

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

PERİYODİK ATEŞ SENDROMLARINDA TNFRSF1A
GENİ VARYANTLARININ ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI

Selime AKDENİZ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

PERİYODİK ATEŞ SENDROMLARINDA TNFRSF1A
GENİ VARYANTLARININ ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI

Selime AKDENİZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. A. Esra MANGUOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 2008.02.0122.005)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir./...../2010

Tez Danışmanı :Yrd. Doç. Dr. A. Esra MANGUOĞLU

Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye :Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye :Prof. Dr. Güven LÜLECİ

Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye :Prof. Dr. Ayşen BİNGÖL BOZ

Akdeniz Üniversitesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :Doç. Dr. Özgül ALPER

Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.... tarih ve/..... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

“Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom” ilk kez 1982 yılında Williamson ve arkadaşları tarafından İrlanda/İskoçya kökenli bir ailede “Ailesel Hibernian Ateş” olarak tanımlanmıştır. 1998 yılında sendromdan sorumlu gen 12 nolu kromozomun kısa kolunda bulunan “Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü Süper Ailesi 1A” (Tumour Necrosis Factor Receptor Super Family 1A / TNFRSF1A) olarak tanımlanmış ve sendrom “TNF Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS)” adını almıştır. Sendrom başta Kuzey Avrupa ülkeleri olmak üzere Hindistan, Türkiye, Japonya, İsrail gibi birçok ülkede tanımlanmış olup geniş bir etnik çeşitlilik sergilemektedir.

TNFRSF1A geninde şimdiye kadar 98 farklı varyasyon tanımlanmış ve bu varyasyonların 65’inin TRAPS fenotipine yol açtığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda, klinik bulguları ile periyodik ateş sendromu tablosu oluşturan olgularda, TNFRSF1A geni varyantlarının dağılımının ve sıklığının belirlenmesi amaçlandı. Çalışmaya dahil edilen 30 hastada TNFRSF1A geninin tüm eksonları için DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Olgularda, literatürde TRAPS fenotipine yol açtığı tespit edilmiş varyasyonlardan hiçbirisi bulunamadı. Ancak, 18 olguda 1 numaralı ekson bölgesindeki sinonim c.36 A>G (G allel frekansı %40, A allel frekansı %60), 27 olguda 4 numaralı intron bölgesinde c.473–33 T>C (T allel frekansı %28, C allel frekansı %72), 18 olguda 6 numaralı intron bölgesinde c.625+10 A>G (A allel frekansı %62, G allel frekansı %38), 16 olguda 7 numaralı intron bölgesinde c.740–9 T>C (C allel frekansı %30, T allel frekansı %70) transisyonları ve önceden bilinen bu değişimlere ek olarak ilk defa bu çalışmada tanımlanan 6 numaralı intron bölgesinde c.626–32 G>T transversiyonu da 1 olguda saptandı.

Çalışmamız, ülkemizde periyodik ateş sendromlarında, klinik tablonun oluşmasında, TNFRSF1A geninin öneminin araştırıldığı, geniş olgu grubunda yapılan ilk çalışma niteliğinde olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: DNA dizi analizi, Periyodik ateş sendromu, TRAPS, TNFRSF1A.

ABSTRACT

“Tumour Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome” was reported for the first time as “Familial Hibernian Fever” in Irish/Scottish family by Williamson and his collaborators in 1982. The gene responsible for the syndrome was defined in 1998 as Tumour Necrosis Factor Receptor Super Family 1A (TNFRSF1A) which is located in the short arm of chromosome 12, and later the syndrome was identified as TNF Receptor Associated Periodic Syndrome (TRAPS). The syndrome was reported mainly in European countries as well as other countries such as India, Turkey, Japan, Israel and exhibits a broad ethnic diversity.

There have been 98 different variants of TNFRSF1A identified so far, and 65 of which were reported to cause TRAPS phenotype.

Our aim was to evaluate the distribution and frequency of TNFRSF1A gene variants in cases with periodic fever syndrome symptoms. The DNA sequence analysis for all exons of TNFRSF1A gene was performed for 30 cases. None of the mutations that was reported as TRAPS causing before, was identified in our study. However a synonym c.36 A>G transition in exon 1 in 18 cases (G allele frequency %40, A allele frequency %60), c.473–33 T>C transition in intron 4 in 27 cases (T allele frequency %28, C allele frequency %72), c.625+10 A>G transition in intron 6 in 18 cases (A allele frequency %62, G allele frequency %38), c.740–9 T>C transition in intron 7 in 16 cases (C allele frequency %30, T allele frequency %70) and a novel transversion c.626–32 G>T in intron 6 in 1 case were detected.

Our study is important for being, in our country, the first study in which the importance of TNFRSF1A gene variants in clinical manifestations of TRAPS in a large patient group was investigated.

Keywords: DNA sequencing analysis, Periodic fever syndrome, TRAPS, TNFRSF1A.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında, bilimsel farkındalık, doğru araştırma ve değerlendirme, bilimsel olgulara neden sonuç ilişkisine dayalı yorum getirme yetilerini kazandıran, ilgi ve yol göstericiliğini hep yanımda hissettiğim Sayın Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. A. Esra MANGUOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilincin gelişmesinde ve bilimsel araştırmanın inceliklerinin özümsemesinde gösterdiği hassasiyet, yol göstericiliği ve desteği için Sayın Prof. Dr. Güven LÜLECİ'ye,

Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI, sayın hocaları, araştırma görevlileri, teknisyen ve sekreterlerine,

Yüksek lisans tezimin gerçekleşmesi için gerekli olguları sağlayan, tezimin başlangıcından beri ilgi, özveri ve desteklerini esirgemeyen, yol göstericilik ve hassasiyetleri için Sayın Prof. Dr. Ayşen BİNGÖL BOZ ve Prof. Dr. İbrahim KESER'e

Yüksek lisans tezimin tamamlanabilmesi için gerekli olguları sağlayan Sayın Prof. Dr. Sara Şebnem KILIÇ ve Uzm. Dr. Demet HAFIZOĞLU'na,

Tüm eğitim yaşamım boyunca arkamda olduklarını göstererek bana inanan, güvenen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayat mücadelemdeki en büyük destekçim olan çok sevgili AİLEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sistemik Otoenflamatuar Sendromlar	2
2.2. Kalıtsal Periyodik Ateş Sendromları	4
2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA; OMIM 249100)	5
2.2.2. Hiperimmünoglobulin D ve Periyodik Ateş Sendromu (HIDS; OMIM 260920)	8
2.2.3. Muckle–Wells Sendromu (OMIM 191900)	10
2.2.4. Neonatal Başlangıçlı Multisistemik Enflamatuar Hastalık (NOMID) / Kronik İnfantil Kutanöz ve Artikular Sendrom (CINCA; OMIM 607115)	12
2.2.5. Ailesel Soğuk Otoenflamatuar Sendrom (Ailesel Soğuk Ürtiker–FCAS; OMIM 120100)	12
2.2.6. Piyojenik Artirit ile Piyoderma Gangrenosum ve Akne Sendromu (PAPA; OMIM 604416)	12
2.2.7. Blau Sendromu veya Ailesel Granüloamatöz Artirit (OMIM 186580)	13
2.2.8. Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü ile İlişkili Periyodik Ateş Sendromu (TRAPS; OMIM 142680)	14
2.2.8.1. TRAPS Fenotipinde Gözlenen Klinik Bulgular	15

2.2.8.2.	TRAPS'in Genetik Temeli	15
2.2.8.3.	TNF α ve TNFRSF1A'nın Yapısı	15
2.2.8.4.	TRAPS'de Reseptör Ayrılma (Shedding) Mekanizması	17
2.2.8.5.	TNF α ve TNFRSF1A Sinyal Yolu	17
2.2.8.6.	TNFRSF1A'nın TRAPS'deki Rolü	20
2.2.8.7.	TNFRSF1A Mutasyonları	21
2.2.8.8.	TRAPS'in Tedavisi	25
MATERYAL ve YÖNTEMLER		26
3.1.	Periyodik Ateş Sendromu Şüphesi Taşıyan Olguların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	26
3.2.	Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Periferel Kan Örneklerinin Alımı	27
3.3.	Periferel Kandan DNA Eldesi	28
3.3.1.	Kullanılan Solüsyonlar	28
3.3.2.	DNA İzolasyonu Basamakları	29
3.4.	DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	30
3.5.	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi	30
3.5.1.	PCR Reaksiyonlarında TNFRSF1A Geninin Tüm Eksonlarını Amplifiye Etmek İçin Kullanılan Primerler	30
3.5.2.	PCR Reaksiyonunun İçeriği	33
3.5.3.	PCR Programı	33
3.6.	Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	34
3.6.1.	Kullanılan Solüsyonlar	34
3.6.2.	%2lik Agaroz Jelin Hazırlanması	34
3.6.3.	PCR Ürünlerinin Elektroforez İşlemi	34
3.7.	PCR Reaksiyonun Sonunda Amplikonların Temizlenmesi	34
3.8.	DNA Dizi Analizi Reaksiyonu	35
3.8.1.	DNA Dizi Analizi PCR Programı	35
3.9.	DNA Dizi Analizi Reaksiyonu sonunda Amplikonların Temizlenmesi	35
3.10.	Örneklerin Cihaza Yüklenmesi ve Analizi	35
BULGULAR		36
4.1.	Klinik Bulgular	36
4.2.	Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	38

TARTIŞMA ve SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72
EKLER	73
Ek–1 Periyodik Otoenflamatuar Sendromlar Hasta Hikâye Formu	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAA	:Ailesel Akdeniz Ateşi
ADAM17	:Disintegrin ve Metaloproteinaz 17 (A Disintegrin and Metalloprotease)
AP-1	:Aktive Edici Protein-1 (Activating Protein-1)
ASC	:Apopitoz ile İlişkili Benek Benzeri protein ile CARD (Apoptosis Associated Speck Like Domain with CARD)
ATF2	:Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 2(Activating Transcription Factor 2)
BB-ZF	:B Kutu Çinko Parmak Bölgesi (B Box Zinc Finger Domain)
CAPS	:Kriyopirin ile İlişkili Periyodik Sendrom (Criopyrin Associated Periodic Syndrome)
CARD	:Kaspaz Alınma Bölgesi (Caspase Recruitment Domain)
CC	:Sarılmış Sarmal Bölge (Coiled Coil Domain)
CD	:Farklılaşma Grubu (Cluster of Differentiation)
CD2BP1	:CD2 Bağlayıcı Protein1 (CD2 Binding Protein1)
CHOP	:C/EBP-Homolog Protein
cIAP	:Apopitoz Proteinini Hücresel İnhibitörü (Cellular İnhibitor of Apoptoz Protein)
CIAS1	:Soğuk ile Tetiklenen Otoenflamatuar Sendrom 1 Geni (Cold Induced Autoinflammatory Syndrome 1)
CINCA	:Kronik İnfantil Nörolojik Kutanoz ve Artikular Sendrom
CRD	:Sisteince Zengin Bölge (Cysteine-Rich Domain)
CRP	:C Reaktif Proteinini
DD	:Ölüm Bölgesi (Death Domain)
DED	:Ölüm Etki Bölgesi (Death Effector Domain)
EBP	:Kuvvetlendirici Bağlayıcı Protein (Enhancer Binding protein)
Elk1	:Efrin Benzeri Kinaz (Ephrin Like Kinase)
ESH	:Eritrosit Sedimentasyon Hızı
FADD	:Fas ile İlişkili Ölüm Bölgesi (Fas-Associated Death Domain)
FCAS	:Ailesel Soğuk Ürtiker

FHF	:Ailesel Hibernian Ateş
HIDS	:Hiperimmumoglobulinemi D ve Periyodik Ateş Sendromu
IgD	:İmmunoglobulin D
IKK	:IκB kinaz kompleksi
IL-18	:İnterlökin 18
IL-1β	:İnterlökin 1 Beta
IκB	:Kappa B İnhibitörü (Inhibitor of Kappa B)
kDa	:Kilo Dalton
LRR	:Lösence Zengin Tekrar (Leucine-Rich Repeat)
MA	:Mevalonik Asidüri
MAPK	:Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MEFV	:Pirin Geni
MEK	:MAPK Kinaz
MEKK	:MAPK Kinaz Kinaz
MVK	:Mevalonat Kinaz
MWS	:Muckle-Wells Sendromu
NALP3	:NACHT bölgesi, lösence zengin tekrar ve pirin bölgesi içeren protein
NCBI	:National Center of Biotechnology Information
NEMO	:NF-κβ'ye Özel Ayarlayıcı (NF-κβ Essential Modulator)
NF-κB	:Çekirdek Faktörü Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)
NOMID	:Neonatal Başlangıçlı Multisistem Enflamatuvar Hastalık
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLAD	:Ligand Öncesi Toplanma Bölgesi (Preligand Assembly Domain)
PMA	:4b-Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PSTPIP1	:Prolin Serin Treonin Fosfataz Etkileşim Proteini1 (Proline-Serine-Threonine Phosphatase-Interacting Protein 1)
PyD	:Pirin Bölgesi (Pyrin Domain)
PYPAF1	:Pirin bölgesi içeren APAF benzeri protein
RIP	:Reseptör Etkileşim Proteini (Receptor Interacting Protein)
SAA	:Serum Amiloid A Proteini
SODD	:Ölüm Domaini Susturucusu (Silencer of Death Domain)
TACE	:TNFα Dönüştüren Enzim (TNFα-converting enzyme)

TAK1	:TGF- β Aktive Kinaz (TGF- β Activated Kinase)
TANK	:TRAF2 Ailesi Üyesi ile İlişkili NF- κ B Aktivatörü (TRAF2 family member associated NF- κ B activator)
TGF-β	:Transforme Edici Büyüme Faktörü β
TNF	:Tümör Nekroze Edici Faktör
TNFRSF1A	:Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü Süper Ailesi 1A
TRADD	:TNF Reseptörü ile İlişkili Ölüm Bölgesi (TNF Receptor Associated Death Domain)
TRAF2	:TNF Reseptör ile İlişkili Faktör 2 (TNF Receptor Associated Factor)
TRAPS	:TNF Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2.1. Pirin geni (MEFV) ile pirin proteininin şematik şekli	6
2.2. Mevalonat kinaz geni (MVK) ile mevalonat kinaz proteininin şematik şekli	9
2.3. Kriyopirin geni (CIAS1) ile kriyopirin proteininin şematik şekli	11
2.4. CD2BP1 geni ile CD2BP1 proteininin şematik şekli	13
2.5. Williamson ve arkadaşları tarafından Ailesel Hibernian Ateş tanısı alan ilk ailenin pedigrisi	14
2.6. TNFRSF1A geni ile TNFRSF1A proteininin şematik şekli	17
2.7. $TNF\alpha$ 'nın TNFRSF1A'ya bağlanmasıyla aktif hale gelen ana sinyal yolları	19
2.8. TNFRSF1A genindeki varyasyonların varyasyon tipine göre dağılımı	21
2.9. TNFRSF1A genindeki değişimlerin gen üzerindeki bölgelere göre dağılımı ve fenotip ile ilişkisi	22
2.10. TNFRSF1A genindeki varyasyonların ülkelere göre dağılımı ve fenotip ile ilişkisi	24
3.1. Tanısal skor denklemi	26
3.2. Tanısal skor değerine göre hastalığın tanısının konulmasında izlenecek algoritma	27
3.3. TNFRSF1A geninin 10 eksonunun NCBI Sequence Viewer programında görünümü	32
4.1. TNFRSF1A geni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri ile referans marker görüntüsü	38
4.2. TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	39
4.3. TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	39
4.4. TNFRSF1A geninin 2 ve 3 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	40
4.5. TNFRSF1A geninin 2 ve 3 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	41

4.6.	TNFRSF1A geninin 4 ve5 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	42
4.7.	TNFRSF1A geninin 4 ve 5 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	43
4.8.	TNFRSF1A geninin 6 ve 7 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	44
4.9.	TNFRSF1A geninin 6 ve 7 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	45
4.10.	TNFRSF1A geninin 8 ve 9 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	46
4.11.	TNFRSF1A geninin 8 ve 9 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	47
4.12.	TNFRSF1A geninin 10 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi	48
4.13.	TNFRSF1A geninin 10 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi	49
4.14.	TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunda saptanan c.36 A/G ve c.36 G/G varyasyonu	51
4.15.	TNFRSF1A geninin 4 numaralı intronunda saptanan c.473–33 T/C ve c.473–33 C/C varyasyonu	51
4.16.	TNFRSF1A geninin 6 numaralı intronunda saptanan c.625+10 A/G ve c.625+10 G/G varyasyonu	52
4.17.	TNFRSF1A geninin 6 numaralı intronunda saptanan c.626–32 G/T varyasyonu	52
4.18.	TNFRSF1A geninin 7 numaralı intronunda saptanan c.740–9 T/C ve c.740–9 C/C varyasyonu	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa No
2.1. Sistemik Otoenflamatuvar Hastalıklar	3
2.2. İnfevers veri tabanına göre Türk olgularda rapor edilen MVK geni varyasyonları	9
2.3. İnfevers veri tabanına göre Türk olgularda rapor edilen CIAS1 geni varyasyonları	11
2.4. Sisteince zengin bölgeler dışında rapor edilen TNFRSF1A değişimleri	23
2.5. TNFRSF1A geninde Türk olgularda rapor edilen değişimler	23
3.1. TNFRSF1A geninin PCR ile çoğaltılacak olan eksonları, ilgili primerleri ve amplikon büyüklükleri	31
3.2. 1, 2–3, 4–5, 6–7 ve 10 numaralı eksonların PCR reaksiyon içeriği	33
3.3. 8-9 numaralı eksonların PCR reaksiyon içeriği	33
3.4. DNA Dizileme Reaksiyon İçeriği	35
4.1. Klinik bulgu çizelgesi–1	36
4.2. Klinik bulgu çizelgesi–2	37
4.3. Olgularımızda saptanan nükleotid değişimleri	50
4.4. Olgularımızın klinik bulguları ile saptanan varyasyonların karşılaştırmalı çizelgesi	54

GİRİŞ ve AMAÇ

“Periyodik Ateş Sendromları”, yüksek ateş ve bölgesel yangının gözlemlendiği tekrar eden ataklar ile karakterize, Mendeliyan kalıtım gösteren sistemik otoenflamatuvar bir hastalık grubudur. Ataklar sırasında, eklemlerde, deride, karında ve gözde sistemik yangı tutulumu gözlenir. “Yangı”nın, enfeksiyon veya otoantikör gözlenmeksizin meydana gelmesi bu sendromları, otoenflamatuvar sendrom olarak adlandırılmasına neden olmuştur (1).

TRAPS, vücudun farklı bölgelerinde periyodik febril ataklar ve yangı ile karakterize periyodik ateş sendromudur. İlk olarak 1982’de Williamson ve arkadaşları tarafından “Ailesel Hibernian Ateş” olarak tanımlanmıştır (2, 3, 4). Daha sonra sendromdan sorumlu gen 12p13 bölgesinde yer alan TNFRSF1A olarak belirlenmiştir (5). Genin tanımlanmasına bağlı olarak ilgili genetik çalışmaların hız kazanmasıyla; Finlandiya, İrlanda, İskoçya Hollanda, Belçika, Fransa, Almanya gibi Avrupa ülkelerinde hastalıkla ilişkilendirilen mutasyonlar tanımlanmıştır (6). Sendromun, Avrupa dışında ilk olarak, 2002 yılında İsrailli Arap bir ailede ve ardından 2004 yılında Japon bir hastada rapor edilmesiyle etnik çeşitlilik kavramı önem kazanmaya başlamıştır (7, 8).

Ülkemizin Akdeniz Havzası’ndaki konumu ve Ailesel Akdeniz Ateşi’nin en sık gözlenen periyodik ateş sendromu olması nedeniyle (9), sebebi belli olmayan periyodik ateş ve yangı atakları ile kliniğe başvuran hastalarda ilk akla gelen sendrom Ailesel Akdeniz Ateşi’dir.

Periyodik ateş sendromları arasında genetik ve fenotipik heterojenitenin bulunması, literatürde TRAPS ile ilişkilendirilen 3 farklı TNFRSF1A mutasyonunun ilk olarak ülkemizde yaşayan Türk kökenli hastalarda rapor edilmiş olması (10, 11, 12) hem MEFV hem TNFRSF1A geninde mutasyon taşıyan çeşitli Avrupa ülkeleri kökenli olguların varlığı (13, 14, 15), TRAPS’in ülkemizdeki periyodik ateş profilindeki yerinin yeni araştırmalarla belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu nedenle, çalışmamızda, ülkemizin periyodik ateş sendromu profilinin açığa çıkarılmasına katkı sağlanması açısından, periyodik ateş sendromu bulgularıyla kliniğe başvuran hastalarda, TNFRSF1A genindeki mutasyonların taranması ve ülkemizde periyodik ateş sendromu profilinde TNFRSF1A geninin önemini ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Çocukluk çağında gözlenen hastalıklarda önemli bulgulardan biri olan ateş, sık olarak viral enfeksiyonlardan köken almakla beraber; enfeksiyon olmaksızın ateşin tekrarladığı durumlar, birçok kalıtsal veya kalıtsal olmayan nedenlerden kaynaklanabilir. Tekrar eden ateş ile ilişkilendirilen kalıtsal olmayan faktörler genellikle, neoplazi, bağışıklık sistemi hastalıkları, kronik sistemik hastalıklar veya romatizmal hastalıklardır (16, 17). Enfeksiyona bağlı bir etiyoloji gözlenmeksizin, seröz membran ve eklemlerdeki yangı ile birlikte meydana gelen tekrar eden ateş atakları ise “Kalıtsal Periyodik Ateş Sendromları”nın en belirgin özelliğini oluşturmaktadır (18).

2.1. Sistemik Otoenflamatuar Sendromlar

Sistemik otoenflamatuar sendromlar çoğunlukla bir dış uyaran olmaksızın, periyodik olarak tekrar eden yangısal ataklar ile karakterize bir hastalık grubunu oluşturur. Ataklar sırasında veya ataklar arasındaki dönemde oto–antikor (otoimmünite sırasında oluşan antikor) veya antijene özgü T hücresi gözlenmemesi, bu sendromları, vücudun kendi hücre, protein ve dokularına bağışıklık cevabı gösterdiği otoimmün hastalıklardan ayırmaktadır. Periyodik ateş sendromları da, serumda yüksek oranda oto–antikor veya antijene özgü T hücresi gözlenmeksizin oluşan yangı atakları halinde belirti gösterdiği için otoenflamatuar sendromlar olarak adlandırılmaktadır (1, 19, 20). Otoenflamatuar hastalık grubuna dahil olan hastalıklar hastalığın seyri, başlangıç yaşı, devam süresi ve belirtileri bakımından farklılıklara sahip olmalarına rağmen belirli ortak özellikleri paylaşmaktadır. Bu özellikler;

- Seröz zarlarda yangıyı takiben, tekrarlayan yüksek ateş atakları,
- Yangısal atakların aralıklı gözlenmesi
- Yangının kas ve eklem tutulumu
- Ortalama eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), serum akut faz proteinleri, C reaktif proteini (CRP) ve serum amiloid A (SAA) seviyelerinde artıştır (19, 21, 22, 23).

Sistemik otoenflamatuar hastalıklarda, periyodik olarak tekrar eden ateşe, periton (karın zarı) iltihabı, plevra (akciğer zarı) iltihabı, perikardiyum (kalbin etrafını saran zar) iltihabı, eklem iltihabı ve deri döküntüsü bulgularının eşlik ettiği durumlar bildirilmiştir (24).

Çizelge 2.1’de sistemik otoenflamatuar hastalıklar, kalıtım modelleri ve bu hastalıklardan sorumlu gen ve risk faktörleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Sistemik Otoenflamatuar Hastalıklar

Sistemik Otoenflamatuar Hastalıklar			
	OMIM*	Kalıtım*	Gen veya Risk Faktörleri
Kalıtsal Periyodik Ateş Sendromları			
• Ailesel Akdeniz Ateşi	249100	OR	MEFV
• TNF Reseptörü ile ilişkili Periyodik Sendrom	142680	OD	TNFRSF1A
• Hiperimmünoglobulinemi D ile Periyodik Ateş Sendromu	260920	OR	MVK
• Ailesel Soğuk Otoenflamatuar Sendromu	120100	OD	CIAS1/NALP3/PYPAF1
• Muckle–Wells Sendromu	191900	OD	CIAS1/NALP3/PYPAF1
• Neonatal Başlangıçlı Multisistemik Enflamatuar Hastalık / Kronik Infantil Kutanoz ve Artikular Sendrom	607115	Sporadik, OD	CIAS1/NALP3/PYPAF1
İdiyopatik Febril Hastalıklar			
• Periyodik Ateş, Aft, Farenjit, Adenoid Sendromu (PFAPA)		Genellikle Ailesel Değil	
• Sistemik Başlangıçlı Juvenil İdiyopatik Artrit (SOJIA)	604302	Kompleks	IL–6, MIF polimorfizmleri
• Yetişkin Başlangıçlı Still’s hastalığı		Genellikle Ailesel Değil	
Granüloematöz Hastalıklar			
• Crohn’s Hastalığı	266600	Kompleks	NOD2/CARD15, ABCB1 (Ala893), MEFV (?)
• Kronik Granüloematöz Sinovit ile üveit ve kraniyal nöropati (Blau Sendromu)	186580	OD	NOD2/CARD15
• Erken başlangıçlı Sarkoidoz	609464	Sporadik, OD	NOD2/CARD15
Piyojenik Hastalıklar			
• Piyojenik Artrit ile Piyoderma Gangrenosum ve Akne Sendromu (PAPA)	604416	OD	PSTPIP1
• Kronik Tekrarlayan Multifokal Osteomyelit (CRMO)	259680	Sporadik, OD	LPIN2 (Konjenital diseritropoietik anemi (Majeed syndrome) ile ilişkili olduğunda)
• Sinovit, Akne, Pustuloz, Hyerostoz ve Osteit Sendromu (SAPHO)		Genellikle Ailesel Değil	
Hemafagositik Hastalıklar			
• Primer Hemofagositik Lenfositosis	603553	OR	PRF1, RAB27A
• Makrofaj Aktivasyon Sendromu (MAS)	607624	Genellikle Ailesel Değil	Pediyatrik Romatizmal Hastalıklar
Komplement Hastalıkları			
• Kalıtsal Anjiyödem	106100	OD	C1NH
Vaskülitik Hastalıklar			
• Behçet Hastalığı	109650	Kompleks	HLA-B51
Otoenflamatuar hastalıkların diğer olası kategorileri, gut ve pseudogut gibi metabolik hastalıkları, Gaucher’s hastalığı ve Hermansky–Pudlak Sendromu gibi Depo hastalıkları ve idiyopatik Pulmoner Fibrozis gibi hastalıklarını içermektedir (21).			

*OMIM: Online Inheritance in Man, OR: Otozomal Resesif, OD: Otozomal Dominant

Otoenflamatuar hastalıkların birçoğu (Çizelge 2.1) doğuştan kazanılan bağışıklık sistemini düzenleyen genlerdeki mutasyonlar nedeni ile oluşur. Bu hastalıklar gerek klinikleri gerekse moleküler patogenezi bakımından kısmen aydınlatılmış hastalıklardır. Tekrarlayıcı ateşler bölgesel yangıyla ilişkilidir ve fenotipe yansımaları açısından oldukça büyük farklılıklar sergileyebilirler (23, 25).

2.2. Kalıtsal Periyodik Ateş Sendromları

Kalıtsal Periyodik ateş sendromları (Hereditary Periodic Fever Syndromes), genetik değişim sonucunda belirli aralıklarla meydana gelen klinik belirtiler ile uyum gösteren bir grup hastalığı kapsamakta ve Mendeliyan kalıtım göstermektedir (11). Sıklıkla tetikleyici faktörler ve otoimmünite belirtileri olmaksızın ortaya çıkan tekrarlayan yangı, bu grup sendromların anahtar belirtisidir (11, 18). Sistemik otoenflamatuar hastalıklardan olan periyodik ateş sendromlarında, serumda anti-nükleer antikor (otoimmün hastalıklarda artış gösteren doğrudan hücre çekirdeğini hedef alan oto-antikor) ve romatizmal faktör (romatoid artirit’li hastalarda organizmanın kendi dokusuna karşı gelişen antikor) gözlenmemektedir (11, 14, 15).

Tıp literatüründe, en sık gözlenen otoenflamatuar hastalık olarak tanımlanan dört kalıtsal periyodik ateş sendromu şu şekilde belirlenmiştir;

- Ailesel Akdeniz Ateşi
- Hiperimmünoglobulinemi D ile Periyodik Ateş Sendromu
- Muckle–Wells Sendromu
- Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom (19, 26).

Bu sendromlardan “Ailesel Akdeniz Ateşi” ve “Hiperimmünoglobulinemi D ile Periyodik Ateş Sendromu” otozomal resesif kalıtım gösterirken, “Muckle–Wells Sendromu ile “Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom” otozomal dominant kalıtılır (19, 27).

Daha sonra tanımlanan, otozomal dominant kalıtım gösteren 4 otoenflamatuar hastalık da kalıtsal periyodik ateş sendromu listesine eklenmiştir;

- Ailesel Soğuk Otoenflamatuar Sendrom
- Kronik İnfanitil Nörolojik Kutanöz ve Artikular Sendrom / Neonatal Başlangıçlı Multisistem Enflamatuar Hastalık
- Piyojenik Artirit ile Piyoderma Gangrenosum Ve Akne Sendromu Blau Sendromu veya Ailesel Granülomatöz Artirit

Blau ve PAPA sendromları, periyodik ateş sendromu grubuna en son dahil edildikleri için çizelge 2.1’de, “Kalıtsal Periyodik Ateş Sendromları” listesinde değil

“Granülomatöz Hastalıklar” ve Piyojenik Hastalıklar” başlıkları altında gösterilmiştir (19).

Son 10 yılda, kalıtsal otoenflamatuar hastalıkların hem klinik özellikleri hem de moleküler mekanizmalarının anlaşılması ile ilgili büyük ilerleme kaydedilmiştir (23). Aile hikâyesi, etnik köken, atakların yenidoğan dönemde veya bir yaşına kadar başlamış olması ile hastalığın seyri, kalıtsal otoenflamatuar hastalıklar açısından ayırıcı tanı hakkında bilgilendirici olabilmekle beraber, genetik test kesin tanı sağlamaktadır (1, 11).

2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA; OMIM 249100)

En sık gözlenen kalıtsal periyodik ateş sendromu olan Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA), çoğunlukla Ermeni, Arap, Sefardik Yahudi ve Türk populasyonlarını ve daha az sıklıkla İtalya, İspanya, Yunanistan, Portekiz, Fransa gibi diğer Akdeniz populasyonların etkilemekte ve otozomal resesif kalıtım göstermektedir (9). AAA temel olarak; tekrarlayan ateş, karın ve eklem ağrıları gibi klinik bulguların gözlemlendiği, hastalığın en ciddi komplikasyonu olarak ise bazı vakalarda amiloidoz gelişimi olan patogenezinin henüz tam anlamıyla netleşmediği bir kalıtsal periyodik ateş sendromudur (25,28).

AAA’da seröz zarlardaki yangıya bağlı tekrar eden ateş atakları sırasında; periton iltihabı, plevra iltihabı, perikardiyum iltihabı, eklem iltihabı, eritemli deri döküntüsü klinik öykünün bir parçası olabilmektedir (21, 23). Ateş, atak sırasında genellikle 38–40°C olup 12–72 saat sürer. Ataklar sırasında nötrofili, akut faz cevap ve etkilenen bölgelere polimorfonükleer lökosit akını vardır (25, 29).

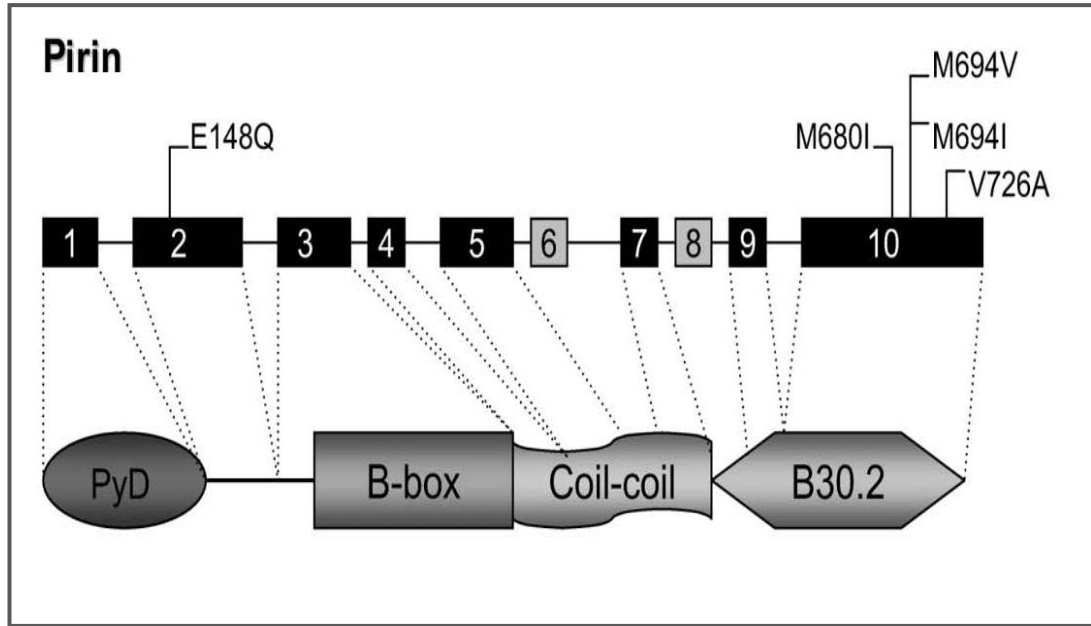
Akut faz proteinlerinden biri olan serum amiloid A (AA) proteini birikimine bağlı olarak AAA hastalarında amiloidoz gelişebilir (21). AAA’da gelişen amiloidoz, AA tipi amiloid fibrillerinden oluşmakta ve serum amiloid ile ilişkili protein (serum amyloid-associated protein – SAA) olarak isimlendirilen öncül proteinden gelişmektedir. Uzun süren doku hasarı ve yangı, SAA seviyelerinin yükselmesine yol açmaktadır (28).

AAA’dan sorumlu gen 1997 yılında iki farklı konsorsiyum (International FMF Consortium ve French FMF Consortium) tarafından 16 nolu kromozomun kısa kolunda klonlanmıştır. “**ME**diterranean **Fe**Ver” ifadesine atfen **MEFV** adı verilen bu gen 10 eksondan oluşmakta ve 781 aminoasitlik, Amerikalıların Pirin (Latince pyrexia: ateş düzenleyen protein), Fransızların Marenostrin (Latince Mareo nostrum: Akdeniz’in eski adı) adını verdikleri bir protein kodlamaktadır (28).

Pirin proteini 86 kDa ağırlığında arjinin ve lizin aminoasitlerince zengin, pozitif yüklü bir proteindir. Pirin proteini, dört fonksiyonel bölge içermektedir (Şekil 2.1);

- Amino (N) terminal ucunda “Pirin bölgesi” (PAD, PyD veya DAPIN olarak da isimlendirilir),
- “B kutu çinko parmak (B box zinc finger) bölgesi” (BB-ZF),
- “Sarılmış sarmal (Coiled coil-CC) bölge” ,
- Karboksi (C) terminal ucunda “B30.2 bölgesi” (28, 30).

Pirin proteinindeki çekirdek lokalizasyon sinyalinin varlığı, proteinin başta sadece çekirdekte bulunduğunu ve bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğünü düşündürmüştür. Ancak yapılan çalışmalar pirinin, eosinofil ve sitokin ile aktive olmuş monositlerde sitoplazmada, nötrofillerde ise çekirdekte bulunduğunu göstermiştir (21, 23, 25, 28). Bu bulgular, pirinin bulunduğu hücreye göre farklı proteinlerle etkileşime girerek, farklı fonksiyonları üstlenebileceğini göstermektedir. Pirin sitoplazmada nötrofillerdeki hücre iskeleti ile ilgili mekanizmaları düzenleyerek işlev görür. Çekirdekte ise, proenflamatuar sitokinleri baskılamaya veya antienflamatuar sitokinlerin artışına neden olmaktadır (21, 25, 28).



Şekil 2.1. Pirin geni (MEFV) ile pirin proteininin şematik şekli. Şekilde numara ile gösterilmiş kutular pirin geninin 10 eksonunu; gen ve protein arasındaki çizgiler ilgili ekson bölgelerinin kodladığı protein bölgelerini göstermektedir. Eksonlar üzerinde AAA açısından en sık rastlanan mutasyonlar gösterilmiştir (30).

Yangı ve apoptozda sinyal iletimi ve protein oligomerizasyonu, ölüm bölgesi–katlanma süper ailesine (death domain–fold superfamily) dahil olan protein protein etkileşim bölgeleri tarafından gerçekleştirilir. Bu süper aile 4 bölge içermektedir (31);

- Ölüm Bölgesi (Death Domain–DD)
- Ölüm Etki Bölgesi (Death Effector Domain–DED)
- Kaspaz Alınma Bölgesi (Caspase Recruitment Domain – CARD)
- Pirin Bölgesi (Pyrin Domain–PYD)

Her 4 bölge, bölgeler arasında elektrostatik yükleri aracılığıyla etkileşim oluşmasını sağlayan ve antiparalel düzenlenmiş 6 adet α heliks yapı içerir (21). CARD bölgesi, ölüm bölgesi ve ölüm etkileşim bölgelerinin fizyolojik pH’da kendi aralarında etkileşime girerek büyük molekül ağırlığına sahip kümeler oluşturdıkları tanımlanmıştır (31). Bu 4 bölgenin homo– ve hetero– etkileşimleri apoptotik ve yangısal komplekslerin oluşmasında anahtar rol oynar (32).

Pirin proteininin işlevini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalar, proteinin; ASC (apoptosis–associated speck like protein with a CARD) ve PSTPIP1 [proline serine threonine phosphatase interacting protein1/ CD2BP1 (CD2 binding protein 1)] proteinleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. ASC’nin apoptoz, interleukin–1 β ’nın (IL–1 β) işlenmesi ve salgılanması ile ilişkili prokaspaz–1 aktivasyonu ile yangı cevabının başlaması ve yayılmasında görevli bir transkripsiyon faktörü olan NF– κ B aktivasyonunda rol oynadığı tanımlanmıştır. PSTPIP1, pirinin yoğun olarak eksprese olduğu monositler ve nötrofillerde eksprese olmaktadır. PSTPIP1, PEST fosfatazlar [prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ve treonin (T)’den zengin protein tirozin fosfataz] ile substratları arasında önemli bir adaptör proteindir. PSTPIP1 ile pyrin proteini arasındaki bağlantı arttığında PEST fosfataz bağlantısının azaldığı düşünülmektedir. Dolayısıyla, hastalık fenotipinin bir kısmı, PEST fosfataz hedeflerinin fosforilasyon durumu ile ilişkilendirilmektedir (28).

Yangı sürecinin harekete geçirilmesinde anahtar rolü olan enflamazom çoklu bir protein yapısıdır. Enflamazomun protein bileşimini, enflamazom oluşumunu başlatan harekete geçirici protein belirlemekle birlikte bir enflamazom kaspaz–1, kaspaz–5, kriyopirin ve ASC’den oluşabilir. Enflamazom yangısal sitokin olan IL–1 β ve IL–18’in aktivasyonuna aracı olmaktadır (33, 34). Pirin proteininin ASC ile etkileşime girmesi, ASC’nin enflamazom oluşturmak üzere kriyopirin ile etkileşime girmesini, dolayısıyla kaspaz–1 aracılı enflamazom oluşumu ve buna bağlı IL–1 β salınımını engellemektedir. Pirinin, ASC’den bağımsız olarak da B30.2/rfp/SPRY bölgesi aracılığıyla pro–kaspaz–1 ve kaspaz–1’e bağlanarak IL–1 β salınımına engel olduğu gösterilmiştir. AAA ile ilişkilendirilmiş ASC mutasyonları tanımlanmamış olmasına rağmen; AAA fenotipine yol açan MEFV mutasyonlarından 31 tanesinin B30.2/rfp/SPRY bölgesini kodlayan 10 numaralı eksonda tanımlanmış olması; bu mutasyonların, pirin proteininin, prokaspaz–1 ve kaspaz–1’e bağlanmasını engelleyerek yangı profiline neden olduğunu düşündürmektedir (19).

MEFV geninde, “INFEVERS” veri tabanına göre şimdiye kadar 193 varyasyon bildirilmiştir. Bu varyasyonlardan 64 tanesi AAA fenotipine yol açmaktadır (6). MEFV mutasyonu taşıyıcılık frekansının, Kuzey Afrika Yahudileri, Aşkenazi Yahudileri, Türkler ve Araplar’da %20, Ermeniler ve Irak Yahudileri’nde %35–39 olduğu saptanmıştır (9). Özen ve arkadaşları 1998 yılında, ülkemizde 46.813 çocuk olgu ile yaptıkları epidemiyolojik çalışmada AAA prevalansını 9.3/10,000 olarak saptamışlardır (35).

Türk olgularda MEFV gen mutasyon frekansları tanı kriterleri ve olgu grubuna bağlı olarak değişim göstermekle birlikte M694V allelinin frekansı %21.6–51.55, E148Q allelinin frekansı %3.55–19.1, M680I allelinin frekansı %2.5–16, V726A allelinin frekansı %1–12, P369S allelinin frekansı %3.7, R761H allelinin frekansı %2, A744S allelinin frekansı %1.3, K695R allelinin frekansı %0.9 olarak bildirilmiştir (9, 34, 36, 37)

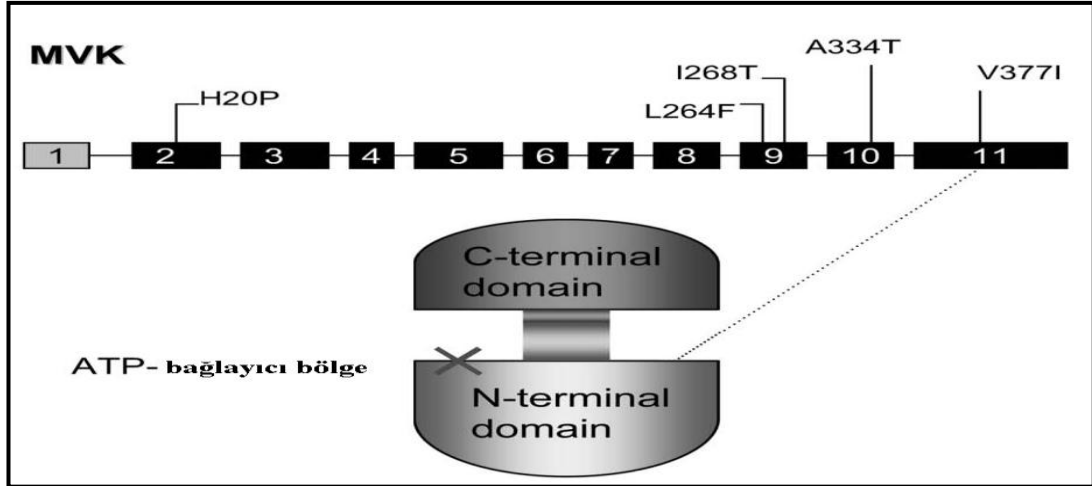
AAA hastalarında amiloidoz gelişme riski etnik gruplara göre farklılık göstermektedir (36). Homozigot M694V değişiminin Ermeni ve Yahudilerde, hastalığın ağır seyretmesinde ve amiloidoz gelişiminde belirleyici olduğu bulunmuştur (38). Türkiye’de Türk Ailesel Akdeniz Ateşi çalışma grubunun 1090 olgu ile yaptıkları çalışmada M694V allel frekansı %51.4 bulunmuş olup, bu mutasyon bu olgu grubunda amiloid gelişimi ile ilişkili bulunmamıştır. Aynı çalışmada, AAA hastalarında ateş %92.5, karın ağrısı %93.7, eklem yangısı %47.4, göğüs ağrısı %31.2 sıklığında tanımlanmıştır (39).

2.2.2. Hiperimmünoglobulinemi D ve Periyodik Ateş Sendromu (HIDS; OMIM 260920)

Hiperimmünoglobulin D ve periyodik ateş sendromu (HIDS) özellikle Hollanda ve Kuzey Avrupa kökenli bireylerde görülen, otozomal resesif kalıtım gösteren kalıtsal periyodik ateş sendromudur (40).

Sendromun prevalansı 1/1.000.000’den az olarak belirlenmiştir (41). HIDS atakları ortalama 4–7 gün sürer ve genellikle düzensizdir. Ataklar sırasında gözlenen belirgin klinik bulgular; ateş, servikal lenfadenopati (lenf bezlerinin büyümesi), splenomegali (dalak büyümesi), lökositoz, kusma ve diyare ile birlikte gözlenen karın ağrısıdır. Bu bulguların yanında baş ağrısı, eklem ağrısı, eritemli deri döküntüsü, aftöz ülser bulguları gözlenen HIDS hastaları da bildirilmiştir (42).

Hastalık, 12 numaralı kromozomun uzun kolunda (12q24) bulunan ve 396 aminoasitlik mevalonat kinaz enzimini kodlayan **MVK** genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (Şekil 2.2) (43). Hiper IgD sendromlu hastaların çoğunda serum IgD seviyeleri 100mg/dL’nin üzerindedir. Sendromun ismine rağmen, plazmalarında yüksek seviyede immünoglobulin D rastlanmayan HIDS hastaları tanımlanmıştır. Hastaların %80’inde serum IgA seviyeleri de yüksek bulunmuştur (15, 16).



Şekil 2.2. Mevalonat kinaz geni (MVK) ile mevalonat kinaz proteininin şematik şekli. Şekilde numara ile gösterilmiş kutular MVK geninin 11 eksonunu; gen ve protein arasındaki çizgi V377I değişiminin protein üzerindeki olası yerini; X işareti enzimatik olarak aktif olan ATP bağlayıcı bölgeyi göstermektedir. Eksonlar üzerinde HIDS açısından en sık rastlanan mutasyonlar gösterilmiştir (30).

Mevalonat kinaz aktivitesindeki abnormalitelerin yangı reaksiyonlarındaki rolü tam olarak bilinmemekle beraber mevalonat kinaz, kolesterol, D vitamini, safra asidi, steroid hormon ve steroid olmayan izoprenoidlerin biyosentezinde mevalonik asitin 5-fosfomevalonata dönüşmesini sağlar. MVK genindeki mutasyonlar sonucu mevalonat kinaz aktivitesindeki azalma mevalonik asit birikimine neden olur. Bu durum mevalonik asidüri ile sonuçlanır. Bu nedenle mevalonat kinaz eksikliğinin “Hiperimmünoglobulin D ve Periyodik Ateş Sendromu–HIDS” ile “Mevalonik Asidüri / MA” olmak üzere 2 farklı şekilde fenotipe yansımaktadır. Ancak mevalonat kinaz eksikliğinin HIDS ile ilişkisi bilinmemektedir (44). MVK geninde şimdiye kadar saptanan 109 varyantın 64 tanesi HIDS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. MVK geninde saptanan varyasyonlardan 4 tanesi ilk defa Türk olgularda rapor edilmiştir (Çizelge 2.2). Bu varyasyonlardan 2’si HIDS fenotipi ile ilişkili bulunmuştur (6). Türk olgularda rapor edilen 2 varyasyon ise Mandey ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yayınlanmıştır. Çalışmada klinik bulguları ile HIDS tanısı almış 37 olgu taranmıştır (40).

Çizelge 2.2. Infervers veri tabanına göre Türk olgularda rapor edilen MVK geni varyasyonları

Değişimin;				Kaynakça
Sekans Varyantı	Konumu	Protein varyantı	Fenotip ile ilişkisi	
c.238G>Ap.	Ekson 4	V80I	Bilinmiyor	Lohse 2003
c.709A>T	Ekson 8	T237S	Var	Mandey 2006
c.831C>T	Ekson 9	R277R	Bilinmiyor	Domingo 2006
c.965C>G	Ekson 10	T322S	Var	Mandey 2006

HIDS hastalarının çoğu MVK genindeki birleşik heterozigot yanlış anlamlı mutasyon taşırlar. HIDS hastalarının %90'ında, genin 1129. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazına dönüşmesi sonucu, mevalonat kinaz proteininin 377. pozisyonundaki valin aminoasitinin izolösin aminoasitine dönüştüğü, V377I değişimi tespit edilmiştir. Diğer periyodik ateşlerle karşılaştırıldığında HIDS hastalarının amiloidoz geliştirmesi oldukça nadirdir (15).

2.2.3. Muckle–Wells Sendromu (OMIM 191900)

Muckle–Wells Sendromu (MWS), otozomal dominant kalıtım gösteren 3 “kriyopirin ile ilişkili periyodik sendrom”dan (CAPS) en ağır seyreden 2.’sidir. Muckle–Wells sendromu ilk defa 1962 yılında, ürtiker, sağırılık ve renal amiloidoz bulguları bulunan bir olguda tanımlanmış olup prevalansı bilinmemektedir (1, 45).

Diğer kriyopirinopatiler;

- Neonatal Başlangıçlı Multisistemik Enflamatuvar Hastalık (**NOMID**– **N**eonatal **O**nset **M**ultisystemic **I**nflammatory **D**isease) / Kronik İnfantil Kutanöz Ve Artikular Sendrom (**CINCA**– **C**hronic **N**eurologic **C**utaneous and **A**rticular **S**yndrom; OMIM 607115) ve
- Ailesel Soğuk Otoenflamatuvar Sendrom (**FCAS**– **F**amilial **C**old **U**rticaria / Ailesel Soğuk Ürtiker; OMIM 120100)’dur (19).

Kriyopirinopatiler temelde ortak bir genetik alt yapıları olmasına rağmen farklı klinik fenotipleri ile birbirlerinden ayrılan hastalıklardır. Genetik temelde olduğu gibi klinik bulgular da çakışma söz konusu olmaktadır (46). Periyodik olarak devam eden ve eklem iltihabı, karın ağrısı ve konjunktivit ile birlikte gözlenen yangısal ataklar sırasında akut faz proteinlerinde artış gözlenir. Çocukluk döneminde başlayan yangı ataklarına ilerleyen dönemlerde sensorinöral işitme kaybı eşlik eder. MWS’li hastaların %25’inde amiloidoz gelişmektedir (19).

Kriyopirinopatilerden sorumlu gen, 1 numaralı kromozomun uzun kolunda bulunan, 9 eksondan oluşan **CIAS1** genidir. CIAS1 geni;

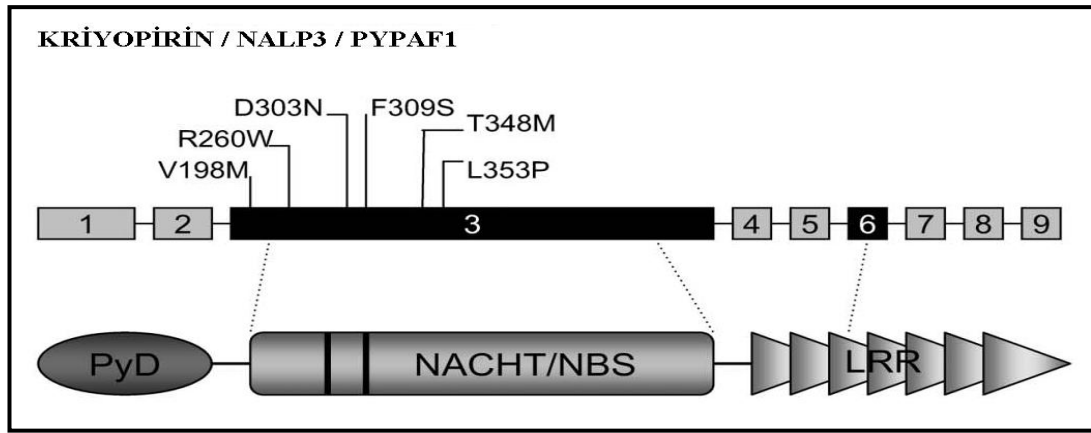
- PYPAF1 (pirin bölgesi içeren APAF benzeri protein) veya
- NALP3 (NACHT bölgesi, lösince zengin tekrar ve pirin bölgesi içeren protein)

olarak da bilinen “kriyopirin” proteinini kodlar (19).

Kriyopirin proteini (Şekil 2.3) 920 aminoasit büyüklüğünde olup 3 temel domain içerir;

- N-terminal Pirin bölgesi
- Merkezi NACHT bölgesi
- C-terminal lösine zengin 7 tekrar bölgesi (LRR) (19).

Kriyopirin, monosit, granülosit ve kondrositlerde ifade edilmekte olup, bir dış uyarana karşı enflamazom denilen protein kompleksi ile immün cevabın düzenlenmesinde görev alır. Enflamazomun, yangı öncesi sitokinlerden interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18)'in salgılanma ve işlenme sürecinde görevli olan kaspaz-1'i etkinleştirdiği gösterilmiştir (19).



Şekil 2.3. Kriyopirin geni (CIAS1) ile kriyopirin proteininin şematik şekli. Şekilde numara ile gösterilmiş kutular CIAS1 geninin 9 eksonunu; gen ve protein arasındaki çizgiler ilgili ekson bölgelerinin kodladığı protein bölgelerini göstermektedir. Eksonlar üzerinde kriyopirinopatiler açısından en sık rastlanan mutasyonlar gösterilmiştir (30).

CIAS1 geninde şimdiye kadar saptanan 120 varyasyondan 86'sı kriyopiriopatiler ile ilişkilendirilmiştir. Toplam 6 varyasyon Türk olgularda rapor edilmiştir (Çizelge 2.3) (6).

Çizelge 2.3. İnfevers veri tabanına göre Türk olgularda rapor edilen CIAS1 geni varyasyonları

Değişimin;					Kaynakça
Bilinen adı	Konumu	Sekans varyantı	Protein pozisyonu	Fenotip ilişkisi	
Q306E	Ekson 3	c.916C>G	p.Gln306Glu	CINCA/NOMID	Berdeli 2009
L344L	Ekson 3	c.1032G>A	p.Leu344Leu	No	Şentürk 2006
V351L	Ekson 3	c.1051G>C	p.Val351Leu	CINCA/NOMID	Arostegui 2006
Y441H	Ekson 3	c.1321T>C	p.Tyr441His	Muckle–Wells ve NOMID/CINCA	Gül 2008
I480F	Ekson 3	c.1438A>T	p.Ile480Phe	CINCA/NOMID Muckle–Wells Syndrome	Dalgıç 2007
G569A	Ekson 3	c.1706G>C	p.Gly569Ala	CINCA/NOMID	Horsman 2008

Kriyopirinopatiler farklı 3 sendrom olmalarına rağmen, klinik bulguları çakışabilmektedir. Kriyopirinopatiler ile ilişkili bulunan mutasyonların genotip-fenotip ilişkisi ve moleküler temeli tam olarak aydınlatılmamıştır (46). Jeru ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; yenidoğan dönemlerinden itibaren 2–10 gün tekrarlayan yüksek ateş, eklem ve kas ağrısı ile birlikte ataklar geçiren monozygotik ikiz kardeşlerin ikisinde de CIAS1, TNFRSF1A, MEFV ve MVK genlerinde herhangi bir mutasyon saptanmamış olup; immün cevap ve yangıda CIAS1 ile aynı ailede yer alan NALP12 geninde mutasyon taraması yapılmıştır. Analiz sonrası 2 kardeşte de NALP12 geninde R284X mutasyonu saptanmıştır. Bu durum kriyopirinopatilerin genetik temelinin heterojen ve henüz tam anlamıyla aydınlatılmamış olduğunu doğrulamaktadır (47).

2.2.4. Neonatal Başlangıçlı Multisistemik Enflamatuvar Hastalık (NOMID) /

Kronik İnfanıl Kutanöz ve Artikular Sendrom (CINCA; OMIM 607115)

İlk olarak 1980 yılında tanımlanan CINCA/NOMID, kriyopirinopatilerin en ağır seyirli olan tipi olup otozomal dominant kalıtılmaktadır. Prevalansının 1/1.000.000’den az olarak tanımlanmıştır (48). Neonatal dönemde başlangıç gösteren ateş, gezici deri döküntüleri, eklem iltihabı, üveit (gözün damar tabakasının iltihabı) hastalığın temel klinik bulguları olup, ilerleyen süreçte merkezi sistem tutulumu, serebral atropi, amiloidoz ve sensorinöral işitme kaybı gözlenir. Olguların %60’ından daha fazlasında işitme kaybı ve %25’inde amiloidoz gelişimi rapor edilmiştir (23, 46).

2.2.5. Ailesel Soğuk Otoenflamatuvar Sendrom

(Ailesel Soğuk Ürtiker-FCAS; OMIM 120100)

İlk kez 1940 yılında tanımlanan Ailesel Soğuk Otoenflamatuvar sendrom, kriyopirinopatilerin en hafif seyirli olan tipidir. Özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa’da rapor edilen ve otozomal dominant kalıtılan sendromun prevalansının 1/1.000.000 olduğu tanımlanmıştır. Hastalarda soğuk ile temas, tipik olarak kaşıntılı ve ağrılı döküntüler meydana getirir. Konjunktivit, eklem tutulumu, baş ağrısı yenidoğan döneminde başlangıç gösteren yangısal ataklara eşlik eden bulgular olup, amiloidoz gelişimi ve işitme kaybı bu hastalarda çok nadir görülür (49). Türkiye’den rapor edilmiş FCAS olgusu bulunmamaktadır (6).

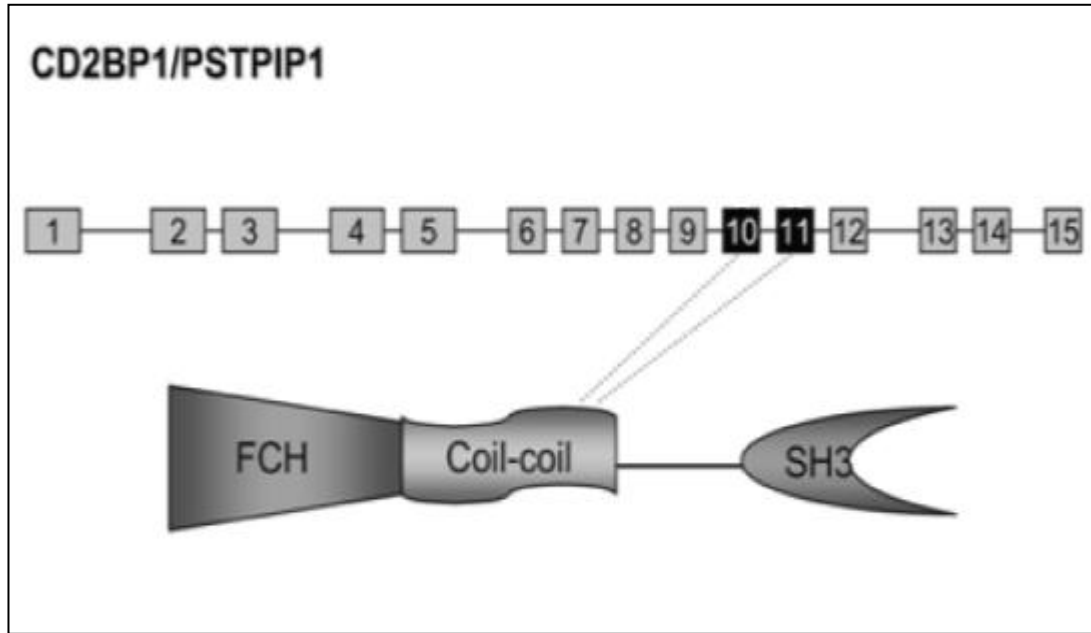
2.2.6. Piyojenik Artirit ile Piyoderma Gangrenosum ve Akne Sendromu

(PAPA; OMIM 604416)

İlk kez 1997 yılında tanımlanan PAPA sendromu otozomal dominant kalıtım gösteren periyodik ateş sendromudur. PAPA sendromunun prevalansının 1/1.000.000’den daha az olduğu bilinmektedir (50). Hastalık, eklem, deri ve kaslarda hasar meydana getiren yangı ile tanımlanmaktadır. Hastalığa neden olan gen 15 nolu kromozomun uzun kolunda yer alan, PSTPIP-1(Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1) olarak da bilinen CD2-bağlayan protein 1 (CD2BP1)’i kodlayan **CD2BP1** genidir (Şekil 2.4). CD2BP1 proteini 416 aminoasitten oluşmakta ve nötrofillerde ifade edilmektedir. Bu proteini kodlayan

gendeki mutasyonlar protein ürününü aşırı fosforile ederek, proteinin yangı yanıtında pirin bölgesine daha sıkı bağlanmasına neden olur (19).

İnfevers veritabanına göre CD2BP1 geninde şimdiye kadar toplam 5 varyasyon tanımlanmıştır. Bu varyasyonlardan 4 tanesi (A230T, E250Q, E250K, D266N) PAPA fenotipine yol açarken, c.741+33–741+34insGT varyasyonu hastalık fenotipi ile ilişkilendirilmemiştir (6).



Şekil 2.4. CD2BP1 geni ile CD2BP1 proteininin şematik şekli. Şekilde numara ile gösterilmiş kutular CD2BP1 geninin 15 eksonunu göstermektedir (30).

2.2.7. Blau Sendromu veya Ailesel Granüloamatöz Artirit (OMIM 186580)

Blau sendromu, otozomal dominant kalım gösteren; eklem, deri ve gözleri etkileyen granüloamatöz bir periyodik sendromdur. Sendromun prevalansı bilinmemektedir. Hastalık, 16 numaralı kromozomun uzun kolunda yer alan **NOD2** veya **CARD15** olarak bilinen proteini kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanır. CARD15 proteini, doğal bağışıklık sisteminde NF- κ B aracılı sinyal yolunda görev alan hücresel bir reseptör proteinidir. İlk olarak Crohn's hastalığı ile tanımlanmış olup sonradan Blau sendromu ile de ilişkilendirilmiştir (51). NOD2 proteini, C-terminal bölgesinde lösince zengin 10 tane LRR tekrarı, NACHT bölgesi ve 2 tane N-terminal CARD bölgesi içerir. NACHT bölgesindeki mutasyonlar Blau sendromu ile ilişkilendirilmişken, LRR motiflerindeki mutasyonların Crohn's hastalığına neden olduğu bulunmuştur (52). İnfevers veri tabanına göre NOD2 geninde şimdiye kadar 105 varyasyon rapor edilmiştir. Bu varyasyonlardan, 76'sı Crohn's hastalığı, 8'i Blau sendromu ve 24'ü ise ülseratif kolit ile ilişkilendirilmiştir (6).

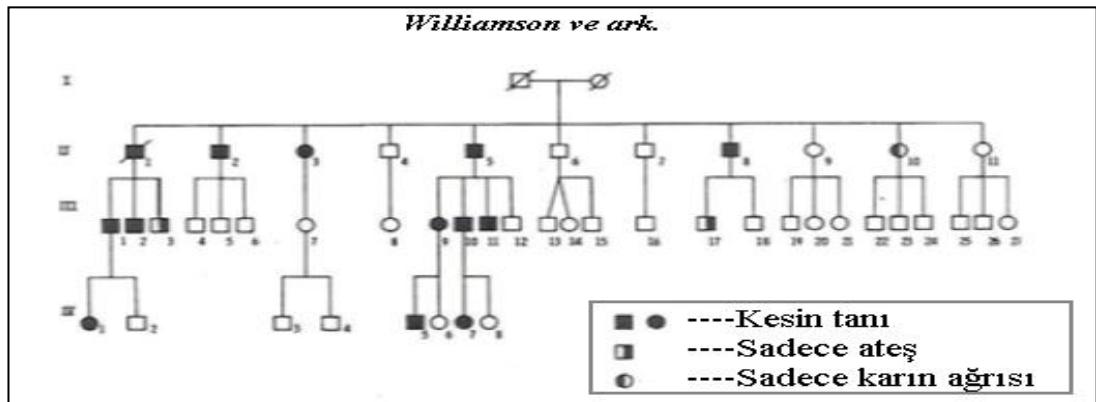
2.2.8. Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü ile İlişkili Periyodik Ateş Sendromu (TRAPS; OMIM 142680)

Literatürde;

- Ailesel Hibernian Ateş (Familial Hibernian Fever–FHF),
- Tümör Nekroze Edici Faktör (TNF) Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom (TNF Receptor Associated Periodic Syndrom–TRAPS),
- Otozomal Dominant Ailesel Periyodik Ateş Sendromu (Autosomal Dominant Familial Periodic Fever syndrome)

olarak isimlendirilen TRAPS (53), ilk olarak Williamson ve arkadaşları tarafından 1982 yılında İrlanda/İskoçya kökenli bir ailede “Ailesel Hibernian Ateş” (Hibernian: İrlandalı, İrlanda'ya ait) olarak tanımlanmıştır. Ailenin klinik bulguları arasında tekrar eden ateş atakları, abdominal ağrı, bölgesel deri lezyonları, miyalji (kas ağrısı), plörezi (akciğer zarında sıvı birikmesi), lökositoz (kandaki akyuvar sayısında artış) ve yüksek eritrosit sedimentasyon hızı bulunmaktadır. Şekil 2.5’de Ailesel Hibernian Ateş’in tanımlandığı ilk ailenin pedigrisi gösterilmektedir (4).

1982 yılına kadar bazı araştırmacılar tarafından farklı ailesel periyodik ateş sendromları tanımlanmış ve literatürde yer almıştır. Williamson ve arkadaşları, mevcut klinik bulgulara yol açabilecek tetikleyici nedenlerin mevcut olmamasına karşın tekrar eden ateş ve ağrı ataklarını, Ailesel Akdeniz Ateşi ile uyumlu bulmuşlardır. Ancak incelenen ailedeki klinik bulgular, kalıtım şekli ve steroid tedavisi sonucu elde edilen olumlu yanıt gibi bulgular doğrultusunda durumun yeni bir sendrom olabileceği kanısına varmışlardır. Ailenin 3 kuşak pedigrisini incelediklerinde Ailesel Akdeniz Ateşi’nden farklı olarak otozomal dominant kalıtım gösterdiğini tespit etmişlerdir (4).



Şekil 2.5. Williamson ve arkadaşları tarafından Ailesel Hibernian Ateş tanısı alan ilk ailenin pedigrisi (4)

2.2.8.1. TRAPS Fenotipinde Gözlenen Klinik Bulgular

Hastalığın tipik bulguları, tekrarlayan yüksek ateş atakları ile beraber görülen karın ağrısı, eklem ağrısı, konjunktivit veya periorbital ödem, plevra (karın zarı) iltihabı, gezici deri döküntüsüdür. Ataklar sırasında akut faz cevabı meydana gelir ve eritrosit sedimentasyon hızı, yangı tepkimelerinde artış gösteren bir akut faz proteini olan C reaktif protein seviyesi artış gösterir. Ayrıca nötrofili (kandaki nötrofil sayısında artış) ve trombositoz (kandaki trombosit sayısında artış) gelişir (19).

Atakları tetikleyen belirgin bir uyaran bulunmamakla beraber bazı hormonal değişimlerin ve ufak enfeksiyonların atakları tetiklediği durumlar bildirilmiştir. Ataklar çocukluk döneminde başlar ve bir haftadan bir aya kadar süre ile devam edebilir (19). TRAPS hastalarının yaklaşık %10–25’inde sistemik amiloid A gelişir (19, 54, 55)

2.2.8.2. TRAPS’in Genetik Temeli

İskoçya/Avustralya ve İskoçya/İrlanda kökenli aileler ile yapılan iki farklı çalışmada dominant kalıtılan periyodik ateş sendromundan sorumlu gen bölgesi 12p13 olarak belirtilmiştir. Bu bölgede; CD4 (cluster of differentiation 4), LAG–3 (lenfosit aktivasyon geni–3), CD27 (cluster of differentiation 27), komplement genler C1s (Complement C1s subcomponent) ve C1r (Complement C1r subcomponent) vardır. Bu genlere ilave olarak bölgedeki bir diğer gen olan “Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptör Süper Ailesi tip 1A” (**TNFRSF1A**-**Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family 1A**; alternatif isimleri: **CD120a**, **p55**, **TNFR1**) geni, dominant periyodik ateş profili sergileyen bir ailede etkilenen aile üyelerinin serum çözünür TNFRSF1A seviyesinin, sağlıklı normal bireylerdeki ortalamanın çok altında olması nedeniyle diğer genlerden daha çok dikkat çekmiştir (56, 57, 58).

Dominant kalıtılan periyodik ateş sendromunun genetik temeli, genetik hasarın 12p13 bölgesinde saptanmasının ardından, uluslararası araştırma konsorsiyumu tarafından 1999’da, hastalıktan sorumlu genin, “Tümör Nekroze Edici Faktör” (**TNF**-**Tumour Necrosis Factor**) molekülü için hücre reseptör proteinini kodlayan TNFRSF1A olarak tanımlanmasıyla belirlenmiştir. Sendroma akronim olarak “**TNF Receptor Associated Periodic Syndrome**” ifadesine atfen TRAPS ismi verilmiştir (5). TRAPS’in prevalansı bilinmemekle beraber literatürde Belçikalı, Afrika–Amerikalı, Fransız, Alman, İsrailli, Japon, Hollandalı, Slovakyalı, İngiliz, Danimarkalı ve Türk olgular dahil olmak üzere çok çeşitli populasyonlarda TRAPS olguları bildirilmiş olup sendrom geniş bir etnik çeşitlilik göstermektedir (6, 20).

2.2.8.3. TNF α ve TNFRSF1A’nın Yapısı

Tümör nekroze edici faktör alfa (TNF α), hücre içi patojenlere karşı konağın korunmasında ve yangının başlatılmasında, interlökin–1 β (IL–1 β), interlökin–6 (IL–6) gibi birçok yangısal sitokinlerin sentezini harekete geçiren, lökositleri aktive eden, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttıran, apoptozu düzenleyen multipotent bir sitokindir. Bu sitokin tümör nekroze edici faktör olarak Carswell tarafından ilk

olarak 1975’de tanımlanmıştır. Aktif makrofaj, monosit, lenfosit, polimorfonükleer lökosit ve endotel hücreleri tarafından, 26 kDa’luk transmembran protein olarak sentezlenen TNF α , hücreyel yenilenme ve farklılaşma tepkimelerinde de rol alır (19).

26 kDa’luk TNF α , biyolojik işlevini, 157 aminoasitlik alt birimlerinden oluşan homotrimerler halinde gerçekleştirir. Hücre membranına bağlı TNF (memTNF), TACE (TNF α -converting enzyme) ile proteolitik ayrılma sonucu 17 kDa’luk çözünür TNF’ye dönüşür (19).

TNF α birçok reseptöre bağlanabilme özelliğine sahiptir ancak, TNF’ye özgül 2 reseptör vardır (19);

- TNFRSF1A (TNF receptor super family 1A, TNFR1, p55TNFR, CD120a)
- TNFRSF1B (TNF receptor super family 1B, TNFR2, p75TNFR, CD120b)

TNFRSF1A ve TNFRSF1B’nin hücre membranının dışında kalan bölgelerinin, %28 oranında homolog olmasına rağmen, knock-out fare modelleri ile yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, TNF α biyolojik işlevini büyük oranda, TNFRSF1A aracılığı ile gerçekleştirmektedir (19).

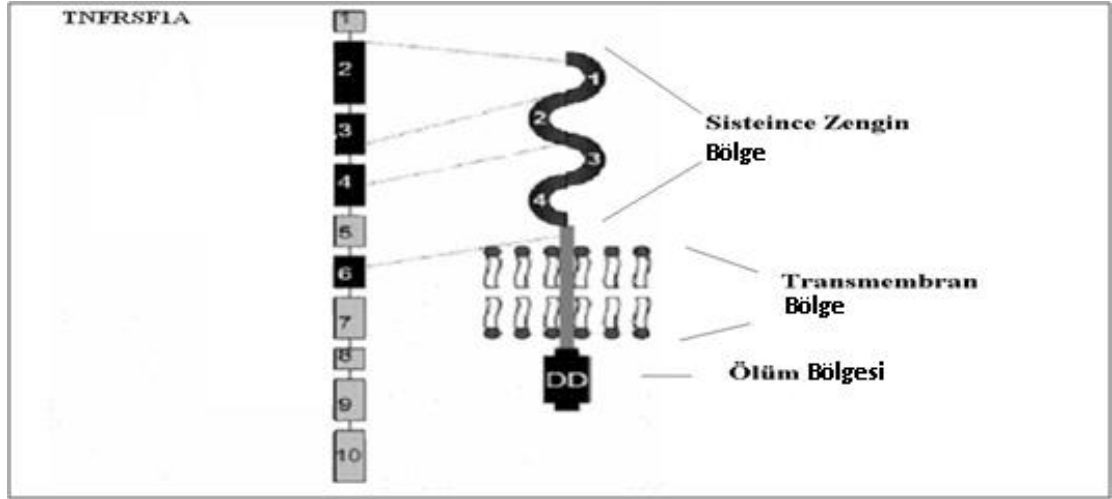
TNFRSF1A geni 10 ekson ve 13339 nükleotidden oluşuyor olup, 455 aminoasitlik reseptör proteinini kodlamaktadır. Bir membran glikoproteini olan TNFRSF1A’da ilk 29 aminoasit sinyal peptidi, sonraki 182 aminoasit hücre dışı bölgeyi, sonraki 21 aminoasit transmembran bölgeyi ve en son 223 aminoasitlik kısmı ise hücre içi bölgeyi oluşturur. Ölüm bölgesi reseptör proteininin 359–439 numaralı aminoasitlerini kapsar (Şekil 2.6) (21, 59).

Reseptör, dört tane sisteince zengin bölge (CRD, cystein rich domain) içeren bir hücre dışı alan, bir transmembran bölge ve bir hücre içi ölüm bölgesinden (DD–death domain) oluşmaktadır (60). Ölüm bölgesi, geniş bir yangı sitokin grubunun aktivasyonunu ya da hücre ölümünü indükleyen NF- κ B’yi harekete geçirmek için “Tümör Nekroze Edici Faktör ile İlişkili Ölüm Bölgesi–**TRADD** (**T**NF–**R**eceptor **A**ssociated **D**eath **D**omain)” aracılığıyla sinyal gönderen protein–protein etkileşim bölgesidir (14).

Her CRD bölgesi, TNF reseptör protein süper ailesinde oldukça iyi bir şekilde korunmuş olan üç tane sistein–sistein disülfid bağı içermektedir. TRAPS mutasyonları ağırlıklı olarak, hücre dışı CRD bölgelerini ve birçok olguda ise, disülfid bağlarına katılan sistein kalıntılarını etkileyerek en yüksek amiloidoz riskine sahip olan en penetran hastalık fenotipine yol açmaktadır (60).

İlk sisteince zengin bölge (CRD1, cysteine rich domain 1), preligand bağlanma bölgesi (PLAD–preligand assembly domain)’dir. Ligand yokluğunda, PLAD, reseptörlerin kendi aralarındaki kovalent olmayan homofilik etkileşimine aracılık

eder. Bu etkileşim sayesinde, reseptörler, homomultimerize formda ve sessiz durumda tutulurken, sinyal iletiminin kendiliğinden aktivasyonu da engellenir. Hücre dışı bölgelerden CRD2 ve CRD3, trimerik TNF α ile etkileşime girerken, CRD4 ise TNF α 'nın bağlanması için diğer CRD'ler kadar etkin değildir (19)



Şekil 2.6. TNFRSF1A geni ile TNFRSF1A proteininin şematik şekli. Şekilde numara ile gösterilmiş kutular TNFRSF1A geninin 10 eksonunu göstermektedir (30).

2.2.8.4. TRAPS'de Reseptör Ayrılma (Shedding) Mekanizması

Trimerik TNF α 'nın reseptöre sisteince zengin 2. veya 3. bölgesinden bağlanmasını takiben, TNF'in hücre yüzeyinden ayrılmasından da sorumlu olan bir metaloproteaz–disintegrin olan ADAM17 (TACE), transmembran TNFRSF1A reseptörünü, hücre membranına en yakın olduğu ekstraselüler bölgesinden ayırır. “Receptor clearance” olarak da isimlendirilen ayrılma mekanizması ile TNF α 'nın hücre yüzeyinde indüklediği sinyalleşme durdurulur ve çözünür reseptör dolaşımdaki TNF α 'ya bağlanabilir. Böylece yangı reaksiyonu kısıtlanır (19, 60, 61).

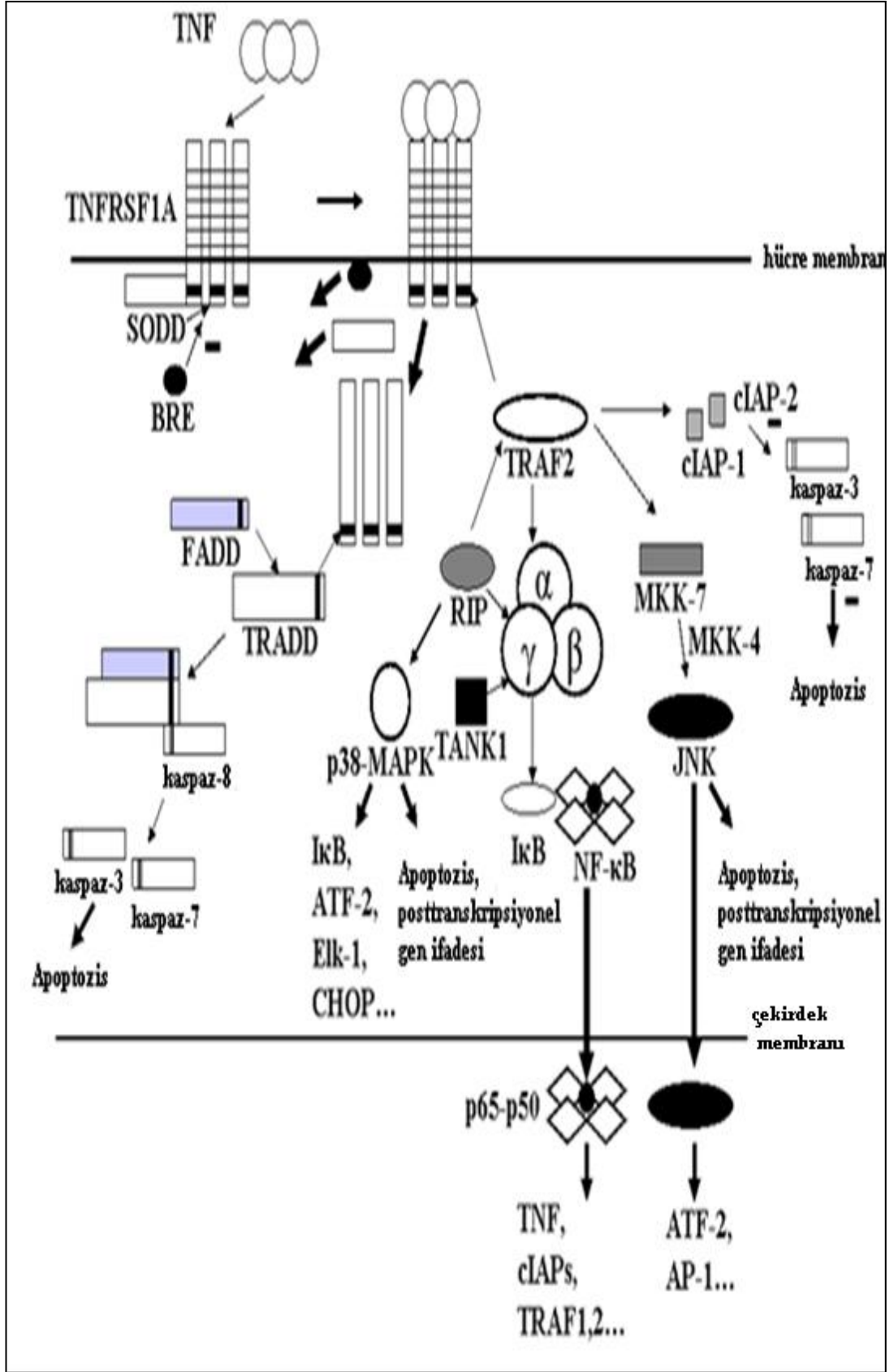
2.2.8.5. TNF α ve TNFRSF1A Sinyal Yolu

Şekil 2.7'de TNF α 'nın TNFRSF1A'ya bağlanmasıyla aktif hale gelen ana sinyal yolları gösterilmektedir. TNF α homotrimerlerinin, trimerik TNFRSF1A'nın ekstraselüler bölgesindeki 2 veya 3 numaralı sisteince zengin bölgesine bağlanması, birçok hücre içi sinyal basamağını başlatır. Dinlenme halindeki hücrede, bir inhibitör protein olan, ölüm bölgesi susturucusu (silencer of death domain–SODD) ölüm bölgesine bağlı bulunarak, apoptozun başlamasına engel olur. Reseptöre TNF α 'nın bağlanmasıyla SODD ölüm bölgesinden salınır ve SODD'nin salınması TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi olan TRADD'in (TNF–Receptor Associated Death Domain), TNFRSF1A'nın ölüm bölgesine bağlanmasını sağlar. TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor), RIP (Receptor Interacting Protein) ve FADD (Fas–Associated Death Domain) gibi ilave moleküllerin TNFRSF1A'ya bağlanmasının, TRADD aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (19).

TRAF2, MAPK (mitojen harekete geçirici protein kinaz) kinaz (MEK) kinazlar (MEKK) dahil birçok alt yol sinyal molekülü ile etkileşime girer. TRAF2, cIAP-1 ve cIAP-2'ye (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 ve 2) bağlanarak hücre ölüm proteazları olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'i inhibe eder. Bu sayede apoptoz engellenmiş olur. TRAF2 bundan başka, inhibitör kappa B (IκB) kinaz (IKK) kompleksi ile bu kompleksin katalitik alt birimleri olan IKKα ve IKKβ ile etkileşime girer. IKK molekülünün TRAF2'ye eklenmesi ile RIP, IKK'nın bir diğer katalitik altbirimine [IKKγ / NEMO (NF-κβ Essential Modulator)] bağlanır ve böylece MEKK3 ya da transforme edici büyüme faktörü-β-aktif kinaz [transforming growth factor-β(TGF-β)-activated kinase-TAK1] ile etkileşim sonucu IKK aktive olur. Aktive IKK kompleksinin, IKKβ alt birimi, kappa B inhibitörü IκB'yi 32 ve 36. pozisyonlardaki serin (ser-32 ve ser-36) rezidularından fosforile eder. Bu olay IκB'nin yıkımı ve transkripsiyon faktörü NF-κB'nin salınımıyla sonuçlanır. Salınan NF-κB çekirdeğe taşınır. NF-κB, TNFα gibi proenflamatuar sitokinlerin, cIAPs ve TRAF2 gibi anti-apoptotik aracı moleküllerin ve hücre adezyonu ve lökosit aktivasyonu ile göçünde görev alan proteinlerin ekspresyonlarını tetikler (19).

TNFα aracılı NF-κB aktivasyonu, TRAF2 aile üyesi ile ilişkili NF-κB aktivatörünün (TANK, TRAF2 family member associated NF-κB activator), IKK kompleksinin katalitik alt birimi olan NEMO'ya çinko-parmak motifi ile bağlanmasını ve aynı zamanda histon H3 proteininin IKKα tarafından çekirdekte fosforilasyonunu da gerektirir. TNFα'nın indüklediği ve TNFRSF1A aracılı NF-κB aktivasyonu, konvansiyonel ve standart yolak olarak kabul edilir. Ancak NF-κB aktivasyonunun IKKβ veya NEMO'ya bağlı olmayan yolağı da bulunmaktadır (19.)

RIP'in TRAF2'ye bağlanması ve MEKK'lerin RIP'a eklenmesi, p38 mitojenle aktive protein kinaz (p38-MAPK) yolunu aktif hale getirir. P38 bir MAPK ailesi üyesi olup; IκB, aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF2), Eph benzeri kinaz (Elk)1 ve C/EBP-homolog protein (CHOP) gibi birçok transkripsiyon faktörünü aktive eder. Bu transkripsiyon faktörleri de aktive edici protein-1 (AP-1) veya NF-κB yolakları aracılığı ile proenflamatuar sitokin ekspresyonunu indükler (19).



Şekil 2.7. TNF α 'nınTNFRSF1A'ya bağlanmasıyla aktif hale gelen ana sinyal yolları (19).

2.2.8.6. TNFRSF1A'nın TRAPS'deki Rolü

TRAPS'in altında yatan ana mekanizmaları şöyledir;

- Aktif TNFRSF1A'nın hücre dışı bölgesinin hücre yüzeyinden ayrılmasında azalma (azalmış “ayrılma–shedding” mekanizması)
- TNFRSF1A'nın hücre yüzey ekspresyonunda azalma
- Bu azalmaya bağlı olarak, TNF α bağlama kapasitesinde azalma
- Mutant TNFRSF1A'nın hücre içi tutulumu.

Bu nedenlerle, apopitoz, yangı ve transkripsiyon faktör aktivasyonunun anormal tetiklenmesinin gerçekleştiği düşünülmektedir (19).

TNFRSF1A'nın TRAPS'deki rolünü tanımlayan ilk yayında, dominant periyodik ateş tanısı almış, içlerinde Mulley'in ve McDermott'un dominant periyodik ateş sendromunun olası kromozomal bölgesinin tanımlanmasını çalıştıkları 2 ailenin de bulunduğu, Finlandiya kökenli bir aile, İngiltere/Almanya/İrlanda kökenli 3 aile, Fransız/Kanada kökenli bir aile ve İrlanda kökenli bir ailede mutasyon analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi sonucu sistince zengin ilk bölgede İrlandalı ailede C30R ve T50M, İrlanda/İskoçya kökenli ailede C33Y, İngiltere/Almanya/İrlanda kökenli bir ailede C52F, Fransız/Kanada kökenli ailede T50M mutasyonları saptanmıştır. Reseptörün 2. CRD bölgesinde de İskoçyalı ailede C88R ve Finlandiyalı ailede C88Y mutasyonu saptanmış olup değişimlerden hiçbirinin sağlıklı kontrol bireylerde bulunmadığını belirtmişlerdir. C33Y mutasyonu taşıyan 8, C88Y taşıyan 5, T50M mutasyonu taşıyan 11 ve C52F mutasyonu taşıyan 2 olgunun serum çözünür reseptör seviyeleri incelendiğinde mutasyon taşıyan bireylerde ataklar sırasında serum çözünür reseptör seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Ancak sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında serum çözünür reseptör seviyesi mutasyon taşıyan olgularda anlamlı ölçüde daha az bulunmuştur. Bu sonuç da mutasyonların bir etkisinin, reseptör ayrılma mekanizmasını bozarak, dolaşımdaki TNF moleküllerini susturacak olan çözünür reseptör seviyesindeki azalma olduğunu kanıtlamaktadır. Aynı çalışmada, TNFRSF1A C52F mutasyonunun, membrana bağlı reseptörün fonksiyonu üzerine olan etkisini araştırmışlardır. C52F mutasyonu taşıyan olguların ve sağlıklı kontrol bireylerin monosit ve polimorfonükleer lökositleri, metalloproteaz aracılı reseptör ayrılmasını indükleyen faktör [PMA (4b–phorbol 12–myristate 13–acetate)] ile indüklenmiştir. Sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, mutasyon taşıyan olguların hücrelerinde reseptör ayrılma mekanizmasında anlamlı ölçüde azalma saptanmıştır (5).

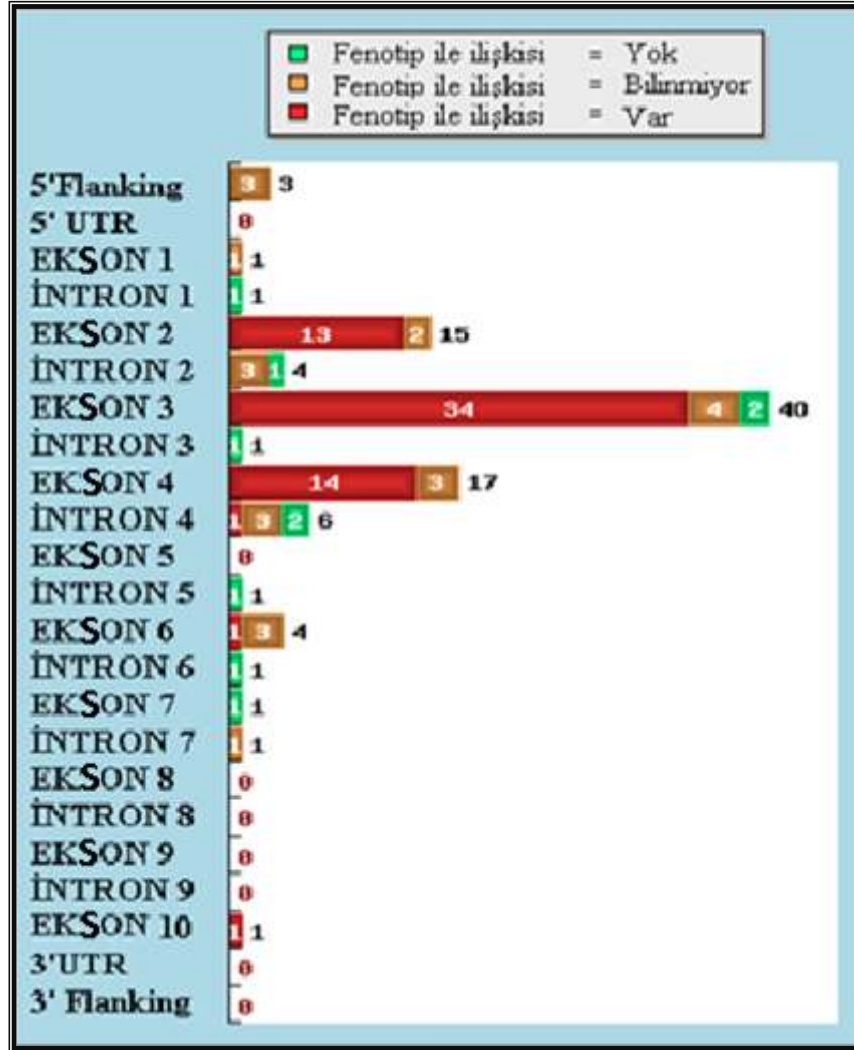
2.2.8.7. TNFRSF1A Mutasyonları

TNFRSF1A geninde şimdiye kadar rapor edilmiş olan toplam 98 varyasyonun 92'si baz değişimi, 5'i delesyon 1'i duplikasyondur (Şekil 2.8). Baz değişimi şeklinde gözlenen varyasyonların 62'si, delesyonların ise 3'ü TRAPS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. TNFRSF1A genindeki varyasyonların gen üzerindeki konumlarına göre dağılımı “Şekil 2.9” üzerinde gösterilmiştir (6).



Şekil 2.8. TNFRSF1A genindeki varyasyonların varyasyon tipine göre dağılımı (6).

(TNFRSF1A geninde Coşan ve arkadaşlarının saptadıkları C29R varyasyonu INFEVERS veritabanına eklenmediği için tabloda 97 varyasyon gözlenmektedir.)



Şekil 2.9. TNFRSF1A genindeki değişimlerin gen üzerindeki bölgelere göre dağılımı ve fenotip ile ilişkisi (6).

TRAPS ile ilişkili TNFRSF1A geni mutasyonları, reseptörün çoğunlukla hücre dışı bölgesinde konumlanmıştır (6). TRAPS ile ilişkili sistein mutasyonlarının, yüksek penetrans ve hastalığın ağır seyri ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (60). Reseptör proteininin 92. pozisyonundaki arjinin aminoasitinin glutamin aminoasitine dönüşmesine neden olan R92Q varyasyonu, şimdiye kadar tanımlanmış olan TRAPS mutasyonları arasında en sık gözlenen varyasyondur. Hull ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan çalışma ile R92Q mutasyonunun, o tarihe kadar tanımlanmış olan toplam 20 TNFRSF1A mutasyonu arasındaki frekansı %28.9 olarak belirlenmiştir. Ayrıca R92Q ve P46L mutasyonlarının asemptomatik popülasyondaki görülme sıklığı %1'in üzerinde bulunmuştur. Hull ve arkadaşları R92Q varyasyonunu, rastgele seçilen 132 İrlandalı sağlıklı kontrol bireyinde yaptıkları analiz sonucu 2 olguda (%1.5) ve rastgele seçilen 634 Beyaz İrlandalı kökenli bireyde yaptıkları analiz sonucu 6 olguda (%0.95) belirlemişlerdir (20).

TNFRSF1A geni üzerinde şimdiye kadar rapor edilen değişimlerden sadece 8 tanesi (c.558G>A, c.586–612del27, c.596T>A, c.605T>A, c.625+10A>G, c.678C>G, c.740–9T>C, c.1080C>G) reseptörün sisteince zengin domainleri dışında kalan bölgelerini kodlayan DNA bölgesi üzerinde bulunmaktadır (6). İlgili değişimlerin bulundukları eksonlar, baz değişimleri, protein varyantları ve fenotip ile olan ilişkileri Çizelge 2.4’de gösterilmektedir.

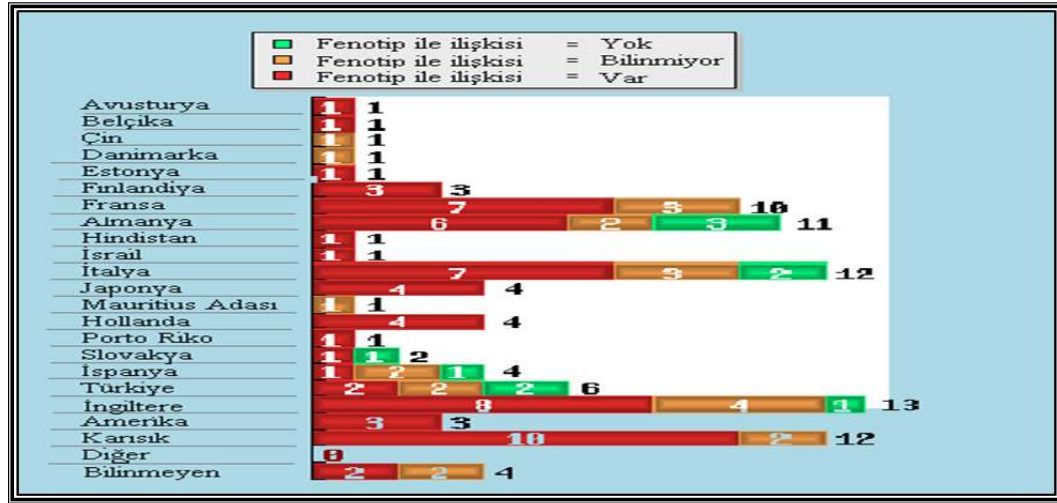
Çizelge 2.4. Sisteince zengin bölgeler dışında rapor edilen TNFRSF1A değişimleri (6).

Değişimin;					Kaynakça
Bilinen Adı	Konumu	Dizi Varyantı	Protein Varyantı	TRAPS Fenotipi ile ilişkisi	
K157K	Ekson6	c.558 G>A	p.Lys186Lys	Bilinmiyor	D’osualdo 2006
L167–G175del	Ekson6	c.586–612 del27	p.Leu196–Gly204del	Bilinmiyor	D’osualdo 2006
I170N	Ekson6	c.596 T>A	p.Ile199Asn	Bilinmiyor	Krigel 2003
V173D	Ekson6	c.605 T>A	p.Val202Asp	Var	Stajanov 2008
c.625+10A/G	İntron 6	c.625+10 A>G	–	Yok	Bazzoni 2003
S197S	Ekson 7	c.678 C>G	p.Ser226Ser	Yok	Lohse 2004
c.218–9T>C	İntron 7	c.740–9 T>C	–	Bilinmiyor	Aksentijevich 2003
Y331X	Ekson 10	c.1080 C>G	p.Tyr360X	Var	Kütükçüler 2009

TNFRSF1A genindeki varyasyonlardan 7’si Türk olgularda rapor edilmiştir (Şekil 2.10) ve bu değişimlerden TNFRSF1A geninin 3 numaralı eksonunda tespit edilen c.267C>A ve 10 numaralı eksonunda tespit edilen c.1080 C>G varyantları TRAPS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.5) (6).

Çizelge 2.5. TNFRSF1A geninde Türk olgularda rapor edilen değişimler (6,12).

Değişimin;					Kaynakça
Bilinen Adı	Konumu	Dizi Varyantının cDNA’daki konumu	Protein Varyantı	TRAPS Fenotipi ile ilişkisi	
c.194–15C>T	İntron 2	c.194–15C>T	–	Bilinmiyor	Lohse 2004
F60L(267A>G)	Ekson 3	c.267C>A	p.Phe89Leu	Var	Dinç ve ark. 2005
N116S	Ekson 4	c.434A>G	p.Asn145Ser	Bilinmiyor	Gjin 2008
c.472+6C>T	İntron 4	c.472+6C>T	–	Yok	Lohse 2006
c.552–89A>T	İntron 5	c.552–89A>T	–	Yok	Lohse 2005
Y331X	Ekson 10	c.1080C>G	p.Tyr360X	Var	Kütükçüler ve ark. 2009
C29R	Ekson 2			Var	Coşan ve ark. 2010



Şekil 2.10. TNFRSF1A genindeki varyasyonların ülkelere göre dağılımı ve fenotip ile ilişkisi (6).

Dinç ve arkadaşlarının rapor ettiği 26 yaşındaki erkek hastanın, 6 yaşından itibaren 39°C'yi geçen ateş ile beraber deri döküntüsü, kusma, karın ağrısı, boyun bölgesindeki lenf bezlerinde büyüme, bilek ve dirsek eklemlerinde ağrı şeklinde gözlenen ataklar geçirdiği tanımlanmıştır. Atakların yılda bir veya iki kez tekrarladığı ve 2–3 hafta süreyle devam ettiği bildirilmiştir. Olgu 14–21 yaşları arasında ataksız bir dönem geçirmiş, sonrasında ataklar tekrar başlamıştır. Olgunun aile hikâyesinde 63 yaşındaki babanın çocukluğunda benzer şikâyetleri olduğu, bu şikâyetlerin 30'lu yaşlarda sonlandığı ve 3 senedir böbrek yetmezliği için diyaliz işlemi gördüğü belirtilmiştir. Olgunun böbrek biyopsi materyali anti–amiloid A antikoru ile boyanmak suretiyle böbreklerde amiloid A proteini birikimi gösterilmiştir. Olgu, en sık gözlenen MEFV geni mutasyonları (M680I, M694V, M694I, V726A, E148Q) bakımından normal genotipte bulunduktan sonra TNFRSF1A geninin tümü için DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. TNFRSF1A geninin 3 numaralı eksonunda 276. pozisyonundaki adenin bazının guanin bazına transisyonu tespit edilmiştir. Protein düzeyinde bakıldığında bu transisyonun 60. pozisyonundaki fenilalanin aminoasitinin lösin aminoasidine dönüşümüne neden olduğu gözlenmektedir (10).

Dinç ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladıkları Türk TRAPS olgusundan sonra, 2009 yılında Kütükçüler ve arkadaşları Türk kökenli, akrabalık ilişkisi bulunmayan iki TRAPS olgusu daha tanımlamışlardır. İlk olgu, akraba evliliği yapmış sağlıklı bir anne ve babanın 3 yaşındaki oğlu olup, karın ve eklem ağrısı olmaksızın gözlenen tekrarlayan ateş ve tonsilit (bademcik iltihabı) şikâyetleri ile hastaneye başvurulmuştur. Atakların 1 yaşında başladığı ve 3–4 haftada bir tekrar ettiği bildirilmiştir. Olguda ataklar sırasında yüksek eritrosit sedimentasyon hızı ve C reaktif protein seviyesi ile normal IgD seviyesi tespit edilmiştir. Olguda, 2 yaşında iken MEFV geni için yapılan DNA dizi analizi sonucu heterozigot E148Q mutasyonu saptanmış ve kolçisin tedavisi uygulanmaya başlanmış ancak tedaviye yanıt alınamamıştır. Daha sonra, olguya TNFRSF1A, MVK ve CIAS1 genleri açısından DNA dizi analizi yapılmıştır. Bir numaralı olguda, TNFRSF1A geninin 10 numaralı eksonunda 1080. pozisyonundaki guanin bazının sitozin bazına

transversiyonu sonucu protein düzeyinde p.Y360X anlamsız mutasyonu ile 455 aminoasitten oluşan TNFRSF1A'dan 95 aminoasit eksik güdük protein oluşturduğu belirlenmiştir. Olgunun ebeveynlerine ve kardeşine yapılan DNA dizi analizi sonucu aynı mutasyon olgunun babasında da tespit edilmiştir. Kütükçüler ve arkadaşlarının yayınladığı ikinci olgu, aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı bir anne ve babanın 42 aylık erkek bebeği olup 1 yaşından itibaren ayda bir gözlenen tekrarlayan ateş ve tonsilit şikâyeti ile hastaneye başvurulmuştur. Klinik bulguları arasında, baş ağrısı, halsizlik, sol submandibular lenfadenomegali, 2–3 derece hipertrofik tonsil ve farenjial hiperanemi bulunmaktadır. Eritrosit sedimentasyon hızı 20mm/saat olarak bulunurken, ataklar sırasında, C reaktif proteinde artış gözlenmiştir. Serum IgD seviyesi normal tespit edilmiştir. Olguda TNFRSF1A geni için DNA dizi analizi yapılmıştır. İki numaralı olguda da bir numaralı olguda gözlenen c.1080C>G transversiyonunu takiben oluşan p.Y360X anlamsız mutasyonu tanımlanmıştır. Olgunun ebeveynleri ve kardeşlerine DNA dizi analizi yapıldığında aynı mutasyonun babada da olduğu gösterilmiştir. Her iki olguya ve aile üyelerine MVK, MEFV ve CIAS1 genleri için yapılan DNA dizi analizi sonucu, MVK ve MEFV genlerinde değişim saptanmazken, CIAS1 geninde her iki olgu ve aile üyelerinde, c.732G>A (p.A242A) ve c.786A>G (p.R260R) değişimleri tespit edilmiştir. Bu 2 varyant ile ilgili literatür bilgisi mevcut olmamakla birlikte hastalık fenotipi ile ilişkili olmadıkları tanımlanmıştır. Bir numaralı olgunun MEFV geninde E148Q mutasyonu taşıdığı ancak kolçisine yanıt alınamadığı için her iki olguda da mevcut fenotipin TNFRSF1A mutasyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kütükçüler ve arkadaşlarının yayınladıkları TRAPS mutasyonu, TNFRSF1A geninde, reseptörün hücre dışı bölgesi dışında tanımlanan ilk TRAPS mutasyonu olma niteliğini taşımaktadır (11).

Bilinen en yeni Türk TRAPS olguları 2010 yılında Coşan ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Çocukluğundan itibaren tekrarlayan ateş atakları, ürtiker benzeri deri döküntüsü, konjunktivit, eklem, kas, karın ve baş ağrısı bulguları olan 47 yaşındaki kadın hastada, TNFRSF1A geni için yapılan DNA dizi analiz sonucu literatürde henüz yayınlanmamış C29R mutasyonu saptanmıştır. Olgunun benzer klinik bulguları olan 2 oğlunda da aynı mutasyon saptanmıştır (12).

2.2.8.8. TRAPS'in Tedavisi

Otoenflamatuar sendromların tedavisi, öncelikle akut atakların baskılanmasını, sonra da atak sıklığını ve süresini azaltmayı, ayrıca amiloidoz gibi ciddi kalıcı organ tutulumlarını önlemeyi amaçlamaktadır. TRAPS'de akut atak sırasındaki ağrı ve yangının kontrol altına alınmasında glukokortikosteroidler oldukça etkilidir. Etiyopatogenezinin yola çıkılarak TNF- α inhibitörlerinden etanersept diğer bir tedavi seçeneği olarak gündeme gelmiştir. Etanerseptin atak sayısını, şiddetini ve süresini azalttığı, tedavisi kesilen olgularda yangı ataklarının şiddetlendiği bildirilmiştir. Etanerseptin, kullanılan glukokortikosteroid dozunu ve sıklığını azalttığı da bildirilmiştir. Diğer bir tedavi alternatifi, yine yangısal bir sitokin olan IL-1 β 'yı bloke etmek için kullanılan IL-1 β reseptör antagonisti olan anakinradır. AAA'da kullanılan temel tedavi olan kolçisinin, TRAPS'de semptomlar üzerindeki etkisinin minimum düzeyde olduğu bildirilmiştir (62).

MATERYAL ve YÖNTEMLER

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Allerji ve İmmunoloji Bölümü ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın İmmunoloji Bilim Dalı'na başvuran 29 pediatrik hasta ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na başvuran bir erişkin hasta dahil edilmiştir.

3.1. Periyodik Ateş Sendromu Şüphesi Taşıyan Olguların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

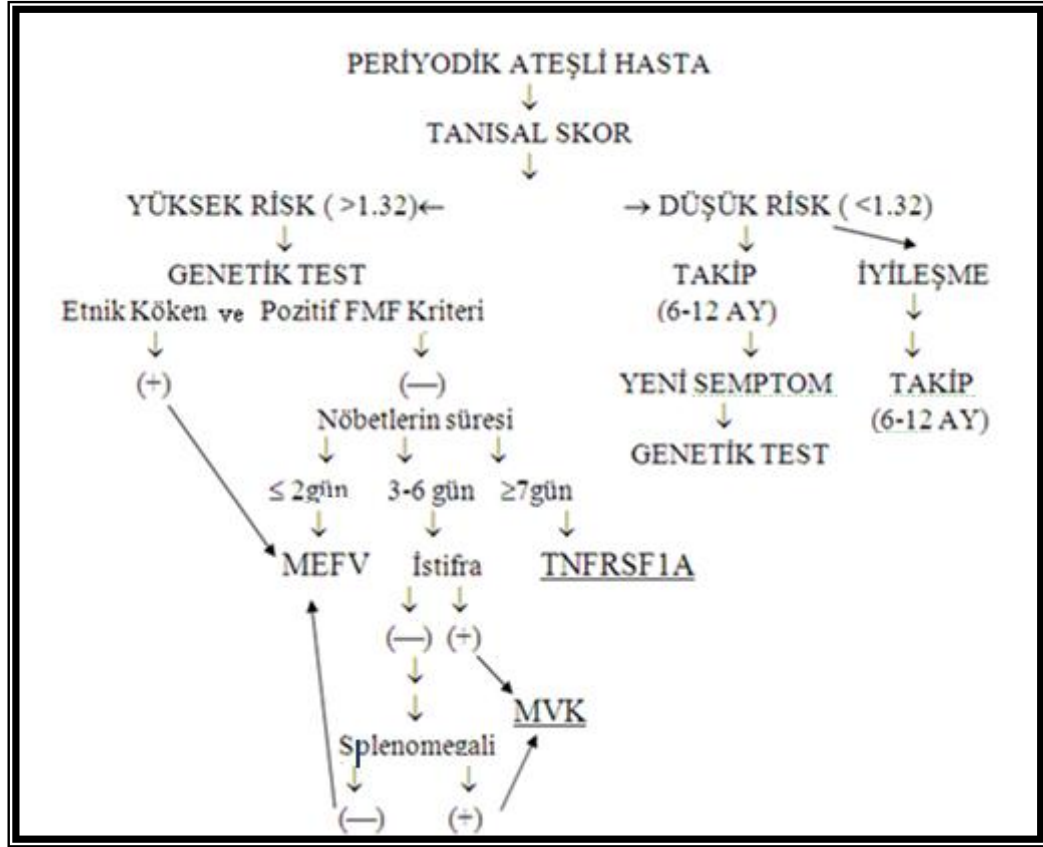
Çalışmaya dahil edilecek olan hastaları belirlemek için Gattorno ve arkadaşlarının, kalıtsal otoenflamatuvar sendromlar ile ilişkili genlerin birinde mutasyon taşıma riskinin önceden tahminini sağlayan klinik parametreleri belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmadan yararlanılmıştır. Kullanılan tanısal skor hesaplama denklemi şekil 3.1'de, belirlenen her hasta için doldurulan hasta bilgi formu Ek-1'de verilmiştir. Denklem göre hesaplanan tanısal skor değerinin 1,32'nin üzerinde olması, olgu periyodik ateş sendromlarının biri açısından pozitif genetik test sonucuna sahip olma riski taşıyor anlamına gelmektedir (63).

Olgunun tanısal skor değeri 1,32'den küçük ise, 6–12 ay süre ile ateş semptomlarının devam edip etmediği takip edilir. Tanısal skor değerinin 1,32'den büyük olması durumunda, uygulanacak olan genetik testin seçiminde izlenmesi önerilen algoritma “Şekil 3.2”de sunulmuştur (63).

TANISAL SKOR HESAPLAMASI		
NÖBET BAŞLANGIÇ YAŞI	AY olarak :	—0.067
ABDOMİNAL AĞRI	HİÇBİR ZAMAN = 0 ARA SIRA/NADİR = 2 HER ZAMAN = 3	1.494
AFTÖZ	HİÇBİR ZAMAN = 0 ARA SIRA/NADİR = 1 HER ZAMAN = 2	—1.504
TORASİK AĞRI	YOK = 0 VAR = 1	1.958
DİYARE	HİÇBİR ZAMAN = 0 NADİR = 1 ARA SIRA = 2 HER ZAMAN = 3	0.901
AİLE HİKAYESİ	YOK = 0 VAR = 1	1.503

TANISAL SKOR = [— (0.067 x yaş(ay)) + (1.494 x abdominal ağrı) — (1.504 x aftöz) + (1.958 x torasik ağrı) + (0.901 x diyare) + (1.503 x aile hikâyesi)]

Şekil 3.1. Tanısal skor denklemi (63).



Şekil 3.2. Tanısal skor değerine göre hastalığın tanısının konulmasında izlenecek algoritma (63).

3.2. Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Periferik Kan Örneklerinin Alımı

Çalışmaya dahil edilen 30 hastanın 23'ünü projemizin başlangıcından önce Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) için mutasyon analizi yapılan hastalar oluşturmaktadır. Bu 23 hastanın 7'sinin DNA materyali Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; 16'sının DNA materyali ise Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı'ndan, hastalardan imzalı bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra temin edilmiştir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 6 hasta, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bölümü'ne, 1 hasta ise Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na projemizin başlangıcından sonra başvurduğu için, periferik kanları K₃EDTA'lı tüplere alınıp DNA eldesi yapılana kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.3. Periferal Kandan DNA Eldesi

Olguların genomik DNA'larının eldesinde, Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart DNA eldesi yöntemi (64) modifiye edilerek uygulandı. DNA eldesi için kullanılan çözeltiler ve yöntem basamakları aşağıdaki gibi uygulandı.

3.3.1 Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Tamponu

NH ₄ Cl ₂	(Sigma)	4.14 gr
KHCO ₃	(Sigma)	0.5 gr
0,5 M EDTA	(Sigma)	2 ml

Yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanan karışıma toplam hacim 500 ml olacak şekilde distile su (dH₂O) eklenerek hazırlanan lizis tamponu otoklavda sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

WBL (White Blood Lysis) Tamponu

4M NaCl	(Sigma)	2.5 ml
0,5 M EDTA	(Sigma)	5 ml

Yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanan karışıma toplam hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O eklenerek hazırlanan WBL tamponu otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

0,5 M EDTA

EDTA	(Sigma)	18.612 gr
NaOH tableti	(Sigma)	10–15 adet

Yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanan karışıma toplam hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O eklenerek hazırlanan çözeltinin pH'sı 8 olacak şekilde ayarlandı, otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

9.5 M Amonyum Asetat

Amonyum Asetat	(Merck)	36.613 gr
----------------	---------	-----------

Yukarıda belirtilen miktarda amonyum asetat 50 ml dH₂O'da çözüldü. Otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi

SDS (Merck) 1 gr

Yukarıda belirtilen miktarda SDS 10ml distile suda çözüldükten sonra filtreden(Orange Scientific) geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K (20mg/ml)

Proteinaz K (AppliChem Proteinase K) 100 mg

Yukarıda belirtilen miktarda proteinaz K 5 ml steril dH₂O'da çözüldü, -20°C'de saklandı.

4M NaCl

NaCl (Sigma) 23.4 gr

Yukarıda belirtilen miktarda NaCl 100 ml steril dH₂O'da çözüldükten sonra otoklavda sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

%70'lik Alkol (C₂H₅OH)

Etil Alkol (Reidel) 70 ml
dH₂O 30 ml

70 ml Etil alkol, 30 ml dH₂O ile karıştırıldı ve +4°C'de saklandı.

3.3.2 DNA İzolasyonu Basamakları

K₃EDTA'lı steril tüplere alınan 10 ml kan örneği alt üst edilerek homojenize edildikten sonra 50 ml'lik steril falkon tüplere aktarıldı. Üzerine 30 ml. lizis tamponu ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. Lizis tamponunun aktivitesini arttırmak amacı ile 15 dakika buzda bekletilen falkon tüpler bu süre sonunda +4°C sıcaklıkta, dakikada 2000 devir (rpm=revolution per minute) olacak şekilde 10 dakika santrifüj (Beckman Coulture-Allegra X-15) edildi. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen dökelti atılıp çökelti elle vurularak homojenize edildi. Bu işlemin ardından tüpe 20 ml. lizis tamponu eklendi. Vorteks ile karıştırılan falkon tüp tekrar +4°C sıcaklıkta, dakikada 2000 devir olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen dökelti atılıp çökelti elle vurularak homojenize edildi. Bu işlemin ardından çökelti üzerine 9,4 ml WBL tamponu, 50µl Proteinaz K (20mg/ml) ve 500µl %10'luk SDS çözeltileri eklendi. Tüp, alt üst edilerek yavaşça karıştırılıp, ağzı parafilm ile kapatıldıktan sonra 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon aşamasının ardından 30 dakika oda ısısında bekletilen falkon tüpe 3,7 ml 0.5M amonyum asetat eklendi. Beyazımsı bir renk oluşuncaya kadar elle vurularak iyice karıştırılması sağlandı. Oda ısısında, dakikada 5000 devir olacak şekilde 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucu elde edilen dökelti steril bir

falkon tüpe aktarıldı. Dökeltinin 2 katı miktarındaki %96'lık soğuk etil alkol, falkondaki dökelti üzerine yavaşça eklendi. Tüp yavaşça alt üst edilerek DNA'nın yoğunlaşması sağlandı. Mikropipet yardımı ile alınan DNA, içerisinde 500µl %70'lik etil alkol bulunan ependorf tüpe aktarıldı. Tüp, oda ısısında dakikada 14000 devir olacak şekilde 10 dakika santrifüj edilerek DNA'nın yıkanması sağlandı. Santrifüj işlemi sonrası dökelti atıldı, çökelti 37°C'lik etüvde ağzı açık olarak kurutuldu. Bu işlemin ardından tüpe 500µl steril distile su eklenerek DNA'nın çözünmesi sağlandı. Elde edilen genomik DNA örnekleri uzun süreli olarak -20°C, kısa süreli olarak ise +4°C'de saklandı.

3.4. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık dereceleri spektrofotometre (Nanodrop 1000) ile belirlendi. Ölçüm için 1.5 µl. Genomik DNA spektrofotometreye yüklendi. Örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerinin oranı ile DNA'nın saflığı ve DNA'nın miktarı ng/µl cinsinden belirlendi. Belirlenen değerlere göre DNA örnekleri 10ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi

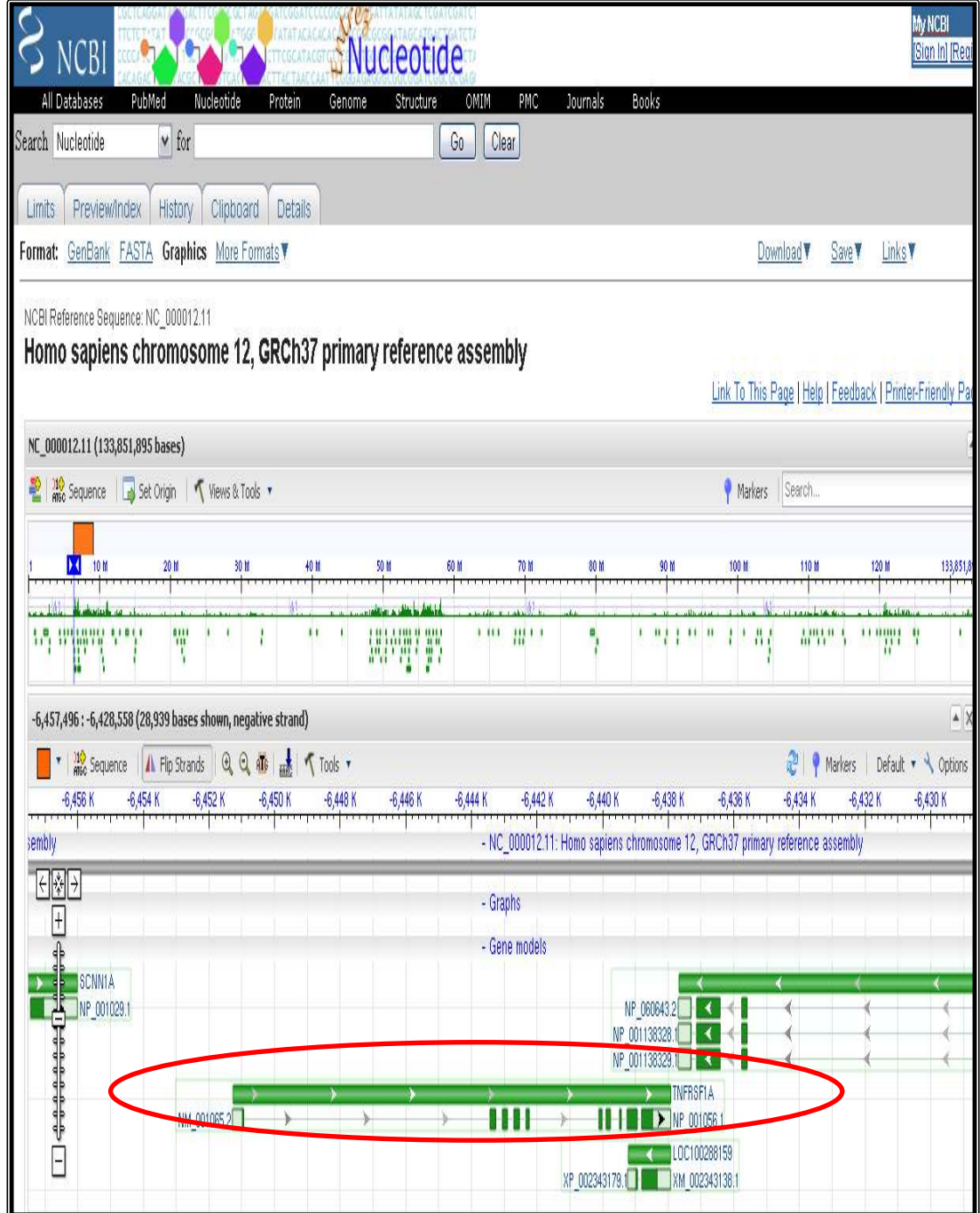
PCR reaksiyonu, "Bio-Rad MyCycler™ Thermal Cycler" cihazında gerçekleştirildi. İşlem basamakları aşağıda belirtilen şekilde uygulandı.

3.5.1. PCR Reaksiyonlarında TNFRSF1A Geninin Tüm Eksonlarını Amplifiye Etmek İçin Kullanılan Primerler

TNFRSF1A geninin tüm eksonlarını amplifiye etmek için kullanılacak primer dizileri belirlenirken, ekson bölgelerinin genom üzerindeki yakın konumları göz önünde bulundurularak 2 ile 3, 4 ile 5, 6 ile 7 ve 8 ile 9 numaralı eksonlar bütün olarak amplifiye edildi. TNFRSF1A geninin 10 eksonu NCBI Sequence Viewer programı ile şekil 3.3'de gösterilmektedir. TNFRSF1A geni için reaksiyonlarda kullanılan primerler ve bu primerle ile çoğaltılan ampikon büyüklükleri çizelge 3.1'de verilmiştir. Şekil 3.3'de TNFRSF1A geninin 10 eksonunun NCBI Sequence Viewer programındaki görünümü gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. TNFRSF1A geninin PCR ile çoğaltılacak olan eksonları, ilgili primerleri ve amplicon büyüklükleri

PCR Ampliconunun Kapsadığı Ekson/Eksonlar	Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3' yönünde)	PCR Ampliconunun Büyüklüğü (baz çifti-bç)
1 Numaralı Ekson	İleri primer	ACTTGGGACGTCCTGGACAGACC	193
	Geri primer	GGAAGGTGCCTCGCCCACCAG	
2 ve 3 Numaralı Eksonlar	İleri primer	CCTCTCTTGATGGTGTCTCC	575
	Geri primer	CTGACTCTCCTGCCTGTGC	
4 ve 5 Numaralı Eksonlar	İleri primer	GGTATGTCAGGAAGGGGATG	547
	Geri primer	CAGTGCCCAGCAGCTCTC	
6 ve 7 Numaralı Eksonlar	İleri primer	TGGTAGGGCCTCTGTTC	428
	Geri primer	CCACCCATGTCCTCCCTCAC	
8 ve 9 Numaralı Eksonlar	İleri primer	ATGTCACCACAAGTCCCCACTGCC	698
	Geri primer	GCCTCTCGTGGTCCCCTCTGGGAG	
10 Numaralı Ekson	İleri primer	CGGCTGGAGACGAGGAGGCT	669
	Geri primer	CTCTTGAGCCCACGGCGCAC	



Şekil 3.3. TNFRSF1A geninin 10 eksonunun NCBI Sequence Viewer programında görünümü (65).

3.5.2. PCR Reaksiyonunun İçeriği

Çizelge 3.1’de belirtilen primerler kullanılarak 1, 2–3, 4–5, 6–7 ve 10 numaralı eksonları çoğaltmak için kurulan PCR reaksiyonunun içeriği çizelge 3.2, 8–9 numaralı eksonları çoğaltmak için kurulan PCR reaksiyonunun içeriği çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. 1, 2–3, 4–5, 6–7 ve 10 numaralı eksonların PCR reaksiyon içeriği

İçerik	μ l
dH ₂ O	14.5
10X Tampon	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
dNTP Karışımı (10 mM)	1.5
İleri Primer (10 mM)	1
Geri Primer (10 mM)	1
Taq Polimeraz (5 u/ μ l)	0.3
DNA (10 ng/ μ l)	3

Çizelge 3.3. 8-9 numaralı eksonların PCR reaksiyon içeriği

İçerik	μ l
dH ₂ O	5
10X Tampon	2.5
MgCl ₂ (25mM)	7
dNTP Karışımı (10mM)	1.5
İleri Primer (10 mM)	1
Geri Primer (10 mM)	1
Betain	4
Taq Polimeraz (5u/ μ l)	0.3
DNA (10ng/ μ l)	3

3.5.3. PCR Programı

PCR cihazı, TNFRSF1A geninin 1, 2–3, 4–5 ve 6–7 numaralı eksonlarının amplifikasyonu için 94°C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonun ardından her bir döngüde denatürasyon için 94°C’de 5 saniye, birleşme için 60°C’de 5 saniye, uzama için 72°C’de 5 saniye olacak şekilde 35 döngü halinde programlandı. Son uzama ise 72°C de 5 dakika olarak ayarlandı.

TNFRSF1A geninin 8–9 ve 10 numaralı eksonlarının amplifikasyonu için PCR cihazı, 94°C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonun ardından her bir döngüde denatürasyon için 94°C’de 5 saniye, birleşme için 65°C’de 5 saniye, uzama için 72°C’de 5 saniye olacak şekilde 35 döngü halinde programlandı. Son uzama ise 72°C de 5 dakika olarak ayarlandı.

3.6. Agaroz Jel Elektrophorezi ve Görüntüleme Sistemi

Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için örnekler %2'lik jel elektrophorezi ile yürütüldü.

3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar

1X TBE Tamponu

Tris-Baz ($C_4H_{11}NO_3$)	(Sigma)	21.68 gr
Borik Asit (H_3BO_3)	(Merck)	11 gr
EDTA	(Sigma)	1.48 gr

Yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanan karışıma toplam hacim 1000 ml olacak şekilde dH_2O eklenerek hazırlanan 1X TBE tamponu $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.6.2. %2lik Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz jeli hazırlamak üzere 2 gr agaroz (Generose), erlenmayerde 100 ml 1X TBE (Triz-Borat-EDTA) tamponunda çözüldü. $50-55^{\circ}C$ 'ye gelene kadar soğutuldu. $0.5 \mu g/ml$ etidyum bromür (EtBr- Sigma) ilave edildi. Elektrophorez küvetine tarak yerleştirildikten sonra sıvı haldeki agaroz jel elektrophorez küvetine döküldü. Oda ısısında polimerleşen jel, taraklar çıkarıldıktan sonra örneği yüklemek üzere içerisinde 1X TBE bulunan elektrophorez tankına yerleştirildi.

3.6.3. PCR Ürünlerinin Elektrophorez İşlemi

PCR ürünleri ile Promega marka 100bp DNA Ladder (Kat.No. #G2101), renkli yükleme tamponu kullanılarak mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Elektrophorez tankına bağlı güç kaynağı 120 volta ayarlanıp, örnekler jelde 20 dakika yürütüldü. Bu işlemlerin ardından jel, ultraviyole (UV) ışığa veren transilluminatör (Syngene-İngenius) yardımıyla incelendi. Transilluminatör cihazına bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraflar alındı.

3.7. PCR Reaksiyonun Sonunda Amplikonların Temizlenmesi

İstenen amplifikasyonların sağlandığı PCR ürünleri, Roche marka pürifikasyon kiti (Kat.No. 11 732 676 001) ile temizlendi. Pürifikasyon işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

PCR ürünü steril dH_2O eklenerek $100 \mu l$ 'ye tamamlandı. Üzerine $500 \mu l$ bağlama tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım, pürifikasyon filtresinin üzerine aktarıldı. Oda ısısında 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Filtre tüpünün altında biriken çökelti döküldü.

Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi. Oda ısısında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpünün altında biriken çökelti atıldı. İkinci yıkama 200 µl yıkama tamponu ile yapıldı. Oda ısısında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve çökelti atıldı. Pürifikasyon filtresi steril ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl elüsyon tamponu ilave edildi. Oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibine biriken çökeltideki DNA, agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

3.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi reaksiyonları, çizelge 3.3’de belirtilen reaksiyon içeriği hazırlandıktan sonra “Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700” marka Thermal Cycler ile aşağıda belirtilen DNA dizileme programına göre gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4 DNA Dizileme Reaksiyon İçeriği

İçerik	µl
dH ₂ O	5
5X Tampon	1
Big Dye v.3.1	1
Primer (3,2 µM)	1
Kalıp DNA	2

3.8.1. DNA Dizi Analizi PCR Programı

PCR cihazı her döngüde denatürasyon 96°C’de 10 saniye, birleşme 50 °C’de 5 saniye, uzama 60 °C’de 4 dakika olacak şekilde, 25 döngü olarak programlandı.

3.9. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu Sonunda Amplikonların Temizlenmesi

2µl sodyum asetat (3.2 M, Mallinckrodt, pH 4.6) mikropipet ile 1.5 ml’lik steril ependorf tüpe konuldu. Üzerine 30 µl %96’lık soğuk etil alkol (EtOH) ilave edildi. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürünü eklendi ve pipetaj yapılarak hafifçe karışması sağlandı. Ependorf karanlık bir ortamda buz üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra oda ısısında 14000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası dökelti mikropipetle alınıp atıldı. Çökeltinin üzerine 250 µl %70’lik etil alkol eklendi. Oda ısısında 14000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Dökelti mikropipet ile dikkatle alınıp atıldı. Tüp karanlık bir ortamda 10–15 dakika kurumaya bırakıldı.

3.10. Örneklerin Cihaza Yüklenmesi ve Analizi

Liyofilize haldeki örnekler 20µl formamid eklendi. İçerik, dizi analizi tüpüne aktarıldı. 94°C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra 10 dakika buzda bekletilen örnekler ABI 3310 dizileme cihazına yüklendi. Cihazdan elde edilen ham veriler ABI Sequence Analysis v3.1 programında değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma grubu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Allerji ve İmmunoloji Bölümü, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmunoloji Bilim Dalı'na başvuran 10'u kız 20'si erkek toplam 30 bireyden oluşmaktadır.

4.1. Klinik Bulgular

Çalışmadaki 30 hastanın Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) açısından MEVF geninde yapılan mutasyon taramasına göre analiz sonuçları, tanısal skor değerleri ve ateş nöbetlerinin başlangıç yaşı çizelge 4.1'de, ataklarının süresi, 1 yıl içerisinde geçirdikleri ortalama atak sayısı, aile hikayesi ve aft bulguları çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Klinik bulgu çizelgesi-1

Hasta No.	Ateş Nöbetlerinin Başlangıç Yaşı	AAA sonucu	Tanısal Skor değeri
1.	12 ay	Normal/Normal	— 0.824
2.	14 yaş	Normal/Normal	—
3.	33 yaş	*—	—
4.	12 ay	Normal/Normal	3.529
5.	8 ay	E148Q/Normal	2.167
6.	4 yaş	Normal/Normal	2.884
7.	15 ay	Normal/Normal	— 1.005
8.	4 ay	Normal/Normal	2.71
9.	22 ay	Normal/Normal	5.576
10.	6 ay	E148Q/Normal	— 3.41
11.	19 ay	Normal/Normal	— 1.293
12.	4 yaş	Normal/Normal	—3.216
13.	6 ay	Normal/Normal	4.291
14.	4 yaş	Normal/Normal	— 0.228
15.	4 yaş	M694V/Normal	3.521
16.	8 ay	Normal/Normal	4.244
17.	11 ay	Normal/Normal	— 0.737
18.	1 ay	Normal/Normal	— 1.571
19.	4 yaş	Normal/Normal	— 0.238
20.	3 yaş	Normal/Normal	2.069
21.	1 yaş	Normal/Normal	— 0.804
22.	2 yaş	M694V/Normal	— 0.124
23.	17 ay	Normal/Normal	1.839
24.	15 ay	Normal/Normal	5.279
25.	3,5 ay	Normal/Normal	— 1.74
26.	2 yaş	Normal/Normal	1.38
27.	4 yaş	Normal/Normal	0.07
28.	4 ay	Normal/Normal	1.215
29.	1 ay	Normal/Normal	1,074
30.	5 yaş	Normal/Normal	— 4.02

(*AAA sonucu bulunmamaktadır)

Çizelge 4.2. Klinik bulgu çizelgesi–2

Hasta No.	Nöbet Süresi (gün)	Nöbet Sayısı/Yıl	Aft Oluşumu	Aile Hikayesi
1.	2–5	6–12	+	–
2.	2–5	2–6	–	–
3.	>10	2–6	–	–
4.	5–10	6–12	+	–
5.	5–10	6–12	–	–
6.	2–5	6–12	–	–
7.	5–10	>12	–	–
8.	2–5	6–12	+	–
9.	2–5	6–12	+	(+)*
10.	2–5	2–6	+	(+)**
11.	2–5	6–12	+	–
12.	2–5	>12	–	–
13.	2–5	>12	–	–
14.	2–5	2–6	+	–
15.	2–5	>12	+	(+)***
16.	5–10	6–12	+	–
17.	2–5	>12	–	–
18.	5–10	>12	+	–
19.	2–5	6–12	+	–
20.	2–5	>12	+	(+)****
21.	2–5	>12	–	–
22.	2–5	>12	+	–
23.	5–10	>12	+	–
24.	2–5	>12	–	–
25.	5–10	>12	+	–
26.	2–5	6–12	–	–
27.	2–5	>12	+	–
28.	2–5	6–12	+	–
29.	2–5	6–12	+	–
30.	2–5	2–6	–	–

*Olgunun 2. ve 3. dereceden 2 akrabası (dayısı ve dayısının kızı) AAA tanısı almıştır.

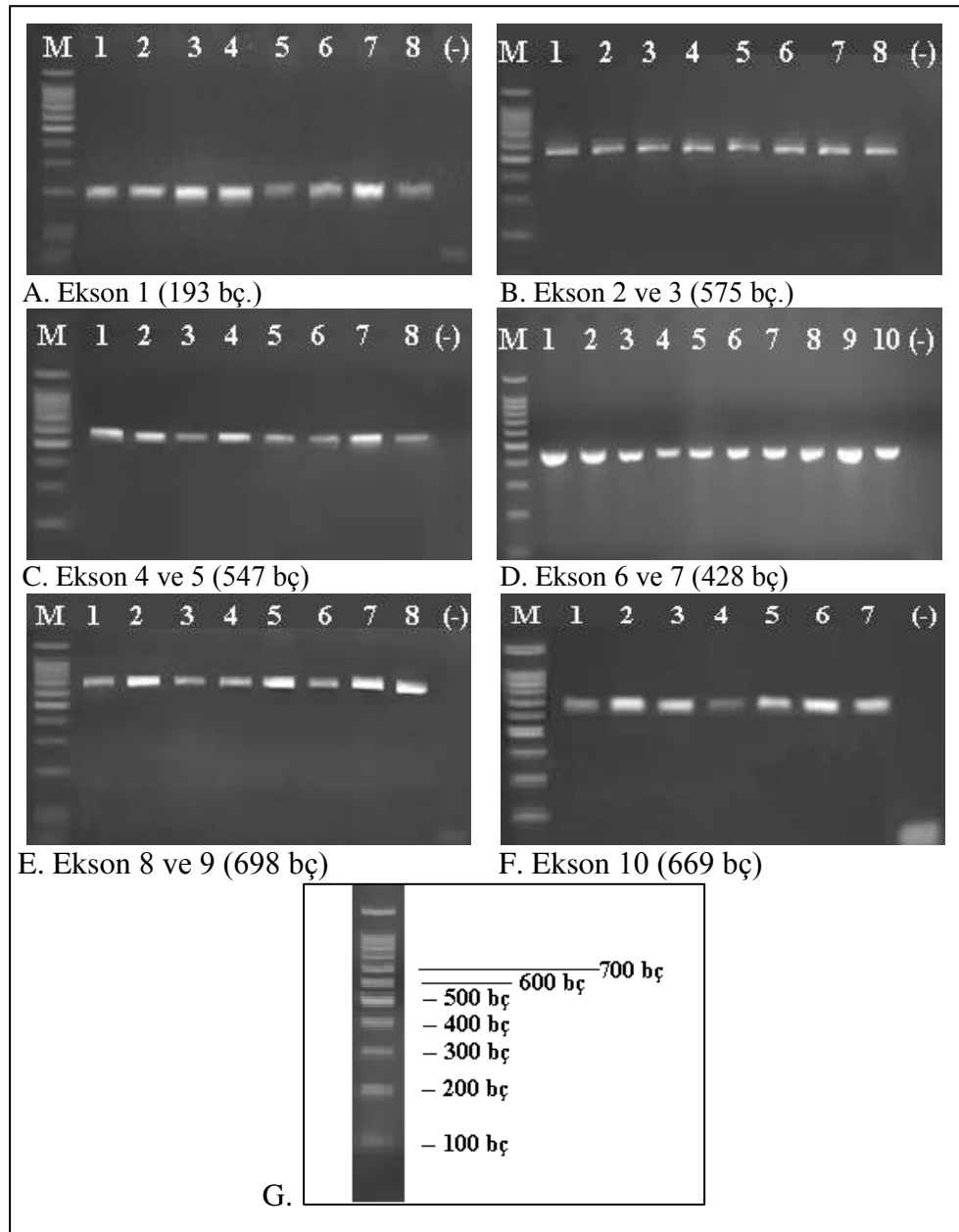
**Olgunun annesi olgu ile aynı AAA mutasyonu taşımaktadır.

***Olgunun erkek kardeşinin (20 nolu olgu) 15–20 günde bir gözlenen, 2–5 gün süren, 38°C'nin üzerinde ateş atakları bulgusu mevcuttur.

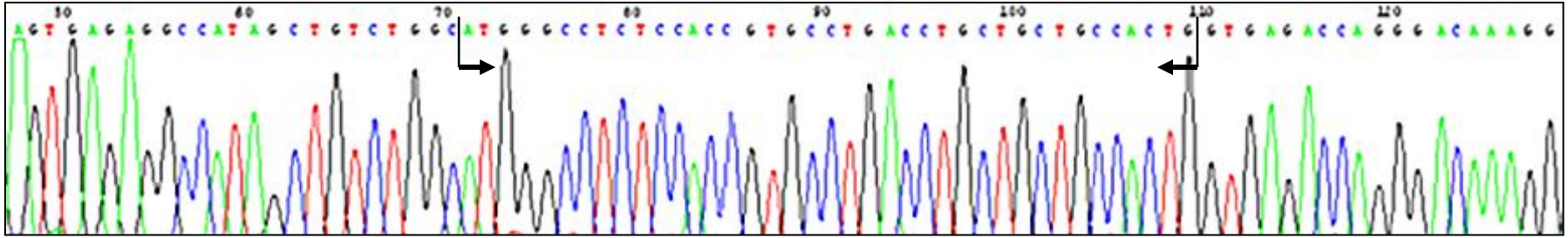
****Olgunun kız kardeşinin (15 nolu olgu), 15 gün–2 ay aralığında bir gözlenen, 2–5 gün süren, 38°C'nin üzerinde ateş atakları mevcuttur.

4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

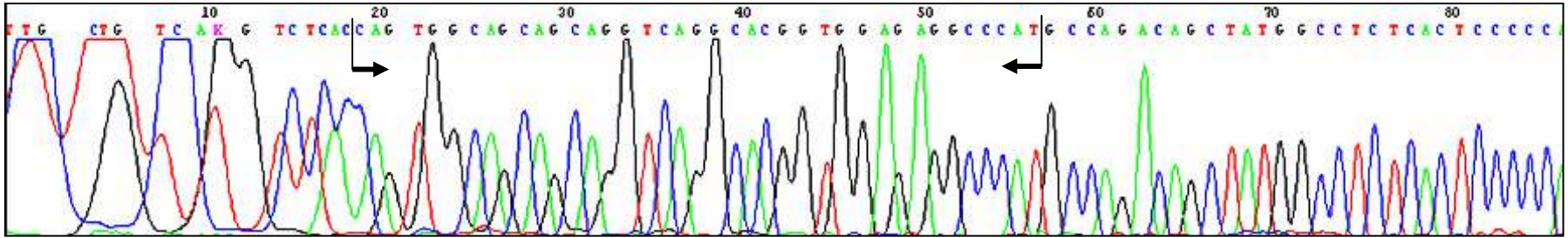
Periyodik ateş şüphesi taşıyan olguların TNFRSF1A genleri PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. TNFRSF1A geni için yapılan amplifikasyonların agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen görüntüleri her ekson için temsili olarak şekil 4.1’de verilmiştir. Olguların amplifiye edilen TNFRSF1A eksonlarının DNA dizi analizi gerçekleştirildi. TNFRSF1A geninin 10 eksonunun materyal ve yöntemler bölümünde verilen primerler ile çoğaltılan ampliconlarının referans DNA dizileri şekil 4.2–4.13’de verilmiştir.



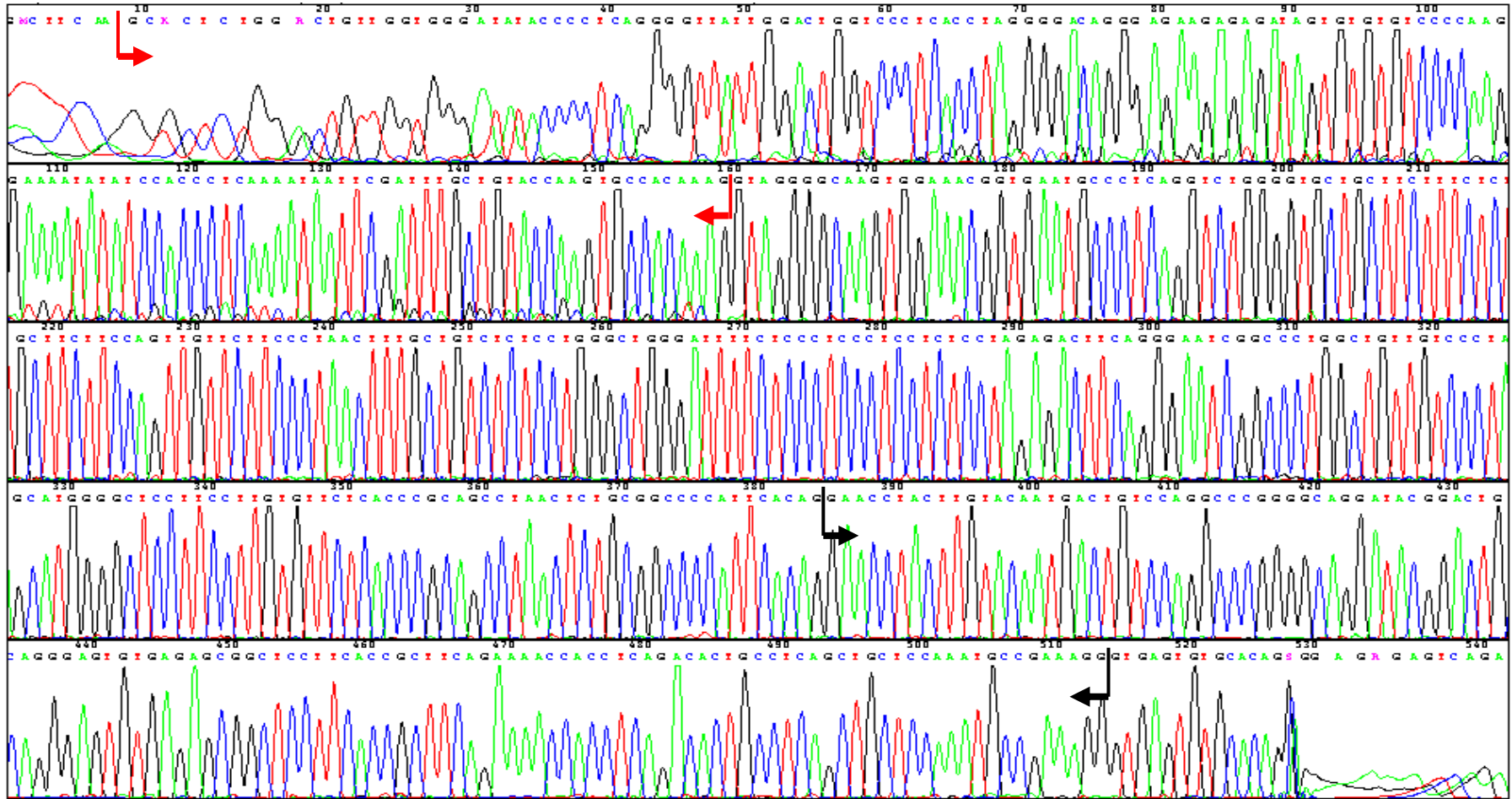
Şekil 4.1. TNFRSF1A geni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri ile referans marker görüntüsü. (M: Marker, (-) : Negatif Kontrol, bç : baz çifti, 1–10 : Olgu numaraları)



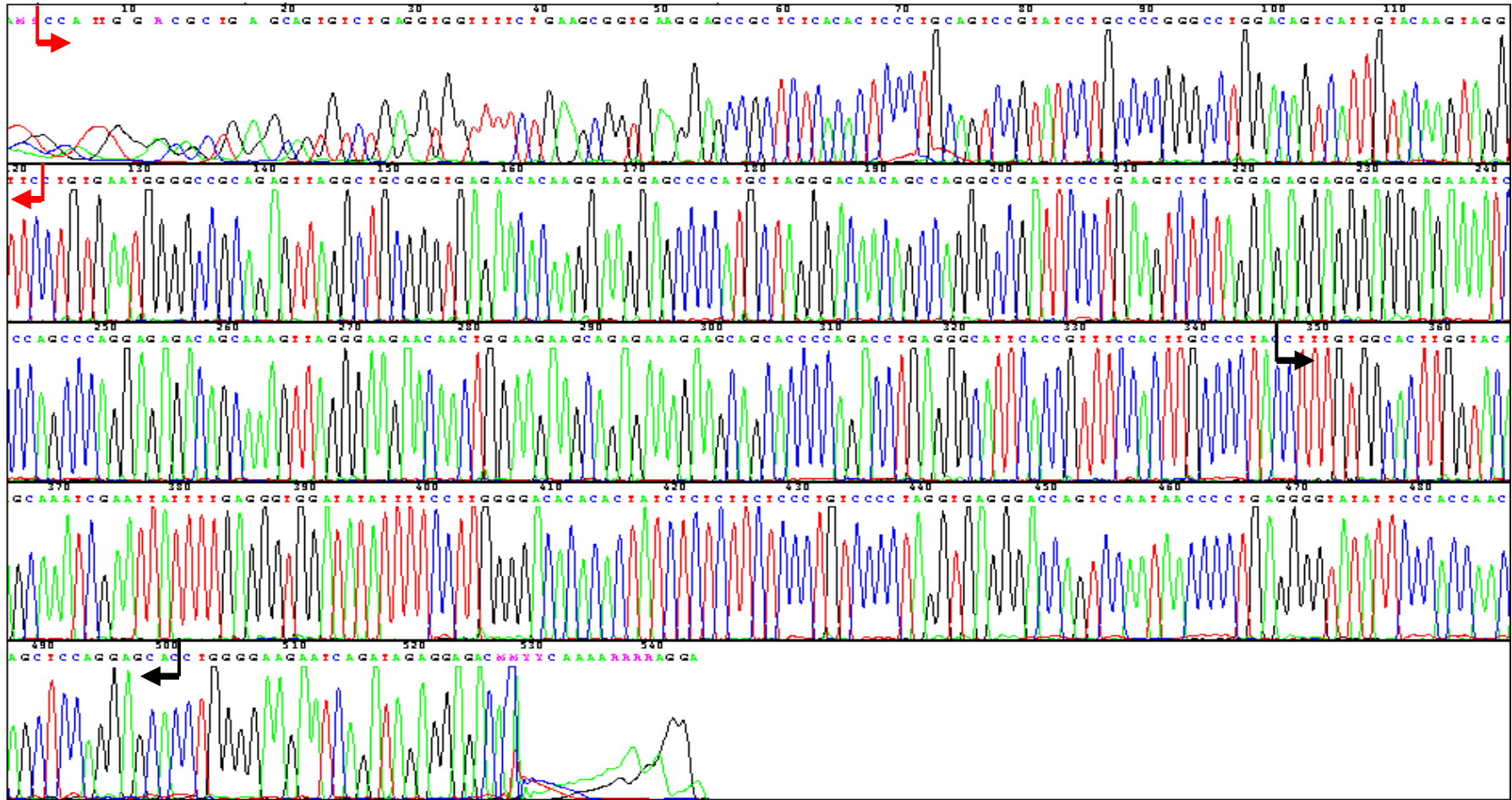
Şekil 4.2. TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki ok işaretleri 1 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.



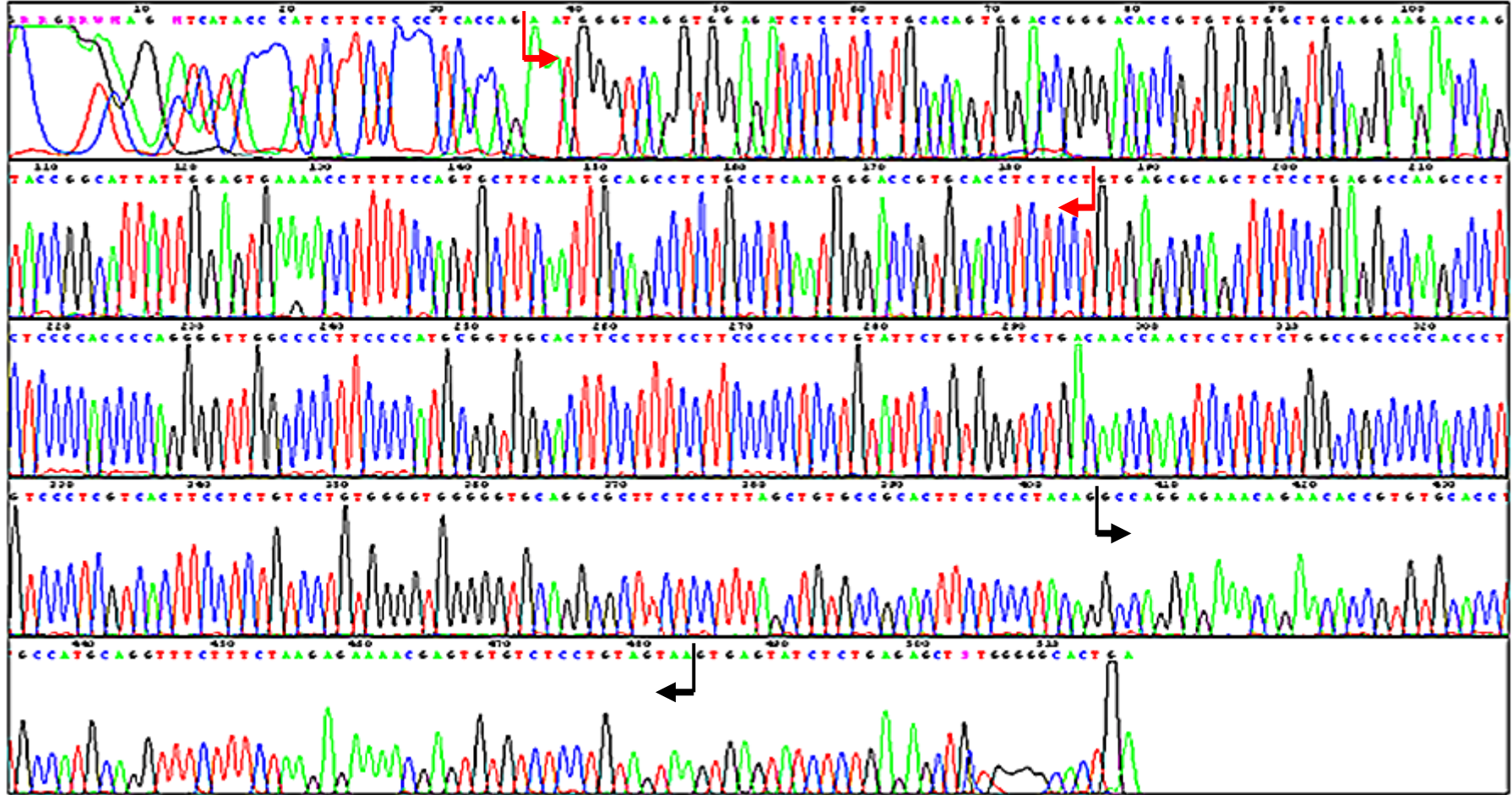
Şekil 4.3. TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki ok işaretleri 1 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.



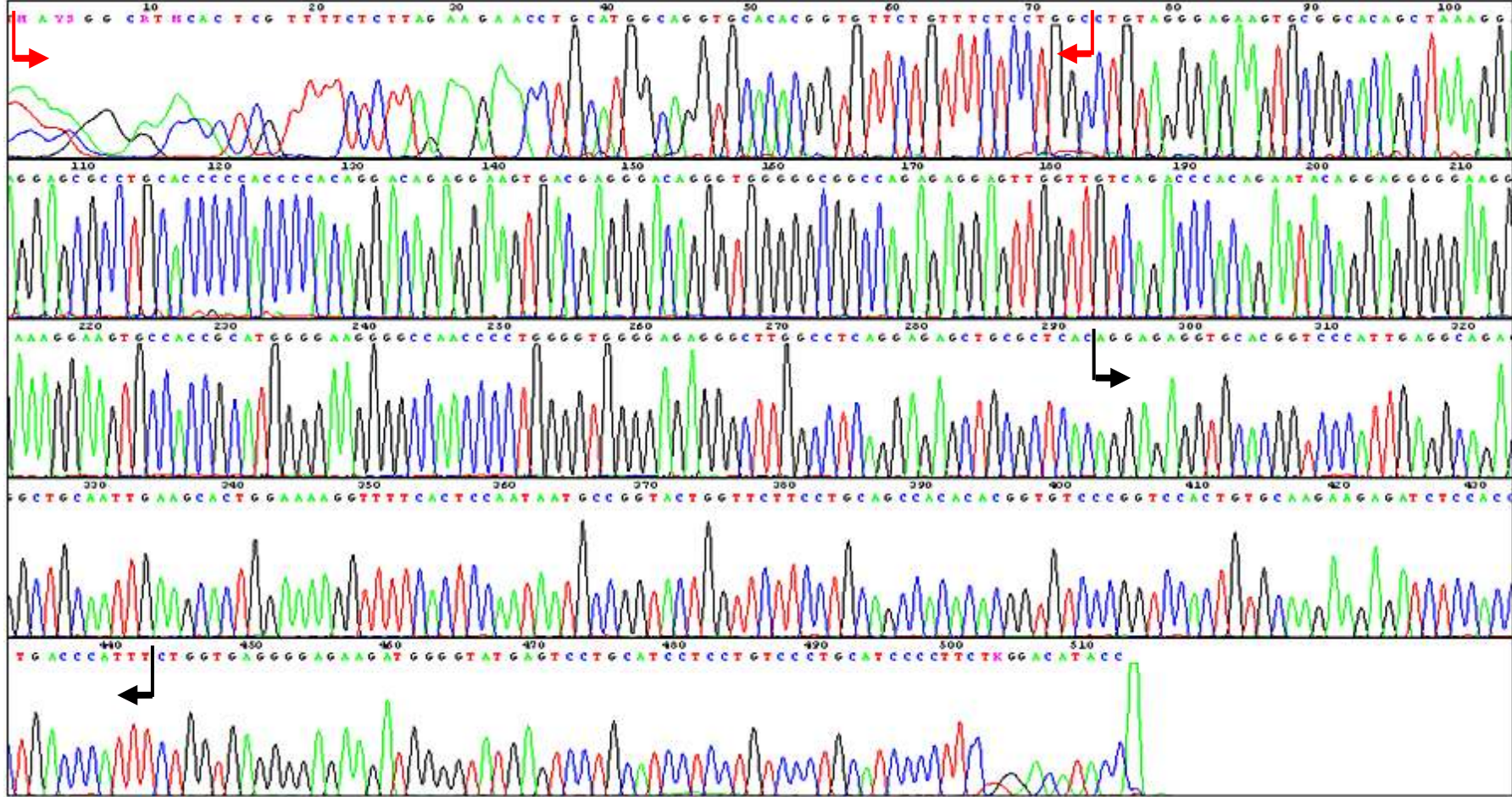
Şekil 4.4. TNFRSF1A geninin 2 ve 3 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 2 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 3 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişi göstermektedir.



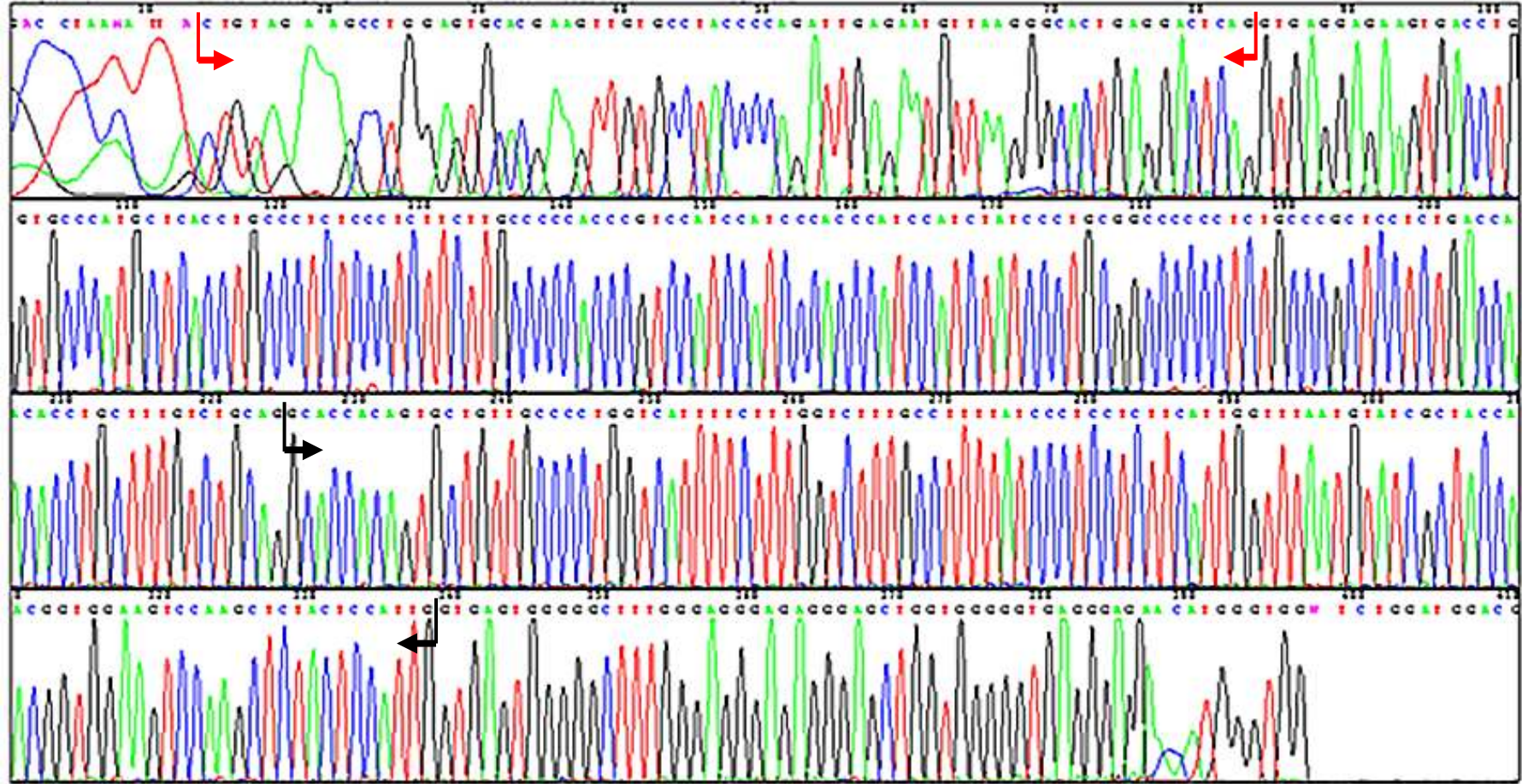
Şekil 4.5. TNFRSF1A geninin 2 ve 3 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 3 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 2 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.



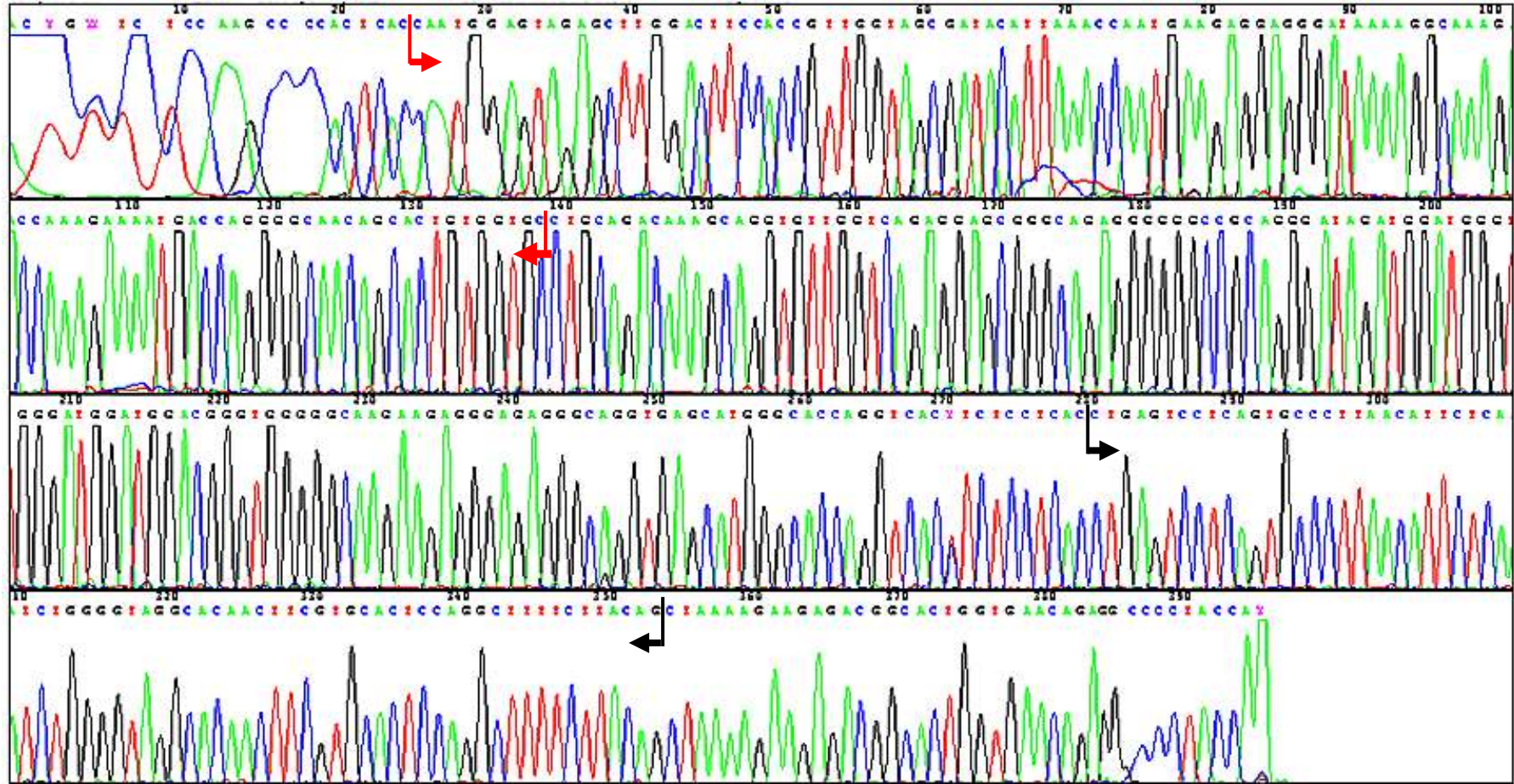
Şekil 4.6. TNFRSF1A geninin 4 ve 5 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 4 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 5 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişi göstermektedir.



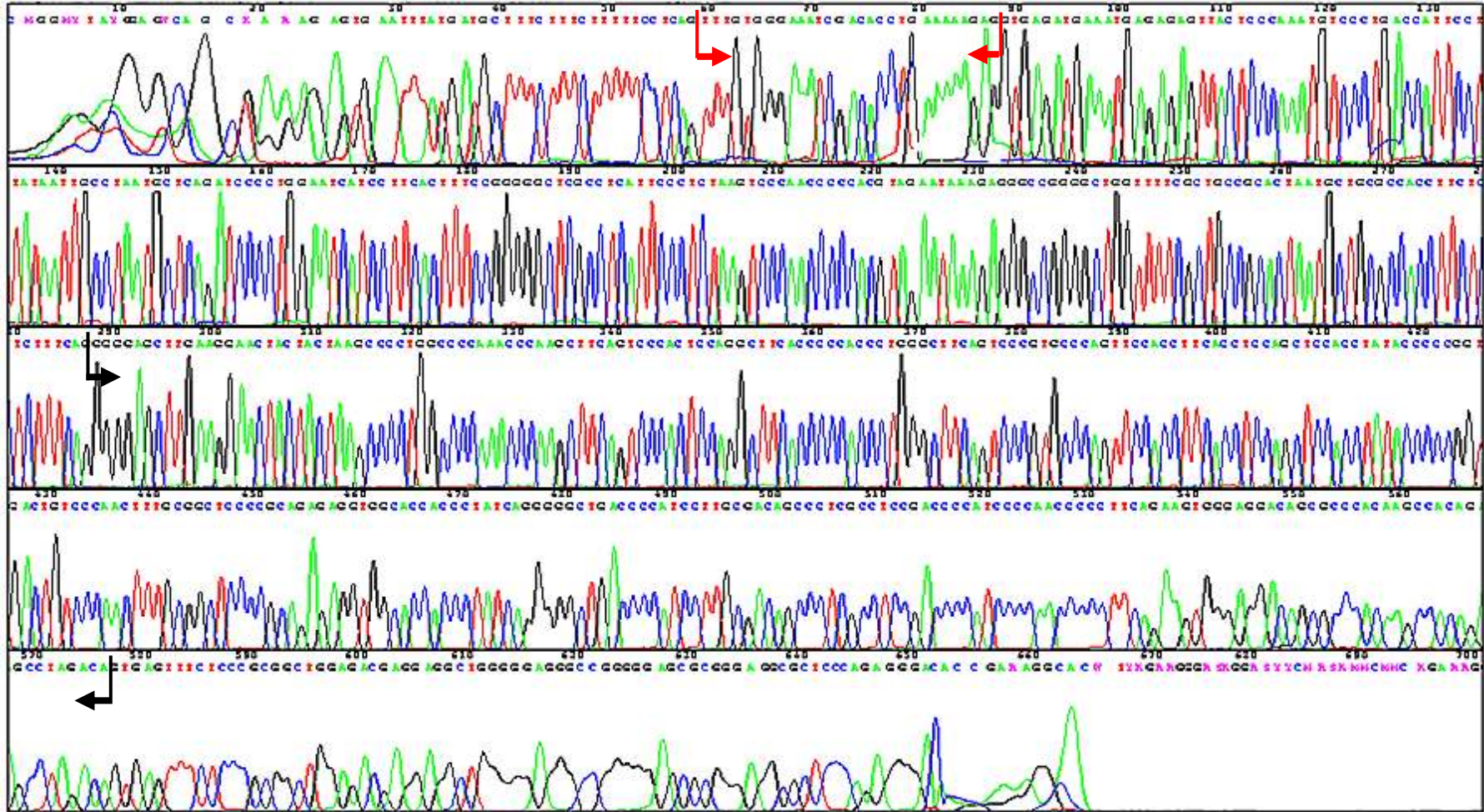
Şekil 4.7. TNFRSF1A geninin 4 ve 5 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 5 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 4 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişi göstermektedir.



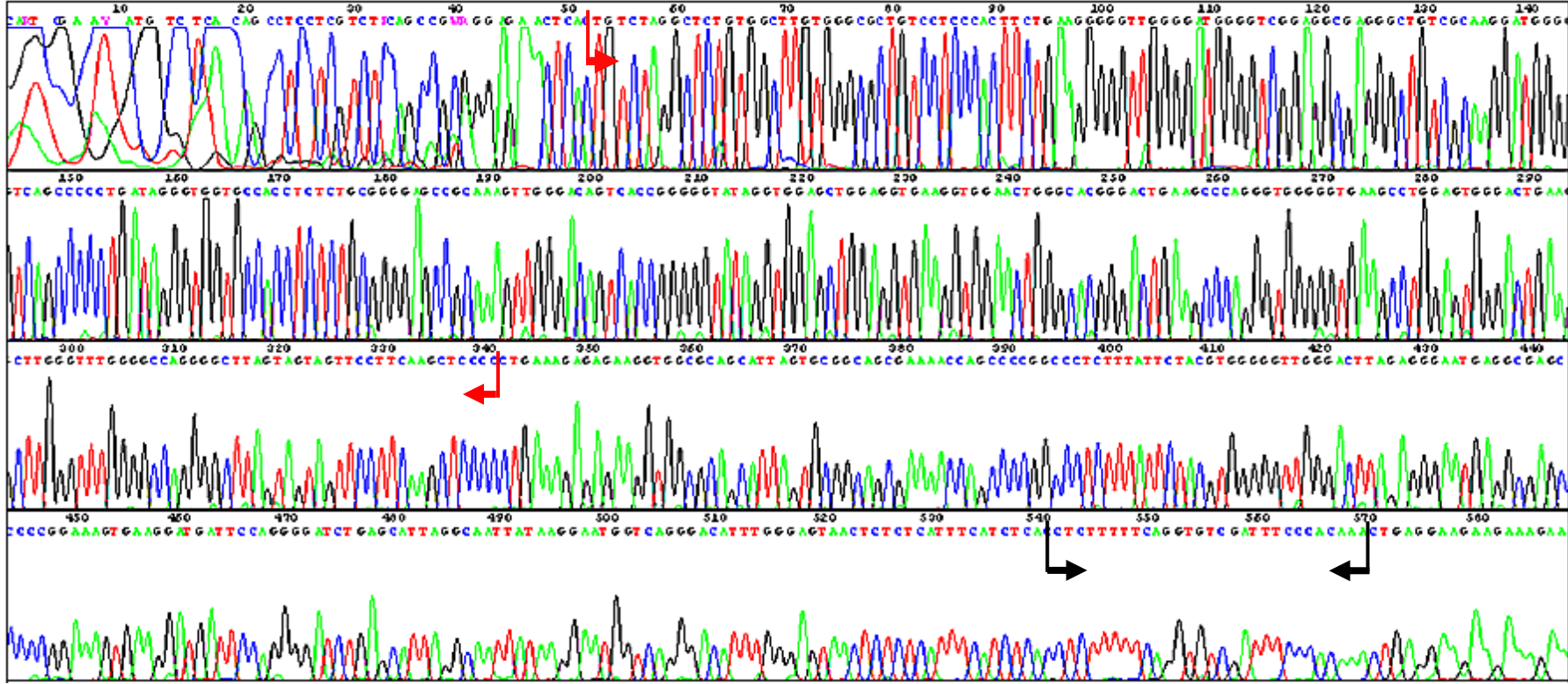
Şekil 4.8. TNFRSF1A geninin 6 ve 7 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 6 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 7 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişi göstermektedir.



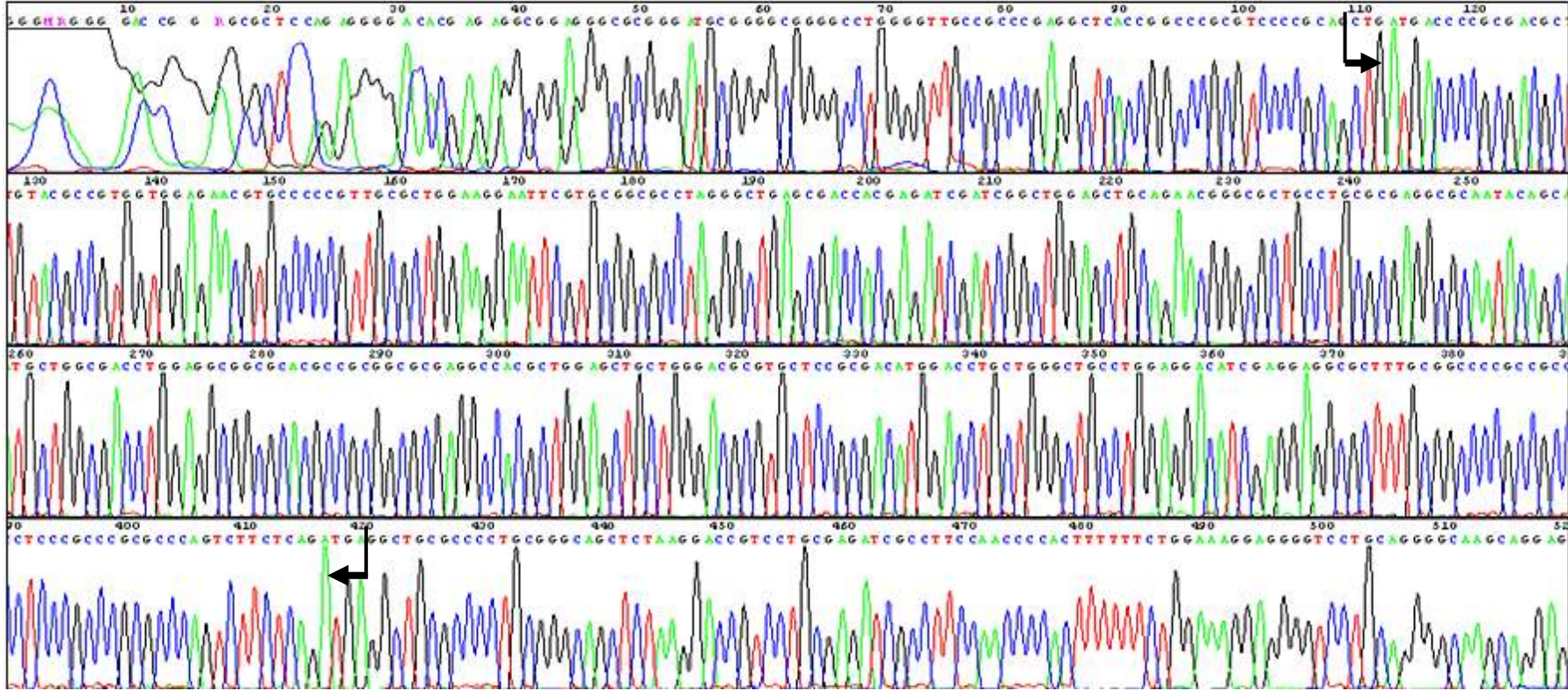
Şekil 4.9. TNFRSF1A geninin 6 ve 7 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 7 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 6 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişi göstermektedir.



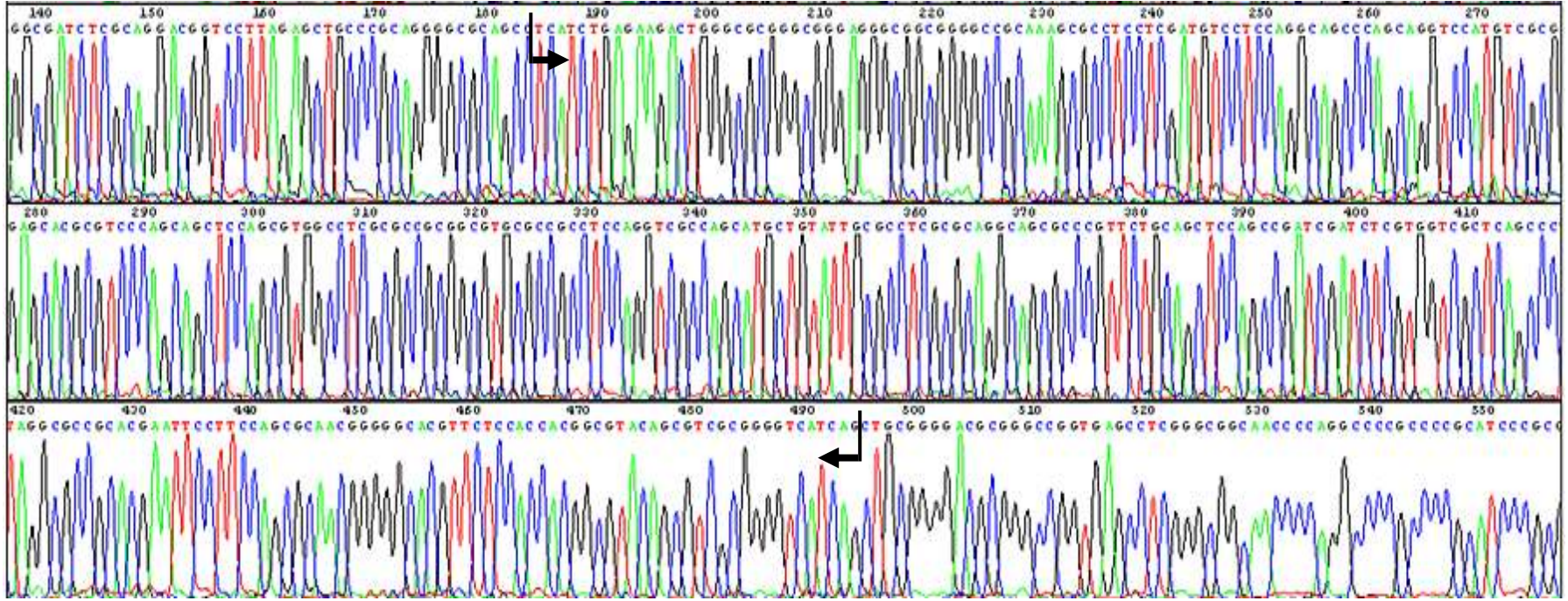
Şekil 4.10. TNFRSF1A geninin 8 ve 9 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 8 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 9 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir



Şekil 4.11. TNFRSF1A geninin 8 ve 9 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki kırmızı renkli ok işaretleri 9 numaralı eksonun, siyah renkli ok işaretleri 8 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.



Şekil 4.12. TNFRSF1A geninin 10 numaralı eksonunun ileri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki ok işaretleri 10 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.



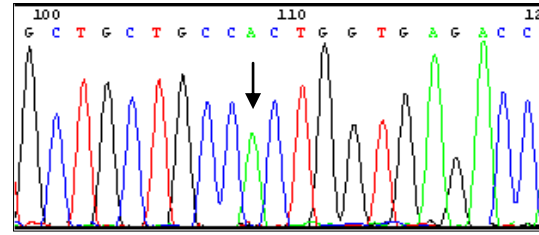
Şekil 4.13. TNFRSF1A geninin 10 numaralı eksonunun geri primer ile okunan DNA dizisi. Şekildeki ok işaretleri 10 numaralı eksonun kodlayıcı bölgesinin başlangıç ve bitişini göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen olguların DNA dizi analizi sonucu elde edilen TNFRSF1A geni dizileri, “NCBI Reference Sequence: NG_007506.1” nükleotid dizisi referans alınarak değerlendirilmiştir (65).

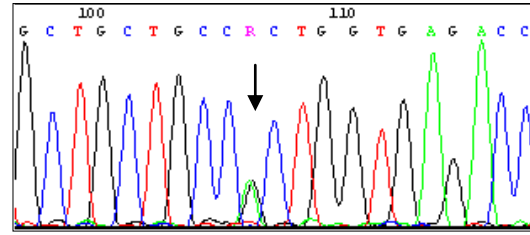
Yapılan değerlendirmeye göre; 4 transisyon ve 1 transversiyon nükleotid değişimi saptanmıştır (Çizelge 4.3). Olgulardan 10, 12 ve 27 numaralı hastalarda, TNFRSF1A geninin materyal ve yöntemler kısmında verilen primerlerle amplifiye edilen bölgelerinde nükleotid değişimi saptanmazken; olguların geri kalanının taşıdığı varyasyonlar çizelge 4.4’de verilmiştir. Olgularda saptanan nükleotid değişimlerinin dizi görüntüleri şekil 4.14–4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Olgularımızda saptanan nükleotid değişimleri

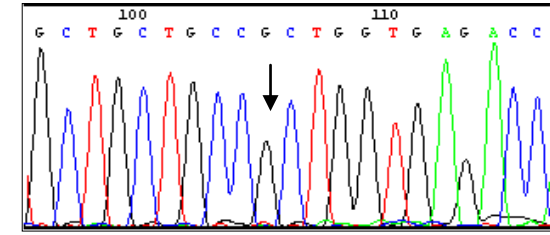
Konum	Transisyon	Saptanan olgu sayısı	Nükleotid pozisyonuna göre allel frekansı	Transisyon/ Transversiyon
Ekson	c.36 A/G	12	%40 G %60 A	Transisyon
	c.36 G/G	6		
	c.36 A/A	12		
İntron	c.473–33 C/C	16	% 28 T % 72 C	Transisyon
	c.473–33 T/C	11		
	c.473-33 T/T	3		
	c.625+10 A/G	13	% 38 G % 62 A	Transisyon
	c.625+10 G/G	5		
	c.625+10 A/A	12		
	c.740–9 T/C	14	% 30 C % 70 T	Transisyon
	c.740–9 C/C	2		
	c.740-9 T/T	14		
	c.626-32 G/T	1	% 2 T % 98 G	Transversiyon
	c.626-32 G/G	29		



A. c.36 A/A (Normal dizi)

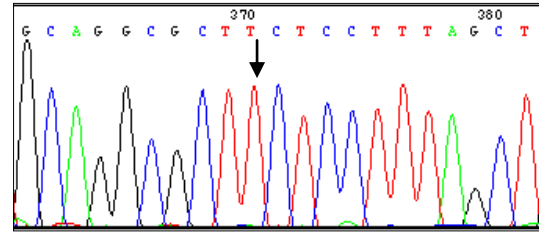


B. c.36 A/G

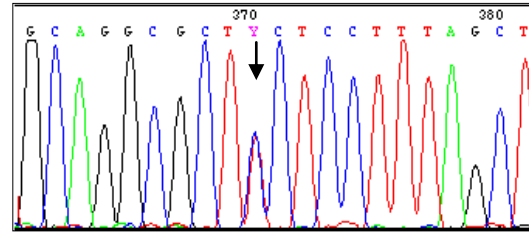


C. c.36 G/G

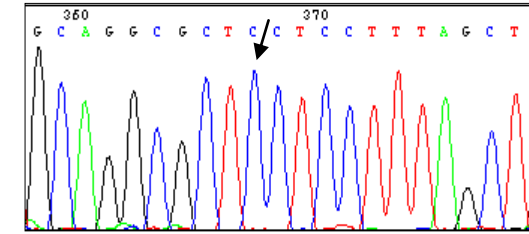
Şekil 4.14. TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunda saptanan c.36 A/G ve c.36 G/G varyasyonu. Şekildeki ok işaretleri saptanan varyasyonları göstermektedir.



D. c.473-33 T/T (Normal Dizi)

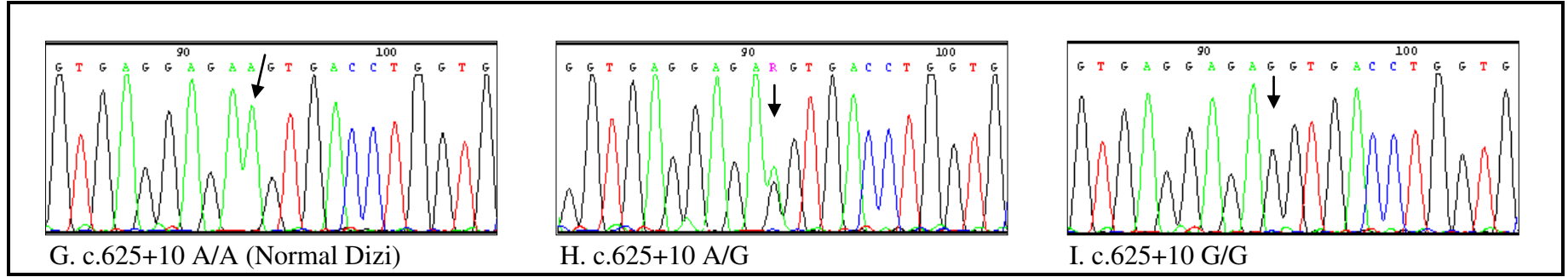


E. c.473-33 T/C

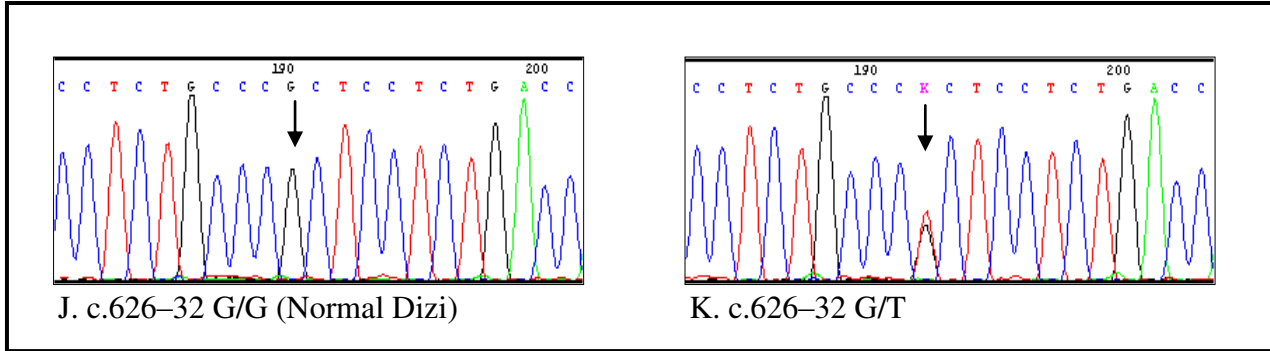


F. c.473-33 C/C

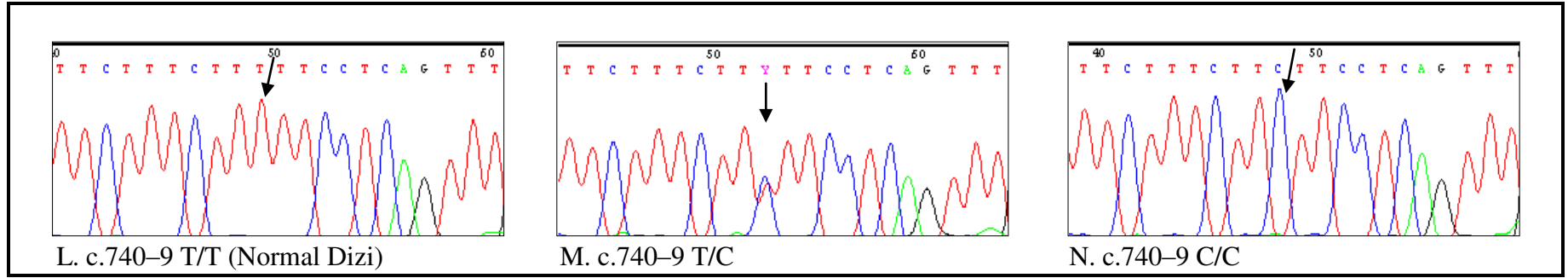
Şekil 4.15. TNFRSF1A geninin 4 numaralı intronunda saptanan c.473-33 T/C ve c.473-33 C/C varyasyonu. Şekildeki ok işaretleri saptanan varyasyonları göstermektedir.



Şekil 4.16. TNFRSF1A geninin 6 numaralı intronunda saptanan c.625+10 A/G ve c.625+10 G/G varyasyonu. Şekildeki ok işaretleri saptanan varyasyonları göstermektedir.



Şekil 4.17. TNFRSF1A geninin 6 numaralı intronunda saptanan c.626-32 G/T varyasyonu. Şekildeki ok işaretleri saptanan varyasyonları göstermektedir.



Şekil 4.18. TNFRSF1A geninin 7 numaralı intronunda saptanan c.740-9 T/C ve c.740-9 C/C varyasyonu. Şekildeki ok işaretleri saptanan varyasyonları göstermektedir.

Çizelge 4.4. Olgularımızın klinik bulguları ile saptanan varyasyonların karşılaştırmalı çizelgesi

Hasta No	Olgularda saptanan nükleotid değişimleri ve cDNA (kodlayıcı DNA) pozisyonları					Bulgular			
	c.36	c.473–33	c.625+10	c.626–32	c.740–9	Ateş Nöbetlerinin Başlangıç Yaşı	Tanısal Skor değeri	AAA sonucu	Aile Hikayesi
1.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	12 ay	— 0.824	Normal/Normal	–
2.	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	14 yaş	–	Normal/Normal	–
3.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	33 yaş	–	*–	–
4.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	12 ay	3.529	Normal/Normal	–
5.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	8 ay	2.167	E148Q/Normal	–
6.	A/A	C/C	A/A	G/G	C/C	4 yaş	2.884	Normal/Normal	–
7.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	15 ay	— 1.005	Normal/Normal	–
8.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	4 ay	2.71	Normal/Normal	–
9.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/C	22 ay	5.576	Normal/Normal	(+)
10.	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	6 ay	— 3.41	E148Q/Normal	(+)
11.	A/G	T/C	A/G	G/G	T/T	19 ay	— 1.293	Normal/Normal	–
12.	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	4 yaş	— 3.216	Normal/Normal	–
13.	A/G	C/C	A/G	G/G	T/C	6 ay	4.291	Normal/Normal	–
14.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/C	4 yaş	— 0.228	Normal/Normal	–
15.	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	4 yaş	3.521	M694V/Normal	(+)
16.	A/G	T/C	A/G	G/G	T/C	8 ay	4.244	Normal/Normal	–
17.	A/G	T/C	A/G	G/G	T/T	11 ay	— 0.737	Normal/Normal	–
18.	A/G	T/C	A/G	G/G	T/T	1ay	— 1.571	Normal/Normal	–
19.	A/A	C/C	A/A	G/T	T/C	4 yaş	— 0.238	Normal/Normal	–
20.	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	3 yaş	2.069	Normal/Normal	(+)
21.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/T	1 yaş	— 0.804	Normal/Normal	–
22.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/C	2 yaş	— 0.124	M694V/Normal	–
23.	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	17 ay	1.839	Normal/Normal	–
24.	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	15 ay	5.279	Normal/Normal	–
25.	A/G	T/C	A/G	G/G	T/T	3,5 ay	— 1.74	Normal/Normal	–
26.	A/A	C/C	A/A	G/G	C/C	2 yaş	1.38	Normal/Normal	–
27.	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T	4 yaş	0.07	Normal/Normal	–
28.	G/G	C/C	A/G	G/G	T/T	4 ay	1.215	Normal/Normal	–
29.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/C	1ay	1.074	Normal/Normal	–
30.	A/A	T/C	A/A	G/G	T/C	5 yaş	— 4.02	Normal/Normal	–

*AAA tanısı bulunmamaktadır.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kalıtsal periyodik ateş sendromları sıklıkla tetikleyici faktörler ve otoimmünite belirtileri olmaksızın ortaya çıkan tekrarlayan yangı atakları ile karakterize mendeliyan kalıtım gösteren bir grup hastalığı kapsamaktadır (5, 11). Bu sendromlardan TRAPS otozomal dominant kalıtım gösterir ve ilk kez İrlanda/İskoçya kökenli bir ailede rapor edildiği için 1982 yılında “Ailesel Hibernian Ateş” olarak isimlendirilmiştir. Williamson ve arkadaşları tarafından tanımlanan İrlanda/İskoçya kökenli ailenin yanı sıra, diğer bilim insanları, İsveç, Finlandiya, Almanya gibi pek çok Avrupa ülkesinde otozomal dominant kalıtılan ve nedeni bilinmeyen periyodik ateş ile karakterize olgular rapor etmişlerdir (4). Sendrom genetik hasarın 12p13 bölgesindeki TNFRSF1A geni ile ilişkilendirilmesiyle (5) TNF Reseptörü ile İlişkili Periyodik Ateş Sendromu (TRAPS) ismini almıştır. Genin tanımlanmasına bağlı olarak ilgili genetik çalışmaların hız kazanmasıyla; Finlandiya, İrlanda, İskoçya Hollanda, Belçika, Fransa, Almanya gibi Avrupa ülkelerinde hastalıkla ilişkilendirilen mutasyonlar tanımlanmıştır (6). Sendromun, Avrupa dışında ilk olarak, 2002 yılında İsrailli Arap bir ailede C70R mutasyonu ile ve ardından 2004 yılında Japon bir hastada T61I mutasyonu ile rapor edilmesiyle etnik çeşitlilik kavramı önem kazanmaya başlamıştır (7, 8).

Ülkemizin Akdeniz Havzası’ndaki konumu, ateş nöbetlerinin süresi, kolçisin tedavisine yanıt, otozomal resesif/dominant kalıtım gibi bulgular değerlendirildiğinde, nedeni bilinmeyen ateşe eşlik eden karında şişlik ve ağrı ile eklem ağrısı gibi şikâyetlerle kliniğe başvuran hastalarda akla ilk gelen periyodik ateş sendromu Ailesel Akdeniz Ateşi’dir. Ancak, periyodik ateş sendromlarının etnik çeşitlilik gösterdiği, ayırıcı tanı sağlayacak klinik bulgularının var olmasına rağmen klinik bulguların bazı genetik varyasyonlarda çakışabildiği ve 2 farklı periyodik ateş sendromu açısından da mutasyon taşıyan olguların varlığı nedeniyle, klinik verilerin desteklediği çerçevede, AAA dışındaki diğer periyodik ateş sendromları da mevcut klinik tablonun olası nedenleri arasında düşünülmelidir.

Literatürde TRAPS ile ilişkilendirilen 3 TNFRSF1A mutasyonunun ilk olarak ülkemizde Türk kökenli hastalarda rapor edilmesi (10, 11, 12), hem MEFV hem TNFRSF1A geninde mutasyon taşıyan Avrupa kökenli olguların varlığı (13, 14, 15); TRAPS’in de, ülkemizde, periyodik ateş sendromu şüphesi taşıyan olguların tanı aşamasında değerlendirilmesi gereken bir periyodik ateş sendromu olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Çalışmamızda, ülkemizde nedeni bilinmeyen periyodik ateş ile kliniğe başvuran olguların klinik tablolarında, TNFRSF1A geni mutasyonlarının yeri ve öneminin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilecek olan olguları seçerken, Gattorno ve arkadaşlarının, kalıtsal otoenflamatuar sendromlar ile ilişkili genlerin birinde mutasyon taşıma riskinin önceden tahminini sağlayan klinik parametreleri belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmadan yararlanıldı. Gattorno ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, periyodik ateş hikâyesi bulunan 228 hastanın detaylı klinik bilgilerinin alınmasının ardından, periyodik ateşin erken başlangıç yaşı, periyodik ateş aile hikâyesi, ateş nöbeti sırasında gözlenen torasik ağrı, abdominal ağrı, diyare ve oral aft oluşumu, birbirinden bağımsız olarak pozitif genetik test sonucu ile ilişkili bulunmuştur. Bu değişkenlerin OR (odds ratio) değerlerine karşılık gelen tahmini katsayıları doğrusal bir skorlama denkleminde birleştirilmiştir. Oluşturulan tanısal skor denkleminin sağlaması, önceki 228 kişilik olgu grubundan bağımsız olarak, 77 olguyu içeren bir çalışma grubu ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, tanısal skor denkleminin, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçları değerlendirildiğinde %82 hassasiyet ve %72 özgüllük sağladığı belirlenmiştir (63). Hastalar çalışmaya dahil edilmeden önce Gattorno ve arkadaşlarının tanısal skor denklemi ile tanısal skorları hesaplanmış ve skoru 1,32 değerinin üzerinde olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Gattorno ve arkadaşlarının, tanısal skor denkleminin %82 hassasiyet ve %72 özgüllük ile çalıştığını göstermesi (63), klinik bulguların TRAPS'i desteklemesi, 10 ve 22 numaralı olgularımızın negatif tanısal skor değerine rağmen MEFV genlerinde E148Q ve M694V mutasyonlarının bulunması; 1,32'nin altında tanısal skor değerine sahip olguları da çalışmaya dahil etmemizin nedenleri arasındadır.

TRAPS hastalarında tanının, büyük çoğunlukla çocukluk çağında konulmasına rağmen, çalışmamızda mutasyon taraması yapılan olgularımız arasında, biri 14 diğeri 33 yaşında 2 olgumuz bulunmaktadır. Saulsbury ve arkadaşları tarafından, sekiz yaşına kadar, tekrarlayan ateş, boğaz ağrısı ve servikal lenfadenopati ile seyreden ataklar ile karakterize klinik bulguları bulunan ve 8 yaşından 21 yaşına kadar ataksız sağlıklı bir dönem geçiren ancak 21 yaşından itibaren ateş, ağrılı servikal lenfadenopati, ağızda ağrılı ülser ve miyalji ile birlikte gözlenen ataklar geçirmeye başlayan bir olgu saptanmıştır. 22 yaşındaki olguya TNFRSF1A geninde yapılan mutasyon taraması sonucu saptanan R92Q mutasyonu ile TRAPS tanısı konulmuştur (67). Bu nedenle, klinik bulguları desteklediği için 14 ve 33 yaşlarındaki bu 2 hasta çalışmamıza mutasyon taraması yapılmak üzere dahil edilmiştir. Gattorno ve arkadaşlarının tanısal skor hesaplama denkleminde ateş nöbetlerinin başlama yaşının ay olarak denkleme yerleştirilmesi gerektiği için bu 2 olgunun tanısal skor hesabı yapılamamıştır.

Çalışmamıza, Ailesel Akdeniz Ateşi açısından MEFV geninde mutasyon saptanmış olduğu halde klinik bulguları TRAPS'i de destekleyen 4 olgu dahil edilmiştir. Bu olgular, MEFV genlerinde heterozigot E148Q mutasyonu taşıyan 5 ve 10 numaralı olgu ile heterozigot M694V mutasyonu taşıyan 15 ve 22 nolu olgulardır. Granel ve arkadaşları tarafından, çocukluk döneminden itibaren ateş, artirit, deri ve oftalmik bulgular ile karakterize ataklar geçiren Akdeniz kökenli 20 yaşında bir olgu tanımlanmıştır. İlk olarak MEFV geninde M694V mutasyonunun saptanmasıyla Ailesel Akdeniz Ateşi tanısı alan ancak kolçisin yerine steroid tedavisine yanıt alınan 20 yaşındaki olguda, geniş kapsamlı yapılan mutasyon taraması sonucu TNFRSF1A geninde de R92Q mutasyonu saptanmıştır (68). Stojanov ve arkadaşları, 2 yaşından

itibaren yüksek ateş, lenfadenopati, karın ağrısı, eklem ağrısı ve aftöz ülser ile karakterize ataklar geçiren 7 yaşında bir olgu tanımlamışlardır. Olgunun serum IgD seviyesi 148IU/ml olarak tespit edilmiş olup MVK geninde yapılan mutasyon taraması sonucu olguda heterozigot V377I mutasyonu saptanmıştır. Bu olguda, göreceli olarak normal seyirli HIDS bulguları, düşük–normal mevalonat kinaz aktivitesi ve normal mevalonik asit seviyesi ile steroid tedavisine olumlu yanıt alındığı rapor edilmiştir. Steroid tedavisine olumlu yanıt alındığı için olguya TNFRSF1A geni için mutasyon taraması yapılmış ve R92Q mutasyonu saptanmıştır. Olgunun ebeveynleri MVK ve TNFRSF1A geni açısından tarandığında, İngiliz kökenli sağlıklı babada V377I MVK mutasyonu ve Alman kökenli sağlıklı annede R92Q TNFRSF1A mutasyonu saptanmıştır. Ağır seyirli HIDS bulgularının, MVK geninde birleşik heterozigot mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (69). Stojanov ve arkadaşlarının rapor ettiği olguya benzer olarak Hoffman ve arkadaşları da, göreceli olarak normal seyirli HIDS bulguları olan IgD serum seviyesi yüksek ancak mevalonat kinaz aktivitesi düşük olan ve steroid tedavisine olumlu yanıt veren 7 yaşında Alman bir olgu tanımlamışlardır. MVK ve TNFRSF1A geni için yapılan mutasyon taraması sonucu olguda, heterozigot MVK V377I mutasyonu ile heterozigot TNFRSF1A R92Q mutasyonu saptanmıştır (15). Bu çalışmalar göstermiştir ki, periyodik ateş sendromlarında, periyodik ateş klinik tablosuna neden olan mutasyonlar tek bir gen ile sınırlı olmayabilir.

Çalışmaya dahil edilen olguların TNFRSF1A genlerinde gerçekleştirilen DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon taraması sonucu, 1'i 1 numaralı ekson bölgesinde 1'i 4 numaralı intron bölgesinde, 2'si 6 numaralı intron bölgesinde ve 1'i 7 numaralı intron bölgesinde olmak üzere toplam 5 nükleotid değişimi saptanmıştır.

Çalışmamızda bir numaralı eksonun 36. baz pozisyonunda adenin allelinin guanin alleleline transisyonu sonucu 12 olguda heterozigot c.36 A/G ve 6 olguda homozigot c.36 G/G varyasyonu saptanmıştır. Allel frekansları %40 G ve %60 A olarak hesaplanmıştır. cDNA'nın 36. pozisyonundaki adenin bazının guanin bazına transisyonu sonucu proteinin 12. pozisyonundaki aminoasitini kodlayan CCA kodonu CCG kodonuna dönüşmektedir. Her iki kodon prolin aminoasitini kodladığı için bu varyasyon sinonim olarak tanımlanır. Infervers veri tabanında c.36 A/G varyasyonunun, TRAPS fenotipi ile ilişkisi olup olmadığı bilinmediği belirtilmiştir. Veritabanında varyasyon ile ilişkili olarak Pitts ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile Bazzoni ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans olarak gösterilmiştir. Pitts ve arkadaşları; rastgele seçilen 101 beyaz ırk kökenli sağlıklı birey ile yaptığı çalışmada c.36 pozisyonunda adenin allelinin 0.54, guanin allelinin 0.46 frekans ile bulunduğunu, heterozigot frekansın ise 0.55 olduğunu saptamışlardır. Pitts ve arkadaşları yapmış oldukları bu populasyon taramasında, sağlıklı bireylerde TNFRSF1A geninin c.36 nükleotid pozisyonunda saptanan adenin ve guanin allellerinin frekanslarının %1'den fazla olması c.36 A/A, c.36 A/G ve c.36 G/G genotiplerinin polimorfizm olduğunu göstermektedir (70).

Bazzoni ve arkadaşları, hematolojik malignansilerde hastaların dolaşımdaki artmış “çözünür TNF reseptör” seviyesinin, TNF reseptörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile ilişkili olup olmadığını araştırmak için yaptıkları çalışmada, 78 akut

lösemi ve 71 sağlıklı bireyin TNFRSF1A ve TNFRSF1B gen dizilimlerini incelemişlerdir. TNFRSF1A geninde saptadıkları 3 varyasyonu ve allel frekansını hasta ve sağlıklı bireylerde değerlendirmişlerdir. Saptanan varyasyonlardan ilki TNFRSF1A geninin 1 numaralı eksonunda 12 numaralı kodonunun 5'-3' yöndeki 3. bazını içermekte olup adenin bazının guanin bazına dönüştüğü c.36 A>G varyasyonudur. Bu varyasyondaki adenin ve guanin allellerinin hasta ve sağlıklı bireylerdeki frekansı değerlendirildiğinde; hasta bireylerde c.36 pozisyonundaki GG allel frekansının %20, AG allel frekansının %45, AA allel frekansının %35; sağlıklı bireylerde c.36 pozisyonundaki GG allel frekansının %20, AG allel frekansının %55, AA allel frekansının %25 olduğu saptanmıştır. Bu frekans verileri değerlendirildiğinde hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı bir farkı olmadığı; hasta grupta saptanan varyasyonların polimorfizm olduğu ve TNFRSF1A polimorfizmleri ile lösemi hastalarının çözünürlük TNFRSF1A reseptörlerinin dolaşımdaki yüksek seviyesi arasında bir bağlantı kurulamayacağı saptanmıştır (71).

Gordon ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, TNF'in sepsis semptomlarına neden olduğu göz önünde bulundurularak, sepsis ve septik şok geçiren hastalarda sepsis bulgularının ortaya çıkması ve hastalığın seyri ile TNF ve TNF reseptörleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmışlardır. Beyaz ırk kökenli 213 hasta ve 132 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları mutasyon analizinde TNFRSF1A geninde c.36 nükleotid pozisyonunda sağlıklı kontrollerde %37.8 oranında AA, %42.9 oranında AG ve %19.3 oranında GG allelleri; hasta grubunda ise %33.2 oranında AA, %48.6 oranında AG ve %18.3 oranında GG allel frekansları saptanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hasta ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir fark olmadığı ve sepsis bulguları ile buldukları TNFRSF1A varyasyonları arasında bir ilişki kurulamayacağı belirtilmiştir (72). Diğer bir çalışmada ise, kalıcı palindromik romatizma (persistent palindromic rheumatism) ile TNF α , IL-1 β , TNFRSF1A ve TNFRSF1B genlerindeki varyasyonlar arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Palindromik romatizma, tekrar eden ve vücutta göç eden artirit ile karakterize bir hastalık olup, ateş bulgusu olmayan ataklar sırasında, C reaktif protein ve eritrosit sedimentasyon hızında artış gözlenmektedir. Çalışmada, Çin popülasyonundan palindromik romatizmalı 53 olgu ile 100 sağlıklı kontrol bireyde yaptıkları mutasyon analizi sonucunda; TNF α 'da 2'si promotor (-308G>A, -238G>A), 1'i intron bölgesinde (+488G>A) olan 3 varyasyon; IL-1 β geninde 2'si promotor (-511C>T, -311T>C) ve 1'i ekson bölgesinde (+3954C>T) olan 3 varyasyon; TNFRSF1B geninde ekson bölgesinde saptanan 2 varyasyon (+676T>G, +1663G>A) ve TNFRSF1A geninde ise biri promotor (-609G>T), biri ekson bölgesinde (c.36A>G) olan 2 varyasyon saptanmıştır. Sağlıklı kontrol grup ve hasta bireyler arasında, c.36A>G varyasyonu dışındaki varyasyonlarda allel frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak, sağlıklı kontrollerde %86 frekansla AA, %10 frekansla AG, %4 frekansla GG ile hasta bireylerde %69.9 frekansla AA ve %30.4 frekansla AG genotipinin saptandığı c.36A>G varyasyonunda, sağlıklı bireyler ve kontroller arasında anlamlı bir fark saptanmış, hasta bireylerin c.36G allel frekansının sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede fazla olduğu bulunmuştur. Çalışmada bu varyasyon ile anlamlı ölçüde bir ilişki saptanması ayrıca TRAPS ve palindromik romatoidli hastaların bazı yangı bulgularının benzer olması nedeniyle, c.36A>G

polimorfizminin TNFRSF1A genindeki kodlayıcı bölgedeki fonksiyonel polimorfizmler ile birlikte kalıtılabileceği (bağlantı eşitsizliği) ve bu polimorfizmleri etkileyebileceği dahası palindromik romatizmanın etiopatogenezinde rol alabileceği bildirilmiştir (73).

Sinonim varyasyonların hem klinik tanıda hem de evrimsel farklılaşmada fonksiyonel olarak nötr oldukları varsayılır. Ancak ekson bölgesindeki sinonim varyasyonların; ataksia telanjektazi (ATM), BRCA1, neurofibromin 1 (NF-1), kistik fibroz transmembran regülatörü (CFTR) gibi bazı hastalık ilişkili genlerde primer RNA'dan intronların hatalı çıkartılması (splice) profiline neden olduğu gösterilmiştir. Örneğin, CFTR geninin 12 numaralı eksonunu model olarak kullanıldığı bir çalışmada, 84 nükleotid uzunluğundaki bu eksonun 19, 25, 40, 49 ve 52. pozisyonlarındaki nükleotidlerinin değişimi sonucu meydana gelen 6 varyantın, intronların kesip çıkartılması sırasında bu eksonun atlanmasına neden olduğu, dolayısıyla hasarlı protein üretiminin gerçekleştiği rapor edilmiştir (74). Olgularımızda saptadığımız sinonim c.36A/G varyasyonunun TRAPS fenotipi ile ilişkisi henüz bilinmemektedir. DNA üzerindeki bu değişim protein düzeyinde aminoasit değişimine yol açmamakla beraber, intron kesip çıkartma sürecinde hasara neden olduğunu bildirir bir bilgi henüz literatürde rapor edilmemiştir. Olgularımızda gözlenen varyantın öneminin tam olarak anlaşılması için daha çok sayıda olgu-kontrol çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda 4 numaralı intronda normal dizide c.473-33 baz pozisyonundaki timin allelinin sitozin alleleline transisyonu ile oluşan c.473-33 T>C varyantı 16 olguda homozigot, 11 olguda heterozigot olarak saptanmıştır. Allel frekansları %28 T ve %72 C olarak hesaplanmıştır. c.473-33T/C varyasyonu ilk olarak 2003 yılında İtalya kökenli bir olguda rapor edilmiş olup infervers veri tabanında TRAPS fenotipi ile ilişkisi olup olmadığı bilinmediği belirtilmiştir. Bazzoni ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada, TNFRSF1A geninin 4 numaralı intron bölgesinde bizim de olgularımızda saptamış olduğumuz c.473-33 T>C varyasyonu saptanmıştır. Bu varyasyondaki timin ve sitozin allellerinin hasta ve sağlıklı bireylerdeki frekansı değerlendirildiğinde; hasta bireylerde TT allel frekansının %19, TC allel frekansının %51, CC allel frekansının %32; sağlıklı bireylerde TT allel frekansının %14, TC allel frekansının %37, CC allel frekansının %49 olduğu belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen bu varyasyonun da allel frekansları değerlendirildiğinde polimorfizm olduğu; sağlıklı ve hasta grupta saptanan polimorfizm frekanslarının istatistiksel olarak farklı olmadığı ve hasta grupta saptanan TNFRSF1A polimorfizmleri ile çözünür TNFRSF1A'nın dolaşımdaki yüksek seviyesi arasında bir bağlantı kurulamayacağı belirtilmiştir (71). Olgularımızda, TNFRSF1A geninin intron bölgelerinde saptadığımız varyasyonlardan, c.473-33 T>C nükleotid değişiminin TRAPS fenotipi ile ilgili olup olmadığı bilinmemektedir.

Çalışmamızda 6 numaralı intronda c.625+10 baz pozisyonunda adenin allelinin guanin alleleline transisyonu sonucu 13 olguda heterozigot c.625+10 A/G ve 5 olguda homozigot c.625+10 G/G varyasyonu saptanmıştır. Allel frekansları %38 G ve %62 A olarak hesaplanmıştır. c.625+10 varyasyonu da ilk olarak 2003 yılında İtalya kökenli bir olguda rapor edilmiştir. Infervers veritabanında bu varyasyonun

semptomatik olmadığı belirtilerek referans olarak Bazzoni ve arkadaşlarının çalışması gösterilmiştir. Çalışmada, bu varyasyondaki adenin ve guanin allellerinin hasta ve sağlıklı bireylerdeki frekansı değerlendirildiğinde; hasta bireylerde AA allel frekansının %34, AG allel frekansının %49, GG allel frekansının %17; sağlıklı bireylerde AA allel frekansının %29, AG allel frekansının %51, GG allel frekansının %20 olduğu saptanmıştır. Çalışmada saptanan c.625+10A>G varyasyonunun frekanslarının hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı bir farkının olmadığı, hasta grupta saptanan TNFRSF1A polimorfizmleri ile çözünür TNFRSF1A'nın dolaşımdaki yüksek seviyesi arasında bir bağlantı kurulamayacağı tanımlanmıştır (71).

Çalışmamızda 14 olguda heterozigot ve 2 olguda homozigot olarak 7 numaralı intronda c.740-9 T>C varyasyonu bulunmuştur. Allel frekansları %30 C ve %70 T olarak hesaplanmıştır. Bu varyasyon 2001 yılında Aksentijevich ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada saptanmıştır (6). Çalışmada klinik bulguları TRAPS ile uyumlu 150 hastada ilk olarak TNFRSF1A geninin 2, 3, 4 ve 5 numaralı eksonları için mutasyon analizi yapılmış ve 120 hastada bu ekson bölgelerinde herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Mutasyon saptanmamış olan bu 120 olgunun klinik bulguları göreceli olarak TRAPS'i daha çok destekleyen 90'ında, TNFRSF1A geninin 1, 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı eksonları için de dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu olgu grubunda c.740-9 T/C varyasyonu dışında mutasyon saptanmamıştır. Olgu grubunda c.740-9 pozisyonundaki T allel frekansı 0.78 ve C allel frekansı 0.22 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacıların 88 sağlıklı kontrol bireyde yaptığı analiz sonucu aynı pozisyonundaki T allel frekansı aynı şekilde 0.78 ve C allel frekansı da 0.22 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak araştırmacılar bu varyasyonu polimorfizm olarak tanımlamışlardır (75).

Olgularımızda, TNFRSF1A geninin intron bölgelerinde saptadığımız varyasyonlardan, c.473-33 T>C ve c.740-9 T>C nükleotid değişimlerinin TRAPS fenotipi ile ilgili olup olmadığı bilinmiyor olup, c.625+10 A>G nükleotid değişiminin ise TRAPS semptomlarına yol açmadığı bildirilmekle beraber bununla ilgili detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu varyasyonların, TRAPS fenotipi ile ilişkisinin açığa çıkarılması için daha çok sayıda olgu ve kontrol gruplarını içeren çalışmaların ve fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu değişimlerin intron bölgesinde bulunmalarına rağmen ekson/intron ve intron/ekson ayırım bölgelerine yakınlıkları göz önünde bulundurulursa, primer RNA'dan intronların kesip çıkartılması işleminde herhangi bir hataya neden olup olmadıkları protein düzeyinde yapılacak çalışmalar ile gösterilebilir.

Çalışmamızda 1 olguda 6 numaralı intronda c.626-32 pozisyonunda guanin bazının timin bazına transversiyonu sonucu heterozigot c.626-32 G/T transversiyonu saptanmıştır. Allel frekansları %2 T ve %98 G olarak hesaplanmıştır. Bu değişim literatürde henüz rapor edilmemiştir. Bu değişim intronik bölgede yer almakla birlikte ekson-intron bağlantı noktasına 32 baz kadar uzaklıktadır. Primer RNA transkriptinden intronların çıkartılması, intron/ekson (verici bölge) ve ekson/intron (alıcı bölge) sınırlarında yerleşik özel nükleotid dizilerine bağlıdır. Alıcı ve verici bölgelerin dizilimini etkileyen ya da bu bölgelerin dizilimin etkilemeyip intronlarda

baz değişimine neden olan mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, RNA'nın işlenmesi sırasında normal bölgeler ile yarışan alternatif alıcı veya verici bölgeler oluşturabilir (76). Örneğin, Aksentijevich ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada bir Arap bir de İskoç kökenli iki ailede TNFRSF1A geninin 3 numaralı intronunda, c.193–14 pozisyonunda guanin bazının adenin bazına transisyonu sonucu oluşan c.193–14 A/A varyasyonu saptamışlardır. İntron bölgesinde meydana gelen bu varyasyonun normal intron kesip çıkartma bölgesinden (splice acceptor site), 5' yönüne doğru 4 kodon geride yeni bir intron kesip çıkartma bölgesi oluşturduğu saptanmıştır. Bunun sonucu olarak intron kesip çıkartma işlemi sırasında kesip çıkartma işlemi gerçekleştirecek faktörler normal bağlanması gereken bölgeden 5' yönde 4 kodon geriye bağlanarak, olgun mRNA'da 2 ve 3 numaralı eksonların arasına fazladan 4 kodon eklenmesine neden olduğu bildirilmiştir (75). İlk olarak çalışmamızda saptanmış olan c.626–32 G/T varyasyonu da benzer şekilde intronların çıkartılıp eksonların birleştirilmesi işlemi etkiliyor olabilir. Çalıştığımız olgu grubunda sadece 1 olguda saptadığımız c.626–32 G/T varyasyonunun ilk olarak sağlıklı kontrol bireylerdeki allel frekansı tanımlanmalıdır. Ardından varyasyonun intron/ekson bölgesine 32 bazlık uzaklığı göz önüne alınarak intron kesip çıkartma işleminde hataya neden olabilecek bir değişim olup olmadığının anlaşılması için fonksiyonel deneylerin yapılması gerekmektedir. Varyasyonun, intron kesip çıkartma işleminde bir hataya neden olması durumunda normal TNFRSF1A proteininin miktarının azalması, ya da yapısal değişimler içermesi gerekmektedir. Reseptör proteinde bu değişimlerin mevcut olup olmadığı, RNA ya da protein düzeyinde yapılacak çalışmalar ile açığa çıkartılabilir.

Çalışmamızdaki 15 numaralı olgu Ailesel Akdeniz Ateşi açısından MEFV M694V/Normal genotipe sahip olup bu olgu 20 numaralı olgunun kardeşidir. Yirmi numaralı olgunun AAA açısından genotipi Normal/Normal olarak bulunmuştur. 15 numaralı olgunun klinik incelemesinde kolçisin tedavisine yanıtın tam olmadığı, 20 numaralı olguda ise tedaviye kısmen yanıt alındığı bildirilmiştir. Her 2 olguda da c.36 G/G, c.473–33 C/C, c.625+10 G/G homozigot nükleotid değişimleri saptanmıştır. Her iki kardeşte de kolçisin tedavisine olan yanıtın sınırlı olması, 15 numaralı olgunun MEFV genindeki M694V mutasyonunun yanı sıra diğer periyodik ateş sendromlarının biri açısından birleşik heterozigot bir mutasyon taşıyor olabileceğini düşündürmektedir. Kesin sonuç için bulunan bu varyantların fenotipe etkisinin tam olarak anlaşılmasına ve olguların diğer periyodik ateş ilişkili genler açısından da değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Genetik varyasyonlar, fenotipin kalıtsal temelini belirlemesi ve gelişmesinde temel biyolojik anahtar görevindedirler. Bir genin fonksiyonu gendeki potansiyel varyasyonlar bilinmeden tümüyle anlaşılmış sayılamaz. Çünkü varyasyonlar gen fonksiyonunu etkileyerek sonrasında fenotipin şekillenmesini sağlarlar (77). Populasyonda 2 farklı birey arasında DNA'nın 1000 baz çifti uzunluğundaki bir parçası, ortalama 1 baz çifti değişim içerir (76) DNA üzerinde bir nükleotid pozisyonu için farklı bireylerde farklı allel bulunması söz konusu olabilir. Bir varyasyon, sahip olduğu allelin frekansı ile tanımlanır. Populasyonda %1'den daha fazla oranda gözlemlendiği bilinen varyantlar polimorfizm olarak tanımlanır. Varyant %1'den az frekansta gözleniyorsa nadir varyant veya mutasyon olarak tanımlanır

(77). Bu değerlendirmeler doğrultusunda olgularımızda saptadığımız tek nükleotid değişimlerinin, yapılan diğer çalışmalarda analiz edilen olgulardaki frekansı göz önüne alındığında, polimorfizm olduğu söylenebilir.

Cantarini ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada klinik bulguları TRAPS fenotipini destekliyor olmasına rağmen TNFRSF1A geninde herhangi bir mutasyon saptanmamış 3 olgu rapor edilmiştir. Olguların periferik kanlarında izole ettikleri nötrofiller ile yaptıkları analizde hasarlı reseptör ayrılma mekanizmasının saptanması dolayısıyla olgulara TRAPS tanısı konmuştur. Bunu takiben başlanan etanersept tedavisi ile olguların ateş ataklarının zamanla normale döndüğü tespit edilmiştir. Bu 3 olguda TNFRSF1A geninde mutasyon saptanmamış olması semptomların oluşmasında başka genlerin işe karıştığını düşündürmektedir. Olgulardan 1 tanesinde serum TNF α seviyesinin yüksek olması TNF α 'yı kodlayan gende bir mutasyonun var olup olmadığını araştırmaya yönelmiş ancak bu gende de herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır (78). Benzer olarak Aganna ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladıkları çalışmada klinik bulguları TRAPS'i destekleyen ve hasarlı reseptör ayrılma mekanizması saptanan 3 ailede de TNFRSF1A geninde mutasyon saptanmamıştır (79). Bu durum, kalıtsal otoenflamatuvar hastalıkların, genetik etiyoloji ve patogenezi açısından, klinik tablosu TRAPS'i destekleyen olgularda heterojen olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızdaki olguların tekrarlayan ateş bulgularının devam etmesi durumu göz önüne alındığında, çalışmanın bir sonraki aşaması olarak olguların nötrofilleri ile yapılacak doku kültürü çalışmaları ile TNFRSF1A reseptörünün ayrılma mekanizmasının incelenmesi, hastalığın tanısının konulmasına ışık tutacaktır. Ayrıca tekrarlayan ateş bulguları devam eden olguların laboratuvar bulguları (IgD, sitokin serum seviyeleri gibi) göz önünde bulundurularak diğer periyodik ateş sendromları açısından taranması planlanmaktadır.

Ateşin çocukluk çağında gözlenen bulguların başında yer aldığı göz önüne alındığında; enfeksiyon, neoplazi, bağışıklık sistemi hastalıkları veya kronik sistemik hastalıkların bulunmamasına rağmen tekrarlayan ateşin gözleendiği durumlar periyodik ateş sendromlarından kaynaklanabilmektedir. Günümüzün gelişen teknolojisi, genetik çalışmalara her geçen gün bir yenisinin eklenmesini kaçınılmaz kılmıştır. Genetik çalışmalar çok çeşitli olmakla beraber, tek nükleotid değişimlerinin analiz edildiği çalışmalar, genetik varyasyonların saptanması, bu varyasyonların protein ve dolayısıyla fenotip üzerindeki etkisinin açığa çıkarılması bakımından ayrı bir önem taşımaktadır. Ülkemizde en sık gözlenen periyodik ateş sendromu Ailesel Akdeniz Ateşi olmasına karşın diğer periyodik ateş sendromlarında rapor edilen Türk olguların varlığı, ülkemizde henüz netlik kazanmamış bir periyodik ateş sendromu profili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda PCR temelli DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Olguların DNA örnekleri, materyal ve yöntemler bölümünde sunulan primerler ile TNFRSF1A geninin ekson bölgelerini ve sadece bir arada amplifiye edilen ekson bölgelerinin arasında kalan intron bölgelerini (2, 4, 6 ve 8 numaralı intronlar) kapsayacak şekilde

amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen DNA bölgelerinde hem dizi analizi yönteminin güvenilirliği bakımından hem de her amplikon için ileri ve geri primer ile en az iki defa DNA dizi analizi gerçekleştirildiği için bu bölgelerde nükleotid değişimine ya da mikro düzeyde delesyonlara bağlı bir mutasyonun gözden kaçmış olması beklenmemektedir. Ancak, yine de, olgularımızda hastalık yapıcı olduğu tanımlanmış TNFRSF1A geni mutasyonlarının (delesyon ve baz değişimi) saptanmamış olması, bu olguların tanısının TRAPS olmadığını belirtmesi için yeterli değildir. Çünkü bu olgularda amplifikasyon sınırlarının dışında kalan diğer intronik bölgeler ile promotor bölgede bulunması olası bir mutasyonun saptanması, kullandığımız yöntem gereği mümkün değildir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan yöntem PCR temelli olduğu için TNFRSF1A geninin bir allelinin tamamını ya da bir kısmını kapsayan genomik yeniden düzenlenmelerin de saptanması mümkün değildir. Bu durumda böyle bir delesyonun varlığı CGH (Comperative Genomic Hybridisation) veya MLPA (Multiplex Ligation–dependent Probe Amplification) gibi geniş delesyonların tespit edilebildiği teknikler ile araştırılmalıdır.

Çalışmamız, Türkiye’de, TRAPS’dan sorumlu olan TNFRSF1A genindeki nükleotid değişimlerinin, periyodik ateş şüphesi taşıyan 30 Türk olgunun periyodik ateş tablosuna neden olabilme olasılığının araştırıldığı mutasyon taraması niteliğindeki ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hoffman HM, Loes JF, Kuijk M. *Periodic Fever Disorders*. Reumatología 2005; **21**(3):96–100.
2. Todd I, Radford PM, Daffa N, Bainbridge SE, Powell RJ, Tighe PJ. *Mutant tumor necrosis factor receptor associated with tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome is altered antigenically and is retained within patients' leukocytes*. Arthritis Rheum. 2007;**56**:2765–73.
3. Nedjai B, Hitman GA, Yousaf N, Chernajovsky Y, Stjernberg–Salmela S, Pettersson T, Ranki A, Hawkins PN, Arkwright PD, McDermott MF, Turner MD. *Abnormal tumor necrosis factor receptor I cell surface expression and NF–kappaB activation in tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome*. Arthritis Rheum. 2008 Jul;**58**(7):2213–4.
4. Williamson LM, Hull D, Mehta R, Reeves WG, Robinson BH, Toghil PJ. *Familial Hibernian fever*. Q J Med. 1982;**51**(204):469–80.
5. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlingens R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Amos CI, Mulley J, Quane KA, Molloy MG, Ranki A, Powell RJ, Hitman GA, O'Shea JJ, Kastner DL. *Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes*. Cell. 1999 Apr 2;**97**(1):133–44.
6. INFEVERS database: <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers>
7. Aganna E, Zeharia A, Hitman GA, Basel–Vanagaite L, Allotey RA, Booth DR, Hawkins PN, Thacker C, Syndercombe–Court D, McDermott MF. *An Israeli Arab patient with a de novo TNFRSF1A mutation causing tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome*. Arthritis Rheum. 2002 Jan;**46**(1):245–9.
8. Ida H, Kawasaki E, Miyashita T, Tanaka F, Kamachi M, Izumi Y, Huang M, Tamai M, Origuchi T, Kawakami A, Migita K, Motomura M, Yoshimura T, Eguchi K. *A novel mutation (T61I) in the gene encoding tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) in a Japanese patient with tumour necrosis factor receptor–associated periodic syndrome (TRAPS) associated with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford). 2004 Oct;**43**(10):1292–9.

9. Etem E. *Familial mediterranean Fever: a retrospective clinical and molecular study in the East of anatolia region of Turkey*. Open Rheumatol J. 2010 Jan 29;**4**:1–6.
10. Dinc A, Erdem H, Rowczenio D, Simsek I, Pay S, Bahce M, Lachmann H. *Autosomal dominant periodic fever with AA amyloidosis: tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) in a Turkish family*. J Nephrol. 2005 Sep–Oct;**18**(5):626–9.
11. Kutukculer N, Gulez N, Karaca N, Aksu G, Berdeli A. *A novel Y331X nonsense mutation in TNFRSF1A gene in two unrelated Turkish families with periodic fever syndrome*. Int J Immunogenet. 2010 Feb;**37**(1):21–5.
12. Cosan F, Yazici A, Yilmazer B, Gul A, Ustek D, Cefle A. *A novel TNFRSF1 gene mutation in a Turkish family: a report of three cases*. Clin Rheumatol. 2010 Jun 10. [Epub ahead of print]
13. Granel B, Serratrice J, Dodé C, Grateau G, Disdier P, Weiller PJ. *Overlap syndrome between FMF and TRAPS in a patient carrying MEFV and TNFRSF1A mutations*. Clin Exp Rheumatol. 2007 Jul–Aug;**25**(4 Suppl 45):S93–5
14. Stojanov S, Lohse P, Lohse P, Hoffmann F, Renner ED, Zellerer S, Kéry A, Shin YS, Haas D, Hoffmann GF, Belohradsky BH. *Molecular analysis of the MVK and TNFRSF1A genes in patients with a clinical presentation typical of the hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome: a low-penetrance TNFRSF1A variant in a heterozygous MVK carrier possibly influences the phenotype of hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome or vice versa*. Arthritis Rheum. 2004;**50**:1951–1958.
15. Hoffmann F, Lohse P, Stojanov S, Shin YS, Renner ED, Kéry A, Zellerer S, Belohradsky BH. *Identification of a novel mevalonate kinase gene mutation in combination with the common MVK V377I substitution and the low-penetrance TNFRSF1A R92Q mutation*. Eur J Hum Genet. 2005 Apr;**13**(4):510–2.
16. Keleş S, Özdemir C, Bahçeciler NN, Barlan IB. *Periyodik Ateş Sendromları*. Güncel Pediatri 2007;**5**:57–61.
17. Trübenbach J, Wildhardt G, Niebel J, Hawle H, Steinberger D. *A monoallelic double mutation as a cause for TNF receptor-associated periodic fever syndrome*. Rheumatol Int. 2010 Apr;**30**(6):805–9.
18. Centola M, Aksentijevich I, Kastner DL. *The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases*. Hum Mol Genet. 1998;**7**(10):1581–8.

19. Stjernberg–Salmela S. *Tumour necrosis factor receptor–associated periodic syndrome (TRAPS). Identification of novel TNFRSF1A mutations and intracellular signalling defects*. University of Helsinki Department of Dermatology, Allergology and Venereology and Department of Medicine. Helsinki, 2008. Academic dissertation.
20. Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, Dean J, Powell RJ, Kastner DL. *The TNF receptor–associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder*. Medicine (Baltimore). 2002 Sep;81(5):349–68.
21. Kastner DL. *Hereditary periodic fever syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;74–81.
22. Kasapçopur Ö, Arısoy N. *Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuvar hastalıklar*. Türk Pediatri Arşivi 2006;41:9–17.
23. Goldfinger S. *The inherited autoinflammatory syndrome: a decade of discovery*. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2009;120:413–8.
24. Stjernberg–Salmela S, Kivisaari A, Puolakkainen P, Färkkilä M, Kemppainen E, Ranki A, Pettersson T. *Intra–abdominal abscess in a patient with tumour necrosis factor receptor–associated periodic fever syndrome*. J Intern Med 2006;259:209–13
25. Kozanoğlu D. *Ailevi Akdeniz Ateşli çocuklarda demografik özellikler, tanı kriterleri ve prognostik faktörler*. T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Klinikleri, İzmir. 2007. Uzmanlık Tezi.
26. Drenth JP, van Der Meer JW. *Periodic fevers enter the era of molecular diagnosis*. BMJ. 2000 Apr 22;320(7242):1091–2.
27. Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. *The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations*. Curr Opin Rheumatol. 2003 Jan;15(1):61–9.
28. Peynircioğlu B, Yılmaz E. *Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının moleküler temeli*. Hacettepe Tıp Dergisi 2006;37:223–229
29. Peru H, Elmacı AM, Yorulmaz A, Altun B, Kara F. *Konya bölgesindeki Ailevi Akdeniz Ateşli olguların değerlendirilmesi: Klinik ve genetik çalışma*. Genel Tıp Derg. 2008;18(1)
30. Stojanov S, Kastner DL. *Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment*. Current Opinion in Rheumatology 2005, 17:586–599
31. Sukits SF, Lin LL, Hsu S, Malakian K, Powers R, Xu GY. *Solution structure of the tumor necrosis factor receptor–1 death domain*. J Mol Biol. 2001 Jul 20;310(4):895–906.

32. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. *The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation*. Annu Rev Immunol. 2007;**25**:561–86.
33. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . Mol Cell. 2002 Aug;**10**(2):417–26.
34. Akar N, Misiroglu M, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N, Tümer N, Akcakus M, Tastan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from Familial Mediterranean Fever. Hum Mutat. 2000 Jan;**15**(1):118–9.
35. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, Tezcan S. *Prevalence of juvenile chronic arthritis and Familial Mediterranean Fever in Turkey. A field study*. J Rheumatol 1998;**25**:2445–9.
36. Yalçinkaya F, Cakar N, Misirlioğlu M, Tümer N, Akar N, Tekin M, Taştan H, Koçak H, Ozkaya N, Elhan AH. *Genotype–phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation–independent amyloidosis*. Rheumatology (Oxford). 2000 Jan;**39**(1):67–72.
37. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, Saatci U, Bakkaloglu A, Ozguc M. *Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population*. Eur J Hum Genet. 2001 Jul;**9**(7):553–5.
38. Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, Mimouni A, Danon Y, Lotan R, Ogur G, Sirin A, Schlezinger M, Halpern GJ, Schwabe A, Kastner D, Rotter JJ, Fischel-Ghodsian N. *Phenotype–Genotype correlation in FMF: Evidence for an association between Met694Val and amyloidosis*. Eur J Hum Genet. 1999;**7**: 287–92.
39. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E, Arici M, Bakkaloglu A, Besbas N, Akpolat T, Dinc A, Erken E; Turkish FMF Study Group. *Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study*. Medicine (Baltimore). 2005 Jan;**84**(1):1–11.
40. Mandey SH, Schneiders MS, Koster J, Waterham HR. *Mutational spectrum and genotype–phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency*. Hum Mutat. 2006 Aug;**27**(8):796–802.
41. Grateau G. *Hyperimmunoglobulinemia (HyperIgD) and periodic fever*. Orphanet encyclopedia, February 2005
42. Lachmann HJ, Hawkins PN. *Developments in the scientific and clinical understanding of autoinflammatory disorders*. Arthritis Res Ther. 2009;**11**(1):212. Epub 2009 Jan 30.

43. Haas D, Hoffmann GF. *Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome*. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006;**1**:13
44. Kelley RI. *Inborn errors of cholesterol biosynthesis*. Adv Pediatr. 2000;**47**:1–53.
45. Grateau G. *Muckle–Wells Syndrom*. Orphanet encyclopedia, February 2005.
46. Neven B, Prieur AM, Quartier dit Maire P; Medscape. *Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment*. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Sep;**4**(9):481–9.
47. Jeru I, Duquesnoy P, Fernandes–Alnemri T, Cochet E, Yu JW, Lackmy–Port–Lis M, Grimprel E, Landman–Parker J, Hentgen V, Marlin S, McElreavey K, Sarkisian T, Grateau G, Alnemri ES, Amselem S. *Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 5;**105**(5):1614–9. Epub 2008 Jan 29.
48. Prieur AM. *CINCA Syndrome*. Orphanet encyclopedia, October 2003.
49. Hoffman HM. *Familial Cold Autoinflammatory Syndrome*. Orphanet encyclopedia, February 2005.
50. Touitou I. *PAPA Syndrome*. Orphanet encyclopedia, October 2006.
51. Van Duist MM, Albrecht M, Podswiadek M, Giachino D, Lengauer T, Punzi L, De Marchi M. *A new CARD15 mutation in Blau syndrome*. Eur J Hum Genet. 2005 Jun;**13**(6):742–7.
52. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoko S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf–1 family member that is restricted to monocytes and activates NF–kappaB. J Biol Chem 2001;**276**:4812–8.
53. OMIM#142680 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/142680>
54. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O’Shea JJ, Kastner DL. *TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes*. Curr Opin Immunol 2000;**12**:279–86.
55. Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, Goldbach–Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato AJ, Henrickson M, Pons–Estel B, O’Shea JJ, Kastner DL. *The tumor–necrosis–factor receptor–associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype–phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers*. Am J Hum Genet. 2001 Aug;**69**(2):301–14. Epub 2001 Jul 6.
56. Smith AJ, Humphries SE. *Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality*. Cytokine Growth Factor Rev. 2009 Feb;**20**(1):43–59. Epub 2008 Nov 28.

57. Mulley J, Saar K, Hewitt G, Rüschemdorf F, Phillips H, Colley A, Sillence D, Reis A, Wilson M. *Gene localization for an autosomal dominant familial periodic fever to 12p13*. Am J Hum Genet. 1998 Apr;**62**(4):884–9.
58. McDermott MF, Ogunkolade BW, McDermott EM, Jones LC, Wan Y, Quane KA, McCarthy J, Phelan M, Molloy MG, Powell RJ, Amos CI, Hitman GA. *Linkage of familial Hibernian fever to chromosome 12p13*. Am J Hum Genet. 1998 Jun;**62**(6):1446–51
59. National Center for Biotechnology Information web site / protein:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001056.1
60. Masters SL, Lobito AA, Chae J, Kastner DL. *Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers*. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2006 Dec;**6**(6):428–33.
61. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. *The ADAM metalloproteinases*. Mol Aspects Med. 2008 Oct;**29**(5):258–89. Epub 2008 Aug 15.
62. Karatay S, Melikoğlu MA. *TRAPS: Otozomal dominant bir otoinflamatuvar sendrom*. EAJM. 2007;**39**:210–213.
63. Gattorno M, Sormani MP, D'Ossualdo A, Pelagatti MA, Caroli F, Federici S, Cecconi M, Solari N, Meini A, Zulian F, Obici L, Breda L, Martino S, Tommasini A, Bossi G, Govers A, Touitou I, Woo P, Frenkel J, Koné-Paut I, Baldi M, Ceccherini I, Martini A. *A diagnostic score for molecular analysis of hereditary autoinflammatory syndromes with periodic fever in children*. Arthritis Rheum. 2008 Jun;**58**(6):1823–32.
64. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res **16**:215
65. National Center for Biotechnology Information web site – Homo sapiens
TNFRSF1A Reference Sequence: NG_007506.1:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007506.1?&from=5000&to=18338&report=genbank
66. National Center for Biotechnology Information web site / gene graph:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000012.11?from=6437257&to=6451927&strand=true&report=graph
67. Saulsbury FT, Wispelwey B. *Tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome in a young adult who had features of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis as a child*. J Pediatr 2005;**146**:283–5.
68. Granel B, Serratrice J, Dodé C, Grateau G, Disdier P, Weiller PJ. *Overlap syndrome between FMF and TRAPS in a patient carrying MEFV and TNFRSF1A mutations*. Clin Exp Rheumatol. 2007 Jul–Aug;**26**:S93–5

69. Stojanov S, Lohse P, McDermott MF. Periodic fever due to a novel TNFRSF1A mutation in a heterozygous Chinese carrier of MEFV E148Q. *Rheumatology* 2004;**43**:526–7.
70. Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL. *An MspAI I polymorphism in exon 1 of the human TNF receptor type I (p55) gene*. *Eur J Immunogenet.* 1998 Apr–Jun;**25**(2–3):269–70.
71. Bazzoni F, Gatto L, Lenzi L, Vinante F, Pizzolo G, Zanolin E, De Gironcoli M. *Identification of novel polymorphisms in the human TNFR1 gene: distribution in acute leukemia patients and healthy individuals*. *Immunogenetics.* 2000 Feb;**51**(2):159–63.
72. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, Millo JL, Welsh KI, Holloway P, Hitman GA, Piper RD, Garrard CS, Hinds CJ. Institute of Cell and Molecular Science & William Harvey Research Institute, Barts and The London Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London, London, UK. *TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study*. *Genes Immun.* 2004 Dec;**5**(8):631–40.
73. Lu LY, Keng HM, Chu JJ, Lin XT, Hsu CM, Sung PK. *TNF receptor I polymorphism is associated with persistent palindromic rheumatism*. *Scand J Rheumatol.* 2007 Jul–Aug;**36**(4):278–84.
74. Pagani F, Raponi M, Baralle FE. *Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 3;**102**(18):6368–72. Epub 2005 Apr 19.
75. Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, Goldbach–Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato AJ, Henrickson M, Pons–Estel B, O'Shea JJ, Kastner DL. *The tumor–necrosis–factor receptor–associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype–phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers*. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;**69**(2):301–14.
76. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine, Sixth Edition*, W.B. Saunders Company. ISBN 0–7216–6902–6, 2005
77. Barnes MR. *Genetic variation analysis for biomedical researchers: a primer*. *Methods Mol Biol.* 2010;**628**:1–20.
78. Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, Rigante D, Baldari CT, Laghi Pasini F, Galeazzi M. *Typical and severe tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome in the absence of mutations in the TNFRSF1A gene: a case series*. *Rheumatol Int.* 2010 May 15. [Epub ahead of print]

79. Aganna E, Hammond L, Hawkins PN, Aldea A, McKee SA, van Amstel HK, Mischung C, Kusuhara K, Saulsbury FT, Lachmann HJ, Bybee A, McDermott EM, La Regina M, Arostegui JJ, Campistol JM, Worthington S, High KP, Molloy MG, Baker N, Bidwell JL, Castañer JL, Whiteford ML, Janssens-Korpola PL, Manna R, Powell RJ, Woo P, Solis P, Minden K, Frenkel J, Yagüe J, Mirakian RM, Hitman GA, McDermott MF. *Heterogeneity among patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome phenotypes*. Arthritis Rheum. 2003 Sep;48(9):2632–44.

ÖZGEÇMİŞ

14.09.1985 tarihinde Bursa’da doğan Selime AKDENİZ, ilköğretimini, 1991–1999 yılları arasında Bursa Sakarya İlkokulu ve Bursa Hürriyet İlköğretim Okulu’nda, ortaöğretimini 1999–2002 yılları arasında Bursa Cumhuriyet Lisesi’nde tamamlamıştır. 2002 yılında girmiş olduğu Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun olmuştur. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Bölümü’nde Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı’na başlamıştır.

EKLER

TARİH: _/ _/ _

PERİYODİK OTOENFLAMATUAR SENDROMLAR**Hasta Hikaye Formu**

HASTA ADI :
 DOĞUM TARİHİ :
 CİNSİYET : E [] K []

ANNE : Hasta [] Sağlıklı [] (Periyodik ateş sendromları açısından)
 BABA : Hasta [] Sağlıklı []
 ETNİK KÖKEN :
 ATEŞ NÖBETLERİNİN BAŞLADIĞI YAŞ :

ATEŞ NÖBETLERİNİN KLİNİK BULGULARI

NÖBETLERİN SÜRESİ (gün) : <2 [] 2-5 [] 5-10 [] >10 [] (belirtiniz)

DERECE : >38°C [] <38 °C []

NÖBET SAYISI /YIL : <2 [] 2-6 [] 6-12 [] >12 [](belirtiniz)

ATEŞ GÖZLENMEYEN ARALIKLAR : Düzenli [] Düzensiz []
 SÜRESİ (gün) :

ATEŞ NÖBETİNİN BAŞLANGICINDA
 ÜŞÜME VE TITREME : Evet [] Hayır []

YAZ AYLARINDA ATEŞ NÖBETLERİ : Evet [] Hayır []

ATEŞ İLE İLİŞKİLİ BELİRTİLER**MUKO-KUTANÖZ**

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
AFTÖZ STOMATİT				
GENİTAL BÖLGEDE AFTÖZ ÜLSER				
ORAL HERPES BENZERİ LEZYONLAR				
EKSUDATİF FARENJİT				
ERİTEMATÖZ FARENJİT				
KONJUKTİVİT				
MAKULA-PAPULAR DÖKÜNTÜ*				
ERİZİPEL BENZERİ DÖKÜNTÜ*				
ÜRTİKERİYAL DÖKÜNTÜ*				
SOĞUK ÜRTİKER*				
PSEUDO-FOLİKÜLİT*				
DİĞER.....				

* Lokalizasyonu belirtiniz

KAS-İSKELET SİSTEMİ

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
ARTRALJİ				
MİYALJİ				
MONOARTİRİT*				
OLİGOARTİRİT* (≤ 4 EKLEM)				
POLİARTİRİT* (≥ 4 EKLEM)				
DİĞER.....				

* Lokalizasyonu belirtiniz

OKÜLER BULGULAR

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
PERİORBİTAL ÖDEM				
KONJUKTİVİT				
PERİORBİTAL AĞRI				
DİĞER.....				

GASTROİNTESTİNAL SİSTEM

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
ABDOMİNAL AĞRI				
PEKLİK				
DİYARE				
İSTİFRA				
DİĞER.....				

LENFOİD ORGANLAR

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
LENFOADENOPATİ*				
LENF NODLARINDA AĞRI				
SPLENOMEGALİ				
DİĞER.....				

* Lokalizasyonu belirtiniz

KARDİYO-RESPIRATÖR SİSTEM

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
TORASİK AĞRI				
PLARİT				
X-RAY BELGESİ	VAR		YOK	
PERİKARDİT				
EKO-KARDİYO BELGESİ	VAR		YOK	
DİĞER.....				

DİĞER BELİRTİLER

	HER ZAMAN	ARA SIRA	NADİR	HİÇBİR ZAMAN
BAŞ AĞRISI				
YORGUNLUK				
DİĞER.....				

PERİYODİK ATEŞ SENDROMLARI AÇISINDAN ETKİLENMİŞ AİLE ÜYELERİ

	İSİM-SOYİSİM (BAŞ HARFLERİ)	YAKINLIK	ETNİK KÖKEN	DOĞUM YERİ	KLİNİK BULGULAR
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					