Blok (Techne)

Yatay elektroforez tankı

Soğutmalı Santrifüj (Rotanta460r)

Microfuge Soğutmalı Mikrosantrifüj

Çeker Ocak

Gel Elektroforez Midi 14cm*16cm

Güç Kaynağı, 1000 V

Hassas Terazî

Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı

PCR Cihazı Eppendorf

Su Banyosu (Memert)

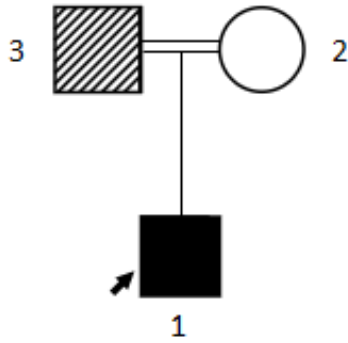
Elektroforez Tankı (Biorad)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hasta Örnekleri

Bu çalışma için gerekli hasta örnekleri İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim dalı tarafından sağlanmıştır. Çalışmada gerekli olan etik kurul onayı İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan (05.08.2019, No.: 903) alınmıştır. Hastalara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak 5 ml periferik kanları alınmıştır. Taranan hastalar DNASE1L3 genindeki mutasyonlar açısından negatiftir.

Şekil 10'da görülen aile bireylerinde ve ayrıca iki pediatrik hastada mutasyona analizi yapılmıştır. Şekil 10'da görülen hasta erkek çocukta hastalık başlangıç yaşı 13'tür. 55 yaşındaki babada Mukokutanöz Behçet bulunmaktadır. 48 yaşında olan anne sağlıklıdır.



Şekil 10: Aile Ağacı

3.2.2. Kandan DNA İzolasyonu

Total DNA izolasyonu için DNA izolasyon kiti protokolüne göre yapılmıştır.

1) 10 ml'li EDTA'lı tüpte bulunan kandan 200 ul alınarak üzerine 20 ul Proteinaz K konuldu.

2) 8 dakika 55 C'de bekletildikten sonra üzerine 20 ul RNAz A konularak vortekslendi ve 2 dakika inkübe edildi.

3) Üzerine 200 ul *Genomic Lysis/Binding Buffer* eklenerek vortekslendi ve 55 C'de 10 dakika inkübe edildi.

4) 200 ul %96-100 etanol eklenerek vortekslendi. Hazırlanan lizat spin kolonuna alındı ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılarak temizi ile değiştirildi.

5) 500 ul *Wash Buffer 1* eklendi ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılarak temizi ile değiştirildi.

6) 500 ul *Wash Buffer 2* eklendi ve maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. Spin kolonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.

7) Filtrenin üzerine 30 ul *Genomic elution buffer* eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.

8) Kolon maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen DNA örnekleri +4 °C'de saklandı.

3.2.3. Primer Tasarlanması

AGBL3 geninin ekzon bölgelerinden 15 tanesi (tasarlanan bütün bölgeler dizilendi) için *NCBI primer designing tool* kullanılarak *Forward* ve *Reverse* yönlü primerler tasarlanmıştır.

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

Tablo 3: Primer Dizileri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi
AGBL3 2.ekzon forward	5' GTCTTATTGTGGTTGTTGTCTCGT 3'
AGBL3 2.ekzon reverse	3' GCATAGTGTTCCCAGTGATAGC 5'
AGBL3 3.ekzon forward	5' TTGGGTGCATTGAGACCAGT 3'
AGBL3 3.ekzon reverse	3' GGCTTACCTAAAACAAACCTGAAA 5'
AGBL3 4.ekzon forward	5' GGAGTTGGTATTTTCTTCTTCCCA 3'
AGBL3 4.ekzon reverse	3' GTCTGAATCCCCCAAACCTGCT 5'
AGBL3 5.ekzon forward	5' ACCCCACACAAAACACTACA 3'
AGBL3 5.ekzon reverse	3' ACTGGCTCTAAATCAACACTTGA 5'
AGBL3 6.ekzon forward	5' CGAACACCTTTGAAGCAGCC 3'
AGBL3 6.ekzon reverse	3' TACTCCCCTCCTCCACAACAA 5'
AGBL3 7.ekzon 1.bölge forward	5' GCAGTTTCTCATCCAATAAAAGGG 3'
AGBL3 7.ekzon 1.bölge reverse	3' AGGTATTCTTGCAGGTTGGTGT 5'
AGBL3 7.ekzon 2.bölge forward	5' TAGGAACAACCCAGGCCAAG 3'

AGBL3 7.ekzon 2.bölge reverse	3' TGAATGAGATTGTGGGAGCAA 5'
AGBL3 8.ekzon forward	5' GGGCAAAGGCAAGAGTGAAA 3'
AGBL3 8.ekzon reverse	3' TCTGCTATCTCACATGGGCAA 5'
AGBL3 9.ekzon forward	5' CACAGGTCAGGAAATAAAAAGTAGC 3'
AGBL3 9.ekzon reverse	3' TCCCCTTAAAAACAACAAGCATT 5'
AGBL3 10.ekzon forward	5' GATGGTGGAAAAGGAACAAGGG 3'
AGBL3 10.ekzon reverse	3' AAGTGCTAAAACCCCAACAACA 5'
AGBL3 11.ekzon forward	5' GTTGTGGGGTTTGTAGCACTT 3'
AGBL3 11.ekzon reverse	3' CCACCACTTACAGTTGGGATT 5'
AGBL3 12.ekzon forward	5' TTAAGATGCCACCAAAACACTG 3'
AGBL3 12.ekzon reverse	3' AGGCTACCACCTCTGTCACTA 5'
AGBL3 13.ekzon forward	5' CATGTCTGCATATGTACTCTTTGAT 3'
AGBL3 13.ekzon reverse	3' GCCCACCTCTCATCTGTCAA 5'
AGBL3 14.ekzon forward	5' AAGCCCCCTTTACTGCCAAAA 3'
AGBL3 14.ekzon reverse	3' CACTGCGCTTGGATTGTTGT 5'
AGBL3 15.ekzon forward	5' AATATGAAATGTAAATGGGCGAGTT 3'
AGBL3 15.ekzon reverse	5' ACTGTTTCCCCTGTGTATTCT 3'
AGBL3 16.ekzon forward	5' CCCTGAAACCTGCTCGATTAC 3'
AGBL3 16.ekzon reverse	3' GCCAAATGTGATGGAGCTGAC 5'
AGBL3 17.ekzon forward	5' GGCTGAGGTTAGAGTAGGTATCC 3'
AGBL3 17.ekzon reverse	3' AAGGGGAGAGATAGGGAAAGGG 5'

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR kullanılarak istenen bölgeler, tasarlanan primerler yardımıyla çoğaltıldı. Dizilemeye gidecek örnekler için total hacim 40 ul olarak belirlendi. PZR malzemeleri ve koşulları Tablo 4, 5, 6 ve 7’de gösterilmiştir.

Tablo 4: PZR karışımı (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Ekzon bölgelerinin amplifikasyonu için)

Malzeme	Miktar
10X Buffer	4 ul
MgCl ₂	2,4 ul
dNTP	3,2 ul
Forward Primer	1,6 ul
Reverse Primer	1,6 ul
Taq DNA Polimeraz	0,24 ul
dH ₂ O	25,96 ul
DNA	1 ul

Tablo 5: PZR koşulları (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Ekzon bölgelerinin amplifikasyonu için)

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	37
Amplifikasyon	Değişken	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	

	72 °C	5 dakika	1
Soğuma	4 °C		-

Tablo 6: PZR karışımı (8. Ekzon için)

Malzeme	Miktar
10X Platinum Buffer	4 ul
MgSO ₄	2,4 ul
dNTP	3,2 ul
Forward Primer	1,6 ul
Reverse Primer	1,6 ul
Platinum Taq DNA Pol.	0,24 ul
dH ₂ O	25,96 ul
DNA	1 ul

Tablo 7: PZR koşulları (8. Ekzon için)

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	37
Amplifikasyon	Değişken	30 saniye	
Uzama	68 °C	30 saniye	
	68 °C	5 dakika	1
Soğuma	4 °C		-

3.2.5. Jel Elektroforezi

PZR ürünleri jel elektroforezi ile yürütülerek istenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontrol edildi.

- 1) 50 ml 1X TAE'nin içine 1 gram agaroz tartılarak eklendi (%2'lik jel için)
- 2) Karışım mikrodalgada ısıtılarak kaynaması beklendi.
- 3) Kaynayan karışıma 2.5 ul Etidium Bromür (EtBr) eklendi. Kasete döküldü.
- 4) Jel donduktan sonra kaset tanka alındı. 1X TAE eklendi. Örnekler *loading dye* ile karıştırılarak yüklendi. Örneklerin yanına *marker* yüklendi.
- 5) Örnekler 80 V'da yürütüldü. *Marker* band büyüklükleri ayrılacak kadar yürütüldükten sonra, transilluminatör cihazında UV ışık altında jelin görüntüsü alındı.

3.2.6. Sanger Dizileme

Sanger dizileme, PZR ürünlerinin zincir sonlandırma metodu ile okunmasına olanak sağlar. Hedef diziler referans genom ile karşılaştırılarak farklı olan bölgeler araştırıldı.

İstenilen ekzon bölgelerinin çoğaltıldığı PZR ürünleri dizilendi. Dizileme için hizmet alımı yapıldı.

3.2.7. Biyoinformatik Araçlarla AGBL3 Proteini 3D Yapı Modellemesi

Doğal AGBL3 ve erken terminasyon sonucu oluşan kısa (*truncated*) AGBL3 proteinlerinin 3D yapı analizi biyoinformatik araçlar yardımıyla gerçekleştirildi. Erken terminasyona sebep olan mutasyon, protein yapısında ve stabilitesinde önemli değişikliklere neden olur. Bu amaçla doğal AGBL3 proteini modellemesi SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)'de *automated homology modelling* kullanılarak yapıldı. Oluşturulan bu yapılar PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) aracı kullanılarak doğrulandı (61).

Erken terminasyon sonucu oluşan kısa AGBL3 proteini SWISS PDB Viewer kullanarak oluşturuldu. Protein modellerini en uygun konformasyon enerjisi

minimizasyonuna getirmek için, varsayılan olarak Gromacs algoritmasını kullanan NOMAD-Ref (<http://lorentz.immstr.pasteur.fr/nomad-ref.php>) kullanıldı (62).

3.2.8. Modellemesi Yapılan Proteinlerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

SPPIDER solvent erişilebilirliği tabanlı *Protein-Protein Interface iDEntifikasyon ve Recognition* (<http://sppider.cchmc.org/>), proteinlerin 3D yapısındaki solvent erişilebilirliğini ve ikincil yapılarını tahmin eden bir sunucudur (63). İkincil yapı ve solvent erişilebilirliklerinin tahmini için, Polyview3D - Dictionary of Secondary Structure Protein (DSSP) kullanıldı.

SRide (<http://sride.enzim.hu/>) sunucusu, protein 3D yapı stabilizasyonunda önemli rol oynayan stabilize edici rezidülerin (SR) taranması için kullanıldı. Protein sekansları arasında bu stabilize edici rezidülerin yüksek korunurluğu gösterildi (64).

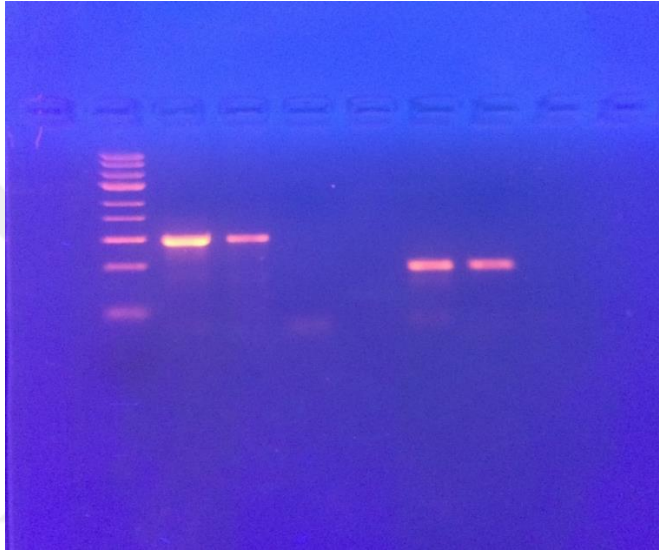
FlexPred (<http://flexpred.rit.albany.edu/>) web sunucusu proteinlerdeki konformasyonel anahtarlar (switch) yer alan rezidü pozisyonlarını tahmin etmek için kullanıldı. Bu web sunucusu, bu tür sıralı konformasyon anahtarlarında (switches) yer alabilecek rezidü pozisyonlarını tahmin eder. FlexPred çıktısı 'R'(rigid) and 'F'(flexible) etiketlerinden oluşur (65).

HBAT, bağlanmamış tüm etkileşimler için protein yapısı PDB dosyalarının analizinde kullanılan otomatik bir araçtır. HBAT'ın bir protein yapısındaki tüm etkileşimler hakkında kullanıcı dostu bir şekilde bilgi sağlamadaki kompaktlığı, diğer mevcut araçlara göre bir avantajdır. Program, bağlı ligandları olan PDB yapıları hakkında ek bilgi gerektirmez (66).

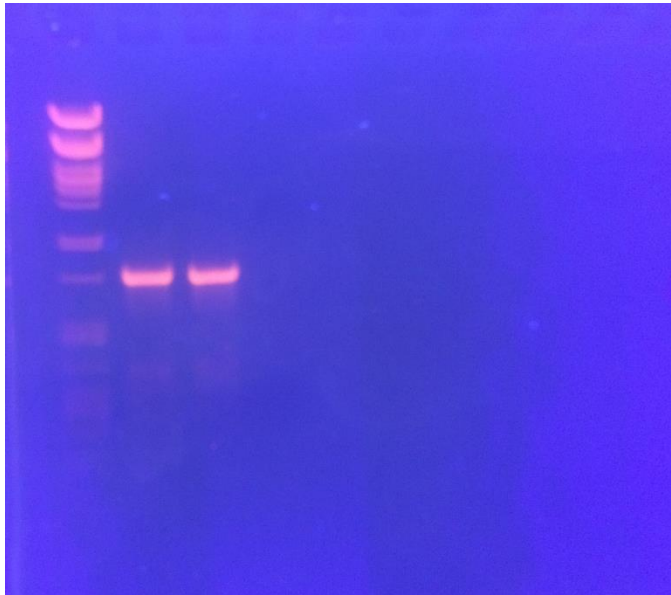
4. BULGULAR

4.1. Jel Elektroforezi Görüntüleri

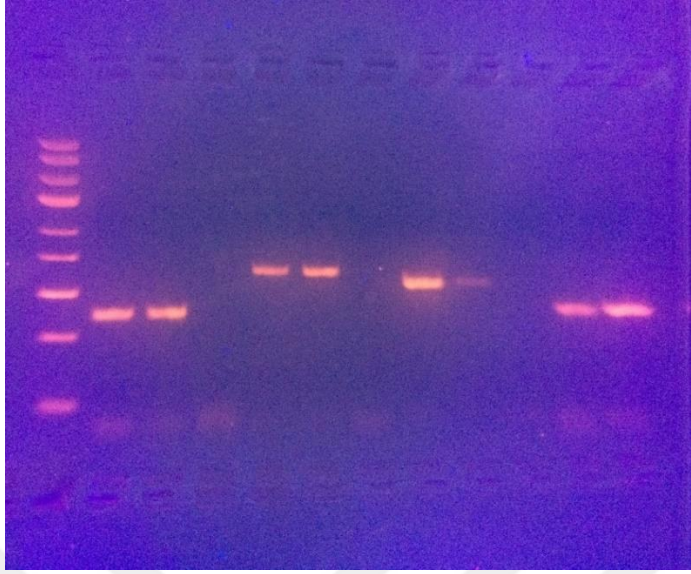
PZR yöntemiyle çoğaltılan gen bölgeleri jel elektroforeziyle yürütüldü. PZR ürünü boyutuna göre istenilen bölgenin amplifikasyonu ve spesifik olmayan amplifikasyonun varlığı açısından kontrol edildi. Jel elektroforezi görüntüleri Şekil 11,12,13 ve 14’de gösterilmiştir.



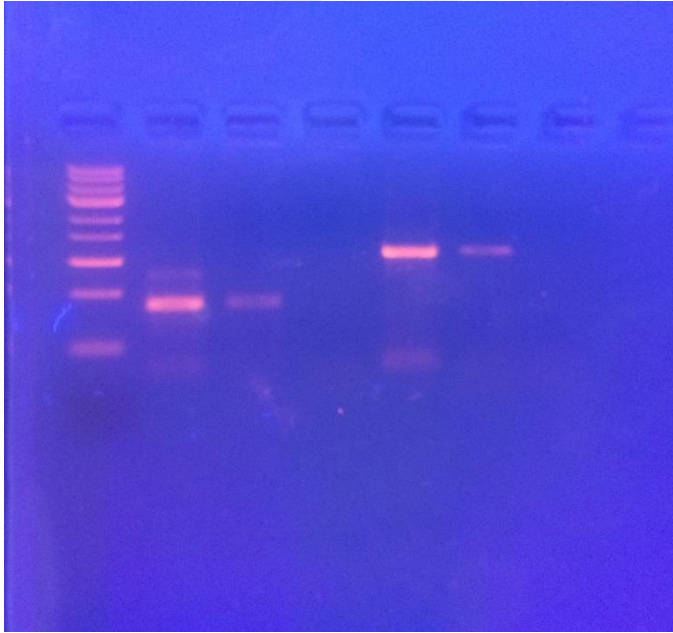
Şekil 11: AGL3 geni 2. ve 4. ekzon bölgeleri jel görüntüsü



Şekil 12: AGL3 geni 8. ekzon bölgesi jel görüntüsü



Şekil 13: AGBL3 geni 5, 7.2, 9, 10.ekzon bölgeleri jel görüntüsü



Şekil 14: AGBL3 geni 6. Ekzon ve 7.ekzon 1.bölge jel görüntüsü

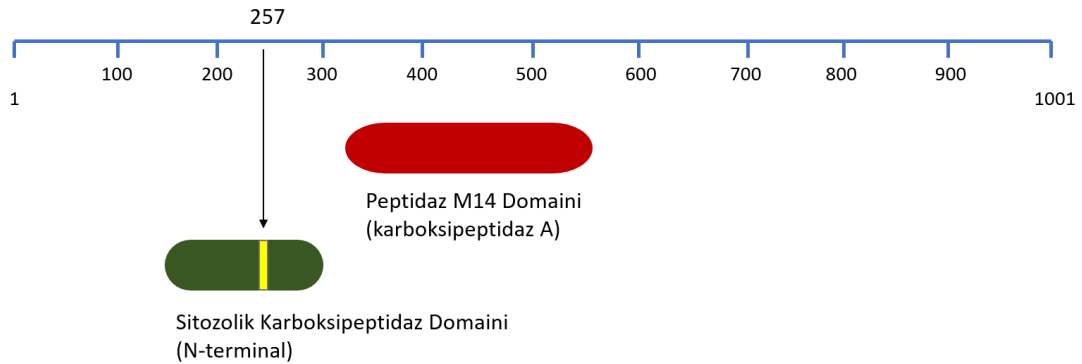
4.2. Sanger Dizileme Sonuçları

HUVS'li bir ailede (trio) (Şekil 9) yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak, ekzon dizileme yöntemi ile AGL3 geninde c.769C>T mutasyonu saptandı. Anne (2. Hasta) ve baba (3. Hasta) mutasyon açısından heterozigot, hasta olan erkek çocuk (1. Hasta) ise homozigot bulundu. Bu mutasyon proteinin erken terminasyonuna (p.Gln257Ter) neden olan *nonsense* mutasyondur. Hastalarda c.769C>T bölgesinde mutasyon görülme durumları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: Hastaların Özellikleri

Hasta No.	Tanı	c.769 bölgesinde mutasyon
1	HUVS	VAR (homozigot)
2	Sağlıklı	VAR (heterozigot)
3	Mukokutanöz Behçet	VAR (heterozigot)
4	HUVS	YOK
5	HUVS	YOK

c.769C>T mutasyonu AGL3 proteininde sitozolik karboksipeptidaz domaininde bulunmaktadır. Mutasyonun bulunduğu yer Şekil 15'de gösterilmiştir.



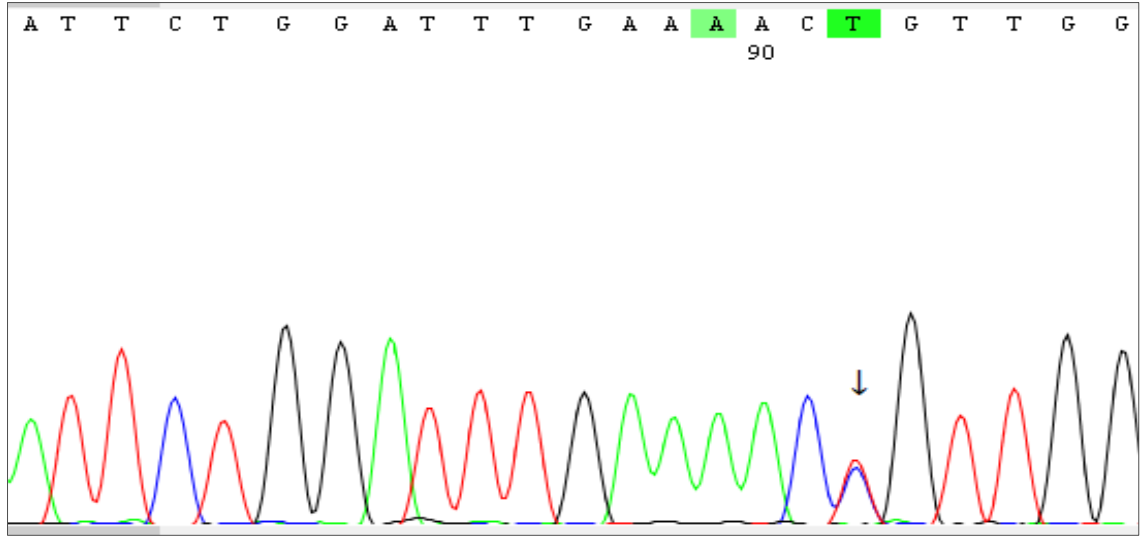
Şekil 15: AGL3 proteininde c.769C>T mutasyonu konumu

4. ve 5. hasta örneklerinin Sanger dizileme sonuçları Codoncode Aligner programı ile analiz edilmiştir. 4.hastanın Codoncode programı ile analizi sonucu saptanan varyasyonları Tablo 9’da gösterilmiştir. 4. Ve 5. Hastalarda c.769C>T mutasyonu saptanmadı.

Tablo 9: 4. hastanın varyasyon tablosu (GRCh38.p12 referans alınmıştır)

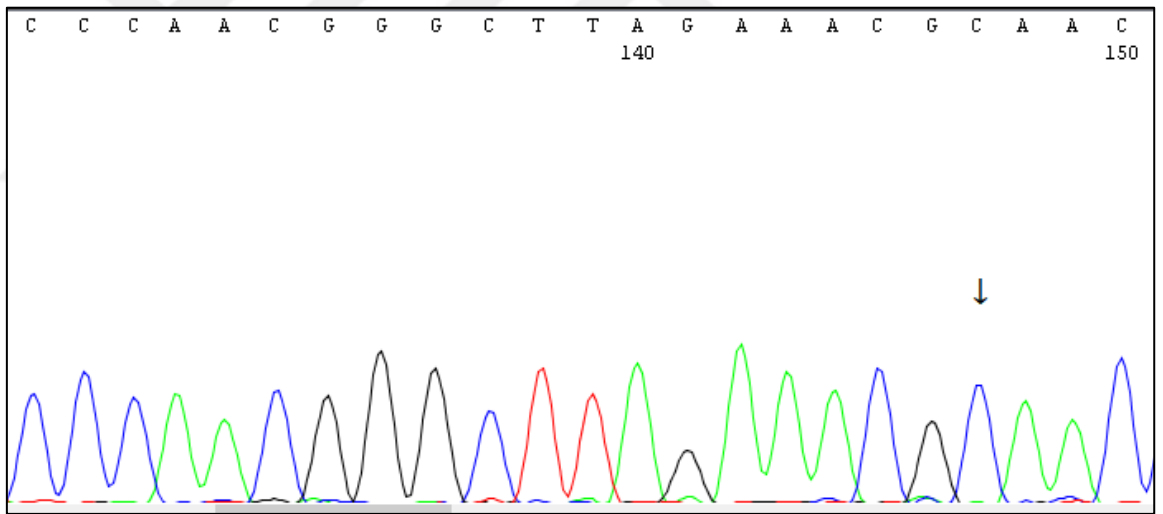
Mutasyon	Nükleotid değişimi	Protein değişimi	Bölge	rs Numarası	MAF Değeri
chr7:134989207	T-C (heterozigot)	İntron varyantı	2.intron	rs12671813	C=0.4146
chr7:135017105	G>C (homozigot)	E[GAA]>Q[CAA]	5.ekzon	rs4236655	C=0.9978
chr7:135034800	C>G (homozigot)	L[CTC]>L[CTG]	7.ekzon	rs9656447	G=0.9978
chr7:135059317	Delesyon (heterozigot)	İntron varyantı	13.intron	rs146909058	delA=0.5146

4.hastada AGBL3 geni ekzon bölgelerinin dizilenmesi sonucu elde edilen kromotografi görüntüleri Şekil 16,17,18,19 ve 20’de verilmiştir.



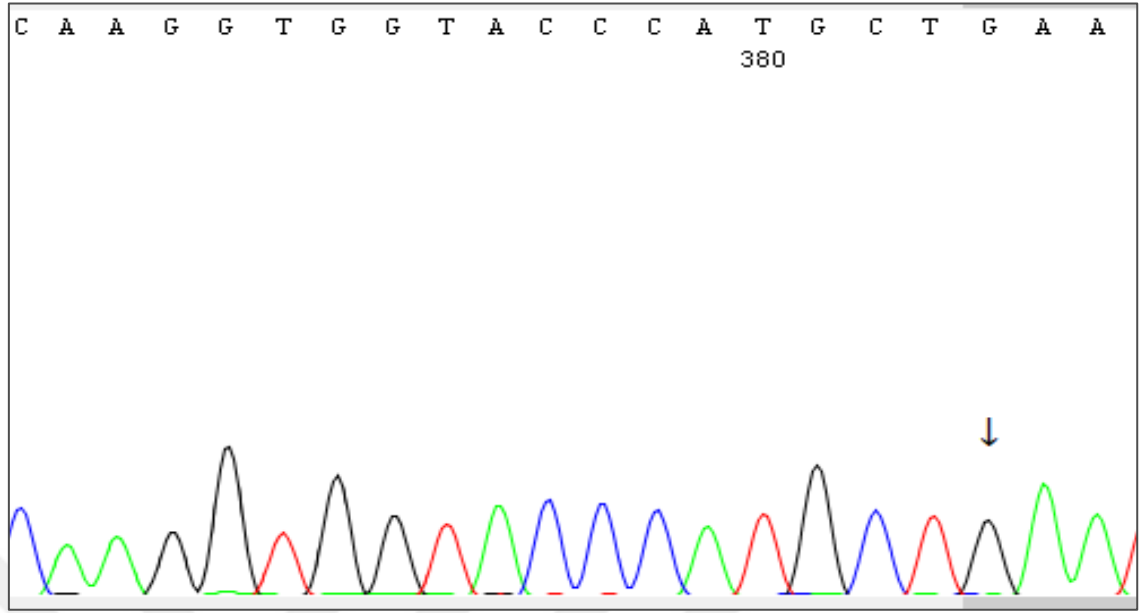
Şekil 16: 4. hastada AGBL3 geni 2. İntronunda rs12671813 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs12671813 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. T-C heterozigot olduğu görülmektedir.



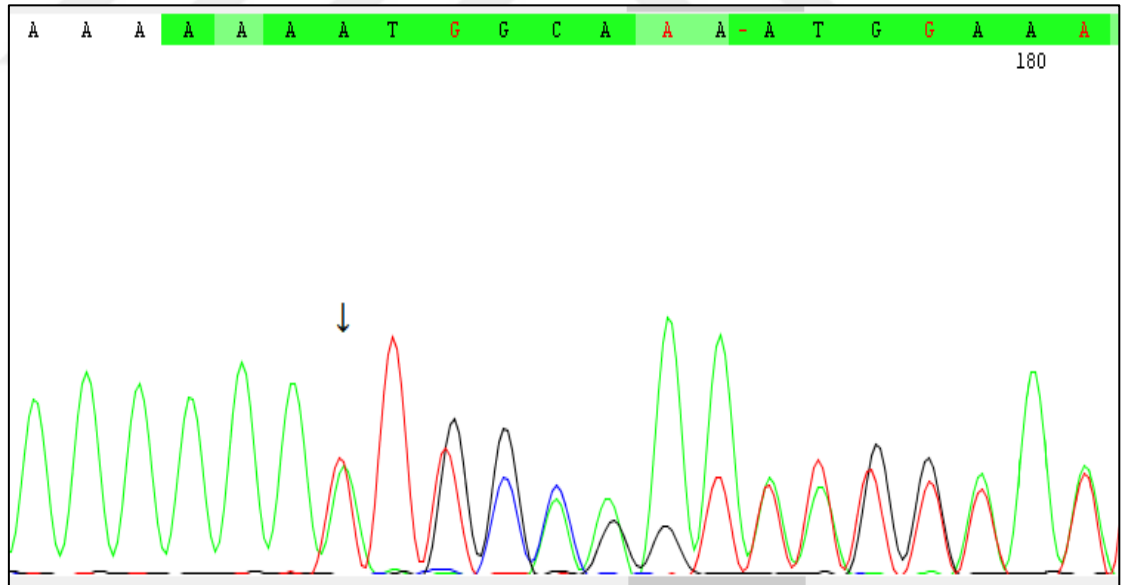
Şekil 17: 4. hastada AGBL3 geni 5. Ekzonda rs4236655 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs4236655 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. G>C homozigot olduğu görülmektedir.



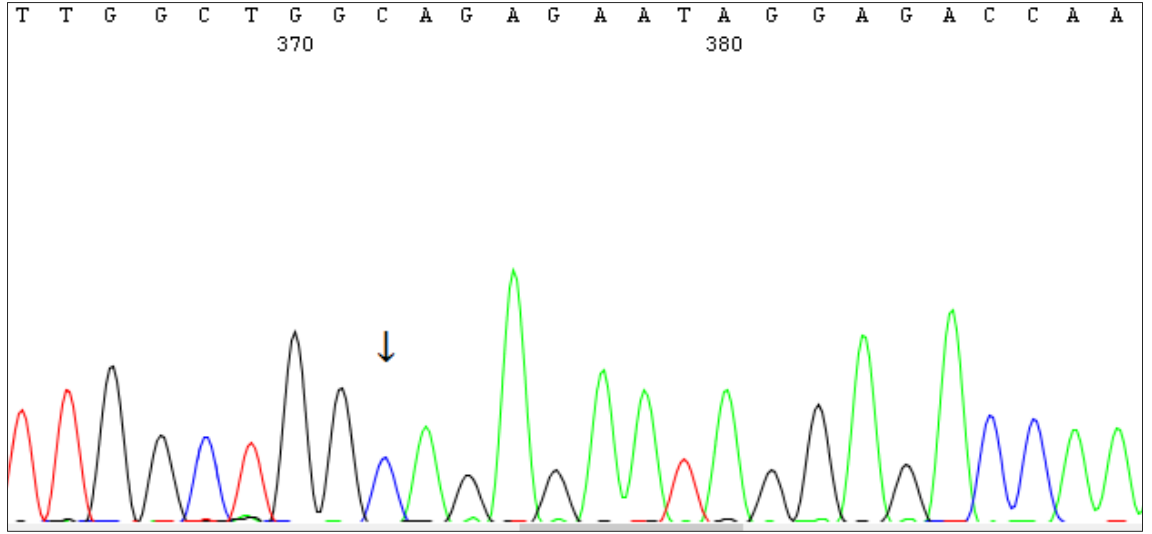
Şekil 18: 4. hastada AGBL3 geni 7. Ekzonda rs9656447 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs9656447 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. C>G homozigot olduğu görülmektedir.



Şekil 19: 4. hastada AGBL3 geni 13. İntronda rs146909058 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs146909058 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. A bazı delesyonu olduğu görülmektedir.



Şekil 20: 4. hasta; 7. ekzonda cDNA'nın 769. Pozisyonunda C alleli.

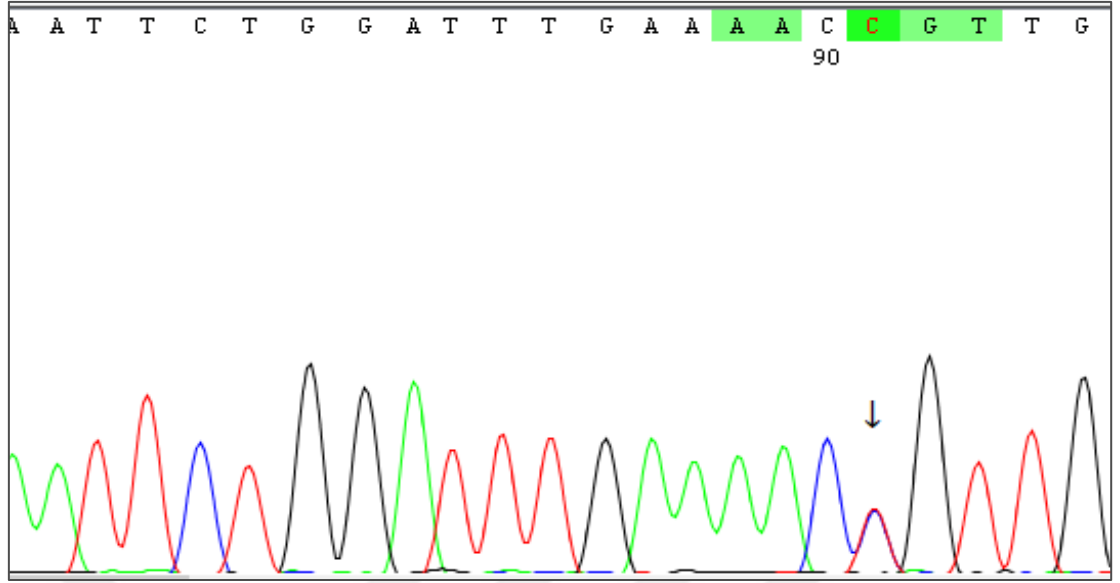
Ailede bulunan c.769C>T mutasyonu gözlenmemektedir.

5.hastanın Codoncode programı ile analizi sonucu saptanan varyasyonları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: 5. hastanın varyasyon tablosu (GRCh38.p12 referans alınmıştır)

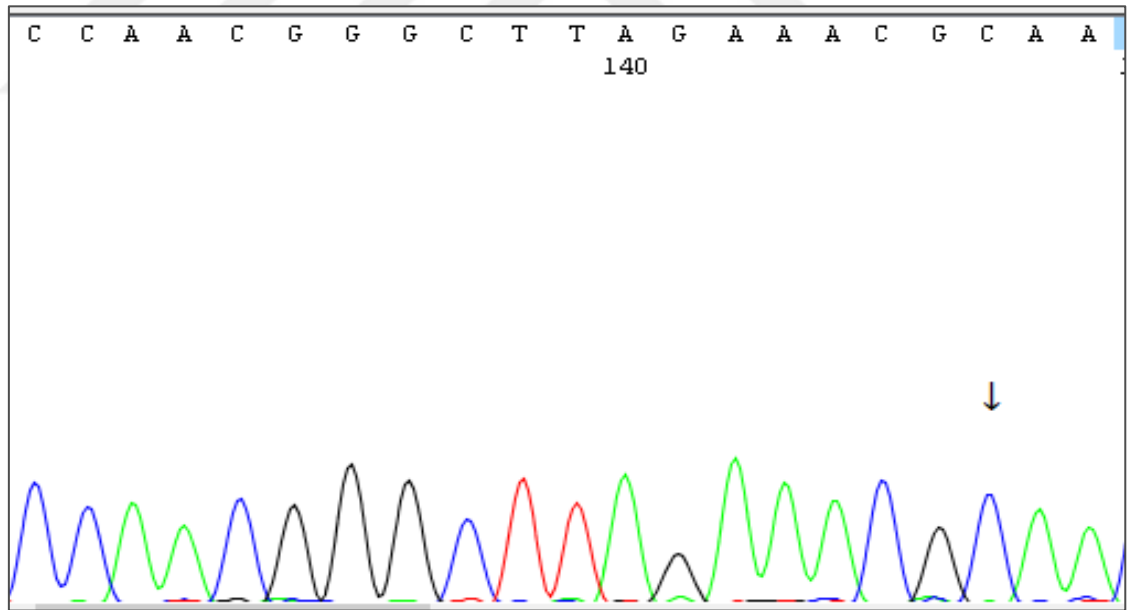
Mutasyon	Nükleotid Özelliği	Protein Özelliği	Bölge	rs Numarası	MAF Değeri
chr7:134989207	T>C (heterozigot)	İntron varyantı	2.intron	rs12671813	C=0.4146
chr7:135017105	G>C (homozigot)	E[GAA]>Q[CAA]	5.ekzon	rs4236655	C=0.9978
chr7:135034800	C>G (homozigot)	L[CTC]>L[CTG]	7.ekzon	rs9656447	G=0.9978

5.hastada AGBL3 geni ekzon bölgelerinin dizilenmesi sonucu elde edilen kromotografi görüntüleri Şekil 21,22,23 ve 24'de verilmiştir.



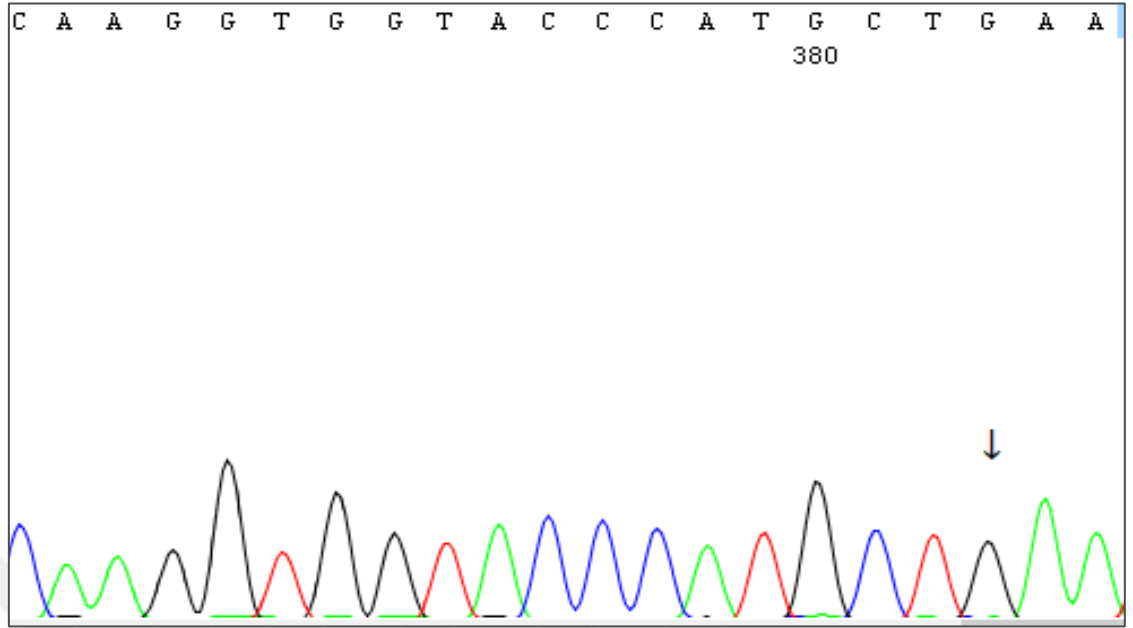
Şekil 21: 5. hastada AGBL3 geni 2. İntronda rs12671813 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs12671813 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. T>C heterozigot olduğu görülmektedir.



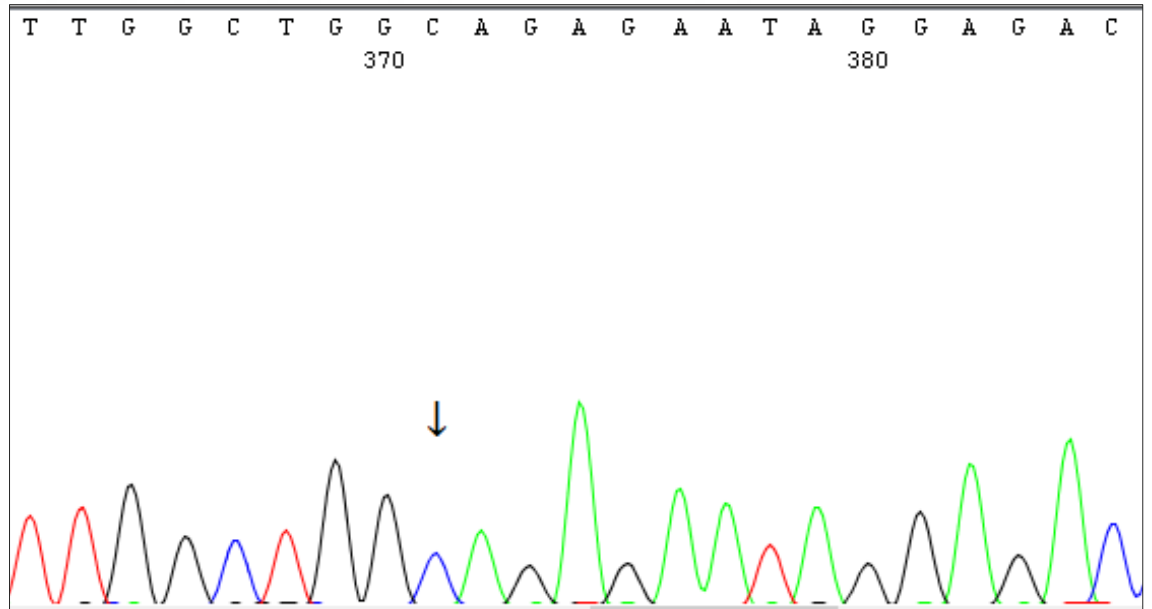
Şekil 22: 5. hastada AGBL3 geni 5. Ekzonda rs4236655 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs4236655 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. G>C homozigot olduğu görülmektedir.



Şekil 23: 5. hastada AGBL3 geni 7. Ekzonda rs9656447 polimorfizminin bulunduğu bölgenin sanger dizleme sonuçlarının görüntüsü.

rs9656447 polimorfizmi ok ile gösterilmiştir. C>G homozigot olduğu görülmektedir.



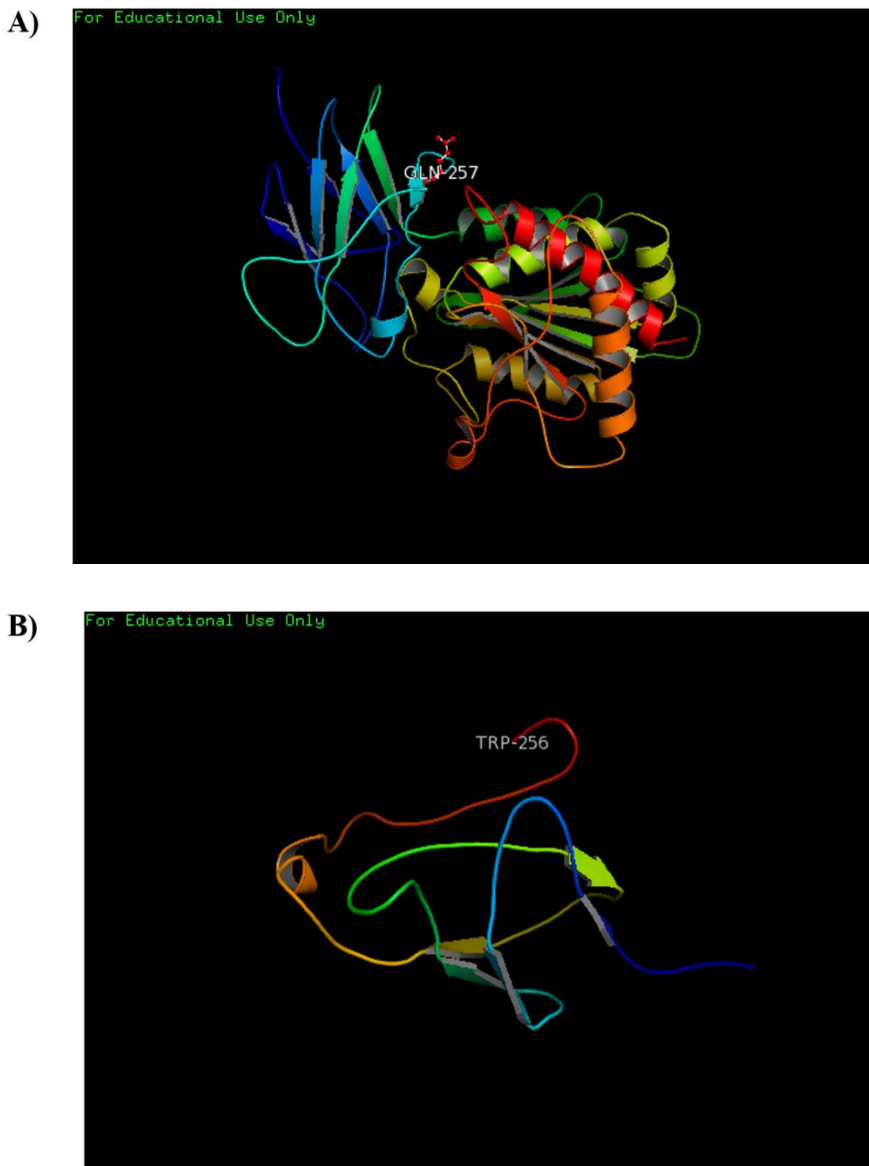
Şekil 24: 5. hasta; 7. ekzonda cDNA'nın 769. Pozisyonunda C alleli.

Ailede bulunan c.769C>T mutasyon gözlenmemektedir.

4.3. Protein Modelleme

SWISS-MODEL aracı kullanılarak oluşturulan doğal AGBL3 proteini ve SWISS PDB Viewer aracı kullanılarak oluşturulan erken terminasyonla oluşan kısa AGBL3 proteini modelleri Şekil 25’de gösterilmiştir.

Doğal protein 409 amino asit uzunluğunda modellenmiştir. Mutant proteinde 257.pozisyonda *stop* kodonu olduğu için 256 amino asit uzunluğundadır. 256.pozisyonda Triptofan amino asiti gösterilmektedir.



Şekil 25: Doğal ve *Truncated* AGBL3’ün 3D yapısı

a)Doğal AGBL3 proteini b) *Truncated* AGBL3 proteini

4.4. Doğal ve *Truncated* Protein Arasındaki Yapısal Farklar

Protein yapılarında stabilitenin çeşitli non-kovalent etkileşimler (hidrofobik, van der waals, non-kovalent ve elektrostatik etkileşimler) yoluyla sağlandığı bilinmektedir. (67). Hidrofobik etkileşimlerin protein katlanması için itici güç olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, katlanmaya direnme eğilimi, protein yapısındaki rezidüler arasındaki işbirlikçi (*cooperative*) etkileşimlerden türetilir (68). SPPIDER, truncated AGBL3 modellerinin ikincil yapılarındaki doğal AGBL3 modellerine göre farklılığı öngörmüştür (Tablo 11). İkincil yapıdaki önemli değişiklik, protein katlanması ve hücre içi etkileşimlerdeki olası değişikliği tahmin etmiştir.

Tablo 11: SPPIDER Tarafından Öngörülen doğal ve *Truncated* AGBL3 Proteininin İkincil Yapıları ve Solvent Erişilebilirliğinin) Karşılaştırmalı Analizi

No.	Pozisyon	İkincil Yapı			Solvent Erişilebilirliği (SABLE)	
		Heliks	Halka (Coil)	Beta iplik (strand)	Tam Gömülü olan bölgeler	Açıkta olan bölgeler
1	Doğal AGBL3 Protein	84	219	106	37	5
2	<i>Truncated</i> AGBL3 Protein	0	57	38	21	5

Doğal AGBL3 ve *truncated* AGBL3 proteinlerindeki stabilize edici rezidülerin SRide tarafından analizi, Tablo 12'de gösterilen stabilize edici rezidülerdeki değişimi öngördü. *Truncated* AGBL3 protein modeli 192. pozisyonda glutamin ve 193. pozisyonda lösin eklendiğini gösterdi. Ayrıca, doğal AGBL3 protein modelinde bulunan tüm stabilize edici rezidüler *truncated* AGBL3'de delesyona uğramıştı.

Tablo 12: SRide ile Analiz Edilen Doğal ve *Truncated* AGBL3 Proteinlerinin Stabilize Edici Rezidüleri

No.	Protein	Stabilize Edici Rezidüler	
		Mevcut	Yeni Oluşan
1	Doğal AGBL3 Protein	PHEA210, PHEA223, SERA279, LEUA280	
2	<i>Truncated</i> AGBL3		GLNA192, LEUA193

	Protein		
--	---------	--	--

Flexpred, Tablo 13'de gösterilen doğal AGBL3 ve *truncated* AGBL3 protein modelindeki esnek rezidülerdeki değişimi öngörmüştür. *Truncated* AGBL3 protein modeli çeşitli pozisyonlarda esnek rezidülerin delesyonunu gösterdi. Ayrıca, esnek rezidülerin 15, 37, 38, 39, 41, 54, 55, 56, 68, 71, 74, 76, 79, 80, 81, 88, 91 ve 94 pozisyonlarında ilavesi bulunmuştur.

Tablo 13: Doğal ve *Truncated* AGBL3 Protein Yapılarında Esnek Rezidü Pozisyonlarındaki Değişiklikler

No.		Esnek Rezidüler
1	Doğal AGBL3 Protein	1, 2, 3, 4, 5, 40, 92, 93, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 127, 128, 153, 154, 158, 185, 186, 187, 188, 189, 221, 222, 223, 224, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 337, 338, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 383, 384,
2	<i>Truncated</i> AGBL3 Protein	1, 2, 3, 4, 5, 15, 37, 38, 39, 40, 41, 54, 55, 56, 68, 71, 74, 76, 79, 80, 81, 88, 91, 92, 93, 94

Tablo 14'de gösterilen doğal protein yapısına kıyasla, *truncated* modelin tamamında hidrojen bağı frekanslarında sayılabilir bir değişiklik fark edildi. *Truncated* AGBL3 protein modeli, güçlü ve zayıf H-bağlarında farklılık gösterdi. HBAT aracı ile güçlü H-bağı N-H..O'da dikkate değer bir azalma ve C-H..O ve C-H..N gibi zayıf H-bağlarında da azalma öngörülmüştür.

Tablo 14: HBAT ile Doğal ve *Truncated* AGBL3 Proteinlerinde Moleküller Arası Hidrojen Bağı Frekans Tahminleri

No	Protein	N-H..O	O-H..O	N-H..N	O-H..N	C-H..O	C-H..N	N-H..S	O-H..S	C-H..S
1	Doğal AGBL3 Protein	434	30	220	10	73	22	2	1	6
2	<i>Truncated</i> AGBL3 Protein	62	1	44	1	15	8	0	0	1

5. TARTIŞMA

Otoimmün hastalıklarda (OH) vücut aşırı aktif bağışıklık sistemiyle sağlıklı hücrelere saldırarak yaşamı tehdit eden boyutlara ulaşabilir. OH'ler organa özgü hastalıklardan sistemik hastalıklara kadar geniş bir yelpazede görülebilir. Sistemik hastalıklarda bir çok organ etkilenebilir (1).

Ürtikeryal vaskülit (ÜV), hafif lezyonlardan şiddetli sistemik hastalığa kadar farklı tiplerde görülebilen otoimmün bir hastalıktır. Sıklığı tam olarak bilinmemekle beraber ürtikeryal vaskülitin patofizyolojik bir bulgusu olan lökositoklastik vaskülitin görülme sıklığı milyon başına 45'tir. ÜV, lezyonların büyüklüğü, kalıcılığı, rengi, lökositoklastik vaskülit görülmesi gibi özellikler açısından klasik ürtikerden farklılıklar gösterir. Klinikte üç farklı alt tipi görülen ÜV'nin en nadir alt tipi hipokomplementemik ürtikeryal vaskülit sendromu (HUVS)'dur (19,20).

McDuffie sendromu olarak da adlandırılan HUVS, sistemik lupus eritematozus (SLE)'a benzer özellikler gösteren nadir bir otoimmün hastalıktır. Literatürde 200'den az vaka bildirilmiştir ve hastalığın altında yatan etmenler tam olarak açıklanamamıştır. HUVS için Schwartz tarafından tanımlanan majör kriterler; 6 aydan uzun süren ürtiker ve hipokomplementemidir. Minör kriterler (en az ikisi tanı için gerekli olan) lökositoklastik vaskülit, artralji veya artrit, üveit veya episklerit (veya konjonktivit), hafif glomerülonefrit, tekrarlayan karın ağrısı veya pozitif C1q antikor testidir. Diğer klinik bulgular anjiyoödem, obstrüktif akciğer hastalığı ve çeşitli nörolojik problemleri içerir. Bu belirtilerin altında yatan etmenler tam olarak açıklanamamıştır (21,22,23).

İmmün reaktif maddelerin ve komplemanların damar duvarlarında birikmesi ve kompleman kaskadı aktivasyonu ÜV'de sık görülen bulgular iken yaygın ürtikerde böyle değildir. Bu bağışıklık kompleksleri otoantikorlar yoluyla oluşturulur; ancak aynı zamanda ilaçlar ve enfeksiyonlar yoluyla da indüklenebilir. Hepatit B ve hepatit C virüsleri, bu tür antikorların oluşumunu indükleyebilen enfeksiyöz ajanlar arasındadır (20).

HUVS'li hastalar klasik yolla kompleman aktivasyonuna bağlı olarak azalmış C1q, C2, C3 ve C4 seviyelerine sahiptir. C1q komplemanı HUVS'li hastaların serumunda bulunan otoantikorlar için bağlayıcı bir bölgeye sahiptir. Bu otoantikorlar,

oluşturdukları bağışıklık kompleksleriyle klasik kompleman sistemini aktive eden IgG molekülleridir (30,41). Klasik kompleman yolu etkinleştirildikten sonra oluşan C3a ve C5a anafilatoksin, kemokin ve sitokinlerin üretimine yol açar ve bunun da ÜV ile birlikte görülen şok, lökopeni ve trombositopeniden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (36). Bu aktive olmuş kompleman ürünleri mast hücre degranülasyonunu indükler. Bu maddelerin oluşumu, damar geçirgenliğinin artmasına, nötrofillerin kemotaksisine ve immün komplekslerin birikiminin artmasına neden olur. Nötrofiller iltihap bölgesine vardıklarında fagositik hale gelirler ve doku yıkımını ve ödemi daha da şiddetlendiren proteolitik enzimler (örneğin kollajenaz ve elastaz gibi) salgırlar. Ayrıca dolaşımda görülen anti-C1q antikollarının immün kompleks oluşumu ve vasküler inflomasyonun patogeneze katılabileceği düşünülmektedir (32).

HUVS'nin patogenezi aydınlatmak için Özçakar ve arkadaşları (38) yaptıkları çalışmada otozomal resesif HUVS'li iki ailede *whole-exome sequencing* ile birlikte otozigozite haritalama yapmışlardır. Üç çocuğu etkilenmiş ailede DNASE1L3 geninde c.289_290delAC bölgesinde çerçeve kaymasına sebep olan homozigot bir mutasyon saptamışlardır. İlişkisiz başka bir ailede DNASE1L3 geninde c.320+4delAGTA bölgesinde *exon skipping*'e neden olan homozigot bir mutasyon saptamışlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda daha önce SLE ile ilişkilendirilmiş olan bir endonükleazı kodlayan DNASE1L3'teki mutasyonların HUVS patofizyolojisinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışma haricinde HUVS'nin genetik alt yapısını aydınlatmayı hedefleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. HUVS'nin multifaktöriyel yapısı ve sistemik katılımının bu durumda etkisi olabilir (38). Ranalli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 6 pediyatrik HUVS hastasında DNASE1L3 genindeki varyasyonu taramış ve 3 vakada bu varyasyonu saptamışlardır (69). Bu durum DNASE1L3 geninin HUVS ile ilişkisini güçlendirmektedir. Tez çalışmamızda AGBL3 geni dizilemesi yapılan HUVS'li hastalar DNASE1L3 geni mutasyonları bulunmamaktadır.

Literatürde HUVS ile ilişkilendirilmiş yalnızca DNASE1L3 geni bulunmaktadır. Daha önce yapılan *whole-exome sequencing* (WES) analizinden AGBL3 (CCP3) geni aday gen olarak belirlendi. HUVS'li, ataklar sırasında yüksek CRP ve ESR seviyesine sahip, 22 yaşındaki indeks vakada genomik varyasyonlar tüm ekzom dizileme ile tarandı. AGBL3 geninde zararlı bir homozigot c.769C>T mutasyonu bulundu. Bu mutasyon indeks vakada homozigot iken, sağlıklı annede ve Mukokutanöz Behçet

öyküsü olan babasında heterozigottu. Mutasyon; proteinin erken sonlanmasına (p.Gln257Ter) ve sitozolik karboksipeptidaz domaininde delesyonuna sebep olur. Bu domain diğer karboksipeptidazlarda bulunmaz ve CCP'lere özgüdür. Sitozolik karboksipeptidaz domaini katlanmaya katkıda bulunabilir, düzenleyici bir etkisi olabilir ve/veya diğer proteinlere bağlanabilir. Bu domaindeki mutasyon proteinin görevini aksatabilir ya da işlevsizleştirebilir. Erken sonlanmaya uğrayan protein hücre içinde *truncated* protein formunda sunulabilir veya *nonsense mediated decay*'e uğrayarak paraçalanabilir. Proteinin *truncated* formu için farklı araçlar kullanılarak analizler yapıldı. Doğal ve *truncated* proteinin modellemesi yapıldıktan sonra SPPIDER aracı ile proteinlerin ikincil yapıları ve solvent erişilebilirlikleri tahmin edildi. Proteinin ikincil yapısının oluşması katlanmada önemli bir role sahiptir ve proteinin fonksiyonelliğini etkiler. *Truncated* proteinde *coil* ve *beta* ikincil yapılarında belirgin bir azalma görülürken *helix* yapısının delesyonu görülür. Bu durum *truncated* proteinin katlanmasını etkileyerek proteinin fonksiyonel özelliklerini kaybetmesine neden olabilir. Solvent erişilebilirliğinde açıkta olan bölgelerin sayısı değişmezken gömülü bölgeler azalmıştır. Bu durum proteinin hidrofilik, hidrofobik olma gibi özelliklerini etkileyebilir. Böylece proteinin substrat seçimi değişebilir.

SRide aracı ile proteinin stabilize edici rezidüleri tahmin edildi. Stabilize edici rezidüler protein-protein etkileşimlerinde önemli rol oynar. Doğal proteinde yer alan stabilize edici rezidülerin hepsi delesyona uğramış ve *truncated* proteinde yeni stabilize edici rezidüler bulundu.

Flexpred aracı ile proteinlerin esnek rezidüleri tahmin edildi. *Truncated* proteinde bazı rezidüler delesyona uğrarken yeni esnek rezidüler de bulundu. Esnek rezidüler proteine esneklik kazandırır ve proteinin hareketini etkileyebilir.

HBAT aracı ile öngörülen Hidrojen bağı frekanslarında sayılabilir seviyede değişiklik fark edildi. *Truncated* proteinde doğal proteine kıyasla güçlü N-H..O bağlarında ve zayıf C-H..O ve C-H..N bağlarında azalma gözlemlendi. Bu bağlar proteine stabilite kazandırır ve protein diğer proteinlerle etkileşime girdiğinde proteinin aktif bölgesini etkileyebilir.

Yapılan bu biyoinformatik tahminlerle p.Gln257Ter bölgesinde mutasyon bulunan *truncated* AGBL3 proteininin doğal olana kıyasla önemli değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu analizler *truncated* proteininin ikincil yapı, solvent erişilebilirliği,

stabilize edici rezidüler, esnek rezidüler ve hidrojen bağları açısından değişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Daha ileri çalışmalarla sonuçların *in-vitro* deneyler ile doğrulanması gerekmektedir.

AGBL3, özellikle tubulinler gibi proteinlerde poliglutamat yan zincirlerinin deglutamilasyonunu katalize eder. Asetilasyon, tirozinasyon, glutamilasyon, glisilasyon, deglutamilasyon vs. gibi farklı modifikasyonlar tubulinleri değiştirebilmektedir. Tirozinasyon ve detirozinasyon çoğu α -tubulin alt ünitesinde gerçekleşen geri dönüşümlü PTM'lerdir. Mikrotübüller (MT) C-terminal uçlarından tirozinin proteolitik olarak çıkarılmasıyla detirozinasyona uğrayabilirler. Detirozinasyon MT stabilizasyonu ile ilişkilidir. Bir çok farklı hücre tipinde bulunan uzun ömürlü MT'ler tirozinasyon bakımından eksiktir. Detirozine edilmiş α -tubulinin sondan bir önceki glutamat rezidünün çıkarılmasıyla geri dönüşümsüz bir şekilde $\Delta 2$ -tubulin oluşabilir. $\Delta 2$ -tubulin tekrar tirozinlenemez. $\Delta 2$ -tubulin nöron, sentrozom ve primer silialarda bulunan stabil MT'lerin karakteristik bir özelliğidir. $\Delta 2$ -tubulin, beyinde ve özellikle farklılaşmış nöronlarda fazlaca bulunur (62,63).

İlk olarak tanımlanan tubulin modifiye eden enzim tubulin tirozinasyonundan sorumlu olan tubulin tirozin ligaz (TTL)'dir. Tirozinin zincirden çıkarılmasını sağlayan enzim henüz tanımlanmamıştır ancak CCP1 adayları arasındadır. Kalinina ve arkadaşları *ccp1* geninde buldukları mutasyonun farelerde MT'lerin detirozinasyonunu azalttığını bulmuşlardır. Purkinje hücre dejenerasyon (*pcd*) fareler *ccp1* geninde mutasyon taşırlar ve bu farelerde alfa-tubulinlerin tirozin seviyesinin artmasına istinaden bu enzimin detirozinasyonuna aracılık ettiği öne sürülmüştür (72). Rogowski ve arkadaşları çalışmalarında CCP1'in direkt olarak detirozinasyona katılmadığı bunun yerine CCP1'in sondan bir önceki glutamat rezidüsünü detirozine alfa-tubulinden çıkararak $\Delta 2$ -tubulin oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (73). Bununla birlikte CCP4, CCP6, CCP2 ve CCP3 de $\Delta 2$ -tubulin oluşturabilir.

Tort ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CCP2 ve AGBL3'ün mikrotübül düzeyinde uzun Glutamat zincirlerini hidrolize edebildiği (deglutamilasyon) ve böylece $\Delta 2$ -tubulin üretebildiğini göstermiştir.

AGBL3 Glutamat'ın yanı sıra C-terminaldeki Aspartat rezidülerini de hidrolize (deaspartilasyon) edebilir. AGBL3, Glutamat ve Aspartat uzaklaştırmasını eşit verimlilikle katalize eder. Oysa CCP ailesindeki diğer enzimler Aspartat uzaklaştırması

için zayıf aktivite gösterirler. AGBL3 dışında diğer CCPler bu reaksiyonu etkin bir şekilde katalize etmek için özel kofaktörler veya düzenleyiciler gerektirebilir.

CCP2 ve AGBL3 silli dokularda; testis, trake ve akciğerde ifade edilir. AGBL3, retina ve adipoz dokuda nispeten daha kuvvetli bir şekilde ifade edilir. CCP2/3, CCP1 ile kıyaslandığında organlarda nispeten daha düşük ifade edilmiştir. CCP1'in bu yüksek ifadesi, deglutamilasyon reaksiyonlarının büyük bir kısmını katalize ettiğini gösterebilir.

Tort ve arkadaşlarının çalışmasında *Agbl2/3 double knockout* (KO) fareler üretildi. Bu fareler canlılıklarını devam ettirdi ve hiçbir belirgin fenotipik değişiklik göstermedi. *Wild type* (WT) farelere kıyasla KO farelerin testislerinde ve spermalarında tubulin poliglutamilasyonu arttığı gözlemlendi. Testis ve sperm dışında başka hiçbir organda tubulin poliglutamilasyon seviyelerinde tespit edilebilir değişiklikler gözlemlenmedi. CCP2/3'ün spermde *Myosin light-chain kinase 1* (MLCK1)'in deglutamilasyonuna tamamlayıcı olarak dahil olduğu, ancak diğer enzimlerin (CCP'lerin) yetişkin farelerde bu iki enzimin yokluğunu telafi edebileceği gösterildi. Belki de gelişme sırasındaki bu telafi nedeniyle deglutamilasyondaki değişikliklerle ilgili görünür bir fenotip değişikliği olmamıştır. Bazı organlarda CCP2, AGBL3 veya her ikisinin de MLCK1'in deglutamilasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Aynı çalışmada CCP'ler farklı bakteri protein yapılarından faydalanılarak modellenmiştir. Bu modellerdeki 255.pozisyonda bulunan Arjinin (S1' altbiriminde) CCP'lerin substrat tercihlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Metallokarboksipeptidazlarda 255.pozisyondaki rezidü direkt olarak substratın C-terminal yan zincirine bağlanır. Bu pozisyondaki bazik amino asit, substrat olarak asidik amino asit seçiminde önemli bir rol oynar (59).

AGBL3'ün STRING veritabanı kullanılarak protein etkileşim analizi yapıldığında CD46 ve CD59 ile ilişkisi görülmektedir. CD46 geni tarafından kodlanan protein tip I membran proteinidir ve kompleman sisteminin düzenleyici bir parçasıdır. Bu protein, konakçı hücreyi tamamlayıcı hasardan koruyan serum faktör I ile kompleman bileşenleri C3b ve C4b'nin inaktivasyonu için kofaktör aktivitesine sahiptir.

CD59 geni tarafından kodlanan protein kompleman-aracılı hücre lizisini düzenleyen ve lenfosit sinyal transdüksiyonuna katılan bir hücre yüzey glikoproteinidir. Bu protein, kompleman *membrane attack complex*'in güçlü bir inhibitörü olup, bu kompleksin oluşumu sırasında kompleman C8 ve/veya C9'u bağlar, böylece ozmotik

por oluşumu için gerekli olan çoklu C9 kopyalarının komplekse dahil edilmesini engeller. Ancak STRING veritabanı *in-vitro* deneylerden ziyade *in-silico* tahminlere dayanan bir program olduğundan bu ilişkilerin *in-vitro* deneyler ile de doğrulanması gerekmektedir. Bu veritabanından elde edilen bilgilerle tahmin yürütülebilir, ancak bu veriler kanıtlanmış değildir.

Kolşisin, otoinflamatuar ve otoimmün bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Kolşisin, MT'lerin yapısını koruyan tubulin-kolşisin kompleksini oluşturmak için hem α - hem β -tubuline bağlanır. Böylece MT polimerizasyonunu inhibe eder. MT polimerizasyonu hücre içi organel ve vezikül taşınması, sitokin ve kemokin salınımı ve gen ekspresyonu düzenlenmesi gibi sayısız hücre fonksiyonu kontrol edebilir (74). Pirinin N-terminal bölümü mikrotübüllere bağlanır. Pirinin granüositlerde ve monositlerde hücre iskeleti ile etkileşerek enflamasyonu düzenlediği düşünülmektedir. AAA'deki kolşisinin terapötik etkisinin bu etkileşime bağlı olması muhtemeldir (75).

AGBL3 tubulinlerde $\Delta 2$ -tubulin oluşumu ve deaspartilasyondan sorumludur. $\Delta 2$ -tubulin, MT'leri depolimerizasyondan korur ve MT'lerin stabilizasyonunu sağlar. AGBL3 genindeki mutasyonların tubulinler üzerinden dolaylı olarak inflamasyonda etkili olabileceği düşünülebilir.

Tubulinlerin otoinflamatuar ve otoimmün hastalıklarla ilişkisi farklı yayınlarda tartışılmıştır. Yapılan bir çalışmada mikrotübüllerin NLRP3 inflamazomunun oluşumuna aracılık ettiği öne sürülmektedir (75). Kolşisinin mikrotübüllerle ilişkisi ve dolayısıyla ailevi akdeniz ateşi ile olan ilişkisi yayınlarda tartışılmıştır (76). AGBL3'ün tubulinlerin post translasyonel modifikasyonlarında görevli olduğu bilinmektedir. Tubulinlerin otoinflamatuar ve otoimmün hastalıklarla ilişkisi AGBL3'ü dolaylı bir hedef haline getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, genetik etiyolojisi bilinmeyen ve nadir otoimmün bir hastalık olan HUVS'nin altında yatan mekanizma ve yolları aydınlatmak için DNASE1L3 geninde mutasyon bulunmayan HUVS'li iki hastanın AGBL3 geni ekzon bölgeleri Sanger dizileme ile taranmıştır. AGBL3 geni, daha önce trio bir aileden yapılan WES verisinin analiz edilmesiyle aday gen olarak belirlenmiştir. Bu vakada AGBL3 geninde c.769C>T bölgesinde mutasyonu saptanmıştır. Tez çalışmamızda AGBL3 geninin ekzon bölgeleri pediatrik HUVS'li iki hastada Sanger dizileme ile taranmıştır. Bu iki hastada WES yapılan vakada görülen c.769C>T mutasyonu

saptanmamıştır. Ancak farklı intronik ve ekzonik bölgelerde varyasyonlar görülmüş bunların toplumdaki sıklıklarının yüksek olması sebebiyle benign polimorfizm oldukları düşünülmüştür. 4. hasta için bu varyasyonlardan ikisi intron bölgesinde iken 2 tanesi ekzon bölgesindedir. Ekzon bölgesinde olan varyantların görülme sıklığı yüksek olmakla beraber amino asit değişimine neden olmaktadır. 5. hastada ise 1 tane intron bölgesinde, 2 tane ekzon bölgesinde varyasyon görülmüştür. Bu varyantlar 4. Hastada saptanan ile aynı bölgededir. Bu varyantların toplumda görülme sıklığı yüksektir. AGBL3 (CCP3) proteini, CCP ailesinden olup bu ailenin diğer üyeleri de $\Delta 2$ -tubulin oluşumunu katalizlemektedir. Ancak deaspartilasyon aktivitesi AGBL3 proteinine özgüdür.

Daha ileri çalışmalarda CCP ailesinin diğer üyelerine de bakılarak bu genlerde oluşabilecek mutasyonların tubulin modifikasyonları üzerine etkisi daha geniş çaplı olarak araştırılabilir. HUVS oldukça nadir bir hastalık olduğu için taranan hasta sayısının artırılması mutasyon taraması yapılırken sonuçların doğruluğunu arttıracaktır. Daha geniş çaplı bir araştırma için hasta sayısının artırılması düşünülmektedir. HUVS'li vakada görülen p.Gln257Ter protein değişikliğinin homozigot olarak görülen indeks vakada ve heterozigot olan anne/babasında Western blot ile analiz edilmesi gelecekte yapılması planlanan çalışmalar arasındadır. Böylece proteinin hasta bireyde miktarı veya boyutu tespit edilerek fikir sahibi olunacaktır. Genetik alt yapısı bilinmeyen bu hastalıkla alakalı çalışmalar farklı tedavi yöntemlerinin önünü açacak ve hedefe yönelik tedaviler için yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Doria A, Zen M, Bettio S, Gatto M, Bassi N, Nalotto L, et al. Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. *Autoimmun Rev.* 2012;12(1):22–30.
2. Borella E, Palma L, Zen M, Bettio S, Nalotto L, Gatto M, et al. The body against self: Autoinflammation and autoimmunity. *Isr Med Assoc J.* 2014;16(10):608–10.
3. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2011;365(17):1612–23.
4. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror Autoinflammaticus : The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease . *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):621–68.
5. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccarino L, Doria A. Environment and systemic lupus erythematosus: An overview. *Autoimmunity* [Internet]. 2005 Jan 1;38(7):465–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/08916930500285394>
6. Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Turriel M, Petri M. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2005 Sep 1;14(9):683–6. Available from: <https://doi.org/10.1191/0961203305lu2200oa>
7. Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, et al. Autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(1 Suppl 40):S79-85.
8. Obici L, Merlini G. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmun Rev.* 2012 Nov;12(1):14–7.
9. Obici L, Raimondi S, Lavatelli F, Bellotti V, Merlini G. Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic diseases: a critical overview. *Arthritis Rheum.* 2009 Oct;61(10):1435–40.
10. Rekvig OP, Putterman C, Casu C, Gao H-X, Ghirardello A, Mortensen ES, et al. Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? *Autoimmun Rev.* 2012 Jun;11(8):596–603.
11. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev.* 2011 Apr;10(6):305–10.

12. Gattorno M, Federici S, Pelagatti MA, Caorsi R, Brisca G, Malattia C, et al. Diagnosis and management of autoinflammatory diseases in childhood. *J Clin Immunol*. 2008 May;28 Suppl 1:S73-83.
13. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, et al. SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev*. 2010 Nov;10(1):55–60.
14. Shugaiv E, Tuzun E, Mutlu M, Kiyat-Atamer A, Kurtuncu M, Akman-Demir G. Mycophenolate mofetil as a novel immunosuppressant in the treatment of neuro-Behcet's disease with parenchymal involvement: presentation of four cases. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(4 Suppl 67):S64-7.
15. Lachmann HJ, Quartier P, So A, Hawkins PN. The emerging role of interleukin-1beta in autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum*. 2011 Feb;63(2):314–24.
16. Geyer M, Muller-Ladner U. Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 May;22(3):246–51.
17. Brown NA, Carter JD. Urticarial vasculitis. *Curr Rheumatol Rep*. 2007;9(4):312–9.
18. Hamad A, Jithpratuck W, Krishnaswamy G. Urticarial vasculitis and associated disorders. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2017;118(4):394–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2017.01.017>
19. Wisnieski JJ. Urticarial vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(1):24–31.
20. Venzor J, Lee WL, Huston DP. Urticarial vasculitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002 Oct;23(2):201–16.
21. Jachiet M, Flageul B, Deroux A, Le Quellec A, Maurier F, Cordoliani F, et al. The clinical spectrum and therapeutic management of hypocomplementemic urticarial vasculitis: data from a French nationwide study of fifty-seven patients. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ). 2015 Feb;67(2):527–34.
22. McDuffie FC, Sams WMJ, Maldonado JE, Andreini PH, Conn DL, Samayoa EA. Hypocomplementemia with cutaneous vasculitis and arthritis. Possible immune complex syndrome. *Mayo Clin Proc*. 1973 May;48(5):340–8.
23. Wisnieski JJ, Baer AN, Christensen J, Cupps TR, Flagg DN, Jones J V, et al. Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. Clinical and serologic findings in 18 patients. *Medicine* (Baltimore). 1995 Jan;74(1):24–41.
24. Schwartz HR, McDuffie FC, Black LF, Schroeter AL, Conn DL. Hypocomplementemic urticarial vasculitis: association with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Mayo Clin Proc.* 1982 Apr;57(4):231–8.
25. Grotz W, Baba HA, Becker JU, Baumgärtel MW. Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome. 2009;106(46):756–64.
 26. Davis MDP, Brewer JD. Urticarial vasculitis and hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. 2004;24:183–213.
 27. Saeki T, Ueno M, Shimada H, Nishi S, Imai N, Miyamura S, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hypocomplementemic urticarial vasculitis after complete remission of membranous nephropathy. *Nephron.* 2001 Jun;88(2):174–7.
 28. Buck A, Christensen J, McCarty M. Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome: A case report and literature review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2012;5(1):36–46.
 29. Davis MD, Daoud MS, Kirby B, Gibson LE, Rogers RS 3rd. Clinicopathologic correlation of hypocomplementemic and normocomplementemic urticarial vasculitis. *J Am Acad Dermatol.* 1998 Jun;38(6 Pt 1):899–905.
 30. Mehregan DR, Hall MJ, Gibson LE. Urticarial vasculitis: a histopathologic and clinical review of 72 cases. *J Am Acad Dermatol.* 1992 Mar;26(3 Pt 2):441–8.
 31. Balsam L, Karim M, Miller F, Rubinstein S. Crescentic glomerulonephritis associated with hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2008 Dec;52(6):1168–73.
 32. Berg RE, Kantor GR, Bergfeld WF. Urticarial vasculitis. *Int J Dermatol.* 1988 Sep;27(7):468–72.
 33. Dienstag JL, Rhodes AR, Bhan AK, Dvorak AM, Mihm MCJ, Wands JR. Urticaria associated with acute viral hepatitis type B: studies of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1978 Jul;89(1):34–40.
 34. Zeiss CR, Burch FX, Marder RJ, Furey NL, Schmid FR, Gewurz H. A hypocomplementemic vasculitic urticarial syndrome: Report of four new cases and definition of the disease. *Am J Med [Internet].* 1980 Jun 1;68(6):867–75. Available from: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90216-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90216-8)
 35. Wisnieski JJ, Jones SM. IgG autoantibody to the collagen-like region of Clq in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome, systemic lupus erythematosus, and 6 other musculoskeletal or rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1992 Jun;19(6):884–8.

36. Guillet G, Jeune R. Urticarial vasculitis with shock, leukopenia and thrombocytopenia, possibly due to anaphylatoxin release. *Br J Dermatol*. 1983 May;108(5):605–8.
37. Babajani A, Chung-Park M, Wisniewski JJ. Recurrent pericarditis and cardiac tamponade in a patient with hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *J Rheumatol*. 1991 May;18(5):752–5.
38. Özçakar ZB, Foster J, Diaz-Horta O, Kasapcopur O, Fan YS, Yalçinkaya F, et al. DNASE1L3 mutations in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum*. 2013;65(8):2183–9.
39. Orsini F, De Blasio D, Zangari R, Zanier E, De Simoni M-G. Corrigendum: Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration, and brain homeostasis. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 7;8:380.
40. Andrade FA, Lidani KCF, Catarino SJ, Messias-Reason IJ. Serine Proteases in the Lectin Pathway of the Complement System BT - Proteases in Physiology and Pathology. In: Chakraborti S, Dhalla NS, editors. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 397–420. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_18
41. Agnello V, Koffler D, Eisenberg JW, Winchester RJ, Kunkel HG. C1q PRECIPITINS IN THE SERA OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND OTHER HYPOCOMPLEMENTEMIC STATES: CHARACTERIZATION OF HIGH AND LOW MOLECULAR WEIGHT TYPES. *J Exp Med*. 1971 Sep;134(3):228–41.
42. Gammon WR, Wheeler CEJ. Urticarial vasculitis: report of a case and review of the literature. *Arch Dermatol*. 1979 Jan;115(1):76–80.
43. Monroe EW. Urticarial vasculitis: an updated review. *J Am Acad Dermatol*. 1981 Jul;5(1):88–95.
44. Jayakanthan K, Gupta AN, Mathew J, Ravindran R, Mahasampath G, Danda D. Clinical utility of anti-C1q antibody in primary and secondary vasculitic conditions. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(5):3–6.
45. Jennette JC, Stone JR. Chapter 11 - Diseases of Medium-Sized and Small Vessels. In: Willis MS, Homeister JW, Stone JRBT-C and MP of CD, editors. San Diego: Academic Press; 2014. p. 197–219. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124052062000119>

46. Coremans IE, Daha MR, van der Voort EA, Muizert Y, Halma C, Breedveld FC. Antibodies against C1q in anti-glomerular basement membrane nephritis. *Clin Exp Immunol.* 1992 Feb;87(2):256–60.
47. Strife CF, Leahy AE, West CD. Antibody to a cryptic, solid phase C1Q antigen in membranoproliferative nephritis. *Kidney Int.* 1989 Mar;35(3):836–42.
48. Chen K-R, Pittelkow MR, Su WPD, Gleich GJ, Newman W, Leiferman KM. Recurrent Cutaneous Necrotizing Eosinophilic Vasculitis: A Novel Eosinophil-Mediated Syndrome. *JAMA Dermatology* [Internet]. 1994 Sep 1;130(9):1159–66. Available from: <https://doi.org/10.1001/archderm.1994.01690090083012>
49. Mehregan DR, Gibson LE. Pathophysiology of urticarial vasculitis. Vol. 134, *Archives of dermatology.* United States; 1998. p. 88–9.
50. Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Saavedra MA. Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2009 Dec;11(6):410–5.
51. Aydogan K, Karadogan SK, Adim SB. Hypocomplementemic urticarial vasculitis : a rare presentation of systemic lupus erythematosus. 2006;1057–61.
52. Palazzo E, Bourgeois P, Meyer O, De Bandt M, Kazatchkine M, Kahn MF. Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome, Jaccoud's syndrome, valvulopathy: a new syndromic combination. *J Rheumatol.* 1993 Jul;20(7):1236–40.
53. Grimbert P, Schulte K, Buisson C, Desvaux D, Baron C, Pastural M, et al. Renal transplantation in a patient with hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2001 Jan;37(1):144–8.
54. Jones MD, Tsou E, Lack E, Cupps TR. Pulmonary disease in systemic urticarial vasculitis: the role of bronchoalveolar lavage. *Am J Med.* 1990 Apr;88(4):431–4.
55. Kobayashi S, Nagase M, Hidaka S, Arai T, Ikegaya N, Hishida A, et al. Membranous nephropathy associated with hypocomplementemic urticarial vasculitis: report of two cases and a review of the literature. Vol. 66, *Nephron.* Switzerland; 1994. p. 1–7.
56. Calvo-Romero JM. Diffuse large B cell lymphoma in a patient with hypocomplementemic urticarial vasculitis. *J Postgrad Med.* 2003;49(3):252–3.
57. Wei S, Segura S, Vendrell J, Aviles FX, Lanoue E, Day R, et al. Identification

- and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14954–64.
58. Wu HY, Wei P, Morgan JJ. Role of Cytosolic Carboxypeptidase 5 in Neuronal Survival and Spermatogenesis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(January):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41428>
 59. Tort O, Tanco S, Rocha C, Bièche I, Seixas C. The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. 2014;25.
 60. Lyons PJ, Sapio MR, Fricker LD. Zebrafish cytosolic carboxypeptidases 1 and 5 are essential for embryonic development. *J Biol Chem*. 2013 Oct;288(42):30454–62.
 61. Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* [Internet]. 1996;8(4):477–86. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00228148>
 62. Lindahl E, Azuara C, Koehl P, Delarue M. NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul;34(Web Server issue):W52–6.
 63. Porollo A, Meller J. Prediction-based fingerprints of protein-protein interactions. *Proteins*. 2007 Feb;66(3):630–45.
 64. Magyar C, Gromiha MM, Pujadas G, Tusnady GE, Simon I. SRide: a server for identifying stabilizing residues in proteins. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul;33(Web Server issue):W303–5.
 65. Kuznetsov IB. Ordered conformational change in the protein backbone: prediction of conformationally variable positions from sequence and low-resolution structural data. *Proteins*. 2008 Jul;72(1):74–87.
 66. Tiwari A, Panigrahi SK. HBAT: a complete package for analysing strong and weak hydrogen bonds in macromolecular crystal structures. *In Silico Biol*. 2007;7(6):651–61.
 67. Han J-H, Kerrison N, Chothia C, Teichmann SA. Divergence of interdomain geometry in two-domain proteins. *Structure* [Internet]. 2006 May;14(5):935–945. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.016>

68. Ponnuswamy PK. Hydrophobic characteristics of folded proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 1993;59(1):57–103.
69. Ranalli M, Passarelli C, Messina V, Pardeo M, Sacco E, Insalaco A, et al. FRI0554 DNASE1L3 VARIANT IN HYPOCOMPLEMENTEMIC URTICARIAL VASCULITIS SYNDROME IDENTIFIES A DIFFERENT CLINICAL PHENOTYPE. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2019 Jun 1;78(Suppl 2):972 LP – 973. Available from: http://ard.bmj.com/content/78/Suppl_2/972.2.abstract
70. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci.* 2010 Oct;123(Pt 20):3447–55.
71. Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem.* 2009 May;109(3):683–93.
72. Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Aviles FX, Fricker LD. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007 Mar;21(3):836–50.
73. Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme J-C, Bosson A, et al. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell.* 2010 Nov;143(4):564–78.
74. Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin Ther* [Internet]. 2014;36(10):1465–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.07.017>
75. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):454–60.
76. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood.* 2001 Aug;98(3):851–9.

FORMLAR

GENETİK ARAŞTIRMA AMAÇLI KAN ÖRNEĞİ ALINACAK KİŞİLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

1. “HİPOKOMPLEMENTEMİK ÜRTİKERYAL VASKÜLİT SENDROMLU HASTALARDA AGBL3 MUTASYONU ANALİZİ ” başlıklı klinik çalışmada kullanılmak üzere kolunuzdan 10 (10 ml) kan alınması gerekmektedir. Bu kandan, genetik materyal (DNA/RNA) ve/veya hücre elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.
2. Tanı örneğiniz bölümümüze ulaştıktan sonra kayıt edilip, numaralandırılarak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak şekilde saklanmaktadır.
3. Alınan biyolojik örneklerden DNA/RNA/hücre materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu arşivde kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
4. Tanı örneğinizde istenen tetkikler tamamlandıktan sonra yasal süre boyunca saklanacak şekilde arşivlenecektir. Tanı amaçlı yapılan analizler raporlandıktan sonra artan materyal hastalıkların genetiğini aydınlatmak ve tedaviye yönelik yeni hedeflerin belirlenmek amacıyla DETAE’de gerçekleştirilecek başka bilimsel araştırma projelerinde kullanılabilir.
5. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir. Ancak arzu ederseniz kişisel bulgularınıza ulaşma hakkına sahipsiniz.
6. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
7. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan kendi isteğiniz ile ve istediğiniz an ayrılabilirsiniz.
8. Bu çalışmada sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumundan herhangi bir ödeme alınması söz konusu olmadığı gibi size de çalışmaya katılmanız nedeniyle herhangi bir ödemede bulunulmayacaktır.
9. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu talebinizin/kararınızın gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz bir etkisi olmayacaktır.
10. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

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

NOT:

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

Formu Okuyup İmzalayan Kişinin;

Bilgilendiren Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Adı ve Soyadı:

Hastaya Yakınlık Derecesi:

Tarih:

İletişim Bilgileri:

İmza

Tarih:

İmza:

ETİK KURUL KARARI

	T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
Sayı : 903 Konu: Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ hk.		Tarih : 05.08.2019
 Sayın Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ Genetik Anabilim Dalı İlgili Genetik Anabilim Dalının 21/06/2019 gün ve 122249 sayılı yazısı Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Başra KARAÇAM' ın yürüteceği 2019/809 dosya numaralı "Hipokomplementemik Örtkeryal Vaskülit Sendromlu Hastalarda AGBL3 Mutasyonu Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 28/06/2019 tarih ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi rica ederim.		
  Prof. Dr. A.Yagız ÜRESİN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı		
Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu		

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HİPOKOMPLEMENTEMİK ÜRTİKERYAL VASKÜLİT SENDROMLU HASTALARDA AGBL3 MUTASYONU ANALİZİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 3	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.omicsonline.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	"Abstract Supplement 2019 ACR/ARP Annual Meeting", Arthritis & Rheumatology, 2019 Yayın	<% 1
7	insights.ovid.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	ÖZDEMİR, Selçuk, ARSLAN, Harun, ÖZENTÜRK, Uğur, YILDIRIM, Fatih and YILDIZ,	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Büşra	Soyadı	Karaçam
Doğ.Yeri	Zonguldak	Doğ.Tar.	25.07.1995
Email	busrakaracam18@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi – DETAE- Genetik programı	2020
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi - Mol.Bio. ve Genetik	2017
Lise	Karaman Fen Lisesi	2013

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2019-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		70

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	89,53	86,77	88,71
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap okumak,
Seyahat etmek,
Fotoğraf çekmek

