

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**MEFV GENİNDE “MUTASYON
SAPTANAMAYAN VEYA TEK MUTASYON
SAPTANAN” AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ
OLGULARINDA, FARKLI GEN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

DR. MEHMET KOCABEY

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**MEFV GENİNDE “MUTASYON
SAPTANAMAYAN VEYA TEK MUTASYON
SAPTANAN” AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ
OLGULARINDA, FARKLI GEN
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET KOCABEY

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2020.KB.SAG.009

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Ailevi Akdeniz Ateşi Tanımı	4
2.2.Epidemiyoloji.....	4
2.3.Genetik.....	5
2.4.Patogenez	7
2.5.Klinik Bulgular	12
2.6.Genotip-Fenotip Korelasyonu.....	16
2.6.1.Genotip-Fenotip Korelasyonu Kurulamamasından Doğan Hipotezler	18
2.7.Tanı	20
2.7.1.Tel Hashomer Kriterleri	20
2.7.2.Livneh Kriterleri.....	21
2.7.3.Türk Pediatrik Tanı Kriterleri	21
2.7.4.Eurofever/PRINTO Sınıflandırma Kriterleri	22
2.7.5.Genetik Analizlerin Tanıda Kullanımı.....	23
2.8.FMF Ayırıcı Tanısında Otoinflamatuvar Hastalıklar	24
2.8.1.Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenopati Sendromu (PFAPA)	24
2.8.2.Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS)	25
2.8.3.Hiperimmunglobulin D Sendromu / Mevalonat Kinaz Eksikliği (HIDS)	26
2.8.4.Kriopyrin İlişkili Periyodik Sendromlar	26
2.9.FMF Tedavisinde Kolşisin ve Etki Mekanizması.....	27
2.10.Aday Gen Araştırmalarında Tüm Ekzom Analizleri ve FMF	29

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	31
3.1.Hasta Seçimi	31
3.2.Verilerin Toplanması	32
3.3.Genomik DNA İzolasyonu	33
3.4.Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi.....	33
3.5.Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu	34
3.5.1.Real-Time PCR ile Sık Görülen Mutasyonların Tespiti	34
3.5.2.Otoinflamatuvar Hastalıklar NGS Paneli.....	35
3.6.Tüm Ekzom Dizileme (WES).....	36
3.6.1.WES Laboratuvar Aşamaları	37
3.6.2.WES Biyoinformatik Analizi.....	40
3.6.3.WES Verilerinin Klinik Analizi.....	40
4. BULGULAR	43
4.1.Olguların Demografik Özellikleri.....	43
4.2.Olguların Klinik Özellikleri.....	43
4.2.1.Aile I'e Ait Klinik Bulgular	43
4.2.2.Aile II'e Ait Klinik Bulgular.....	47
4.2.3.Aile III'e Ait Klinik Bulgular	48
4.2.4.Aile IV'e Ait Klinik Bulgular	49
4.2.5.Aile V'e Ait Klinik Bulgular.....	49
4.3.Tüm Ekzom Dizileme Sonuçları.....	51
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAKLAR.....	72
8. EKLER	86
EK 1.Etik Kurul Onayı	86
EK 2.Verit Kayıt Formu	88
EK 3.Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	90

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Tel-Hashomer Tanı Kriterleri
Tablo 2. Livneh Tanı Kriterleri
Tablo 3. Eurofever/PRINTO Klinik Kriterleri
Tablo 4. Eurofever/PRINTO Klinik ve Genetik Kriterleri
Tablo 5. Real-Time PCR ve Erime Eğrisi Analizi Tepkime Koşulları
Tablo 6. WES İçin Kullanılan Materyaller
Tablo 7. WES için Kullanılan Ekipman
Tablo 8. Çalışmaya Katılan Vakaların Klinik Bulguları
Tablo 9. Tüm Ekzom Dizileme Kalite Parametreleri
Tablo 10. Olgu I.1'e Ait Olası FMF İlişkili Varyantlar
Tablo 11. Olgu II.1'e Ait Olası FMF İlişkili Varyantlar
Tablo 12. Olgu III.1'e Ait Olası FMF İlişkili Varyantlar
Tablo 13. Olgu IV.1'e Ait Olası FMF İlişkili Varyantlar
Tablo 14. Olgu V.1'e Ait Olası FMF İlişkili Varyantlar

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Pyrin Fonksiyonel Alt Ünitelerinin Şematik Görünümü ve Bazı Sık Görülen Mutasyonların Protein Üzerindeki Lokalizasyonları
- Şekil 2.** Pyrin İnflamazom Yolağı
- Şekil 3.** Pyrin Aktivasyonu ile Mikrobiyal Toksinlerin İlişkisi
- Şekil 4.** Caspase-1 ve Dimerizasyon/Otoproteoliz Sonrası Oluşan Aktif Formu
- Şekil 5.** FMF Bulguları ve Görülme Sıklıkları
- Şekil 6.** *Colchicum Autumnale* Bitkisi ve Kolşisin Kimyasal Yapısı
- Şekil 7.** Çalışmaya Katılan İndeks Vakaları ve Birinci Derece Akrabalarını Gösteren Pedigriler
- Şekil 8.** WES Verilerine 1. Basamak Filtreleme Yapılırken İzlenilen Strateji
- Şekil 9.** WES Verilerine 2. Basamak Filtreleme Yapılırken İzlenilen Strateji
- Şekil 10.** STRING Uygulamasının Kullanımı
- Şekil 11.** GeneMANIA Uygulamasının Kullanımı
- Şekil 12.** BIRC2 Protein Yapısı

KISALTMALAR

μl	Mikrolitre
ACMG	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği - ('American College of Medical Genetics and Genomics')
bç	Baz çifti
CARD	'Caspase Activation and Recruitment Domain'
cDNA	Komplementer DNA
DAVID	'Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery'
dbSNP	'The Single Nucleotide Polymorphism Database'
DEÜTF	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
EULAR	'European League Against Rheumatism'
FCAS	Ailesel Soğuk Otoinflamatuvar Sendrom - ('Familial Cold Autoinflammatory Syndrome')
FMF	Ailevi Akdeniz Ateşi - ('Familial Mediterranean Fever')
hg19	'Human Genome 19'
HIDS	Hiperimmünglobulin D Sendromu
IbpA	'Immunoglobulin-binding Protein A' (<i>Histophilus somni</i>)
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
MAF	Minör Allel Frekansı
MWS	Muckle-Wells Sendromu
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
ng	Nanogram
NGS	Yeni Nesil Dizileme - ('Next Generation Sequencing')
NOMID	Neonatal Başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar Hastalık - ('Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease')
OMIM	'Online Mendelian Inheritance in Men'
PAAND	Pyrin İlişkili Otoinflamasyon ve Nötrofilik Dermatoz - ('Pyrin Associated Autoinflammation with Neutrophilic Dermatoses')
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu - ('Polymerase Chain Reaction')
PFAPA	Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenopati Sendromu - ('Periodic Fever with Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenopathy')
PRINTO	'Pediatric Rheumatology International Trials Organization'
PRR	Patern Tanıyıcı Reseptör - ('Pattern Recognition Receptor')
PYCARD (eski adı ASC)	PYD ve CARD Bölgesi İçeren Protein - ('Apoptosis Associated Speck-like Protein Containing a CARD')
PYD	'Pyrin Domain'
REVEL	'Rare Exome Variant Ensemble Learner'
siRNA	'Small Interfering RNA'
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi - ('Single Nucleotide Polymorphism')
STRING	'Search Tool for Recurring Instances of Neighboring Genes'
TcdA/B	<i>Clostridium difficile</i> toksin A / B
TecA	'T6SS Effector Protein Affecting Cytoskeletal Architecture' (<i>Burkholderia cenocepacia</i>)

Ti/Tv	Tranzisyon/Transversiyon
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR1	TNF Reseptör 1
TRAPS	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü İlişkili Periyodik Sendrom – (‘TNF Receptor Associated Periodic Syndrome’)
UTR	‘Untranslated Region’
VopS	‘Vibrio Outer Protein S’ (<i>Vibrio parahaemoliticus</i>)
VUS	Klinik Önemi Belirsiz Varyant - (‘Variant of Uncertain Significance’)
WES	Tüm Ekzom Dizileme - (‘Whole Exome Sequencing’)
WT	‘wild type’
YopT / E / M	<i>Yersinia</i> Outer Protein T / E / M



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasından itibaren her aşamasında büyük katkısı olan, her zaman beni gülen yüzü ile karşılayan, değerlendirmeleri ve önerileri ile daima daha iyiye yönelmemi sağlayan değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Özlem Giray Bozkaya'ya,

Tez verilerimin analizinde değerli düşünce ve tavsiyeleriyle bana yol gösteren, araştırma arzusu ve titizliğiyle her zaman örnek aldığım sayın Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan'a,

Bu projenin gerçekleşmesini sağlayan, projeye değerli görüşleri ile katkı veren sayın Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübeleriyle yetişmemde büyük emekleri olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Murat Derya Erçal'a, Doç. Dr. Elçin Bora'ya, Doç. Dr. Tufan Çankaya'ya ve Doç. Dr. Altuğ Koç'a,

Tez hastalarımın belirlenmesinde desteğini esirgemeyen DEÜTF Çocuk Nefroloji Bilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Alper Soylu'ya,

Projeye maddi desteklerinden ötürü Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Dört yıl boyunca dostluklarını esirgemeyen, hastanede geçirdiğim tüm vakitleri eğlenceli ve mutlu anılara çeviren Tıbbi Genetik ve Çocuk Genetik bölümlerindeki sevgili hekim arkadaşlarıma,

Bir parçası olmaktan onur duyduğum, her birinin pırlanta gibi insanlar olduğunu düşündüğüm, bölümde bir aile ortamı oluşmasını sağlayan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanı tüm arkadaşlarıma,

Son olarak bugünlere gelmemde en büyük emek ve fedakarlıklarda bulunan, bana olan inançları, sabırları, destekleri ve en önemlisi de sevgileriyle her zaman yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama ve biricik eşim Duygu'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Mehmet Kocabey

ÖZET

MEFV GENİNDE “MUTASYON SAPTANAMAYAN VEYA TEK MUTASYON SAPTANAN” AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ OLGULARINDA, FARKLI GEN VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Mehmet KOCABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İZMİR

Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF); kendini sınırlayan ateş atakları ve beraberinde seröz zarların inflamasyonu ile seyreden bir otoinflamatuvar hastalıktır. Ülkemizde en sık görülen genetik hastalıklardan biridir ve otozomal resesif kalıtmı olduğu kabul edilmektedir. *MEFV* geni biallelik mutasyonları ile ilişkilendirilmesine karşın olguların yaklaşık %25-30’unda sadece tek mutasyon saptanmaktadır veya hiç mutasyon saptanmamaktadır.

Bu çalışmada 2019 yılı içerisinde Tel-Hashomer kriterleri doğrultusunda kesin tanı konulan, kolşisin tedavisine olumlu yanıt vermiş fakat genetik incelemede biallelik *MEFV* mutasyonu saptanmayan 5 indeks olgu ve birinci derece akrabaları olmak üzere toplam 17 bireyde tüm ekzom dizileme çalışılmıştır. *MEFV* harici genlerde kliniğe sebep olan yeni varyantların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Tüm ekzom dizileme sonucu olgularda kişi başına saptanan ortalama 33.474 varyant minör allel frekansları ve protein üzerindeki etkileri temel alınarak filtrelenmiş ve güncel kılavuzlara göre analiz edilmiştir. Beş indeks olgunun tamamında ortak olarak bulunan bir genetik değişim saptanmamıştır. Varyantların ilişkili bulundukları hücresel yollar belirlenerek karşılaştırılmış fakat ortak olarak etkilenmiş bir yolak tespit edilmemiştir. Olgular bireysel olarak incelendiğinde immünite ilişkili yollarda bir olguda *BIRC2* geninde, bir başka olguda ise *BCL10* geninde *de novo* varyantlar saptanmıştır. Bu varyantların fizyopatolojik ilişkisinin kesinleştirilebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma; monoallelik *MEFV* mutasyonlu FMF olgularında yapılan literatürdeki en geniş çaplı etyolojik araştırma özelliği taşımaktadır. Olguların tamamında genotip-fenotip korelasyonu kurulmasını sağlayacak tek bir nadir varyant bulunmadığı gösterilmiştir. Söz konusu olgularda geniş serilerde poligenik/multifaktöryel etkenlerin araştırılması gerekliliği ortaya konmuştur. FMF genetiği hakkındaki bilgilerin artmasıyla gelecekte doğru tanı, tedavi ve izlem algoritmaları geliştirilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi, Tüm ekzom dizileme, *MEFV*, *BIRC2*, *BCL10*

SUMMARY

INVESTIGATION OF FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER CASES WITHOUT *MEFV* MUTATION OR WITH SINGLE *MEFV* MUTATION FOR DIFFERENT GENE VARIANTS

Mehmet KOCABEY, MD

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Izmir

Familial Mediterranean Fever (FMF); is an autoinflammatory disease characterized by periodic fever and concurrent episodes of serous membrane inflammation. FMF is one of the most common genetic diseases in Turkey and is considered to be inherited in an autosomal recessive manner. Although biallelic mutations in *MEFV* gene is associated with disease, in approximately 25-30% of cases only a single mutation is detected.

In this study, we performed whole exome sequencing (WES) in 17 individuals, including 5 index cases and their first-degree relatives, who were diagnosed in accordance with the Tel-Hashomer criteria in 2019, responded positively to colchicine treatment, but had no biallelic *MEFV* mutation in genetic evaluation. We aimed to find novel gene variants that can contribute to FMF.

An average of 33.474 variants per person were revealed as a result of WES. We filtered rare non-synonymous exonic variants and analyzed clinically according to current guidelines. No shared gene or variant was detected in index cases. The cellular pathways which filtered variants are associated with were identified and compared, but no common affected pathway was identified. When the cases were examined individually, *de novo* variants were found in one case in the *BIRC2* gene and in another case in the *BCL10* gene. Additional studies are needed to confirm the physiopathological relationship of these genes with FMF.

This study is the most extensive etiological research in FMF cases with monoallelic *MEFV* mutation performed in the literature. We have shown that genotype-phenotype correlation in these cases may not be established by a single rare genetic variant. The necessity of additional investigations in larger series for polygenic/multifactorial factors has been revealed. By increasing knowledge about FMF genetics, accurate diagnosis, treatment and follow-up algorithms can be developed in the future.

Keywords: Familial Mediterranean Fever, Whole exome sequencing, *MEFV*, *BIRC2*, *BCL10*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF: ‘Familial Mediterranean Fever’); kendini sınırlayan ateş atakları ve beraberinde seröz zarların inflamasyonu ile seyreden otozomal resesif kalıtmı bir otoinflamatuvar hastalıktır. Özellikle Doğu Akdeniz havzasında yaşayan Türk, Ermeni, Yahudi ve Arap toplumlarında yüksek oranda görülmektedir. Hastalıktan 16. kromozomun kısa kolunda yer alan *MEFV* geni mutasyonları sorumludur. Taşıyıcılık oranları ve prevalansı göz önüne alındığında FMF, Türkiye’de en sık görülen tek gen hastalıklarından biri olarak göze çarpmaktadır. Kesin tanı, uluslararası kabul görmüş Tel-Hashomer kriterlerine uyum ile konulur. Hastalarda rastlanan belirti ve bulgular geniş bir yelpazede karşımıza çıkabildiği için ayırıcı tanıda pek çok farklı hastalığın (enfeksiyöz, immünolojik, romatolojik vb...) düşünülmesi gerekmekte ve tanı hızla konulamayabilmektedir. Şüpheli durumlarda hastalara ampirik kolşisin tedavisi başlanarak olgu takip edilebilir ve ataklarda azalma olup olmamasına göre tanı kesinleştirilebilir (1).

Hastalık ile ilişkilendirilmiş çok sayıda *MEFV* mutasyonu saptanmıştır. Hastalığın bilinen kalıtım şekli göz önünde bulundurulduğunda, bulgu ve belirtilerin ancak biallelik mutasyon varlığında açığa çıkması gerekliliği aşıkardır. Buna rağmen klinik olarak kesin tanı almış hastaların %25-30 kadarında ancak tek mutasyon saptanabilmekte veya hiç mutasyon saptanamamaktadır (2). *MEFV* geninin kodlayan bölgelerinin tamamının dizi analizi ile incelenmesi dahi bu sonucu değiştirmemektedir (3). Dolayısıyla genetik inceleme tek başına olguları açıklamakta yetersiz kalmaktadır.

Araştırma hipotezimiz; “Tel Hashomer kriterleri doğrultusunda tanı konulan ve kolşisin tedavisinden yarar gören, fakat genetik incelemede mutasyon saptanamayan veya tek mutasyon saptanabilen (yani biallelik mutasyon saptanamayan) olgularda *MEFV* harici genlerde FMF kliniğine sebep olan varyantlar bulunabileceği” şeklindedir. Bu amaçla, söz konusu olguların tüm ekzom analizi ile ileri moleküler karakterizasyonu sonrası FMF için yeni düzenleyici genler tanımlamayı hedefledik. FMF patogenezindeki yolların aydınlığa kavuşturulması ile hastalığın genetik tanısı kolaylaşacak, yanlış uygulamaların önüne geçilebilecek ve uzun vadede hedefe yönelik genetik tedaviler geliştirilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Tanımı

Otoinflamatuvar hastalıklar; doğal immun sistemin bozuklukları sonucu, otoantikor veya antijene spesifik T lenfosit bulunmadan, tekrarlayıcı vasıfta, lokalize veya sistemik inflamasyon atakları ile seyreden bir hastalık grubudur (4). Yaklaşık 30 farklı monogenik hastalık tanımlanmış olmakla beraber bu grubun en sık tanı konulan ve en iyi bilinen prototipi Ailevi Akdeniz Ateşi olarak karşımıza çıkmaktadır.

FMF; kendini sınırlayan ateş atakları ve beraberinde seröz zarların inflamasyonu ile seyreden otozomal resesif kalıtmı (OMIM: “Online Mendelian Inheritance in Men” #249100) bir otoinflamatuvar hastalıktır. Hastalığın ilişkili saptandığı *MEFV* ('MEditerranean FeVer') geni, 1997 yılında iki farklı uluslararası konsorsiyumun çalışmaları sonucunda tanımlanmıştır (5,6).

2.2. Epidemiyoloji

Ailevi Akdeniz Ateşi, özellikle Doğu Akdeniz havzasında yaşayan Türk, Ermeni, Yahudi ve Arap toplumlarında yüksek oranda görülmektedir. Fakat tarihsel süreçte toplumsal hareketlerin de etkisiyle Yunanistan ve İtalya başta olmak üzere diğer toplumlara da *MEFV* mutasyonlarının yayıldığı gösterilmiştir (7,8). Ülkemizde yapılan epidemiyolojik araştırmalarda *MEFV* genindeki varyantların varlığına göre hesaplanan taşıyıcılık oranları farklı değerlerdedir. Orta Anadolu bölgesinde 100 sağlıklı kontrol üzerinden yapılan bir araştırmada %20 ve Karadeniz bölgesinde 100 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir araştırmada %27 gibi yüksek taşıyıcılık oranları saptanmıştır (9,10). Güneydoğu Anadolu bölgesinde 667 sağlıklı kontrol üzerinden yapılan bir araştırmada ise %3,8 taşıyıcılık oranı saptanmıştır (11).

FMF prevalansı ülkemiz genelinde yaklaşık 1/1000 civarında kabul edilmektedir (12). Bölgesel düzeydeki çalışmalarda taşıyıcılık oranlarına benzer şekilde farklılıklar göze çarpmaktadır. Batı Anadolu'da %0,027, Orta Anadolu'da %0,25 ve Karadeniz bölgesinde ise %0,82 gibi değişken değerlerde bildirilmiştir (13–15). Taşıyıcılık oranları ve prevalansı göz önüne alındığında FMF; Türkiye'de en sık görülen tek gen hastalıklarından biri olarak göze

çarpmaktadır. Ülkemiz, 83 milyon kişilik nüfusu değerlendirildiğinde yaklaşık 80.000 hasta ile muhtemelen dünyadaki en büyük hasta popülasyonuna sahip ülkedir. Öte yandan bildirilen taşıyıcılık değerleri ve prevalans değerleri birbiriyle tam örtüşmemektedir. Yüksek taşıyıcılık oranları aracılığıyla öngörülen yüksek prevalans, çalışmalarda karşımıza çıkmamaktadır. Yüzde 20 taşıyıcılık oranı olan ve Hardy-Weinberg kuralına görece uyumlu olan bir toplumda beklenen prevalans yaklaşık olarak %1,28 civarında olmalıdır veya 1/1000 prevalans ile beklenen taşıyıcılık oranı yaklaşık olarak %6,12 olmalıdır. Şüphesiz hiçbir toplumda allel frekanslarının Hardy-Weinberg kuralına tam uyum göstermesi beklenemez fakat saptanan prevalans beklenenin çok altında gözükmemektedir. Araştırma metodolojisindeki ve bölgesel farklılıklardaki etkenler bu farklılığı bir miktar açıklayabilir fakat daha büyük bir olasılıkla *MEFV* varyantları tek başlarına taşıyıcılığın belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır.

2.3. Genetik

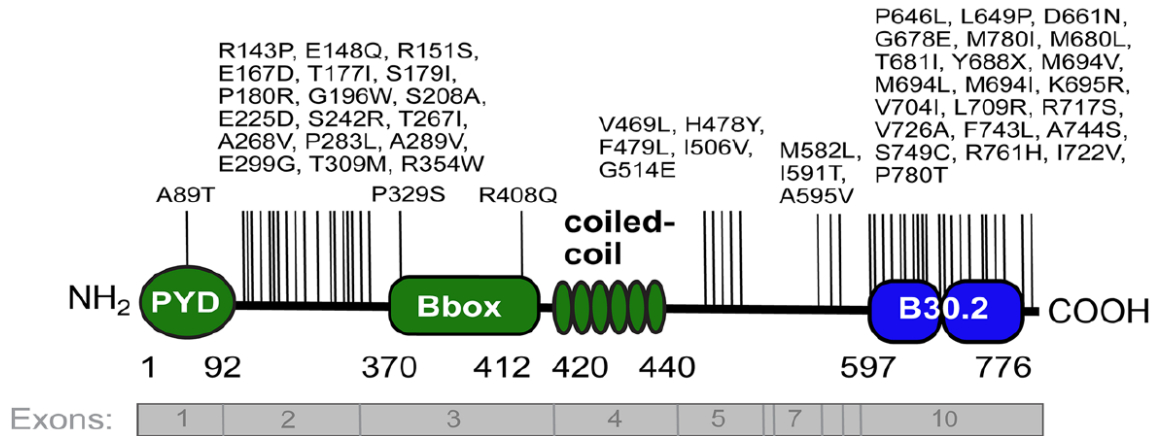
Ailevi Akdeniz Ateşi 1908 yılında ilk kez tanımlandıktan sonra olgulardaki ailevi geçiş paterni bilim insanlarının hemen dikkatini çekmiştir (16). Heller ve arkadaşları 1958-1967 yılları arasında yayınladıkları geniş çaplı FMF çalışmalarında sundukları çeşitli pedigriler aracılığıyla hastalığın önce inkomplet penetranslı otozomal dominant geçiş paterni gösterebileceğini düşünmüş, fakat daha sonra otozomal resesif kalıtım paterni gösterdiğini bildirmişlerdir (17–19). Linkaj analizleri sonucu 1992 yılında Pras ve arkadaşları hedef genin 16. kromozomun kısa kolunda bulunduğunu göstermiştir (20). Ertesi sene Aksentijevich ve arkadaşları, 16. kromozomun kısa kolunda daha dar bir alana lokalize edilebilmesi için linkaj analizlerinin yanısıra homozigosite haritalaması yöntemini kullanmışlardır (21). Bu çalışmalar; akraba evliliği sonucu doğan hasta bireylerde aynı ailedeki sağlıklı kardeşlere nazaran hastalığa yol açan bölgelerin kalıtım yoluyla aynı ('homozygous by descent') olacağı prensibine dayanmaktadır. Fakat yüksek taşıyıcılık oranları nedeniyle akraba evliliği sonucu doğsa bile hasta bireylerin kalıtım yoluyla aynı allellere sahip olmama ihtimali ve o dönem ilgili kromozom bölgesinde iyi tanımlanmış polimorfik işaretleyicilerin eksikliği nedeniyle hedef gene kesin olarak ulaşılamamıştır. Zamanla moleküler tekniklerin de ilerlemesi ile hedef bölge daraltılmış ve pozisyonel klonlama yöntemi ile 1997 yılında iki farklı uluslararası konsorsiyumun çalışmaları sonucunda *MEFV* geni tanımlanmıştır (5,6).

MEFV geni 16p13.3 bölgesinde yer alan 10 ekzonlu bir gendir ve 781 aminoasitten oluşan, 86 kDa moleküler ağırlığındaki Pyrin/Marenostrin proteinini kodlar. Pyrin, yunanca ateş ('pyros') kelimesinden türetilmiştir. Marenostrin ismi ise Roma İmparatorluğu döneminde Akdeniz için kullanılan 'mare nostrum' (bizim deniz) deyiminden türetilmiştir. Günümüzde *MEFV* geni içerisinde tanımlanmış olan 350'nin üzerinde varyant bulunmaktadır ve "Infevers" veritabanında listelenmektedir (22). Genin tüm lokasyonlarında (5' UTR, 3' UTR, tüm ekzonlar ve intronlarında) değişimler bulunabildiği gösterilmiştir (22). 2015 yılında Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği'nin (ACMG: 'American College of Medical Genetics and Genomics') yayınladığı patojenisite değerlendirme kriterleri uyarınca bu varyantlar vanGijn ve arkadaşları tarafından tekrar değerlendirilmiştir (23,24). Diğer otoinflamatuar hastalık genlerinden farklı olarak *MEFV* geni varyantları, yüksek oranda (%42) klinik önemi bilinmeyen varyantlar olarak sınıflandırılmaktadır (24). Görülme sıklıkları da göz önünde bulundurulduğunda hastalık sebebi olarak ilk aşamada toplam 14 mutasyona bakılmasının yeterli olduğu bildirilmektedir (25,26). Bu mutasyonlar gen içerisindeki lokalizasyon sırasıyla; E148Q, E167D, T267I, P369S, F479L, I591T, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S, R761H, I692del ve K695R varyantlarıdır. E148Q, P369S ve I591T varyantlarının patojenisitesi klinik önemi belirsiz olarak bildirilmektedir (22). Hastalığın klasik formundan sorumlu olan patojenik varyantlar büyük oranda 10. ekzonda veya daha nadiren 1,2,3 ve 5. ekzonlarda bulunmaktadır. Mutasyonlara ait bir diğer kritik özellik neredeyse tüm mutasyonların yanlış anlamlı ('missense') mutasyonlar olması ve neredeyse hiç yıkıcı mutasyon (çerçeve kayması, 'nonsense', başlangıç kodonu mutasyonları vb...) görülmemesidir.

Son yıllarda ekzon 8 içerisinde yer alan T577 aminoasidine ait mutasyonların, H478Y veya kompleks allellere sahip olguların klasik fenotipe benzeyen, kolşisine dirençli olabilen dominant kalıtmımlı bir FMF formuna yol açabildiği de bildirilmektedir (27–30). Benzer şekilde ekzon 2'de yer alan bazı nadir mutasyonların da (S242R, E244K) proteindeki bir bağlanma motifini bozarak ateşin eşlik ettiği nötrofilik dermatoz ile seyreden ve 'Pyrin İlişkili Otoinflamasyon ve Nötrofilik Dermatoz' olarak adlandırılan otozomal dominant kalıtmımlı yeni bir fenotipe yol açtığı öne sürülmektedir (31,32). Tüm yeni bulgular ışığında FMF genetiği hakkındaki bilgilerimizin yetersiz kaldığı gözükmemektedir. Pyrin proteininin görevleri ve hastalık patogenezi hakkındaki bilgilerin artmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Patogenez

FMF patogenezini *MEFV* geninin bulunmasının üzerinden geçen 20 yıla rağmen halen tüm detaylarıyla anlaşılamamıştır. Diğer otoinflamatuvar hastalıklarda olduğu gibi, FMF’de de interlökin 1 beta (IL-1 β) aracılı sistemik inflamasyonun görüldüğü artmış doğal immunité cevabı göze çarpmaktadır (33). Pyrin; başlıca myeloid hücre serilerinde (olgun nötrofillerde, eozinofillerde, monosit/makrofajlarda...) eksprese olduğu bilinen ve myeloid diferansiasyon sırasında artmış ekspresyonu olduğu gösterilen bir proteindir (34,35). İnterferon gama, TNF (Tümör Nekrozis Faktör) ve lipopolisakkarit gibi pro-inflamatuvar ajanların Pyrin sentezini arttırdığı; interlökin-4 ve interlökin-10 gibi anti inflamatuvar ajanların ise Pyrin sentezini baskıladığı gösterilmiştir (35). Pyrin proteini içerisinde, ikincil yapı ve sekans benzerliklerinden yola çıkılarak toplam 4 farklı fonksiyonel ünite bulunduğu bilinmektedir. Bunlar proteinin N terminalinden C terminaline doğru sırasıyla ‘PYRIN’ alt bölgesi (PYD), çinko parmak alt bölgesi, ‘Coiled coil’ alt bölgesi ve mutasyonların en sık görüldüğü B30.2 alt bölgesidir (Şekil-1) (36). Farelerdeki homolog pyrinde ise B30.2 alt bölgesi bulunmamaktadır (36). Bu durum hem fare çalışmalarını yorumlamakta güçlük yaratmakta hem de klinik açıdan önemli olan B30.2 bölgesinin fonksiyonunu netleştirmeyi zorlaştırmaktadır.

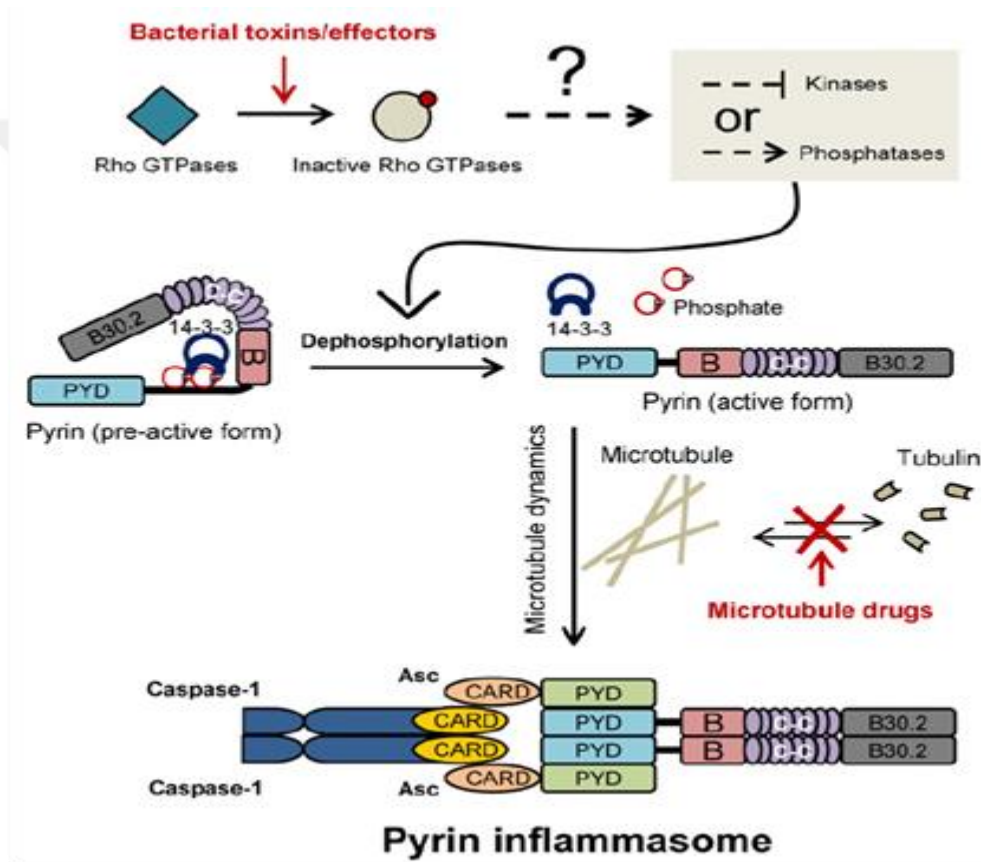


Şekil-1: Pyrin fonksiyonel alt ünitelerinin şematik görünümü ve bazı sık görülen mutasyonların protein üzerindeki lokalizasyonları. PYD: ‘Pyrin domain’, Bbox: Çinko parmak alt bölgesi. [Heilig ve Broz, 2018. “Function and Mechanism of the Pyrin Inflammasome” makalesinden alıntıdır (36).]

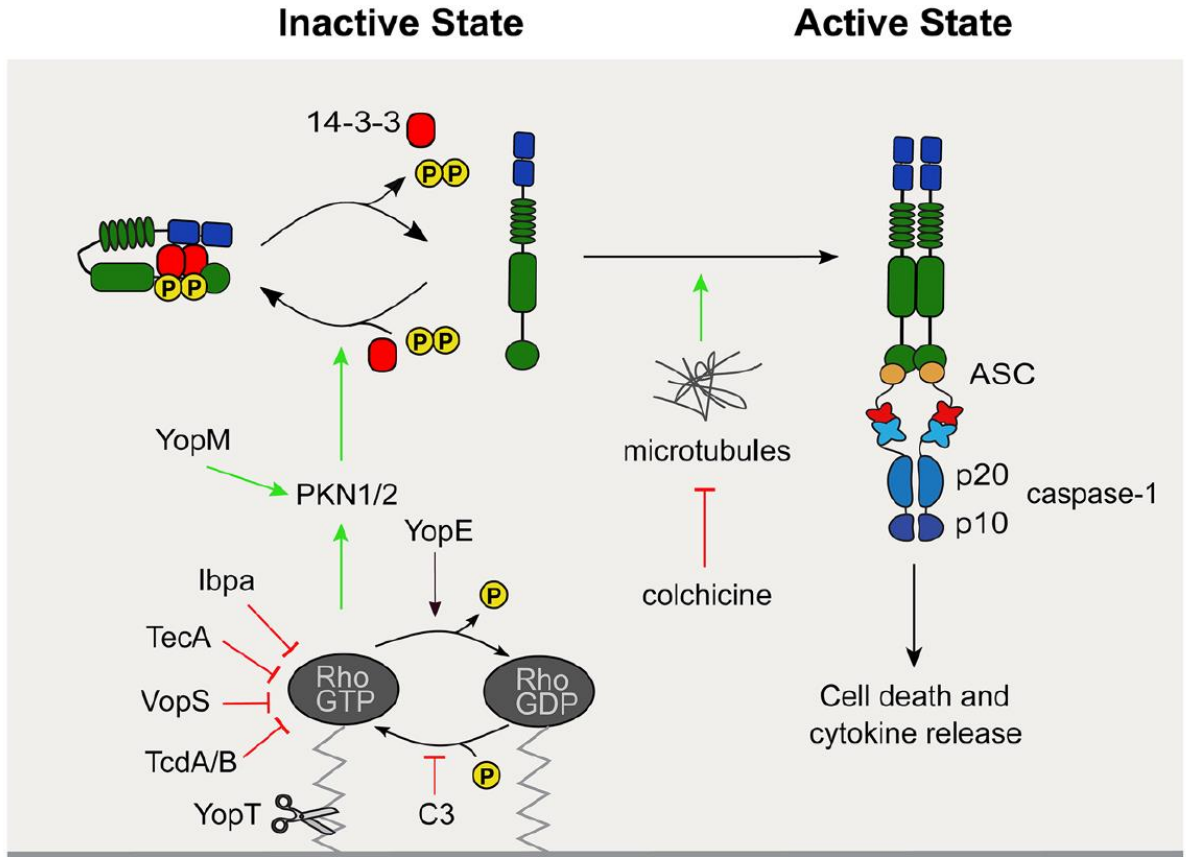
Pyrin'in hücre içi görevi 2002 yılında inflamazom adı verilen multiprotein komplekslerinin tanımlanmasından sonra daha iyi anlaşılmıştır (37). Günümüzde sitozolik inflamazom kompleksleri doğal immun yanıtın ortaya konmasında ve düzenlenmesinde merkezi bir pozisyonda değerlendirilmektedir (38). Pyrin de bu komplekslerin oluşumunda ve regülasyonunda görev alarak IL-1 β sentez yolağının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Fizyolojik koşullarda yabancı ajanlara ait materyalleri veya biyolojik etkileri tanıyan patern tanıyıcı reseptörlerin (PRR: 'Pattern recognition receptor') aktivasyonu ile inflamazom aracılı doğal immun yanıt tetiklenir. Başlıca PRR'ler; hücre zarındaki Toll benzeri reseptörler, sitozolik Nod benzeri reseptörler, RIG-1 ('retinoic acid inducible gene-1') benzeri reseptörler ve C-tipi lektin reseptörleridir (39). Bu reseptörlerin görevi patojen mikroorganizmalar ile sıklıkla ilişkili olan molekülleri (Örn: lipopolisakkaritler, endotoksinler, flagellin, lipoteikoik asit vb...) tanıyarak mikrobisidal ve pro-inflamatuar yanıtları tetiklemek, adaptif immun yanıtı uyarıcı sinyalleri başlatmak, gerekirse de hücre ölümünü başlatmaktır (39). Nod benzeri reseptörlerde de bulunan PYD alt ünitesini içermesi ve inflammatuar süreçler ile ilişkisi nedeniyle Pyrin'in de patern tanıyıcı reseptör olabileceği düşünülmüştür fakat tam olarak hangi çevresel etkenlere yönelik tanıma görevi olduğu net değildir.

2014 yılında Xu ve arkadaşlarının kritik çalışmasında Pyrin'in mikrobiyal uyarıyı indirekt yollarla tanıyarak olabileceği gösterilmiştir (40). Buna göre Pyrin, diğer PRR'lerden farklı olarak toksin aracılı Rho GTPaz inaktivasyonunu indirekt olarak tanımaktadır (40). Rho proteinleri özellikle hücre iskeleti ve aktin dinamikleri ile ilgili düzenleyici fonksiyonlar üstlenen proteinlerdir (41). Fizyolojik koşullarda normal Rho GTPaz, serin-treonin kinazların (PKN1/PKN2: 'protein kinase N1/N2') aktivasyonu aracılığıyla Pyrin fosforilasyonuna yol açar. 205. ve 241. pozisyonlardaki serin rezidüleri üzerinden gerçekleşen fosforilasyon sonucu oluşan fosforile Pyrin, 14-3-3 proteinlerine bağlanarak inaktif tersiyer yapıda bulunur (42). Bu sayede inflamasyon yolağı inhibisyon altında bakteriyel uyarı gelene kadar bekletilir (Şekil-2) (43). Bu kritik keşif aynı zamanda Pyrin'in hangi mikrobiyal etkenlere karşı duyarlı olduğunu ön görmemize de yardımcı olmaktadır. *Clostridium difficile* TcdB toksini, *Vibrio parahaemolyticus* VopS toksini, *Histophilus somni* IbpA toksini ve *Clostridium botulinum* ADP-ribozilleyici C3 toksininin Pyrin inflamazom yolağını tetikleyebildiği Xu ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (40). Pyrin'in diğer PRR'lerden farklı olarak normal hücre içi yolaklardaki bozulmayı tanıması, evrimsel açıdan yeni ortaya çıkacak organizmalara karşı doğal immun yanıt oluşturabilme kabiliyeti sağlaması açısından çok değerlidir. Öte yandan

mikroorganizmaların da pyrin aktivasyonunu engellemeye yönelik süreçleri evrimsel süreçte geliştirmesi normaldir. Örneğin *Yersinia Pestis*, RhoA GTPaz'ı inaktive etmesine karşın salgıladığı YopM faktörü ile serin/treonin kinazları direkt olarak aktive etmekte ve pyrin inflamazom yolağını inhibisyon altında tutmaktadır (Şekil-3) (44). Özellikle Akdeniz havzasında ve dünyadaki FMF olgularında, atakları tetikleyen çevresel ajanların veya süreçlerin aydınlatılması için bu bilgi ekseninde yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



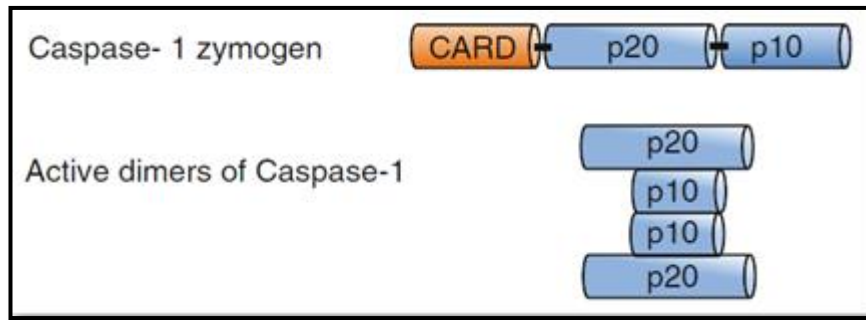
Şekil-2: Pyrin inflamazom yolağı. (PYD: ‘Pyrin Domain’, CARD: ‘Caspase Activation and Recruitment Domain’)[Gao vd., 2016. “Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation” makalesinden alıntıdır (42).]



Şekil-3: Pyrin aktivasyonu ile mikrobiyal toksinlerin ilişkisi. İnaktif durumda fosforile pyrin, 14-3-3 proteinine bağlanarak fonksiyon göstermez. Bakteriyel toksinlerce Rho sinyali bozulduğunda pyrin defosforile olarak aktif hale gelir. Ibpa, TecA, VopS, TcdA/B, YopT, C3 ve YopE toksinleri Rho sinyalini bozarken YopM toksini direk PKN1/2 aktivasyonu ile Pyrin'i inhibe eder. [Heilig ve Broz, 2018. "Function and Mechanism of the Pyrin Inflammasome" makalesinden alıntıdır (36).]

Çevresel bir etken sonucunda Rho sinyali ortadan kalktığında PKN1 ve PKN2'nin pyrin ile etkileşimi azalmaktadır. Normal fare (pyrin^{WT/WT}), insan pyrin C terminaldeki B30.2 bölgesi eklenmiş mutant fare (pyrin^{B30.2+/B30.2+}) ve sık görülen mutasyonların eklendiği mutant fare (pyrin^{M694V/M694V}) karşılaştırıldığında pyrin'in, PKN1 ve PKN2 aracılı fosforilasyona; pyrin^{M694V/M694V} > pyrin^{B30.2+/B30.2+} > pyrin^{WT/WT} sırasıyla direnç gösterdiği bildirilmiştir (43). Dolayısıyla FMF olgularında mutasyonların en sık görüldüğü B30.2 bölgesi Pyrin inhibisyonuna direnç ile ilişkili olabilir.

Pyrin fosforilasyonu ortadan kalktığında, fosforile Pyrin ile bağlanarak onu inhibisyon altında tutan 14-3-3 proteinleri ortamdan ayrılır (43). Sonrasında Caspase-1 aktivasyonuna ilerleyen sürecin ilk aşaması Pyrin'in N-terminalindeki PYD alt bölgesi ile PYCARD (eski adıyla ASC: 'Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD') adı verilen proteinin etkileşimidir (45). PYCARD, 22 kDa moleküler ağırlığında bir protein olup başlıca iki fonksiyonel ünitesi bulunmaktadır: N-terminalindeki PYD bölgesi ve C-terminalindeki CARD ('Caspase Activation and Recruitment Domain') bölgesi (46). Pyrin^{PYD} ve ASC^{PYD} bölgelerinin karşılıklı etkileşimi ile ASC oligomerizasyonu meydana gelir (36,45). ASC oligomerizasyonu için Pyrin oligomerizasyonu da gerekmektedir ve bu da Pyrin'in 'coiled coil' bölgesi aracılığıyla gerçekleşmektedir (47). ASC^{CARD} bölgesi aracılığıyla Procaspase-1'i ortama getirir. Dolayısıyla ASC, Pyrin ve Caspase-1 arasında adaptör görevi yerine getirmektedir (46). Pyrin aracılı inflamazomun yanı sıra diğer PRR'ler aracılı inflamazom kompleksleri de (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 vb...) caspase 1'in zimojen formunun dimerizasyonuna olanak sağlayan moleküler platform görevi görürler (48). Zimojen Caspase-1 üç ana bölümden oluşur. CARD bölümü aracılığıyla inflamazomlara tutunurken, p20 ve p10 bölümleri otoproteoliz sonrası enzimatik olarak aktif hale gelecek bölümlerdir. Dimerize zimojen Caspase-1, otoproteoliz sonucu aktif Caspase 1'leri meydana getirir (Şekil-4) (48).



Şekil-4: Caspase-1 ve dimerizasyon / otoproteoliz sonrası oluşan aktif formu. [Guey ve Petrili, 2016. "Assessing Caspase-1 Activation" makalesinden alıntıdır (48).]

Aktif sitozolik caspase-1 tarafından IL-1 β prekürsörünün yıkımı sonucu aktif IL-1 β meydana gelir. Biyolojik aktif IL-1 β ; inflamasyonun sistemik etkilerinin ortaya çıkmasına aracılık eder (48).

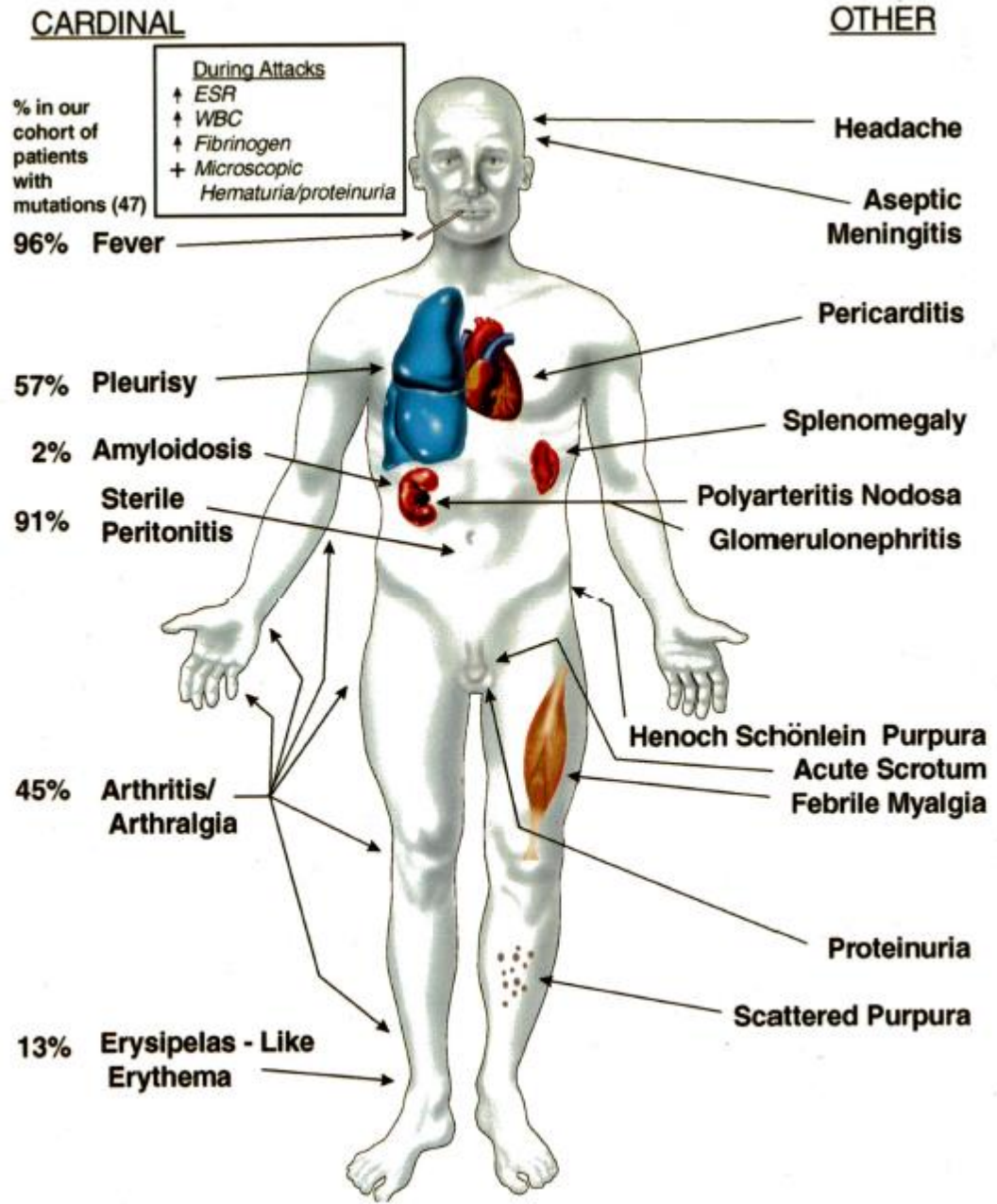
Tüm bu bulgular Pyrin'in bir pro-inflamatuar protein olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla artmış doğal immun cevap ile seyreden FMF'teki *MEFV* mutasyonlarının eskiden düşünüldüğü gibi fonksiyon kaybı mı ('loss of function'), yoksa fonksiyon kazanımı ('gain of function') mı oluşturduğu tartışma konusudur. Özellikle 2000'li yılların başında yapılan bir çalışmada Pyrin B30.2 bölgesinin diğer inflamazomlar, caspase-1 ve proIL-1 β ile etkileştiği gösterilmiştir ve bu nedenle anti-inflamatuar etkileri olduğu öne sürülmüştür (49). Benzer şekilde siRNA aracılı Pyrin 'knock-out' hücre serilerinde bakteriyel lipopolisakkarit uyarısı sonrasında IL-1 β salgısının arttığını bildiren bir yayın da mevcuttur (50). Dolayısıyla uzun bir zaman pyrin'in inflamasyonu baskılayıcı bir protein olduğu ve mutasyonlarının fonksiyon kaybı mekanizması ile etki ettiği düşünülmüştür. Fakat yakın dönemli çalışmalarda Pyrin 'knock-out' farelerde diğer inflamazomları etkileyen bariz bir fenotip görülmezken, proteinin terminal bölgesinde mutasyon içeren 'knock-in' farelerde inflamatuvar yanıt ortaya çıktığı görülmüştür (40,51). Gerek pyrin fizyolojik fonksiyonları hakkındaki yeni bilgiler gerekse de pyrin 'knock-out' / 'knock-in' fare çalışmaları fonksiyon kazanımı modelini güçlendirmektedir. Pyrin mutasyonlarının fonksiyon kazanımı ile hastalığa yol açması dozaj etkisi yoluyla bazı tek mutasyonlu olgularda görülen hafif kliniği açıklayabilir. Fakat tek mutasyonlu olup ağır seyreden olguları veya tek mutasyonlu olup hiç klinik göstermeyen olguları açıklamamaktadır. Bu olgularda muhtemelen Pyrin yolağında yer alan diğer proteinler ve genlerde (RhoGTPaz'lar, PKN1/2, 14-3-3 proteinleri, ASC vb...) hastalık ilişkili ek mutasyonlar bulunabilir.

2.5. Klinik Bulgular

FMF, semptomların ataklar halinde ortaya çıktığı bir hastalıktır ve olguların %90'ında şikayetler 20 yaş öncesinde başlar (4). Atak sıklığı olgular arasında veya tek olgunun seyrinde dahi oldukça değişkenlik gösterebilir. Haftalık ataklardan, yılda 1-2 атаğa kadar değişken sıklıklar bildirilmiştir (52). Fiziksel ve emosyonel stres, soğuğa maruziyet, menstruasyon, uzun süreli yolculuklar, yorgunluk gibi faktörlerin atakları tetikleyebildiği bilinse de çevresel etkenlerin hastalık seyrine etkisi konusunda ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (53). Ataklar arası dönemlerde olgular genelde semptomsuzdur fakat persistan inflamatuvar parametre yükseklikleri saptanabilir (54). Olguların %35'e kadar bir kısmında ataklar öncesi iştah kaybı, yorgunluk, anksiyete gibi prodromal semptomlar bulunabildiği bildirilmektedir (55). Ataklar 12-72 saat uzunluğunda sürer, antibiyotiklere cevap vermez ve spontan olarak düzelir (52).

Ateş ve serözit FMF ataklarındaki kardinal bulguları oluşturur (Şekil-5) (56). FMF ilişkili ateşin rektal ölçümlerde 38°C veya üzerinde olması beklenir ve olguların %96-98'inde en az bir atakta ateş bulgusu vardır (1,52,56). Pediatrik olgularda tespit edilebilen tek bulgu ateş olabilir. Özellikle 5 yaş öncesinde semptomları başlayan olgularda ateşli ve daha ağır ataklar görülürken, 12 yaş sonrası semptomatik olan olgularda ateşsiz ve daha hafif ataklar görülmektedir (57).

Periton başta olmak üzere plevra, perikard ve eklem zarları başlıca tutulan seröz zarlardır. Peritonit jeneralize karakterde veya tek bir kadranda sınırlı görülebilir (54). Dolayısıyla fizik muayenede tahta karın, defans, rebound ve jeneralize hassasiyet saptanır. Arka periton tutulumunda ise karın ağrısı renal koliki taklit edebilir. Karın ağrısına erişkinlerde atak sırasında daha sıklıkla konstipasyon eşlik ederken çocuklarda ise diare eşlik eder (52). Tekrarlayan akut batın semptomları ve cerrahi patolojilerin ekarte edilmesindeki zorluklar sebebiyle FMF olgularında verimsiz laparotomi öyküsü sıkça görülmektedir. Yüzde 20'ye varan oranlarda apandektomi, %2'ye varan oranlarda da kolesistektomi bildirilmiştir (58). FMF tanılı bireylerin de apandisit olabileceği düşünülerek ayırıcı tanı yapmak son derece önemlidir. EULAR ('European League Against Rheumatism') kılavuzunda FMF atağını ayırt edici prodromal belirtilerin varlığının hastaya sorulması önerilmiştir. Olgu bu belirtiler aracılığıyla şikayetin önceki ataklarla benzer olup olmadığını kısmen ayırt edebilir. Fakat her halükarda diğer tanıların mutlaka muayene, görüntüleme veya akut faz reaktanlarının takibiyle dışlanmaya çalışılması tavsiye edilmektedir (59). Diğer patolojiler kaynaklı akut batın zamanla kötüleşecek iken FMF atakları zamanla düzelecektir. FMF olgularında; rekürren peritonit sekeli, laparotomi komplikasyonu olarak oluşan fibröz adezyonlar veya kolşisin tedavisinin yan etkileri diğer karın ağrısı sebeplerini oluşturur.



Şekil-5: FMF bulguları ve görülme sıklıkları. [Samuels et al., 1998. "Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health" makalesinden alıntıdır (56).]

Göğüs ağrısının sebebi plevra veya perikard tutulumudur. Plöritik ağrı, peritonitin aksine genelde unilateral ve lokalize karakterdedir. Perikardit ise nadir görülen bulgulardandır. Türk FMF çalışma grubunun verilerine göre plevra tutulumu olguların %31'inde görülürken,

perikard tutulumu ise yalnızca %2.4 oranındadır (58). Genellikle tamponad veya konstrüktif perikardit gibi komplikasyonlara yol açmadan spontan düzelmektedir.

FMF ilişkili artrit orta ve büyük eklemleri tutar. Kalça ve diz eklemlerinin yanısıra daha az sıklıkta ayak bileği, omuz, temporomandibüler ve sternoklaviküler eklemler tutulabilir. Nötrofilden zengin efüzyon eşlik edebilir. Non-eroziv ve destrüktif olmayan artrit görülür (54). Artralji, artrite eşlik edebilir veya tek başına görülebilir. Ayak bileği etrafında veya ayağın dorsal yüzeyinde görülebilen cilt döküntüsü, erizipel benzeri eritem olarak isimlendirilir ve FMF açısından nadir görülen fakat spesifik bir bulgudur. Uzamış febril myalji bir diğer nadir bulgudur. Hastanın günlük işlevini ciddi derecede bozabilir, ateş ve akut faz reaktanlarında yükseklik eşlik edebilir ve kortikosteroid tedavisine yanıt verir (60). Diğer bulgular olarak; tunica vaginalis testis tutulumuna bağlı olarak erkeklerde görülebilen skrotal ağrı, aseptik menenjit, egzersiz ilişkili myalji, vaskülitik deri döküntüleri (özellikle de Henoch-Schönlein purpurası) karşımıza çıkmaktadır (Şekil-5) (54).

FMF'in uzun dönem seyrindeki en ciddi komplikasyonu ve prognozunu etkileyen en önemli bulgu amiloidoz varlığıdır. FMF seyrinde sekonder tip amiloidoz da denilen AA ('amyloid associated') tip amiloidoz görülür. Türk FMF çalışma grubunun verilerine göre ülkemiz hastalarında amiloidoz sıklığı %12.9'dur (58). Serum Amiloid A proteinleri toplamda 4 farklı tiptir ve 11. kromozom üzerindeki SAA1, SAA2, SAA3 ve SAA4 genleri tarafından sentezlenir (61). Kesin biyolojik fonksiyonları net olmamakla beraber akut faz yanıtını oluşturan protein grubunun içinde değerlendirilirler. Bu proteinler sitokin uyarısı (IL-1 β , IL6 vb...) sonucunda başlıca karaciğerden sentezlenip kana karışmaktadır. SAA1 ve SAA2 en fazla sentezlenen alt tiplerdir ve akut faz yanıtında HDL ile etkileşime girdikleri gösterilmiştir (62). FMF patogenezi de artmış IL-1 β salınımını içerdiğinden, SAA proteinleri FMF sürecinde artmış salınıma uğramaktadır. Bu proteinlerin, özellikle de SAA1'in, yıkım ürünleri yüksek derecede hidrofobik, proteolize dirençli beta tabakalar oluşturur ve oligomerler halinde farklı organlarda çökerek AA tip amiloidoza yol açarlar (63). FMF olgularında amiloid plaklar böbrekte birikime uğrayarak proteinüri, nefrotik sendrom ve son dönem kronik böbrek hastalığına neden olur (52). Böbrek tutulumunun yanısıra bağırsak, kalp, endokrin bezler, dalak ve karaciğerde de birikim görülmektedir (52). Renal amiloidoz tanısı için altın standart tanı yöntemi böbrek biyopsisidir fakat teknik kolaylık açısından rektal submukozal biyopsi veya gingival biyopsi de kullanılmaktadır. Amiloidoz gelişimini engellemek FMF tedavisinin başlıca

amaçlarından biri olup, düzenli ve hayat boyu kolşisin tedavisi ile etkin biçimde durdurulabilmektedir (59,64). Genetik ve çevresel faktörler amiloidoz yatkınlığını modifiye edebilir. M694V homozigot genotipi, *SAA1* geni varyantları, erkek cinsiyet, kolşisin tedavisine uyum, rekürren artrit kliniğe eşlik etmesi, erken başlangıç gibi faktörlerin bu yatkınlığı modifiye ettiği gösterilmiştir (52,65,66).

FMF semptomları geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilmektedir. Klinik heterojenite FMF'te çok yaygın görülen bir durumdur. Olgular izlendikçe ve genetik bilgi altyapısının da güçlenmesiyle başlıca 3 farklı fenotipte sınıflandırma yapılmıştır (67,68). Fenotip 1 olgular klasik FMF semptomlarını gösteren olgulardır. Ateş ve serözit ataklarını yaşarlar ve uzun dönemde amiloidoz riski altındadırlar. Fenotip 2 olgular ise asemptomatik bir seyir izleyip direkt amiloidoz semptomlarıyla başvuran ve o şekilde tanı alan olgulardır. Tanı sonrasında klasik atakların ortaya çıkması da mümkündür veya hayat boyu ataksız seyredebilir (67). Amiloidoz olgularında fenotip 1'de de fenotip 2'de de subklinik inflamasyon ve devamlı yüksek SAA düzeyleri saptanabilir (69). Bu hastaların ve tüm diğer FMF olgularının 1. derece akrabalarına *MEFV* genetik analizi yapılarak olası asemptomatik bireyleri amiloidoz gelişmeden yakalamak koruyucu hekimlik uygulaması olarak tavsiye edilmektedir (67,69). Fenotip 3 olgularda ise biallelik mutasyon varlığına rağmen hayat boyu semptom ortaya çıkmamaktadır. Fenotip 3'ün de dahil edilmesiyle beraber bu fenotipik sınıflandırmayı biallelik mutasyon taşıyan hastalar açısından ele almak mümkündür. Fakat olguların ciddi bir bölümünde *MEFV* içerisinde tek mutasyon saptanmakta, hatta hiç mutasyon saptanamamaktadır. Bu olgular bazı çalışmalarda tüm olguların %30 civarındaki geniş bir kesimini oluşturmaktadır (3). Bu grup 'fenotip 4' olarak adlandırılabilen gibi 'genetik olarak yetim olgular' şeklinde de tanımlanmaktadır (70). Hasta grupları içinde %30'a kadar saptansa da tüm popülasyon değerlendirildiğinde *MEFV* geninde tek mutasyon saptanan insanların (yani taşıyıcıların) çok büyük bir bölümü FMF bulgusu göstermemektedir.

2.6. Genotip Fenotip Korelasyonu

FMF olgularında gözlediğimiz fenotipik çeşitlilik, çevresel faktörlerin yanı sıra muhtemelen altta yatan genetik/ epigenetik heterojeniteden kaynaklanır (71). *MEFV* varyantları ile FMF kliniği arasında tüm hastaları açıklayan, uluslararası kabul görmüş bir genotip-fenotip korelasyonu kurulamamaktadır (68). Bu konu üzerine yapılan pek çok çalışma mevcuttur

(58,72–78). Avrupa kaynaklı 'Eurofever' hasta kayıtları üzerinden yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada en sık görülen varyant M694V'dir (72). Ardından V726A, M680I ve klinik önemi belirsiz E148Q varyantı gelmektedir. M694V mutasyonu homozigot durumda ortalama 2 gün süren ve her ay tekrarlayan ateş atakları ile beraber; karın ağrısı, artralji, myalji, kusma, ishal, göğüs ağrısı ve oligoartrit ile seyretmektedir (72). Aynı zamanda M694V homozigot genotipi; penetransı en yüksek, hastalık seyri en ağır, semptom başlangıç yaşı erken ve hastalığın en önemli komorbiditesi kabul edilen renal amiloidoz için riski yüksek bir genotip olarak kabul edilmektedir (73). E148Q homozigot genotipinde ise olguların %55'i asemptomatik seyreder ve amiloidoz gelişmez (73). E148Q varyantının protein yapısında görece az yapısal değişime sebep olduğu ve kompleks allel halinde taşındığında kliniği modifiye ettiği de öne sürülmüştür (79). Genel olarak diğer mutasyon kombinasyonları bu iki semptomatik uç arasında yer almaktadır. R202Q varyantı ise polimorfizm olarak kabul edilmekte ve genetik tanıda kullanılmaması tavsiye edilmektedir (25). Türkiye kaynaklı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (58,75,76,78). Dokuz Eylül Üniversitesi verileri de literatür ile uyumludur. 1679 olguluk seride en sık görülen mutasyon M694V (%16,86) iken, bunu E148Q (%5,96) ve M680I (%5,30) takip etmiştir. Olguların yaklaşık %50'sinde ise hiç mutasyon saptanmamıştır (77). Sonuç olarak mutasyon lokalizasyonuna göre değerlendirildiğinde ekzon 10 'hotspot' mutasyonları daha ağır klinik ile ilişkilendirilirken, ekzon 2 mutasyonları daha hafif bir seyir ile ilişkilendirilmiştir fakat bunun her olgu için geçerli olmayabileceği unutulmamalıdır.

Genotip-fenotip korelasyonunun kurulamamasının bir diğer sebebi de tüm olguların otozomal resesif kalıtmı beklediği üzere biallelik mutasyon taşınamamasıdır. Farklı serilerde istikrarlı biçimde tek mutasyon taşıyan veya hiç mutasyon taşımayan hastalar tanımlanmıştır (80). Bu durumun sebebi klinik heterojenite yüzünden genetik tetkik için yönlendirilen olguların spesifik seçilememesi, tanı kriterlerinin yeterince spesifik olmaması veya yanlış tanı konulması, sorumlu farklı kalıtım paterni, gen ve/veya epigenetik faktörlerin mevcudiyeti olabilir. Genetik açıdan değerlendirildiğinde; olası ikinci mutasyonun saptanamıyor olma ihtimali düşünülerek Booty ve arkadaşları 10 olguda *MEFV* geninin promotor, ekzonik ve intronik bölgesinin tamamını dizilemiş fakat mutasyon tespit edememiştir (3). Marek-Yagel ve arkadaşları 20 olguda komplementer DNA dizilemesi ve ekspresyon analizi yaparak ikinci allelde bilinmeyen bir varyanta bağlı ekspresyon kaybı veya lökositlere spesifik mozaik bir mutasyon ihtimalini dışlamıştır (81). Sekanslama yöntemi ile saptanamayacak olan kopya sayısı değişikliklerinin (delesyonlar, duplikasyonlar...) altta yatan neden olup olmadığı

araştırılmış fakat olguları açıklayabilecek yeniden düzenlemeler saptanmamıştır (81,82). Olası ikinci mutasyonun gösterilemiyor oluşu ihtimaline karşın haplotip analizleri ile varlığı indirekt araştırılmıştır. Hasta kardeşlerde her iki allelde aynı haplotip ile karşılaşılacağı düşünülmüş, fakat ebeveynlerden farklı allelleri edindikleri gösterilmiştir (3,81). Bu sonuçlar ışığında sadece *MEFV* geni varyantları ile genetik olarak yetim olguları açıklama imkanı kalmamıştır ve diğer genlerin fenotipe etki etmesi ihtimali güçlenmiştir. Heterozigot olguların klinik seyirleri incelendiğinde homozigot/bileşik heterozigot mutasyon saptanan klasik olgulardan kısmen hafif seyir gösterebilecekleri gibi, ayırt etmenin mümkün olmadığı benzerlikte seyredebileceği de gösterilmiştir (81,83).

2.6.1. Genotip-Fenotip Korelasyonunun Kurulamamasından Doğan Hipotezler

Bugüne kadar yapılan çalışmalar olguları kısmen açıklasa da geride önemli sorular bırakmaktadır. Bu sorular şu şekilde özetlenebilir:

1. Fenotip 2 olarak adlandırılan ve *MEFV* geninde çift mutasyon saptanmasına karşın hayat boyu hiç semptom göstermeden seyredip, sonrasında amiloidoz kliniğiyle tanı alan olgular nasıl açıklanabilir?

Fenotip 2 olgular görece nadir görülmelerine karşın sahip oldukları *MEFV* varyantları bakımından ayırt edici bir özellikleri bulunmamaktadır. Ağır klinik ile ilişkilendirilen M694V homozigotluğu dahi fenotip 2 kliniği ile seyredebilmektedir.

2. *MEFV* geninde çift mutasyon saptanan olguların bazıları neden hayat boyu asemptomatik kalmaktadırlar?

Bu olgular fenotip 3 olarak da adlandırılmıştır (67,74). Bu olgu grubunun tahmin edilenin aksine klasik hastalardan daha fazla sayıda olabileceği gösterilmiştir. Yüksek taşıyıcılık oranlarına rağmen FMF prevalansının Hardy-Weinberg kuralına göre beklenenden çok daha düşük olması da çift mutasyonlu insanların asemptomatik seyredebildiğine işaret etmektedir.

3. *MEFV* geninde tek mutasyon saptanmasına veya hiç mutasyon saptanmamasına rağmen klinik olarak tanı alabilen FMF hastaları için altta yatan genetik mekanizma ne olabilir?

Tez araştırmasının temelini bu olgular oluşturmaktadır. Bu durumunun patofizyolojik mekanizmasını açıklamak üzere farklı hipotezler öne sürülmüştür.

Genetik olarak yetim olguları açıklamaya yönelik ilk hipotez, dominant kalıtmımlı bir FMF alt tipinin var olduğunu iddia eder. Gerçekten de bazı spesifik nadir mutasyonları taşıyan aile pedigrilerinde dominant kalıtım gösterilmiştir (30,84). Fakat sık görülen heterozigot mutasyonları taşıyan hasta bireylerdeki klinik duruma açıklama getirmemektedir. İkinci teori Pyrin'in, geçmişte zannedildiği gibi anti-inflamatuar değil pro-inflamatuar bir protein olmasıyla ilişkilidir. İlk keşfedildiğinde pyrin'in anti-inflamatuar bir protein olduğu ve çift taraflı mutasyonlarının tam fonksiyon kaybı sonucu artmış immün yanıt ile seyreden FMF kliniğine yol açtığı düşünülüyordu (50). Taşıyıcılar ise asemptomatik kalmaktaydı. Fakat pyrin bunun aksine pro-inflamatuar bir protein ise ve mutasyonları da fonksiyon kazanımı yoluyla patojenisiteye sebep oluyorsa; tek mutasyonlu, çift mutasyonlu ve hatta kompleks allellere sahip olgular arasında bozuk gen dozajına paralel olarak artan ağırlıkta bir klinik beklenebilir (70). Bu durumda tek mutasyon saptanan bireylerde, çift mutasyonlu olanlara göre daha hafif de olsa, artmış inflamasyon olacaktır. Fakat bu hipotez de tek mutasyon taşıyıp ağır hastalık seyri gösteren olguları veya tek mutasyon taşıyıp asemptomatik kalan büyük çoğunluğu açıklayamamaktadır. Diğer bazı çalışmalarda epigenetik etkiler veya ekzon dışı mutasyonlar araştırılmıştır fakat yaygın kabul gören bir açıklama ortaya çıkmamıştır (85–88). Genetik olarak yetim olguları açıklamaya yönelik bu tezde araştırılacak olan hipotez, genomun diğer noktalarında hastalığın penetransını ve ekspresivitesini değiştiren varyantlar olabileceğidir. Halihazırda FMF fenotipini modifiye ettiği gösterilmiş *MICA* ('major histocompatibility complex class I chain related gene A') ve *SAA1* ('serum amyloid A1') gibi lokuslar zaten mevcuttur (89,90). Fakat Bardet-Biedl sendromunda görülen kalıtıma benzer bir digenik model olabileceği de düşünülmelidir. Bu amaçla Neocleous ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları araştırmada benzer klinik gösteren diğer otoinflamatuvar hastalık genlerini (*TNFRSF1A*, *NLRP3*, *MVK*) incelemiş ve tüm olguları açıklayabilecek kapsayıcılıkta bir ilişki saptamamıştır. Nadir olgularda ikili kombinasyonlarda mutasyon bulunabileceği ise gösterilmiştir (91). Booty ve arkadaşlarının 2009 yılındaki araştırmasında ise seçilmiş 10 olguda IL-1 yolağıyla ilişkili bulunan *ASC*, *SIVA*, *CASP1*, *PSTPIP1*, *POP1* ve *POP2* genleri araştırılmıştır. Bu çalışmada da tüm olguları açıklayabilecek bir gen öne sürülememiştir (3). Aday gen seçimini doğru yapmak için en önemli bilgi, Pyrin proteinin ilişkili olduğu yolakların ve dolayısıyla FMF patofizyolojisinin açığa kavuşturulmasından gelecektir.

2.7. Tanı

Günümüzde FMF tanısı temel olarak klinik kriterlere dayanmaktadır. Tanıda 4 ayrı grubun önerdiği tanı kriterlerinden birisi baz alınabilmektedir. Bunlar; en yaygın kullanılan ‘Tel Hashomer’ kriterleri, Livneh kriteri, Türk pediatrik kriterleri ve yakın zamanda teklif edilen “Eurofever/PRINTO” (‘Eurofever’: Avrupa orjinli bir otoinflatuar hasta kayıt sistemi, PRINTO: ‘Pediatric Rheumatology International Trials Organisation’) kriterleridir (1,19,92,93). Tel-Hashomer kriterlerinin kullanılmaya başlamasının ardından atipik atakların, egzersize bağlı myalji gibi ek tanımlanan bulguların eklenmesi amacıyla Livneh kriterleri önerilmiştir. Pediatrik olgularda klinik tablonun tam olarak oturmamış olma ihtimali nedeniyle Türk Pediatrik tanı kriterleri önerilmiştir. Bu üç grubun önerdiği kriterin hiçbiri genetik analizi içermemekte, yalnızca klinik bulgulara dayanmaktadır. Yakın zamanlı “Eurofever/PRINTO” kriterinde ise tanısal amaçtan ziyade diğer otoinflatuar hastalıklarla ayırıcı tanı amaçlanmış ve ilk kez bu grup tarafından genetik analiz sonuçları tanı sürecine dahil edilmiştir.

2.7.1. Tel Hashomer Kriterleri

Bu kriterlere göre 2 majör veya 1 majör + 2 minör kritere uyum sağlayan olgular FMF tanısı almaktadır. 1 majör + 1 minör kritere uyan olgular ise muhtemel tanı olarak değerlendirilmektedir (Tablo-1) (19).

Majör Kriterler
1. Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
2. Predispozan hastalık olmadan AA tipi amiloidoz varlığı
3. Kolşisin tedavisine yanıt
Minör Kriterler
1. Tekrarlayan ateş atakları
2. Erizipel Benzeri Eritem
3. Birinci derece akrabalarında FMF öyküsü

Tablo-1: Tel-Hashomer Tanı Kriterleri

2.7.2. Livneh Kriterleri

1997 yılında Livneh ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Tablo-2) (1). Kesin tanı için bir majör kriter veya; en az iki minör kriter veya; bir minör + beş destekleyici kriter veya; bir minör + destekleyici kriterlerden ilk beşinden dört tanesinin bulunması gerekmektedir.

Majör Kriterler	Minör Kriterler
Tipik Ataklar*	Atipik Ataklar**
1.Peritonit (Jeneralize)	1.İnkomplet Karın Ağrısı Atağı
2.Plevrit (Unilateral) veya Perikardit	2.İnkomplet Göğüs Ağrısı Atağı
3.Monoartrit (Kalça, Diz, Ayak bileği)	3.İnkomplet Artrit Atağı
4.Tipik Atak Kriterlerine Uyan İzole Ateş	4.Egzersiz ilişkili Bacak Ağrısı
	5.Kolşisine Olumlu Yanıt
Destekleyici Kriterler	
1.Ailede FMF Öyküsü	7.Aşağıdakilerden bir veya daha fazlasında anormallikle olan inflamatuvar yanıt (Lökosit, SAA, eritrosit sedimentasyon hızı, fibrinojen)
2.Uygun Etnik Köken	8.Epizodik Hematüri / Proteinüri
3.Yirmi Yaş Öncesi Başlangıç	9.Verimsiz Laparotomi veya Verimsiz Apendektomi
4.Ağır, Yatak İstirahati Gerektiren Atak	10.Akraba Evliliği
5.Atakların Spontan Remisyonu	
6.Ataklar Arası Asemptomatik Dönem	

Tipik Ataklar	Atipik Ataklar
*Tipik veya atipik kriterlere uymayan ataklar değerlendirmeye alınmaz	**Ağrılı ve tekrarlayıcı nitelikte olup aşağıda belirtilen kriterler açısından tipik ataklardan ayrılan ataklar
1.Tekrarlayıcı (3 veya daha fazla)	1.Normal veya 38°C'den düşük ateş
2.Ateşli (rektal ölçümde >38°C)	2.Daha uzun veya daha kısa ataklar (6 saat -1 hafta)
3.Kısa süreli (12-72 saat)	3.Karın ağrısı sırasında peritonit bulgularının görülmemesi
	4.Lokalize abdominal ataklar
	5.Spesifik eklemler dışında artrit atakları

Tablo-2: Livneh Tanı Kriterleri

2.7.3. Türk Pediatrik Tanı Kriterleri

2009 yılında Yalçinkaya ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (92). Pediatrik yaş grubunda hastalığın diğer bulguları ortaya çıkmadan da tanı konabilmesi amacıyla oluşturulmuştur. Kriterler; ateş (>38°C), karın ağrısı, göğüs ağrısı ve artrit bulgularının 6-72

saat arasında sürmesi ve en az üç kez tekrarlaması ile ailede bilinen FMF öyküsünden oluşmaktadır. Beş kriterden ikisinin varlığı halinde FMF tanısı konulmaktadır.

2.7.4. Eurofever/PRINTO Sınıflandırma Kriterleri

2019 yılında ortaya atılan kriterler olup başlıca amacı otoinflamatuvar hastalıklar arasında ayırım yapmaya yardımcı olmaktır (93). FMF için başlıca iki tip kriter önerilmiştir (Tablo-3 ve Tablo-4). Bu kriterler, FMF ve diğer otoinflamatuvar hastalıkların tanısında genetik analiz sonuçlarını sürece dahil eden ilk kriter olmuştur.

Eurofever/PRINTO Klinik Kriterler	
Doğu Akdeniz etnik kökeni	Aftöz stomatit olmaması
Atakların 1-3 gün sürmesi	Ürtikeryal döküntü olmaması
Göğüs ağrısı varlığı	Makülopapüler döküntü olmaması
Karın ağrısı varlığı	Ağrılı lenf nodu olmaması
Artrit varlığı	

Tablo-3: Eurofever/PRINTO klinik kriterleri. Otoinflamatuvar hastalık ön tanılı bir olguda dokuz kriterden altısının varlığında FMF ön planda düşünülmelidir.

Eurofever/PRINTO Klinik + Genetik Kriterler	
Doğrulayıcı MEFV Genotipi Varlığında*; 1. Atakların 1-3 gün sürmesi 2.Artrit 3.Göğüs Ağrısı 4.Karın Ağrısı Bulgularının en az biri	Doğrulayıcı MEFV Genotipi Yokluğunda**; 1.Atakların 1-3 gün sürmesi 2.Artrit 3.Göğüs Ağrısı 4.Karın Ağrısı Bulgularının en az ikisi
* :Biallelik (homozigot veya bileşik heterozigot) muhtemel patojenik veya patojenik genetik varyant saptanması durumu	
** : Biallelik klinik önemi belirsiz varyant saptanan olgular veya, Bir adet klinik önemi belirsiz varyant ile bir adet patojenik/muhtemel patojenik varyantın trans pozisyonunda saptandığı olgular veya, Monoallelik (heterozigot) patojenik/muhtemel patojenik varyant saptanan olgular	

Tablo-4: Eurofever/PRINTO klinik ve genetik kriterleri.

2.7.5. Genetik Analizlerin Tanıda Kullanımı

Günümüzde FMF tanısı temel olarak yukarıda belirtilen klinik kriterler üzerinden konulmaktadır. Genetik test ise şüphe durumunda destekleyici konumdadır (25,94). Genetik incelemede iki basamaklı bir yaklaşım uygulanabileceği belirtilmiştir. Özellikle patojenisite ile ilişkilendirilen ekzon 10 'hotspot' mutasyonlarının çeşitli yöntemlerle analizi ['StripAssay', gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Polymerase Chain Reaction), fragman analizi...] ilk basamak tetkik olarak yapılmaktadır. Sonrasında tüm gen analizi, tanı konusunda şüphede kalınmış vakalarda ikinci basamakta önerilmektedir (25). Güncel veritabanlarındaki *MEFV* varyasyon sayısı 350'nin üzerindedir (22). Genin neredeyse tüm ekzonlarında mutasyon gösterilmiş olup, UTR bölgelerinde dahi fonksiyonel etkisi gösterilen varyantlar tanımlanmıştır (87,88). Buna rağmen tüm gen analizi bile kesin tanı verememektedir (3). *MEFV* analizinin objektif ve görece kolay olmasına rağmen kesin tanı vermemesinin başlıca sebebi otozomal resesif olarak düşünülen kalıtım paternine rağmen olguların bir kısmında her iki allelde mutasyon saptanamamasıdır.

Eurofever/PRINTO kriterleri ile ilk kez klinik ve genetik bulgular tanı sürecinde birleştirilmiştir. Otoinflatuar hastalıklar içerisinde FMF ayırt edilmesi için sensitivite %94, spesifisite ise %95 olarak bildirilmiştir (93). Tanısal amaçlı kullanımında Sağ ve arkadaşlarının yakın zamanlı çalışmasında Eurofever/PRINTO kriterleri, Tel-Hashomer ve Türk Pediatrik kriterleri ile karşılaştırılmış, %96 ile en yüksek sensitiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Fakat spesifisite (%73.1) konusunda diğer iki kriterin gerisinde kalmıştır (95). 2020'de yapılan bir başka çalışmada ise Tanatar ve arkadaşları dört kriterin performansını otoinflatuar hasta ve kontrol grupları içinde karşılaştırmıştır (96). Bu çalışmada ise Eurofever/PRINTO kriterleri en yüksek spesifisiteye sahip kriter olarak öne çıkmış, sensitivitesi daha düşük bulunmuştur (96). Daha geniş ve homojen hasta serilerinde karşılaştırma ihtiyacı gözükse de her iki çalışmanın ortak noktası, tanı kriterlerinin heterozigot mutasyonlu olgularda performansının daha düşük olmasıdır (95,96). Dolayısıyla genetik test tek başına kullanımında da, klinik kriterler ile birlikte kullanımında da olguların tamamını kapsayan bir tanı testi özelliği göstermemektedir.

Objektif ve spesifik bir tanı testi eksikliği FMF olgu yönetiminde çeşitli zorluklara yol açmaktadır. Örneğin; semptomların geniş bir yelpazede görülmesi ayırıcı tanı zorluklarını ve dolayısıyla yanlış tanıları sıkça karşımıza çıkarmaktadır. Olguların FMF kesin tanısı

almadan önce akut romatizmal ateş, juvenil idiopatik artrit gibi tanılarla takip edildiği bildirilmiştir (58,75). Ayrıca Henoch-Schönlein Purpurası ve Poliarteritis Nodosa gibi eşlik eden vaskülitler, FMF olgularında toplum prevalanslarına göre yüksek oranlarda saptandıkları için klinik spektrumu daha da karıştırmaktadırlar (58,75). Tekrarlayan akut batın semptomları ve cerrahi patolojilerin ekarte edilmesindeki zorluklar sebebiyle FMF olgularında laparotomi öyküsü sıkça görülmektedir. Yüzde 20'ye varan oranlarda apendektomi, %2'ye varan oranlarda da kolesistektomi bildirilmiştir (58). Hatta verimsiz laparotomi, tanı kriterlerinde dahi yer almaktadır (1). Yanlış tanılar, uzamış tanı süreçlerinin, gereksiz invaziv girişimlerin ve amiloidoz gibi hayatı tehdit eden ağır komorbiditelerin önlenmesi ihtiyacı; sensitif ve spesifik, hızlı sonuç veren bir tanısal test gerekliliğini göstermektedir. Aksi halde tüm bu veriler ışığında Ailevi Akdeniz Ateşi'nin, özellikle de ülkemiz için önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturduğu ortadadır.

2.8. FMF Ayırıcı Tanısında Otoinflatuar Hastalıklar

FMF ayırıcı tanısında semptomlarının çeşitliliği nedeniyle pek çok lokalize veya sistemik hastalık düşünülmelidir. Akut karın yapabilen tüm patolojiler, pankreatit, renal kolik, endometriozis, pulmoner emboli, enfeksiyöz serözit ajanları, otoimmun hastalıklar ve benzeri pek çok hastalık sayılabilir. Fakat IL-1 aracılı sistemik inflamasyon, ataklar halinde tekrarlayıcı ateş kliniği ve doğal immun sistem bozukluğu etyopatogenezi bakımından ortak olduğu hastalık grubu otoinflatuar hastalıklardır.

2.8.1. Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit ve Adenopati Sendromu (PFAPA)

1987 yılında Marshall ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (97). Ortalama 4 yaş civarında hastalık belirtileri başlar. Farenjit, servikal lenfadenopati veya oral aft semptomlarından en az biri ateşe eşlik eder. Her atak yaklaşık 4-6 gün sürer ve spontan olarak düzelir (98). Diğer otoinflatuar hastalıklardan farklı olarak ataklar arası periyot PFAPA'da daha düzenlidir ve 3-5 haftada bir tekrarlar. Düşük doz kortikosteroid tedavisi ile ataklarda hızlı bir remisyon görülebilir fakat uzun dönemde atakların azaltılmasında etkili değildir. Uzun dönem tedavide ise tonsillektomi seçilmiş vakalarda önerilmektedir (99). Ataklarda nadiren eşlik eden karın ağrısı, artralji, myalji gibi semptomlar da olabildiği için FMF ataklarıyla ayırmak güç olabilir. İki hastalığın ayrımında 1. Uluslararası PFAPA konferansında bazı noktaların irdelenmesi önerilmiştir (100);

1. FMF atakları genellikle rastgele aralıklarla ortaya çıkarken PFAPA atakları daha düzenli aralıklarda ortaya çıkar.
2. FMF ataklarında görülen şiddetli jeneralize peritonit PFAPA ataklarında görülmez. Fakat FMF'in atipik atakları ile ayırmak mümkün olmaz.
3. Her iki hastalıkta da aft görülebilir fakat servikal lenfadenopatinin eşlik ettiği gerçek farenjit FMF'de görülmez.
4. FMF atakları tek doz kortikosteroid tedavisine yanıt vermez.
5. Profilaktik kolşisin tedavisi PFAPA ataklarının sıklığını azaltmaz.
6. Artrit, plörit ve erizipel benzeri eritem bulguları FMF için spesifiktir, PFAPA'da görülmez.

PFAPA olgularında aile öyküsü %30 civarında görülebilir. Fakat günümüzde bir geni tanımlanmamıştır ve monogenik kalıtılmadığı düşünülmektedir (98).

2.8.2. Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS)

TNFRSF1A geni (12p13.1) mutasyonları sonucu ortaya çıkan otozomal dominant kalıtmı bir hastalıktır. Tümör nekrozis faktör (TNF) reseptörünü ilgilendiren; anormal oligomerizasyon, yanlış katlanma, ekstraselüler bölgede azalmış ayrışma, endoplazmik retikulumda birikme, azalmış TNF bağlanması, ligand bağımsız sinyal gönderimi ve azalmış TNF aracılı apoptoz gibi süreçlerin patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir. Sonuç olarak nükleer faktör kappa B (NFκB) aktivasyonu oluşur ve IL-1β sekresyonu gerçekleşir (98). *TNFRSF1A* geninde günümüzde 170 farklı varyant bildirilmiştir (22). Patojenik mutasyonların önemli bir kısmını protein katlanmasında önemli rol oynayan disülfid bağlarının olduğu sistein rezidülerindeki mutasyonlar oluşturmaktadır (33).

Tekrarlayan ateş atakları 1-3 hafta arasında sürer. FMF ile ayırt etmede en yardımcı olan bulgulardan biri atakların uzun sürmesidir (101). Atakların ortalama başlangıç yaşı 4 yaş civarındır fakat erişkin başlangıçlı olgular da bulunmaktadır. Karın ağrısı, göğüs ağrısı, myalji, bulantı, kusma, lenfadenopati, ürtikeryal döküntüler, oküler bulgular (periorbital ödem, konjonktivit) eşlik edebilir (4,98). FMF'e benzer şekilde TRAPS'ta da AA amiloidoz gelişme riski bulunmaktadır.

2.8.3. Hiperimmunglobulin D Sendromu / Mevalonat Kinaz Eksikliği (HIDS)

MVK geni 12q24.11 bölgesine lokalize bir gen olup; ince barsak, pankreas, dalak, beyin, uterus, serviks, prostat, cilt ve gözde eksprese olan izoprenoid ve kolesterol biyosentezinde görevli mevalonat kinaz enzimini kodlar (4). *MVK* geninde ortaya çıkan biallelik mutasyonlar sonucu enzim işlevinin tam kaybı olması halinde daha ağır olan mevalonik asidüri kliniği görülürken, kısmi (%5-15) enzim işlevinin varlığında daha hafif olan hiperimmunglobülin D sendromu (HIDS) ortaya çıkar (4). *MVK* geninde günümüzde 200'ün üzerinde varyant bildirilmiştir (22). Mevalonat kinaz eksikliğinde RhoA'nın membrana yönlendirilmesi için gereken geranilgeranil pirofosfat eksikliği sebebiyle RhoA inaktivasyonu meydana gelir. Bu nedenle FMF'de de temel mekanizma olan pyrin inflamazom aktivasyonu ortaya çıkar. Dolayısıyla FMF ile aynı yolak üzerinden HIDS kliniğinin geliştiği düşünülmektedir (43,98).

HIDS tablosunda 3-7 gün aralığında süren febril ataklar ilk dekatta (genellikle 1 yaş sonrasında) ortaya çıkar. Ateşin yanısıra servikal lenfadenopati, karın ağrısı, artralji, aftöz stomatit, baş ağrısı, serebellar bulgular ve makülopapüler deri döküntüsü görülebilir (98,101). Aşılama, stres ve infeksiyonlar atakları tetikleyebilir. Laboratuvarında IgD yüksekliği görülebilir ama tüm hastalarda olması şart değildir ve prognostik anlam ifade etmez. FMF ile arasındaki en önemli fark kolşisinin tedavide etkinliği olmamasıdır (98)

2.8.4. Kriopyrin İlişkili Periyodik Sendromlar

Kriopyrinopatiler toplamda üç farklı hastalığı içeren bir spektrumdur. Hafif fenotipten şiddetliye doğru sırayla: Ailesel Soğuk Otoinflamatuvar Sendrom (FCAS: 'Familial Cold Autoinflammatory Syndrome'), Muckle-Wells Sendromu (MWS) ve Neonatal Başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar Hastalık (NOMID: 'Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease'). Üçü de *NLRP3* geninde otozomal dominant kalıtılan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. FCAS olgularında yaklaşık 1 gün süren, soğuk maruziyeti ile tetiklenen ateş, ürtikeryal döküntüler, artrit ve konjonktivit semptomları görülür (98,101). MWS olgularında soğuktan bağımsız ateş, ürtikeryal döküntü, konjonktivit, artrit atakları 1-7 gün civarında sürer. Amiloidoz ve sensorinöral işitme kaybı görülebilir. NOMID olgularında ise kronik seyirli ateş, ürtikeryal döküntüler, kronik aseptik menenjit ve uzun kemiklerde epifizyal büyüme bulguları görülür (98,101). Her üç klinikte de IL-1 bloke edici ajanlar tedavinin temelini oluşturmaktadır.

NLRP3 geni çeşitli uyarılar sonrası aktifleşerek inflamazom kompleksi oluşturmaktadır ve aynı Pypin gibi Caspase-1'i aktifleştirerek IL-1 β salgılanmasına yol açar. Genel olarak ekzon 3 mutasyonlarının taranması önerilmektedir ve mutasyon saptanamayan olgularda mozaiklik olabileceği de düşünölmelidir (25).

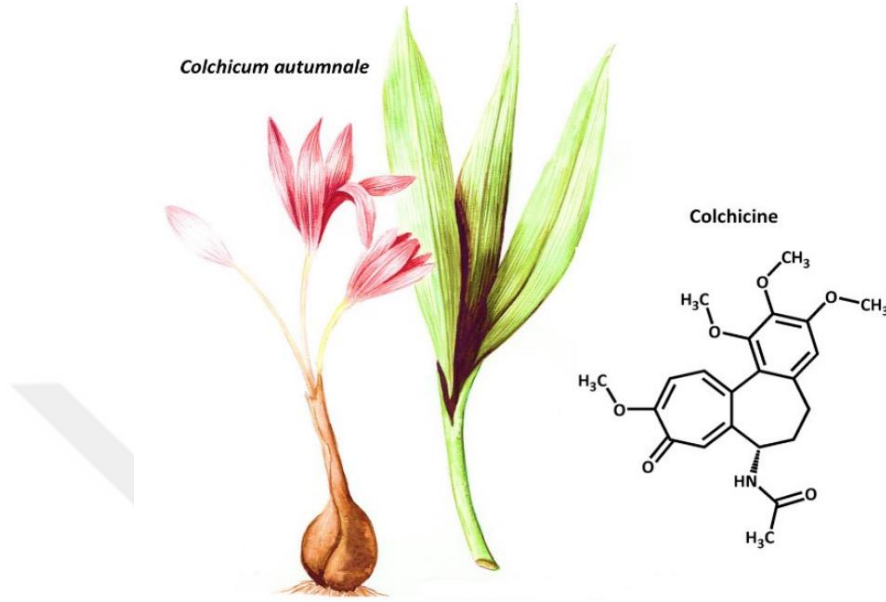
2.9. FMF Tedavisinde Kolşisin ve Etki Mekanizması

1972 yılında Dr. Özkan ile Dr. Goldfinger'ın ayrı ayrı kolşisinin düzenli kullanımının atakları azalttığını bildirdiğinden beri FMF tedavisinin temelini kolşisin oluşturmaktadır (102,103). O dönemde gut hastalığında kolşisin düzenli kullanılmaktaydı ve guttaki etkinliğinin polimorfonökleer lökositlerin sodyum ürat kristallerini fagositozuna engel olmasından kaynaklandığı düşünölyordu. Dr. Goldfinger; FMF olgularının vöcut efüzyonlarında artmış fagositik aktivite gösteren polimorfonökleer lökositler olduğı bilindiğı için, inflamasyonun kısır döngüsünün kolşisin ile başlangıçta durdurulabileceğini öne sürmüştür (103). Aradan geçen yaklaşık 50 yılın ardından FMF patogenezi ile ilgili bilgiler arttıkça kolşisinin de tedavide oynadığı rol daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır.

Kolşisin, *Colchicum Autumnale* bitkisinden elde edilen bir trisiklik alkaloiddir (Şekil-6) (104). Kolşisin hücre içinde β tübölün molekülüne bağlanarak, onların konformasyonunu değıştirir. Konformasyonu değışen β tübölünler uzamakta olan mikrotüböl heliksine eklendiğinde, yeni tübölünlerin eklenmesine engel olur ve dolayısıyla mikrotüböl polimerizasyonu durur. Bu durumun nötrofillerde aktivasyon, degranölasyon ve kemotaksisi durdurarak anti-inflamatuar etki yarattığı düşünölmektedir (105). Aynı zamanda iğ iplikçiğı inhibisyonu ile mitoz bölünmeyi durdurur.

Kolşisin tedavisi FMF olgularında hayat boyu devam edecek şekilde planlanır. Sadece atak dönemlerinde kullanımı etkili değildir. Günlük ve düzenli kullanımının olguların %85-90'ında atak sıklığını ve şiddetini azalttığı, pek çok olguda ise remisyon sağladığı bilinmektedir (106). 5 yaş altı çocuklarda 0.5 mg/gün, 5-10 yaş arası çocuklarda 0.5-1.0 mg/gün, 10 yaş üstü çocuklarda ve erişkinlerde ise 1.0-1.5 mg/gün dozlarında kullanılması ve yanıtı göre doz arttırılması önerilmektedir (98). Olgularda en yüksek 2 mg/gün dozundaki düzenli kullanımı amiloidoz gelişimini önlemektedir. Tedaviye ara verilirse relaps ataklar başlayabilir. Ataklar sırasında doz arttırılması önerilmez, nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar kullanılabilir (107). Kolşisinin FMF dışı otoinflamatuar hastalıklarda terapötik etkisi bulunmamaktadır. Tüm

otoinflamatuar olgu gruplarında genellikle etkili olan ilaç grubu IL-1 bloke edici ajanlardır (98). Bu da kolşisinin Pýrin inflamazom yolağında spesifik etkileri olabileceğini yansıtır.



Şekil-6: *Colchicum Autumnale* bitkisi ve kolşisinin kimyasal yapısı. [Rodriguez-Garcie et al., 2017.“Multi-target Activities of Selected Alkaloids and Terpenoids” makalesinden alıntıdır (104).]

Pýrin’in patern tanıyıcı reseptör olarak görev yaptığı ve ASC ile etkileşerek inflamazom kompleksi oluşturduğu bilinmektedir. Pýrin-ASC etkileşimlerinin hücrede özellikle aktin polimerizasyon alanlarında meydana geldiği gösterilmiştir (108). Bu alanlar aynı zamanda monosit ve makrofajların fagositik hareketleri sırasındaki öncü çıkıntılarına denk gelmektedir (108). Bir diğer hücre iskeleti elemanı olan mikrotübüller de kolşisinin terapötik etkinliği nedeniyle araştırılmaktadır. Aktin polimerizasyonunu durduran ajanlar (sitokalazin D), aktin efektörlerini hedefleyen ajanlar veya mikrotübül stabilize edici ajanlar (paklitaksel) Pýrin aracılı IL-1 β sekresyonunu etkilemezken; kolşisinin, Caspase-1 matürasyonunu durdurduğunu Van Gorp ve arkadaşları göstermiştir (109). Aynı çalışmada *NLRP3* aracılı inflamazom kompleksinin de kolşisin tarafından bloke edilmediği gösterilmiştir (109). Dolayısıyla mikrotübül polimerizasyonu Pýrin aracılı inflamazom aktivasyonu için spesifik olarak görev yapmaktadır (110). Bu kritik basamağın hangi aşamada olduğu araştırılmış ve Pýrin defosforilasyonu sonrası, ASC oligomerizasyonu öncesinde olduğu bulunmuştur. Fakat ilginç

şekilde Pýrin B30.2 bölgesi mutasyonlarının bu aşamada mikrotübüllere olan ihtiyacı ortadan kaldırarak inflamasyonu arttırıyor olabileceği keşfedilmiştir (109). Bu paradoksik *in vitro* deney sonucu kolşisinin klinik etkinliği ile çelişmektedir. Diğer araştırmalarda ise başlıca iki kontrol mekanizması öne çıkmaktadır. Pýrin fosforilasyon / defosforilasyonu ve mikrotübül aracılı inflamazom matürasyonunun kontrolü (42,111). Magnotti ve arkadaşları ise önceki çalışmanın aksine FMF olgularında mikrotübül aracılı kontrol sisteminin mutasyonlar aracılığıyla by-pass geçildiğini ve bu sebepten ötürü artmış inflamasyon oluştuğunu öne sürmüşlerdir (111). Mikrotübül dinamikleri ve Pýrin inflamazom aktivasyonunun tam olarak nasıl geliştiği üzerine yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ortadadır. Fakat kolşisinin diğer otoinflamatuvar hastalıklarda etkili olmaması ve spesifik olarak FMF olgularında tedavide yarar sağlaması terapötik etkinliğinin sadece nötrofil kemotaksisi ve degranülasyonu üzerindeki etkilerinden kaynaklanmadığını göstermektedir. Kolşisinin etki ettiği hücre içi yolların netleştirilmesi ile FMF patogenezi daha iyi anlaşılabilir. Dolayısıyla mikrotübül aracılı proteinler ve onları kodlayıcı gen varyantlarından FMF kliniğini modifiye edici potansiyel hedefler ortaya konulabilir.

2.10. Aday Gen Araştırmalarında Tüm Ekzom Analizleri ve FMF

20. yüzyılın sonlarında genetik kodun dizilenerek ortaya konması temel olarak Sanger sekanslama yöntemiyle yapılmaktaydı. 21. yüzyılın başlangıcında kısa DNA amplikonlarının masif paralel dizilemesinin icadıyla moleküler laboratuvarında büyük çaplı bir devrim gerçekleşmiştir. Yeni Nesil Dizileme (NGS: ‘Next Generation Sequencing’) yöntemlerinin son 15 yıl içindeki hızlı gelişimi ve çeşitliliği aracılığıyla baz başına dizileme maliyeti ve büyük miktarlarda genomun dizileme süresi logaritmik olarak azalmaktadır. Bu sayede önceden cevaplanması mümkün olmayan sorular, araştırılabilir hale gelmiştir. Bu konulardan biri de klinik fenotipin ve aile çalışmalarının genetik etyolojiyi yansıttığı fakat mevcut genetik analizlerin durumu tam anlamıyla açıklayamadığı olgularda genom boyu dizileme yöntemleriyle aday genlerin araştırılmasıdır.

Olguların etnik kökenlerine göre değişebilse de ortalama bir tüm ekzom dizileme (WES: ‘Whole Exome Sequencing’) sonucunda 15.000 ile 20.000 civarında varyant saptanmaktadır. Büyük çaplı verilerin elde edilmesi kolaylaşmış olsa da, analiz edilmesi ve anlamlandırılması güçlükleri barındırmaktadır. Araştırmacılar WES sonucunda çıkan varyantları, genetik ve

klirik öngörölere dayalı çeşitli filtreler aracılığıyla daraltmaktadır. Bu amaçla nadir ve kodlayıcı bölge varyantları, fenotiple ilişkili genlerdeki varyantlar, vakalarda ortak bulunup kontrollerde bulunmayan varyantlar, ailede kalıtım yoluyla aynı bölgelerde bulunan varyantlar ve ön görülen kalıtım paternine uyan varyantlar öncelikli olarak değerlendirilmektedir (112). Ayrıca ACMG kılavuzları doğrultusunda varyantlar patojenik, muhtemel patojenik, klinik önemi belirsiz, muhtemel benign veya benign olarak sınıflandırılmaktadır (23). Bu yöntemle yapılan tüm ekzom analizleri hem klinik tanıda hem de aday gen araştırmalarında son derece başarılı olmuştur. Örneğin pediatrik popülasyonda nadir hastalıklar için tanı oranları WES ile %28 düzeyindedir. Bu oran; ebeveynlerin de analiz içerisine dahi edilmesi (trio-üçlü analiz) ile %40'lara ulaşmaktadır (113). Trio analizler ile varyantların faz durumları (cis/ trans ayrımı) belirlenebilmekte ve *de novo* varyantlar ayırt edilebilmektedir. Geleneksel yöntemlerle en iyi durumlarda ulaşılabilen %10 gibi oranlar düşünüldüğünde genom boyu yaklaşımların tanıya katkısı ciddi boyutlardadır (113). Benzer şekilde pek çok sebebi bilinmeyen ailesel hastalıkta yeni gen tanımlanmıştır. Amyotrofik lateral skleroz ⁽¹¹⁴⁾, inflamatuvar barsak hastalıkları ⁽¹¹⁵⁾, spinoserebellar ataksi ⁽¹¹⁶⁾, non sendromik işitme kaybı ⁽¹¹⁷⁾, Kabuki sendromu ⁽¹¹⁸⁾, Freeman Sheldon sendromu ⁽¹¹⁹⁾ ve daha pek çok hastalıkta WES aracılığıyla nedensel genler saptanabilmiştir (112,120).

FMF olgularını içeren WES çalışmaları ise literatürde az sayıdadır. Genetik olarak yetim olguları açıklamaya yönelik az sayıdaki çalışmanın önemli kısıtlılığı sınırlı sayıdaki genin araştırılmış olmasıdır. Sonuçları bakımından ilginç olan bir araştırmada; epizodik ateş, nötrofilik dermatoz, artralji ve myalji semptomlarının çok sayıda bireyde saptandığı Belçika kökenli bir ailede linkaj ve WES yapılmıştır. Bu ailede, araştırmacıların PAAND ('Pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis') olarak isimlendirdikleri kliniğin bir *MEFV* varyantından (S242R) kaynaklandığı gösterilmiştir (31). Bu çalışmanın sonuçları FMF patofizyolojisinde de bahsedilen yeni gelişmeler için öncü olmuştur. Sınırlı sayıdaki WES çalışmasının bir diğerinde Orta Doğu ve Kuzey Afrika popülasyonlarındaki WES verilerinin değerlendirilmesi ile FMF için epidemiyolojik bilgiler elde edilmiştir (121). Diğer bazı yayınlarda; FMF'in nadir görüldüğü Çin'de WES ile tanı konan olgular tanımlanmış (122), FMF ve Behçet hastalığı birlikteliğine yol açan yeni bir varyant gösterilmiş (123) veya FMF ve sitosterolemi gibi nadir bir fenotipik birliktelik bildirilmiştir (124). Günümüzde literatürde bilimiz dahilinde heterozigot mutasyon taşıyan olguları araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Seçimi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEUTF) Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Çocuk Nefrolojisi Bilim Dalı ile Çocuk Genetik Bilim Dalları bünyesinde yaklaşık 20 yıldır FMF hastalığının tanısı ve genetik takibi amacıyla poliklinik hizmetleri verilmektedir. 01.01.2019 – 31.12.2019 tarihleri arasında polikliniklerimize FMF ön tanısıyla yönlendirilen olgular, rutin hasta takibi kapsamında değerlendirilmiştir. Bu olgulardan Tel-Hashomer tanı kriterlerine (Tablo-1) göre FMF klinik tanısı olan veya olası tanılı olgulara genetik tetkik yapılmıştır. Kliniğimizde genetik tetkik için literatürde önerildiği üzere iki basamaklı bir algoritma uygulanmaktadır (25,94). İlk basamakta *MEFV* geni 8 'hotspot' mutasyonu (E148Q, R202Q, P369S, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S) taranmaktadır. Sonrasında klinik kesin tanılı olan fakat hastalığın otozomal resesif kalıtımı ile çelişecek şekilde tek mutasyon saptanan veya hiç mutasyon saptanamayan bireylerde yeni nesil dizi analizi ile otoinflamatuvar hastalıklar paneli çalışılmıştır. Bu panelin içerisinde toplam 12 gen (*MEFV*, *TNFRSF1A*, *MVK*, *IL1RN*, *LPIN2*, *NOD2*, *NLRP3*, *NLRP12*, *ADA2*, *PSTPIP1*, *TNFRSF11A* ve *ELANE*) bulunmaktadır. İlgili genlere ait tüm ekzonik bölgeler ve ekzon-intron bileşkeleri (± 10 bç) analiz edilmiştir. İkinci basamak test sonrasında dahi hastalık tablosunu açıklayabilecek genetik sonuca ulaşamayan 5 olguya ve birinci derece akrabalarına (toplam 17 kişi) tez kapsamında tüm ekzom analizi yapıldı. Bu tez kapsamındaki çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2020.KB.SAG.009).

Maddi ve teknik nedenlerle, fonksiyonel çalışma ile destekleme yapılamayacağı için WES yapılacak olguların seçiminde; kesin FMF tanılı olgulardan düzenli kolşisin tedavisi kullanan ve bundan yarar görenler ile 1.derece akrabalarında (anne-baba-kardeş-çocuk) FMF öyküsü bulunan olgulara öncelik verilmesi planlanmıştır. Projemiz kapsamında incelenecek olgu sayısı bütçe desteğine orantılı olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak teze dahil edilecek olgular için belirlediğimiz kriterler şu şekildedir;

- Klinik bulgularıyla Tel-Hashomer kriterlerine göre FMF tanısı olan,
- *MEFV* geninde tek mutasyon saptanan veya hiç mutasyon saptanmayan,
- Otoinflamatuvar panelde kliniği doğrulayıcı yeterlilikte varyant saptanmayan* ve
- Birinci derece akrabalarında (anne-baba-kardeş-çocuklar) FMF tanısı bulunan veya düzenli kolşisin tedavisi kullanan ve yanıt alınan,

5 olgu ve birinci derece akrabaları olmak üzere toplam 17 kişi çalışmaya dahil edildi.

*Otoinflamatuvar panelde saptanan varyantların kliniği doğrulayıcı yeterlilikte olup olmadığına Eurofever/PRINTO kriterlerine göre karar verilmiştir (93). Genel olarak dominant hastalıklarda benign, muhtemel benign ve klinik önemi belirsiz varyantlar (VUS) veya resesif hastalıklarda biallelik VUS'lar kliniği doğrulayıcı yeterlilikte kabul edilmemektedir.

3.2. Verilerin Toplanması

Tez araştırması için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.11.2018 tarihli 2018/28-25 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır (**Ek-1**). Pediatrik olgular Çocuk Nefrolojisi ile Çocuk Genetik polikliniklerinde, ebeveynler ise Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirildi. Poliklinik muayenesi esnasında veri kayıt formu dolduruldu. Bu formda semptom başlangıç yaşı, komplet atakların özellikleri, inkomplet atakların özellikleri, amiloidoz bulguları, ek hastalıklar, kolşisin ve diğer ilaç kullanımı, varsa sedimentasyon, CRP, lökositöz, fibrinojen gibi laboratuvar değerleri, eski moleküler inceleme sonuçları, ailedeki diğer FMF tanılı bireyler ve aile ağacı kaydedildi (**Ek-2**). İkinci basamak NGS sonuçları verilirken dahil edilme kriterlerini karşılayan olgulara araştırma anlatıldı ve gönüllü olanlara bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı (**Ek-3**). Pediatrik olgular için yasal vasilerinden onam alındı. Tüm tetkiklerin öncesinde ve sonrasında olgulara genetik danışmanlık hizmeti verildi.

3.3. Genomik DNA İzolasyonu

Laboratuvar çalışmasının ilk aşamasında onam veren tüm olgulardan toplam 4 ml EDTA'lı tüpe periferik kan örneği alındı. Saflaştırılmış total genomik DNA elde edilmesi amacıyla her olgunun 200 µl kanında spin kolon DNA izolasyon tekniği uygulandı. Bu amaçla Qiacube® otomatize DNA izolasyon cihazı (Qiagen, Almanya) ve QIAamp® DNA Blood Mini kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği protokoller uygulanmış olup, cihaz kan ile diğer kimyasalların eklenmesi sonrasında otomatize olarak çalışmaktadır ve özetle şu aşamaları içermektedir;

1. İlk aşamada 20 µl proteinaz K, 200 µl ligasyon buffer solüsyon ve 200 µl periferik kan 1.5ml mikrosentrifüj tüpüne eklenir. 56 °C'de 10 dakika inkübasyonda bırakılır.
2. 200 µl etanol (%96-100) örneğe eklenir ve 15 sn vortekslenir.
3. Karışım spin kolona nakledilir. Spin kolon temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
4. 6000xg'de 1 dk santrifüj edilir. Filtrat atılır.
5. 500 µl 'Wash buffer 1' eklenir. Spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
6. 6000xg'de 1 dk santrifüj edilir. Filtrat atılır.
7. 500 µl 'Wash buffer 2' eklenir. Spin kolon yeni bir temiz 2 ml toplama tüpüne konulur.
8. 20000xg'de 3 dk santrifüj edilir. Filtrat atılır.
9. Spin kolon temiz 1.5 ml mikrosentrifüj tüpüne alınır. 100-200 µl 'Elution buffer' veya distile su eklenir. 1-5 dk oda sıcaklığında bekletilir.
10. 6000xg'de 1 dk santrifüj edilir. Spin kolonlar atılır.
11. Elde edilen DNA'lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, parafilmle ağızları kapatılarak DNA saklama kutularına konulup -20°C'de saklandı.

3.4. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

Konsantrasyon ve saflık ölçümünde NanoDrop ND1000® Spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Spektrofotometrik ölçüm; DNA, RNA ve protein gibi maddelerin içinde bulundukları sıvı solüsyondan geçirilen belirli spektrumlardaki ışığı kimyasal yapılarına ve konsantrasyonlarına paralel olarak absorbe (A) etmesi prensibine dayanır. Nükleik asitler 260 nm'de ve proteinler 280 nm'de ışığı maksimum absorbe ettiği için A260/A280 oranı kullanılarak DNA saflığı hesaplanabilir. Tez çalışmalarına uygun kalitede DNA materyalinin A260/A280 oranının 1,8-2,0 arasında olması ve konsantrasyonunun ise en

az 40 ng/μl olması hedeflendi. Saflığı hedef aralıktan daha az olan oranlar protein kontaminasyonunu gösterirken, daha fazla olanlar RNA miktarının fazla olduğunu gösterir. Saflık ve konsantrasyonları hedefe ulaşmayan örneklerde izolasyon tekrar edildi.

3.5. Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu

Teze dahil olma kriterlerini sağlayan hastalar iki aşamalı *MEFV* genetik testi sonrasında seçilmiştir. Bunların ilki rutin poliklinik hizmetleri kapsamında uygulanan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tetkikidir. İkincisi ise Otoinflamatuvar Hastalıklar NGS panelidir. 01.01.2019 – 31.12.2019 tarihleri arasında polikliniklerimize FMF ön tanısıyla yönlendirilen olguların ilgili tetkik sonuçları Tıbbi Genetik AD arşivlerinden temin edilmiştir.

3.5.1. Real-Time PCR ile Sık Görülen Mutasyonların Tespiti

Klasik polimeraz zincir reaksiyonunda hedef DNA, o bölgeye özgün primerler (oligonükleotidler) ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılmaktadır fakat sonrasında çoğaltılan ürünlerin görüntülenmesi için ek işlem gerekmektedir. Real-Time PCR’da ise DNA’nın çoğaltılması ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi aynı anda mümkün olmaktadır. Floresan isaretili prob veya boyaların kullanılması yoluyla yeni oluşan DNA miktarı ile doğru orantılı olarak floresan ışımaya elde edilmektedir. Bu ışımaya gerçek zamanlı takip edilmesi ile hem PCR etkinliği hem de başlangıçtaki hedef DNA miktarının rölatif kantitasyonu saptanabilmektedir. Öte yandan spesifik nükleotid dizilerine özgü problemler kullanılarak tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) varlığı da gösterilebilir. SNP genotipleme ve bu problemlerin hibridize olduğu çift zincirli DNA dizilerinin farklı sıcaklıklarda denatüre olması prensibine dayalı olarak yapılan analize erime eğrisi analizi (‘melting curve analysis’) denilmektedir. Kliniğimizde bu yöntemle *MEFV* geninde en sık görülen 8 mutasyon (E148Q, R202Q, P369S, M680I, M694V, M694I, V726A, A744S) incelenmektedir. Real-Time PCR işlemleri için Cobas® z480 Real-Time PCR cihazı (Roche Diagnostics, İsviçre) ve LightSNiP® FMF kiti (TIB Molbiol, Almanya) üretici protokollerine uygun olarak kullanılmıştır.

Uyguladığımız tetkik aşamaları şu şekildedir;

- Çalışmada kullanılacak DNA’lar -20 °C den çıkartılarak çözüldü.

- Her SNP genotiplemesi için 20 µl, hasta başına 8 SNP genotipleneceği için toplam 160 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Her 20 µl için karışıma aşağıdaki kimyasallar eklendi.
 - H₂O 11.4 – 15.4 µl
 - FastStart DNA Master HybProbe 2.0 µl
 - MgCl₂ 1.6 µl
 - DNA 1.0 – 5.0 µl (~50 ng)
- Reaksiyon karışımı önceden spesifik problarla hazırlanmış olan LightSNIp 96 kuyucuklu plak kuyucuklarına 20’şer µl olarak dağıtıldı.
- Hazırlanan plak Cobas® z480 Real-Time PCR cihazında Tablo-5’teki protokol ile yürütüldü.

Program	Denatürasyon	PCR Siklusları			Erime Edilmesi	Eğrisi	Elde	Soğutma
Siklus Sayısı	1	45-60			1			1
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Zaman (sn)	600	10	10	15	30	120	0	30
Okuma	-	-	-	-	-	40 °C’den 75 °C’ye çıkarken her 1 °C’lik artışta 3 kez floresan okuma yapılmaktadır		

Tablo-5: Real-Time PCR ve erime eğrisi analizi tepkime koşulları

3.5.2. Otoinflatuar Hastalıklar NGS Paneli

Yeni nesil dizileme analizi tekniklerinin rutin kullanıma girmesiyle günümüzde pek çok gen ve olgu aynı anda, ucuz ve hızlı biçimde sekanslanabilmektedir. Son yıllarda çok sayıda farklı teknik tanımlansa da en yaygın kullanıma sahip olan yöntem köprü amplifikasyonu ve sonrasında sentez yoluyla dizileme yöntemidir. Rutin olgu yönetimi algoritmamızda ilk basamak Real-Time PCR analizinde biallelik mutasyon saptanmamış olan fakat klinik tanısı kesin olan olgularda Otoinflatuar Hastalıklar NGS Paneli (Celemics, Güney Kore) çalışılmıştır. Bu panel 12 adet gen [*TNFRSF1A* (ENST00000162749), *MEFV* (ENST00000219596), *MVK* (ENST00000228510), *IL1RN* (ENST00000259206), *LPIN2* (ENST00000261596), *NOD2* (ENST00000300589), *NLRP3* (ENST00000336119), *NLRP12*

(ENST00000391773), *ADA2* (ENST00000399839), *PSTPIP1* (ENST00000558012), *TNFRSF11A* (ENST00000586569), *ELANE* (ENST00000590230) – Parantez içlerinde transkript numaraları verilmiştir (125)] içermektedir. Yürütmeler için Nextseq® (Illumina, ABD) NGS platformu kullanılmıştır. Elde edilen ham veri SEQ analiz platformuna (Genomize, Türkiye) yüklenerek analiz edilmiştir. Tüm aşamalarda üretici protokollerine uyulmuştur. Başlangıçta yeterli kalite parametrelerine sahip DNA temin edilip edilmediği kontrol edilir. İstenen miktarda DNA elde edildikten sonra kütüphane hazırlama aşamasına geçilir. Sırasıyla; DNA fragmentasyonu, pürifikasyon, DNA uç onarımı, pürifikasyon, A ucu takılması, pürifikasyon, adaptör ligasyonu, pürifikasyon, indeks ile işaretleme, pürifikasyon, prob hibridizasyonu, streptavidin boncuk ile hedef kütüphanenin seçilmesi, hedef kütüphanenin amplifikasyonu ve son pürifikasyon işlemleri gerçekleştirilir. En son hazırlanan kütüphane NGS platformunda yürütülerek dizileme verisi elde edilir. Tüm bu aşamalar tez çalışmasının özünü oluşturan WES ile aynı basamakları içermektedir ve WES başlığı altında daha ayrıntılı açıklanacaktır.

3.6. Tüm Ekzom Dizileme (WES)

Ekzom dizilemesi ile insan genomunun kodlayan bölgeleri içindeki ekzonların zenginleştirilmesi ve yüksek verimli sekanslanması sonucu kişiye ait varyasyonlar ortaya konmaktadır. 22.000 gen üzerindeki 180.000'den fazla ekzon taranmaktadır. Toplumda sık görülen ve herhangi bir hastalığa yol açmayan varyasyonlar görülebileceği gibi, son derece nadir ve kişiye özgü varyantlar da saptanabilmektedir. Tüm ekzonlar, genomun yaklaşık %1'ini kaplamasına karşın hastalık yapıcı mutasyonların %85'i bu bölgelerde bulunmaktadır. Mendelyen bozukluklar veya multifaktöryel hastalıklar; genomun kodlayıcı bölgesindeki farklılıkların frekans, fonksiyonel etki, ailesel kalıtım, segregasyon, *in silico* predikasyon ve protein sentezi üzerindeki etkileri gibi sonuçlarının incelenmesi yoluyla aydınlatılmaktadır. Tüm ekzom analizi verileri değerlendirilirken kullanılan başlıca iki kalite parametresi bulunmaktadır. Kaplam; hedef bölgenin yüzde kaçının okunduğunu ifade ederken, derinlik; belirli bir bölgenin toplamda kaç defa okunduğunu ifade eder. Minimum 50x derinlikte, %75 kaplam hedeflenerek çalışma yapıldı. WES için 'Twist Bioscience™ Customized Kit for Exome' kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Kullanılan kit hedef yakalama ve zenginleştirme ('target capture and enrichment') prensibi ile çalışmaktadır. Bu yöntemde biotinile edilmiş probalar hedef bölgeyle hibridize olduktan sonra streptavidin boncuklarla

yakalanıp manyetik alan ile hedef dışı bölgelerde ayrıştırılarak çoğaltılmaktadır. Kütüphane hazırlanması aşamasında kullanılan materyaller Tablo-6'da, ekipman ise Tablo-7'de belirtilmiştir.

Malzeme	Marka
Target Capture NGS kit	Twist Bioscience™ Customized Kit for Exome
DNA Pürifikasyonu için Manyetik Boncuklar	Beckman Coulter™ AMPure XP for PCR Purification
Kütüphane Amplifikasyon Kiti	Roche™ KAPA HiFi HotStart Library Amplification Kit
NGS Reaksiyon Kartuşu	Illumina™ HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5
Etanol	MERCK™ Ethanol
Nükleaz İçermeyen Su	MERCK™ Nuclease free water

Tablo-6: WES için kullanılan materyaller

Ekipman	Marka
PCR Cihazı	Bio-Rad™ T100 Thermal Cycler
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific™ NanoDrop ND1000® Spectrophotometer
Santrifüj	Eppendorf™ 5425/5424R
Vorteks	IKA™ Vortex
Termal Çalkalayıcı	BIOSAN™ TS-100 Thermo-Shaker
Mikropipet Setleri	Eppendorf™
Manyetik Stand	DynaMag™ -2 Magnet
0.2 ml, 1.5 ml, 2 ml PCR tüpleri	Eppendorf™

Tablo-7: WES için kullanılan ekipman

3.6.1. WES Laboratuvar Aşamaları

Olguların WES çalışması için A260/A280 oranı 1,8-2,0 saflığında ve en az 40 ng/μl konsantrasyonda DNA kullanıldı. Kütüphane hazırlığı sırasındaki 'wetlab' aşamaları hizmet

alımı ile gerçekleştirilmiş olup, biyoinformatik aşamalar ve klinik analizi DEÜTF Tıbbi Genetik AD'da uygulandı. Kütüphane hazırlanırken sırasıyla; fragmentasyon, Açık uç onarımı, A ucu takılması, adaptör ligasyonu, indeks ile işaretleme, prob hibridizasyonu, streptavidin boncuk ile hedef kütüphanenin seçilmesi, hedef kütüphanenin amplifikasyonu ve pürifikasyon işlemleri yapıldı.

DNA Fragmentasyonu: DNA, fragmentaz enzimi ile 37°C'de inkübe edildi. 150-250 bp uzunluğunda DNA fragmanları elde edildi.

Pürifikasyon*: Pürifikasyon işlemi manyetik boncuklar (Magnetik bead) ile yapıldı. Manyetik boncuk çözeltisi kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığına bekletildi. 2mL'lik konik dipli tüplere her örnek için manyetik boncuk dağıtıldı. Üzerine fragmente edilen DNA ürünleri eklendi. Vorteks ve spin ile homojenize edildi. Manyetik boncukların DNA'yı yakalaması için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Tüpler manyetik standı yerleştirildi. Sıvı şeffaf olduğunda (3-5 dk) süpernatant pipetle atıldı. Tüpler manyetik standı üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklendi. 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Kalan alkolü temizlemek için spin yapıldı ve 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi. Alkol tamamen uzaklaşmaya kadar bekledi (kurutma). Manyetik boncuk tabakasının tamamen kuruyup çatlamamasına dikkat edildi. Tüpler standı üzerindeyken nükleaz içermeyen su eklenip, standtan alındı. Vorteks ve spin yapıldı. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Standı tekrar yerleştirilip, şeffaflaşınca standtan çıkartmadan süpernatant yeni tüplere alındı ve sonraki aşamalar için kullanıldı. DNA üzerine uygulanan tüm işlemlerin arasında pürifikasyon tekrarlandı.*

DNA ucu onarımı (End repair): Test kitinde bulunan 'End Repair Mix' üzerine bir önceki adımdan elde edilen DNA ürünü eklendi ve 20°C'de 30 dk inkübe edildi.

*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

A ucu takılması (A-tailing): Bu adımda DNA fragmentlerinin ucuna adenilasyon yapılmaktadır. Bu amaçla test kitinde bulunan A-tailing tüplerinin üzerine bir önceki pürifikasyon adımından elde edilen DNA ürünü eklendi. Örnekler 30°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.

*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

Adaptör Ligasyonu: Bir önceki pürifikasyondan elde edilen süpernatant ligasyon tüplerine eklendi. Üzerine kitin içerisinde bulunan adaptör eklendi. 15 dk 20°C’de inkübasyon yapıldı. Sonrasında USER enzimi eklenip ve 37°C’de 15 dk inkübe edildi.

*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

İndeks ile İşaretleme: Dual indeks (ikili indeks) seti kullanıldı. İndeksler aynı anda birden fazla örneğin tek bir tüpte birleştirilmesi ve eş zamanlı sekanslanmasını mümkün kılan primer dizileridir. i5 ve i7 olarak adlandırılan evrensel dual indeks sistemi kullanılmıştır. Bir önceki adımdan elde edilen DNA ürünü, ‘KAPA Library Amplification Mix’ ve indeks primerleri ile oluşturulan reaksiyon karışımı PCR cihazına kondu ve kit kullanım kılavuzunda önerilen PCR protokolü uygulandı.

*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

Prob Hibridizasyonu: Kitin içerisinde bulunan Blok miks, Hibridizasyon miks ve ‘Target Capture’ problemleri ile hibridizasyon reaksiyonu hazırlandı. Örnekler ile gece boyu 65°C’de inkübe edildi.

Streptavidin boncuk ile hedef kütüphanenin seçilmesi: Hibridizasyondan alınan örnekler streptavidin boncuklar ve kitin içerisinde bulunan yıkama çözeltileri ile seri yıkama işleminden geçirildi. Bu sayede elde edilen DNA ürünü hedef kütüphaneyi oluşturmaktadır.

Hedef kütüphanenin amplifikasyonu: Elde edilen hedef kütüphane PCR ile amplifiye edildi. Son kez pürifikasyon adımı tekrarlandı ve hedef bölgeleri seçilmiş, indekslenmiş kütüphanenin yürütme öncesi konsantrasyon kontrolü yapıldı.

Illumina Cihazı ile Yeni Nesil Dizileme: Kütüphane hazırlama basamakları tamamlandıktan sonraki adım Illumina™ HiSeq cihazı ile sekanslama işlemi yapıldı. Kütüphane hazırlama kiti ile elde edilen indekslenmiş örnekler tek bir tüpte birleştirildikten sonra cihaz kartuşuna yüklendi. Reaksiyon kartuşu ve akış hücresi (‘flow cell’) cihaza yerleştirildi. Cihazdan elde edilen data, “FASTQ” formatında alındı.

3.6.2. WES Biyoinformatik Analizi

İşlem sonucu ortaya çıkan 'FASTQ' formatındaki ham veriler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda analiz edildi ve NGS yürütme hizmeti alınan merkezde hiçbir veri saklanmadı. Ham veriler; referans genomu (hg19) hizalama, sıralama, varyant çağırma ('variant calling'), güvenilirlik skorlaması ve varyant anotasyonu aşamalarından geçirildi. Bu aşamalarda SEQ (Genomize, Türkiye) analiz platformu kullanıldı (126). SEQ platformunda; *Burrows-Wheeler-Aligner* programı ile okumaların referans genomu haritalanması ve *FreeBayes* haplotip temelli varyant çağırma programının optimize edilmiş algoritması otomatize olarak kullanılmaktadır. Başlıca 5 parametreye göre varyantlara güvenilirlik değerlendirilmesi yapılır. Bu parametreler; primer ve sekonder kaplam eşiği, alternatif/allel oranı eşiği, iplikçik bias değeri eşiği ve heterozigot varyantlar için her iki iplikçikteki alternatif/allel oranlarından gelen kanıt varlığıdır. Tüm parametrelerde geçerli olan varyantlara yüksek güvenilirlik, en az birinden geçersiz olan varyantlara düşük güvenilirlik, primer kaplam eşiğini geçemiyorsa yetersiz güvenilirlik sınıflandırması yapılır (126). Yetersiz olanlar sonraki aşamalarda değerlendirilmeye alınmadı. Sonuç olarak 'VCF' formatındaki, her bir varyant için güvenilirlik skorlaması yapıp, hg19 insan referans genomuna hizalanmış ve anote edilmiş veriler, ileri filtrelendirmeler ile patojenite sınıflandırmasına tabii tutuldu. Tüm olgularda 22.000 gen hedef bölgesi için minimum 50x derinlikte ve en az %75 kaplam dahilinde veri elde edilmesi amaçlandı.

3.6.3. WES Verilerinin Klinik Analizi

Saptanan varyantların patojenisite sınıflandırmasında 2015 yılında yayınlanan Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Derneğinin güncel kılavuzu esas alınmıştır (23). Buna göre varyantlar sırasıyla benign, muhtemel benign, klinik önemi belirsiz, muhtemel patojenik ve patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Patojenisite açısından elde edilebilecek ek bilgilerin (*de novo* olup olmamaları, cis-trans durumunda bulunan varyantların ayırt edilmesi vb.) analize dahil edilebilmesi için; ebeveynlerin tetkiki de aynı analiz içine dahil edilmiştir. Dolayısıyla üçlü analiz varyant anlamlandırılması için önem arz etmektedir. Bu aşamada kullanılan veriler şu şekildedir;

- Varyantın tipi (nonsense, missense, stop vb...),
- Varsa daha önce bildirilmiş aynı aminoasit değişiminin patojenisitesi,

- Varsa daha önce bildirilmiş aynı kodon değişikliğinin patojenisitesi,
- *de novo* olup olmaması,
- Bilinen fonksiyonel çalışmasının olup olmaması,
- Toplum frekansı ve merkez içi frekansı,
- Varsa eski vaka-kontrol çalışmalarındaki frekansları,
- Protein üzerinde mutasyonel 'hotspot' bir noktada yer alıp almaması,
- Biallelik olup olmaması,
- Protein uzunluğu üzerindeki etkisi,
- *in silico* analiz verileri
- Uluslararası veritabanlarındaki verileri

Patojenisite sınıflandırması sırasında SEQ platformunun yanısıra; Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ait ClinVar veritabanı, Varsome (Saphetor, İsviçre) analiz platformu ve Franklin (Genoox, ABD) analiz platformundan da yararlanıldı. Filtrelenen hedef varyantların ait olduğu genler DAVID ('Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery') veritabanında işlevsel zenginleştirme analizi ile araştırıldı (127). Bu sayede Pysin ilişkili olmasa bile olgularda immunité aracılı yolaklarda artmış bir varyant yükü bulunup bulunmadığı değerlendirildi. Ayrıca saptanan varyantların içinde *MEFV* geninin görevli bulunduğu 'Nod-like reseptör sinyal yolağında' görevli bir gene ait varyant olup olmadığı kontrol edildi. Varyant saptanan genlere ait fonksiyonel incelemelerde FMF patogenezinde değinilen başlıca 13 gen [*MEFV*, *CASP1*, *IL18*, *IL1B*, *MVK*, *PKN1*, *PKN2*, *PSTPIP1*, *PYCARD*, *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *YWHAB* (14-3-3 proteini)] ile bilinen fonksiyonel ilişki olup olmadığı GeneMANIA ve STRING ('Search Tool for Recurring Instances of Neighboring Genes') uygulamaları kullanılarak araştırıldı (128,129). Yanlış anlamlı ('missense') varyantlara ait *in silico* tahmin verileri için 'REVEL' algoritmasına ait skorlar kullanıldı (130). Revel skorlamasında 0-1 arası değerler bulunmaktadır ve spesifik olarak patojenik varyantların ayırt edilmesi için Ioannidis ve arkadaşları 0,75 ve üstü skorların sınır olarak kabul edilebileceğini önermiştir. Daha sensitif bir analiz amaçlandığında bu sınırın 0,5 olarak da kabul edilebileceği belirtilmiştir (130). Bu çalışma dahilinde Revel skoru 0,5-0,75 arasındaki değerler VUS yönünde; 0,75 üzerindeki değerler ise patojenisite lehine değerlendirilmiştir.

Gnomad veritabanından her gene özgü o/e skorları ('observed/expected') temin edildi. Bu skorlar genel toplumda herhangi bir gen için karşılaşılan varyant sayısının ('observed'),

evrimsel olarak beklenen varyant sayısına ('expected') oranını yansıtmaktadır (131). Bu hesaplama içerisinde Gnomad veritabanında ilgili genin sekans dizilimini, olgu başına kaplamaları ve metilasyon durumlarını hesaba katan bir mutasyon modeli algoritması kullanılmaktadır ve başlıca 3 farklı varyant tipi için 3 farklı skor hesaplanmaktadır (131). Sinonim varyantlar, missense ile inframe delesyon/duplikasyon varyantları ve yıkıcı varyantlar (nonsense, çerçeve kayması, ekzondan +/- 2 baz çifti uzaklıkta yer alan 'splice' varyantları, başlangıç ve stop kodon varyantları) için ayrı ayrı o/e skorları bulunmaktadır (131). Bu çalışmada da varyant filtrelemeleri varyantın tipine göre ayrı ayrı yapılmış ve varyant tipine özgü o/e skoru analizde kullanılmıştır. Skor olarak 0,35 üzeri varyantın benign olduğu yönünde yorumlanmıştır. Tüm bu bilgilerin değerlendirilmesi sonrası patojenik/muhtemel patojenik kabul edilen varyantlar ve ilgili genlerinin FMF kliniğiyle olası ilişkisi güncel literatür ışığında değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmaya DEÜTF Çocuk Nefroloji ve Çocuk Genetik polikliniklerinde takip edilen 5 indeks olgu ve birinci derece akrabaları olmak üzere toplam 17 kişi dahil edildi. İndeks vakaların yaşları 4-12 (Ortalama: 8,4) arasındaydı. Tüm çalışma grubunun yaş ortalaması 23,6 olarak tespit edildi. İndeks vakaların kardeşlerinde bir, ebeveynlerinden ise iki kişi daha FMF tanısı ile kolşisin kullanmaktaydı. Dolayısıyla toplam FMF tanılı birey sayısı 8 idi. Çalışma grubunun %47'sini (8/17) erkekler, %53'ünü (9/17) kadınlar oluşturmaktaydı.

4.2. Olguların Klinik Özellikleri

Olguların klinik bulguları tablo-8'de özetlenmiştir.

4.2.1. Aile I'e Ait Klinik Bulgular

İndeks olgunun (Tablo-8, olgu I.1) FMF ilişkili semptomları 5 yaşında başlamıştı. 5-7 yaşları arasında en az 4 kez, karın ağrısı ve ateş atakları geçirmişti. Kusma ve ishal eşlik etmiş fakat göğüs ağrısı, eklem bulguları veya döküntüsü olmamıştı. Ateşinin 38-39 °C aralığında ölçüldüğü öğrenildi. Ayırıcı tanıda enfektif odak bulunamaması üzerine FMF düşünülerek 1 mg/gün kolşisin tedavisi başlanılmıştı. Tedavi başlangıcı sonrası benzer ataklar tekrarlamamıştı fakat yılda 1-2 sefer ateşsiz, peritonit bulguları olmayan ve lokalize edemediği karın ağrıları olmuştu. Son atağını 11 yaşında iken kendi kararıyla 15 gün kolşisini kullanmamasını takiben geçirmişti. 37°C ateş, karın ağrısı ve sağ ayak bileğinde artralji bulguları saptanmıştı. Özgeçmişinde ek olarak dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu tanısıyla metilfenidat kullandığı öğrenildi. Genetik incelemesinde *MEFV* geninde M694V heterozigot mutasyonu saptandı ve otoinflamatuvar panelde herhangi bir ek varyant bulunmamaktaydı.

İndeks olgunun ablası (Tablo-8, olgu I.2) sağlıklı idi. *MEFV* geninde M694V heterozigot mutasyonu bulunmaktaydı ve otoinflamatuvar panelde herhangi bir ek varyant saptanmamıştı.

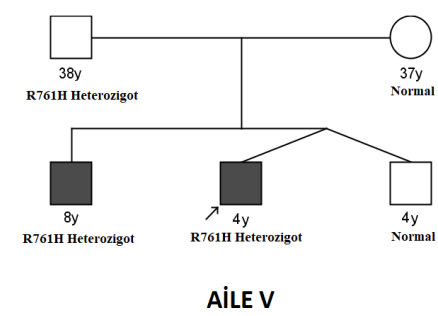
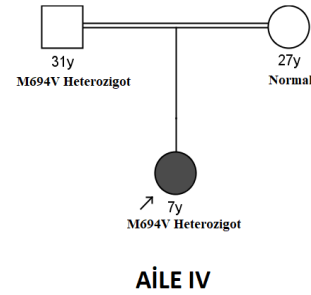
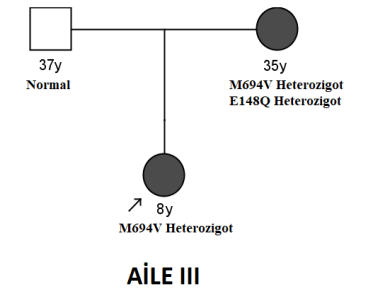
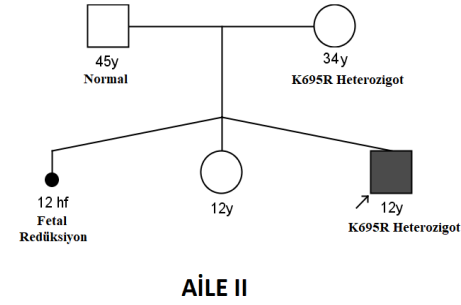
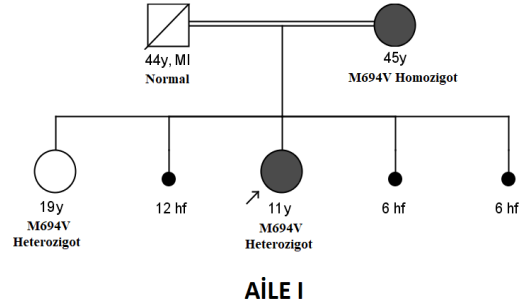
Olgular	Cinsiyet	Yaş	Başlangıç Yaşı	Karın ağrısı	Ateş	Atralji	Artrit	Atak Sıklığı*	Atak Süresi (Gün)
Aile I									
I.1 (indeks olgu)	Kadın	11	5	+	+	+	-	Yılda 1-2	5-7 gün
I.2 (abla)	Kadın	19	-	-	-	-	-	-	-
I.3 (anne)	Kadın	45	6	+	+	+	+	Yılda 6-7	5-10 gün
Aile II									
II.1 (indeks olgu)	Erkek	12	8	+	+	-	-	2 Ayda 1	3 gün
II.2 (anne)	Kadın	34	-	-	-	-	-	-	-
II.3 (baba)	Erkek	35	-	-	-	-	-	-	-
Aile III									
III.1 (indeks olgu)	Kadın	8	2	-	+	+	+	Yılda 4-5	1-2 gün
III.2 (anne)	Kadın	35	18	+	+	+	+	Yılda 10-12	1-2 gün
III.3 (baba)	Erkek	37	-	-	-	-	-	-	-
Aile IV									
IV.1 (indeks olgu)	Kadın	7	1	+	+	+	-	Yılda 4-6	2-3 gün
IV.2 (anne)	Kadın	27	-	-	-	-	-	-	-
IV.3 (baba)	Erkek	31	-	-	-	-	-	-	-
Aile V									
V.1 (indeks olgu)	Erkek	4	1	-	+	-	-	Ayda 1	2-3 gün
V.2 (dizigotik ikiz)	Erkek	4	-	-	-	-	-	-	-
V.3 (abi)	Erkek	8	2	-	+	+	+	Yılda 3-4	3-7 gün
V.4 (anne)	Kadın	37	-	-	-	-	-	-	-
V.5 (baba)	Erkek	38	-	-	-	-	-	-	-

Tablo-8: Çalışmaya katılan vakaların klinik bulguları. *Atak sıklıkları olguların tedavi öncesi hastalık dönemindeki sıklığı yansıtmakta olup, tüm olgularda kolşisin tedavisi sonrası atak sıklığı gerilemiştir.

Olgular	EBE	Göğüs Ağrısı	İshal / Kabızlık	Bulantı /Kusma	Myalji	ESH/CRP*	Lökosit* (/µl)	Laparotomi Öyküsü	Kolşisin Kullanımı
Aile I									
I.1 (indeks olgu)	-	-	+	+	+	41 / 0,3	8300	-	1 mg/gün
I.2 (abla)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
I.3 (anne)	-	+	-	-	-	13* / 3,9*	5400*	+	1,5 mg/gün
Aile II									
II.1 (indeks olgu)	+	-	-	-	-	3* / 0,7*	9900*	-	1 mg/gün
II.2 (anne)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
II.3 (baba)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
Aile III									
III.1 (indeks olgu)	-	-	-	-	+	40 / 2,9	5000*	-	1 mg/gün
III.2 (anne)	-	+	+	+	-	-	-	-	1,5 mg/gün
III.3 (baba)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
Aile IV									
IV.1 (indeks olgu)	-	-	+	+	-	32 / 6,1	3100	-	1 mg/gün
IV.2 (anne)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
IV.3 (baba)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
Aile V									
V.1 (indeks olgu)	+	-	-	-	-	81 / 110,6	12100	-	0,5 mg/gün
V.2 (dizigotik ikiz)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
V.3 (abi)	-	-	-	-	-	17 / 20,3	15300	-	0,5 mg/gün
V.4 (anne)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı
V.5 (baba)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sağlıklı

Tablo-8 (devamı): Çalışmaya katılan vakaların klinik bulguları. EBE: Erişipel Benzeri Eritem. ESH: eritrosit sedimentasyon hızı (mm/saat). CRP:C-Reaktif Protein (mg/L). *Laboratuvar değerleri (ESH, CRP, Lökosit) atak dönemi değerlerini yansıtmaktadır. ‘*’ işareti bulunan değerler, atak dönemi verisi bulunmayan olgularda atak dışı dönemdeki bazal değerleri yansıtmaktadır.

■, ● : FMF Klinik Tanılı Olgular



Şekil-7: Çalışmaya katılan indeks vakaları ve birinci derece akrabalarını gösteren pedigriler. *MEFV* genetik analizi sonuçları olguların yaşlarının altında gösterilmiştir. Benign ve muhtemel benign varyantlar dahil edilmemiştir. MI:Myokard infarktüsü

İndeks olgunun annesinin (Tablo-8, olgu I.3) de FMF tanısı bulunmaktaydı. İlk semptomları 6 yaşında başlamıştı. Tipik karın ağrısı ve ateş şikayetleriyle çok sayıda atak geçirmişti. O dönemde ataklarının 5-10 gün arasında sürdüğünü ve senede ortalama 6 kez tekrarladığı öğrenildi. Dönem dönem göğüs ağrısı ve eklem bulgularının (özellikle ayak bileği ve diz) eşlik ettiği atakları olmuştu. Döküntü öyküsü bulunmamaktaydı. 18 yaşında apendektomi olmuştu fakat patoloji raporu bulunmadığı için apandisit olup olmadığı bilinmemekteydi. FMF tanısı 21 yaşında iken konulmuştu ve kolşisin tedavisine başlanmıştı. Tedavi başlangıcı sonrası atak sıklığı azalmıştı. 30 yaşının sonrasında da senede 0-1 atak geçirmekteydi. Kolşisin 1,5 mg/gün düzenli kullanmaktaydı. *MEFV* geninde M694V homozigot mutasyonu saptandı ve otoinflamatuar panelde herhangi bir ek varyant bulunmamaktaydı.

İndeks olgunun babası 44 yaşında myokard enfarktüsü nedeniyle exitus olduğu için çalışmaya dahil edilemedi. Bilinen *MEFV* mutasyonu bulunmamaktaydı. Fakat babaannesinin 3. dekatta kronik böbrek yetmezliği nedeniyle vefat ettiği ve çocukluğundan beri ateşli karın ağrısı ataklarının olduğu öğrenildi. O yıllarda kesin tanı almadığı için amiloidoz etyolojili olup olmadığı kesinleştirilemedi. Ailede bilinen başka FMF tanılı birey bulunmamaktaydı (Şekil-7).

4.2.2. Aile II'ye Ait Klinik Bulgular

İndeks olgu'nun (Tablo-8, olgu II.1) ilk bulguları 8 yaşında iken başlamıştı. 6 ay içinde 3 kez şiddetli karın ağrısı ve peritonit bulgularıyla takip edilen ve her seferinde apandisit ön tanısı düşünülen atakları olduğu öğrenildi. Tüm atakları 3 gün içinde azalarak gerilemiş ve opere edilmemişti. Atak sırasında ateşi 38 – 38.5 °C aralığında ölçülmüştü. Eklem ağrısı, göğüs ağrısı şikayetleri olmamıştı. Ataklardan bağımsız olarak ara ara el ve ayaklarda lokalize döküntü olmaktadır. FMF ön tanısıyla olguya *MEFV* tetkiki yaptırılmış ve K695R heterozigot mutasyonu saptanmıştı. 6 aylık kolşisin denemesi başlatılan olgunun hiç şikayeti olmaması sonrasında kolşisin tekrar deneme amaçlı kesilmişti. Fakat atakların tekrar başlaması üzerine kesin FMF tanısı düşünülerek 1 mg/gün kolşisin tedavisi başlanmıştı. İlacı düzenli kullanan olgunun şikayeti bulunmamaktaydı. Özgeçmişinde ev tozu akarı alerjisi bulunduğu ve immünoterapi gördüğü öğrenildi. Alerjik şikayetleri arttıkça setirizin kullanmaktaydı. Olgunun otoinflamatuar hastalıklar panelinde *MEFV* geninde önceden bilinen K695R heterozigot mutasyonu doğrulandı. Aynı zamanda *ELANE* geninin 5. intronunda heterozigot c.597+4C>T

varyantı ve *NLRP12* geninin 3. ekzonunda heterozigot c.1343C>G (p.G448A) varyantı saptandı. Fakat bu varyantlar VUS olarak değerlendirildi ve kliniği açıklamamaktaydı.

İndeks olgunun in vitro fertilizasyon sonucu oluşan gebelikten bir dizigotik ikizi ve bir de fetal redüksiyon amacıyla termine edilen üçüzü bulunmaktaydı. Yaşayan kardeşi 12 yaşında ve sağlıklıydı. Ailenin isteği doğrultusunda çalışmaya dahil edilmedi. Olgunun sağlıklı annesi (Tablo-8, olgu II.2) ve babasının (Tablo-8, olgu II.3) arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Ailede bilinen başka FMF tanılı birey yoktu (Şekil-7).

4.2.3. Aile III'e Ait Klinik Bulgular

İndeks olgu (Tablo-8, olgu III.1) 2 yaşında tekrarlayan monoartrit bulguları nedeniyle tanı almıştı. Ataklarda en sık unilateral diz tutulumu görülmüştü. Dönem dönem dirseklere izole artralji, yaygın artralji, karın ağrısı ve bulantı ile seyreden şikayetleri olsa da nadir olduğu öğrenildi. Olgunun her atağında ateş bulunmamaktaydı fakat ateşin eşlik ettiği ataklarda 41°C'ye kadar yükseldiği öğrenildi. Ataklar yaklaşık 3 ayda bir tekrarlamakta ve 1-2 gün içinde düzelmekteydi. Annesinde de FMF tanısı olduğu için 0,5 mg/gün kolşisin denemesi başlanmış ve kısmi yarar görmüştü. 4 yaşında kolşisinin 1 mg/gün doza yükseltilmesi ile şikayetleri tamamen düzelmişti. Son yıllarda tek şikayeti uzun yolculuklar sonrası başlayan yaygın artalji iken, 8 yaşında 40°C ateş, karın ağrısı ve yaygın artalji bulgularıyla seyreden bir atak geçirmişti. Ayırıcı tanıda herhangi bir enfeksiyöz odak bulunamamış ve 2 gün içinde tüm bulguları düzelmişti. Özgeçmişinde ek hastalığı bulunmayan olgunun genetik analizinde *MEFV* geninde M694V heterozigot mutasyonu ile heterozigot R202Q polimorfizmi saptandı. Otoinflamatuvar panelde *NLRP3* geninin 3. ekzonunda heterozigot c.2113C>A (p.Q705K) varyantı ve *TNFRSF11A* geninin 10. ekzonunda heterozigot c.1766C>G (p.P589R) varyantı saptandı. Fakat bu varyantlar VUS olarak değerlendirildi ve kliniği açıklamamaktaydı.

İndeks olgunun annesi (Tablo-8, olgu III.2) çocukluğundan beri FMF tanısıyla takipli idi. Ataklar halinde ateş (38°C), karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal bulguları bulunmaktaydı. Bir kez sol ayak bileğinde artrit, bir kez de plöritik göğüs ağrısı olmuştu. Bu atakların tedavi öncesi dönemlerde senede 10-12 sefer tekrarladığı ve 1-2 gün sürüp düzeldiği öğrenildi. Akut karın nedeniyle acil servislerde cerrahi açıdan takip edilmiş fakat bulguların her seferinde düzelmesi nedeniyle opere edilmemişti. Düzenli tedaviye 28 yaşında 1,5 mg/gün kolşisin ile başlamıştı ve tedavi sonrası atak sıklığı senede 2-3 kereye kadar azalmıştı. İndeks olgunun annesinin *MEFV*

geninde bilinen M694V heterozigot mutasyonu, E148Q heterozigot mutasyonu ve R202Q heterozigot polimorfizmi bulunmaktaydı.

İndeks olgunun babası (Tablo-8, olgu III.3), 37 yaşında ve sağlıklıydı. *MEFV* geninde bilinen bir varyant bulunmamaktaydı. Ebeveynler arasında akrabalık bulunmamaktaydı (Şekil-7). Ailede aynı zamanda indeks olgunun teyzesinde ve anneannesinde de FMF tanısı bulunduğu öğrenildi.

4.2.4. Aile IV'e Ait Klinik Bulgular

İndeks olgunun (Tablo-8, olgu IV.1) FMF ilişkili semptomları 1 yaşında başlamıştı. 38-40°C arasında ölçülen ateşinin 2-3 gün sürdüğü ve ortalama 2-3 ayda bir tekrarladığı öğrenildi. Ayırıcı tanıda enfeksiyöz sebepler düşünülen olgu çok sefer antibiyotik tedavisi kullanmış fakat yarar görmemişti. Üç yaşında iken atak sıklığı artmış ve karın ağrısı tariflemeye başlamıştı. Bulantı, kusma, ishal ve artralji eşlik edebilmekteydi. Hiç artrit veya döküntü bulguları olmamıştı. 4 yaşında iken FMF tanısı düşünülen olguya 1 mg/gün kolşisin tedavisi başlanmıştı. Tedavi sonrası atak sıklığı azalan olgunun son bir sene içerisinde (7 yaş) tek atak öyküsü bulunmaktaydı. Özgeçmişinde ek hastalık olmadığı öğrenildi ve genetik incelemesinde *MEFV* geninde M694V heterozigot mutasyonu ile R202Q heterozigot polimorfizmi saptandı. Otoinflamatuvar panelde herhangi bir ek varyant bulunmamaktaydı.

İndeks olgunun annesi (Tablo-8, olgu IV.2) ve babası (Tablo-8, olgu IV.3) arasında 5. derece akrabalık bulunmaktaydı ve her ikisi de sağlıklıydı (Şekil-7). Ailede bilinen FMF tanılı birey bulunmamaktaydı.

4.2.5. Aile V'e Ait Klinik Bulgular

İndeks olgu (Tablo-8, olgu V.1) 6 aylıkken 41°C'ye kadar yükselen ve 2-3 gün sonrasında düzelen ateş nedeniyle araştırılmaya başlanmıştı. Şikayetleri ayda 1-2 defa tekrarlamış fakat yaşı ilerledikçe 2 ayda 1 defa olacak şekilde azalmıştı. Ayırıcı tanıda enfeksiyöz sebepler, immün yetmezlikler düşünülmüş fakat tedavilerden yanıt alınamamıştı. Artrit, karın ağrısı veya göğüs ağrısı bulunmamaktaydı fakat özellikle ayak bileklerinde ağrı ve çevresinde eritematöz döküntü olduğu öğrenildi. Bunun üzerine 3 yaşında iken FMF düşünülen olguya 0,5 mg/gün kolşisin tedavisi başlanmış ve sonrasında atak sıklığı ortalama 4 ayda 1 olacak şekilde azalmıştı.

Olgunun zaman zaman oral aftlarının bulunması nedeniyle PFAPA da ayırıcı tanıda düşünülmüş fakat kolşisinden yarar görmesi, atak aralıklarının düzensiz oluşu, lenfadenopati gözükmemesi ve erizipel benzeri eritem bulunması gibi nedenlerden ötürü dışlanmıştı. Özgeçmişinde ek hastalık bulunmayan olgunun genetik analizinde *MEFV* geninde R761H heterozigot mutasyonu saptandı. Otoinflamatuvar panelde ise herhangi bir ek varyant bulunmamaktaydı.

İndeks olgunun çift yumurta ikizi kardeşi (Tablo-8, olgu V.2) 4 yaşındaydı ve sağlıklıydı.

İndeks olgunun abisi (Tablo-8, olgu V.3) de FMF tanısıyla takip edilmekteydi. Şikayetleri 2 yaşındayken ateş ve artralji ile başlamıştı. Atakları 3-4 ayda bir tekrarlamakta ve yaklaşık 7 gün içinde düzelmekteydi. Beş yaşında geçirdiği şiddetli bir atak sırasında sol diz, sol ayak bileği, bilateral dirsekler ve el bileğinde artrit olmuş ve 21 güne kadar yatırılarak izlenmişti. FMF ataklarında poliartrit beklenen bir bulgu olmamakla beraber olgunun o döneme kadar kliniğinin antibiyotik tedavilerine yanıtız izole ateş atakları ağırlıklı olması ve kardeşine de FMF tanısı konulması nedeniyle, olguya 0,5 mg/gün kolşisin denemesi başlanmıştı. Olgunun kolşisin sonrası benzer şikayetinin olmadığı öğrenildi. Senede 1-2 kez enfeksiyöz kaynaklı ateş bulguları olmuş ve artrit, karın ağrısı, göğüs ağrısı veya döküntü gibi bulgular eşlik etmemişti. Özgeçmişinde ek hastalık bulunmayan olgunun genetik analizinde *MEFV* geninde R761H heterozigot mutasyonu saptandı. Otoinflamatuvar panelde ise herhangi bir ek varyant bulunmamaktaydı.

İndeks olgunun annesi (Tablo-8, olgu V.4) 37 yaşında, babası (Tablo-8, olgu V.5) ise 38 yaşında ve sağlıklıydı. Aralarında akrabalık bulunmamaktaydı (Şekil-7). Ailede bilinen FMF tanılı başka birey yoktu.

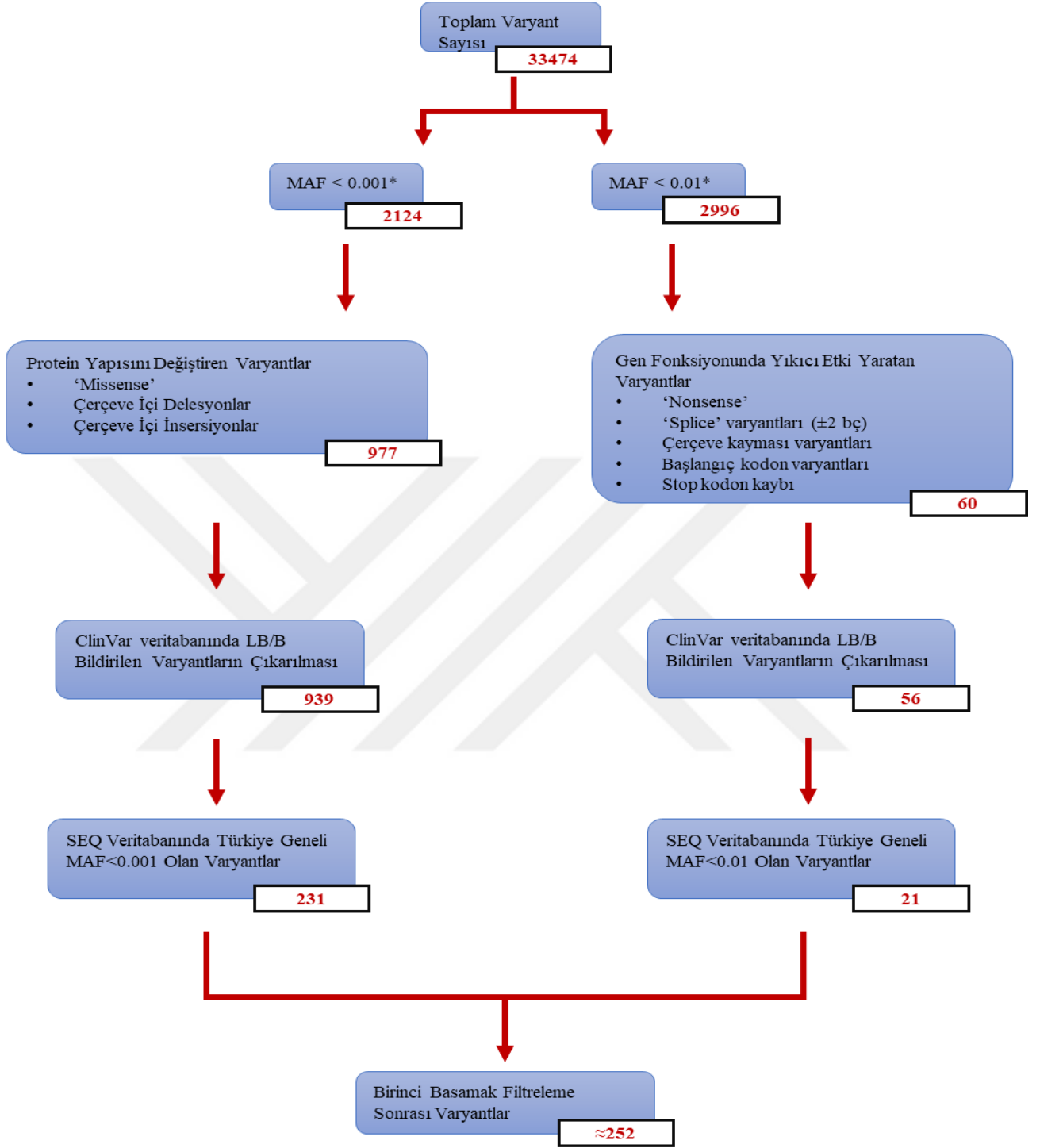
4.3. Tüm Ekzom Dizileme Sonuçları

Beş indeks olgu ve birinci derece akrabaları ile birlikte toplam 17 kişiye tüm ekzom dizileme çalışıldı. Analiz öncesi elde edilen verilerin kalite değerlendirilmesi tablo-9'da belirtilen parametreler ile yapıldı. Hedeflenen 50x okuma derinliğinde en az %75 kaplamanın çok daha üzerinde okuma verisine ulaşıldı. Tüm olgularda en az 50x derinlikte ortalama %91,73'lük kaplamda okuma verisi elde edilmiş olup, sadece olgu V.5'te 50x okuma derinliği %75'in altında kaldı. Bu olguda da 20x okuma derinliğinde %93.38 kaplam olduğu görüldüğünden analiz edilebilir veri olarak kabul edildi ve değerlendirmeye alındı (Tablo-9).

WES ile indeks olgularda, olgu başına ortalama 33474 varyant saptandı (Şekil-8). Tüm bireylerde bu varyantlara iki basamaklı analiz yapıldı. İlk basamakta varyantlar protein üzerindeki etkilerine göre ayrı filtrelemeye tabi tutuldu. İlk grupta gen fonksiyonunda yıkıcı etki gösteren varyantlar (nonsense, çerçeve kayması, ekzondan +/- 2 baz çifti uzaklıkta yer alan 'splice' varyantları, başlangıç ve stop kodon varyantları) içerisinde minör allel frekansı %1'in altında olan varyantlar belirlendi. İndeks olgularda ortalama 60 adet saptandı. İkinci grupta proteinin yapısını değiştiren varyantlar (missense, çerçeve içi delesyon ve insersiyon varyantları) içerisinde minör allel frekansı %0.1'in altında olan varyantlar belirlendi. İndeks olgularda ortalama 977 adet saptandı. Türkiye genelindeki FMF prevalansı yaklaşık 1/1000 kabul edilmesine rağmen yıkıcı olarak tanımlanan varyantlar daha patojenik oldukları için filtrelemede minör allel frekansı %1 olarak daha geniş tutuldu. Bu varyantların içerisinde ClinVar veritabanında benign/muhtemel benign olarak bildirilen varyantlar ve kullanılan analiz programı SEQ-Genomize veritabanında minör allel frekansı Türkiye genelinde belirlenenden yüksek olan varyantlar filtrelendi ($n \geq 1000$). Birinci basamak filtreleme sonrası, olgu başına ortalama 252 varyant belirlendi (Şekil-8).

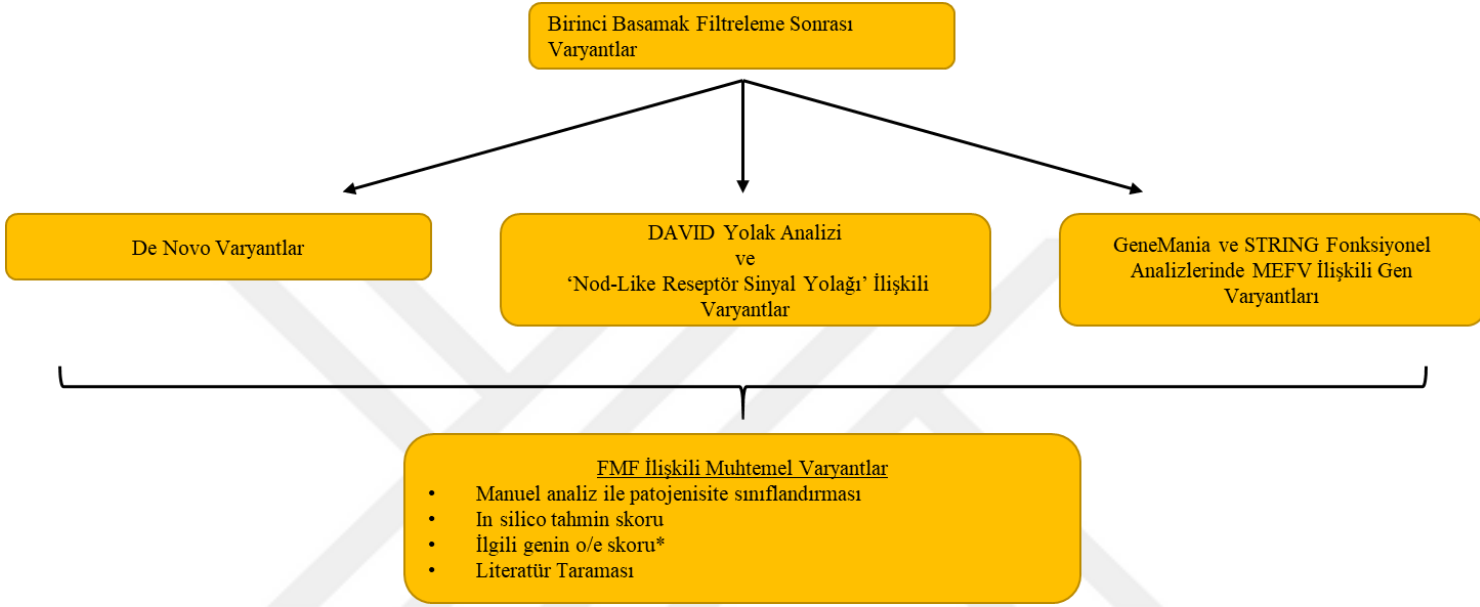
Olgular	Okuma Sayısı (milyon)	Ortalama Derinlik	Ti/Tv Oranı	En az 20 kere (20x) okunan baz yüzdesi	En az 50 kere (50x) okunan baz yüzdesi
Aile I					
I.1 (indeks olgu)	44,4	93	2,2	%97,00	%87,14
I.2 (abla)	53,0	115	2,2	%97,57	%92,20
I.3 (anne)	49,9	105	2,2	%97,38	%90,43
Aile II					
II.1 (indeks olgu)	55,7	116	2,19	%97,19	%92,21
II.2 (anne)	51,5	108	2,19	%97,49	%91,28
II.3 (baba)	50,3	106	2,2	%97,63	%90,90
Aile III					
III.1 (indeks olgu)	52,9	111	2,2	%97,46	%91,34
III.2 (anne)	47,1	99	2,2	%97,19	%89,00
III.3 (baba)	117,4	235	2,12	%98,49	%96,89
Aile IV					
IV.1 (indeks olgu)	135,9	271	2,1	%98,41	%97,05
IV.2 (anne)	115,0	225	2,1	%98,20	%96,46
IV.3 (baba)	110,0	218	2,11	%98,36	%96,52
Aile V					
V.1 (indeks olgu)	134,4	270	2,11	%98,48	%97,05
V.2 (dizigotik ikiz)	125,3	251	2,11	%98,45	%96,91
V.3 (abi)	130,9	266	2,1	%98,60	%97,21
V.4 (anne)	177,0	352	2,09	%98,53	%97,53
V.5 (baba)	27,2	58	2,27	%93,38	%59,37

Tablo-9: Tüm ekzom dizileme kalite parametreleri (Ti/Tv:Tranzisyon/Transversiyon oranı)



Şekil-8: WES Verilerine 1. Basamak Filtreleme Yapılırken İzlenen Strateji. Sağ alt kutucuklarda 5 indeks olguda saptanan ortalama varyant sayıları belirtilmektedir. *MAF: Minör allel frekansı, B: 'Benign', LB:'Likely Benign'. GnomAD veritabanı verileri esas alınmıştır (132).

İkinci basamakta; DAVID, GeneMANIA ve STRING fonksiyonel analizleri yapıldı ve parental kalıtlar belirlenerek *de novo* varyantlar ortaya kondu (Şekil-9). Olgu V.1’de *BIRC2* geninde, Olgu IV.1’de *PRR21* geninde, Olgu III.1’de *PELP1* geninde, Olgu II.1’de ise *BCL10* ve *IMP4* geninde birer adet heterozigot *de novo* varyant saptandı. Olgu I.1’in babası exitus olduğu için WES çalışılmadığından o olguda olası *de novo* varyantlar ayırt edilmedi. Olgulara ait tüm varyantlar tablo 10, 11, 12, 13 ve 14’te özetlendi.



Şekil-9: WES Verilerine 2. Basamak Filtreleme Yapılırken İzlenilen Strateji.

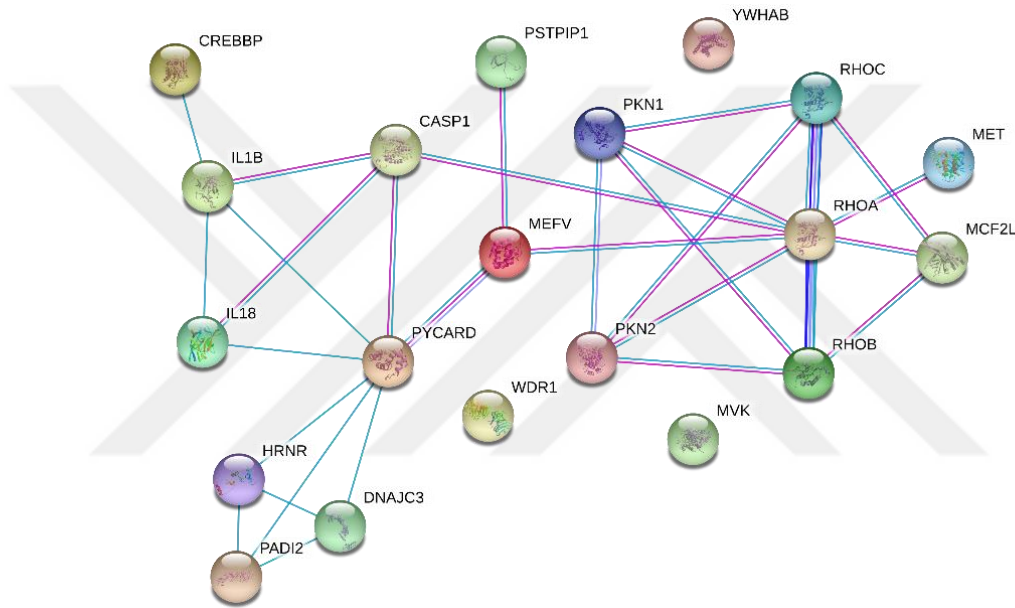
*o/e skoru ('observed/expected'): Genin ilgili varyant tipine özgü maruz kaldığı evrimsel seçilimin şiddetini indirekt olarak yansıtan bir değer olup <0.35 olması patojenisite lehine yorumlanmaktadır.

DAVID veri tabanında artmış varyant yükü bulunan yolakların ayırt edilmesi için hedef varyantların ait olduğu genlerin listeleri 'Official Gene-Symbol' şeklinde girildi. Referans genom ve background olarak homo sapiens kullanıldı. Benjamini protokolünde $p < 0.05$ olarak saptanan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sırasıyla;

- Olgu I.1’de ‘Tight junction’ yolağında ($p=0.045$),
- Olgu III.1’de ‘Autoimmune thyroid disease’ yolağında ($p=0.031$),
- Olgu IV.1’de ‘Gap junction’ ($p=0.014$), ‘Inflammatory mediator regulation of TRP channels’ ($p=0.02$), ‘Neuroactive ligand-receptor interaction’ ($p=0.027$), ‘Oocyte meiosis’ ($p=0.03$) ve ‘Calcium signaling’ ($p=0.04$) yolaklarında,

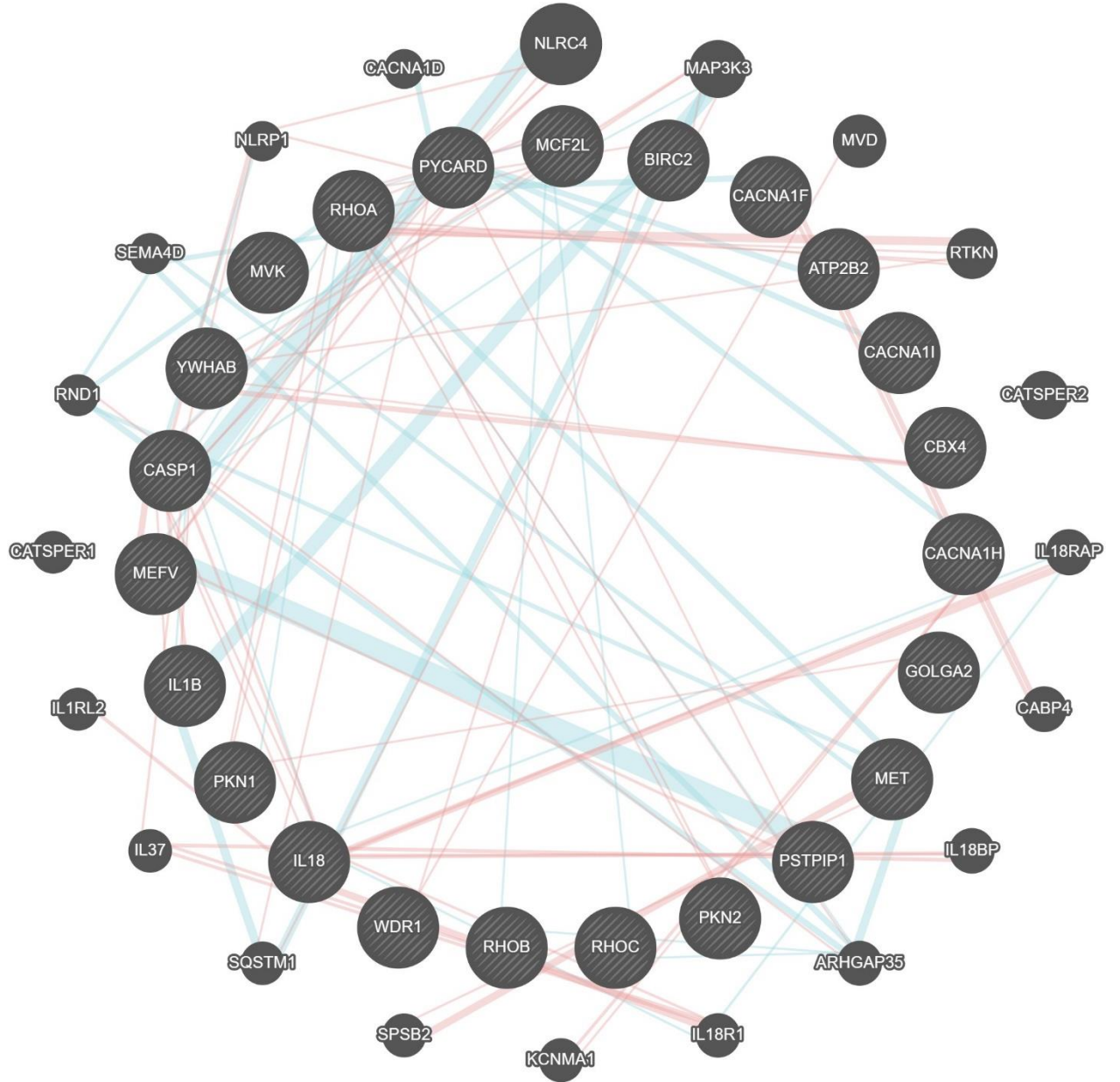
- Olgu V.1’de ise ‘Retinol metabolism’ ($p=0.036$) ve ‘Adherens junction’ ($p=0.046$) yolaklarında artmış varyant yükü saptandı. Olgu II.1’de ise herhangi bir yolda istatistiksel anlamlı artmış varyant yükü saptanmadı.

STRING programında fonksiyonel etkileşimler belirlenirken minimum etkileşim skoru 0.7 ve üzeri olan yüksek güvenilirlikli etkileşimler esas alındı. GeneMANIA uygulamasında da bilinen etkileşimler esas alınmış olup tahmini etkileşimler analize dahil edilmedi. Örnek olarak indeks olgu V.1’de saptanan varyantların Pyrin inflamazom yolağıyla fonksiyonel etkileşimleri Şekil-10 ve Şekil-11’de gösterilmiştir.



Şekil-10: STRING uygulamasının kullanımı. Her dairenin içinde proteinin yapısı şematik olarak gösterilmiş olup, daireler arası mavi çizgiler veritabanlarından elde edilen bilgileri, pembe çizgiler ise deneysel araştırmalardan elde edilen bilgileri yansıtmaktadır. Olgu V.1’deki varyantlar gösterilmiştir.

Olgularda önceden bilinen *MEFV* varyantları, ACMG kriterlerine göre patojenik değerlendirilen varyantlar, GeneMANIA ve STRING uygulamalarında fonksiyonel ilişki saptanan varyantlar, *de novo* varyantlar ve Nod-like reseptör sinyal yolağı ilişkili varyantların; uluslararası nomenklatüre uygun isimlendirmesi, pozisyon, zigosite, parental köken, in silico tahmin skoru, o/e skoru, varsa dbSNP veritabanına ait rs numarası, SEQ platformu minör allel frekansı ve patojenisite kriterleri her olgu için ayrı ayrı tablo 10-11-12-13-14’te özetlenmiştir.



Şekil-11: GeneMANIA uygulamasının kullanımı. Her dairenin içinde ilgili genin adı yazılı olup, daireler arası mavi çizgiler aynı yolakta görev alındığını, pembe çizgiler ise fiziksel etkileşim bulunduğunu gösterir. Çizgilerin kalınlığı saptanan etkileşimin yoğunluğunu yansıtmaktadır. Olgu V.1'deki varyantlar gösterilmiştir.

Gen	Kromozom	Pozisyon	HGVS İsmi	Protein Düzeyindeki Değişim	Ekzon/İntron	Zigosite	Parental Kalıtım	In Silico Tahmin Skoru (REVEL)	o/e Skoru (Gnomad)	rsID Numarası	Minör Allel Frekansı (SEQ platformu)	Fonksiyonel Etkileşim	Patojenik Sınıflandırma &	Patojenisite Kriterleri *
ABCA13	7	48349721	ENST00000435803.1:c.9499C>T	p.Arg3167Ter	Exon 24	HET	maternal*	N/A	0,915	N/A	0.001	N/A	LP	PVS1, PM2
ACTN3	11	66327703	ENST00000502692.1:c.1727C>T	p.Ala576Val	Exon 14	HET	maternal*	N/A	N/A	rs372101780	0.001	RHOA ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2
AEDN	6	168370601	ENST00000400822.3:c.5491C>A	p.Leu1831Met	Exon 34	HET	maternal*	0,181	0,8	rs765987505	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ANKS1A	6	35048916	ENST00000360359.3:c.2690C>T	p.Ala897Val	Exon 17	HET	maternal*	0,017	0,691	rs779234201	0.001	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ARHGAP23	17	36584785	ENST00000431231.2:c.56C>T	p.Pro19Leu	Exon 1	HET	N/A	0,046	0,785	rs777310873	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
ARHGAP32	11	128842491	ENST00000310343.9:c.3868G>C	p.Asp1290His	Exon 21	HET	N/A	0,071	0,85	rs200698355	0.001	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING) + RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CACNA1H	16	1252227	ENST00000348261.5:c.1778_1789delATGCCGACGCCA	p.His593_Thr597delinsPro	Exon 9	HET	N/A	N/A	1,174	rs768475346	0.001	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, PM4
DIAPH1	5	140953556	ENST00000253811.6:c.1852_1860dupCCACCTCT	p.Pro618_Pro620dup	Exon 16	HET	maternal*	N/A	0,818	N/A	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING) + RHOA/C ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP3
EPHA6	3	96533572	ENST00000389672.5:c.105C>G	p.Cys35Trp	Exon 1	HET	N/A	0,062	0,829	rs759542650	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
F10	13	113777176	ENST00000375559.3:c.7C>T	p.Arg3Cys	Exon 1	HET	N/A	0,117	0,807	rs149972574	0.0	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, PP2, BP4
FGD1	X	54521801	ENST00000375135.3:c.65C>T	p.Pro22Leu	Exon 1	HET	maternal*	0,133	0,515	N/A	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, PP2, BP4
GPALPP1	13	45589160	ENST00000379151.4:c.482C>T	p.Thr161Met	Exon 5	HET	N/A	0,139	1,006	rs181252018	0.001	RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
HRNR	1	152187936	ENST00000368801.2:c.6169C>T	p.Arg2057Ter	Exon 3	HET	N/A	N/A	1,86	rs878915709	0.0	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2
MDM4	1	204511936	ENST00000367182.3:c.536C>G	p.Ala179Gly	Exon 8	HET	N/A	0,02	0,7	rs146492402	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
MEFV	16	3293407	ENST00000219596.1:c.2080A>G	p.Met694Val	Exon 10	HET	maternal*	0,406	1,228	rs61752717	0.094	N/A	P	PP5>PS, PM1, PM2, PM5, BP4
MEX3B	15	82337998	ENST00000329713.4:c.40_48dupAGCGGCGGC	p.Ser14_Gly16dup	Exon 1	HET	maternal*	N/A	0,842	rs756729330	0.001	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, PM4
PHKA2	X	18917338	ENST00000379942.4:c.3064T>A	p.Ser1022Thr	Exon 29	HET	N/A	0,139	0,775	rs773766679	0.001	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
PITPNM1	11	67265666	ENST00000534749.1:c.1612C>T	p.Arg538Cys	Exon 10	HET	N/A	0,211	0,687	rs759052851	0.0	RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
PTBP1	19	805158	ENST00000356948.6:c.863C>T	p.Ser288Leu	Exon 8	HET	N/A	0,187	0,757	rs147259741	0.001	CASP1 ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
RIPOR2	6	24848345	ENST00000259698.4:c.985G>A	p.Ala329Thr	Exon 12	HET	N/A	0,068	0,718	rs35254980	0.0	RHOA ile etkileşim (STRING) + RHOA/C ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
SHROOM3	4	77660493	ENST00000296043.6:c.1167T>A	p.Ser389Arg	Exon 5	HET	N/A	0,182	0,897	rs201389959	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
XPA	9	100459431	ENST00000375128.4:c.144C>G	p.Tyr48Ter	Exon 1	HET	maternal*	N/A	0,557	N/A	0.0	N/A	LP	PVS1, PM2

Tablo-10: Olgu I.1'e ait olası FMF ilişkili varyantlar.

HGVS: 'Human Genome Variation Society', N/A: 'not applicable', HET: Heterozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'.

*Olgunun babasına WES çalışılmadığı için bu varyantların parental kalıtımı kesin olarak söylenememektedir. Fakat maternal orjinli oldukları düşünülmektedir.

& Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (23).

Gen	Kromozom	Pozisyon	HGVS İsimlendirmesi	Protein Düzeyindeki Değişim	Ekzon/İntron	Zigosite	Parental Kalıtım	In Silico Tahmin Skoru (REVEL)	o/e Skoru (Gnomad)	rsID Numarası	Minör Allel Frekansı (SEQ platformu)	Fonksiyonel Etkileşim	Patojenik Sınıflandırma &	Patojenisite Kriterleri *
ADAM12	10	127843804	ENST00000368679.4:c.331A>G	p.Asn111Asp	Exon 4	HET	maternal	0,055	0,843	rs367875671	0.0	RHOA ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ALB	4	74282037	ENST00000295897.4:c.1256T>A	p.Phe419Tyr	Exon 10	HET	paternal	0,253	0,897	rs1025342545	0.0	PKN1 ve YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
ANXA2	15	60674597	ENST00000332680.4:c.146C>G	p.Thr49Ser	Exon 3	HET	paternal	0,066	0,943	rs780461746	0.0	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
BCL10	1	85736574	ENST00000370580.1:c.73C>T	p.Arg25Cys	Exon 2	HET	de novo	0,680	0,648	N/A	0.0	CHUK aracılı PYCARD etkileşimi (STRING)	VUS	PM2
CHUK	10	101969420	ENST00000370397.7:c.1060C>A	p.Leu354Ile	Exon 10	HET	paternal	0,119	0,608	N/A	0.0	PYCARD ile etkileşim (STRING) + 'Nod-like reseptör sinyal yolağı' proteini (DAVID)	VUS	PM2, BP4
CRY1	12	107393742	ENST00000008527.5:c.803A>G	p.Lys268Arg	Exon 6	HET	maternal	0,061	0,748	rs138102124	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
FMN2	1	240371963	ENST00000319653.9:c.3851A>G	p.Lys1284Arg	Exon 5	HET	maternal	0,306	0,970	rs578174204	0.001	CASP1 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
GIGYF2	2	233680423	ENST00000373566.3:c.2250G>C	p.Gln750His	Exon 20	HET	maternal	0,262	0,763	rs895609234	0.001	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
IL23R	1	67635297	ENST00000347310.5:c.343T>G	p.Cys115Gly	Exon 3	HET	maternal	0,436	0,829	rs746144971	0.0	IL1B ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
IMP4	2	131100663	ENST00000259239.3:c.8G>C	p.Arg3Pro	Exon 2	HET	de novo	0,525	0,927	N/A	0.0	N/A	VUS	PM2
LAMB1	7	107616254	ENST00000393561.1:c.1141G>A	p.Val381Ile	Exon 8	HET	paternal	0,034	0,952	rs200303288	0.001	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
MEFV	16	3293403	ENST00000219596.1:c.2084A>G	p.Lys695Arg	Exon 10	HET	maternal	0,353	1,228	rs104895094	0.005	N/A	P	PP5>PS, PM1, PM2, PM5, PP2, BP4
MYH13	17	10265498	ENST00000252172.4:c.442C>T	p.Arg148Cys	Exon 5	HET	maternal	0,792	0,991	rs367783054	0.0	PSTPIP1 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, PP3
NCOA2	8	71068582	ENST00000452400.2:c.2018C>G	p.Pro673Arg	Exon 11	HET	maternal	0,067	0,773	rs61754971	0.001	PKN1 ile etkileşim (STRING) + PKN1 ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
NLRP12	19	54313570	ENST00000391773.1:c.1343G>C	p.Gly448Ala	Exon 3	HET	paternal	0,240	1,195	rs104895566	0.001	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
PHLDB2	3	111658386	ENST00000339325.3:c.2195A>G	p.His732Arg	Exon 7	HET	paternal	0,037	0,959	N/A	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
PPM1B	2	44445202	ENST00000282412.4:c.1061G>A	p.Gly354Glu	Exon 4	HET	maternal	0,673	0,896	N/A	0.0	PKN2 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2
RPL31	2	101620666	ENST00000409038.1:c.154T>C	p.Phe52Leu	Exon 3	HET	maternal	0,310	0,485	N/A	0.0	PSTPIP1 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
SFN	1	27190265	ENST00000339276.4:c.562G>A	p.Glu188Lys	Exon 1	HET	maternal	0,364	0,694	rs761394832	0.0	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
TACR3	4	104640580	ENST00000304883.2:c.251_252dupGC	p.Ile85A>Ile85A	Exon 1	HET	paternal	N/A	1,244	N/A	0.001	N/A	LP	PVS1, PM2
TBC1D1	4	38022269	ENST00000261439.4:c.1030G>A	p.Gly344Ser	Exon 5	HET	paternal	0,138	0,918	rs758994457	0.0	YWHAB ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
TIAM2	6	155469341	ENST00000456144.1:c.1901G>A	p.Arg634Gln	Exon 6	HET	paternal	0,143	0,887	rs138017039	0.001	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
TTN	2	179602922	ENST00000589042.1:c.14258A>G	p.Tyr4753Cys	Exon 49	HET	maternal	0,345	1,023	rs752678561	0.0	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4

Tablo-11: Olgu II.1'e ait olası FMF ilişkili varyantlar.

HGVS: 'Human Genome Variation Society', N/A: 'not applicable', HET: Heterozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'.

& Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (23).

Gen	Kromozom	Pozisyon	HGVS İsimlendirmesi	Protein Düzeyindeki Değişim	Ekzon/İntron	Zigosite	Parental Kalıtım	In Silico Tahmin Skoru (REVEL)	o/e Skoru (Gnomad)	rsID Numarası	Minör Allel Frekansı (SEQ platformu)	Fonksiyonel Etkileşim	Patojenik Sınıflandırma *	Patojenisite Kriterleri *
ARHGAP20	11	110450457	ENST00000260283.4:c.3213A>T	p.Leu1071Phe	Exon 16	HET	paternal	0,154	0,870	rs143937766	0.001	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
ARHGAP27	17	43507530	ENST00000428638.1:c.116G>A	p.Arg39Gln	Exon 1	HET	maternal	0,136	0,756	rs754321879	0.001	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
ARHGEF7	13	111932966	ENST00000375741.2:c.1730C>T	p.Thr577Met	Exon 16	HET	paternal	0,399	0,666	rs539695846	0.001	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
C1QA	1	22964189	ENST00000402322.1:c.80G>A	p.Arg27Gln	Exon 1	HET	paternal	0,180	0,703	rs41507347	0.001	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
C1QC	1	22973906	ENST00000374640.4:c.368C>T	p.Thr123Met	Exon 3	HET	maternal	0,571	0,900	rs369345026	0.0	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2
CENPJ	13	25484153	ENST00000381884.4:c.640G>A	p.Ala214Thr	Exon 4	HET	paternal	0,011	0,977	rs769818191	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CEP131	17	79170833	ENST00000269392.4:c.1679C>T	p.Pro560Leu	Exon 14	HET	paternal	0,024	0,959	rs780199740	0.001	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CORO7	16	4412652	ENST00000251166.4:c.1363G>A	p.Gly455Arg	Exon 15	HET	maternal	0,226	1,023	rs767466448	0.001	RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
EEF1D	8	144671495	ENST00000532741.1:c.907G>A	p.Gly303Ser	Exon 1	HET	paternal	0,015	1,011	rs1399858736	0.0	PKN2 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ERBIN	5	65350751	ENST00000506030.1:c.3605G>A	p.Arg1202Gln	Exon 21	HET	maternal	0,257	0,905	rs138617538	0.0	Nod-like reseptör sinyal yolağında görevli (DAVID)	VUS	PM2, BP4
FAS	10	90762918	ENST00000355740.2:c.163G>C	p.Asp55His	Exon 2	HET	paternal	0,195	0,731	rs148677058	0.0	RHOA ile etkileşim (STRING) + RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
FBN1	15	48704816	ENST00000316623.5:c.8176C>T	p.Arg2726Trp	Exon 65	HET	maternal	0,569	0,645	rs61746008	0.001	RHOB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2
GORASP2	2	171811246	ENST00000452526.2:c.689A>G	p.Gln230Arg	Exon 7	HET	maternal	0,139	0,714	N/A	0.0	RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
HSPG2	1	22155422	ENST00000374695.3:c.12143T>C	p.Leu4048Pro	Exon 88	HET	paternal	0,857	0,939	rs1368598061	0.001	PYCARD ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, PP3
IKZF3	17	37988389	ENST00000346872.3:c.23C>T	p.Ala8Val	Exon 2	HET	paternal	0,020	0,657	rs892775511	0.0	RHOA ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
IRAK3	12	66639034	ENST00000261233.4:c.1306A>G	p.Met436Val	Exon 11	HET	maternal	0,231	1,012	rs555279649	0.001	IL1B ile etkileşim (STRING) + IL1B ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
IRS1	2	227659746	ENST00000305123.5:c.3709C>G	p.Gln1237Glu	Exon 1	HET	maternal	0,113	0,993	rs747703859	0.001	RHOA ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ITGAV	2	187455234	ENST00000261023.3:c.169G>C	p.Val57Leu	Exon 1	HET	paternal	0,056	0,895	N/A	0.0	RHOA ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolda (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
MAP1A	15	43817076	ENST00000382031.1:c.4120_4122 delGAG	p.Glu1374del	Exon 5	HET	paternal	N/A	0,855	rs748717835	0.0	RHOB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, PM4
MARS1	12	57910091	ENST00000262027.5:c.2527C>A	p.Gln843Lys	Exon 20	HET	maternal	0,049	0,858	rs561321660	0.0	PKN2 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
MEFV	16	3293407	ENST00000219596.1:c.2080A>G	p.Met694Val	Exon 10	HET	maternal	0,406	1,228	rs61752717	0.094	N/A	P	PP5>PS, PM1, PM2, PM5, BP4
MEFV	16	3304463	ENST00000219596.1:c.605G>A	p.Arg202Gln	Exon 2	HET	maternal	0,033	1,228	rs224222	0.23	N/A	B	BA 1, BS2, BP4, BP6
NLRC4	2	32449648	ENST00000402280.1:c.2969T>G	p.Val990Gly	Exon 9	HET	maternal	0,145	0,882	N/A	0.0	IL1B, IL18, PYCARD, CASP1 ile etkileşim (STRING) + CASP1 ve PYCARD ile etkileşim (GeneMANIA) + Nod-like reseptör sinyal yolağında görevli (DAVID)	VUS	PM2, BP4
PELP1	17	4575900	ENST00000301396.4:c.2817_2818 insG	p.Pro940Alafs Ter35	Exon 16	HET	de novo	N/A	0,050	N/A	0.005	N/A	VUS	PM2
PFN1	17	4850009	ENST00000572383.1:c.476A>G	p.Gln159Arg	Exon 3	HET	maternal	0,116	0,407	N/A	0.0	RHOA/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
PPP1R12B	1	202403894	ENST00000336894.4:c.1252A>G	p.Arg418Gly	Exon 9	HET	paternal	0,108	0,882	N/A	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
PTBP2	1	97235271	ENST00000394184.3:c.161A>G	p.Asp54Gly	Exon 5	HET	maternal	0,314	0,468	rs765144770	0.0	CASP1 ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
RAPGEF3	12	48151819	ENST00000389212.3:c.49G>A	p.Val17Met	Exon 3	HET	paternal	0,123	0,897	rs755530927	0.0	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
REEP4	8	21996564	ENST00000306306.3:c.428C>T	p.Ala143Val	Exon 6	HET	maternal	0,169	0,904	rs756827594	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
SLC19A3	2	228566967	ENST00000258403.3:c.68G>T	p.Gly23Val	Exon 2	HET	maternal	0,906	1,063	rs121917882	0.0	N/A	P	PP5>PM, PM2, PP3
TAB2	6	149700064	ENST00000286332.5:c.1013C>A	p.Ser338Tyr	Exon 2	HET	paternal	0,247	0,760	N/A	0.0	Nod-like reseptör sinyal yolağında görevli (DAVID)	VUS	PM2, BP4
TP53BP2	1	223998183	ENST00000343537.7:c.322A>G	p.Lys108Glu	Exon 4	HET	paternal	0,092	0,788	rs1156872238	0.0	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ZC3HAV1	7	138738829	ENST00000464606.1:c.2566C>T	p.His856Tyr	Exon 11	HET	paternal	0,021	0,807	rs1346684781	0.001	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4

Tablo-12: Olgu III.1’e ait olası FMF ilişkili varyantlar. HGVS: ‘Human Genome Variation Society’, N/A: ‘not applicable’, HET: Heterozigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. & Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (23).

Gen	Kromozom	Pozisyon	HGVS İsimlendirmesi	Protein Düzeyindeki Değişim	Ekzon/İntron	Zigosite	Parental Kalıtım	In Silico Tahmin Skoru (REVEL)	o/e Skoru (Gnomad)	rsID Numarası	Minör Allel Frekansı (SEQ platformu)	Fonksiyonel Etkileşim	Patojenik Sınıflandırma &	Patojenisite Kriterleri &
ARHGEF15	17	8216371	ENST00000421050.1:c.733C>T	p.Arg245Trp	Ekzon 2	HET	maternal	0,181	0,912	rs371870992	0.0	RhoA/B/C ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
ARHGEF5	7	144062733	ENST00000056217.5:c.2971_2972delCCin sGA	p.Pro991Glu	Ekzon 2	HET	paternal	N/A	0,8	N/A	0.0	RhoA/B/C ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2
CHRM5	15	34355796	ENST00000383263.5:c.878A>G	p.Asn293Ser	Ekzon 3	HET	paternal	0,208	0,802	rs148495102	0.0	PKN1/2 ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CLCN6	1	11887244	ENST00000376496.3:c.806C>T	p.Ser269Leu	Ekzon 10	HET	maternal	0,915	0,808	rs761839015	0.001	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, PP3
CTSG	14	25043894	ENST00000216336.2:c.320_325delATGCA	p.Asn107_Asp108del	Ekzon 3	HET	paternal	N/A	0,817	N/A	0.0	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, PM4
IFI16	1	158990150	ENST00000295809.7:c.992C>G	p.Thr331Ser	Ekzon 6	HET	maternal	0,003	0,919	N/A	0.0	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
ITGB4	17	73739839	ENST00000200181.3:c.3008G>A	p.Arg1003His	Ekzon 26	HET	paternal	0,021	0,969	rs1311203130	0.0	YWHAB ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
LATS2	13	21620032	ENST00000542899.1:c.134C>A	p.Thr45Asn	Ekzon 2	HET	paternal	0,065	0,757	rs751006272	0.001	YWHAB ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
LPAR2	19	19735100	ENST00000542587.1:c.1021G>C	p.Glu341Gln	Ekzon 6	HET	paternal	0,162	0,667	N/A	0.0	RhoA ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
MEFV	16	3293407	ENST00000219596.1:c.2080A>G	p.Met694Val	Ekzon 10	HET	paternal	0,406	1,228	rs61752717	0.094	N/A	P	PP5>PS, PM1, PM2, PM5, BP4
MEFV	16	3304463	ENST00000219596.1:c.605G>A	p.Arg202Gln	Ekzon 2	HET	paternal	0,033	1,228	rs224222	0.23	N/A	B	BA1, BS2, BP4, BP6
MYH13	17	10265676	ENST00000252172.4:c.348+1G>A	N/A	Intron 4	HET	paternal	N/A	0,739	rs188631380	0.002	PSTPIP1 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2
NGF	1	115829085	ENST00000369512.2:c.332C>T	p.Ala111Val	Ekzon 3	HET	maternal	0,056	0,798	rs751440257	0.001	RHOA/B/C ve YWHAB ile etkileşim (STRING) + RHOA, YWHAB ve PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
OBSCN	1	228524825	ENST00000570156.2:c.19529A>G	p.Gln6510Arg	Ekzon 76	HET	maternal	0,153	1,044	N/A	0.0	RhoA/B/C ile etkileşim (STRING) + RHOA/B/C ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
PPP3CC	8	22380233	ENST00000397775.3:c.914C>G	p.Pro305Arg	Ekzon 8	HET	maternal	0,731	0,78	rs750379620	0.0	YWHAB ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2
PRKACB	1	84610087	ENST00000370685.3:c.43A>C	p.Thr15Pro	Ekzon 1	HET	paternal	0,157	0,445	N/A	0.0	RHOA/B/C ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
PRR21	2	240982191	ENST00000486799.1:c.181_208delTCCA CGGCTCTTCACCCATGTCCCTTCA	p.Ser61ProfsTer316	Ekzon 1	HET	de novo	N/A	N/A	N/A	0.0	N/A	VUS	PM2
SRC	20	36024610	ENST00000373558.2:c.617T>G	p.Leu206Arg	Ekzon 6	HET	maternal	0,271	0,396	rs1048616788	0.0	RHOA ve YWHAB ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
TBC1D4	13	75880518	ENST00000377636.3:c.2683A>G	p.Lys895Glu	Ekzon 15	HET	maternal	0,201	0,926	rs369089434	0.001	YWHAB ile etkileşim (STRING) + YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
TTN	2	179650715	ENST00000589042.1:c.2230G>A	p.Ala744Thr	Ekzon 14	HET	paternal	0,087	1,023	rs144639994	0.001	PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4

Tablo-13: Olgu IV.1’e ait olası FMF ilişkili varyantlar.

HGVS: ‘Human Genome Variation Society’, N/A: ‘not applicable’, HET: Heterozigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. & Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (23).

Gen	Kromozom	Pozisyon	HGVS İsimlendirmesi	Protein Düzeyindeki Değişim	Ekzon/İntron	Zigosite	Parental Kalıtım	In Silico Tahmin Skoru (REVEL)	o/e Skoru (Gnomad)	rsID Numarası	Minör Allel Frekansı (SEQ platformu)	Fonksiyonel Etkileşim	Patojenik Sınıflandırma &	Patojenisite Kriterleri &
ATP2B2	3	10392245	ENST00000352432.4:c.2153G>A	p.Arg718His	Exon 14	HET	maternal	0,391	0,545	rs928659205	0.001	PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
BIRC2	11	102239235	ENST00000227758.2:c.1323_1327delAA GAG	p.Glu443GlyfsTer7	Exon 6	HET	de novo	N/A	0,220	N/A	0.0	CASP1 ile aynı yolakta (GeneMANIA) +Nod-like reseptör sinyal yolağında görevli (DAVID)	LP	PS2, PM2
CACNA1F	X	49082917	ENST00000376265.2:c.1450G>A	p.Asp484Asn	Exon 11	HEMİZİGOT	maternal	0,268	0,748	rs782709793	0.001	PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CACNA1H	16	1258205	ENST00000348261.5:c.3347G>A	p.Gly1116Glu	Exon 16	HET	maternal	0,239	1,174	rs757299200	0.001	PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CACNA1I	22	40075377	ENST00000336649.4:c.5339G>A	p.Arg1780Gln	Exon 35	HET	maternal	0,242	0,591	rs925854645	0.001	PYCARD ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
CBX4	17	77808287	ENST00000269397.4:c.1139_1153delCC TCACACCA CCGC	p.Pro380_Pro384del	Exon 5	HET	paternal	N/A	0,681	N/A	0.001	YWHAB ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, PM4
CREBBP	16	3778168	ENST00000262367.5:c.6880C>T	p.Arg2294Trp	Exon 31	HET	maternal	0,533	0,709	rs763223282	0.001	IL1B ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2
DNAJC3	13	96443127	ENST00000602402.1:c.1358A>G	p.Glu453Gly	Exon 12	HET	maternal	0,501	0,703	rs1457856860	0.001	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2
GOLGA2	9	131019771	ENST00000421699.2:c.2671C>T	p.Arg891Trp	Exon 25	HET	maternal	0,085	0,895	rs147923606	0.001	PKN1 ile etkileşim (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
HRNR	1	152187945	ENST00000368801.2:c.6160G>T	p.Gly2054Cys	Exon 3	HET	maternal	0,058	2,027	rs61814939	0.001	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
KRIT1	7	91865798	ENST00000340022.2:c.412_413delAT	p.Ile138TyrfsTer5	Exon 7	HET	paternal	N/A	0,319	N/A	0.001	N/A	LP	PVS1, PM2
LZTR1	22	21346593	ENST00000215739.8:c.1084C>T	p.Arg362Ter	Exon 10	HET	paternal	N/A	2,280	rs189150283	0.0	N/A	LP	PVS1, PM2
MCF2L	13	113736779	ENST00000375604.2:c.2085C>A	p.His695Gln	Exon 17	HET	paternal	0,269	0,804	rs201634776	0.001	RHOA ile etkileşim (STRING) + RHOA/B/C ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
MEFV	16	3293205	ENST00000219596.1:c.2282G>A	p.Arg761His	Exon 10	HET	paternal	0,352	1,228	rs104895097	0.01	N/A	LP	PP5>PS, PM1, PM2, BP4
MET	7	116371845	ENST00000318493.6:c.1324A>G	p.Ile442Val	Exon 3	HET	maternal	0,159	0,803	rs532124885	0.001	RHOA ile etkileşim (STRING) + RHOA ile aynı yolakta (GeneMANIA)	VUS	PM2, BP4
PADI2	1	17418911	ENST00000375486.4:c.647A>G	p.Tyr216Cys	Exon 6	HET	paternal	0,142	0,932	rs1161466890	0.001	PYCARD ile etkileşim (STRING)	VUS	PM2, BP4
RPE65	1	68897168	ENST00000262340.5:c.1228delT	p.Ser410GlnfsTer30	Exon 11	HET	paternal	N/A	0,790	N/A	0.0	N/A	LP	PVS1, PM2

Tablo-14: Olgu V.1’e ait olası FMF ilişkili varyantlar.

HGVS: ‘Human Genome Variation Society’, N/A: ‘not applicable’, HET: Heterozigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’.

& Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (23).

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, Doğu Akdeniz coğrafyasının hasta sayısı ve morbiditeleri açısından en önemli genetik hastalıklardan biri olan FMF için, klinik tanı alan fakat moleküler olarak *MEFV* geninde biallelik mutasyon saptanmayan olgularda tüm ekzom dizileme çalışılmıştır. 5 indeks olgu ve birinci derece akrabaları olmak üzere toplam 17 kişide FMF kliniğini açıklayabilecek yeni mutasyonlar ve aday genler öne sürülmüştür fakat fizyopatolojik ilişkinin kesinleştirilebilmesi için ek çalışmalar gerekmektedir.

Bir varyantı FMF kliniği ile ilişkilendirecek en kuvvetli kanıtın, birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan olguların tamamında aynı genetik değişimin saptanmasından geleceği düşünülmüştür. Bu nedenle yapılan çapraz karşılaştırmada, ikinci basamak analizde belirlenen varyantların içinde tüm olgularda ortak olarak bulunan bir varyant olmadığı görülmüştür. Aynı ayrı yapılan karşılaştırmalarda olgu I.1 ve V.1’de *CACNA1H* ile *HRNR* genlerinde ortak değişim bulunduğu, olgu II.1 ve IV.1’de ise *MYH13* ve *TTN* genlerinde ortak değişim bulunduğu görülmüştür.

CACNA1H geni voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bir alt ünitesini kodlamakla beraber GeneMANIA uygulamasında *PYCARD* (eski adı ile *ASC*) ile aynı yolakta gösterilmektedir. Fakat literatür taramasında bu bilgiyi destekleyecek bir çalışma görülmemiştir. Olgu I.1’de 4 aminoasit kaybına neden olan inframe delesyon, V.1’de ise missense varyant saptanmıştır. Missense p.Gly1116Glu değişimi in silico analizlerde benign olarak (Revel:0,239) tahmin edilmektedir. Aynı zamanda *CACNA1H*’nin o/e skoru 1,174’tür. Bu açıdan bakıldığında *CACNA1H*’nin haployetersizlik durumunda hastalık oluşturma potansiyelinin düşük olduğu söylenebilir fakat *CACNA1H* varyantları OMIM’de dominant kalıtmımlı olarak ailesel hiperaldosteronizm, tip 4 (OMIM#617027) ile ilişkilendirilmiştir. Hem olgu I.1’de hem de olgu V.1’de bu kliniğe uygun hipertansiyon bulguları bulunmamaktadır. Sonuç olarak *CACNA1H* varyantlarının ikisi de VUS olarak yorumlanmıştır ve FMF ile ilişkili olmadıkları düşünülmüştür.

HRNR, fonksiyonu tam olarak bilinmese de epidermiste kornifikasyonda görevli kalsiyum bağlayıcı bir protein olup spesifik hedef proteinleri regüle ettiği düşünülmektedir (133). STRING uygulamasında nötrofil degranülasyonunda azurofil granül ekzositozu sürecinde *PYCARD* ile beraber rol oynadığı belirtilmiştir fakat literatür taramasında bu bilgiyi

destekleyecek bir çalışma görülmemiştir. Literatürde, epidermal hastalıkların dışında, bir olguda myelodisplastik sendromdan akut myelositik lösemiye dönüşümde etkili olabileceği bildirilmiştir (133). Olgu I.1’de nonsense varyant, olgu V.1’de ise missense varyant görülmüştür. Missense varyant p.Gly2054Cys değişimi için Revel skoru 0,058 olarak benign tahmin yönündedir. Ayrıca *HRNR* için (o/e yıkıcı:1,860 ; o/e missense:2,027) haployetersizlik durumunun patojenik olma ihtimali düşük ön görülmektedir. *HRNR* geni ile ilgili OMIM’de herhangi bir mendelyen kalıtmı hastalık ilişkilendirilmemiştir. Sonuç olarak *HRNR* varyantlarının ikisi de VUS olarak yorumlanmıştır ve FMF ile ilişkili olmadıkları düşünülmüştür.

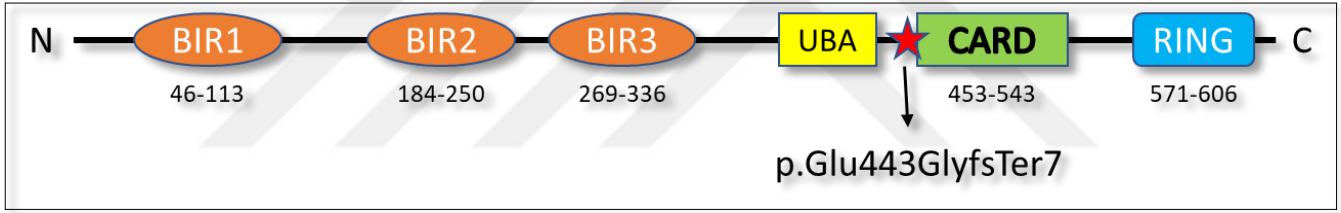
MYH13 geni özellikle ekstraoküler kas hücrelerine spesifik olduğu düşünülen bir myozin ağır zincir kodlamaktadır. 2007’de yapılan geniş ölçekli bir protein-protein etkileşimleri çalışmasında PSTPIP1 ile etkileşimde bulunduğu saptanmıştır (134). Aynı zamanda yakın zamanlı bir WES çalışmasında majör depresif bozukluk ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (135). Olgu II.1’de p.Arg148Cys missense değişimi saptanmıştır ve in silico tahmini patojenik yönündedir (Revel:0,792). Olgu IV.1’de ise intron 4 canonical splice bölgesinde c.348+1G>A değişimi saptanmıştır. *MYH13* geninin haployetersizlik durumunun patojenik olma ihtimali ise düşük ön görülmektedir (o/e yıkıcı:0,739 ; o/e missense:0,991). OMIM’de herhangi bir klinik ile ilişkilendirilmemiştir. Sonuç olarak *MYH13* varyantlarının ikisi de VUS olarak yorumlanmıştır. Bu proteinin diğer dokulardaki ekspresyonu ve olası PSTPIP1 etkileşimine dair ileri araştırmalar gerekmektedir.

TTN geni kardiyak kas ve iskelet kaslarında görev alan yapısal bir proteindir. Yaklaşık 36.000 aminoasit uzunluğu ile insandaki en büyük proteinlerden biridir. GeneMANIA uygulamasında PYCARD ile aynı yolda ilişkili olduğu gösterilmesine rağmen literatürde bu bilgiyi destekleyecek herhangi bir çalışma saptanmamıştır. Olgu II.1 ve IV.1’de saptanan missense varyantlar in silico analizlerde benign olarak tahmin edilmektedir. *TTN* geni haployetersizliği izole kardiyak, izole iskelet kası veya kombine kas hastalığı klinikleri ile ilişkilendirilmiş olmasına karşın çalışmalarda analiz edilen neredeyse tüm kontrol grubu bireylerinde de varyasyonu saptanmaktadır (136). Dolayısıyla bizim çalışmamızda da birden fazla bireyde *TTN* değişimi görülmesinin genin büyüklüğü ve sık karşılaşılan genomik varyasyonu ile ilişkili olduğu, FMF kliniği ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür.

Her insanda, çeşitli çevresel faktörler ve paternal yaşa bağlı olarak değişse de, ortalama olarak 70 *de novo* varyant bulunduğu ve en az 1 non-sinonim *de novo* mutasyon bulunduğu tahmin edilmektedir (137). *De novo* varyantların son yıllarda otizm spektrum bozuklukları, şizofreni gibi pek çok hastalıkta önemli rol oynadığı ve ACMG kriterlerinde bir varyantın *de novo* olmasının klinik ile ilişkilendirilebiliyorsa güçlü patojenisite göstergesi olduğu kabul edilmektedir (23,137). Babasına WES çalışılamayan olgu I.1 hariç, bizim olgularımızda da filtrelenen varyantlar içinde en az bir *de novo* varyant tespit edilmiştir. Olgu V.1’de *BIRC2* geninde, Olgu IV.1’de *PRR21* geninde, Olgu III.1’de *PELP1* geninde, Olgu II.1’de ise *BCL10* ve *IMP4* geninde birer adet heterozigot *de novo* varyant saptanmıştır. *PRR21* fonksiyonu kesin bilinmemektedir, *PELP1* östrojen reseptörü ko-aktivatörü kodlamaktadır ve *IMP4* geni ise nükleolusta lokalize ribozom biyogenezinde görevli bir protein kodlamaktadır. Bu üç gen için Pyrin inflamazom yolağıyla ilgili fonksiyonel bir ilişki saptanmamıştır ve bilinen herhangi bir hastalıkla ilişkileri bulunmamaktadır. Dolayısıyla *BCL10* ve *BIRC2* haricindeki *de novo* varyantların FMF ile ilişkili olmadıkları düşünülmüştür.

BIRC2 geni (eski adıyla CIAP1; ‘cellular inhibitor of apoptosis 1’) apoptoz inhibitörleri protein ailesinin bir üyesidir. Çok sayıda hücrel fonksiyonda görev almaktadır. Bir E3 ubiquitin ligaz proteini olarak görev yaptığı ve kendisi de dahil pek çok substratı ubiquitinleyerek regüle ettiği bilinmektedir (138). Caspase-3, caspase-7 ve caspase-9 üzerinde inhibitör etki sonucu apoptoz gelişimini durdurur (138). Aynı zamanda TNF (‘Tumor Necrosis Factor’) ile TNFR1 (‘TNF Receptor-1’) uyarısı sonrası plazma membranında oluşan Kompleks-1’in içinde yer alır, ve kompleks elemanlarını ubiquitinleyerek yolağın devamında Nükleer faktör kapp B (NFκB) aktivasyonu ile inflamatuvar uyarının düzenlenmesinde katkıda bulunur (139). FMF kliniği açısından en önemli fonksiyonu; diğer apoptoz inhibitör proteinleri (XIAP: ‘X linked IAP’ ve CIAP2) ile beraber IL-1 beta oluşumunu inhibe etmesidir. Bunun NLRP3 inflamazomu ile Caspase-8 üzerinden meydana geldiği bildirilmiştir (140,141). Öte yandan bu bilgiye zıt olarak CIAP1 ve CIAP2 proteinlerinin efektif caspase-1 aktivasyonu ve dolayısıyla IL-1 beta oluşumu için şart olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (142). *BIRC2*’nin; Pyrin inflamazomuyla olası etkileşimini araştıran bir çalışma bulunmasa da, IL-1 beta oluşumu ile direk ilişkisi olması nedeniyle otoinflamatuvar hastalıklarda rolü olabilir. Olgu V.1’de *BIRC2* geni 6. ekzonunda *de novo* heterozigot p.Glu443GlyfsTer7 çerçeve kayması mutasyonu saptanmıştır. *BIRC2* proteini başlıca 6 farklı alt bölüm içermektedir. N terminalinden itibaren sırayla 3 adet protein-protein etkileşiminden sorumlu BIR bölgesi (‘baculoviral IAP repeat

domain'), ubikitin bağlanmasından sorumlu UBA bölgesi ('Ubiquitin associated domain'), CARD ('caspase recruitment domain') ve E2 proteinleri ile etkileşimden sorumlu RING ('really interesting new gene domain') bölgesi bulunmaktadır (Şekil-12) (143). CARD domain'inin caspase aktivasyonundan ziyade proteinin otoubikitinasyonunda ve dolayısıyla otoinhibisyonunda görevli olabileceği bildirilmiştir (143). Olgumuzda saptanan mutasyon CARD domain'inin hemen öncesine denk gelmekte ve 7 aminoasit sonrasında stop kodon gelişimine yol açmaktadır (Şekil-12). *BIRC2* geninin o/e skoru 0,22'dir ve bu nedenle haploetersizliğin hastalık kliniği oluşturma potansiyeli yüksektir. Literatürde apoptoz inhibitör proteinleri ilişkili mutasyonlar genellikle kanser patogeneğinde somatik formda bildirilmiştir ve germline mutasyonları ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır (144). OMIM'de de herhangi bir klinik ile ilişkilendirilmemiştir. Dolayısıyla olgu V.1'de gördüğümüz periyodik ateş, artralji, eritematöz döküntüler ve oral aft kliniği ile *BIRC2* geninde saptanan ve muhtemel patojenik olarak yorumladığımız çerçeve kayması mutasyonunun fizyopatolojik ilişkisini tespit etmek için ek araştırmalar yapılması gerekmektedir.



Şekil-12: BIRC2 protein yapısı. Alt bölgelerin içinde bulunduğu aminoasit numaraları her bölümün alt tarafında yazılmıştır. Olgu V.1'de saptanan mutasyon yıldız ile işaretlenmiştir.

BCL10 geni kazanılmış bağışıklık sistemi aktivasyonu ve regülasyonunda rol oynayan bir sinyalizasyon proteinini kodlar. B veya T hücre reseptörleri uyarıldığında; BCL10, çeşitli CARD proteinleri (CARD9, CARD10, CARD11, CARD14) ve MALT1 proteini ile 'CBM' adı verilen bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin başlıca etkisi NFκB aktivasyonuna yol açmaktır. Bunu ubikitin regülasyonu yapan bazı proteinlerin bölgeye çağırılması ve NEMO ('NFκB essential modulator') ile IKK alfa ('inhibitor of NFκB kinase', diğer adıyla *CHUK*) ve IKK beta proteinlerini aktive ederek yapar. IKK proteinleri aktifleştğinde NFκB kinazı deaktive eder ve sitozoldeki NFκB serbest kalarak aktive olur (145). İlginç şekilde olgu II.1'de hem *BCL10* geninde *de novo* heterozigot missense değişim (p.Arg25Cys) hem de *CHUK* geninde paternal kalıtmalı heterozigot missense (p.Leu354Ile) değişim saptanmıştır. CBM kompleksin somatik mutasyonlarında, özellikle de *BCL10*'u içeren translokasyonlarda lenfoma meydana

gelmektedir (146). Biallelik germline mutasyonlarında ise CBM-opatiler adı verilen ve immünyetmezlik ile seyreden klinikler ortaya çıkmaktadır. Literatürde *BCL10* biallelik mutasyonlarında persistan otit, persistan gastrointestinal sistem enfeksiyonları, sinir sistemi ve solunum sistemi enfeksiyonları ile seyreden ve 3 yaşında ex olan tek bir vaka tanımlanmıştır (147). *CHUK* geni biallelik mutasyonları ise prenatal dönemde fatal olan Cocoon sendromu (OMIM#613630) ile ilişkilendirilmiştir. Her iki gen için de literatürde biallelik mutasyonlu birer aile tanımlanmıştır ve heterozigot mutasyonları ile ilgili bir klinik bildirim bulunmamaktadır. Her iki gen için de o/e skorları (*CHUK*:0,608 - *BCL10*:0,648) haploetersizliğe tahammülün yüksek olabileceğini yansıtmaktadır. In silico tahminlerde *CHUK* genindeki p.Leu354Ile varyantı benign yönünde (Revel:0,119), *BCL10* geni p.Arg25Cys varyantı VUS yönünde (Revel:0,680) tahmin edilmektedir. Her iki varyant da tarafımızca VUS olarak yorumlanmıştır ve olgu II.1’de görülen ateş, karın ağrısı, ekstremit döküntüleri ve alerjik semptomlar ile ilişkili olup olmadıkları konusunda ek araştırmalar yapılmadan kesin bir yorum yapılamamaktadır. 2012’de Gringhuis ve arkadaşları tarafından; Pyrin gibi bir çeşit PRR proteini olan Dectin-1’in ekstrasellüler fungal patojenleri tanıyarak CARD9-BCL10-MALT1 kompleksinin oluşumuna yol açtığı ve sonrasında CBM kompleksinin hem IL-1 beta transkripsiyonunu arttırdığı hem de MALT1-PYCARD-Caspase-8 kompleksinin oluşumu ile caspase-1’den bağımsız IL-1 beta matürasyonuna yol açtığı keşfedilmiştir (148). Dolayısıyla *BCL10*’un görev aldığı fizyolojik süreçler Pyrin inflamazom yolağıyla direk ilişkili olmasa da IL1-beta sentezini arttırabildiği gösterilmiştir.

Olgularda ortak olan varyantlar ve *de novo* varyantlar değerlendirildikten sonra ACMG kriterlerine göre değerlendirme yapılmış ve 8 varyant patojenik olarak yorumlanmıştır (Önceden bilinen *MEFV* mutasyonları dahil edilmemiştir). Olgu I.1’de *ABCA13* ve *XPA* genlerinde, olgu II.1’de *TACR3* geninde, olgu III.1’de *SLC19A3* geninde, olgu V.1’de ise *BIRC2*, *KRIT1*, *LZTR1* ve *RPE65* genlerinde muhtemel patojenik/patojenik varyantlar saptandı. Yukarıda aynı zamanda *de novo* olduğu için etkisi tartışılan *BIRC2* varyantı hariç; diğerleri ile Pyrin inflamazom yolağı proteinleri arasında DAVID, GeneMANIA veya STRING’de herhangi bir fonksiyonel ilişki saptanmadı. Dolayısıyla bu genlerin ilişkili oldukları hastalıklar açısından olası klinik etkilerinin değerlendirilmesi tez kapsamının dışında bırakıldı.

İkinci basamak filtreleme sonunda tablo 10-11-12-13 ve 14'te olgular bazında ayrı ayrı belirtilen toplam 115 varyantın; 7'sini olgularda önceden bilinen *MEFV* varyantları, 8'ini olgular arası ortak saptanan gen (*CACNA1H*, *HRNR*, *MYH13*, *TTN*) varyantları, 5'ini de novo varyantlar (*BCL10*, *IMP4*, *PELP1*, *PRR21*, *BIRC2*), 7'sini ise FMF ile ilişkisiz olmasına rağmen patojenik yorumlanan varyantlar (*ABCA13*, *XPA*, *TACR3*, *SLC19A3*, *KRIT1*, *LZTR1*, *RPE65*) oluşturmaktadır. Yukarıda tartışılan değişimlerin dışında olgularda DAVID, GeneMANIA ve STRING'de FMF patogenezinde rol oynayan proteinlerle fonksiyonel ilişkisi olabileceği öngörülen toplam 88 farklı gen/varyant belirlendi. Bunların içinden olgu II.1'de görülen *CHUK* p.Leu354 ile değişimi *BCL10* ile yakın ilişkisinden dolayı ayrıca tartışılmıştır. Geriye kalan 87 gen varyantının ikisinde (olgu III.1-*HSPG*-p.Leu4048Pro ve olgu IV.1-*CLCN6*-p.Ser269Leu) *in silico* tahmin patojenik lehine saptanmış olsa da, 87 varyantın hiçbirinin o/e skorunun 0,35'in altında olmadığı görüldü. Dolayısıyla bu varyantlar eldeki veriler ile FMF kliniği ile ilişkilendirilememektedir. Tamamı VUS olarak yorumlanan söz konusu nadir ekzonik değişimlerin klinik ile ilişkilendirilebilmesi için başta RNA analizleri olmak üzere ek çalışmalar gerekmektedir. Bu aşamada 87 varyantın 57'sinin (%65) RhoGTPaz'lar ve 14-3-3 şaperon proteinleri ile ilişkili olması; bu proteinlerin hücre içinde çok sayıda etkileşimde bulunmalarının bir yansımasıdır. Dolayısıyla Pýrin inflamazom yolağını Rho proteinleri ve 14-3-3 proteinleri üzerinden indirekt olarak etkileyebilecek hedeflerin muazzam sayıda olduğu tahmin edilebilir.

Olgularda frekans filtresinden geçirilen varyantlar Pýrin inflamazom yolağı ilişkileri açısından incelenmelerinin yanısıra farklı yolaklarla ilgili artmış bir varyant yükü olup olmadığı açısından da DAVID gen zenginleştirme analizinde incelendi. Olgu I.1'de 'Tight junction' yolağında (p=0.045), olgu III.1'de 'Autoimmune thyroid disease' yolağında (p=0.031), olgu IV.1'de 'Gap junction' (p=0.014), 'Inflammatory mediator regulation of Transient Receptor Potential channels' (p=0.02), 'Neuroactive ligand-receptor interaction' (p=0.027), 'Oocyte meiosis' (p=0.03) ve 'Calcium signaling' (p=0.04) yolaklarında, olgu V.1'de ise 'Retinol metabolism' (p=0.036) ve 'Adherens junction' (p=0.046) yolaklarında artmış varyant yükü saptandı. Olgu II.1'de ise herhangi bir yolakta istatistiksel anlamlı artmış varyant yükü saptanmadı. Bu yolakların içerisinde de olgular arasında ortak olarak etkilenmiş bir yolak saptanmaması FMF fenotipine yol açabilecek Pýrin inflamazom yolağı dışında bir yolak bulunmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Genetik olarak yetim olguları açıklamak üzere daha önce yapılan *MEFV* tüm gen dizi analizi çalışmaları, cDNA analizleri, delesyon-duplikasyon taramaları ve haplotip analizleri sonucunda ekstra bir mutasyon gösterilememiş ve söz konusu olguların sadece *MEFV* varyantları ile açıklanamayacağı ortaya konmuştur (3,81,82). *MEFV* geni dışında, klinik olarak benzerlikler bulunan diğer otoinflamatuvar hastalıkların genleri araştırılmış fakat kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (3,91). Bu tez çalışması genom boyu bir araştırma olmasından ötürü, genetik olarak yetim FMF olgularında yapılan en geniş çaplı etyolojik araştırmadır.

WES'in tanıya ulaşma potansiyeli, *MEFV* ile fonksiyonel/klinik benzerliklerine dayandırılarak seçilen sınırlı sayıda genin araştırılmasından ziyade; insan genomunda tanımlanmış 20.000'in üzerindeki genin protein kodlayıcı bölgelerinin tamamının hedeflenmesinden ötürü daha yüksektir. Bu yaklaşımın başlıca iki aleyhte etkisi ortaya çıkabilir. Bunların ilki hedef bölgenin genişlemesiyle elde edilen genomik okuma verisinin kaplamında azalma ortaya çıkmasıdır. Germline mutasyon tespitinde minimum 30x ve üzerindeki okuma sayıları güvenilir kabul edilmektedir (149). Bizim çalışmamızda minimum hedef okuma derinliği 50x olarak belirlenmiş ve tüm bireylerde minimum derinlikte ortalama %91,73 indeks olgularda ise ortalama %92,95 kaplama ulaşılmıştır. Okuma sayılarının homojen dağılıp dağılmadığını yansıtan ortalama okuma derinliği ise çalışmamızdaki tüm bireylerde ortalama 176x seviyesindedir.

Hedef bölge büyütüldüğünde ortaya çıkan ikinci negatif etki saptanan muazzam sayıdaki varyantın analiz edilmesindeki güçlüklerdir. Bu kapsamda filtreleme ve varyant önceliklendirme yapılmış fakat analizin spesifik genler ile sınırlanmaması adına gen filtresi kullanılmamıştır. Bunun yerine saptanan varyantlar; toplum frekanslarına, ClinVar veritabanındaki patojenisite bildirimlerine ve protein üzerindeki etkilerine göre filtrelenmiştir. ClinVar veritabanında benign / muhtemel benign olarak bildirilen varyantlar analiz dışı bırakılmıştır. Saptanan varyantların minör allel frekansı; dünyanın farklı bölgelerindeki (Kuzeybatı Avrupa, Güney Avrupa, Afrika, Güney Asya, Doğu Asya, Latin vb...) popülasyonların verilerden oluşan Gnomad veritabanı ve SEQ platformundaki Türkiye geneli olgu verileri üzerinden değerlendirilmiştir (132). FMF prevalansının ülkemizde bölgeden bölgeye değişmesine karşın yaklaşık 1/1000 sıklıkta kabul edilmesi ve genetik olarak yetim FMF olgularının tüm vakaların %25-30'unu oluşturması nedeniyle araştırılan değişimler yaklaşık 2-3/10.000 sıklıkta olacaktır (12). Gnomad popülasyonlarında FMF hastalığının çok

daha nadir olması sebebiyle 1/1000 olarak belirlenen limitin potansiyel patojenik varyantları kapsayacağı düşünülmüştür. Proteinde yıkıcı etki yaratan değişimler için frekans filtresi 1/100 olarak uygulanmış ve daha da geniş tutulmuştur. Frekans filtreleri belirlenirken doğru kalıtım paternini ön görmek en önemli basamaktır. Burada ele alınan hipotez monoallelilik *MEFV* varyantlarının, Pyrin'in fizyolojik koşullarda yabancı ajanları tanıma eşiğini düşürdüğü fakat FMF kliniğinin gelişmesi için aynı yolak üzerinde ikinci bir bozukluğun daha gerekiyor olduğudur. Kompleks kalıtmıli hastalıklarda heritabiliteli açıklamak için sıklıkla öne sürülen nadir varyant-güçlü etki ('rare variant-large effect') benzeri bir etki araştırılmıştır (150). FMF, kompleks kalıtmıli bir hastalık olmasa dahi, monoallelilik mutasyon gösterilen FMF olgularında nasıl bir kalıtım modeli olabileceği konusunda geniş ailelerde yeterli araştırma bulunmamaktadır ve literatürde digenik kalıtım ihtimalleri üzerinde durulmuştur (91). Çalışma içerisindeki olgularımızın kalıtım paternleri incelendiğinde; Aile I ve III'te anne ve çocuklarda FMF tanıları bulunmaktadır. Aile II ve IV'te indeks olgular dışında etkilenmiş birey bulunmamaktadır. Aile V'te ise ebeveynler sağlıklı iken etkilenmiş iki çocuk bulunmaktadır. Aile I ve III'te etkilenmiş annelerin *MEFV* locuslarında biallelik mutasyon gösterilmiştir (Olgu I.3 – M694V homozigot, Olgu III.2 – M694V heterozigot ve E148Q heterozigot). Dolayısıyla muhtemelen indeks olguların genetik etyolojisi, annelerinkinden farklıdır. Ayrıca aile I'de M694V mutasyonunu heterozigot taşıyan abla (Olgu I.2), klinik bulgu göstermemiştir. Geri kalan ailelerde ise indeks olgudaki mutasyonu taşıyan ebeveynler (Olgu II.2, IV.3 ve V.5) FMF kliniği göstermemiştir. *MEFV* mutasyonunu monoallelilik taşıyan bazı bireylerin FMF hastası olup diğerlerinin klinik göstermemesi inkomplet penetranslı otozomal dominant kalıtım veya digenik kalıtım olarak yorumlanabilir. Literatürde de bazı spesifik varyantlar için (H478, T577, M694del, kompleks alleller) dominant kalıtım bildirilmiştir (27–29). Fakat literatürdeki olgularda bu çalışmadakilerden farklı varyantlar bulunmaktadır ve ayrıca dominant geçiş yüksek/tam penetranslı olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla tez kapsamındaki olguların; penetrans eksikliğini açıklamaya yönelik olarak nadir varyant/güçlü etki hipotezine uyumlu *MEFV* dışı bir mutasyon araştırmasına uygun olduğu görülmüştür.

Araştırma sonuçlarında tüm olguları açıklayabilecek kapsayıcılıkta ortak bir varyant tespit edilmemiştir. İzole iki olguda ayrı ayrı tespit edilen *BCL10* ve *BIRC2 de novo* varyantları haricinde FMF kliniği ile ilişkili olabilecek başka bir varyant tespit edilmemiştir. Bu durumun birden fazla farklı sebepten kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bunların ilki; monoallelilik *MEFV* mutasyonlu FMF olgularının birbirinden farklı genetik etyolojilerden kaynaklanıyor

olma ihtimalidir. Yukarıda da belirtildiği gibi genetik olarak yetim FMF olgularının net bir Mendelyen kalıtım paternine uymaması sebebiyle bu ailelerde linkaj çalışmaları yoluyla hedef lokuslara ulaşılamamaktadır. Benzer şekilde bu olguların birden fazla sayıda otoinflamatuvar hastalığın fenokopileri olma ihtimali de düşünülmelidir. PFAPA, TRAPS, HIDS ve kriyopyrin ilişkili sendromlarda yaygın olarak periyodik ateş kliniği görülmekte ve tanı aşamasında birbirine karıştırılabilmektedir. Bu sebeple Eurofever/PRINTO kriterleri 2019 yılında ayırıcı tanıda yardımcı olmak adına belirlenmiştir (93). Fakat bugüne kadar yapılan araştırmalarda genetik olarak yetim olgular ile diğer FMF olguları arasında fenotipik özelliklerden yola çıkılarak ayırt edici bir özellik gösterilmemiştir (81,83). Bir diğer ihtimal olarak bu olguların aynı etyolojik kökene sahip olsalar da poligenik kalıtmı olmalarıdır. Çok sayıda farklı polimorfizmin bir arada bulunması sonucunda klinik ortaya çıkıyor olabilir. FMF fenotipini modifiye ettiği bilinen *MICA* ve *SAA1* gibi birden fazla gen olduğu bilinmektedir (89,90). Her ne kadar bu modifiye edici genlerin biallelik FMF olgularının bulgularına etki ettikleri gösterilmişse de patogenezi etkileyebilecek çok sayıda gen olabileceğini göstermeleri açısından değerlidirler. Günümüzde iyi bilinen pek çok poligenik multifaktöryel hastalık da artık otoinflamatuvar hastalık grubunun içerisinde değerlendirilmektedir. Juvenil idiyomatik artrit, Behçet, Chron, Gut ve Still hastalıkları gibi pek çok hastalığın patogenezinde kompleks etkileşimli otoinflamatuvar süreçlerin rol oynadığı kabul edilmektedir (151). Genetik olarak yetim FMF'in poligenik orjinli olması durumunda gerek olgu sayısının azlığı, gerekse de nadir varyantların araştırılması nedeniyle bu çalışmada tüm olguları kapsayıcı bir gen bulunmaması normaldir. Üçüncü olasılık; aynı etyoloji ve tek bir genetik değişim olması halinde dahi bu değişimin araştırma kapsamının dışındaki bölgelerde yer almasıdır. Tez kapsamında epigenetik değişimler, intronik ve gen dışı DNA bölgeleri bulunmadığından bu tip genomik / epigenomik etkenler FMF fizyopatogenezinde dışlanmamaktadır. Son olarak doğal immun sistemin bir parçası olması nedeniyle Pyrin inflamazomu çevresel etkenler ile, özellikle de enfeksiyöz ajanlar ile, direkt etkileşim halindedir. Hastalığın coğrafi dağılımı da göz önüne alınarak Doğu Akdeniz'e özgü bir çevresel ajanın monoallelik mutasyonlu olgulardaki kliniği diğer genetik değişkenlerden bağımsız olarak ortaya çıkarma ihtimali bulunmaktadır. Pyrin inflamazom aktivasyonunu tetiklediği bilinen; *Clostridium difficile*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Histophilus somni*, *Clostridium botulinum* gibi çeşitli enfeksiyöz ajanlar bulunmaktadır (40). Monoallelik ve biallelik olgularda atakları tetikleyen süreçleri, tüm olası enfeksiyöz ajanlar doğrultusunda araştırarak çalışmaların ilginç sonuçları olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu tez çalışması genom boyu bir araştırma olmasından ötürü, genetik olarak yetim FMF olgularında yapılan literatürdeki en geniş çaplı etyolojik araştırmadır.
2. Monoallelirik patojenik *MEFV* varyantlarının, Pyrin'in fizyolojik koşullarda aktivasyon eşiğini düşürdüğü fakat FMF gelişimi için aynı yolak üzerinde farklı değişimler gerektiği düşünülerek etki potansiyeli yüksek nadir varyantlar araştırılmıştır.
3. Nadir varyantlar içerisinde genetik olarak yetim FMF olgularının tamamını açıklayabilecek tek bir etken bulunmamıştır.
4. İki ayrı olguda *BCL10* ve *BIRC2* genlerinde FMF kliniği ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz *de novo* varyantlar saptanmıştır. Bu genlerin klinik etkisinin kanıtlanabilmesi için daha geniş hasta serilerinde araştırılması ve fonksiyonel analizler yapılması gerekmektedir.
5. Olgularda nadir varyant yükünün artmış olduğu diğer hücresel yolaklar araştırılmış fakat ortak bir yolak tespit edilmemiştir. Bu durum FMF patogenezinin temel olarak Pyrin inflamazom yolağı ilişkili olduğunu, diğer hücresel yolaklarla ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Bu bulgunun transkriptomik ve proteomik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.
6. Biallelik mutasyon saptanamayan FMF olgularının geniş serilerde klinik açıdan irdelenmesi ve eğer varsa fenotipik alt gruplarının tanımlanması veya geniş ailelerde kalıtım paternlerinin araştırılması önemlidir.
7. Çalışmamızın önemli kısıtlılıklarından biri epigenetik etkenlerin, intronik ve gen dışı DNA dizilerinin araştırılmamış olmasıdır. Benzer şekilde olgular arasında herhangi bir çevresel etkenin olası etkisi araştırılmamıştır.
8. Sonuç olarak; ülkemizdeki en önemli genetik hastalıklardan olan FMF'in patofizyolojisinin aydınlatılması gelecekte doğru tanı, tedavi ve izlem algoritmalarının geliştirilmesi için kritik önemdedir. Bu amaçla çok sayıda klinik ve genetik verinin toplanması ile bilginin modelleme sistemleri veya çoklu tahmin araçlarıyla birleştirerek yorumlanması gerekmektedir. Umuyoruz ki bu çalışmanın sonuçları, genotip-fenotip ilişkilerini incelemede mevcut modellere katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1879–85.
2. Shohat M. Familial Mediterranean Fever. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, editors. *GeneReviews®*. 2000 [Erişim tarihi: 6 Nisan 2020]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1227/>
3. Booty MG, Jae JC, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, et al. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: Where is the second hit? *Arthritis Rheum.* 2009;60:1851–61.
4. Menekře Ö, Albuz B, Sılan F. Otoinflatuar Hastalıklar ve Genetik. In: Semerci Gündüz N, editor. *Genetik ve Multidisipliner Yaklaşımlar*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p. 49–61. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-otoinflatuar-hastaliklar-ve-genetik-85283.html>
5. The French FMF Consortium, Bernot A, Clepet C, Dasilva C, Devaud C, Petit J-L, et al. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet.* 1997 Sep;17:25–31.
6. The International FMF Consortium. Ancient Missense Mutations in a New Member of the RoRet Gene Family Are Likely to Cause Familial Mediterranean Fever. *Cell.* 1997 Aug;90:797–807.
7. La Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, et al. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:50–6.
8. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean fever in the world. *Arthritis Care Res.* 2009;61:1447–53.
9. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:553–5.
10. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, Ozdamar K, Cengiz K, Akpolat T. MEFV mutations in patients with familial mediterranean fever in the black sea region of Turkey: Samsun Experience [corrected]. *J Rheumatol.* 2008;35:106–13.
11. Korkmaz DT, Atak PG, Çelik C. Frequencies of the common mefv gene mutations in Adiyaman, Southeast Anatolia, Turkey. *Balk J Med Genet.* 2014;17:67–72.

12. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, et al. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol*. 1998 Dec;25:2445–9.
13. Çobankara V, Fidan G, Türk T, Zencir M, Çolakoglu M, Özen S. The prevalence of familial Mediterranean fever in the Turkish province of Denizli: A field study with a zero patient design. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22:3–6.
14. Onen F, Sumer H, Turkay S, Akyurek O, Tunca M, Ozdogan H. Increased frequency of familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey. *Clin Exp Rheumatol*. 22:S31-3.
15. Kisacik B, Yildirim B, Tasliyurt T, Ozyurt H, Ozyurt B, Yuce S, et al. Increased frequency of familial Mediterranean fever in northern Turkey: A population-based study. *Rheumatol Int*. 2009;29:1307–9.
16. Janeway TC. An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting. *Arch Intern Med*. 1908;2:214.
17. Heller H, Sohar E, Sherf I. Familial Mediterranean Fever. *Arch Intern Med*. 1958;102:50.
18. Sohar E, Pras M, Heller J, Heller H. Genetics of Familial Mediterranean Fever. *Arch Intern Med*. 1961;107:529–38.
19. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med*. 1967;43:227–53.
20. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Prosen L, Dean M, et al. Mapping of a Gene Causing Familial Mediterranean Fever to the Short Arm of Chromosome 16. *N Engl J Med*. 1992;326:1509–13.
21. Aksentijevich I, Pras E, Gruberg L, Shen Y, Holman K, Helling S, et al. Refined mapping of the gene causing familial Mediterranean fever, by linkage and homozygosity studies. *Am J Hum Genet*. 1993;53:451–61.
22. Infervers: an online database for autoinflammatory mutations [Erişim Tarihi: 15 Mart 2020]. <https://infervers.umai-montpellier.fr/>
23. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–24.

24. Van Gijn ME, Ceccherini I, Shinar Y, Carbo EC, Slofstra M, Arostegui JI, et al. New workflow for classification of genetic variants' pathogenicity applied to hereditary recurrent fevers by the International Study Group for Systemic Autoinflammatory Diseases (INSAID). *J Med Genet*. 2018;55:530–7.
25. Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, et al. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1599–605.
26. Ozen S, Batu ED. The myths we believed in familial mediterranean fever: What have we learned in the past years? *Semin Immunopathol*. 2015;37:363–9.
27. Stoffels M, Szperl A, Simon A, Netea MG, Plantinga TS, van Deuren M, et al. MEFV mutations affecting pyrin amino acid 577 cause autosomal dominant autoinflammatory disease. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:455–61.
28. Sarabay G, Touitou I. Dominant familial Mediterranean fever. *Rheumatology*. 2017;56:173–5.
29. Fukushima Y, Obara K, Hirata H, Sugiyama K, Fukuda T, Takabe K. Three Japanese patients (mother and two children) with familial Mediterranean fever associated with compound heterozygosity for L110P/E148Q/M694I and an autosomal true dominant inheritance pattern. *Asian Pacific J allergy Immunol*. 2013;31:325–9.
30. Aldea A, Campistol JM, Arostegui JI, Rius J, Maso M, Vives J, et al. A Severe Autosomal-Dominant Periodic Inflammatory Disorder with Renal AA Amyloidosis and Colchicine Resistance Associated to the MEFV H478Y Variant in a Spanish Kindred: An Unusual Familial Mediterranean Fever Phenotype or Another MEFV-Associated Periodic. *Am J Med Genet*. 2004;124A:67–73.
31. Masters SL, Lagou V, Jéru I, Baker PJ, Van Eyck L, Parry DA, et al. Familial autoinflammation with neutrophilic dermatosis reveals a regulatory mechanism of pyrin activation. *Sci Transl Med*. 2016;8:1–10.
32. Moghaddas F, Llamas R, De Nardo D, Martinez-Banaclocha H, Martinez-Garcia JJ, Mesa-del-Castillo P, et al. A novel Pyrin-Associated Autoinflammation with Neutrophilic Dermatitis mutation further defines 14-3-3 binding of pyrin and distinction to Familial Mediterranean Fever. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:2085–94.
33. Martorana D, Bonatti F, Mozzoni P, Vaglio A, Percesepe A. Monogenic autoinflammatory diseases with mendelian inheritance: Genes, mutations, and

- genotype/phenotype correlations. *Front Immunol.* 2017;8:1–17.
34. Tidow N, Chen X, Müller C, Kawano S, Gombart AF, Fischel-Ghodsian N, et al. Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood.* 2000;95:1451–5.
 35. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood.* 2000;95:3223–31.
 36. Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol.* 2018;48:230–8.
 37. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10:417–26.
 38. Lamkanfi M, Dixit VM. In Retrospect: The inflammasome turns 15. *Nature.* 2017;30;548:534–5.
 39. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol.* 2018;9:1–19.
 40. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature.* 2014;513:237–41.
 41. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004;301:43–9.
 42. Gao W, Yang J, Liu W, Wang Y, Shao F. Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E4857–66.
 43. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol.* 2016;17:914–21.
 44. Ratner D, Orning MPA, Proulx MK, Wang D, Gavrilin MA, Wewers MD, et al. The *Yersinia pestis* Effector YopM Inhibits Pyrin Inflammasome Activation. Brodsky IE, editor. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1006035.
 45. Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S, et al. Cryopyrin and pyrin

- activate caspase-1, but not NF- κ B, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ.* 2006;13:236–49.
46. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem.* 2002;277:21119–22.
 47. Yu J-W, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell.* 2007;28:214–27.
 48. Guey B, Petrilli V. NLR Proteins. 2016;1417:197–206.
 49. Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer H-D, et al. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death Differ.* 2007;14:1457–66.
 50. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:9982–7.
 51. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity.* 2011;34:755–68.
 52. Fonnesu C, Cerquaglia C, Giovinalle M, Curigliano V, Verrecchia E, de Socio G, et al. Familial Mediterranean Fever: a review for clinical management. *Jt bone spine.* 2009;76:227–33.
 53. Karadag O, Tufan A, Yazisiz V, Ureten K, Yilmaz S, Cinar M, et al. The factors considered as trigger for the attacks in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2013;33:893–7.
 54. Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J, Schor NF. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 20th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier. 2016. 3880 p.
 55. Babaoglu H, Atas N, Varan O, Satis H, Bilici Salman R, Guler A, et al. Frequency, characteristics, and clinical determinants of “prodrome” in familial Mediterranean fever patients. *Scand J Rheumatol.* 2020;49:154–8.
 56. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a

- survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)*. 1998;77:268–97.
57. Sönmez HE, Esmeray P, Batu ED, Arıcı ZS, Demir S, Sağ E, et al. Is age associated with disease severity and compliance to treatment in children with familial Mediterranean fever? *Rheumatol Int*. 2019;39:83–7.
 58. Tunca M, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Ozen S, Topaloglu R, et al. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84:1–11.
 59. Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Livneh A, Ben-Chetrit E, Giancane G, et al. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:644–51.
 60. Langevitz P, Zemer D, Livneh A, Shemer J, Pras M. Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 1994;21:1708–9.
 61. De Buck M, Gouwy M, Wang JM, Van Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem*. 2016;23:1725–55.
 62. Benditt EP, Eriksen N. Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:4025–8.
 63. Westermark GT, Fändrich M, Westermark P. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:321–44.
 64. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med*. 1986;314:1001–5.
 65. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot-Thoraval F, Geneviève D, Mndjoyan E, et al. Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1136–43.
 66. Mukhin NA, Kozlovskaya L V, Bogdanova M V, Rameev V V, Moiseev S V, Simonyan AK. Predictors of AA amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*. 2015;35:1257–61.
 67. Soriano A, Manna R. Familial Mediterranean fever: new phenotypes. *Autoimmun Rev*. 2012;12:31–7.

68. Gangemi S, Manti S, Procopio V, Casciaro M, Di Salvo E, Cutrupi M, et al. Lack of clear and univocal genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever patients: A systematic review. *Clin Genet*. 2018;94:81–94.
69. Livneh A. Amyloidosis of familial Mediterranean fever (FMF)--insights to FMF phenotype II [abstract only]. *Harefuah*. 2006;145:743–5, 782.
70. Touitou I. Inheritance of autoinflammatory diseases: Shifting paradigms and nomenclature. *J Med Genet*. 2013;50:349–59.
71. Akarsu AN, Saatci U, Ozen S, Bakkaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genet*. 1997;34:573–8.
72. Papa R, Doglio M, Lachmann HJ, Ozen S, Frenkel J, Simon A, et al. A web-based collection of genotype-phenotype associations in hereditary recurrent fevers from the Eurofever registry. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12:167.
73. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet*. 2001;9:473–83.
74. Kogan A, Shinar Y, Lidar M, Revivo A, Langevitz P, Padeh S, et al. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: High frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet*. 2001;102:272–6.
75. Ozturk C, Halicioglu O, Coker I, Gulez N, Sutcuoglu S, Karaca N, et al. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clin Rheumatol*. 2012;31:493–501.
76. Coşkunpınar E, Özvarnalı A, Çefle K, Palanduz A, Gül A, Öztürk D, et al. Ailevi Akdeniz Ateşinde Moleküler Tanı Deneyimi: MEFV Geninde Sık Görülen Mutasyonlar. *Med Bull Haseki*. 2018;56:42–9.
77. Ülgenalp A. DEGETAM’a Yönlendirilen Hastalardaki MEFV Geni Mutasyonlarının Dağılımı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg*. 2009;23:53–8.
78. Akpolat T, Özkaya O, Özen S. Homozygous M694V as a risk factor for amyloidosis in Turkish FMF patients. *Gene*. 2012;492:285–9.
79. Naimushin A, Lidar M, Ben Zvi I, Livneh A. The structural effect of the E148Q MEFV mutation on the pyrin protein: a study using a quantum chemistry model. *Isr Med Assoc J*. 2011;13:199–201.

80. Özen S. Changing concepts in familial Mediterranean fever: Is it possible to have an autosomal-recessive disease with only one mutation? *Arthritis Rheum.* 2009;60:1575–7.
81. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1862–6.
82. van Gijn ME, Soler S, de la Chapelle C, Mulder M, Ritorre C, Kriek M, et al. Search for copy number alterations in the MEFV gene using multiplex ligation probe amplification, experience from three diagnostic centres. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:1404–6.
83. Koné-Paut I, Hentgen V, Guillaume-Czitrom S, Compeyrot-Lacassagne S, Tran TA, Touitou I. The clinical spectrum of 94 patients carrying a single mutated MEFV allele. *Rheumatology.* 2009;48:840–2.
84. Booth D, Gillmore J, Lachmann H, Booth S, Bybee A, Soyuturk M, et al. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM.* 2000;93:217–21.
85. Grandemange S, Soler S, Touitou I. Expression of the familial Mediterranean fever gene is regulated by nonsense-mediated decay. *Hum Mol Genet.* 2009;18:4746–55.
86. Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, Celikyapi Erdem G, Hatemi G, Ozdogan H, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet.* 2011;12:105.
87. Notarnicola C, Boizet-Bonhoure B, de Santa Barbara P, Osta MA, Cattani D, Touitou I. Characterization of new mutations in the 5'-flanking region of the familial Mediterranean fever gene. *Genes Immun.* 2009;10:273–9.
88. Üstek D, Ekmekçi C, Oku B, Coşan F, Çakiris A, Abacı N, et al. MEFV gene 3'-UTR Alu repeat polymorphisms in patients with familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26:S72-6
89. Touitou I, Picot MC, Domingo C, Notarnicola C, Cattani D, Demaille J, et al. The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 2001;44:163–9.
90. Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1149–55.

91. Neocleous V, Byrou S, Toumba M, Costi C, Shammam C, Kyriakou C, et al. Evidence of digenic inheritance in autoinflammation-associated genes. *J Genet.* 2016;95:761–6.
92. Yalçinkaya F, Özen S, Özçakar ZB, Aktay N, Çakar N, Düzova A, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology.* 2009;48:395–8.
93. Gattorno M, Hofer M, Federici S, Vanoni F, Bovis F, Aksentijevich I, et al. Classification criteria for autoinflammatory recurrent fevers. *Ann Rheum Dis.* 2019;78:1025–32.
94. Giancane G, Haar NMT, Wulffraat N, Vastert SJ, Barron K, Hentgen V, et al. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:635–41.
95. Sag E, Demirel D, Demir S, Atalay E, Akca U, Bilginer Y, et al. Performance of the new “Eurofever/PRINTO classification criteria” in FMF patients. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50:172–5.
96. Tanatar A, Sönmez HE, Karadağ ŞG, Çakmak F, Çakan M, Demir F, et al. Performance of Tel-Hashomer, Livneh, pediatric and new Eurofever/PRINTO classification criteria for familial Mediterranean fever in a referral center. *Rheumatol Int.* 2020;40:21–7.
97. Marshall GS, Edwards KM, Butler J, Lawton AR. Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr.* 1987;110:43–6.
98. Sag E, Bilginer Y, Özen S. Autoinflammatory Diseases with Periodic Fevers. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19:1–10.
99. Vanoni F, Theodoropoulou K, Hofer M. PFAPA syndrome: a review on treatment and outcome. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14:38.
100. Harel L, Hashkes PJ, Lapidus S, Edwards KM, Padeh S, Gattorno M, et al. The First International Conference on Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Adenitis Syndrome. *J Pediatr.* 2018;193:265–274.
101. Lidar M, Giat E. An Up-to-date Approach to a Patient with a Suspected Autoinflammatory Disease. *Rambam Maimonides Med J.* 2017;8:e0002.
102. Özkan E, Okur Ö, Ekmekçi A, Özcan R, Tag T. A new approach to the treatment of periodic fever. *Med Bull Istanbul.* 1972;5:44–9.
103. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med.*

1972;287:1302.

104. Rodriguez-Garcia A, Hosseini S, Martinez-Chapa SO, Cordell GA. Multi-target Activities of Selected Alkaloids and Terpenoids. *Mini Rev Org Chem*. 2017;14:272–9.
105. Cerquaglia C, Diaco M, Nucera G, La Regina M, Montalto M, Manna R. Pharmacological and clinical basis of treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with colchicine or analogues: An update. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:117–24.
106. Slobodnick A, Shah B, Krasnokutsky S, Pillinger MH. Update on colchicine, 2017. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57:i4–11.
107. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, Huss K, Lainka E, Neudorf U, et al. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics*. 2007;119:e474-83.
108. Waite AL, Schaner P, Hu C, Richards N, Balci-Peynircioglu B, Hong A, et al. Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234:40–52.
109. Van Gorp H, Saavedra PHV, De Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, Walle L Vande, Matusiak M, et al. Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:14384–9.
110. Savic S, Caseley EA, McDermott MF. Moving towards a systems-based classification of innate immune-mediated diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16:222-237.
111. Magnotti F, Lefeuvre L, Benezech S, Malsot T, Waeckel L, Martin A, et al. Pyrin dephosphorylation is sufficient to trigger inflammasome activation in familial Mediterranean fever patients. *EMBO Mol Med*. 2019;11:e10547.
112. Coonrod EM, Durtschi JD, Margraf RL, Voelkerding K V. Developing genome and exome sequencing for candidate gene identification in inherited disorders: an integrated technical and bioinformatics approach. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:415–33.
113. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth H V. Paediatric genomics: Diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet*. 2018;19:253–68.
114. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 2010;68:857–64.

115. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, Helbling D, Bonacci BB, Decker B, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med*. 2011;13:255–62.
116. Wang JL, Yang X, Xia K, Hu ZM, Weng L, Jin X, et al. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain*. 2010;133:3510–8.
117. Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, Lee MK, Thornton AM, Roeb W, et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am J Hum Genet*. 2010;87:90–4.
118. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 2010;42:790–3.
119. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009;461:272–6.
120. Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet*. 2011;129:351–70.
121. Koshy R, Sivadas A, Scaria V. Genetic epidemiology of familial Mediterranean fever through integrative analysis of whole genome and exome sequences from Middle East and North Africa. *Clin Genet*. 2018;93:92–102.
122. Wu D, Shen M, Zeng X. Familial Mediterranean fever in Chinese adult patients. *Rheumatology*. 2018;57:2140-2144
123. Zerkaoui M, Laarabi FZ, Ajhoun Y, Chkirate B, Sefiani A. A novel single variant in the MEFV gene causing Mediterranean fever and Behçet's disease: A case report. *J Med Case Rep*. 2018;12:10–3.
124. Tada H, Kawashiri MA, Okada H, Endo S, Toyoshima Y, Konno T, et al. A rare coincidence of sitosterolemia and familial mediterranean fever identified by whole exome sequencing. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23:884–90.
125. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D745–51.

126. SEQ Analysis Platform. [Erişim Tarihi: 19 Nisan 2020]. <https://seq.genomize.com/>
127. Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4:P3.
128. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D607–13.
129. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W214-20.
130. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99:877–85.
131. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285–91.
132. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581:434–43.
133. Wang L, Wang Y-Y, Cao Q, Chen Z, Chen S-J. Hornerin gene was involved in a case of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome with t(1;2)(q21;q37). *Leukemia.* 2006;20:2184–7.
134. Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol.* 2007;3:89.
135. Han K-M, Han M-R, Kim A, Kang W, Kang Y, Kang J, et al. A study combining whole-exome sequencing and structural neuroimaging analysis for major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2020;262:31–9.
136. Chauveau C, Rowell J, Ferreira A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat.* 2014;35:1046–59.
137. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature.* 2012;23;488:471–5.

138. Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.* 2000;10:169–77.
139. Lalaoui N, Vaux DL. Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Research.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1889.
140. Lawlor KE, Feltham R, Yabal M, Conos SA, Chen KW, Ziehe S, et al. XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1 β Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation. *Cell Rep.* 2017;20:668–82.
141. Vince JE, Wong WW-L, Gentle I, Lawlor KE, Allam R, O'Reilly L, et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity.* 2012;36:215–27.
142. Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity.* 2011;35:897–907.
143. Lopez J, John SW, Tenev T, Rautureau GJP, Hinds MG, Francalanci F, et al. CARD-Mediated Autoinhibition of cIAP1's E3 Ligase Activity Suppresses Cell Proliferation and Migration. *Mol Cell.* 2011;42:569–83.
144. Chang Y-S, Huang H-D, Yeh K-T, Chang J-G. Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. *Int J Oncol.* 2017;50:1778–84.
145. Lu HY, Biggs CM, Blanchard-Rohner G, Fung S-Y, Sharma M, Turvey SE. Germline CBM-opathies: From immunodeficiency to atopy. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:1661–73.
146. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell.* 1999;96:35–45.
147. Torres JM, Martinez-Barricarte R, García-Gómez S, Mazariegos MS, Itan Y, Boisson B, et al. Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity. *J Clin Invest.* 2014;124:5239–48.
148. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, Van Der Vlist M, Boekhout T, et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol.* 2012;13:246–54.

149. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagnostics*. 2017;19:341–65.
150. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet*. 2012;13:135–45.
151. Jéru I. Update on the Genetics of Autoinflammatory Disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19:41.
152. Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, et al. A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Hum Genet*. 2009;85:833–46.
153. Hirai Y, Noda A, Kodama Y, Cordova KA, Cullings HM, Yonehara S, et al. Increased risk of skin cancer in Japanese heterozygotes of xeroderma pigmentosum group A. *J Hum Genet*. 2018;63:1181–4.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Tez araştırması için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.11.2018 tarihli 2018/28-25 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI				
Sayın Prof.Dr. Özlem Giray Bozkaya Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.				
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.				
ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR			
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58			
FAKS	0 232 412 22 43			
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4330-GOA		
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐		
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	MEFV Geninde Mutasyon Saptanmayan veya Tek Mutasyon Saptanan Ailesel Akdeniz Ateşi Olgularında Farklı Gen Varyantlarının Araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Özlem Giray Bozkaya Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/28-25	Tarih:01.11.2018
	Prof.Dr. Özlem Giray Bozkaya'nın sorumlusu olduğu "MEFV Geninde Mutasyon Saptanmayan veya Tek Mutasyon Saptanan Ailesel Akdeniz Ateşi Olgularında Farklı Gen Varyantlarının Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-2. FMF Veri Kayıt Formu

FMF OLGU FORMU

Adı/Soyadı:

Doğum Tarihi ve Yeri:

Telefon No:

Adres:

Semptomların başlangıç yaşı:

HASTALIK ÖYKÜSÜ:

- **Tipik Ataklar: Ateş , rektal $\geq$ 38°C , 12-72 saat , $\geq$ 3 atak**
 - Karın (jeneralize peritonit):
 - Göğüs (plevrit):
 - Perikardit:
 - Monoartrit (kalça-diz-bilek):
 - Sadece ateş:
 - Diğer (unilateral orşit – unilateral erizipel benzeri eritem – alt extremitede simetrik myalji):
- **İnkomplet Ataklar: Ateş, rektal $\leq$ 38°C, 6 saat-1 hafta**
 - Karın (lokalize veya peritonit yok):
 - Göğüs (plevrit/perikardit olmadan ağrı):
 - Artrit (farklı eklemlerde veya atak sırasında 2+ eklemdede):
 - Diğer (bilateral orşit – simetrik eritem – alt ekstremitede dışında veya asimetrik myalji):
- **Diğer Bulgular** (dermatolojik bulgular, proteinüri vs):
- **Kolşisin Kullanımı ve Yanıt:**
(6 aylık kolşisin sonrası semptomlarda rahatlama ve kesilmesi sonrası alevlenme mevcut mu?)

LABORATUVAR

Sedimentasyon/CRP:

Lökositoz:

Fibrinojen:

EK HASTALIK:

- AA tip amiloidoz:
- Diğer:

KULLANDIğI İLAÇLAR:

- Canakinumab:
- Infliximabe:
- Rilonacept:
- Anakinra:
- Diğer:

MOLEKÜLER İNCELEME SONUCU / YÖNTEMİ:**AİLE AĞACI:****AİLEDEKİ TANILI BİREYLER (VARSA) VE DAHA ÖNCE YAPILAN FMF MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARI:**

EK-3.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın adı:

“MEFV Geninde Mutasyon Saptanamayan veya Tek Mutasyon Saptanan Ailesel Akdeniz Ateşi Olgularında Farklı Gen Varyantlarının Araştırılması”

Araştırmayı destekleyen kurum:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Genetik Bilim Dalı

Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nefrolojisi Bilim Dalı

Araştırmacıların adı:

Prof. Dr. Özlem GİRAY BOZKAYA

Dr. Mehmet KOCABEY

Prof. Dr. Alper SOYLU

Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP

Dr. Öğretim Üyesi Altuğ KOÇ

Adresi:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR

E-mail adresi:

mehmet.kocabey@deu.edu.tr

Telefonu:

0232 412 3669

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik AD ve Çocuk Genetik Bilim Dalları olarak **“MEFV Geninde Mutasyon Saptanamayan veya Tek Mutasyon Saptanan Ailesel Akdeniz Ateşi Olgularında Farklı Gen Varyantlarının Araştırılması”** adlı tez çalışmasını yürütmekteyiz.

Sizin çocuğunuzun da içinde bulunduğu bir grup hastada, klinik ve laboratuvar bulgularıyla Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) tanısı alıp, kullanılan tedaviye yanıt alınmasına rağmen, beklenen genetik değişiklikler saptanamamaktadır. Biz çalışmamızda toplumda sık görülen genetik hastalıklardan biri olan bu tür hastalar için yeni mutasyonları araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada elde edilecek verilerin, hastalığın tanısında meydana gelen hataları önlemesini ve tedavi başlangıcındaki gecikmeleri azaltmasını hedefledik.

Bu çalışmaya AAA hastalığı için kesin tanı konulan fakat genetik testlerinde beklenildiği şekilde iki mutasyon saptanamayan olguların dahil olmasını planladık. On hasta ve ebeveynleri olmak üzere toplam 30 kişinin katılmasını planladık.* Araştırmamız 15 aylık süre içerisinde tamamlanacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizin/çocuğunuzun yaşı, cinsiyeti, vücut boyu, vücut ağırlığı, FMF başlangıç yaşı, ailede FMF varlığı, FMF klinik bulguları, almakta olduğu tedavi, tedaviye yanıtı, eşlik eden hastalıkları, FMF mutasyon varlığı ve eğer varsa araştırılan diğer genlerdeki mutasyonların varlığı kayıt altına alınacaktır. Bu çalışmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde çalışma, sizin/çocuğunuzun almakta olduğu tedavi ve izlemde bir değişikliğe neden olmayacaktır. Sizden/çocuğunuzdan rutin tetkikler için alınan kan kullanılacak, ek girişim yapılmayacaktır. Sizden/çocuğunuzdan alınan kanlardan Ailevi Akdeniz Ateşi'nden sorumlu olan gen olan “MEFV” geni dışındaki genlerde mutasyon olup olmadığı yeni nesil dizileme yöntemiyle araştırılacaktır.

Araştırmanın sürecinde sizin ciddi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Sizin adınıza öngörülen tıbbi bir risk de bulunmamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen hiçbir bilgi veya biyolojik materyal başka çalışmalarda kullanılmayacaktır. Size ait tüm tıbbi bilgiler ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Bu araştırma için etik kurul onayı alınmıştır.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır. Katıldığınız takdirde çalışmanın herhangi bir aşamasında herhangi bir sebep göstermeden onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Bu durum, herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır.

Tez çalışması hakkında ek bilgi almak istediğiniz takdirde lütfen Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD öğretim üyesi Prof. Dr. Özlem Giray Bozkaya ya da Tıbbi Genetik AD araştırma görevlisi Dr. Mehmet Kocabey ile temasa geçiniz (Telefon: 0232 412 3669, Adres: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR)

Eğer bu tez çalışmasına sizin/çocuğunuzun katılmasını kabul ediyorsanız, lütfen bu formu imzalayınız.

*Proje bütçesi doğrultusunda olgu sayısı etik kurul onayı öncesi planlanan 10 olgudan 5'e indirilmiştir.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Ben, (katılımcının adı), yukarıdaki metni okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma imkânı buldum. Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım takdirde herhangi bir olumsuzluk ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Formun bir örneğini aldım / almak istemiyorum (bu durumda araştırmacı bu kopyayı saklar).

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza: