

MAHİR BİNİCİ	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2022
--------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEDİATRİK AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARDA CD40
POLİMORFİZMİ**

Mahir BİNİCİ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Selahaddin TEKEŞ

DİYARBAKIR- 2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEDİATRİK AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARDA CD40
POLİMORFİZMİ**

Mahir BİNİCİ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Selahaddin TEKEŞ

DİYARBAKIR- 2022



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Mahir BİNİCİ**' nin hazırladığı **“Pediatrik Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarda CD40 Polimorfizmi”** başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 23/06/2022

Danışman Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ Dicle Üni. Tıp Fakültesi

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Mahmut BALKAN	Dicle Üni. Tıp Fakültesi
Üye	Prof. Dr. Halit AKBAŞ	Harran Üni. Tıp Fakültesi
Üye	Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ	Dicle Üni. Tıp Fakültesi
Üye	Doç. Dr. Feridun AKKAFA	Harran Üni. Tıp Fakültesi
Üye	Dr.Öğr. Üyesi Diclehan ORAL	Dicle Üni. Tıp Fakültesi

İmza

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../20.. tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

29/06/2022

Mahir BİNİCİ

İmza

TEŞEKKÜR

Başta eğitim sürecim boyunca gerek bilgi ve birikimi gerekse öngörülerini bana yardımcı olan ve tez seçimim konusunda fikirlerini esirgemeyen değerli danışmanım Doç. Dr. Selahaddin TEKEŞ' e,

Çalışmalarım esnasında fikirleri, tecrübeleri ve verdikleri dersler ile aynı zamanda eğitimime katkı sunan başta bölüm başkanım Prof. Dr. Mahmut BALKAN olmak üzere Dr. Öğretim Üyesi Diclehan ORAL ve aramızdan zamansız bir şekilde ayrılan çok değerli hocam rahmetli Prof. Dr. Hilmi İSİ hocamıza,

Fikirleri, tecrübeleri ile eğitimime katkı sunan ve şu anda başka üniversitelerde görev yapan Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK ve Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül TÜRKYILMAZ' a, doktora çalışmalarında ki katkılarından dolayı Doç. Dr. Ayşe Feyda NURSAL' a,

Çalışmalarında her türlü katkıyı esirgemeyen anabilim dalımızdaki değerli çalışma arkadaşlarım Asiye BAYRAK, Güllü KILIÇ, Ferda TEKİN, Fatma AYATA, Emel ESEN, Berivan ATEŞ, Serap Kalkanlı BİNİCİ, Zülfü YILDIZ, Muhammed AKDEMİR, Sinan TURAN, Muhammed Furkan AKTAŞ, Hasan GÖYA, Wardan ALNANEA' ya, Ahmet Serhat BAYAR ve Mert İPEKÇİ' ye,

Çalışmalarında materyal temini için her türlü desteği veren çalışma arkadaşlarım Hüsamettin DEMİR ve Şaban TUNÇ' a,

Hayatımın önemli bir kısmında sürekli yanımda bulunan hem meslektaşım hemde can kardeşim Aram İlyas YÜCEL' e,

Beni bugünlere getiren eğitim yaşamım boyunca her türlü maddi manevi katkılarını sunan değerli babam Necat BİNİCİ, annem Halime BİNİCİ ve kardeşlerim Berivan ve Baran' a,

Ve hayatımın bir parçası olarak iyi ve kötü günlerimde yanımda olan biricik eşim Serap ve oğlumuz Deniz Eymen' e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından **TIP.20.006** numaralı proje ile desteklenmiştir. Aynı zamanda bu tez çalışmasında bünyesinde bulunduğum **ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme)** programı kapsamında yapılan bütçe desteğinden de yararlanılmıştır.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	V
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ	VII
1. ÖZETLER	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER	6
3.1. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalığı	6
3.1.1. Ailesel Akdeniz Ateşi' nin tanımı	6
3.1.2. Tarihçesi	6
3.1.3. Epidemiyoloji	7
3.1.4. Klinik bulgular	8
3.1.5. Tanı kriterleri	9
3.1.6. Patogenez	11
3.1.7. FMF genetiği	11
3.1.8. Pirin proteininin yapısı ve FMF ile ilişkisi	13
3.1.9. Genotip-fenotip korelasyonu	15
3.2. Cluster of Differentiation 40 (CD40)	15
3.2.1. CD40 tarihçesi ve tanımı	15
3.2.2. CD40 genetiği	16
3.2.3. CD40/CD40L sinyal iletimi ve hücrel yanıt	17
3.2.4. CD40 sinyal mekanizması	19
3.2.5. CD40 sinyal mekanizmasının hastalıklarla ilişkisi	20
3.3. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	21
3.3.1. TaqMan® Assay	22
3.3.2. CD40 tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs)	23
3.3.2.1. rs1883832 tek nükleotid polimorfizmi	24
3.3.2.2. rs4810485 tek nükleotid polimorfizmi	25
4. GEREÇ VE YÖNTEM	26

4.1.	Materyal.....	26
4.1.1.	Hasta ve kontrol grupları.....	26
4.1.2.	Kan örnekleri.....	26
4.1.3.	Kullanılan kitler ve cihazlar	26
4.2.	Metod.....	31
4.2.1.	Periferik kandan DNA izolasyon yöntemi	31
4.2.2.	FMF Pyrosekans analizi	32
4.2.2.1.	PCR aşaması	35
4.2.2.2.	Pyrosekans aşaması.....	36
4.2.3.	Real Time PCR ile TaqMan genotipleme analizi	44
4.2.3.1.	TaqMan genotipleme analizi.....	45
4.2.3.2.	TaqMan genotipleme analiz verileri	48
4.2.4.	İstatistiksel analiz	53
5.	BULGULAR	54
6.	TARTIŞMA	60
7.	SONUÇLAR	65
8.	KAYNAKLAR	67
9.	EKLER.....	80
9.1.	Özgeçmiş	80
9.2.	İntihal Raporu.....	81
9.3.	Etik Kurul Raporu	82
9.4.	Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu	83
9.5.	Doktora Makalesi	85

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACS:	Akut Koroner Sendrom
APS:	Adenosin 5' fosfosülfat
ASC:	Apoptosis-associated speck-like protein with a CARD
ATP:	Adenozin tri fosfat
CD40:	Cluster of differentiation 40
CD40L:	CD40 ligand
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP:	Deoksinükleotid trifosfat
ERK:	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtBr:	Etidyum bromür
FMF:	Familial Mediterranean Fever (Ailesel Akdeniz Ateşi)
GCA:	Dev hücreli arterit
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
HSP:	Henoch-Schönlein purpurası
ICAM-1:	Hücreler arası adhezyon molekülü-1
IFN-γ:	İnterferon-gamma
IgM:	İmmünglobülin M
IL-18:	İnterlökin 18
IL-1β:	İnterlökin 1- β
JAK:	Janus kinaz
kb:	Kilobaz
kDa:	Kilo Dalton
KOA:	Diz osteoartriti
LT-α:	Lenfotoksin- α
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MCP-1:	Monosit kemotaktik protein-1
MEFV:	Mediterranean Fever
MGB:	Küçük bir oluk bağlayıcı
MIP-1α:	Makrofaj inflamatuvar protein 1 α
MIP-1β:	Makrofaj inflamatuvar protein 1 β
ml:	Mili litre

MMP:	Matriks metaloproteinaz
NALP3:	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NF-κB:	Nükleer Faktör Kabba B
NFQ:	Floresan olmayan quencher
NLRP3:	NLR family pyrin domain containing 3
nm:	Nanometre
PAN:	Poliarteritis nodosa
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNA:	Peptit nükleik asit
PPi:	Pirofosfat
PSTPIP1:	Prolin-serin-treonin fosfataz etkileşimli protein
RANTES:	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
RT:	Real Time
SLE:	Sistemik lupus eritematozus
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nukleotid Polimorfizmi)
STAT:	Sinyal iletimi ve transkripsiyon
SYBR Green:	Syber green
TGF-β:	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
Tm:	Erime sıcaklığı
TNF:	Tümör Nekroz Faktörü
TRAF:	TNF-reseptörü ile ilişkili faktör
UP:	Ultra saf
VCAM-1:	Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
wt:	Wild type (Yapanıl tip)
μl:	Mikro litre

ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİL

Şekil 1 Dünyada FMF dağılımı ve prevalansı (24).....	7
Şekil 2 MEFV geni (49).....	12
Şekil 3 MEFV geninin mutasyonları (51).....	13
Şekil 4 Pirin proteininin yapısı ve ilişkili proteinler (49).	14
Şekil 5 CD40 geninin lokasyonu (69).....	17
Şekil 6 CD40 Protein yapısı (68).	17
Şekil 7 CD40 sinyal yolağı (62).....	19
Şekil 8 TaqMan Assay (100).....	23
Şekil 9 rs1883832 SNP (103).....	24
Şekil 10 rs4810485 SNP (111).....	25
Şekil 11 DNA İzolasyon Prosedürü (112).	32
Şekil 12 Pyrosekans Prensibi (116).....	34
Şekil 13 Plate Setup Örneği.	37
Şekil 14 Kartuş Kuyucuk Alanları.	40
Şekil 15 Analiz örneği.....	42
Şekil 16 Real-Time PCR Problemleri (119).	45
Şekil 17 TaqMan Genotipleme Analizi Çalışma Prensibi.	47

RESİM

Resim 1 EZ1 Advanced DNA İzolasyon Cihazı.....	28
Resim 2 PyroMark Q24 Pyrosequencing Cihazı.	28
Resim 3 PCR Cihazı.	29
Resim 4 PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu.	29
Resim 5 Isı Bloğu, T-Shaker, Combi-Spin Cihazları.....	30
Resim 6 Real Time PCR.	30
Resim 7 PCR Kabini.....	31
Resim 8 Kartuş.....	40
Resim 9 PCR termal Döngü Ayarları.....	48
Resim 10 Raportör Boya İdiyogramı	48
Resim 11 analiz örneği (a. Wild Type b. Heterozigot c. Mutant).	49
Resim 12 Hasta Grb. rs1883832 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu.	50
Resim 13 Genotipleme ve Allellerin Belirlenmesi	51
Resim 14 Kontrol Grb. rs1883832 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu	52
Resim 15 Hasta Grb. rs4810485 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu	52
Resim 16 Kontrol Grb. rs4810485 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu	53

TABLO

Tablo 1 FMF tanısı için klinik tanı kriterleri (Tel Hashomer kriterleri) (20-37).....	9
Tablo 2 FMF tanısı için klinik tanı kriterleri (Livneh kriterleri) (20-37).	9
Tablo 3 Çocukluk çağında FMF tanısı için belirlenen kriterler (39).	10
Tablo 4 FMF için uluslararası şiddet puanlama sistemi (20-41).	10
Tablo 5 SNP Genotipleme Stratejileri (93).....	22
Tablo 6 Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı.	34
Tablo 7 PCR protokolü.	35
Tablo 8 Master Mix Hazırlığı.	38
Tablo 9 FMF Analiz Şablonu.....	41
Tablo 10 Floresan sinyal korelasyonları.	46
Tablo 11 PCR Reaksiyon Mix Miktarları.	47
Tablo 12 PCR Termal Döngü Şartları.....	47
Tablo 13 Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı.....	54
Tablo 14 Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyete göre dağılımı.....	54
Tablo 15 FMF Hastalarının Genotiplerinin Dağılımı.	54
Tablo 16 FMF Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlar.....	55
Tablo 17 Mutasyonların Allel frekans Dağılımı.	56
Tablo 18 rs1883832 (C/T) polimorfizmi Genotip ve allel frekansı.	56
Tablo 19 rs4810485 (G/T) polimorfizmi Genotip ve allel frekansı.	57
Tablo 20 rs1883832(C/T) ve rs4810485(G/T) SNPs ait kombine genotip analizleri.	58
Tablo 21 FMF mutasyon genotiplerinin rs1883832 (C/T) ile karşılaştırılması.	59
Tablo 22 FMF mutasyon genotiplerinin rs4810485 (G/T) ile karşılaştırılması.....	59
Tablo 23 FMF Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması.	60
Tablo 24 Ülke genelinde yapılan MEFV mutasyonlarının allel frekans dağılımı. ..	61

1. ÖZETLER

1.1.Türkçe Özet

Pediyatrik Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarda CD40 Polimorfizmi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Mahir BİNİCİ

Danışmanı: Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Amaç: Ailesel akdeniz ateşi (FMF) resesif olarak kalıtılan otoinflatuar bir hastalıktır. FMF birçok klinik semptomun kombinasyonunun görüldüğü bir hastalık olup genetik ve genetik olmayan risk faktörlerinin çoğu ile ilişkili olabilmektedir. Lokal ve sistemik inflamatuvar cevaplara katılan ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde kritik rol oynayan CD40 geninde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda CD40 polimorfizmlerinin hastalığın patogeneğinde bir etkisinin olup olmadığının araştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Hasta grubunda MEFV (Mediterranean Fever) geninde meydana gelen yaygın mutasyon verileri pyro-sekans analizi ile elde edildi. Hasta ve kontrol gruplarında CD40 genindeki Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) genotiplemesi için Real-Time PCR’ da rs1883832 ve rs4810485 SNP genotipleme problemleri kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamızda MEFV geninin yaygın mutasyon analizi sonucunda en sık görülen mutasyonlar E148Q (%33,6) ve M694V (23,4) mutasyonları olmuştur. CD40 genine ait rs1883832 tek nükleotid polimorfizm analizi sonucu hasta grubunun %43,0’ünde CC, %56,0’ında CT ve %1,0’ünde TT genotipleri saptanırken kontrol grubunda ise %47,0’inde CC ve %53,0’ünde CT genotipleri saptandı. CD40 genine ait rs4810485 tek nükleotid polimorfizm analizi sonucu hasta grubunun %43,0’ünde GG, %43,0’ünde GT ve %14,0’ünde TT genotipleri saptanırken kontrol grubunda ise %47,0’inde GG, %45,0’inde GT ve %8,0’inde TT genotipleri saptandı. Her iki tek nükleotid polimorfizmi içinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda FMF hastalığı ve CD40 geninin rs1883832 ve rs4810485 tek nükleotid polimorfizmleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışmamız mevcut literatür bilgilerimize göre lkemizde FMF ocuk yaş grubunda yapılan ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Ailesel Akdeniz Ateşi, CD40, Polimorfizmi, Tek Nükleotid, rs1883832, rs4810485



1.2. Abstract

CD40 Gene Polymorphisms in Pediatric Patients with Familial Mediterranean Fever

Student's Surname and Name: Mahir BİNİCİ

Adviser of Thesis: Assoc. Prof. Selahattin TEKEŞ

Department: Medical Biology

Aim: Familial Mediterranean fever (FMF) is a recessively inherited autoinflammatory disease. FMF is a disease with a combination of many clinical symptoms and may be associated with most genetic and non-genetic risk factors. Single nucleotide polymorphisms in the CD40 gene, which participates in local and systemic inflammatory responses, play a critical role in the regulation of the immune system, have been associated with many diseases. In our study, we aimed to investigate whether CD40 polymorphisms have an effect on the pathogenesis of the disease.

Material and Method: Common mutations in the MEFV (Mediterranean Fever) gene in patients were obtained by pyro-sequence analysis. TaqMan genotyping probes of rs1883832 and rs4810485 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were used in Real-Time PCR for genotyping of SNPs in CD40 gene for patient and control groups.

Results: In our study, E148Q (33.6%) and M694V (23.4) mutations were the most common mutations as a result of the mutation analysis of the MEFV gene. As a result of rs1883832 single nucleotide polymorphism analysis of CD40 gene, CC genotypes were detected in 43.0%, CT in 56.0% and TT in 1.0% of the patient group, whereas CC genotypes were detected in 47.0% and CT in 53.0% of the control group. As a result of rs4810485 single nucleotide polymorphism analysis of CD40 gene, GG genotypes were detected in 43.0%, GT in 43.0% and TT in 14.0% of the patient group, whereas GG genotypes were detected in 47.0%, GT in 45.0% and TT in 8.0% of the control group. There was no statistical difference between the patient and control groups in both single nucleotide polymorphisms ($p>0.05$).

Conclusion: In the light of the data obtained in our study, there was no significant correlation between FMF disease and CD40 gene rs1883832 and rs4810485 single nucleotide polymorphisms. According to our current literature knowledge, our study is important in terms of being the first study conducted in the pediatric patient with FMF in our country.

Key Words: Familial Mediterranean Fever, CD40, Polymorphism, Single Nucleotide, rs1883832, rs4810485



2. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) tekrarlayan ateş atakları, serozit, eklem bulguları, erizipel benzeri döküntüler ve böbrek komplikasyonları ile kendini gösteren otoinflamatuvar bir hastalıktır. Mediterranean Fever (MEFV) genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (1).

FMF genel olarak Akdeniz bölgesinde yaşayan populasyonları etkiler ve Türk, Yahudi, Arap ve Ermeni nüfuslarında güçlü bir dağılım gösterir. Akdeniz havzasında bulunan İspanya, İtalya ve Yunanistan toplumlarında daha az ölçüde dağılım göstermektedir. Bununla birlikte son yıllarda artan göçle birlikte FMF artık dünya çapında görülebilen bir hastalık haline gelmiştir (2,3).

FMF genetik ve genetik olmayan risk faktörlerinin çoğu ile ilişkili olabilmektedir. FMF de genotip ve fenotip korelasyonu oldukça kompleks yapıdadır. Hastalığın patogenezinde etnik ve çevresel faktörlerin yanında farklı genetik faktörlerde rol oynamaktadır (4).

Cluster of Differentiation 40 (CD40) TNF ailesine ait tip II sitokin olup bağışıklık hücreleri, trombositler, fibroblastlar, epitel hücreleri, düz kas hücreleri, mast hücreleri ve dentritik hücreler dahil çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilir. CD40 lokal ve sistemik inflamatuvar cevaplara katılır, bağışıklık hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasına aracılık eder ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde kritik rol oynar (5).

Bir dizi çalışmada, CD40 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPs) çok sayıda immüno-inflamatuvar hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (6).

FMF birçok klinik semptomun kombinasyonunun görüldüğü bir hastalıktır. Çevresel faktörler ve farklı genlerdeki gen mutasyonları bu hastalıkta rol oynayabilmektedir. Çalışmamız ışığında CD40 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPs) hastalığın patogenezinde bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Çalışmamızın bu alanda yapılacak diğer çalışmalara bilgiler vereceği düşüncesindeyiz. Çalışmamız, Türk populasyonunda çocuk yaş grubunda FMF ve CD40 tek nükleotid polimorfizmleri arasındaki ilişkinin inceleneceği ilk çalışma olacak olması bakımından da önemlidir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1.Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalığı

3.1.1. Ailesel Akdeniz Ateşi' nin tanımı

Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), tekrarlayan peritonit, ateş, döküntü ve artritis atakları ile karakterize, otozomal resesif geçişli bir inflamatuvar hastalıktır (7). FMF genel olarak Akdeniz çevresinde yaşayan toplumlar (Yahudiler, Ermeniler, Türkler ve Araplar) arasında yaygın olmasına rağmen, göç ve artan ulaşım imkanlarının artması nedeniyle dünyanın her yerinde görülebilmektedir (8).

FMF den sorumlu olan MEFV genindeki mutasyonlar hastalığa sebep olmaktadır (1).

3.1.2. Tarihçesi

Literatürde ilk vaka 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından 16 yaşında Yahudi bir kız çocuğunda tekrarlayan ateş, abdominal ağrı, kanda yüksek lökosit belirtileriyle tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu hastalığı “Paroksizmal Peritonit” diye tanımlamışlardır (9,10). Klinik olarak ilk tanımı 1945 yılında Siegal ve arkadaşları tarafından “Benign Paroksizmal Peritonit” ismi ile tanımlanmıştır (11). 1950' lerin başında, FMF ile potansiyel olarak ölümcül komplikasyonu olan sekonder (AA) amiloidoz arasındaki ilişki bildirilmiştir (8).

Heller ve arkadaşları 1958 yılında hastalığa “Ailesel Akdeniz Ateşi” adını vermişlerdir (12). Aynı araştırmacılar 1964 yılında hastalığın otozomal resesif geçişli bir hastalık olduğunu bildirmişlerdir (13). FMF için etkili bir ilaç olarak kolşisinin keşfi 1970' lerde büyük bir terapötik atılımdı ve bu ilaca verilen yanıt, tanıyı doğrulamaya yardımcı olmak için kullanılabilmekteydi (14,15).

1997 yılında hem bir Fransız çalışma grubu hem de uluslararası bir konsorsiyum tarafından klonlanan MEFV geninin 16. Kromozomun p13.3 bölgesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Genin ürettiği 781 amino asit içeren proteine “marenostin/pirin” adı verilmiştir (16,17).

Türkiye de ilk tespit edilen vaka 1946 yılında “Garip bir karın ağrısı sendromu” adlı raporda Marmaralı tarafından rapor edilmiş olup ilk kolşisin tedavisi Özkan

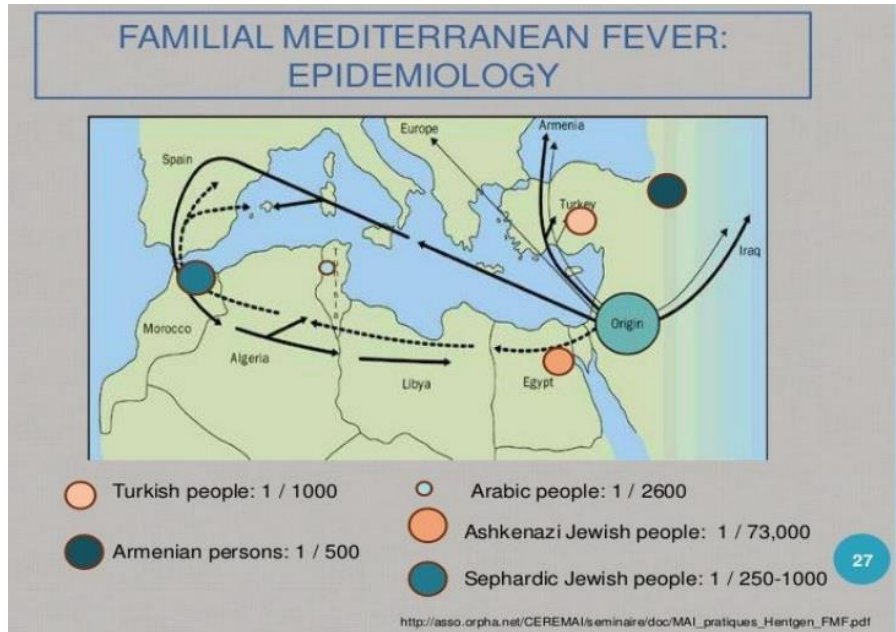
tarafından 1972 yılında uygulanmıştır (18-19). Türkiye'den çok sayıda vaka ulusal ve uluslararası dergilerde bildirilmiştir.

3.1.3. Epidemiyoloji

FMF en çok Akdeniz bölgesinde yaşayan Sefarad Yahudileri, Ermeniler, Araplar ve Türkler arasında yaygındır. 20. yüzyıldaki yoğun göç nedeniyle, FMF Almanya, İtalya, Çek Cumhuriyeti ve Japonya gibi Akdeniz dışındaki bölgelerde de rapor edilmektedir. Bu popülasyonlarda, prevalansın 100.000 kişi başına 100-400 civarında olduğu tahmin edilmektedir (20).

En yüksek prevalans Türklerde görülmekle birlikte 1/400 ile 1/1000 arasındadır. Türklerde taşıyıcılık oranı 1:5 şeklindedir. 84 milyondan fazla nüfusu ile dünyadaki tüm FMF vakalarının büyük bir kısmı Türkiye'de yaşamaktadır. İsrail, Aşkenazi olmayan (Sefarad) Yahudilerde 1/1000' den fazla yaygınlık oranı ve 1:5 taşıyıcılık oranıyla ikinci sıradadır. Aşkenaz Yahudilerinde bu sayı daha düşüktür. Ermenilerdeki prevalans 1/500' dir. Ürdün, Lübnan ve Suriye gibi Orta Doğu'daki diğer ülkelerde birçok FMF vakası var ancak kesin prevalans bilinmemektedir (2,8,21). Dünyada FMF dağılımı ve prevalansı şekil 1' de gösterilmiştir.

FMF cinsiyete göre farklılık göstermemesine rağmen bazı çalışmalarda erkek bireylerde kadınlara göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir (8,22,23).



Şekil 1 Dünyada FMF dağılımı ve prevalansı (24).

3.1.4. Klinik bulgular

Karakteristik olarak FMF hastaları; plörit, peritonit, artrit veya erizipel benzeri cilt lezyonlarının neden olduğu ağrı atakları ve tekrarlayan kendi kendini sınırlayan ateş ataklarından muzdariptir (25,26). Çoğu FMF hastası ilk atağını erken çocukluk döneminde yaşar. İlk atak, hastaların %65' inde 10 yaşın altında ve %90' ında ise 20 yaşın altında ortaya çıkmaktadır (27). Ataklar 12-72 saat arasında kendi kendini sınırlar ve ataklar arasındaki aralık; haftalardan yıllara kadar oldukça değişkendir (2). Hastalığın ön belirtileri tipik olarak semptomların başlamasından 1-2 gün önce ortaya çıkar. Bu ön belirtiler; nöropsikiyatrik veya fiziksel belirtiler, iştah ve tat değişiklikleri veya semptonun ortaya çıkacağı bölgede ağrı şeklinde olabilir (28).

Tekrarlayan ateş atakları, tipik olarak 38°C' den yüksektir ve 40°C'ye kadar çıkabilmektedir. Ateş döngüsü, bir tepe noktası görene kadar kendiliğinden hızlı bir şekilde yükselir 1-3 gün içerisinde hızlı bir düşüş gösterir (28,29)

Başlangıçta akut cerrahi karın hastalıkları ile karıştırılan periton iltihabına bağlı karın ağrısı belirtileri (peritonit) FMF de görülen diğer bir belirtidir. Hastaların %95' inde görülen bu semptomda yetişkinlerde kabızlık, çocuklarda ise ishal görülebilmektedir. Peritonit belirtileri 12-48 saat içinde düzelmektedir (27,30).

Göğüs ağrısı; plörit veya perikardit nedeniyle olabilir. Plörit ağrısı tipik olarak tek taraflıdır ve 1-4 gün sürer. Geçici olarak küçük plevral efüzyon (plörezi) gözlenir ve ataktan sonraki 48 saat içinde düzelmektedir. Perikardit 1-14 gün arası sürer ve hastalar birden fazla atak geçirirler (27,31).

Artrit ikinci en yaygın semptomdur ve ataklar genellikle monoartikülerdir. Tipik olarak alt ekstremitelerin (dizler ve ayak bilekleri) büyük eklemlerini içerir ve genellikle çocukluk çağında gelişen bir durumdur (29,32).

Erizipel benzeri cilt lezyonu (döküntüler) alt ekstremitelerde oluşur ve tipik olarak 10-35 cm² büyüklüğünde görülmektedir. Ağrılı, sıcak ve keskin sınırlara sahiptir ve bu belirtiler genellikle 2-3 gün içerisinde kendiliğinden düzelmektedir. FMF çocuk hastalarda tipik bir ayırt edici semptomdur (21,33).

Uzamış febril miyalji ve akut skrotum FMF hastalığında görülen diğer semptomlardır. Akut Skrotum; serozit atakları esnasında meydana gelen tunika vajinalis iltihabından kaynaklanır ve 12-24 saat içinde düzelir (29,34).

FMF hastalarında; hematüri, proteinüri, tekrarlayan akut pyelonefrit, glomerülonefrit ve sekonder (AA) amiloidoz görülen böbrek semptomlarıdır. Sekonder (AA) amiloidoz, FMF' nin en önemli komplikasyonu olmasına rağmen, Türkiye'de yapılan çok merkezli büyük bir çalışmada FMF' li hastaların %8,6' sında bulunmuştur (35,36).

Henoch-Schönlein purpurası (HSP) ve Poliarteritis nodosa (PAN) gibi çocukluk çağının en sık rastlanan vaskülitinin FMF hastalarında görülme sıklığının normal topluma göre 7 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (24).

3.1.5. Tanı kriterleri

Klinik tanı kriterleri, İsrail'deki Tel-Hashomer Tıp Merkezinde yapılan bir çalışmadan türetilmiştir. Akdeniz kökenli bir hasta iki majör kriteri veya bir majör ve iki minör kriteri karşıladığında FMF tanısı düşünülmelidir (tablo 1) (37).

Tablo 1 FMF tanısı için klinik tanı kriterleri (Tel Hashomer kriterleri) (20,37).

Majör Kriterler
Tekrarlayan ateş atakları ile beraber sinovit, serozit, peritonit ve plörit
Predispozan hastalık olmaksızın AA amiloidoz
Kolşisin tedavisine iyi klinik yanıt
Minör Kriterler
Tekrarlayan ateş atakları
Erizipel benzeri cilt lezyonları
Ailede FMF öyküsü (birinci derece akraba)

Livneh ve ark. tarafından önerilen basitleştirilmiş tanı kriterleri tablo 2' de verilmiştir. Bu kriterlere göre bir veya daha fazla majör kriter ya da iki veya daha fazla minör kriterin olması FMF tanısını düşündürmelidir.

Tablo 2 FMF tanısı için klinik tanı kriterleri (Livneh kriterleri) (20,37).

Majör Kriterler (1-4. Tipik ataklar)	Minör Kriterler (1-2. Aşağıdaki bölgelerden 1 veya daha fazlasını içeren tamamlanmamış ataklar)
1. Peritonit (genelleştirilmiş)	1. Göğüs
2. Plörit (unilateral) veya perikardit	2. Ortak
3. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)	3. Egzersiz bacak ağrısı
4. Yalnız ateş	4. Kolşisine olumlu yanıt
5. Tamamlanmamış abdominal ataklar	

Bu kriterler esas olarak moleküler analizin tanımlanmasından önce ve yerleşik bir hastalığı olan yaygın bir yetişkin popülasyonunda geliştirilmiştir. Bir Türk çalışma grubu tarafından çocukluk çağı FMF tanısı için yeni bir dizi kriter önerilmiştir. Yalçinkaya ve arkadaşlarının önerdiği bu yeni kriterlerin çocukluk çağı hastalar için daha iyi bir sensitivite sağladığı rapor edilmiştir (tablo 3). FMF klinik tanısı için; seçilen beş kriterden en az ikisinin bulunması gerektiğinin yeterli olduğu bildirilmiştir (38,39).

Tablo 3 Çocukluk çağında FMF tanısı için belirlenen kriterler (39).

Kriter	Tanım
Ateş	>38°C aksiller sıcaklık, 6-72 saat süre, 53 atak
Karın ağrısı	6-72 saat süre, 53 atak
Göğüs ağrısı	6-72 saat süre, 53 atak
Artrit	6-72 saat süre, 53 atak, oligoartrit
FMF' in aile öyküsü	

Uluslararası bir FMF grubu tarafından, "FMF için uluslararası şiddet puanlama sistemi" (ISSF) olarak adlandırılan yeni bir şiddet puanlama sistemi geliştirilmiştir. ISSF, araştırmalar ve klinik uygulamalarda kolay uygulanabilir ve kabul edilebilir bir puanlama sistemi olması için geliştirilmiştir (40). Bu Skorlama sistemi tablo 4' te verilmiştir.

Tablo 4 FMF için uluslararası şiddet puanlama sistemi (20,41).

1	Kronik sekel (amiloidoz, büyüme geriliği, anemi, splenomegali)	1
2	Organ disfonksiyonu (FMF ilişkili nefrotik düzeyde proteinüri)	1
3	Organ yetmezliği (FMF ilişkili kalp, böbrek, vs.)	1
4a*	Atakların sıklığı (ayda ortalama 1 ile 2 arasında atak sayısı)	1
4b*	Atakların sıklığı (ayda ortalama 2 den fazla atak sayısı)	2
5	Son ataktan en az 2 hafta sonra ataksız dönemde akut faz reaktanlarında artış (C-reaktif protein, serum amiloid A, eritrosit sedimentasyon hızı, fibrinojen) (en az iki kez, 1 ay arayla)	1
6	Akut atak sırasında ikiden fazla bölgenin tutulumu (perikardit, plörit, peritonit, sinovit, erizipel benzeri lezyonlar, testis tutulumu, miyalji, vb.)	1
7	Hastalık esnasında ikiden fazla farklı atak tipi (izole ateş, perikardit, plörit, peritonit, sinovit, erizipel benzeri lezyonlar, testis tutulumu, miyalji vb.)	1
8	Atak süreleri (yılda en az üç atağın 72 saatten fazla sürmesi)	1
9	Egzersiz ilişkili bacak ağrısı (diğer nedenlere bağlanmaksızın uzun süreli ayakta durma ve/veya egzersiz sonrası olan ağrılar)	1
	Toplam Skor	10
Şiddetli hastalık ≥ 6 , orta düzeyde hastalık 3-5, hafif hastalık ≤ 2 , *4a/4b kriterlerin tanımına göre 0-1-2 puanları verilebilir.		

3.1.6. Patogenez

FMF' den sorumlu gen tanımlanmış olmasına rağmen, FMF' in patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. FMF hastalığından sorumlu olan MEFV geni, 781 amino asitten oluşan bir bağışıklık düzenleyici molekül olan Pirin proteinini kodlar. Doğal bağışıklık sisteminde önemli bir role sahiptir ve interlökin 1- β (IL-1 β) üretimini düzenlemek için kaspaz-1 ve diğer inflamazom kompleksi bileşenleri ile etkileşime girer. İnflamazomlar, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde önemli bir rol oynayan multiprotein kompleksleridir (42).

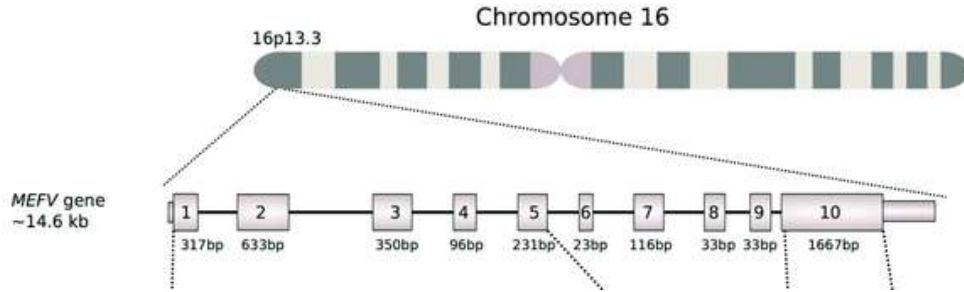
FMF ve diğer otoinflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol oynayan ve interlökin-1 β sentezi için gerekli olan en önemli inflamazom kompleksi nükleotid bağlayıcı alan, lösin bakımından zengin tekrar ve pirin alanı içeren protein olan NALP3 inflamazom kompleksidir. NLRP3; makrofaj, mikroglia gibi immün sistem hücrelerine ulaşan tehlike sinyallerini tanıyan ve IL-1 β ile IL-18 aracılığı ile inflamatuvar yanıtların başlamasında görev alan sitozolik bir reseptör proteindir (43,44).

NLRP3 aktive edildiğinde birçok inflamatuvar uyarana yanıt olarak IL-1 β ' nin aktivasyonuna yol açar. Pirin; NALP3 inflamatuvar kompleksindeki pro-kaspaz-1'e bağlanarak interlökin-1 β üretimini engeller. Pirin mutasyonlarının çoğu proteinin kaspaz-1'e bağlandığı bölge olan C-terminali bölgesinde meydana gelir (43). FMF' deki pirinde meydana gelen mutasyon etkisinin fonksiyon kaybından mı (IL-1 β ' nin pirin inhibitör etkisi) yoksa bir fonksiyon kazanımından mı (pirinin IL-1 β üzerindeki proinflamatuvar etkisi) kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala tartışmalıdır (45). Pirinin anti-inflamatuvar rolü, kaspaz-1 eyleminin inhibisyonunu ve IL-1 β işlemlerini içerir. Pirinin proinflamatuvar rolü ise IL-1 β aktivasyonundan kaynaklı bilinmeyen bir inflamasyonu tetiklediği düşünülmektedir (46).

3.1.7. FMF genetiği

FMF' in kalıtımı, diğer monogenik Mendeliyan hastalıklarda olduğu gibi sıradan bir otozomal resesif kalıtıma benzememektedir. Yapılan son çalışmalar, FMF kalıtımı, penetransı ve patogenezinin daha karmaşık bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (45).

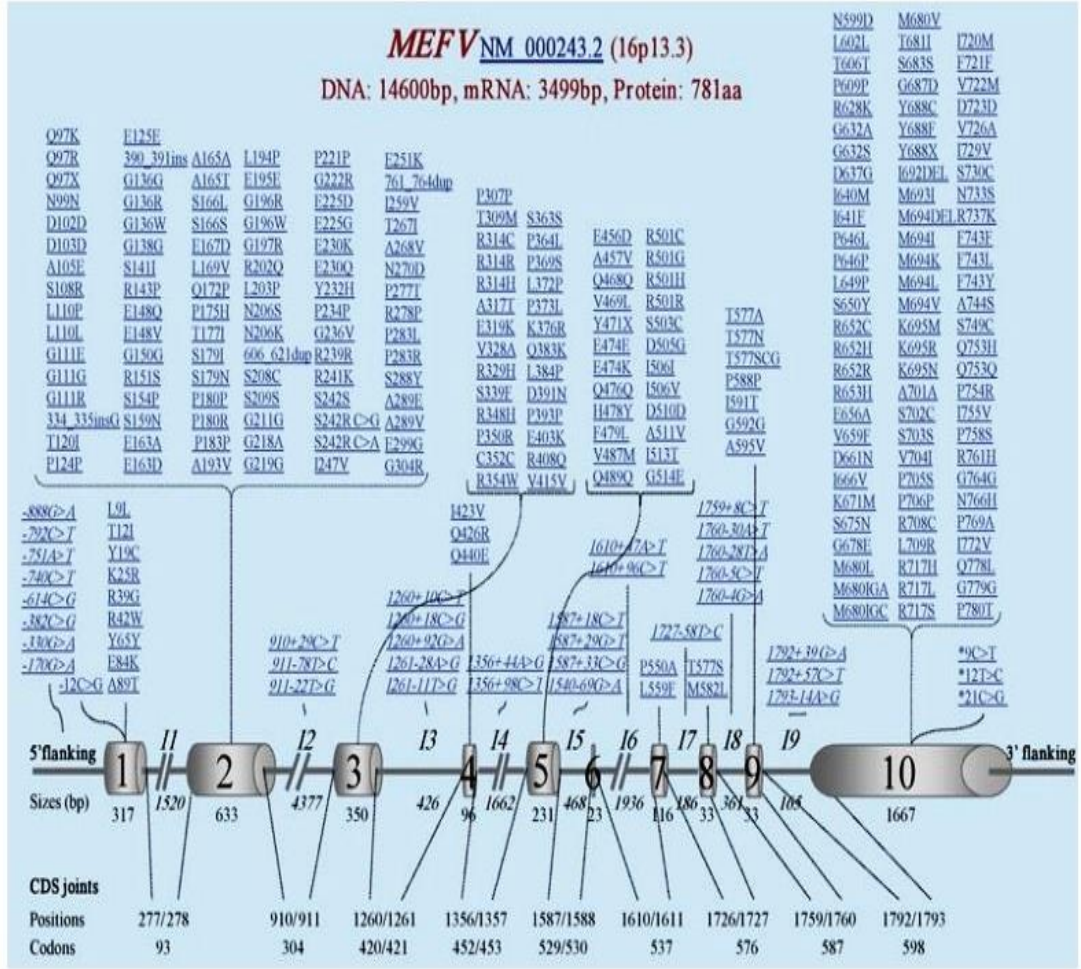
MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunun 13.3 (16p13.3) bölgesinde bulunur ve 10 ekzondan oluşur. 14 600 baz çiftinden oluşmaktadır (şekil 2) (21).



Şekil 2 MEFV geni (49).

En yaygın genetik mutasyonlar, Akdeniz havzasındaki FMF vakalarının %85' inden fazlasından sorumlu olan ekzon 10 ve ekzon 2' de kodlanmıştır (21). Bugüne kadar, MEFV geni için tespit edilen toplam mevcut sekans varyantı sayısı 390' dır (47). Klinik öneme sahip olmaksızın bu mutasyonların çoğu nadir olarak görülür ve esas olarak FMF' in yaygın olmadığı popülasyonlarda görülür. Shinar ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yayınlanan bir kılavuza göre, FMF hastalığı için 14 adet MEFV varyantının taranması önerilmiştir. Bu varyantlardan 9 tanesinin (M680I, M694V, M694I, V726A, A744S, R761H, I692del, E167D, T267I) patojenik olduğu bilinmekle birlikte geri kalan 5 tanesinin (K695R, E148Q, P369S, F479L ve I591T) klinik önemi bilinmemektedir (48). Sekanslamanın yaygınlaşmasından sonra MEFV geninin tamamının sekanslanmasının varyantların tespitinde daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Mevcut uygulama kılavuzları, Sanger dizilime yöntemi kullanılarak MEFV geninin ekzon 10 ve isteğe bağlı olarak 2, 3 ve 5 ekzonlarının test edilmesini önermektedir. Aynı zamanda Yeni Nesil Sekanslama yöntemi ile MEFV geninin tüm ekzonlarının çalışılabileceği de önerilmektedir (50).

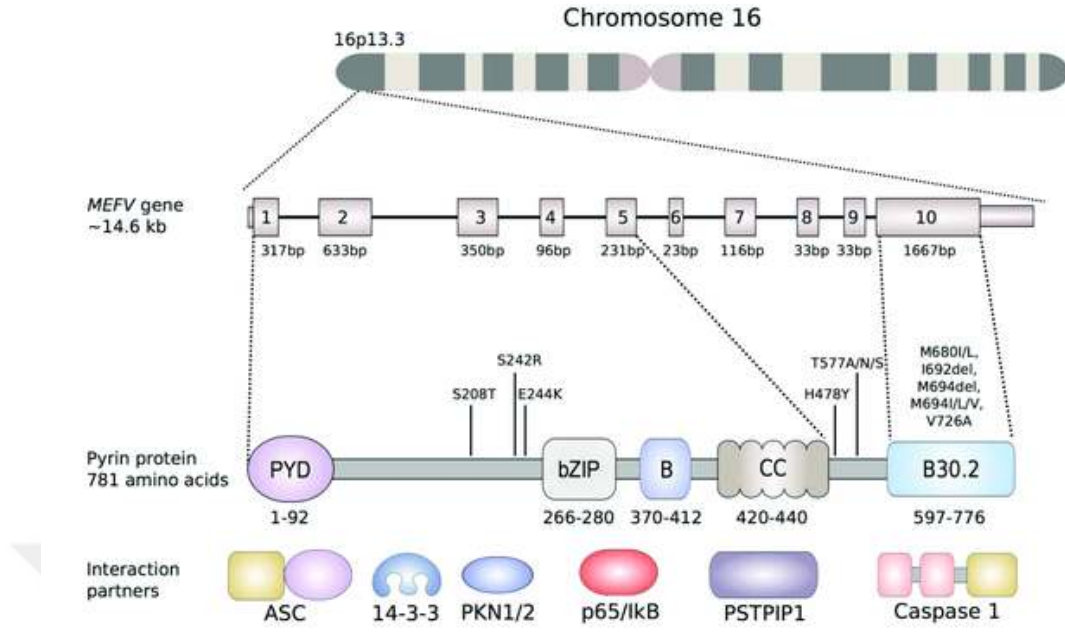
MEFV geninin ekzonlarında meydana gelen mutasyonların bir kısmı şekil 3' te gösterilmiştir.



Şekil 3 MEFV geninin mutasyonları (51).

3.1.8. Pirin proteininin yapısı ve FMF ile ilişkisi

Yunanca da “ateş” anlamına gelen pirin proteinini (marenostrin ve TRIM20 olarak da bilinir); 16. kromozom üzerinde MEFV geni tarafından kodlanan 781 amino asitten oluşan ve yaklaşık olarak 95 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. Pirin ekspresyonu esas olarak doğal bağışıklık sisteminin hücreleri olan granülositler, eozinofiller, monositler ve dendritik hücreler ile sınırlıdır. Homoloji analizleri sonucu, pirin proteinini içinde beş farklı bölge tanımlanmıştır. Bunlar; PYD bölgesi (Pirin bölgesi), bZIP, B-Box, CC (coiled-coil) ve B30.2 (PRY/SPRY) bölgeleridir (Şekil 4) (52).



Şekil 4 Pirin proteininin yapısı ve ilişkili proteinler (49).

Proteinin N terminal ucundaki PYD bölgesi (1-92. amino asitler arası), esas olarak inflamatuvar süreçlerde yer alan 20' den fazla insan proteininde bulunur. PYD bölgesi; inflamatuvar adaptör proteini olan ASC (Apoptosis-associated speck-like protein with a CARD) proteinine bağlanarak kaspaz-1 aracılığı ile inflamasyondan sorumlu olan IL-1 β üretimini regüle eder. Aynı zamanda NF-kB aktivasyonu ile apoptozisin düzenlenmesini sağlar (52,53).

Pirin esas olarak sitozolde bulunur ve b-ZIP bölgesinide içeren proteinin N-terminal ucunun hem mikrotübüller hem de aktin hücre iskeleti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (54).

B-box (370-412) ve α -helikal yapıllı CC (coiled-coil) (420-440) bölgelerinin pirinin oligomerizasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu iki bölgenin, hücre iskeletinin organizasyonu için önemli bir protein olan prolin-serin-treonin fosfataz etkileşimli protein (PSTPIP1/CD2BP1) ile etkileşime girdiği de bildirilmektedir (55,56).

Pirin proteinin C-terminalinde bulunan B30.2 bölgesi, FMF ile ilişkili mutasyonların çoğunun kümелendiği bölgedir ve bu nedenle FMF' e yol açan moleküler mekanizmalar için esas olduğundan özellikle önemlidir. In vitro ekspresyon

çalışmaları, pirinin B30.2 bölgesinin doğrudan kaspaz-1 ile etkileşime girdiğini göstermiştir (49).

3.1.9. Genotip-fenotip korelasyonu

FMF hastalığında, mutasyon ve klinik bulgular arasında büyük farklılıklar görülmektedir. Benzer mutasyona sahip hastalarda veya aynı aile bireylerinde mutasyonlar sonucu ortaya çıkan semptomlar farklılık göstermektedir. Bu durum FMF hastalığının klasik kalıtım şeklinin dışında birçok faktöre bağlı olduğunu düşündürmektedir (57).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada; FMF hastalığında düşük penetrasyon ile görülen mutasyonların, yüksek penetrasyon ile görülen mutasyonlara oranla daha az semptomla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu durumun mutasyonların “doz etkisi”nden kaynaklı olduğu öne sürülmektedir (58).

M694V mutasyonunun hem homozigot hem de bileşik heterozigot varyantları hastalık açısından daha ağır semptomlar göstermekle beraber erken dönemde semptomların görüldüğü bildirilmektedir (59).

M694V mutasyonundan sonra en yaygın ikinci mutasyon olan ekzon 2'deki E148Q mutasyonunun FMF' deki patojenik rolü hala tam olarak bilinmemektedir. Sağlıklı popülasyonun %1' den fazlasında bulunması benign bir polimorfizm olabileceğini düşündürmektedir. Nadir de olsa homozigot E148Q mutasyonu veya diğer patojenik olmayan mutasyonların FMF fenotipi gösterdikleri rapor edilmiştir. Bu tür durumlardan kaynaklı olarak sadece MEVF varyantları ile FMF teşhisi konulmaması önerilmektedir (60,61).

3.2.Cluster of Differentiation 40 (CD40)

3.2.1. CD40 tarihçesi ve tanımı

CD40 sisteminin moleküler patofizyolojisi, ilk olarak 1986 yılında yapılan bir çalışmada ortaya konmaya çalışılmıştır. Günümüze kadar CD40 ve CD40 ligandı (CD154 veya CD40L olarak adlandırılır) ile ilgili 16 binden fazla çalışma yapılmıştır. CD40 ilk kez mesane kanseri hücrelerinde saptanmıştır. Araştırmaların çoğu B ve T lenfositleri arasındaki CD40 geninin önemine odaklanmıştır. Daha sonra, CD40

ligandındaki veya CD40' ın kendisindeki mutasyonların X'e bağılı immün yetmezlik hastalığı olan hiper IgM-sendromundan sorumlu olduğu bulundu (62,68).

CD40; Tümör Nekroz Faktörü (TNF) gen süper ailesinin bir transmembran reseptörüdür. Monositler/Makrofajlar, B-Lenfositleri, Dentritik hücreler gibi antijen sunan hücreler, endotelyal, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerde eksprese edilir. CD40 ve CD40 ligandının (CD40L-CD154) arasındaki etkileşim esas olarak nükleer faktör kappa B' nin (NF- κ B) uyarılması aracılığıyla sitokinlerin, kemokinlerin, matriks metaloproteinazların (MMP), büyüme faktörlerinin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır (62).

CD40 aracılı sinyal iletimi, fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. CD40-CD40L etkileşimi hem humoral hem de hücre sel bağışıklık yanıtlarda rol oynar. Nörodejeneratif bozukluklar, greft-konakçı reaksiyonları, neoplaziler ve ateroskleroz gibi geniş bir kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalık yelpazesinde önemli bir oyuncu olarak görev yapmaktadır (63,64).

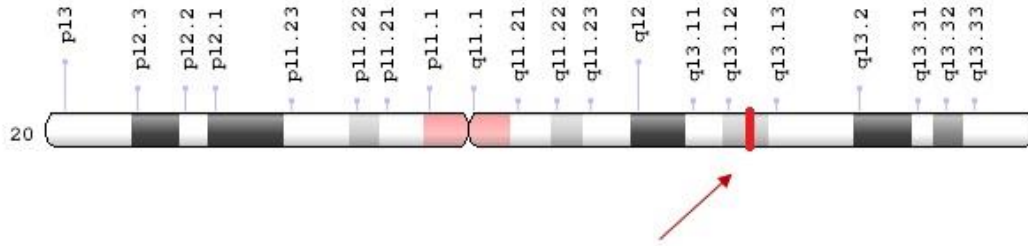
CD40/CD40L etkileşimine yapılan müdahaleler, ya immün yetmezlik durumlarında CD40 sinyalini artırmak ya da kontrolsüz immün reaksiyonlar veya kronik inflamatuvar durumlarda onu bloke etmek için potansiyel bir hedef olmasından kaynaklanmaktadır (65).

CD40/CD40L sinyal yolu organizmanın inflamatuvar yanıtına aracılık etmede anahtar bir role sahiptir. Muhtemelen birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogeneğinde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (62).

CD40 geninin kodlanmayan bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP' ler) ile otoimmün hastalık riski arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Ayrıca, bazı SNP' ler için bu ilişkinin altında yatan moleküler mekanizmalar için çeşitli modeller öne sürülmüştür (66).

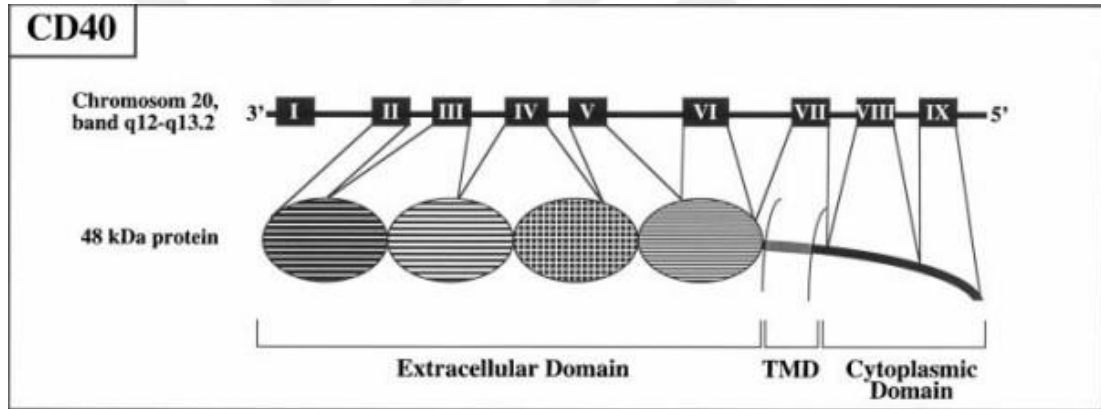
3.2.2. CD40 genetiği

CD40 geni; insanlarda 20. kromozomun q12–q13.2 bölgesinde bulunur ve 11593 bp' den oluşur. Bu genin ürünü 1.5 kb'lik bir mRNA tarafından kodlanan 277 aminoasitten oluşan, yaklaşık 47-48 kDa moleküler ağırlığa sahip bir transmembran glikoprotein reseptörüdür (şekil 5-6) (67,68).



Şekil 5 CD40 geninin lokasyonu (69).

9 ekzon bölgesi içeren genin transkripsiyonu sonucu 277 amino asitlik bir transmembran protein oluşmaktadır. Bu protein 22 amino asitlik bir sinyal dizisi, 171 amino asitlik bir hücre dışı alan, 22 amino asitlik transmembran alanı ve 62 amino asitlik bir sitoplazmik alandan oluşur (şekil 6) (70).



Şekil 6 CD40 Protein yapısı (68).

CD40 proteininin hücre dışı alanında çok sayıda sistein tekrarı bulunmaktadır. 171 amino asitlik hücre dışı alanda birbirleriyle bir veya iki bisülfid bağıyla bağlanarak stabilize olan 4 bölge bulunmaktadır. CD40 ligandının, bu alanlardan ikinci ve üçüncüsüne bağlandığına inanılmaktadır (71).

3.2.3. CD40/CD40L sinyal iletimi ve hücresel yanıt

CD40 proteininin CD40L ile etkileşimi; T lenfositine bağlı B lenfositin aktivasyonu, farklılaşması ve Ig üretiminde kilit bir rol oynamaktadır (72). Bununla

birlikte, CD40-CD40L eşleşmesinin bağışıklık sisteminin farklı yönlerinde çok önemli bir rol oynadığı zaten kanıtlanmıştır. Örnek verecek olursak;

- Kinazların aktivasyonu,
- Hücrel stres ile ilgili genlerin ekspresyonu,
- Yüzey moleküllerinin ekspresyonu,
- Apoptozun uyarılması veya bloke edilmesi,
- Bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşması (örneğin, B hafıza hücrelerinin veya plazma hücrelerinin üretimi),
- Doku reddi ve otoimmünite sırasında T hücrelerinin aktivasyonu şeklindedir (73-75).

CD40/CD40L etkileşimi, hücreleri sitokinler ve kemokinler üretmeye ve salgılamaya, yapışma moleküllerini, co-stimüle edici molekülleri ve matris metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi enzimlerin ekspresyonunu teşvik eder. Bunların tümü, birçok kronik hastalıkta yer alan lokal inflamatuvar süreçlerde görev yapmaktadır (74,76). CD40 özellikle aşağıdaki moleküllerin ekspresyonunu etkiler:

Sitokinler: CD40 aracılı sinyal iletimi, B lenfositleri tarafından IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , lenfotoksin- α (LT- α) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 'nin (TGF- β) sentezini uyarır. Dendritik hücreler ve eozinofiller tarafından granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) sentezi uyarılır. Periferik kan mononükleer hücreleri tarafından ise TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 sentezi uyarılır. Ayrıca, CD40' ın T lenfositleri üzerine bağlanması sonucu IFN- γ (interferon-gamma), TNF- α ve IL-2 üretimini indüklenir (77).

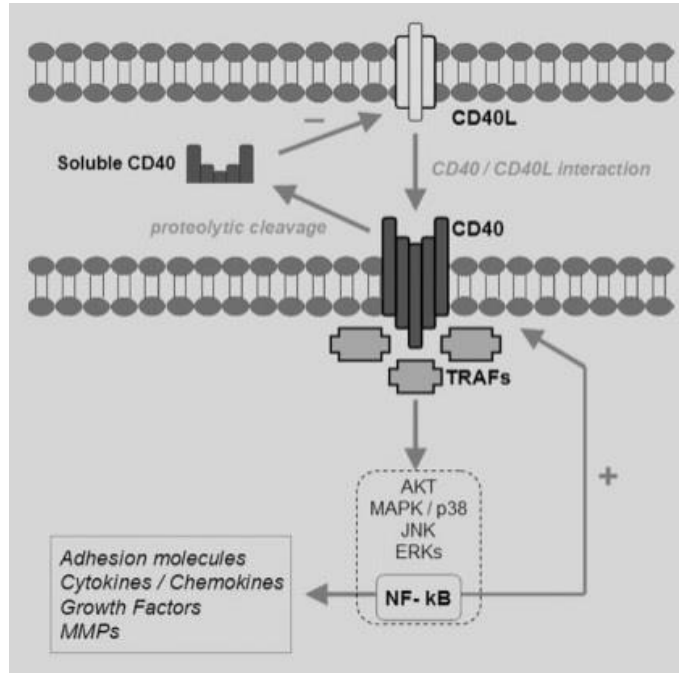
Kemokinler: CD40/CD40L etkileşimi, tübüler epitel hücreleri ve makrofajları uyarak RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted), MIP-1 α ve MIP-1 β (makrofaj inflamatuvar protein 1 α -1 β), MCP-1 (monosit kemotaktik protein-1) sentezlenmesine sebep olur (78). Endotel hücreleri tarafından ise IL-8, MCP-1 ve RANTES üretimi uyarılır. CD40 aracılı kemokin salgılanması; IL-4, IL-13 veya IFN- γ gibi sitokinler tarafından birlikte uyarılmaya bağlıdır (62).

Adhezyon molekülleri: CD40 sisteminin uyarılması, endotelial hücrelerde ve fibroblastlarda E-selektin, vasküler hücre adhezyon molekül-1 (VCAM-1) ve hücreler arası adhezyon molekül-1 (ICAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmaktadır (78).

Hücre dışı matriks düzenleyici enzimler: CD40 sinyali, çeşitli hücre tiplerinde matriks metaloproteinazların (MMP) ekspresyonunu uyarır. T hücrelerinin CD40 sisteminin aktivasyonu üzerine periferik kan mononükleer hücreleri, makrofajlar, endotelial ve düz kas hücreleri tarafından MMP-1,-2,-3 ve -9 salgılanır. Endotelial ve düz kas hücreleri tarafından ise MMP-11 ve MMP-13 salgılanır. MMP'ler hücre davranışının düzenlenmesinde, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerini modüle etmede, hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi ve bozulmasının düzenlenmesinde ve sitokinlerin ve diğer moleküllerin aktivite ve fonksiyonunun modülasyonunda rol oynar (79,80).

3.2.4. CD40 sinyal mekanizması

Hücre içerisinde CD40 ile ilgili sinyal iletimi çeşitli hücre içi araçlar tarafından gerçekleştirilir. Bu tür araçların en önemli grubu TNF-reseptörü ile ilişkili faktör (TRAF) ailesidir (81). TRAF'ların uyarılması ile NF- κ B (nükleer faktör- κ B), ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz), MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz), JAK (Janus kinaz) gibi sinyal yolları uyarılır. Bu yolların hepsi hücrelerin çoğalmasını teşvik ederek apoptozdan kaçmak için gerekli olan sinyal yollarıdır (şekil 7) (62,71).



Şekil 7 CD40 sinyal yolağı (62).

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B); çok çeşitli sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimi yoluyla inflamatuvar yolların aktivasyonunu uyardığından dolayı CD40-CD40L sinyal mekanizması tarafından aktive edilen en önemli transkripsiyon faktörüdür (82).

TRAF proteinlerinin dışında CD40 proteininin hücre içi bölgesi JAK3 ile etkileşime girerek STAT-3 (sinyal iletimi ve transkripsiyon-3), STAT-5a ve STAT-6 moleküllerinin fosforilasyonunu uyarır. JAK3 kinaz yolağı, B lenfositlerin aktivasyonu üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olmasına rağmen, dendritik hücre ve monositlerin aktivasyonu için önemlidir (83,84).

3.2.5. CD40 sinyal mekanizmasının hastalıklarla ilişkisi

CD40' ın lokal ve sistemik inflamtuvar yanıtlara katıldığı, bağışıklık hücresi çoğalmasına ve farklılaşmasına aracılık ettiği ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir (85).

X'e bağlı immün yetmezlik olan hiper IgM sendromuna sahip hastalarda CD40 veya CD40L de meydana gelen mutasyonlar, düşük IgG, IgA seviyeleri ve artan IgM seviyeleri ile karakterizedir (86).

CD40 mekanizması; T lenfosit aktivasyonunun ana modülatörlerinden biri olduğu için, viral enfeksiyonlarda (örneğin, hepatit C) veya hücre içi veya hücre dışı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca doku reddinde de önemli bir role sahiptir (87,88).

CD40, T ve B lenfositleri arasındaki işbirliğinde bir yardımcı uyarıcı molekül olarak çok önemli bir rol oynar. Bu kritik rolden dolayı; otoimmün tiroidit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, sedef hastalığı, sistemik lupus eritematozus, alerjik ensefalomyelit, multiple skleroz, romatoid artrit, kollajen kaynaklı artrit ve tip 1 diabetes mellitus gibi otoimmün hastalıkların patogenezinde önemlidir (89,90).

Genel olarak, CD40 mekanizmasının inflamatuvar bir arka plana sahip veya inflamatuvar bir yanıtı paylaşan çeşitli hastalıkların patogenezinde yer aldığı bilinmektedir. Bunu takiben oksidatif stres, endotel disfonksiyonu ve vasküler hastalık gibi süreçlerde yer aldığı görülmektedir (91,92).

3.3.Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

İnsan Genom Projesinin tamamlanmasıyla, popülasyon arasında çok sayıda varyasyon (polimorfizm) bulunmuştur. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP' ler), insan genomunda en sık meydana gelen genetik polimorfizmdir ve şu anda kamuya açık SNP veritabanlarında bildirilen toplam SNP sayısı 9 milyonu aşmaktadır (93).

SNP, tanımı gereği popülasyonun %1'inden fazlasında bulunan genomdaki belirli bir yerde meydana gelen tek bir nükleotid değişimidir (94). Bundan dolayı SNP' ler insersiyon veya delesyon polimorfizmlerini içermezler. Bununla birlikte, pratikte, bu tanım kesin olarak kabul görmez ve bazen insersiyonlar, delesyonlar ve %1'den az allel frekansına sahip varyasyonlar dahil olmak üzere biallelik varyasyonlar da SNP olarak adlandırılır. İnsan genomundaki SNP' lerin ortalama genel frekansı yaklaşık olarak 1000 bç' inde birdir (95,96).

Genel olarak SNP' ler, genomun kodlama bölgelerinde (ekzon) çok daha az sıklıkla meydana gelir ve çoğu SNP kodlama yapmayan bölgelerde (intron) bulunur (97). Kodlanmış proteinleri değiştirmemelerine rağmen intronlardaki SNP' ler, karşılaştırmalı veya evrimsel genomik çalışmalar için önemli genetik veya fiziksel belirteçler olarak kullanılmaktadırlar. Bir genin düzenleyici bölgelerinde meydana gelen SNP' ler gene ait proteinin transkripsiyon oranlarını etkileyebilir. Kodlama bölgelerinde meydana gelen SNP' ler protein yapısında ve dolayısıyla işlevinde değişikliklere neden olabilir. Bu da bir ilaca veya çevresel toksine yanıtta değişikliğe ya da hastalık gelişmesine yol açabilir. Bu nedenle SNP' ler birçok hastalık açısından genetik ve farmakogenomik çalışmalarda moleküler belirteçler olarak kullanılmıştır (98).

Yüksek frekansları ve basit (ikili) varyasyon paternleri nedeniyle SNP'ler, monogenik veya kompleks hastalıklarla ilgili birçok çalışmada moleküler belirteçler olarak kullanılmıştır. Monogenik hastalıklarda, tek bir gendeki varyasyon bir hastalık durumuna neden olabilir. Diğer yandan, diyabet, otoimmün hastalıklar, kanserler ve Alzheimer hastalığı gibi karmaşık hastalıkların; hastalığa neden olmak için birleşik bir etki uygulayan çok sayıda genetik yatkınlık varyantını içerdiğine inanılmaktadır. Karmaşık hastalıklar genellikle birkaç aday gen üzerinde popülasyon ilişkilendirme çalışmaları veya ailesel örneklerin genom çapında bağlantı analizi ile araştırılır (93).

SNP genotipleme stratejileri tipik olarak iki adımı içerir: allelik ayırım ve allel tespiti. Allelik ayırım; primer uzama, hibridizasyon, ligasyon veya enzimatik kesim ile yapılabilir. Çoğu allel tespit yöntemi ise kütle spektrometrisi, floresan veya kemilüminesansa dayalıdır. Bu yöntemler ve yöntemlere ait alt başlıklar tablo 5’ te verilmiştir.

Tablo 5 SNP Genotipleme Stratejileri (93).

Allelik Ayırım		Allel Tespiti
Primer Uzama	Kütle spektrometrisi tabanlı tespit	Kütle dayalı tespit
	Floresan tespiti	
	Allel spesifik primerler	
Hibridizasyon	Bir prob dizisine hedef hibridizasyon	Floresan dayalı tespit
	TaqMan® assay	
Ligasyon	CFET problemleri kullanarak tespit	
	Padlock probunun ligasyonu	Kemilüminesans dayalı tespit
Enzim Kesimi	Retriksiyon Enzimi ile Kesim	
	Invader® assay	

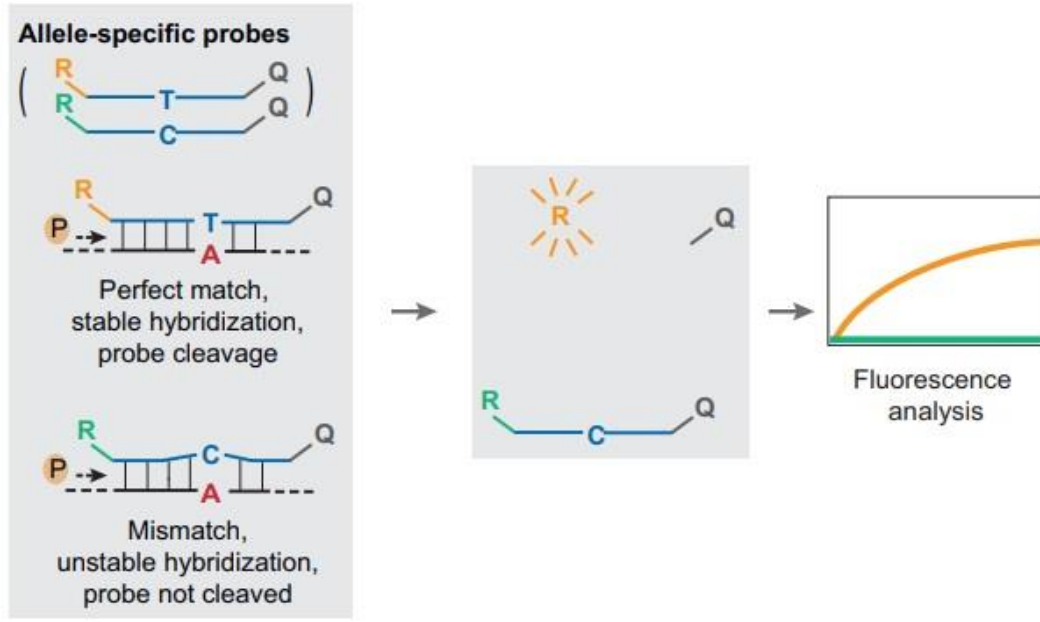
Bir sonraki başlıkta çalışmamızda kullandığımız hibridizasyon yöntemi olan TaqMan® assay hakkında bilgi verilecektir.

3.3.1. TaqMan® Assay

Hibridizasyon yöntemi; mükemmel eşleşen ve uyumsuz hedef-prob çiftleri arasında ayırım yapmak için çift sarmallı DNA'nın termal stabilitesindeki farklılıkları kullanır. Bu nedenle, hibridizasyonun yalnızca prob ve hedef arasında mükemmel uyumun gerçekleşebileceği koşullar altında analizleri gerçekleştirmek çok önemlidir. Genellikle allel farklılaşmasındaki etkinlik; prob sekansının uzunluğuna, probdaki SNP' nin konumuna ve hibridizasyon koşullarına bağlıdır (93).

TaqMan® genotipleme testi (Applied Biosystems, CA), hibridizasyon ve polimerazın 5' nükleaz aktivitesini floresan tespiti ile birleştirir. Tek bir baz uyuşmazlığına sahip iki allele özgü oligonükleotit probu ve SNP içeren bölgeyi çevreleyen bir çift PCR primeri olmak üzere dört oligonükleotit kullanılır (99). Allele özgü problemler bir uçta floresan bir boya (reporter) ve diğer uçta floresan olmayan bir boya (quencher) taşır. Değişime uğramayan problemler, raporter ve quencher boyalar arasındaki yakınlık nedeniyle floresan ışımaya göstermez. SNP tespiti için, PCR reaksiyonu; 5' eksonükleaz aktivitesine sahip bir polimeraz kullanılarak dört probun

hepsinin varlığında genomik DNA ile gerçekleştirilir. PCR primer uzaması sırasında, enzim yalnızca mükemmel şekilde eşleşen hibridize probu keserek raportör boyayı quencerden kurtarır. Raportör boya, quencher yokluğunda bir floresan sinyali üretirken, eşleşmeyen prob bozulmadan kalır ve floresan göstermez (şekil 8) (100). Sonuç olarak, ilgili problemlerin hibridizasyonuna dayalı reaksiyon sırasında her iki allel de tespit edilebilir. TaqMan®, basit bir çalışma prosedürü ile yalnızca tek bir enzimatik adım gerektirir.



Şekil 8 TaqMan Assay (100).

3.3.2. CD40 tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs)

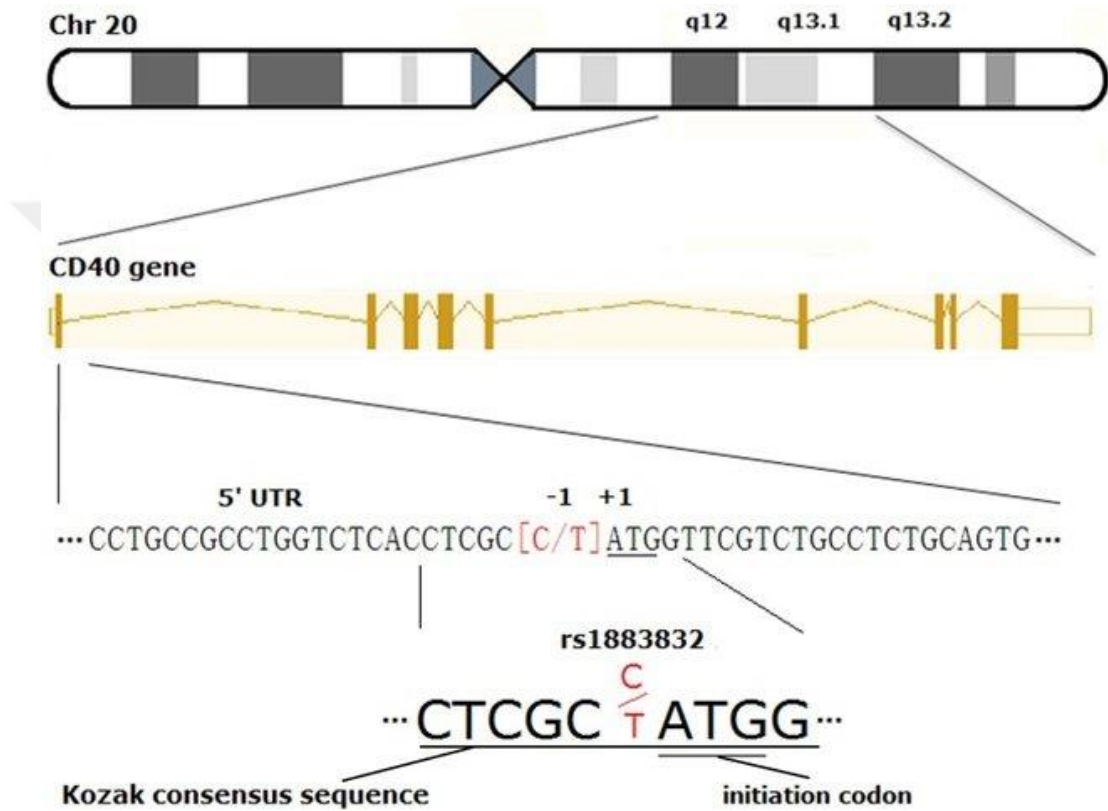
National Library of Medicine verilerine göre; insanlardaki CD40 genine ait 4998 adet SNP rapor edilmiştir. Bu veritabanının verilerine göre bu SNP'lerden 4 tanesi patojenik, 29 tanesi bening (iyi huylu) ve 14 tanesi de muhtemel bening olduğu bildirilmektedir. Geriye kalan SNP'lerin klinik önemi bilinmemektedir (101).

CD40 geninin kodlamayan bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ile otoimmün hastalık riski arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Ayrıca, bazı SNP'ler için bu ilişkinin altında yatan olası moleküler mekanizmalar önerilmiştir (102).

Çalışmamızda CD40 genine ait iki SNP değerlendirilmiştir. Bunlar rs1883832 ve rs4810485 tek nükleotid polimorfizmleridir.

3.3.2.1.rs1883832 tek nükleotid polimorfizmi

rs1883832 SNP' i CD40 geninin kozak konsensüs sekansı olarakta adlandırılan fonksiyonel bölgesinde yer alır (şekil 9) (103).

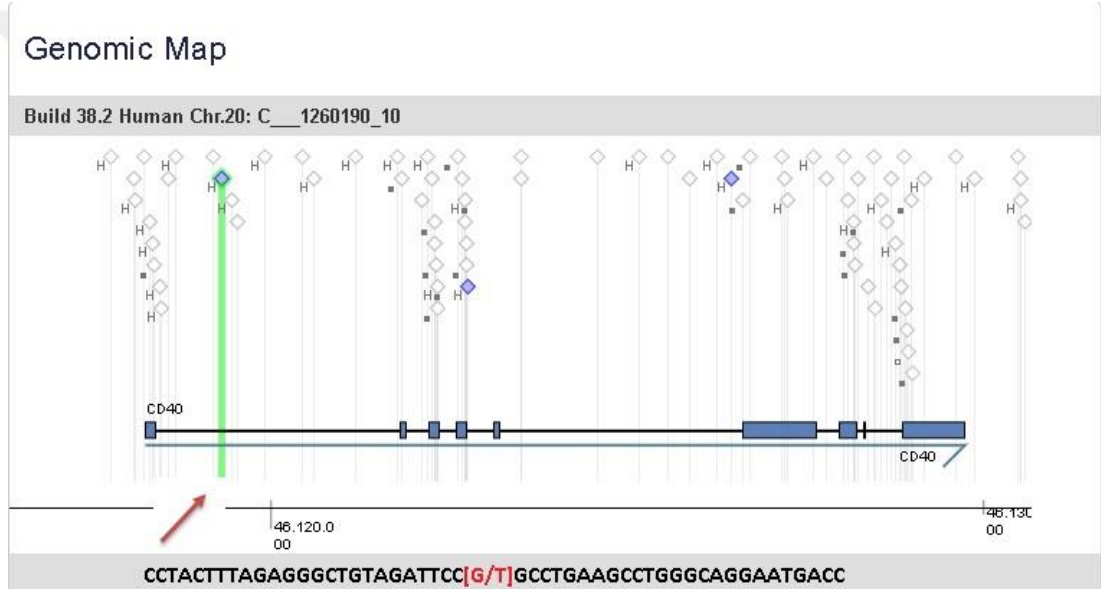


Şekil 9 rs1883832 SNP (103).

rs1883832 de meydana gelen C>T tek nükleotid mutasyonunun CD40 geninin Kozak bölgesinde yer alan promotörlerinin translasyon etkinliğini büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir. Bu polimorfizm CC, CT ve TT genotiplerini içerir (104). Birçok çalışmada CD40 gen promotörü -1' deki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP' ler) Graves hastalığı, Akut Koroner Sendrom (ACS), Dev hücreli arterit (GCA), Meme kanseri gibi çok sayıda immüno-inflamatuvar hastalık ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (105-108).

3.3.2.2.rs4810485 tek nükleotid polimorfizmi

rs4810485 polimorfizmi CD40 geninin ilk intronunda bulunur (şekil 10). Bu tek nükleotid polimorfizminin çoklu otoimmün hastalık riski ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (102). rs4810485 de meydana gelen G>T tek nükleotid mutasyonunun periferik kan hücrelerinde CD40 mRNA düzeylerinin yüksek olmasına ve B lenfositlerinde CD40 ekspresyonunun artmasına sebep olduğu bildirilmektedir (109,110). Bu polimorfizm GG, GT ve TT genotiplerini içerir. Yapılan bir çalışmada Sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında az sayıda hastanın T alleleline sahip olduğu ve bu hastalarda CD40 ekspresyon oranının azaldığı rapor edilmiştir (110).



Şekil 10 rs4810485 SNP (111).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hasta ve kontrol grupları

Hasta Grubu; Dicle Üniversitesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından FMF hastalığı şüphesiyle refere edilen 0-18 yaş aralığında kız ve erkek olmak üzere 100 hasta bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu ise herhangi bir hastalığı olmayan 0-18 yaş aralığında kız ve erkek olmak üzere 100 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Her iki gruptan da aydınlatılmış (bilgilendirilmiş) onamları ile kan örnekleri alınmıştır.

4.1.2. Kan örnekleri

Çalışma grubuna dahil edilen hastalardan 12 saat açlık sonrası etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alınan en az 200 µl olacak şekilde kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20 °C’de tutuldu. Hemoliz olan serum örnekleri çalışmaya dahil edilmedi.

4.1.3. Kullanılan kitler ve cihazlar

a. DNA İzolasyon kiti-EZ1 Advanced DNA Blood Kiti (Qiagen)

- Reaktif Kartuşu, Kan 200 µl
- Tek Kullanımlık Uç Tutucular
- Tek Kullanımlık Filtre Uçları
- Numune Tüpleri (2 ml)
- Elüsyon Tüpleri (1.5 ml)
- Q-Card

Q-Card üzerindeki barkodda kodlanmış bilgiler, EZ1 Advanced cihazı tarafından kullanılarak reaktif veri takibi için gereklidir.

b. FMF Pyrosequencing kiti (Qiagen)

- Sekans primeri FMF-1 120 µl (FMF sekans primer içerikleri Metod bölümünde anlatılacaktır)
- Sekans primeri FMF-2 120 µl
- Sekans primeri FMF-3 120 µl
- Sekans primeri FMF-4 120 µl
- Sekans primeri FMF-5 120 µl
- Sekans primeri FMF-6 120 µl
- Sekans primeri FMF-7 120 µl
- Sekans primeri FMF-8 120 µl
- PyroMark Q24 Plate (100)
- PyroMark Q24 Kartuş (3)
- Pyromark Q24 Vakum Hazırlama Olukları (12)
- PyroMark Gold Q24 Reaktifleri
- PyroMark Bağlama Tamponu (200 ml)
- PyroMark Denatürasyon Solüsyonu (500 ml)
- PyroMark Yıkama Tamponu, konsantre (200 ml)
- PyroMark Annealing Tamponu (250 ml)
- PyroMark Vakum Hazırlama Filtre Probu (100)
- Streptavidin Sepharose Yüksek Performans (GE Healthcare)
- 96' lık PCR plate / 0,2 ml 8' li strip
- Absolut Etanol
- Filtresiz pipet ucu (200 µl-1000 µl)

c. TaqMan® genotyping master mix (Applied Biosystems)

- 400 reaksiyonluk TaqMan Genotipleme Master Miksi (10 ml)

d. rs1883832 SNP primerleri (Applied Biosystems)

- 300 reaksiyonluk C__11655919_20 kodlu 40X rs1883832 primeri (187 µl)

e. rs4810485 SNP primerleri (Applied Biosystems)

- 300 reaksiyonluk C__1260190_10 kodlu 40X rs1883832 primeri (187 µl)

f. EZ1 Advanced DNA izolasyon cihazı (Qiagen)

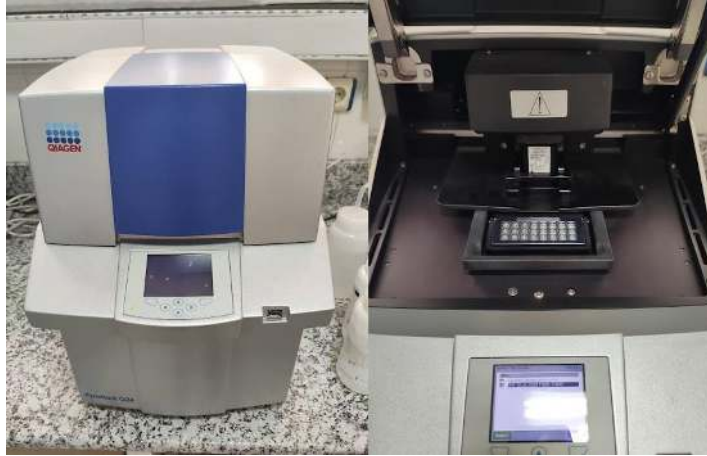
Çalışmamızda Qiagen marka EZ1 Advanced DNA İzolasyon cihazı kullanılmıştır. Her bir çalışmada 6 hasta aynı anda çalışılabilmektedir.



Resim 1 EZ1 Advanced DNA İzolasyon Cihazı.

g. PyroMark Q24 Pyrosequencing cihazı (Qiagen)

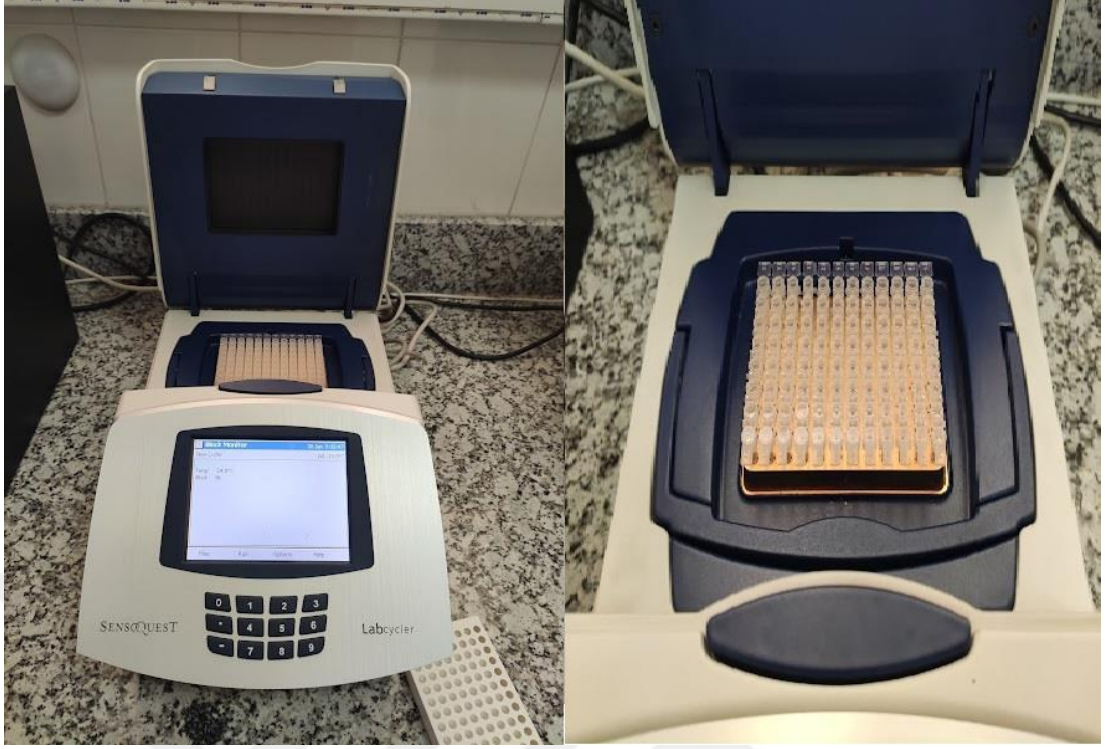
Çalışmamızda Qiagen marka PyroMark Q24 Pyrosequencing cihazı kullanılmıştır. Her bir çalışmada aynı anda 3 hastaya ait 8 ayrı FMF primer sekansı (toplamda 22 ayrı FMF mutasyonu içeren) çalışılabilmektedir.



Resim 2 PyroMark Q24 Pyrosequencing Cihazı.

h. PCR cihazı (SensoQuest labcycler)

Çalışmamızda SensoQuest marka PCR cihazı kullanılmıştır. Her bir çalışmada aynı anda 96 örnek çalışılabilmektedir.



Resim 3 PCR Cihazı.

i. PyroMark Q24 vakum iş istasyonu (Qiagen)

Çalışmamızda Qiagen marka PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu Pyrosekans analizi esnasında kullanılmıştır.



Resim 4 PyroMark Q24 Vakum İş İstasyonu.

j. **Isı Bloğu (Wealtech), T-Shaker (EuroClone), Combi-Spin (BioSan)**
cihazları

Çalışmamızda Isı bloğu, T-shaker ve Spin cihazları Pyrosekans analizi esnasında kullanılmıştır.



Resim 5 Isı Bloğu, T-Shaker, Combi-Spin Cihazları.

k. **Real Time PCR (Qiagen)**

Çalışmamızda Qiagen marka Rotor-Gene Q model Real-Time cihazı TaqMan genotiplleme analizlerinde kullanılmıştır.



Resim 6 Real Time PCR.

l. **PCR kabini (New Bioscience)**

Çalışmamızda DNA izolasyonu, PCR, Pyrosekans ve Real Time PCR çalışmalarının hazırlık aşamalarında kullanılmış olup her çalışma öncesi ve sonrası dezenfektanlar aracılığıyla temizlenmiş ve UV ışığı altında steril edilmiştir.



Resim 7 PCR Kabini.

4.2. Metod

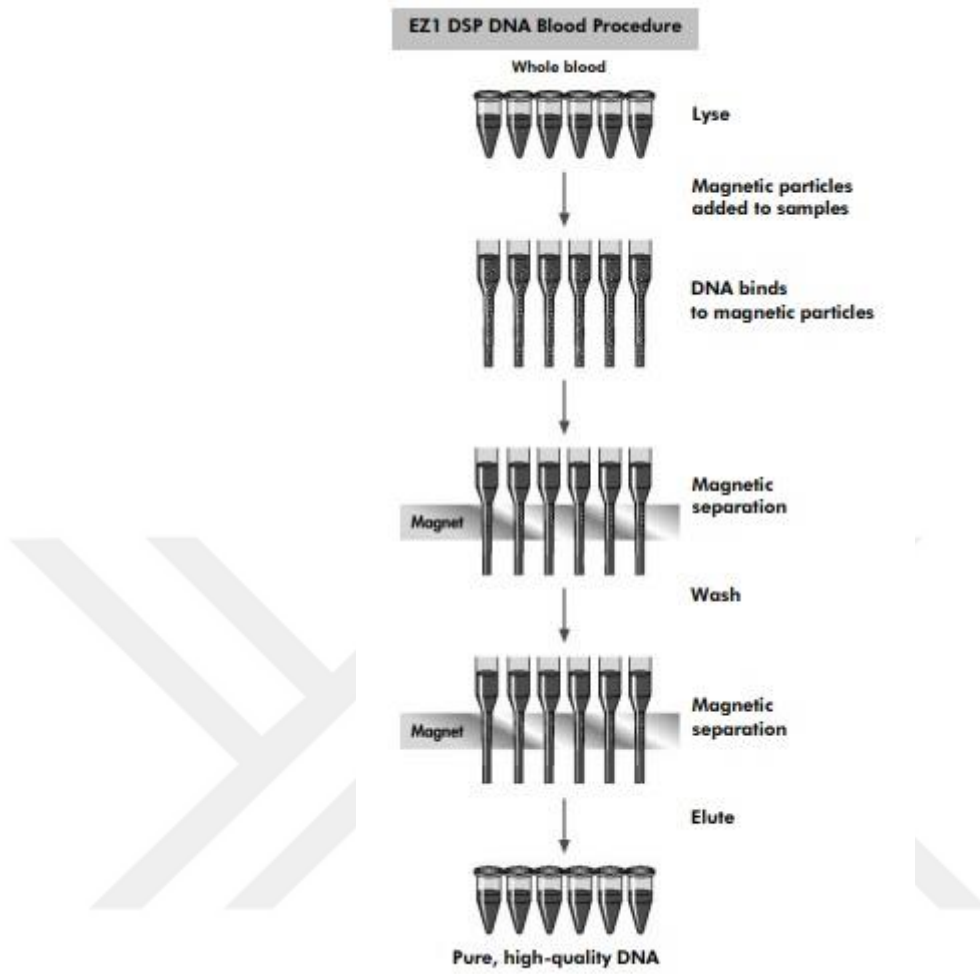
4.2.1. Periferik kandan DNA izolasyon yöntemi

DNA İzolasyon Kiti-EZ1 Advanced DNA Blood Kiti (Qiagen) Manyetik Parçacık Teknolojisini kullanır. Manyetik parçacık teknolojisi, silika bazlı DNA saflaştırmasının hızını ve verimliliğini manyetik parçacıkların uygun şekilde işlenmesiyle birleştirir. DNA, bir kaotropik tuz varlığında parçacıkların silika yüzeyine bağlanmasıyla bir adımda lizatlardan izole edilir. Parçacıklar, bir mıknatıs kullanılarak lizatlardan ayrılır. DNA daha sonra verimli bir şekilde yıkanır ve elüsyon tamponunda ayrıştırılır. Bu yöntemin şematik bir gösterimi şekil 11’ de gösterilmiştir (112).

Cihaz üzerinde 4 bölge bulunmaktadır. İlk olarak 1 numaralı kısma DNA’ ları alması için EZ1 sarflarından çıkan 1,5 ml’ lik elüsyon tüpleri bırakılır. 2 numaralı kısma pipet ucu taşıyıcı ve pipetler bırakılır. 3 numara boş bırakılır ve son olarak 4 numaralı kısma 200 µl çalışılacak numunemiz (edtalı kan) eklenmiş 2 ml’ lik tüplerden bırakılır. EZ1 izolasyon kitinin kutusundan 6 adet kartuş çıkmaktadır. Kartuşları yerleştirmeden önce içindeki sıvı alt üst edilir ve sonra yerlerine yerleştirdikten sonra cihaza yerleştirilir. Cihazın kapağı kapatılarak cihaz ayarları yapılır.

Cihaz ayarlarını yaparken aşağıdaki sıralama takip edildi:

Start Run→ EZ1 Advanced DNA Blood versiyon 1.0→Create Report→No→Örnek volümü 200 µl →Elüsyon volümü 100 µl→ Pure ethanol was-No



Şekil 11 DNA İzolasyon Prosedürü (112).

4.2.2. FMF Pyrosekans analizi

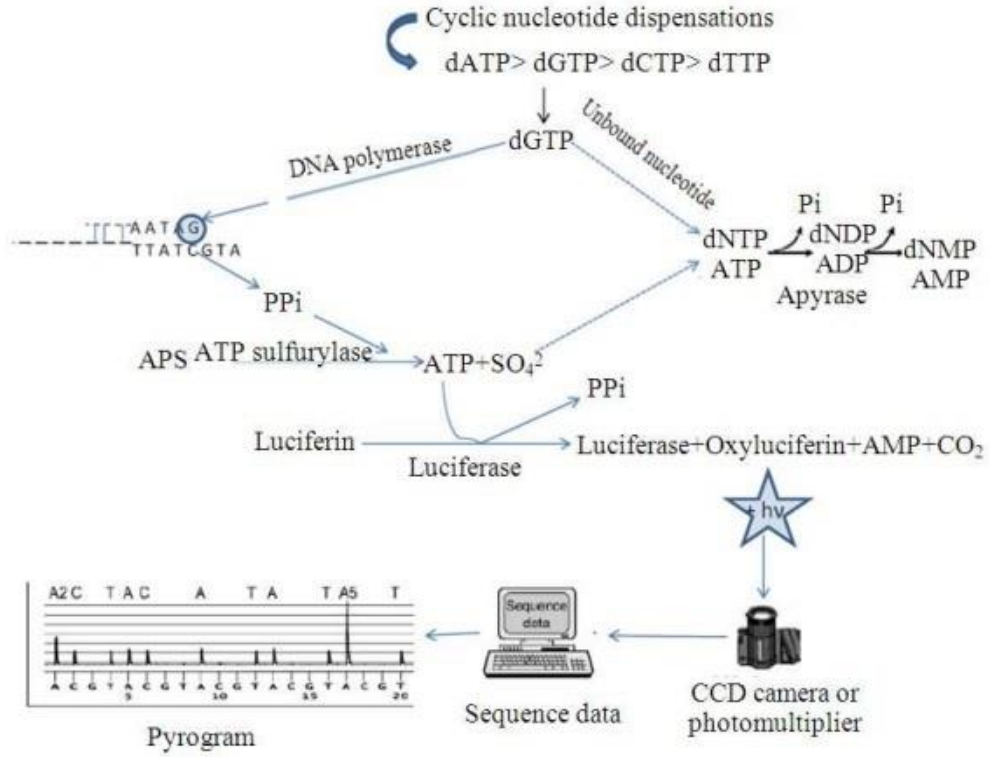
Pyrosekans teknolojisi, de novo DNA dizilimi için geleneksel yöntem olan Sanger dizileme yöntemine alternatif olarak Royal Institute of Technology (KTH) tarafından geliştirilen yeni bir DNA dizileme teknolojisidir. Bu yöntem, DNA polimeraz tarafından kalıp primere yeni nükleotid eklenmesi sırasında ortaya çıkan pirofosfatın luminometrik olarak saptanmasına dayanır. Pyrosekans 100 baza kadar olan DNA parçasının dizilemesi için uygun olup birçok avantaj sunmaktadır (113). Bu teknik nükleik asitlerin ayrıntılı karakterizasyonu için yaygın olarak uygulanabilen alternatif bir yaklaşımdır. Pyrosekans doğruluk, esneklik, paralel işleme gibi potansiyel avantajlara sahiptir ve kolayca otomatikleştirilebilen bir yöntemdir. Ayrıca

etiketli primerler, etiketli nükleotidler ve jel elektroforezine olan ihtiyacı ortadan kaldıran bir tekniktir (114).

Pyrosequencing tekniği; DNA sentezi sırasında salınan pirofosfatın (PPi) saptanmasına dayanır (114). Sekans primeri ile hibridize olmuş biyotin etiketli tek iplikli DNA; DNA polimeraz, ATP sülfürlaz, lusiferaz ve apiraz enzimleri ve adenosin 5' fosfosülfat (APS) ve lusiferin substratları içeren kimyasallar ile karıştırılır. Dört deoksinnükleotit trifosfat (dNTP' ler) reaksiyon karışımına ayrı ayrı olarak tekrarlayan şekilde ilave edilir. İlk reaksiyon DNA polimeraz tarafından bir nükleotidin eklenmesi esnasında inorganik PPi' nin salınması ile başlar. PPi salınımından sonra ortamdaki APS varlığında ATP sülfürlaz tarafından ATP üretimi gerçekleşir. ATP varlığında Lusiferin Lusiferaz enzimi tarafından oksilusiferine dönüştürülür. Bu reaksiyon esnasında ATP miktarıyla orantılı miktarlarda görünür bir ışıma meydana gelmektedir. Maksimum 560 nm (nanometer) dalga boyuna ulaşabilen bu ışık Charge Coupled Device (CCD) kamera veya photomultiplier gibi foton algılama cihazları aracılığıyla algılanır. Ortamda bulunan apiraz enzimi ATP ve diğer dNTP leri degrades eder. Bu işlemin gerçekleştirilmesi için her bir nükleotid eklenme aralığı 65 saniyedir. Nükleotidlerin eklenme sırası bilindiğinden ışıma yapan nükleotidin hangisi olduğu tespit edilebilmektedir. Üretilen ışık, pirogramda bir tepe sinyali olarak gözlenir. Bu tepe sinyalleri incelenerek istenilen bölgenin dizilimi elde edilmiş olunur (115). Pyrosekansın şematik bir gösterimi şekil 12' de gösterilmektedir.

FMF Pyrosekans Testi ile E148Q, P369S, H478Y, F479L, S675N, G678E, M680I (G>C), M680I (G>A), M680L, T681I, I692del, M694V, M694I, M694L, K695R, K695M, R717S, I720M, V722M, V726A, A744S, ve R761H mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmektedir. Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı tablo 6' da gösterilmiştir. FMF Pyrosekans Kiti' nin içeriği ve kullanım talimatları; kit ve cihaz üretici firma tarafından temin edilmiştir (117,118)

FMF Pyrosekans Testi ile örnek başına bir 8' li PCR stripi kullanılarak PCR yapılır. PCR reaksiyonundan sonra örnek başına sekiz pyrosekans reaksiyonu uygulanır.



Şekil 12 Pyrosekans Prensibi (116).

Tablo 6 Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı.

Mutasyon	Değişim	Siniflandırma	Ekzon	Mutasyon	Değişim	Siniflandırma	Ekzon
E148Q	p.(Glu148Gln)	VUS	2	M694V	p.(Met694Val)	Pathogenic	10
P369S	p.(Pro369Ser)	VUS	3	M694I	p.(Met694Ile)	Pathogenic	10
H478Y	p.(His478Tyr)	VUS	5	M694L	p.(Met694Leu)	Likely Pathogenic	10
F479L	p.(Phe479Leu)	Likely Pathogenic	5	K695R	p.(Lys695Arg)	Likely Pathogenic	10
S675N	p.(Ser675Asn)	Likely benign	10	K695M	p.(Lys695Met)	VUS	10
G678E	p.(Gly678Glu)	VUS	10	R717S	p.(Arg717Ser)	VUS	10
M680I (G>C)	p.(Met680Ile)	Pathogenic	10	I720M	p.(Ile720Met)	VUS	10
M680I (G>A)	p.(Met680Ile)	Pathogenic	10	V722M	p.(Val722Met)	VUS	10
M680L	p.(Met680Leu)	Likely Pathogenic	10	V726A	p.(Val726Ala)	Pathogenic	10
T681I	p.(Thr681Ile)	VUS	10	A744S	p.(Ala744Ser)	Pathogenic	10
I692del	p.(Ile692del)	Likely Pathogenic	10	R761H	p.(Arg761His)	Likely pathogenic	10

4.2.2.1.PCR aşaması

PCR ile MEFV geni ekzon 2, 3, 5 ve 10 bölgelerinin amplifikasyonu sağlanır. PCR reaksiyonu için örnek DNA' sı hariç tüm bileşenler 8' li PCR striplerine koyularak kullanıma hazır hale getirilir. Her bir tüpe örnek DNA' sı eklenerek reaksiyon hemen başlatılabilir. PCR işlemleri aşağıdaki gibi yapılır:

- Soğuk zincirde (-20°C) gelen 8' li strip halinde bulunan malzemenin çözünmesi beklenir. 8' li strip içerisinde bakmak istediğimiz mutasyonlar bulunmaktadır. Çözülen malzemeler +4 °C soğutulmuş blok üzerine konarak işlemlere devam edilir.
- Her bir sribin üzerine 1, 2, 3 gibi numaralar verilir. Çalışacağımız hasta veya kontrol grubuna ait DNA' lar da bu sıraya göre dizilir.
- İzole ettiğimiz DNA' lar önce vortekslenir ve birkaç saniye spin attırılır. Daha sonra her bir stripin başlangıç noktası belirlenir. İşlemler bu başlangıç noktasına göre yapılır. Her bir stripin içerisine 5 µl izole DNA örneklerinden bırakılır. 1. Hasta için 1. Stribin her bir kuyusuna 5 µl DNA eklenir. Stripler açıldığında ters çevrilip yine soğuk blok üzerine bırakılır. Toplamda her bir hasta için 40 µl DNA' ya ihtiyacımız vardır.
- Spin kolonunun strip için gelen parçası takılıp örnekler spine yerleştirilir ve birkaç saniye spin attırılır.
- Hazırladığımız PCR protokolüne göre stripler PCR cihazına yerleştirilir. Kullandığımız PCR protokolü tablo 7' de verilmiştir.
- Cihaz üzerinde Run / FMF / Start Run işlemleri uygulanır.

Tablo 7 PCR protokolü.

Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denaturation	94°C	30 saniye
Annealing	60°C	30 saniye
Extension	72°C	30 saniye
Döngü sayısı: 45		
Final extension	72°C	10 dakika

4.2.2.2.Pyrosekans aşaması

Pyrosekans analizinde kullanılan yöntem 6 aşama şeklinde gerçekleştirildi.

a. Ön hazırlık aşaması:

- FMF Pyrosekans testi ilk defa kullanılıyorsa kit üretici firma tarafından sağlanan temel veriler aracılığı ile Pyrosekans cihazına ait yazılım programında assay dosyaları hazırlanır.
- Pyrosekans cihazının içerisinde bulunan “Kartuş” ultra saf su ile bir kere yıkanır. Kartuşun üst kısmından ultra saf su ekleyip üstten parmağımızla bastırdığımızda alttaki iğnelerden su çıkıp çıkmadığına bakılır. Kartuşun alt kısmına dokunulmamalıdır. Sonra kurumaya bırakılır. Ortalama bir kartuş ile 6 aydan fazla bir süre işlem yapılabilir.
- Filter prob el ünitesi ile birlikte ultra saf su içeren kaba daldırıldıktan sonra vakum pompasının ve ünitenin vakum anahtarı açılır. Bu şekilde kaptaki 70 ml su çektilerilerek ünite yıkanır.
- 96’ lık Costar plate 3 sıra halinde makasla kesilip hazırlanır. 24’ lük hale getirilir. El ünitesinin çekip çekmediğini görmek için kesmiş olduğumuz costar plate ultra saf su ile doldurulur ve el ünitesi ile çektilir.
- Bir falcon tüpüne 35 ml saf alkol, 15 ml ultra saf su konularak %70’ lik alkol kullanıma hazır hale getirilir.
- Bir cam şişeye 50 ml wash buffer, 450 ml ultra saf su konularak Wash Buffer kullanıma hazır hale getirilir.
- Isı bloğu 80°C’ ye ayarlanır ve üzerine plate holder yerleştirilir. Süresi 10 dk. gibi bir zamana ayarlanır. Çalışmamız üzerinde 2 dk kalacak ve bir kronometre yardımıyla bu sürenin geçilmemesi gerekmektedir.
- Kit içeriğinde (Gold Reagent Q 24 Reaktif); Adenin, Guanin, Sitozin, Timin nükleotidleri, Enzim ve Substrat bulunmaktadır. Enzim ve subtrat liyofilizedir ve 620 µl ultra pure saf su eklenip 122 µl şeklinde küçük ependorf tüplere bırakılıp porsiyonlanır. Bu porsiyonladığımız malzemeler aliminyum folyo ile sarılıp -20°C’ ye muhafaza edilir. Yapacağımız her çalışmada 1 enzim 1 substrat çıkarılır ve çok çabuk bir şekilde çözündüğünden çalışmadan 1-2 dk önce çıkarmamız yeterlidir.

- Çalışma öncesinde solüsyonlar, nükleotitler, enzim ve substratı, sekans primerleri ve PCR ürünleri oda sıcaklığına çıkarılır. (Annealing Buffer Binding Buffer, Wash Buffer, Denaturation, Solution, Nükleotidler, Streptavidin, Sekans Primerleri, Enzim ve Substrat)

b. Run dosyası oluşturma

- Pyromark Q24 software araç çubuğundan “New run” ikonuna tıklanır.
- “Instrument Method” olarak kartuş ile uyumlu olanı seçilir.
- Plate ID, Barcode, Reagent ID ve Run Note opsiyoneldir. İstedığınız takdirde girilebilir.
- Plate setup kısmında Q24 plate’ in şeması yer almaktadır. Çalışılmak istenilen assayler sol yandaki “Example Files” kısmından kopyalanıp plate üzerine yapıştırılır veya assay üzerine tıklanıp çekilir ve getirip plate üzerine bırakılarak yerleştirilir. Plate kutucukları üzerindeki ilk satırda assay ismi belirecektir.
- Plate kutucukları üzerindeki ikinci ve üçüncü satırlara örnek numarası ve not yazılabilir. Hazırlanmış bir plate setup örneği Şekil 13’ te görülebilir.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FMF-1	FMF-2	FMF-3	FMF-4	FMF-5	FMF-6	FMF-7	FMF-8
B	Assay							
C	Hasta Adı							
	Not							

Şekil 13 Plate Setup Örneği.

- Plate setup hazırlandıktan sonra Q24 software araç çubuğunda “Tools” kısmına tıklanıp “Pre-Run Information” seçilir. Açılan sayfa, enzim, substrat, nükleotit miktarları ve plate setup’ ınızı gösterir. Buradan çalışmaznıza yönelik işlemleri kontrol edebilirsiniz.
- Hazırlanmış run dosyası bilgisayarda uygun bir yere (mesela Run Dosyaları adlı bir klasöre) kaydedilir. Daha sonra run dosyası Q24 cihazında kullanılmak üzere bir USB’ye aktarılır.

c. PCR ürünlerinin Streptavidin Sepharose bilyelerine immobilizasyonu

- Streptavidin Sepharose bilyelerini içeren şişeyi nazik bir şekilde çalkalayarak homojen bir solüsyon elde edilir.
- Tablo 8’ de gösterildiği şekilde bir master mix hazırlanır. Master mix miktarı toplam reaksiyon sayısı için gereken miktardan yaklaşık %10 daha fazla olmalıdır.

Tablo 8 Master Mix Hazırlığı.

Bileşen	Miktar/örnek	25 örnek için
Streptavidin Sepharose bilyeler	2 µl	2 x 25 = 50 µl
Binding Buffer	40 µl	40 x 25 = 1000 µl
Ultra saf su	28 µl	28 x 25 = 700 µl
Toplam	70µl	1750

- 24 kuyucuklu Costar plate’ in her bir kuyucuğuna 70 µl master mix konulur.
- Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürünü eklenir.
- Bu düzende her bir 8’ li sıra bir hastaya ayrılmıştır ve bu sıra PCR stripi ile aynı sıradadır.
- Costar plate’ in üzeri seal veya bir parafilm ile kaplanır.
- Shaker’ a konularak (en az 10 dk) işlem sırası gelene kadar Shaker’da karışması sağlanır.

d. Pyrosekans için örnek hazırlama

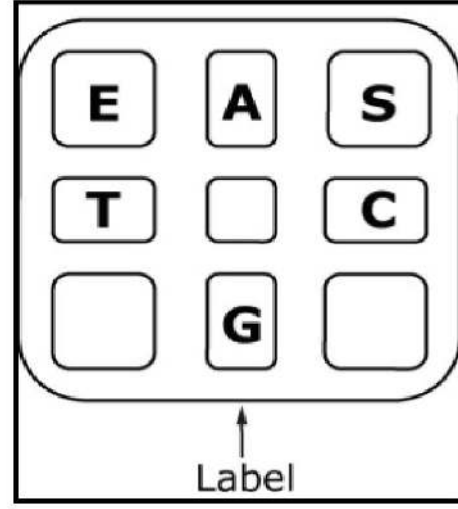
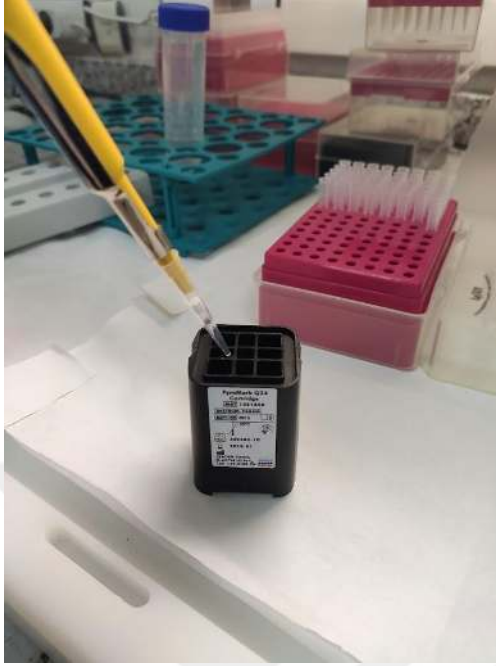
- Öncelikle Vakum istasyonunun hazırlığı yapılır. Burada yapılan işlemler:
 - o H₂O-2’ye ultra saf su koyulur,
 - o H₂O-1’e ultra saf su koyulur,
 - o Denaturasyon solüsyon şişesi alt üst yapılır, ilgili küveze yarım çizgisinin biraz altına gelecek şekilde doldurulur,
 - o Hazırladığımız Wash Buffer’ı ilgili küveze yarım çizgisinin üstüne gelecek şekilde doldurulur,
 - o Alkol en son aşamada konulacaktır.
- Q24 Plate’ in her bir kuyucuğuna run dosyasında hazırlandığı şekilde 2,5 µl sekans primeri ve 22,5 µl annealing buffer konulur. Toplamda 3 hasta olacak şekilde her bir hasta için aşağıdaki şekilde hazırlık gerçekleştirilir:

- 1.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 1. Sekans primeri 7,5 µl
 - 2.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 2. Sekans primeri 7,5 µl
 - 3.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 3. Sekans primeri 7,5 µl
 - 4.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 4. Sekans primeri 7,5 µl
 - 5.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 5. Sekans primeri 7,5 µl
 - 6.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 6. Sekans primeri 7,5 µl
 - 7.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 7. Sekans primeri 7,5 µl
 - 8.tüp Anneling buffer 67,5 µl ve 8. Sekans primeri 7,5 µl
- PCR plate veya stripleri ve Q24 plate' in aynı oriyantasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilir.
 - El ünitesi park pozisyonundayken vakumu açılır.
 - Shaker' dan Costar plate alınır, sol tarafa yerleştirilir. El ünitesi ile hızlıca yaklaşık 15 saniye çektilir.
 - El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilir.
 - El ünitesini "Denaturation Solution" içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletilir.
 - El ünitesini "Washing Buffer" içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilir ve el ünitesi havaya kaldırılıp, ters çevirilerek 3 sn beklenir.
 - El ünitesi probları Q24 plate kuyucuklarına daldırılıp 15 saniye hafifçe sallayarak bilyeler sekans primerini içeren buffera bırakılır.
 - El ünitesi su içeren kaba daldırılarak 10 saniye çalkalanır.
 - El ünitesi su içeren diğer kaba daldırılarak vakum pompası ve ünitenin vakum anahtarı açılır. Bu şekilde kaptaki 70 ml su çektilir.
 - Q24 plate önceden 80°C' ye getirilmiş plate holder üzerine koyularak 80°C'de 2 dakika tutulur.
 - Q24 plate 80°C' den alınmış plate holder ile birlikte oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.

e. Pyromark Q24'ün çalıştırılması

- Öncelikle Kartuşun iyice kurulandığından emin olunur. Daha sonra kullanılacak malzemeler iyice vorteks ve spin yapılır. Pre-Run information report' da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve susbtrat kartuşa koyulur.

- Kartuş üzerinde hangi malzemenin hangi kuyucuğa bırakılacağı resim 8 ve şekil 14’ te gösterilmiştir.



E: Enzim S: Substrat
A: dATPs T: dTTPs G: dGTPs C: dCTPs

Resim 8 Kartuş.

Şekil 14 Kartuş Kuyucuk Alanları.

- Kartuş cihaz yuvasına yerleştirilir ve emniyet tutacağı kapatılır.
- Plate tutacağı açılır, Q24 plate bloğa yerleştirilip plate tutacağı tekrar kapatılır.
- Run dosyasını içeren USB cihazın üstündeki USB girişine takılır. Menüden ok tuşları yardımıyla “Run” komutu seçilir ve “OK” komutu uygulanır. Ok tuşları yardımıyla run dosyası seçilir ve “Select” e basılır.
- Run işlemi yaklaşık 45 dakika sürecektir. Run bittikten sonra ve cihazda run dosyasının USB’ ye kaydedildiğini doğruladıktan sonra “Close” a basılır.
- USB çıkarılır ve Pyromark Q24 software yüklü pc üzerinde analiz edilir.
- İşlemler sonrası vakum istasyonu temizlenir ve sekans işlemi biter bitmez kartuş çıkarılır ve 4 kez yıkanır.

f. Sonuçların analizi

- Pyromark Q24’te çalışılmış run dosyasını içeren USB bilgisayara takılır. USB içerisindeki run dosyası bilgisayarda uygun bir yere kopyalanır. Dosya çift tıklanarak veya Pyromark Q24 software üzerinde “File” menüsünden “Open” seçilerek run dosyası açılır. Run dosyasını analiz etmek için sağ üst köşedeki “Analyze” bölümünden “Analyze all wells” veya “Analyze selected wells”

butonu tıklanır. Analiz raporu oluşturmak için software menüsünden “Reports” bölümünden “SNP Full Report” seçilir.

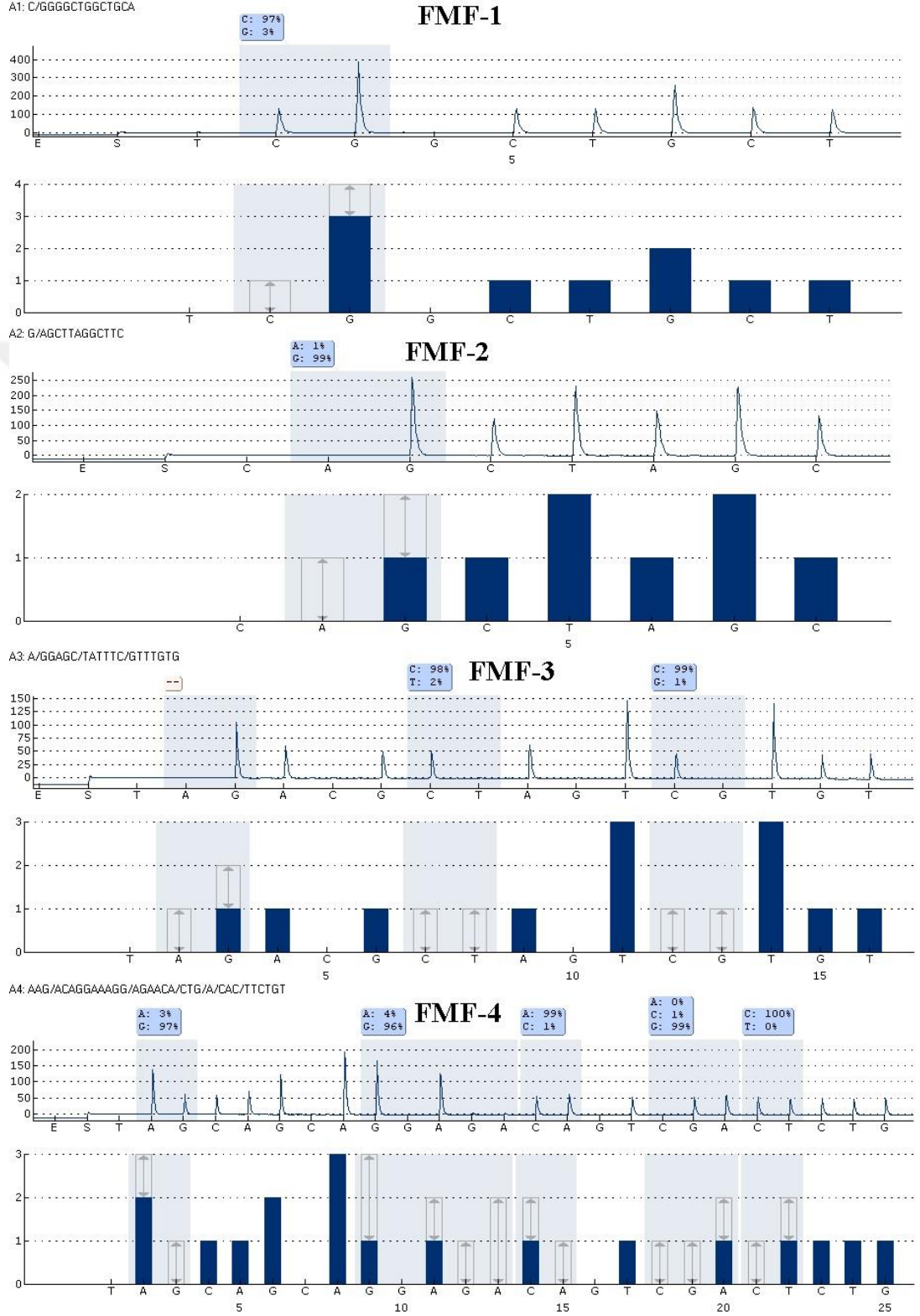
- Okunan dizilimler tablo 9’ da verilmiş olan şablonla karşılaştırılarak mutasyonlar saptanır.

Tablo 9 FMF Analiz Şablonu.

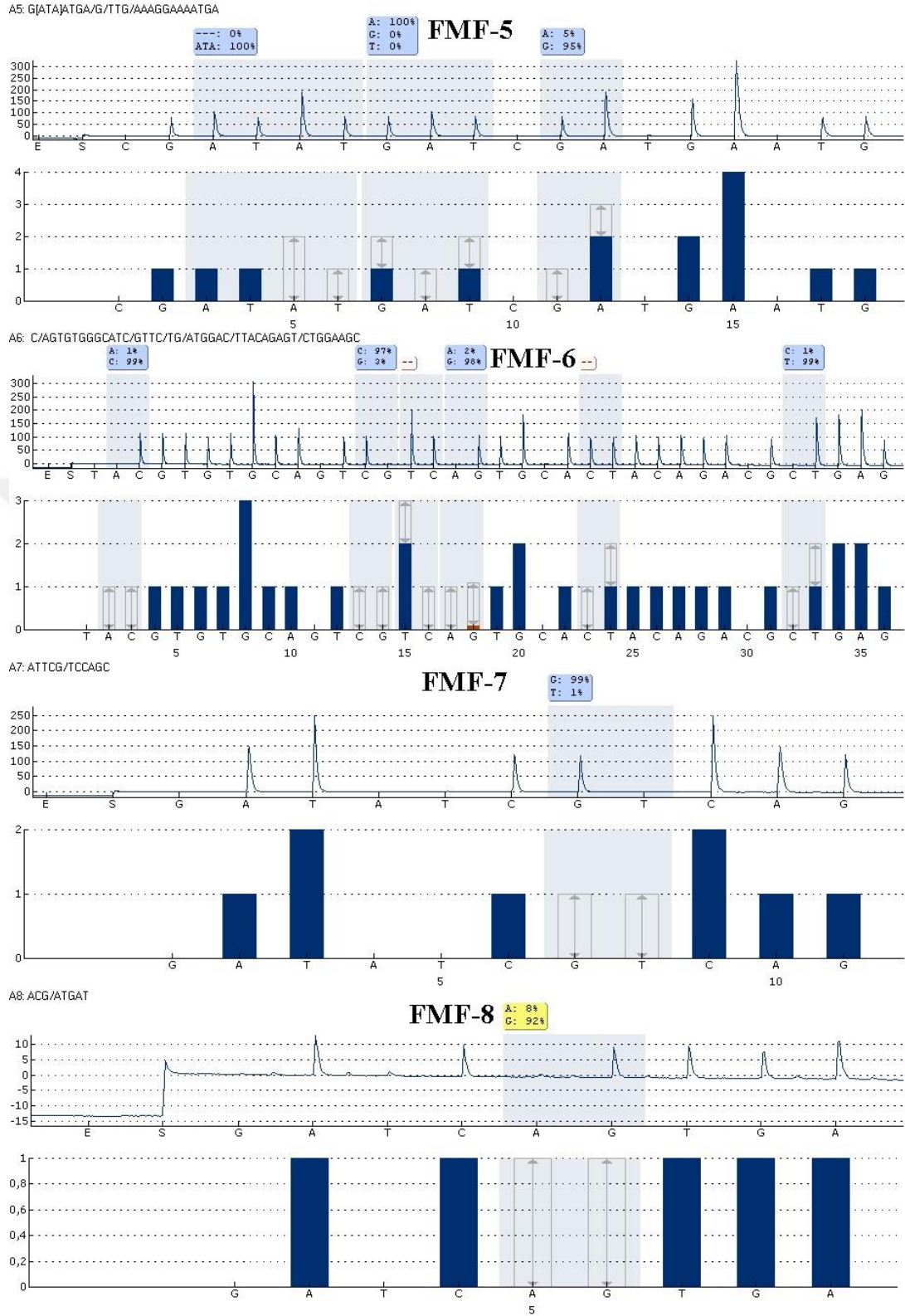
Assay	Ekzon		Dizilim
FMF-1	2	wt <i>Örnek</i> E148Q	C GGG CTG GCT G G GGG CTG GCT G
FMF-2	3	wt <i>Örnek</i> P369S	G GCT TAG GCT A GCT TAG GCT
FMF-3	5	wt <i>Örnek</i> H478Y F479L	A/G GAG CAT TTC TTT GTG A/G GAG TAT TTC TTT GTG A/G GAG CAT TTC TTT GTG
FMF-4	10	wt <i>Örnek</i> S675N G678E M680L M680I(G>A) M680I(G>C) T681I	A AGC AGG AAA GGG AAC ATG ACT CTG T A AAC AGG AAA GGG AAC ATG ACT CTG T A AGC AGG AAA GAG AAC ATG ACT CTG T A AGC AGG AAA GGG AAC CTG ACT CTG T A AGC AGG AAA GGG AAC ATA ACT CTG T A AGC AGG AAA GGG AAC ATC ACT CTG T A AGC AGG AAA GGG AAC ATG ATT CTG T
FMF-5	10	wt <i>Örnek</i> I692del M694V M694L M694I <i>Örnek</i> K695R K695M	G ATA ATG ATG AAG GAA AAT GA G --- ATG ATG AAG GAA AAT GA G ATA ATG GTG AAG GAA AAT GA G ATA ATG TTG AAG GAA AAT GA G ATA ATG ATA AAG GAA AAT GA G ATA ATG ATG AGG GAA AAT GA G ATA ATG ATG ATG GAA AAT GA
FMF-6	10	wt <i>Örnek</i> R717S I720M V722M V726A	CGT GTG GGC ATC TTC/T GTG GAC/T TAC AGA GTT GGA AGC AGT GTG GGC ATC TTC/T GTG GAC/T TAC AGA GTT GGA AGC CGT GTG GGC ATC TTC/T GTG GAC/T TAC AGA GTT GGA AGC CGT GTG GGC ATC TTC/T ATG GAC/T TAC AGA GTT GGA AGC CGT GTG GGC ATC TTC/T GTG GAC/T TAC AGA GCT GGA AGC
FMF-7	10	wt <i>Örnek</i> A744S	A TTC GCC AGC A TTC TCC AGC
FMF-8	10	wt <i>Örnek</i> R761H	A CGT GAT A CAT GAT

g. Analiz örnekleri

Bu bölümde analiz sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi için bazı örnek çalışmalar verilmiştir.



Şekil 15 Analiz örneği.



Şekil 15 Analiz örneği (Devamı).

Şekil 15’ te FMF çalışmasına örnek verilmiştir. Cihazın sekans analizi sonucu kalıp dizilim ile karşılaştırma yapıldıktan sonra analiz şablonu (tablo 9) ile karşılaştırma yapılır. Analiz şablonu ile yapılan karşılaştırma sonrası analiz yapılan bireye ait FMF yaygın mutasyon değerlendirilmesi yapılmıştır.

FMF 5’ teki K695R ve K695M mutasyonlarının analizi için kontrol sekansı G[ATA]ATGA/G/TTG AA/G/TGGAAAATGA ile değiştirildikten sonra yeniden analiz yapılır.

Analiz yapılırken nükleotid değişimi incelendiğinde; orijinal nükleotid %90-100/%10-0 oranında aynı ise “Normal”, %90-100/%10-0 oranında değişim gerçekleşmişse “Homozigot Mutasyon” meydana gelmiştir. Nükleotid değişimi %45-55/%55-45 oranında ise “Heterozigot Mutasyon” meydana gelmiş demektir.

Çalışma esnasında bazen düşük pik oranları ve yukarıda belirtilen oranlarda sapmalar meydana gelebilmektedir. Bu tür durumlarda hasta tekrar edilmiştir.

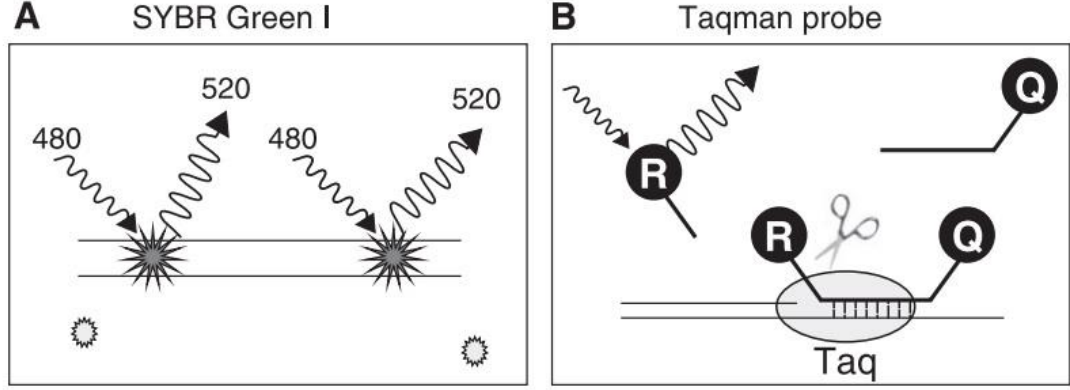
4.2.3. Real Time PCR ile TaqMan genotipleme analizi

Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); 1980’ lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen ve araştırmacıların belirli DNA parçalarını bir milyar kattan fazla amplifiye etmesine olanak tanıyan devrim niteliğindeki PCR yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntem gerçek zamanlı olarak PCR ürünlerinin gözlenmesini sağlamaktadır (119).

Etidiyum Bromid ile DNA’ nın bağlanması sonucu florasan ışık yaydığı 1966 dan beri bilinmekteydi. Bu florasan ışığı videoya kaydeden Higuchi ve arkadaşları Roche laboratuvarlarında ilk real-time PCR gösterimini gerçekleştirmişlerdir (120). 1990’ ların başlarında real-time PCR yaygınlaşmaya başlamış olup ilk ticari ürün 1996 da Applied Biosystems tarafından piyasaya sürülmüştür (121).

Real Time PCR’ ın temel özelliği, DNA amplifikasyonunun ilerlemesinin gerçek zamanlı olarak izlenme yeteneğidir. Bu da belirli kimyasallar ve enstrümanlar ile gerçekleştirilir. Genellikle kimyasal olarak özel floresan problemler kullanılmaktadır. EtBr veya SYBR green I gibi DNA bağlayıcı boyalar, hidroliz problemleri (5'-nükleaz problemleri), hibridizasyon problemleri, moleküler işaretçiler, sunrise ve scorpion primerleri ve peptit nükleik asit (PNA) light-up problemleri dahil olmak üzere çeşitli prob türleri

mevcuttur. Her prob türünün kendine özgü özellikleri vardır ve çalışma prensibi basittir (119). Şekil 16’ da iki farklı prob gösterilmiştir.



Şekil 16 Real-Time PCR Probları (119).

Çalışmamızda TaqMAN probu kullanılarak genotipleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1.TaqMan genotipleme analzi

TaqMan genotipleme analizi, saflaştırılmış genomik DNA numunelerinde spesifik SNP alellerini amplifiye etmek ve saptamak için 5' nükleaz reaksiyonunu kullanır. Her bir assay, belirli bir SNP için alelleri genotiplemenize izin verir. Her TaqMan genotipleme analizi; ilgilenilen diziyi amplifiye etmek için iki primer ve alelleri saptamak için iki TaqMan® MGB probu içerir. Her reaksiyonda iki prob çiftinin varlığı, bir DNA hedef dizisindeki SNP bölgesindeki iki olası varyant alelin genotiplenmesine izin verir. Genotipleme analizi, problarla bağlantılı boyaların floresansındaki değişikliğe dayalı olarak bir SNP' nin varlığını veya yokluğunu belirler. Taqman Genotipleme Analizleri için Taqman MGB probları ve Master mix kullanılmaktadır.

TaqMan® MGB Probları, aşağıdakilere sahip hedefe özel oligonükleotitlerden oluşur:

- Her probun 5' ucunda bir raportör boya:
 - VIC® boyası, Allel 1 probunun 5' ucuna bağlanır.
 - 6FAM™ boyası, Allel 2 probunun 5' ucuna bağlanır.

- A minor groove binder (MGB): Prob uzunluğunu artırmadan erime sıcaklığını (T_m) artıran küçük bir oluk bağlayıcıdır (MGB). Daha kısa problemlerin tasarımına izin verir. Daha kısa problemler, eşleşen ve eşleşmeyen problemler arasında T_m değerlerinde daha büyük farklılıklara neden olarak doğru alelik ayrışmayı sağlar.
- Probun 3' ucunda bir floresan olmayan quencer (NFQ).

Floresan sinyal korelasyonları tablo 10' da gösterilmiştir.

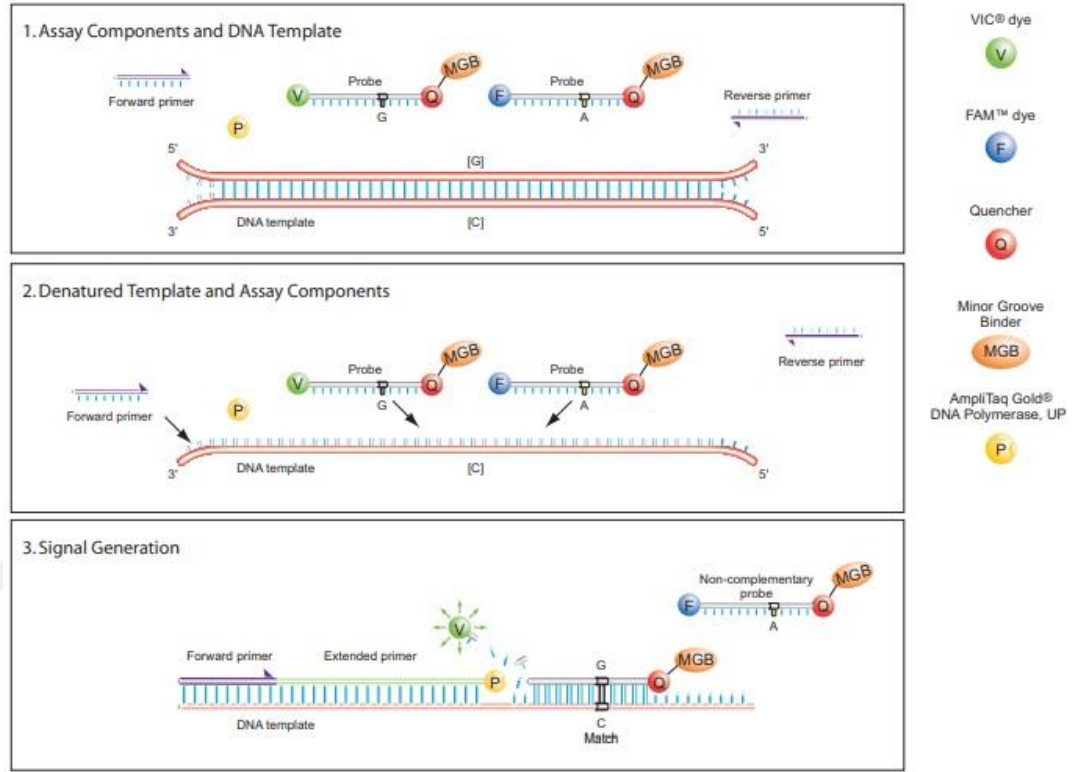
Tablo 10 Floresan sinyal korelasyonları.

Floresan Artışı	Gösterge
Yalnızca VIC boya floresansı	Alel 1 için homozigotluk
Yalnızca 6FAM boya floresansı	Alel 2 için homozigotluk
Her iki boya için floresan sinyalleri	Alel 1-alel 2 için heterozigotluk

TaqMan Genotipleme Master Mixi içerisinde; AmpliTaq Gold® DNA Polimeraz, Ultra Saf (UP) su, Deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTP' ler), ROX™ Pasif Referansı ve Tampon bileşenler (Buffer) bulunmaktadır.

5' Nükleaz reaksiyonun temelleri şu şekildedir:

- TaqMan Genotipleme Master Mix, forward ve reverse primerler ve iki TaqMan MGB Probandan oluşan bir reaksiyon karışımına genomik DNA ilave edilir.
- Her TaqMan MGB Probu, ileri ve geri primer bölgeleri arasında spesifik olarak tamamlayıcı bir diziye bağlanır. Prob sağlam olduğunda, quencer boyanın haberci boyaya yakınlığı haberci floresansını bastırır.
- AmpliTaq Gold DNA Polimeraz sadece hedefe hibridize edilmiş problemleri parçalar. Probun parçalanması sonucu haberci boya quencer boyadan ayrılarak haberci tarafından floresansın artması sağlanır. Şekil 18' de şematik olarak gösterilmiştir.
- Haberci boyanın floresans farklılıkları aracılığıyla genotipleme gerçekleştirilir.



Şekil 17 TaqMan Genotiplleme Analizi Çalışma Prensibi.

Analizler için kullanılan PCR reaksiyon mix miktarları tablo 11’ de gösterilmiştir.

Tablo 11 PCR Reaksiyon Mix Miktarları.

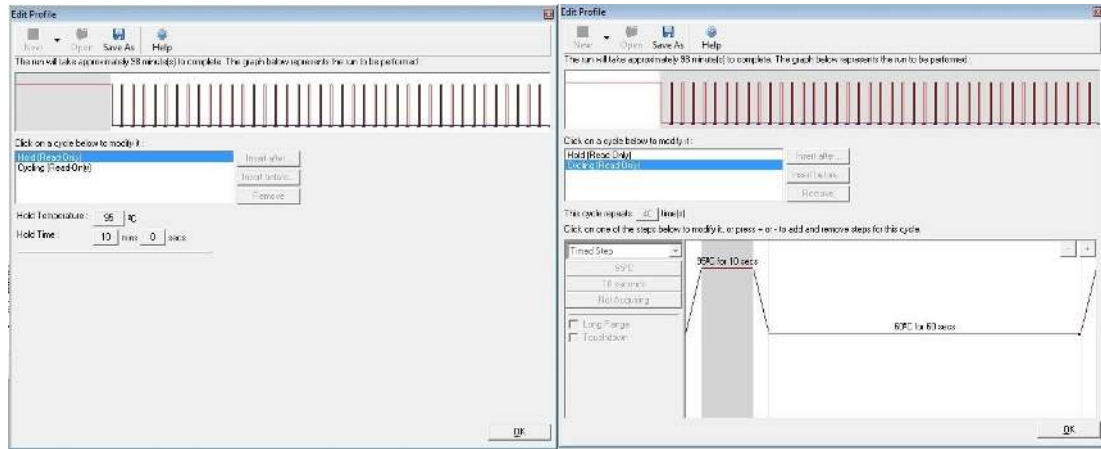
Bileşen	Miktar
TaqMan Genotiplleme Master Mix (2x)	12.5 µl
Taqman Probu (40x)	0.625
Saf Su	9.875
DNA	2
Toplam	25 µl

Analizler için kullanılan PCR reaksiyonu için termal döngü koşulları tablo12’ de gösterilmiştir.

Tablo 12 PCR Termal Döngü Şartları.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
AmpliTaQ Gold Enzim Aktivasyonu	95	10 dk.	1
Denatürasyon	95	10 sn.	40
Primer Bağlanması (Anneiling)	60	1 dk	

Rotor Gene Q (Qiagen) model real-time cihazımızda PCR termal döngü ayarları resim 9’ da görüldüğü şekilde yapılmıştır.



Resim 9 PCR termal Döngü Ayarları.

Analizde kullanılan raportör boyalar cihazda resim 10’ daki idiyogramda görüldüğü gibi Green (Yeşil-FAM) ve Yellow (Sarı-VIC) floresan ışın saptamaktadır.

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ¹ , SYBR Green 1 ¹ , Fluorescein, EvaGreen ¹ , Alexa Fluor 488 ¹
Yellow	530nm	555nm	JOE ¹ , VIC ¹ , HEX, TET ¹ , CAL Fluor Gold 540 ¹ , Yakima Yellow ¹
Orange	585nm	610nm	ROX ¹ , CAL Fluor Red 610 ¹ , Cy3.5 ¹ , Texas Red ¹ , Alexa Fluor 568 ¹
Red	625nm	660nm	Cy5 ¹ , Quasar 670 ¹ , Alexa Fluor 633 ¹
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ¹ , Alexa Fluor 680 ¹
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ¹ , EvaGreen ¹

Resim 10 Raportör Boya İdiyogramı

4.2.3.2. TaqMan genotipleme analiz verileri

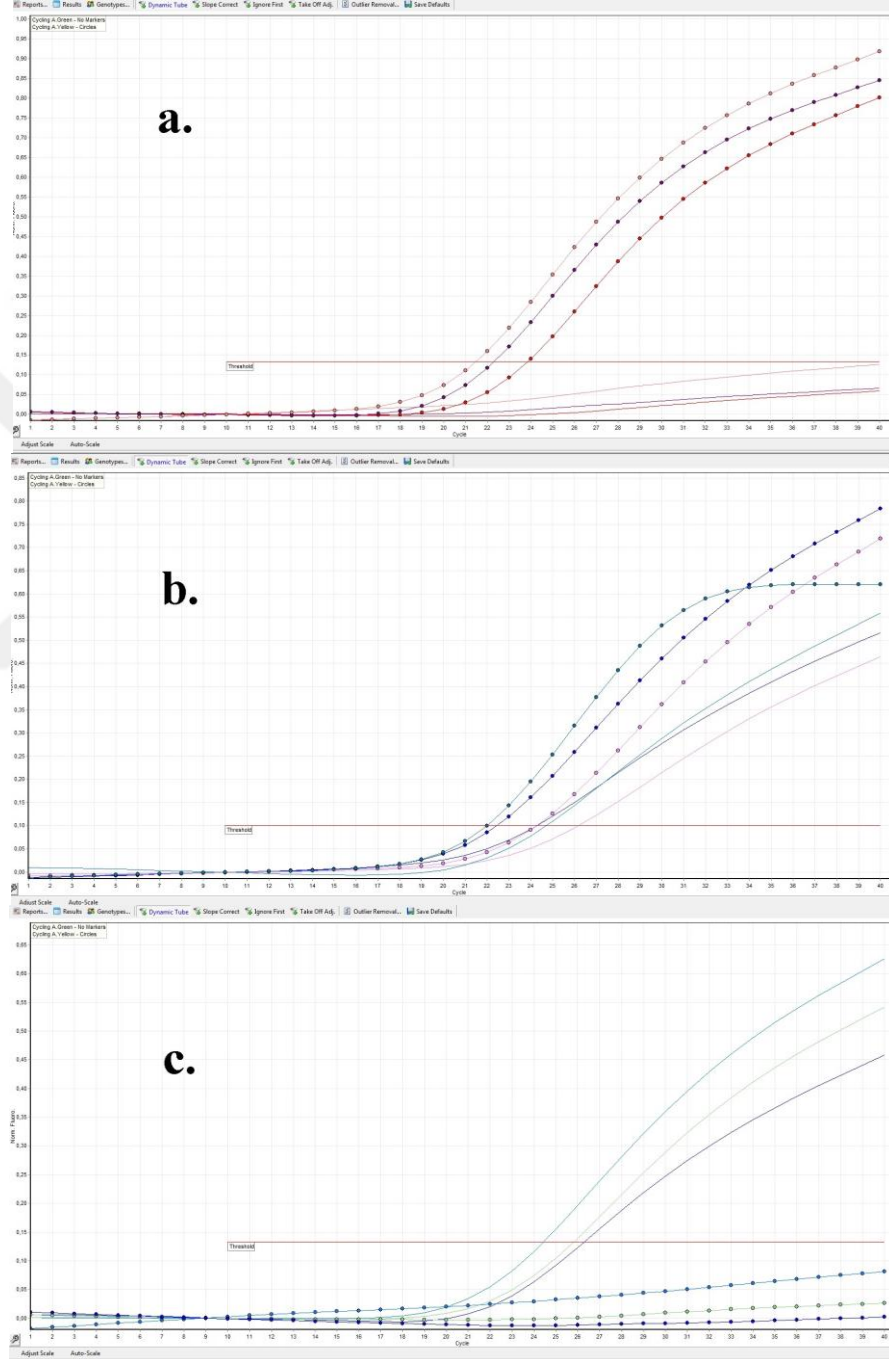
Çalışmamızda bulunan hasta ve kontrol gruplarına ait SNP genotipleme analizleri gerçekleştirmiştir. Bu kapsamda her iki grup içinde rs1883832 ve rs4810485 SNP’ leri analiz edilmiştir.

rs1883832 için: 5’-ACCATGCCTCCTCCCGTAC-3’(sense) ve 5’-CCACTCCCAACTCCCGTCT-3’ (antisense) primerleri kullanılmıştır. GTCCTGCCGCCTGGTCTCACCTCGC[C/T]ATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGT GCG orta sekans dizilime ait nükleotid değişimi olup olmadığı incelenmiştir.

rs4810485 için: 5’-ATCCCCCAAGTACCTGGCTCCT-3’(sense) ve 5’-CCTTGCTGCTTCCCTTGCTTTC-3’(antisense) primerleri kullanılmıştır.

CCTACTTTAGAGGGCTGTAGATTCC[G/T]GCCTGAAGCCTGGGCAGGAAT
GACC orta sekans dizilime ait nükleotid değişimi olup olmadığı incelenmiştir.

Analizlerde nükleotid değişimleri sonucu real time cihazında homozigot wild type, heterozigot mutant ve homozigot mutant allelleri olacak şekilde değerlendirilmiştir (resim 11).

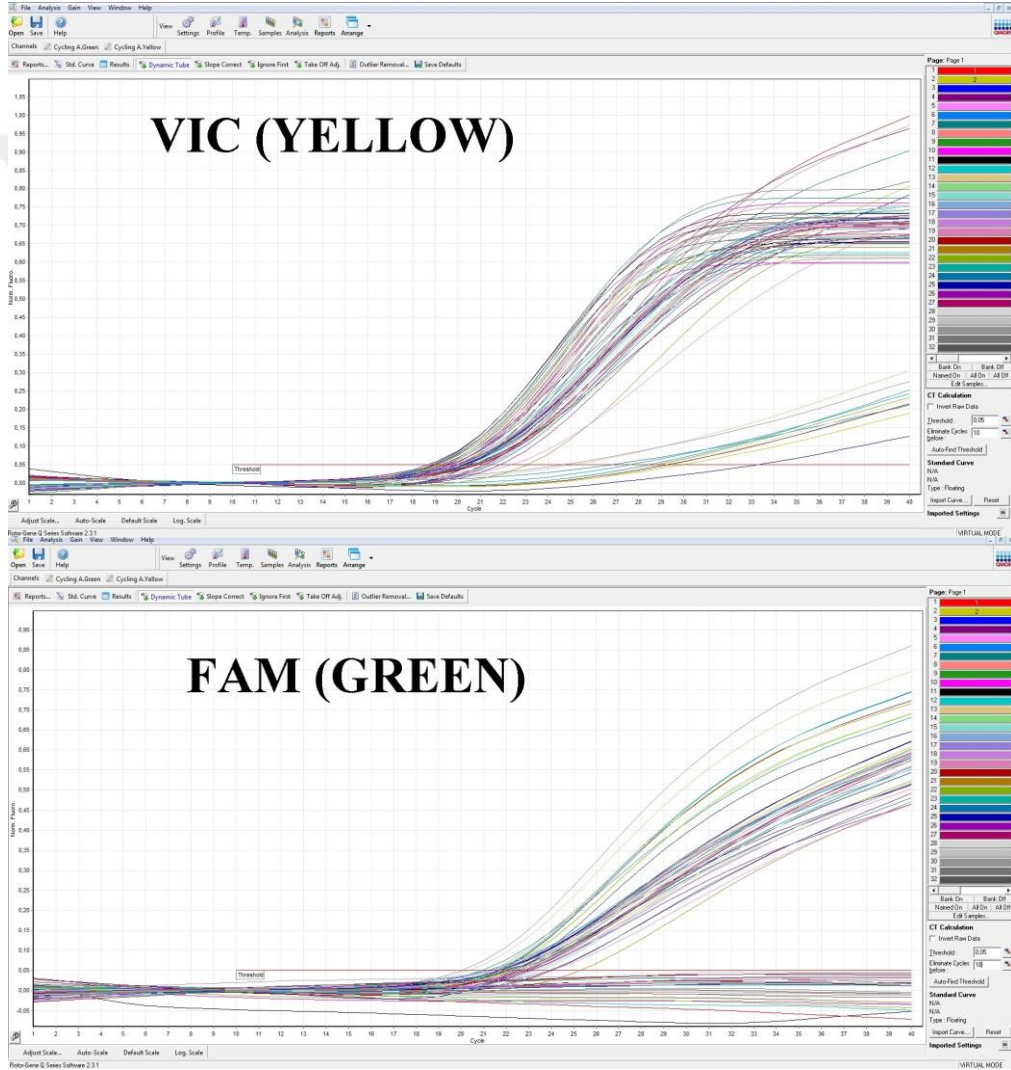


Resim 11 analiz örneği (a. Wild Type b. Heterozigot c. Mutant).

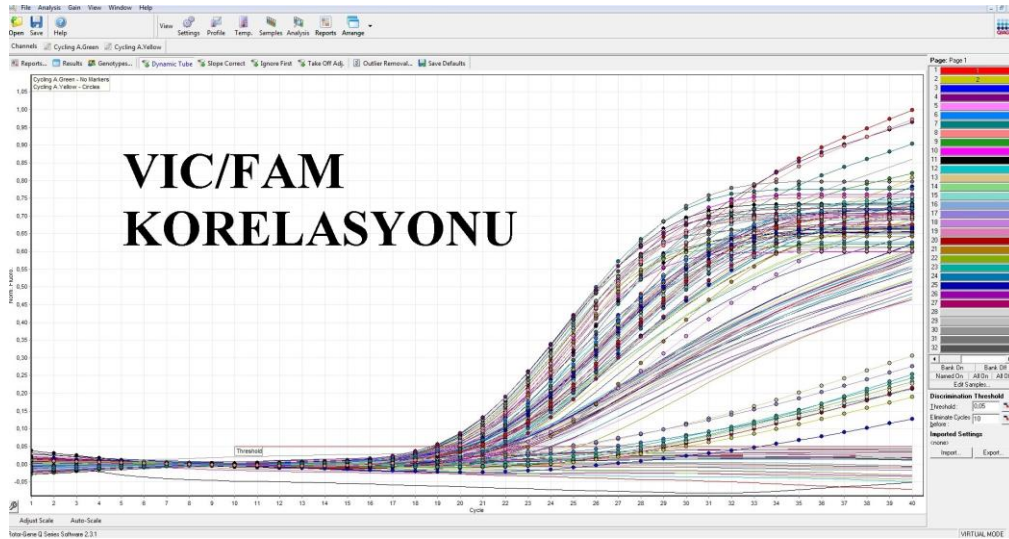
a. Hasta grubunun rs1883832 SNP analizi

Hasta grubuna ait SNP tespiti için real-time PCR cihazında yapılan analiz resim 12’ de gösterilmiştir. Yalnızca VIC boyası ile ışığa yayanlar homozigot CC genotipine, yalnızca FAM boyası ile ışığa yayanlar homozigot TT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır. Hem VIC hemde FAM boyası ile ışığa yayanlar heterozigot CT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır.

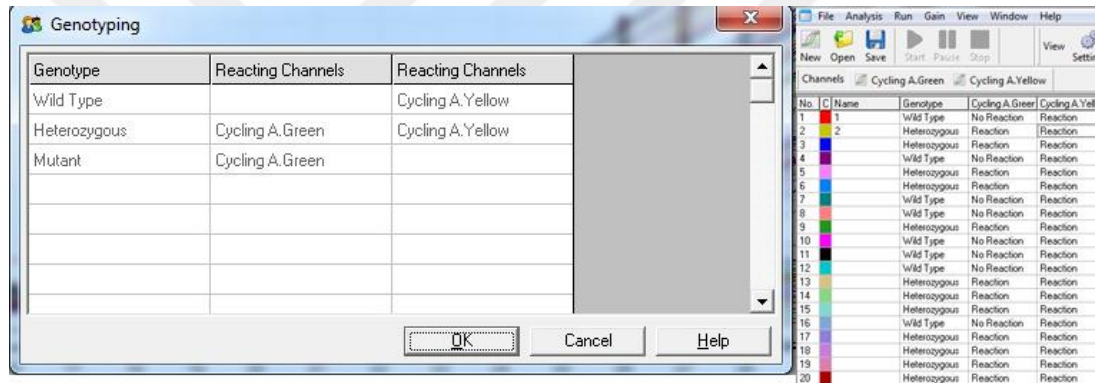
Real-Time PCR cihazının yazılım programında allellerin hangi boya ile ışığa yaptığı bilgiler girilerek genotipleme analizi tamamlanır (resim 13).



Resim 12 Hasta Grb. rs1883832 VIC ve FAM ile ışığa yayan sonuçlar ve korelasyonu.



Resim 12 Hasta Grb. rs1883832 VIC ve FAM ile ısıma yapan sonuçlar ve korelasyonu (Devamı).

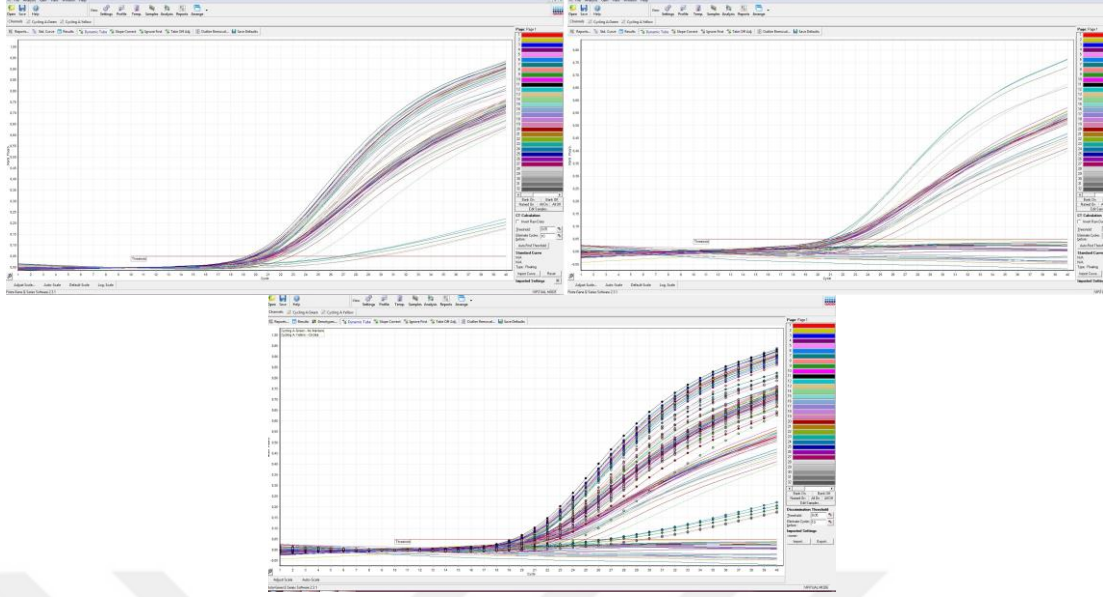


Resim 13 Genotipleme ve Allellerin Belirlenmesi

b. Kontrol grubunun rs1883832 SNP analizi

Kontrol grubuna ait SNP tespitinin real-time PCR cihazında yapılan analizi resim 14' te gösterilmiştir. Yalnızca VIC boyası ile ışıma yapanlar homozigot CC genotipine (wild type), yalnızca FAM boyası ile ışıma yapanlar homozigot TT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır. Hem VIC hemde FAM boyası ile ışıma yapanlar heterozigot CT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır.

Real-Time PCR cihazının yazılım programında allellerin hangi boya ile ışıma yaptığı bilgiler girilerek genotipleme analizi tamamlanır.

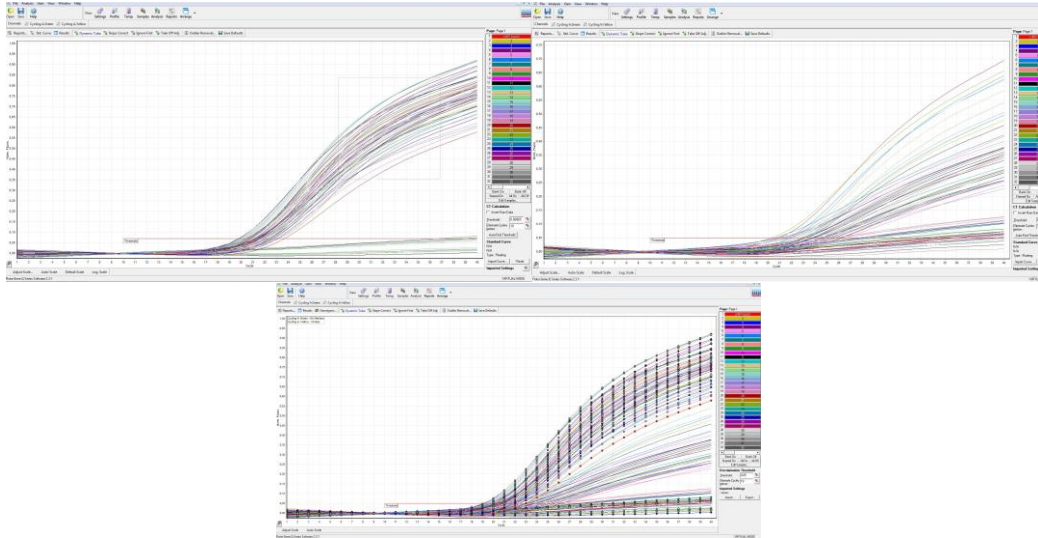


Resim 14 Kontrol Grb. rs1883832 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu

c. Hasta grubunun rs4810485 SNP analiz

Hasta grubuna ait SNP tespitinin real-time PCR cihazında yapılan analizi resim 15’ te gösterilmiştir. Yalnızca VIC boyası ile ışıma yapanlar homozigot GG genotipine (wild type), yalnızca FAM boyası ile ışıma yapanlar homozigot TT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır. Hem VIC hemde FAM boyası ile ışıma yapanlar heterozigot GT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır.

Real-Time PCR cihazının yazılım programında allellerin hangi boya ile ışıma yaptığı bilgiler girilerek genotipleme analizi tamamlanır.

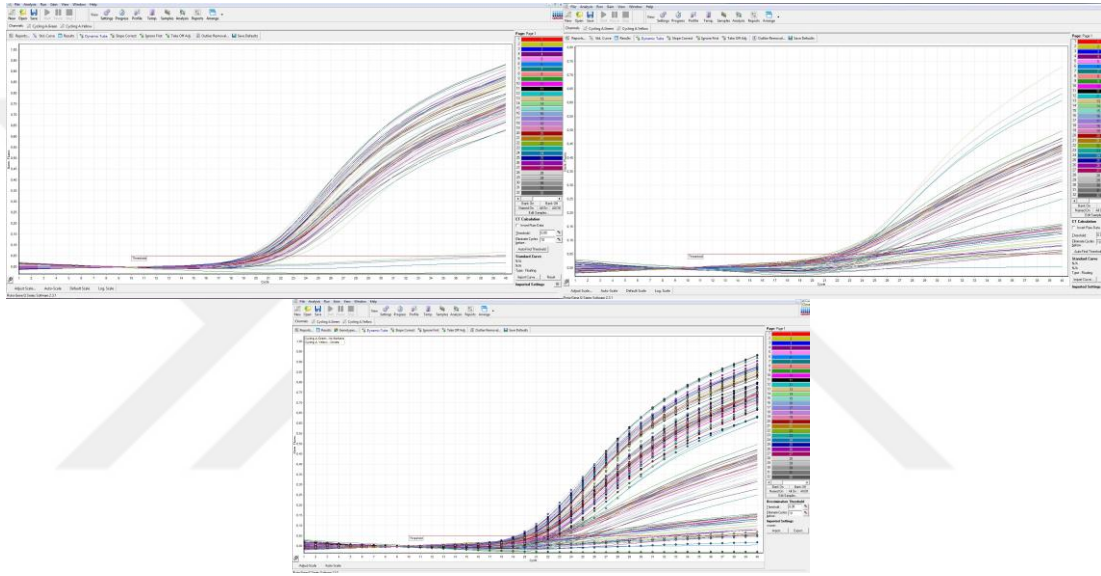


Resim 15 Hasta Grb. rs4810485 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu

d. Kontrol grubunun rs4810485 SNP analizi

Kontrol grubuna ait SNP tespitinin real-time PCR cihazında yapılan analizi resim 16' da gösterilmiştir. Yalnızca VIC boyası ile ışıma yapanlar homozigot GG genotipine (wild type), yalnızca FAM boyası ile ışıma yapanlar homozigot TT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır. Hem VIC hemde FAM boyası ile ışıma yapanlar heterozigot GT genotipine sahip olduğu ortaya konmaktadır.

Real-Time PCR cihazının yazılım programında allellerin hangi boya ile ışıma yaptığı bilgiler girilerek genotipleme analizi tamamlanır.



Resim 16 Kontrol Grb. rs4810485 VIC ve FAM ile ışıma yapan sonuçlar ve korelasyonu

4.2.4. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen kategorik veriler yüzde ve frekans olarak, numerik veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 26.0 (Chicago ILL USA) kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin analizinde Chi-kare testi, numerik verilerin analizinde t-testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

SNP analiz sonuçları, alel frekansları ve genotiplendirme grupları Chi-kare ve Hardy-Weinberg istatistik yöntemleriyle değerlendirildi. FMF grupları arasındaki SNP farklılıkları One Way Anova istatistik yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

Çalışmamızdaki FMF hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait yaşların ortalamaları ve standart sapma değerleri Tablo 13’ de gösterilmiştir.

Tablo 13 Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı.

	Hasta (N=100) Ort±SS	Kontrol (N=100) Ort±SS	p
Yaş	8,11±4.62	7,80±4.45	0,749

Hasta grubunun yaş ortalaması 8,11±4,62 kontrol grubunun yaş ortalaması 7.80±4.45 bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait cinsiyetlerin yüzde olarak değerleri Tablo 14’ te gösterilmiştir.

Tablo 14 Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyete göre dağılımı.

	Hasta (N=100) n (%)	Kontrol (N=100) n (%)	p	X²
Cinsiyet				
Kız	57 (57,0)	54 (54,0)	0,776	0,081
Erkek	43 (43,0)	46 (46,0)		

Hasta grubu 57’ si kız (%57,0), 43’ ü erkek (%43,0) olmak üzere toplam 100 hastadan; Kontrol grubu ise 54’ ü kız (%54,0), 46’ sı erkek (%46,0) olmak üzere toplam 100 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Hasta grubunda tespit edilen MEVF genine ait genotip dağılımı tablo 15’ te verilmiştir. FMF hastalarının genotipleri değerlendirildiğinde hastalardan 72’ si (%72,0) heterozigot, 21’ i (%21,0) bileşik heterozigot ve 7’ si (%7,0) homozigot genotipine sahip oldukları saptanmıştır.

Tablo 15 FMF Hastalarının Genotiplerinin Dağılımı.

Hasta sayısı		
	(n)	(%)
Heterozigot	72	72,0
Bileşik Heterozigot	21	21,0
Homozigot	7	7,0
Kompleks Genotip	0	0
Toplam	100	100

Hasta grubunda tespit edilen MEVF genine ait mutasyonlar tablo 16’ da verilmiştir.

Tablo 16 FMF Hastalarında Tespit Edilen Mutasyonlar.

Mutasyon Tipi	Genotip	Hasta Sayısı	
		(n)	(%)
Heterozigot	E148Q/wt*	32	32,0
	M694V/wt	14	14,0
	V726A/wt	6	6,0
	R761H/wt	7	7,0
	P369S/wt	8	8,0
	M680I (G>C)/wt	1	1,0
	A744S/wt	1	1,0
	M694I/wt	2	2,0
	M680I(G>A)/wt	1	1,0
	Toplam	72	72,0
Bileşik Hetezozigot			
	E148Q/M694V	1	1,0
	M680I(G>C)/M694V	2	2,0
	E148Q/P369S	2	2,0
	E148Q/R761H	3	3,0
	M694V/V726A	3	3,0
	E148Q/V726A	1	1,0
	M680I(G>C)/V726A	2	2,0
	E148Q/K695R	1	1,0
	M694V/M694I	1	1,0
	E148Q/M680I(G>C)	1	1,0
	M680I(G>A)/M680I(G>C)	1	1,0
	M680I(G>C)/R761H	1	1,0
	M694V/K695R	1	1,0
	P369S/R761H	1	1,0
	Toplam	21	21,0
Homozigot	M694V	4	4,0
	E148Q HOMO	1	1,0
	R761H HOMO	1	1,0
	M694I HOMO	1	1,0
Toplam		7	7,0
Genel Toplam		100	100,0

Hasta grubunda tespit edilen MEVF genine ait mutasyonların allel frekans dağılımı tablo 17’ de verilmiştir.

Tablo 17 Mutasyonların Allel Frekans Dağılımı.

Mutasyon	Allel (n)	%
E148Q	43	33,6
M694V	30	23,4
R761H	14	10,9
V726A	12	9,4
P369S	11	8,6
M680I(G>C)	8	6,3
M694I	5	3,9
K695R	2	1,6
M680I(G>A)	2	1,6
A744S	1	0,8
TOPLAM	128	100

Hasta ve kontrol grubunda yapılan çalışmada saptanan rs1883832 (C/T) tek nükleotid polimorfizmine (SNPs) ait genotip ve allel frekansları tablo 18’ de gösterilmiştir.

Tablo 18 rs1883832 (C/T) polimorfizmi genotip ve allel frekansı.

C/T Pol. Genotipi	Hasta N=100 n (%)	Kontrol N=100 n (%)	p	X ²	Odds Ratio	%95 CI
CC	43 (43,0)	47 (47,0)	0,669	0.182	0,851	0,487-1,486
CT	56 (56,0)	53 (53,0)	0,776	0.081	1,129	0,647-1,970
TT	1 (1,0)	0 (0)	1,000	0	-	-
Allel (F)						
C	142 (0,710)	147 (0,735)	0,655	0.200	1,133	0,731-1,754
T	58 (0,290)	53 (0,265)	0,655	0.200		

Çalışmamızda hasta grubunda 100 hastadan 43’ ü (%43,0) rs1883832 (C/T) polimorfizmi açısından CC genotipine (wild type) sahipken, kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyden 47’ sinin (%47,0) CC genotipine sahip olduğu tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,182$). Hasta grubunda 56 birey (%56,0), kontrol grubunda 53 bireyin (%53,0) CT genotipine (heterozigot mutant) sahip olduğu saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,081$). Hasta grubunda 1 bireyde (%1,0) TT genotipi (mutant) tespit edilirken kontrol grubunda bu genotipe rastlanmamıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Allel frekansları açısından bakıldığında hasta grubundaki 100 bireyde C alleli frekansı 142 (0,710) iken, kontrol grubunda bu sayı 147 (0,735) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,200$, $OR(CI)= 1,133$ (0,731-1,754)). Hasta grubunda T alleli frekansı 58 (0,290), kontrol grubunda T alleli frekansı ise 53 (0,265) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,200$, $OR(CI)= 1,133$ (0,731-1,754)).

Hasta ve kontrol grubunda yapılan çalışmada saptanan rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmine (SNPs) ait genotip ve allel frekansları tablo 19’ da gösterilmiştir.

Tablo 19 rs4810485 (G/T) polimorfizmi Genotip ve allel frekansı.

G/T Pol. Genotipi	Hasta N=100 n (%)	Kontrol N=100 n (%)	p	X ²	Odds Ratio	%95 CI
GG	43 (43,0)	47 (47,0)	0,669	0,182	0,851	0,487-1,486
GT	43 (43,0)	45 (45,0)	0,886	0,020	0,922	0,527-1,612
TT	14 (14,0)	8 (8,0)	0,258	1,277	1,872	0,748-4,684
Allel (F)						
G	129 (0,645)	139 (0,695)	0,338	0,916	0,797	0,525-1,211
T	71 (0,355)	61 (0,305)	0,338	0,916		

Çalışmamızda hasta grubunda 100 hastadan 43’ ü (%43,0) rs4810485 (G/T) polimorfizmi açısından GG genotipine (wild type) sahipken, kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyden 47’ sinin (%47,0) GG genotipine sahip olduğu tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,182$). Hasta grubunda 43 birey (%43,0), kontrol grubunda 45 bireyin (%45,0) GT genotipine (heterozigot mutant) sahip olduğu saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,020$). Hasta grubunda 14 bireyde (%14,0) TT genotipi (mutant) tespit edilirken kontrol grubunda 8 bireyde (%8,0) TT genotipi saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=1,277$).

Allel frekansları açısından bakıldığında hasta grubundaki 100 bireyde C alleli frekansı 129 (0,645) iken, kontrol grubunda bu sayı 139 (0,695) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,338$, $OR(CI)= 0,797$

(0,525-1,211)). Hasta grubunda T alleli frekansı 71 (0,355), kontrol grubunda T alleli frekansı ise 61 (0,305) idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,338$, $OR(CI)= 0,797 (0,525-1,211)$).

Hasta ve kontrol grubunda yapılan çalışmada saptanan rs1883832 (C/T) ve rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmlerine (SNPs) ait kombine genotip analizleri tablo 20’ de gösterilmiştir.

Tablo 20 rs1883832 (C/T) ve rs4810485 (G/T) SNPs ait kombine genotip analizleri.

Kombine Genotipi	Hasta N=100 n (%)	Kontrol N=100 n (%)	p	X ²	Odds Ratio	%95 CI
CC-GG	42 (42,0)	47 (47,0)	0,569	0,324	0,817	0,655-1,219
CC-GT	0	0	-	-	-	-
CC-TT	1 (1,0)	0	1,000	-	-	-
CT-GG	1 (1,0)	0	1,000	-	-	-
CT-GT	43 (43,0)	45 (45,0)	0,886	0,020	0,922	0,527-1,612
CT-TT	12 (12,0)	8 (8,0)	0,479	0,500	1,568	0,612-4,019
TT-GG	0	0	-	-	-	-
TT-GT	0	0	-	-	-	-
TT-TT	1 (1,0)	0	1,000	-	-	-

Çalışmamızda hasta grubunda 100 hastadan 42’ si (%42,0) CC-GG kombine genotipe sahipken, kontrol grubundaki 100 sağlıklı bireyden 47’ sinin (%47,0) CC-GG kombine genotipine sahip olduğu tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,569$). Hasta grubunda 43 hastada CT-GT kombine genotipi, kontrol grubunda ise 45 bireyde CT-GT kombine genotipi saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,886$). Hasta grubunda 12 hastada CT-TT kombine genotipi, kontrol grubunda ise 8 bireyde CT-TT kombine genotipi saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$, $X^2=0,479$). CC-GT, TT-GG ve TT-GT kombine genotiplerine hasta ve kontrol grubunda rastlanmamıştır. CC-TT, CT-GG ve TT-TT kombine genotipleri açısından bakıldığında hasta grubunda 1’ er birey varken kontrol grubunda bu kombine genotiplere rastlanmamıştır. Bu genotipler açısından istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Hasta grubunda yapılan MEVF gen mutasyon analizleri sonucu elde edilen veriler ışığında FMF mutasyon genotiplerinin rs1883832 (C/T) tek nükleotid polimorfizmleri ile karşılaştırılmaları tablo 21’ de gösterilmiştir.

Tablo 21 FMF mutasyon genotiplerinin rs1883832 (C/T) ile karşılaştırılması.

Allel	Heterozigot n (%)	Bileşik Heterozigot n (%)	Homozigot n (%)	p
CC	32 (32,0)	8 (8,0)	3 (3,0)	0,928
CT	39 (39,0)	13 (8,0)	4 (4,0)	
TT	1 (1,0)	0	0	

FMF hastalarına ait genotip grupları arasında rs1883832 (C/T) tek nükleotid polimorfizmi açısından istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Hasta grubunda yapılan MEVF gen mutasyon analizleri sonucu elde edilen veriler ışığında FMF mutasyon genotiplerinin rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmleri ile karşılaştırılmaları tablo 22’ de gösterilmiştir.

Tablo 22 FMF mutasyon genotiplerinin rs4810485 (G/T) ile karşılaştırılması.

Allel	Heterozigot n (%)	Bileşik Heterozigot n (%)	Homozigot n (%)	p
GG	33 (33,0)	7 (7,0)	3 (3,0)	0,265
GT	32 (32,0)	9 (9,0)	2 (2,0)	
TT	7 (7,0)	5 (5,0)	2 (2,0)	

FMF hastalarına ait genotip grupları arasında rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmi açısından istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada öncelikle Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) hastalarına ait yaygın mutasyon analizi yapılarak hasta grubunun mutasyon profili araştırılmıştır. FMF hasta ve kontrol gruplarında CD40 genine ait tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) olan rs1883832 ve rs4810485 polimorfizmleri araştırılmıştır. Aynı zamanda FMF hasta profilleri ile C40 genine ait polimorfizmler arasındaki korelasyon araştırılmıştır.

Bu çalışma 0-18 yaş aralığındaki kız ve erkek çocuklarından oluşan 100 hasta ve herhangi bir hastalığı olmayan 100 sağlıklı birey ile yapılmıştır.

Çalışmaya katılan hasta grubunun yaş ortalaması $8,11 \pm 4,62$, kontrol grubunun $7,80 \pm 4,45$ dir. Her iki grup arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel anlamda bir fark yoktur ($p > 0,05$).

Hasta grubundaki 100 hastadan %57' si kız, %43' ü erkek; kontrol grubundaki 100 bireyin %54' ü kız, %46' sı erkeklerden oluşmaktadır. Her iki grup arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Çalışmamızdaki hasta grubundaki FMF hastalarının genotip dağılımları incelendiğinde; hastaların %72' si heterozigot, %21' i bileşik heterozigot ve %7'si homozigot mutasyon profiline sahip olduğu tespit edildi. Hastaların hiçbirinde kompleks bir genotipe (ikiden fazla mutasyon) rastlanmadı. Literatürde yapılan bazı çalışmalardaki verilerle çalışmamızda elde edilen verilerin karşılaştırılması tablo 23' te verilmiştir.

Tablo 23 FMF Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması.

Resferans	Hasta Sayısı	Heterozigot (%)	Bileşik heterozigot (%)	Homozigot (%)	Kompleks Genotip (%)
Akin ve ark. (122)	547	54,11	26,51	18,46	0,92
Coker ve ark. (123)	883	60,10	22,80	16,08	0,30
Ece ve ark. (7)	147	70,70	23,10	6,20	-
Hageman ve ark. (20)	44	27,00	39,00	34,00	-
Dündar ve ark. (1)*	20 268	39,00	24,00	3,00	-
Çalışmamız	100	72,00	21,00	7,00	-

* Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında mutasyonların %34' ü varyant olarak değerlendirilmemiştir.

FMF mutasyonlarının genotip dağılımları karşılaştırıldığında verilerimiz Coker ve ark. tarafından 2011 yılında Ege bölgesindeki ve Ece ve ark. tarafından 2013

yılında Güneydoğu bölgesindeki çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (7,123). Tablo 23’ te verilen diğer çalışmalar ile verilerimiz uyusmamaktadır.

Ülke genelinde ve ülkenin farklı coğrafi bölgelerinde yapılan MEVF genine ait yaygın mutasyonlarda elde edilen FMF mutasyonlarının allel frekans sıklığı ile çalışmamızda elde edilen verilerin karşılaştırması tablo 24’ te verilmiştir. Verilerimizi ülke genelinde yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda, ülke genelinde M694V mutasyon oranı en yüksek olmasına rağmen bizim çalışmamızda E148Q mutasyon oranının en yüksek olduğu tespit edilmiştir (1,124,125). Aynı zamanda bölgemizde M680I mutasyon oranının ülke geneline göre daha düşük olduğu ve R761H ve P369S mutasyon oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

Tablo 24 Ülke genelinde yapılan MEVF mutasyonlarının allel frekans dağılımı.

Bölge (Kay.)	Hasta Sayısı	E148Q % (n)	M694V % (n)	V726A % (n)	R761H % (n)	M680I (G>C) % (n)	P369S % (n)
Doğu Anadolu (126)	415	19,10	21,60	9,70	2,00	9,50	3,70
Doğu Anadolu (127)	453	32,77	36,50	14,09	4,07	3,90	2,04
Karadeniz (128)	731	14,70	42,80	16,30	6,80	14,10	*
İç Anadolu (129)	1 044	5,15	14,68	4,76	1,28	7,62	0,99
İç Anadolu (130)	386	18,39	59,06	22,53	3,36	16,06	4,40
İç Anadolu (131)	330	1,36	50,00	9,70	3,48	14,10	*
Batı Anadolu (132)	175	20,35	41,15	7,08	9,73	12,39	4,42
Ege (122)	547	16,75	47,60	12,95	3,30	11,94	2,55
Ege (123)	833	16,30	48,60	9,70	4,40	13,40	2,60
Ege (133)	190	15,00	53,59	6,81	*	6,81	7,27
Akdeniz (134)	618	19,32	17,35	4,03	1,20	5,24	*
Güneydoğu Anadolu (7)	147	30,70	26,00	13,0	13,50	6,30	10,50
Güneydoğu Anadolu (135)	104	30,80	18,30	8,60	2,90	6,70	10,60
Ülke geneli (124)	1 090	*	51,50	8,10	*	14,4	*
Ülke geneli (125)	1 719	1,00	44,50	9,20	**	12,30	**
Ülke geneli (1)	20 268	22,89	36,93	12,70	3,22	13,30	4,40
Çalışmamız	286	33,60	23,40	9,40	10,90	6,80	8,60

Ülkemizdeki diğer coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalar ile ülke genelindeki MEVF mutasyon allel sıklığı karşılaştırıldığında verilerin birbirine paralel olduğu gözlenmektedir. Ülke geneli ve diğer coğrafi bölgelerde elde edilen veriler ile çalışmamızda elde ettiğimiz veriler karşılaştırıldığında en sık rastlanan mutasyon tipi açısından farklılık olduğu tespit edilmektedir. Bu farklılıkların temelinde coğrafi

bölgesel farklılıkların ya da analiz edilen verilerin sayısı veya yönteminden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bölgemize yakın bir bölge olan Van ili ve çevresinde (Doğu Anadolu Bölgesi) 2010, 2014 ve 2015 yıllarında yapılan üç ayrı çalışmada en sık rastlanan mutasyon sırasıyla M694V, V726A ve M694V mutasyonları olarak rapor edilmiştir. Bu üç çalışmada elde edilen veriler verilerimizle uyuşmamakta olup bu farklılığın coğrafi bölgesel farklılıkların ya da analiz edilen verilerin sayısı veya yönteminden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz (126,127,136).

Bölgemizde 2009 ve 2014 yıllarında yapılan iki çalışma ile kendi verilerimizi karşılaştırdığımızda mutasyon tip ve oranlarının benzer oldukları görülmekte olup, çalışmamızda P369S (%8,60) mutasyonunun oranında bir düşüş olduğu gözlenmektedir (7,135).

CD40 genindeki polimorfizmler ve bunu takiben serum CD40 düzeyindeki değişimler kanser tedavisindeki rolü ve Graves hastalığı, multipl skleroz, romatizmal artrit ve serebrovasküler bozukluklar gibi otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere çok sayıda patolojinin potansiyel hedefi olarak incelenmiştir (137). CD40 ekspresyonu, polimorfizmin hangi gen bölgesinde gerçekleştiğine bağlı olan CD40' ın translasyonel verimliliğine bağlıdır. Bu polimorfizmler; amino asidin etkileneceği kodlama bölgesinde veya gen splicing, transkripsiyon faktörü bağlanma alanı, haberci RNA degradasyonu veya kodlamayan RNA dizisi gibi alanları kapsayan kodlanmayan bölgede gerçekleşmektedir (138).

rs1883832 polimorfizminde CT ve TT genotipine sahip bireylerin monosit kaynaklı aktive edilmiş dentritik hücreler ve B lenfositlerinin yüzeylerinde daha düşük serum CD40 seviyelerine sahip olduklarına dair yapılan çeşitli fonksiyonel çalışmalar mevcuttur. Buna karşılık, CC genotipine sahip bireylerde otoimmün antikorların düzensiz aşırı üretimi sonucu Graves hastalığını indüklediği gösterilmiştir (138)

rs1883832 polimorfizmi ve serum CD40 seviyelerinin karşılaştırılması ile birçok hastalık üzerine çalışmalar rapor edilmiştir. Graves hastalığı, Meme kanseri, Diz osteoartriti (KOA), Sepsis ve Arteriosklerozis gibi hastalıklarda genotip farklılıklarının hastalıkla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (140-144). Servikal kanser, Behçet hastalığı, Haşimato troidi gibi hastalıklarla yapılan çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (138,140,145). Çalışmamızda elde edilen

veriler ışığında FMF hastaları ve kontrol grubu arasında rs1883832 polimorfizmi genotipleri (CC-CT-TT) açısından istatistiksel anlamda bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Allel frekansları açısından Graves hastalığı, Meme kanseri, Diz osteoartriti (KOA), Sepsis ve Arteriosklerozis hastalıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildiği rapor edilmiştir (140-144). Servikal kanser, Behçet hastalığı, Haşimato troidi gibi hastalıklarla yapılan çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (138,140,145). Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında FMF hastaları ve kontrol grubu arasında rs1883832 allelleri (C-T) açısından istatistiksel anlamda bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

CD40 geninin intron-1 bölgesinde meydana gelen rs4810485 polimorfizmi; kodlanmayan bölgedeki splicing işlemleriyle CD40 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı ve rs4810485 T alellerinin anormal splicinge neden olduğu rapor edilmiştir (141,146).

rs4810485 polimorfizmi ve serum CD40 seviyelerinin karşılaştırılması ile birçok hastalık üzerine çalışmalar rapor edilmiştir. Meme kanseri, Diz osteoartriti (KOA) ve Kawasaki gibi hastalıklarda genotip farklılıklarının hastalıkla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (141,142,147). Servikal kanser ve Behçet hastalığı gibi hastalıklarla yapılan çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (138,145). Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında FMF hastaları ve kontrol grubu arasında rs4810485 polimorfizmi genotipleri (GG-GT-TT) açısından istatistiksel anlamda bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Allel frekansları açısından Meme kanseri, Diz osteoartriti (KOA) ve Kawasaki hastalıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildiği rapor edilmiştir (141,142,147). Servikal kanser ve Behçet hastalığı gibi hastalıklarla yapılan çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (138,145). Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında FMF hastaları ve kontrol grubu arasında rs4810485 allelleri (G-T) açısından istatistiksel anlamda bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

İnal ve arkadaşları Behçet hastalığında rs1883832 (C/T) ve rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmlerine ait kombine genotip analizleri gerçekleştirmiş olup bu iki polimorfizm arasında anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir (145). Çalışmamızda

elde edilen veriler ışığında FMF hastaları ve kontrol grubu arasında kombine genotipleri açısından istatistiksel anlamda bir fark saptanmamış olup bu çalışma ile verilerimiz uyushmaktadır ($p>0.05$).

FMF hastalarında CD40 genine ait tek nukleotid polimorfizmlerine yönelik daha önceden yapılan bir çalışma olmadığından literatür karşılaştırılması yapılamamıştır. FMF mutasyon genotiplerinin (homozigot, heterozigot ve bileşik heterozigot) rs1883832 (C/T) ve rs4810485 (G/T) ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel bir fark saptanmadı ($p>0.05$).



7. SONUÇLAR

1. Çalışmada FMF tanısı almış kız ve erkeklerden oluşan 100 kişilik hasta grubunun yaş ortalaması $8,11 \pm 4,62$; 100 sağlıklı kız ve erkeklerden oluşan kontrol grubunun yaş ortalaması ise $7,80 \pm 4,45$ idi.
2. Hasta grubuna katılan 100 hastanın 57' si kız (%57,0), 43' ü erkek (%43,0); kontrol grubunun 54' ü kız (%54,0), 46' sı erkek (%46,0) idi.
3. FMF hastalarının genotipleri değerlendirildiğinde hastalardan 72' si (%72,0) heterozigot, 21' i (%21,0) bileşik heterozigot ve 7' si (%7,0) homozigot genotipine sahip olduğu tespit edildi.
4. FMF hastalarında en sık rastlanan mutasyonlar sırasıyla; E148Q/wt (%32,0), M694V/wt (%14,0), P369S/wt (%8,0), R761H/wt (%7,0), V726A/wt (%6,0) ve M694V/homozigot (%4,0) mutasyonları olarak tespit edildi.
5. FMF hastalarında MEVF gen mutasyonlarının allel frekansları açısından en sık rastlanan alleller sırasıyla; E148Q (%43,0), M694V (%23,4), R761H (%10,9), V726A (%9,4), P369S (%8,6), M680I (G>C) (%6,3) ve M694I (%3,9) olarak tespit edildi.
6. rs1883832 (C/T) polimorfizmi genotipi açısından bakıldığında hasta grubu olarak alınan toplam 100 bireyden 43' ü (%43,0) CC, 56' sı (%56,0) CT ve 1' i (%1,0) TT olarak bulundu.
7. rs1883832 (C/T) polimorfizmi genotipi açısından bakıldığında kontrol grubu olarak alınan toplam 100 bireyden 47' si (%47,0) CC ve 53' ü (%53,0) CT olarak bulundu.
8. Hasta grubunun rs1883832 (C/T) polimorfizmi C allel frekansı 142 (0,71), T allel frekansı 58 (0,29), kontrol grubunun C allel frekansı 147 (0,735), T allel frekansı 53 (0,265) olarak bulundu.
9. rs4810485 (G/T) polimorfizmi genotipi açısından bakıldığında hasta grubu olarak alınan toplam 100 bireyden 43' ü (%43,0) GG, 43' ü (%43,0) GT ve 14' ü (%14,0) TT olarak bulundu.
10. rs4810485 (G/T) polimorfizmi genotipi açısından bakıldığında kontrol grubu olarak alınan toplam 100 bireyden 47' si (%47,0) GG, 45' i (%45,0) GT ve 8' i (%8,0) TT olarak bulundu.

11. Hasta grubunun rs4810485 (G/T) polimorfizmi G allel frekansı 129 (0,645), T allel frekansı 71 (0,355), kontrol grubunun G allel frekansı 139 (0,695), T allel frekansı 61 (0,305) olarak bulundu.

12. rs1883832 (C/T) ve rs4810485 (G/T) tek nükleotid polimorfizmlerine ait kombine genotip analizleri incelendiğinde hasta grubunda CC-GG (%42,0), CC-TT (%1,0), CT-GG (%1,0), CT-GT (%43,0) CT-TT (%12,0) ve TT-TT (%12,0) kombine genotipler tespit edildi. Kontrol grubunda ise CC-GG (%47,0), CT-GT (%45,0) ve CT-TT (%8,0) kombine genotipler tespit edildi.

13. FMF mutasyon genotiplerinin rs1883832 (C/T) ile karşılaştırılması incelendiğinde Heterozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 32'si (%32,0) CC, 39'u (%39,0) CT ve 1'i (%1,0) TT genotipine sahip oldukları saptandı. Bileşik heterozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 8'i (%8,0) CC ve 13'ü (%13,0) CT genotipine sahip oldukları saptandı. Homozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 3'ü (%3,0) CC ve 4'ü (%4,0) CT genotipine sahip oldukları saptandı.

14. FMF mutasyon genotiplerinin rs4810485 (G/T) ile karşılaştırılması incelendiğinde Heterozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 33'ü (%33,0) GG, 32'si (%32,0) GT ve 7'si (%7,0) TT genotipine sahip oldukları saptandı. Bileşik heterozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 7'si (%7,0) GG, 9'u (%9,0) GT ve 5'i (%5,0) TT genotipine sahip oldukları saptandı. Homozigot FMF mutasyonu taşıyan hasta grubundaki bireylerin 3'ü (%3,0) GG, 2'si (%2,0) GT ve 2'si (%2,0) TT genotipine sahip oldukları saptandı.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bu bilgilerin ışığında CD40 genine ait tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) ile Ailesel Akdenizi Ateşi (FMF) hastalığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. CD40 geni polimorfizminin FMF hastalarla ilişkisinin daha sağlıklı sonuçlar vermesi açısından hasta ve kontrol örneklerinin artırılması gerektiği kanaatindeyiz. Aynı zamanda CD40 geninde meydana gelen polimorfizmlerin serum CD40 düzeyini etkilediğinden dolayı sonraki çalışmalarda FMF hastalarına geniş kapsamlı serum düzeyi ve gen polimorfizmlerinin birlikte bakılması gerektiği kanaatine varmaktayız.

8. KAYNAKLAR

- 1- Dunder M, Fahrioglu U, Yildiz SH et al. Clinical and molecular evaluation of MEFV gene variants in the Turkish population: a study by the National Genetics Consortium. *Funct Integr Genomics*. 2022; 1-25.
- 2- Alghamdi M. Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2017; 36(8):1707-1713.
- 3- Soriano A, Manna R. Familial Mediterranean fever: new phenotypes. *Autoimmun Rev*. 2012; 12:31–37.
- 4- Yigit S, Tural S, Tekcan A et al. The role of IL-4 gene 70 bp VNTR and ACE gene I/D variants in Familial Mediterranean fever. *Cytokine*. 2014; 67(1):1-6.
- 5- Liu ZL, Hu J, Xiao XF et al. The CD40 rs1883832 polymorphism affects sepsis susceptibility and sCD40L levels. *Biomed Res Int*. 2018.
- 6- Deng ZH, Sun MH, Li YS et al. Single nucleotide polymorphisms in the CD40 gene associate with the disease susceptibility and severity in knee osteoarthritis in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017; 18(1): 1-8.
- 7- Ece A, Çakmak E, Uluca Ü et al. The MEFV mutations and their clinical correlations in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatol Int*. 2014; 34(2):207-212.
- 8- Tunca M, Akar S, Onen F et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84:1–11.
- 9- Koga T, Migita K, Kawakami A. Biologic therapy in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*. 2016; 26(5):637-41.
- 10- Janeway TC, Mosenthal HO. An Unusual Paroxysmal Syndrome, Probably Allied To Recurrent Vomiting: With A Study of The Nitrogen Metabolism. *Arch Intern Med*. 1908; 2(3): 214-225.
- 11- Siegal, S. Benign paroxymal peritonitis. *Ann Intern Med*. 1945; 23:1-21.
- 12- Heller H, Sohar E, Sherf, L. Familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med*. 1958; 102:50.
- 13- Thomas KP. Genetic factors in amyloidosis. *J Med Genet*. 1975; 12:317p.

- 14- Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med*. 1972; 287:1302.
- 15- Pras M. FMF: Past, present and future. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20(Suppl 26):S-66.
- 16- Bernot A, Clepet C, Dasilva C et al. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet*. 1997; 17:25-31.
- 17- Consortium TIFMF. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*. 1997; 90:797-807.
- 18- Marmaralı A. Garip bir karın ağrısı sendromu. *Türk Tıp Cem Mec*. 1946; 12.
- 19- Bilginer Y, Akpolat T, Ozen S. Renal amyloidosis in children. *Pediatr Nephrol*. 2011; 26(8):1215-1227.
- 20- Hageman IMG, Visser H, Veenstra J. Familial Mediterranean Fever (FMF): a single centre retrospective study in Amsterdam. *Neth J Med*. 2019; 77(5):177-82.
- 21- Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Rheum*. 2009; 61:1447-1453.
- 22- Sohar E, Gafni J, Pras M et al. Familial Mediterranean fever: A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med*. 1967; 43(2):227-253.
- 23- Popovic K, Ek M, Espinosa A et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:3639-3645.
- 24- Özkorucu B. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) ile Mir-4520a Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2022, Manisa (Danışman: Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM).
- 25- Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever – a review. *Genet Med*. 2011; 13:487-98.
- 26- Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean Fever. *Lancet*. 1998; 351:659-64.
- 27- Sohar E, Gafni J, Pras M et al. Familial Mediterranean fever: a survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med*. 1976; 43(2):227-253.

- 28- Lidar M, Yaqubov M, Zaks N et al. The prodrome: a prominent yet overlooked pre-attack manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2006; 33(6):1089–1092.
- 29- Kucuk A, Gezer IA, Ucar R et al. Familial Mediterranean fever. *Acta Med (Hradec Kralove)*. 2014; 57:97–104.
- 30- Tunca M, Kirkali G, Soytürk M et al. Acute phase response and evolution of familial Mediterranean fever. *Lancet*. 1999; 353(9162):1415.
- 31- Kees S, Langevitz P, Zemer D et al. Attacks of pericarditis as manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM*. 1997; 90:643–647.
- 32- Lidar M, Kedem R, Mor A et al. Arthritis as the sole episodic manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 2005; 32:859–862.
- 33- Lidar M, Doron A, Barzilai A et al. Erysipelas-like erythema as the presenting feature of familial Mediterranean fever. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013; 27(7):912–915.
- 34- Livneh A, Madgar I, Langevitz P. Recurrent episodes of acute scrotum with ischemic testicular necrosis in a patient with familial Mediterranean fever. *J Urol*. 1994; 151(2):431–432.
- 35- Sarı İ, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: an updated review. *Eur J Rheumatol*. 2014; 1(1):21–33.
- 36- Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I et al. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)*. 2014; 53(4):741–745.
- 37- Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:1879-85.
- 38- Demirkaya E, Saglam C, Turker T et al. Performance of different diagnostic criteria for familial Mediterranean fever in children with periodic fevers: results from a multicenter international registry. *J Rheumatol*. 2016; 43(1):154–160.
- 39- Yalçinkaya F, Ozen S, Ozçakar ZB et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48:395-398.

- 40- Ödemir FMA. FMF tanısı alan Türk çocuklarda ıssf (FMF için uluslararası şiddet skorlama sistemi) skorlarının değerlendirilmesi; Tek merkez deneyimi 2017. Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Dr.Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Ve Cerrahisi Eğt. ve Arş. Hast., Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2017, İzmir (Danışman: Doç. Dr. Nesrin Gülez).
- 41- Sadri S, Aşçı E, Ergün G et al. Hastalığı kontrol altında olan ailevi Akdeniz ateşi hastalarında düşük doz kolşisin kullanımı. RAED Derg. 2020; 12(2).
- 42- De Torre-Minguella C, Mesa del Castillo P, Pelegrín P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. Front Immunol. 2017; 8:43.
- 43- Campbell L, Raheem I, Malesud CJ et al. The relationship between NALP3 and autoinflammatory syndromes. Int J Mol Sci. 2016; 17(5):725.
- 44- Şahin C, Arıcıoğlu F. Depresyon ve sitokin hipotezinde yeni bir boyut: ‘NLRP3 inflamazomu’. Clin Exp Health Sci. 2013; 3(2):65-68.
- 45- Ozen S, Batu ED. The myths we believed in familial Mediterranean fever: what have we learned in the past years. Semin Immunopathol. 2015; 37(4):363–369.
- 46- Bozkurt Y, Demir A, Erman B, Gül A. Unified modeling offamilial Mediterranean fever and cryopyrin associated periodic syndromes. Comput Math Methods Med. 2015; 893507.
- 47- Infevers: an online database for autoinflammatory mutations. Copyright. Available at <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=1>. Erişim Tarihi: 29.04.2022
- 48- Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I et al. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. Ann Rheum Dis. 2012; 71(10):1599–1605.
- 49- Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL et al. The pyrin inflammasome in health and disease. Front Immunol. 2019; 1745.
- 50- Shinar Y, Ceccherini I, Rowczenio D et al. ISSAID/EMQN best practice guidelines for the genetic diagnosis of monogenic autoinflammatory diseases in the Next-Generation Sequencing Era. Clin Chem. 2020; 66:525–536.
- 51- Güçlü G. FMF (Ailesel Akdeniz Ateşi) Hastalarında İnterlökin-10 (-1082,-819,-592) ve Tümör Nekroz Faktörü (Tnf)-A (-308) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji

Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2014, Tokat (Danışman: Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ, Yrd. Doç. Dr. Ali AKBAŞ).

- 52- Richards N, Schaner P, Diaz A et al. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276:39320–9.
- 53- Matzner Y, Abedat S, Shapiro et al. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood.* 2000; 96:727-731.
- 54- Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood.* 2001; 98:851.
- 55- Yu J-W, Fernandes-Alnemri T, Datta P et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell.* 2007; 28:214–27.
- 56- Shoham NG, Centola M, Mansfield E et al. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:13501–6.
- 57- Procopio V, Manti S, Bianco G et al. Genotype-phenotype correlation in FMF patients: A "non classic" recessive autosomal or "atypical" dominant autosomal inheritance? *Gene.* 2018; 30(641):279-286.
- 58- Federici S, Calcagno G, Finetti M et al. Clinical impact of MEFV mutations in children with periodic fever in a prevalent western European Caucasian population. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71:1961–1965.
- 59- Ozturk C, Halicioglu O, Coker I 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.
- 60- Marek-Yagel D, Bar-Joseph I, Pras E et al. Is E148Q a benign polymorphism or a disease-causing mutation? *J Rheumatol.* 2009; 36:2372.
- 61- Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N et al. Evidence based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74:635–641.

- 62- Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G et al. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*. 2009; 35:474-483.
- 63- Lutgens E, Daemen MJ. CD40–CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002; 12:27–32.
- 64- Laman JD, de Smet BJ, Schoneveld Aet al. CD40–CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today*. 1997; 18:272–277.
- 65- Dullforce P, Sutton DC, Heath AW. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat Med*. 1998; 4:88–91.
- 66- Jacobson EM, Huber AK, Akeno N et al. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue specific expression, *Genes Immun*. 2007; 8:205-214.
- 67- Braesch-Andersen S, Paulie S, Koho H et al. Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CD40. *J Immunol*. 1989; 142:562–567.
- 68- Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58:4–43.
- 69- Genetics Home Reference, Genome Decoration Page/NCBI. Available at https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_chromosome_20_ideogram_from_GHR.png. Erişim Tarihi: 25.04.2022
- 70- Hostager B, Hsing Y, Harms DE et al. Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features. *J Immunol*. 1996; 157:1047–1053.
- 71- Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000; 67:2–17.
- 72- Siepmann K, Skok J, van Essen D et al. Rewiring of CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology*. 2001; 102:263–272.
- 73- Parker DC, Greiner DL, Phillips NE et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:9560–9564.

- 74- Bishop GA, Moore CR, Xie P et al. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 597:131–151.
- 75- Hristov KK, Knox KA, Mitev VI. Regulation of tyrosine phosphorylation during the CD40-mediated rescue of Ramos-BL B cells from BCR-triggered apoptosis. *Int J Mol Med.* 2005; 16:937–941.
- 76- Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40–CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:1931–1936.
- 77- Munroe ME, Bishop GA. A costimulatory function for T cell CD40. *J Immunol.* 2007; 178:671–682.
- 78- Basok A, Shnaider A, Man L et al. CD40 is expressed on human peritoneal mesothelial cells and upregulates the production of interleukin-15 and RANTES. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:695–702.
- 79- Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ et al. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology.* 2000; 100:441–448.
- 80- Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1999; 189: 843–853.
- 81- Bishop GA, Hostager BS, Brown KD. Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2002; 72:19–23.
- 82- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25:280–288.
- 83- Karras JG, Wang Z, Huo L et al. Induction of STAT protein signaling through the CD40 receptor in B lymphocytes: distinct STAT activation following surface Ig and CD40 receptor engagement. *J Immunol.* 1997; 159:4350–4355.
- 84- Saemann MD, Kelemen P, Zeyda M et al. CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited. *Transplant Proc.* 2002; 34:1407–1408.

- 85- Liu ZL, Hu J, Xiao XF et al. The CD40 rs1883832 polymorphism affects sepsis susceptibility and sCD40L levels. *BioMed Res. Int.* 2018; 2018.
- 86- Ferrari S, Giliani S, Insalaco A et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:12614–12619.
- 87- Shiraki K, Sugimoto K, Okano H et al. CD40 expression in HCV-associated chronic liver diseases. *Int J Mol Med.* 2006; 18:559–563.
- 88- Sharma MD, Leite de Moraes M, Zavala F et al. Induction and inhibition of CD40-CD40 ligand interactions: a new strategy underlying host-virus relationships. *J Immunol.* 1998; 161:5357–5365.
- 89- Laman JD, De Boer M, Hart BA. CD40 in clinical inflammation: from multiple sclerosis to atherosclerosis. *Dev Immunol.* 1998; 6:215–222.
- 90- Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity.* 2004; 37:457–464.
- 91- Rizvi M, Pathak D, Freedman JE et al. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med.* 2008; 14:530–538.
- 92- Chen C, Chai H, Wang X et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood.* 2008; 112:3205-3216.
- 93- Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007; 9:289-320.
- 94- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999; 234:177–86.
- 95- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409:928–33.
- 96- Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998; 280:1077–82.
- 97- Li WH, Sadler LA. Low nucleotide diversity in man. *Genetics.* 1991; 129:513–23.

- 98-** Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000; 58:250–64.
- 99-** Holland PM, Abramson RD, Watson R et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88:7276–80.
- 100-** Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal.* 1999; 14:143–49.
- 101-** National Library of Medicine SNP veritabanı. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=cd40+homo+sapiens>. Erişim Tarihi: 18.05.2022
- 102-** Putlyaeva LV, Demin DE, Korneev KV et al. Potential markers of autoimmune diseases, alleles rs115662534 (T) and rs548231435 (C), disrupt the binding of transcription factors STAT1 and EBF1 to the regulatory elements of human CD40 gene. *Biochem (Mosc).* 2018; 83(12):1534-1542.
- 103-** Yun Y, Ma C, Ma X. The SNP rs1883832 in CD40 gene and risk of atherosclerosis in Chinese population: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(5):97289.
- 104-** Deng ZH, Sun MH, Li YS et al. Single nucleotide polymorphisms in the CD40 gene associate with the disease susceptibility and severity in knee osteoarthritis in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017; 18(1):1-8.
- 105-** Jacobson EM, Huber AK, Akeno N et al. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun.* 2007; 8(3):205–14.
- 106-** Wang M, Li Y, Li W et al. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study. *DNA Cell Biol.* 2011; 30(3):173–8.
- 107-** Rodriguez-Rodriguez L, Castaneda S, Vazquez-Rodriguez TR et al. Influence of CD40 rs1883832 polymorphism in susceptibility to and clinical manifestations of biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2010; 37(10):2076–80.

- 108-** Dolen Y, Yilmaz G, Esendagli G et al. CD40 -1C>T single nucleotide polymorphism and CD40 expression on breast tumors. Cytokine. 2010; 50:243–244.
- 109-** Smets I, Fiddes B, Garcia-Perez JE et al. Multiple sclerosis risk variants alter expression of co-stimulatory genes in B cells. Brain. 2018; 141(3):786-796.
- 110-** Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. Ann Rheum Dis. 2011; 70(12):2184-2190.
- 111-** Thermo Fisher Scientific TaqMan® SNP Genotyping Assays-Search Tool-Search-Results-C___1260190_10. Available at https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___1260190_10. Erişim Tarihi: 01.05.2022
- 112-** EZ1® DSP DNA Blood Kit Handbook. Available at <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=9322fe86-6626-446f-9218-072f85ad9f56&lang=en>. Erişim Tarihi: 11.04.2022
- 113-** Gharizadeh B. Method Development and Applications of Pyrosequencing Technology. 1st ed. Stockholm: Royal Institute of Technology; 2003, p:64.
- 114-** Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Res. 2001; 11:3-11.
- 115-** Gharizadeh B, Ghaderi M, Nyren P. Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. Tech. 2007; 47:129-132.
- 116-** Fakruddin MD, Chowdhury A. Pyrosequencing an alternative to traditional Sanger sequencing. Am J Biochem Biotechnol. 2012; 8:14-20.
- 117-** PyroMark Q24 Kullanım Kılavuzu. <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=59f0275d-e60f-4517-b786-b0e0ca13952e&lang=en>. Erişim Tarihi: 12.04.2022
- 118-** FMF Pyrosequencing Kitikullanım Kılavuzu. Üretici Firma tarafından temin edilmiştir. Qiagen Türkiye. 2020.
- 119-** Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ. 2005; 29(3):151-159.

- 120-** Higuchi R, Fockler C, Dollinger G et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotechnol.* 1993; 11:1026 – 1030.
- 121-** BioInformatics. The Market for Real-Time PCR Reagents & Instrumentation. Arlington. VA: BioInformatics. 2003.
- 122-** Akin H, Onay H, Turker E et al. MEFV mutations in patients with Familial Mediterranean Fever from the Aegean region of Turkey. *Mol Biol Rep.* 2010; 37.1:93-8.
- 123-** Coker I, Colak A, Yolcu I et al. MEFV gene mutation spectrum in familial Mediterranean fever (FMF): a single center study in the Aegean region of Turkey. *Z fur Rheumatol.* 2011; 70.6:511-6.
- 124-** Turkish FMF StudyGroup. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nation wide multicenter study. *Medicine.* 2005; 84.1:1-11.
- 125-** Bilge NŞY, Sari I, Solmaz D et al. The distribution of MEFV mutations in Turkish FMF patients: multicenter study representing results of Anatolia. *Turk J Med Sci.* 2019; 49.2:472-7.
- 126-** Etem E, Deveci SD, Erol D et al. Familial Mediterranean Fever: a retrospective clinical and molecular study in the East of Anatolia region of Turkey. *Open Rheumatol J.* 2010; 4:1-6.
- 127-** Coşkun S, Ustyol L, Bayram Y et al. The spectrum of MEFV gene mutations and genotypes in Van province, the eastern region of Turkey, and report of a novel mutation (R361T). *Gene.* 2015; 562:128-31.
- 128-** Dogan H, Bayrak FO, Emet M et al. Familial Mediterranean fever gene mutations in north-eastern part of Anatolia with special respect to rare mutations. *Gene.* 2015; 568:170-5.
- 129-** Dundar M, Emirogullari EF, Kiraz A et al. Common familial Mediterranean fever gene mutations in a Turkish cohort. *Mol Biol Rep.* 2011; 38:5065-9.
- 130-** Ceylan GG, Ceylan C, Ozturk E. Frequency of alterations in the MEFV gene and clinical signs in familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey. *Genet Mol Res.* 2012; 11:1185-94.

- 131-** Demirkaya E, Tunca Y, Gok F et al. A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol*. 2008; 27:729-32.
- 132-** Coşkun S, Kurtgöz S, Keskin E et al. Frequency of mutations in Mediterranean fever gene, with gender and genotype-phenotype correlations in a Turkish population. *J Genet*. 2015; 94:629-35.
- 133-** Özdemir FMA, Gülez N, Makay B. Evaluation of the international severity score for FMF (ISSF) scores in Turkish children diagnosed with FMF: a single-center experience. *Clin Rheumatol*. 2021;1-7.
- 134-** Gunesacar R, Celik MM, Arica V et al. Frequency of MEFV gene mutations in Hatay province, Mediterranean region of Turkey and report of a novel missense mutation (I247V). *Gene*. 2014; 10.546:195-9.
- 135-** Evliyaoglu O, Bilici S, Yolbas I et al. Diyarbakır yöresi Ailevi Akdeniz Ateşli çocuklarda MEFV gen mutasyon sıklıkları. *Dicle Tip Derg*. 2009; 36:2.
- 136-** Özkol H, Yildirim IH, Tülüce Y et al. The Prevalence of “MEFV” Gene Mutations in Rheumatoid Arthritis Patients Inhabiting the Van Province and Surroundings. *Turk J Phys Med Rehabil*. 2014; 60:1.
- 137-** Krishnappa P, Kong HM, Mohamad IB et al. CD40 polymorphism in cervical carcinoma in a subset of Malaysian population. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017; 43(5):923-928.
- 138-** Zhang B, Wu T, Song C et al. Association of CD40--1C/T polymorphism with cerebral infarction susceptibility and its effect on sCD40L in Chinese population. *Int Immunopharmacol*. 2013; 16:461–465.
- 139-** Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T et al. A Graves’ disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology*. 2005; 146:2684–2691.
- 140-** Wang D, Chen J, Zhang H et al. Role of different CD40 polymorphisms in Graves’ disease and Hashimoto’s thyroiditis. *Immunol Invest*. 2017; 46(6):544-551.

- 141-** Shuang C, Dalin L, Weiguang Y et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China. *PloS one*. 2011; 6(8):e23762.
- 142-** Deng ZH, Sun MH, Li Y et al. Single nucleotide polymorphisms in the CD40 gene associate with the disease susceptibility and severity in knee osteoarthritis in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2017; 18(1):1-8.
- 143-** Liu ZL, Hu J, Xiao XF et al. The CD40 rs1883832 polymorphism affects sepsis susceptibility and sCD40L levels. *Biomed Res Int*. 2018.
- 144-** Yun Y, Ma C, Ma X. The SNP rs1883832 in CD40 gene and risk of atherosclerosis in Chinese population: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(5):e97289.
- 145-** Inal EE, Rüstemoğlu A, Inanır A et al. Associations of rs4810485 and rs1883832 polymorphisms of CD40 gene with susceptibility and clinical findings of Behçet's disease. *Rheumatol Int*. 2015; 35(5):837-843.
- 146-** Dolen Y, Yilmaz G, Esendagli G et al. CD40 -1C >T single nucleotide polymorphism and CD40 expression on breast tumors. *Cytokine*. 2010; 50:243–244.
- 147-** Kuo HC, Chao MC, Hsu YW et al. CD40 Gene polymorphisms associated with susceptibility and coronary artery lesions of Kawasaki disease in the Taiwanese population. *Sci World J*. 2012.

9. EKLER

9.1.Özgeçmiş

Adı	Mahir	Soyadı	BİNİCİ
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.	Tel	
E- posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Dicle Üniversitesi SBE Tıbbi Biyoloji	Devam Ediyor
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi SBE Tıbbi Biyoloji	2016
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji	2011
Lise	Namık Kemal Lisesi (Diyarbakır)	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma Görevlisi	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji	2013-2022

Yabancı Dil Sınav Notu									
KPDS	ÜDS	YÖKDİL	IELTS PBT	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
71,000 (2009)	77,500 (2009)	81,250 (2017)	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2012 ilkbahar)	85,85358	71,70708	85,01999

Proje Deneyimi

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Sakız Ağacının (Pistacia Lentiscus L.) Juvenil Ve Olgun Eksplantlarının Mikroçoğaltımı, Kriyoprezervasyonu ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi	Tübitak	243.292	01.05.2011- 01.05.2014	Bursiyer	Ulusal
Doktora Projesi	Düba	31.000		Araştırmacı	Ulusal

9.2.İntihal Raporu

Pediatric Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarda CD40 Polimorfizmi

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 17	% 4	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
3	diclemedj.org İnternet Kaynağı	% 3
4	hastane.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikerisim.kku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

9.3.Etik Kurul Raporu

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR
NONINTERVENTIONAL STUDIES**

139

KARAR					
Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ, Prof. Dr. Selahattin KATAR, Mahir BİNİCİ isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Pediatrik ailesel akdeniz ateşi hastalarda CD40 polimorfizmi" başlıklı araştırmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir. Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.					
DECISION					
The project titled as "CD40 gene polymorphisms in pediatric patients with familial mediterranean fever" planned by Selahattin TEKEŞ, Selahattin KATAR, Mahir BİNİCİ has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.					
Oturum No (Meeting number) :		Tarih (Date): 30.05.2019		Saat (Hour): 11:00-12:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Hüseyin BÜYÜKBAYRAM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji	
2	Prof. Dr.	Levent ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	Katılmış
3	Prof. Dr.	Aziz KARABULUT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kardiyoloji	
4	Prof. Dr.	Cihan AKGÜL ÖZMEN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
5	Prof. Dr.	Haktan KARAMAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
6	Doç. Dr.	İlker KELLE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
7	Doç. Dr.	Zülfükar YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
8	Doç. Dr.	M. Veyis BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
9	Doç. Dr.	Ezeli AZARKAN	Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi	Öğretim Üyesi	Katılmış
10	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
11	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DIYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

9.4.Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu



DİCLE ÜNİVERSİTESİ
BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU
LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sizi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi **Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı tarafından yürütülen “PEDİATRİK AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARDA CD40 POLİMORFİZMİ”** başlıklı **araştırmaya** davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Bu çalışmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkına sahipsiniz. **Çalışmayı yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onam verdiğiniz** biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen **formlardaki** soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler :

- a. Araştırmanın Amacı: CD40 gen polimorfizminin Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) ile ilişkisini saptamak
- b. Araştırmanın İçeriği FMF çocuk yaş grubundaki hastalarda CD40 gen polimorfizmini çalışmak için EDTA'lı tüpe kan örneği almak
- c. Araştırmanın Nedeni: () Bilimsel araştırma (x) Tez çalışması
- d. Araştırmanın Öngörülen Süresi: 6 Ay
- e. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 200
- f. Araştırmanın Yapılacağı Yer(ler): Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

2. Çalışmaya Katılım Onayı :

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce katılımcıya/gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı, soru sorma ve tartışma imkânı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.** 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.

Katılımcının (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

(Varsa) Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin;

Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)

Anne

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

Baba

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

ARAŞTIRICININ :

Adı-Soyadı : Mahir Binici

Tel : 05435341613

e-posta adresi : binici.mahir@hotmail.com

Not: Bu form, iki nüsha halinde düzenlenir. Bu nüshalardan biri imza karşılığında gönüllü kişiye verilir, diğeri araştırmacı tarafından saklanır.

9.5.Doktora Makalesi



Özgün Araştırma / Original Article

Çocuk Ailesel Akdeniz Ateşi Hastalarında MEFV Mutasyonlarının Dağılımı: Türkiye'nin Güneydoğusunda Tek Merkezli Çalışma

Mahir Binici¹, Selahaddin Tekes¹, Mahmut Balkan¹, Diclehan Oral¹, İlyas Yücel¹, Şaban Tunç¹

¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D., Diyarbakır, Türkiye

Geliş: 15.02.2022; Revizyon: 24.05.2022; Kabul Tarihi: 25.05.2022

Öz

Amaç: Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), Akdeniz'de yaşayan etnik gruplarda (Türkler, Araplar, Yahudiler ve Ermeniler) görülen resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalıktır. Farklı coğrafi bölgelerde ve etnik gruplarda FMF'deki MEFV mutasyon değişimi farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, son yıllara ait mutasyon dağılımını belirleyerek bölgemizdeki MEFV mutasyon dağılımı verileri ile ülke geneli ve diğer bölgelerin mutasyon dağılımını karşılaştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Merkezimize sevk edilen FMF klinik semptomları tespit edilen 286 hastanın moleküler test sonuçlarını değerlendirdik. Moleküler analiz için hastaların pyrosequencing yöntemi kullanılarak MEFV genindeki 22 yaygın mutasyon analizi yapıldı.

Bulgular: 286 hastanın genetik analizi sonucu; 74 (%25,87) hastanın 27'sinin homozigot (%9,44), 47'sinin bileşik heterozigot (%16,44) mutasyona sahip olduğunu, 212'sinin (%74,13) isesadece tek bir mutasyon taşıdığına ortaya koydu. Ailel frekansları göz önüne alındığında en yaygın mutasyonlar; E148Q (%32,50), M694V (%26,94), V726A (%10,83), R761H (%10,83), M680I (G>C) (%6,11) ve P369S (%5,56) şeklindedir.

Sonuç: Bu tek merkezli çalışmada, Türkiye'nin güneydoğusundaki çocuk FMF hastalarından elde edilen yaygın MEFV gen mutasyonlarının sıklıkları hakkında bilgi verdik. Hastaların yaklaşık yarısı ailelerinde en az bir E148Q veya M694V mutasyonu taşıyordu. Bölgemizdeki verileri ülke geneli ve Ege bölgesi ile karşılaştırdığımızda en sık rastlanan mutasyon açısından farklılıklar olduğu gözlemlenmektedir. Çalışma sonuçlarımız ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, mutasyon oranları arasında farklılıklar olduğu gözlemlenmektedir. Bu çalışmayla bölgemizdeki FMF hastalarının mutasyon dağılımlarının güncel verileri elde edilerek literatüre katkıda bulunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Otoinflamatuvar hastalık, Ailesel Akdeniz Ateşi, MEFV geni, Mutasyon

DOI: 10.5798/dicletip.1128958

Korrespondans Adresi / Correspondence: Mahir Binici, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D. Posta kodu: 21200 Sur/Diyarbakır, Türkiye e-mail: binici.mahir@gmail.com