



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



# CAPS BENZERİ HASTALIKLARDA MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİMLER VE FENOTİPE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Sona MAMMADOVA

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2020



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

# **CAPS BENZERİ HASTALIKLARDA MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİMLER VE FENOTİPE ETKİSİ**

Sona MAMMADOVA

Danışman: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2020



Sona MAMMADOVA tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan ‘‘CAPS Benzeri Hastalıklarda Moleküler Genetik Değişimler ve Fenotipe Etkisi’’ başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.01.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. Afig BERDELİ

**Raportör Üye** : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

**Üye** : Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “CAPS Benzeri Hastalıklarda Moleküler Genetik Değişimler ve Fenotipe Etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15/01/2020

Sona MAMMADOVA



**ÖZET****CAPS BENZERİ HASTALIKLARDA MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİMLER VE FENOTİPE ETKİSİ**

MAMMADOVA, Sona

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Ocak 2020, 109 sayfa

Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom-2 (FCAS2), kromozom 19q13 üzerindeki, NLRP12 genindeki heterozigot mutasyondan kaynaklanır. Eklem ağrısı, kas ağrısı, ateş, titreme, ekstremitelerin şişmesi ve soğuk algınlığına maruz kaldıktan sonra konjunktivit ile ilişkili tekrarlayan makülopapüler döküntü atakları ile karakterize bir otozomal dominant sistemik inflamatuvar hastalıktır. Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendromu 3 (FCAS3), kromozom 16q23 üzerindeki PLCG2 geni içinde heterozigot mutasyonlarla oluşuyor. Kronik ürtiker, eritem ve soğuk algınlığına cevaben pruritis gelişimi ile karakterize bağışıklık disregülasyonu ile seyreden bir hastalıktır. Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom-4 (FCAS4), kromozom 2p22 üzerindeki NLRC4 genindeki heterozigot mutasyondan kaynaklanır. Bu gendeki mutasyonlar, infantil enterokolit ile otoinflamasyona neden olur.

Bu çalışmada FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromu hastalıklarının nedensel genleri olan NLRP12, PLCG2, NLRC4 genlerinin DNA dizisinde saptanan tüm nükleotid yer değişimlerinin incelenmesinin değerlendirilmesi ve genotip/fenotip ilişkisinin, protein yapısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ayrılıkta her gende olan mutasyonlar saptanmıştır. Çalışmamızda FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromlu hastalıkla ilişkili NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 geninde saptanan mutasyonlar incelenmiştir. NLRP12 geninde 10 hastada, PLCG2 geninde 9 hastada, NLRC4 geninde 6 hastada DNA dizisinde mutasyona sebep olan tüm nükleotid yer değişimleri saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** FCAS2, FCAS3, FCAS4, genotip, fenotip, NLRP12, PLCG2, NLRC4.



**ABSTRACT****MOLECULAR GENETIC CHANGES AND PHENOTYPIC  
EFFECTS IN CAPS-LIKE DISEASES**

MAMMADOVA, Sona

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Afig BERDELI

January 2020, 109 pages

Familial cold autoinflammatory syndrome-2 (FCAS2) results from a heterozygous mutation in the NLRP12 gene on chromosome 19q13. It is an autosomal dominant systemic inflammatory disease characterized by recurrent maculopapular rash attacks associated with conjunctivitis after joint pain, muscle pain, fever, tremors, swelling of the extremities and colds. Familial cold autoinflammatory syndrome 3 (FCAS3) is formed by heterozygous mutations in the PLCG2 gene on chromosome 16q23. Chronic urticaria is a disease characterized by immune dysregulation characterized by the development of pruritis in response to erythema and colds. Familial cold autoinflammatory syndrome-4 (FCAS4) results from a heterozygous mutation in the NLRC4 gene on chromosome 2p22. Mutations in this gene cause autoinflammation with infantile enterocolitis.

In this study it is aimed to evaluate the investigation of all nucleotide changes in the DNA sequence of the causal genes of NLRP12, PLCG2, NLRC4 genes of FCAS2, FCAS3, FCAS4 syndrome and to evaluate the relationship between genotype / phenotype and protein structure. For this purpose mutations in each gene were determined. In our study, the mutations were studied detected in the NLRP12, PLCG2 and NLRC4 genes related to the disease with FCAS2, FCAS3, FCAS4 syndrome. All nucleotide displacements causing mutation in the DNA sequence were determined in 10 patients in the NLRP12, in 9 patient in the PLCG2, in 6 patients in the NLRC4 gene.

**Keywords:** FCAS2, FCAS3, FCAS4, genotype, phenotype, NLRP12, PLCG2, NLRC4.



## ÖNSÖZ

Bu çalışmada FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromlu hastalıkla ilişkili NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 geninde saptanan mutasyonlar çalışılmıştır ve tez çalışmamda FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromu hastalıklarının nedensel genleri olan NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 genlerinin DNA dizisinde, protein kodlayan eksonlarında ve biyolojik anlamı olan intron bölgelerinde saptanan tüm nükleotit yer değişimlerinin incelenmesinde değerlendirilmesi amaçlanarak sağlıklı ve otoinflamatuar klinik ve laboratuvar bulguları olan hastalarda NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 gen analizi yapılarak hastalıkların nedensel genetik varyantları, saptanmış, proteine etkileri ve genotip / fenotip ilişkileri sundum.

Tez danışmanım Prof.Dr.Afig BERDELİ'nin ve Moleküler Genetik laboratuvar çalışanlarının da yardımı ile laboratuvar çalışmalarımın sonucunu göz önünde bulundurarak değerlendirmelerimi yaptım.

İZMİR

15/01/2020

Sona MAMMADOVA



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK .....	ii
KABUL ONAY SAYFASI .....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Ailesel Soğuk Otoinflatuar Sendrom (FCAS).....	1
1.2 Epidemiyoloji .....	1
1.3 Klinik Bulgular .....	1
1.4 FCAS Tanı Kriterleri .....	2
1.5 Ayırıcı Tanı.....	2

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
1.6 Laboratuvar Bulguları.....	3
1.7 Tedavi.....	3
2. AİLEVİ SOĞUKLA UYARILAN OTOİNFLAMATUVAR SENDROM	
2 (FCAS 2).....	5
2.1 NLR Ailesi Pirin Domeni İçeren 12 (NLRP12) GEN .....	5
2.2 NLR Ailesi .....	7
2.3 NLRP12 Ekspresyonu.....	7
2.4 p.D294E Bilgisi ve NF-kB Yönetmeliği.....	9
2.5 NLRP12 Geninin Kromozomal Lokasyonu.....	11
3. AİLESEL SOĞUK OTOİNFLAMATUVAR SENDROMU 3 (FCAS3) .....	12
3.1 Phospholipase C Gamma 2 (PLCG2) Gen.....	12
3.2 PLCG2-İlişkili Antikor Eksikliği, Otoinflamasyon ve İmmün Disregülasyon.....	14
3.3 PLCG2 Gen Mutasyonu.....	15
3.4 p.Ser707Tyr Bilgisi.....	17
3.5 PLCG2 Geninin Kromozomal Lokasyonu.....	18
4. AİLESEL SOĞUK OTOİNFLAMATUVAR SENDROM-4 (FCAS4).....	20

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.1 NLR Family CARD Domain Containing 4 ( NLRC4) Gen .....	20
4.2 NLRC4 Gen İnflamasyonu ve Apoptozom .....	22
4.3 P.Val341Ala Bilgisi .....	28
4.4 Otoinflamasyona Neden Olan NLRC4 Genindeki Mutasyonlar .....	29
4.5 NLRC4'te Olan İnsan Fonksiyon Kazancı Mutasyonları .....	30
4.6 NLRC4 Geninin Kromozomal Lokasyonu .....	31
5. MATERYAL VE METOD .....	32
5.1 DNA Eldesi .....	32
5.2 Hazırlama ve Prosedür .....	34
5.2.1 DNA'nın kontrol edilmesi .....	35
5.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	35
5.4 DNA Dizileme .....	38
5.4.1 NLRP12 geni için referans dizisi .....	38
5.4.2 PLCG2 geni için referans dizisi .....	46
5.4.3 NLRC4 geni için referans dizisi .....	53
5.5 İstatistiksel Analiz .....	61

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6. BULGULAR.....	62
6.1 Hasta Grubu .....	62
6.1.1 NLRP12 geninde saptanan Thr260Met heterozigot mutasyonu .....	62
6.1.2 NLRP12 geninde saptanan Phe402Leu heterozigot mutasyonu .....	63
6.1.3 NLRP12 geninde saptanan Arg352Cys heterozigot mutasyonu .....	64
6.1.4 NLRP12 geninde saptanan p.His304Tyr heterozigot mutasyonu .....	65
6.1.5 NLRP12 geninde saptanan p.Gly39Val heterozigot mutasyonu .....	66
6.1.6 NLRP12 geninde saptanan p.Gly448Ala heterozigot mutasyonu .....	67
6.1.7 NLRP12 geninde saptanan p.Arg1016 * heterozigot mutasyonu .....	68
6.1.8 NLRP12 geninde saptanan p.Ile474Phe heterozigot mutasyonu .....	69
6.1.9 NLRP12 geninde saptanan p.Ile196Thr heterozigot mutasyonu .....	70
6.1.10 NLRP12 geninde saptanan p.Arg329Gln het heterozigot mutasyonu .....	71
6.2 PLCG2 geninde saptanan mutasyonlar .....	72
6.2.1 PLCG2 geninde saptanan p.Gly805Asp heterozigot mutasyonu .....	72
6.2.2 PLCG2 geninde saptanan p.Asn798Ser heterozigot mutasyonu .....	73
6.2.3 PLCG2 geninde saptanan p.Ala776Thr heterozigot mutasyonu.....	74

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

6.2.4 PLCG2 geninde saptanan p.His257Leu heterozigot mutasyonu .....	75
6.2.5 PLCG2 geninde saptanan p.Tyr482His heterozigot mutasyonu.....	76
6.2.6 PLCG2 geninde saptanan p.Met28Leu heterozigot mutasyonu .....	77
6.2.7 PLCG2 geninde saptanan p.Ser110Asn heterozigot mutasyonu .....	78
6.2.8 PLCG2 geninde saptanan p.Ile671Val heterozigot mutasyonu .....	79
6.2.9 PLCG2 geninde saptanan p.Asn1096del heterozigot mutasyonu .....	80
6.3 NLRC4 geninde saptanan mutasyonlar .....	81
6.3.1 NLRC4 geninde saptanan p.Gly786Val heterozigot mutasyonu.....	81
6.3.2 NLRC4 geninde saptanan p.Ala160Thr heterozigot mutasyonu.....	82
6.3.3 NLRC4 geninde saptanan p.Ala622Val heterozigot mutasyonu.....	83
6.3.4 NLRC4 geninde saptanan p.Ile811Thr heterozigot mutasyonu .....	84
6.3.5 NLRC4 geninde saptanan p.Arg204His heterozigot mutasyonu.....	85
7. TARTIŞMA.....	86
8. SONUÇ.....	99
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	100
TEŞEKKÜR .....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	109

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan NLRP12 geni ve proteini.....	5
2.2. NLRP12 geninde mutasyonların şematik diyagramı .....	8
2.3. NLRP12 geninin protein etkileşim ağı.....	8
2.4. NLRP12'nin işlevleri .....	10
2.5. NLRP12 geninin sitogenetik diyagramı.....	11
3.1. PLCG2 kodlayan Fosfolipaz C $\gamma$ 2'deki genomik delesyon işlemleri .....	13
3.2. PLC $\gamma$ 2 enzimatik aktivitesi .....	14
3.3. Plcg2 ekspresyonu, Mutant Plc $\gamma$ 2'nin membran lokalizasyonu.....	15
3.4. PLCG2'nin şematik görünümü ve SWISS modelinin homoloji modellemesi .....	18
3.5. PLCG2 geninin sitogenetik diyagramı.....	19
4.1. Çoklu etkileşimler NLRC4'ü inaktif formda stabilize eder .....	21
4.2. NAIP5-NLRC4 inflamasyon.....	23
4.3. NAIP-NLRC4 inflamasyonunun aktivasyonu .....	25
4.4. Apoptozom düzeneğinin mekanizmaları ve aktivasyonu.....	27
4.5. NLRC4 inflamatuvar mutasyonu. ....	29

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. NLRC4 geninin sitogenetik diyagramı .....	31
5.1. EDTA 'lı tüp. ....	32
5.2. IPrep™ PureLink® otomatik DNA izolasyon cihazı .....	32
5.3. Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (K1820-01).....	33
5.4. Agaroz jelde elektroforez işlemi.....	35
5.5. MyGene Gradient Thermal Cycler cihazı.....	37

**TABLolar DİZİNİ**

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan NLRP12'nin gen ekleme varyantları.....	6
3.1. Allelik varyantlar. ....	13
5.1. PCR döngüsü.....	36



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ASC	Bir Caspase-alım bölgesi içeren Apoptoz ile ilişkili Speck benzeri protein(Related to Apoptosis Containing a Caspase-Intake Zone Speck-like protein)
BIR	Baculovirus IAP tekrarı (A Baculovirus IAP repeat)
CAPS	Kriyopirin ilişkili Periyodik sendrom(Cryopyrin -Associated Autoinflammatory Syndrome)
CARD	Kaspaz-alım domeni (caspase-acquisition domain)
DAG	Diasilgliserol (diacylglycerol)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FCAS	Ailevi soğukla uyarılan otoinflamatuvar sendrom (Familial Cold Autoinflammatory Syndrome)
IL-1 $\beta$	İnterlökin -1 $\beta$ (Interleukin - 1 $\beta$ )
IP3	İnositol 1,4,5 – trifosfat(inositol 1,4,5 - triphosphate)
LRR	Lösin açısından zengin tekrar bölgesi (Leucine rich repeat region)
NLRC4	NLR ailesi CARD domeni içeren 4( NLR family CARD domain containing 4)
NLRP12	NLR ailesi pirin domeni içeren 12 (NLR familypyrin domain containing 12)

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PLCG2	Fosfolipaz C gama 2(phospholipase C gamma 2)
PYD	Pirin domeni (PYD pirin domain)
TAQ	Termo Stabil Polimeraz Enzimi (Thermo Stable Polymerase Enzyme)



## 1. GİRİŞ

Kriyopirinle ilişkili periyodik sendrom (The CryopyrinAssociated Periodic Syndromes (CAPS)) kriyopirin proteinini kodlayan 1.kromozomun uzun kolunda lokalize NLRP3 genindeki mutasyona bağılı olarak gelişir ve otozomal dominant (OD) kalıtılır. Kriyopirin inflamazomun regülasyonunda önemli rol oynar.CAPS hafif, orta ve şiddetli form olmak üzere üç farklı otoinflatuar sendromdan oluşur.

### 1.1 Ailesel Soğuk Otoinflatuar Sendrom (FCAS)

Ailesel soğuk otoinflatuar sendrom (FCAS) ailesel soğuk ürtiker (FCU), ailesel polimorf soğuk erüpsiyonu ve soğuk hipersensitivitesi olarak da bilinmektedir.FCAS otozomal dominant ve sistemik inflamatuar bir hastalık olarak ilk defa 1940 yılında tanımlandı.Hastada soğuğa maruziyetten sonra ürtiker, artralji, konjunktivit ve ateş gelişir.FCAS diğer herediter periyodik ateş sendromlarından ayırıcı özellikleri; soğüğün tetikleyen faktör olması, başlangıç yaşı 6 aylıktan önce olması ve atakların 24 saatten kısa sürmesidir.

### 1.2 Epidemiyoloji

FCAS nadir bir hastalıktır ve sıklığı tam olarak bilinmemektedir.Rapor edilen vakaların çoğu Avrupa ve Kuzey Amerika'dandır.Kadın ve erkek oranı eşittir. Ataklar vakaların %95'i ilk 6 ay içerisinde ve vakaların

%60'ında doğumdan sonra ilk birkaç gün içinde başlar. Ortalama yaş 47 gündür (2 saat-10yıl). Semptom şiddeti başlangıç yaşıyla değişmez.Ürtiker erişkin dönemde daha siktir.

### 1.3 Klinik Bulgular

Tekrarlayan ürtikeriyal döküntü bütün hastalarda en sık görülen bulgudur.Diğer semptomlar; ateş ve üşüme (%93), poliartralji (%96) ve konjunktivit (%84) dir. Soğuğa maruziyetten sonra sık görülen diğer semptomlar;

aşırı terleme (%78), sersemlik (% 67), başağrısı (%58), aşırı susama (%53), bulantı (%51) ve miyaljidir.Artrit bu hastalarda bildirilmemiştir.Semptomları ortaya çıkaracak soğuga maruziyet süresi ortalama 52 dakikadır (5 dk- 3 saat).Atakların ortalama süresi 12 saattir (30dk-72 saat).Hastaların yaklaşık %94'ünde çoğu ataklar 24 saatten daha kısadır.Fizik muayenede; hastalarda ateş, aşırı terleme, konjunktivit ve daha çok ekstremitelerde ve yüzde görülen ürtiker vardır.FCAS için Hoffman ve arkadaşları tarafından klinik tanı kriterleri tanımlanmıştır.Bu kriterler bir çalışmada kullanıldığı zaman hastaların %41'i FCAS için tüm kriterleri,%90'ı 5 kriteri ve %100'ü 4 kriteri doldurmaktadır.Etkilenmeyen hastaların hiç biri 2 veya daha fazla kriteri doldurmadı.

#### **1.4 FCAS Tanı Kriterleri**

1. Tekrarlayan intermittan ateş ve döküntü (doğal,deneysel veya her iki tipte soğuga maruziyet sonrası oluşur)
2. Otozomal dominant geçiş
3. Doğumdan sonra ilk 6 ay içerisinde başlaması
4. Atakların 24 saat sürmesi
5. Ataklarla birlikte konjunktivit varlığı
6. Sağırılık, periorbital ödem, lenfadenopati ve serozitin olmaması

#### **1.5 Ayırıcı Tanı**

Kazanılmış soğuk ürtiker (ACU) fiziksel ürtikerin en sık nedenidir.FCAS'den farklı olarak ACU tipik olarak erişkin yaşta görülür ve spontan olarak düzelir.ACU soğuga doğrudan temasla birkaç dakika içinde gelişir, saatler içerisinde düzelir ve anjioödem, wheezing ve hipotansiyon ile birlikte olabilir.Diğer HPFS özellikle MWS akla gelmelidir.SSS tutulumu (kr. aseptik menenjit, sensoriyal işitme kaybı, optik sinir elevasyonu) MWS'de görülürken

FCAS'da görülmez.Kas-iskelet sistemi 3 hastalıkta farklı şekilde etkilenir.Esas romatolojik problem FCAS'de artralji, MWS'de sinovittir.Diğer ayırıcı tanılar kriyoglobulinemi ve ürtikerdir.

### **1.6 Laboratuvar Bulguları**

Ataklar sırasında akut faz proteinlerinde artış, eritrosit sedimentasyon hızında artış ve lökositöz tespit edilebilir.Serum IL-6 konsantrasyonu yükselmiş olabilir.Mast hücre sayısı ve doku histamin düzeyi normaldir. Ataklar sırasında alınan deri örneğinde dilate damarların çevresinde yoğun nötrofil, eozinofil ve lenfosit infiltrasyonu, dermisin üst kısmında hafif ödemle birlikte bulunur. İnterstisiyel nötrofiller ve mononükleer hücrelerin yer aldığı perivasküler inflamasyon esas histolojik bulgular olarak da rapor edilmiştir.Deriye 5 dakika süreyle buz uygulanarak buz küpü testi yapılır.Bu hastalarda hiçbir ürtiker gelişmez.Genetik testler dikkate alındığında FACS'da bütün mutasyonlar 9 exonu olan NLRP3 (CIAS1) geninin 3.exonunda tanımlanmıştır.

### **1.7 Tedavi**

Anti-inflamatuar ilaçlar seçilmiş hastalarda yararlı olmaktadır.Yapılan bir pilot çalışmada, soğuğa maruziyetten önce IL-1 reseptör antagonisti verilmesi döküntü, artralji ve ateş gibi semptomları engeller ve lökosit ve IL-6 miktarlarını azaltır.

IL-1 antagonisti olan Rilonacept (100mg) uygulanan 5 FASC'li hastada döküntü, ateş ve eklem ağrısı/şişliği birkaç gün içerisinde düzelmiştir ve eritrosit sedimentasyon hızında, CRP ve SAA'de belirgin azalma gözlenmiştir. 160 ve 320 mg'lık dozlarla daha iyi sonuçlar alınmıştır.Çalışmalarda ciddi bir yan etki görülmemiştir.Rilonacept'in FACS ve MWS gibi CAPS'lı hastalarda eklem ağrısı, döküntü, ateş ve titreme, göz irritasyonu ve halsizlik gibi semptomları düzelttiği bildirilmiştir.

Canakinumab oldukça selektif bir IL-1 $\beta$  reseptör antagonistidir. Canakinumab CAPS'la birlikte olan inflamasyonda FDA tarafından

onaylanmıştır.Erişkin dozu her 8 haftada bir 150mg sc yapılır.4 yaşından küçük ve 40kg altındaki çocuklar için doz 8 haftada bir 2mg/kg şeklinde uygulanır.40 kg üzeri çocuklarda da uygulama erişkinlerdeki gibidir.Sık yan etkileri farenjit, diyare, influenza, başağrısı ve bulantıdır.Komplikasyonlar; sistemik amiloidoz önemli bir komplikasyondur ve prognozu belirler.Amiloid nefropati sık ölüm nedenidir.Amiloidoz gelişmemiş hastanın hayat beklentisi normaldir (Hoffman et al., 2001).

Klinik semptomların heterojenliği farklı fenotipler için farklı genlerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

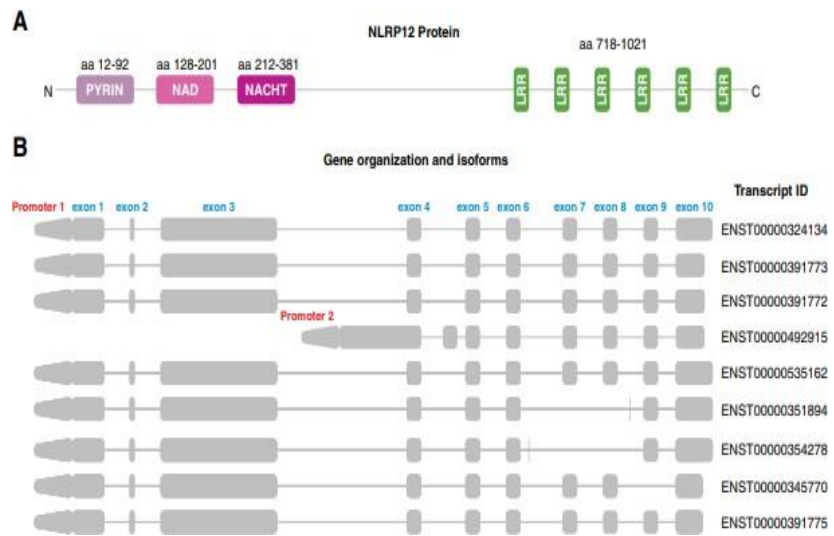
FCAS dört gende (NLRP3, NLRP12, NLRC4 ve PLCG2) olan mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir.

## 2. AİLEVİ SOĞUKLA UYARILAN OTOİNFLAMATUVAR SENDROM 2 (FCAS 2)

FCAS 2 OD(otozomal dominant) geçişli bir hastalıktır.NLRP12 genindeki mutasyona bağlı olarak gelişir.Genellikle, soğuğa maruziyetle başlayabilir.Ataklar 2-15 gün sürer.Ateş, ürtiker benzeri eritem, artralji, miyalji ve baş ağrısı görülür.Hastaların çoğunda sensorinöral işitme kaybı görülür.

### 2.1 NLR Ailesi Pirin Domeni İçeren 12 (NLRP12) GEN

NLRP12, ayrıca diğer isimleriyle RNO, PYPAF7 ve Monarch – 1, bir purin içeren NLR proteinidir. Gen, ilk olarak HL60 insan lösemik hücre çizgisinde tanımlanmış ve kısmen karakterize edilmiştir. NO uyarımı üzerine HL60 hücrelerinde yukarı regüle edildiği anlaşıldığı üzere ilk olarak RNO olarak adlandırılmıştır. Sonra, tam uzunluktaki gen, bağımsız olarak iki grup tarafından klonlanmış ve Monarch – 1 ve PYPAF7 olarak adlandırılmıştır.NLRP12, bir N-terminal PYD, bir merkezi NBD ve bir C- terminali LRR bölgesinden oluşan bir hücre içi proteindir. Tam uzunluktaki insan NLRP12 cDNA'sı, tahmini moleküler ağırlığı ~120 kDa olan bir 1062 aa proteini kodlamaktadır (Şekil 2.1.A). Alternatif ekleme NLRP12'nin çoklu transkript varyantları ile sonuçlanır (Şekil2.1.B ve Tablo2.1).



Şekil 2.1. İnsan NLRP12 geni ve proteini.

(A) NLRP12 protein domainleri. NLRP12 proteini 10 ekzon tarafından kodlanan 1062 kalıntı uzunluğundadır. Exon 1 kodları PYD için. En büyükekson – Exon3, bir NACHT domaini ve bir NACHT ilişkili etki alanı (NAD) içeren NBD'yi kodlarken genin 4-9 eksonları LRR'ler için kodlar.

(B) İnsan NLRP'sinin transkriptleri. NLRP12'nin 9 transkripti mevcuttur. Transkriptler, eksonların ve ekleme bağlantılarının doğrusal sekanslarının çizilerek gösterilmiştir. Görüntü TViewer, suite v3.1 (Genomatix yazılımı, Ann Arbor, MI, ABD; <http://www.genomatix.de/> den elde edildi)

Tablo 2.1. İnsan NLRP12'nin gen ekleme varyantları.

Adı	Lokasyon (19q13.4; ters iplik)	Topluluk transkript ID	Uzunluk (bp)	Topluluk proteini ID	Uzunluk (aa)
NLRP12-001	54,296,857-54,327,597	ENST00000324134	3801	ENSP00000319377	1061
NLRP12-002	54,296,997-54,327,648	ENST00000391773	3715	ENSP00000375653	1062
NLRP12-007	54,296,997-54,327,648	ENST00000391772	3205	ENSP00000375652	892
NLRP12-005	54,296,997-54,311,959	ENST00000492915	2479	No protein product	-
NLRP12-203	54,296,857-54,327,648	ENST00000535162	3681	ENSP00000438030	1004
NLRP12-201	54,296,857-54,327,648	ENST00000351894	3516	ENSP00000340473	949
NLRP12-202	54,296,857-54,327,648	ENST00000354278	3345	ENSP00000346231	892
NLRP12-004	54,296,997-54,327,648	ENST00000345770	3547	ENSP00000341428	1006
NLRP12-003	54,296,996-54,327,571	ENST00000391775	3465	ENSP00000375655	1004

İnsan NLRP'si, ağırlıklı olarak nötrofiller, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve olgunlaşmamış dentrik hücreler gibi miyeloid soy hücrelerinde ifade edilir. Ekspresyonu patojenlere, patojen ürünlere ve inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak aşağı regüle edilir. NLRP12 transkripsiyonunun kısmi aşağı – regülasyonu, TLR stimülasyonundan sonra B lenfosit indüklü matürasyon proteini - I'ın promotöre bağlanmasıyla elde edilir.

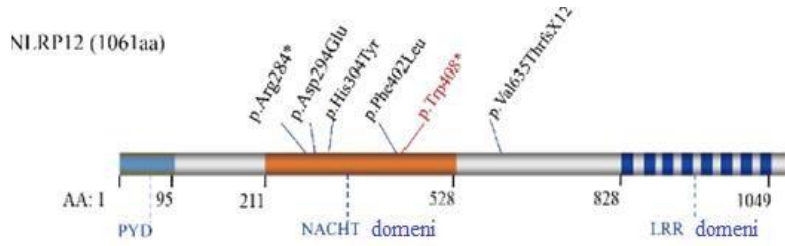
## 2.2 NLR Ailesi

Hücre içi proteinlerin insan NLR ailesinin 22 üyesine 14 NLRP üyesi, 5 NLRC alt ailesinin üyesi, NAIP, NLRX ve CIITA dahildir. NLR'ler N- terminal protein bağlanma domeni (CARD (kaspaz-alım domeni), PYD (pirin domeni) veya BIR (Baculovirus IAP tekrarı) ve bir C-terminali LRR (lösin bakımından zengin tekrar) domeni arasında molekülün merkezinde bulunan NACHT adlı eşsiz bir nükleotit bağlanma domenine sahiptir. NLR moleküllerinin bir kısmının sistein proteaz kaspaz-1'in fonksiyonuyla etkileşime girdiği ve modüle ettiği gösterilmiştir. NLRC4, NLRP6, NLRP7, NLRP10 ve NLRP12 içeren NLR moleküllerinin kaspaz-1 aktivitesini modüle ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte NLRP1, NLRP3 ve NLRC4'ün açık fizyolojik rolleri olduğu gösterilmiştir.

## 2.3 NLRP12 Ekspresyonu

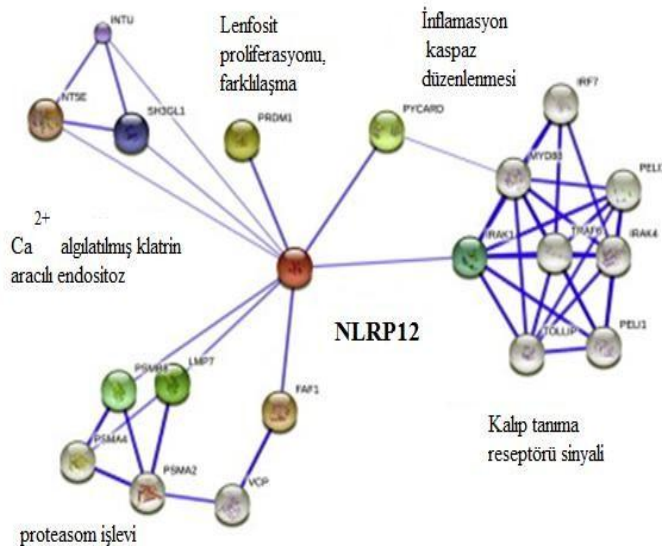
NLRP12'nin ekspresyonu, immün hücreler, patojen ürünleri ve inflamasyon sitokinlerle kısıtlandığı için, bu proteinin iltihap ve bağışıklığı düzenlemesi öngörülmüştür. NLRP12'nin inflamasyon sırasında düzenleyici rolüne uygun NLRP12 genindeki mutasyonlar, ailesel soğuk otoinflamatuvar sendromun bazı formlarını içeren NLRP12AD diye adlandırılan yeni bir inflamatuvar sendromlar sınıfı ile ilişkili bulunmuş ve NBD içinde yer alan anlamsız mutasyon p.Arg284X'in, vahşi – tip NLRP12 ile karşılaştırıldığında NF-kB aktivitesini baskılamakta daha az etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. İnflamasyona neden olan fonksiyon kaybı ile bağlantılı bir ekleme defekti oluşturan bir ekleme NF-kB sinyalleme üzerindeki NLRP12 inhibitör özelliklerinin açık bir şekilde azaltılmasını da tetikler. Hatta bunun aksine, evrimsel olarak korunan NBD içinde haritalanan yanlış mutasyon p.Asp294Glu, NF-kB sinyallemesinin engellenmesi yerine artmış kaspaz – 1 aktivasyonu ile birleşir. Ayrıca olarak, bir CpG bölgesini (p.Arg352Cys) içeren başka yanlış mutasyon proteinin nükleotid – bağlanma yerini kodlayan NLRP12'nin Ekson 3'ünde tanımlanmıştır (Jeru et al., 2011). Bu yine de NF-kB sinyali üzerinde doğrudan bir etki, speck oluşumu ve aktive kaspaz-1 sinyallemesinde bir artış göstermez. Ayrıca, NLRP12AD hastalarının PBMC'lerinin kendiliğinden sağlıklı bireylerden gelen PBMC'lere kıyasla büyük miktarda IL-1 $\beta$  salgıladıkları gösterilmiştir. Sonuç olarak, NLRP12'nin periyodik ateş

sendromunda fizyolojik önemi kesindirirse de, NF- $\kappa$ B yolunu düzenlemeye yönelik davranış tanımlamaya devam etmektedir (Tuncer et al., 2014).



Şekil 2.2. NLRP12 geninde mutasyonların şematik diyagramı (Xiaoru Xia et al., 2016).

NLR proteinleri bağışıklık sisteminde yer alarak bağışıklık sisteminin toksinlere veya mikroorganizmaların saldırısına karşı bu sistemin düzenlenmesine yardım eder. Bağışıklık sistemi tarafından artan aktiviteyi destekleyen NLR proteininden farklı olarak NLRP12 inflamasyon sürecine dahil olan bazı moleküllerin salınmasını inhibe eder. İltihaplanma bağışıklık sistemi mikrobiyal istilacılarla savaşmak ve doku onarımını kolaylaştırmak için beyaz kan hücrelerinin yanı sıra bir yaralanma veya hastalık bölgesine sinyal gönderdiğinde ortaya çıkar.



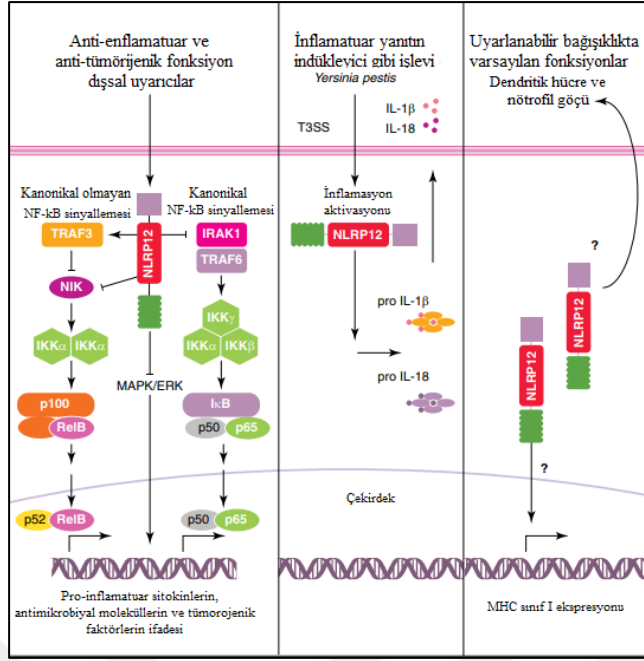
Şekil 2.3. NLRP12 geninin protein etkileşim ağı.

Bunu yaptığı zaman inflamatuvar cevabı durdurmak vücudun kendi hücrelerine ve dokularına zarar vermeyi önlemeye yardımcı olur (Chu et al.,2015).

#### **2.4 p.D294E Bilgisi ve NF-kB Yönetmeliği**

Soğuğa aşırı hassasiyet, NLRP12 geninin p.D294E mutasyonunu taşıyan bireylerde NF – kB aktivitesinin regülasyonu etkilenmemesine rağmen, redoks değişiklikleri ve IL - 1 $\beta$ 'nin hızlandırılmış sekresyonu fenotip ile ilişkilidir.

İmmün olmayan hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde, NLRP12'nin ASC ile birlikte lokalize olduğunu ve IL-1 $\beta$  salgılanmasına yol açan NF-kB ve kaspaz-1'i aktive ettiğini gösterir. Biyokimyasal çalışmalar NLRP12'nin kanonik ve kanonik olmayan NF-kB yollarına müdahale ederek proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimini baskıladığını göstermiştir. NLRP12, aşırı eksprese edilen THP-1 hücrelerinde, kanonik NF-kB alt birimlerinin nükleer translokasyonu RelA (p65) ve p50, TLR2 agonisti ile uyarımdan sonra normal olarak ilerlerken, TLR2 ligandı ile ön muamele, ardından CD40 ligandı uyarımı, NLRP12'nin NOD ve LRR domenleri aracılığıyla NIK ile birleşmesi ve NIK'nin proteazomun aracılık ettiği bozunmasına yol açması sonucu, p52 işleminde ve nükleer translokasyonda azalma gözlemlenmiştir. Sadece NIK ile değil, aynı zamanda NIK degradasyonuna doğrudan katılan TRAF3 ile de NLRP12'nin etkileşimi vurgulanmıştır. Bu nedenle, NLRP12, TRAF3 bozulmasını ve sonuç olarak NIK aktivasyonunu önleyerek, kontrolde kanonik olmayan NF-kB aktivasyonunu korumaktadır (Şekil2.4.1). Bu sebepten NLRP12<sup>-/-</sup> hücreleri NIK, p100 işleminin p52'ye yükseltilmesini ve TRAF3 seviyelerini azaltmıştır. Farklı mekanizmalar aracılığıyla, NLRP12 dahil olmak üzere birçok NLR'nin, kanonik NF-kB aktivasyon yolunu sönmüleyerek eylemlerini yakınlaştırdığı gösterilmiştir. Özellikle, NLRP12, inhibisyonun gerçekleşmesi için kritik görünen, IRAK1 fosforilasyonunu ve ATP'nin NLRP12'nin NBD'sine bağlanmasını engeller (Şekil2.4).



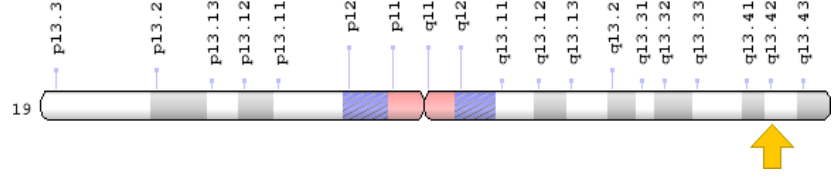
Şekil 2.4. NLRP12'nin işlevleri.

NLRP12'nin, kanonik ve kanonik olmayan NF-κB sinyallemesini ve MAPK/ ERK aktivasyon yolunu baskılayarak, inflamasyonlu sinyalleme ve kolon tümörögenезinin bir negatif regülatörü olarak işlev görmesi beklenirken bununla birlikte NLRP12, kaspaz-1 aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salınımını tahrik ederek, *Y.pestis* enfeksiyonunda gösterildiği gibi inflamasyonlu sinyallemede de rol oynayabilir. NLRP12'nin ayrıca olarak dentritik hücrelerin, nötrofillerin ve klasik ve klasik olmayan MHC sınıf I ekspresyonunun göçünü kontrol ederek adaptif immünitede bir rolü olduğu belirtilmiştir. IKK, IκB kinaz; T3SS, tip III sekresyon sistemi (Jéru et al.,2011).

NF-κB sinyal üzerinde NLRP12 – WT kişilerce NLRP12 – Arg352Cys etkisini karşılaştırmak için daha önce NLRP12 nonsense ve ekleme sahası mutasyonlar arasında zararlı bir etki göstermek için kullanılan bir hücre sisteminde deneyleri yapılmıştır. Bu NF-κB raportör tahlili geçici olarak HEK293T hücrelerinde eksprese edilen NLRP12 -WT'nin, p65 tarafından indüklenen NF-κB aktivasyonunu kuvvetle inhibe ettiğini ve p.Arg352Cys mutasyonunun varlığında benzer bir inhibisyon gösterdiğini doğrulamıştır (Jéru et al., 2011)

## 2.5 NLRP12 Geninin Kromozomal Lokasyonu

Sitogenetik Yeri: 19.cu kromozomun pozisyon 13.42'deki uzun (q)koludur.  
19q13.42



Şekil 2.5. NLRP12 geninin sitogenetik diyagramı.

Moleküler Yeri: Kromozom 19 üzerinde 53,793,584 ila 53,824,403 numaralı baz çiftleri.

### 3. AİLESEL SOĞUK OTOİNFLAMATUVAR SENDROMU3(FCAS3)

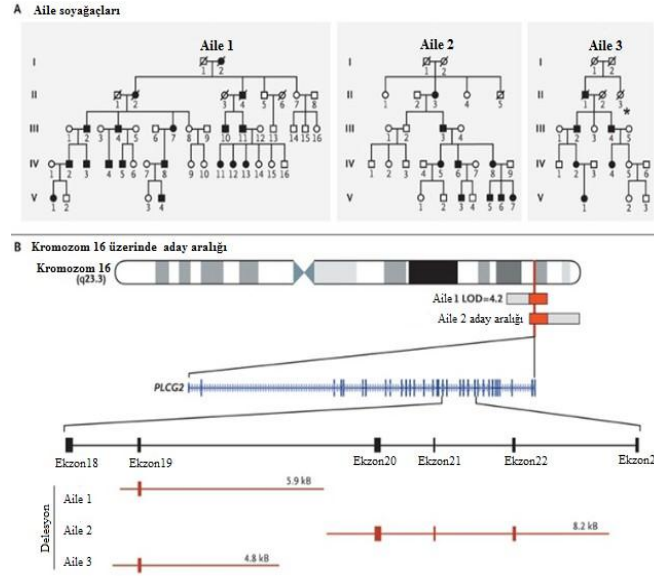
Otozomal dominant immün bozukluğu soğuğa maruz kalmaya yanıt olarak deri ürtiker, eritem ve kaşıntı gelişmesi ile karakterize edilmektedir. Etkilenen bireyler, antikor eksikliği, azalmış B hücresi sayısı, kusurlu B hücresi, enfeksiyona duyarlılığı ve otoimmün hastalık riskinde artış dahil olmak üzere değişken ek immünolojik kusurlara sahiptir. Ailesel soğuk otoinflamatuar sendromu 3 (FCAS3) olan 3 ilgisiz aileden etkilenen bireylerde, PLCG2 geninde 3 farklı heterozigot intragenik delesyonu tanımlanmıştır (Ombrello et al., 2012).

#### 3.1 Phospholipase C Gamma 2 (PLCG2) Gen

Bu gen tarafından kodlanan protein bir kofaktör gibi kalsiyum kullanarak 1-fosfatidil-1D-miyo-inositol 4,5-bisfosfatın 1D- miyo -inositol 1,4,5 trisfosfata (IP<sub>3</sub>) ve diasilgliserin(DAG) dönüşümünü katalize eden bir transmembran sinyal enzimidir. IP<sub>3</sub> ve DAG büyüme faktörü reseptörlerinden ve immün sistem reseptörlerinden sinyalleri hücre zarından iletmek için önemli olan ikinci haberci moleküllerdir. Bu gendeki mutasyonlar , otoinflamasyon, antikor eksikliği ve immün düzensizlik sendromu ve ailevi soğuk otoinflamatuar sendrom 3'te bulunmuştur. İkinci haberci moleküllerin diasilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 – trisfosfat (IP<sub>3</sub>) üretimine, aktive edilmiş fosfatidilinositol-spesifik fosfolipaz C enzimleri aracılık etmektedir. Transmembran sinyalleşmesinde çok önemli bir enzimidir.

1. PLCG2, 5.9-KB DEL. PLCG2 geninde bir heterozigos 5.9-kb delesyonu olan bir ailenin etkilenen üyelerinde ekzon 19'un C-terminal Src- homoloji -2 (cSH2) domeninde silinmesiyle sonuçlanmıştır, bu oto- inhibitördür ve normal olarak konstitütif enzim fonksiyonu önlemektedir.

2. PLCG2, 8.2-KB DEL. PLCG2 geninde bir heterozigos 8.2-kb delesyonu tanımlanan aile üyelerinde, C-terminal Src-homoloji-2 (cSH2) domeninde, 20'den 22'ye kadar olan ekzonların silinmesiyle sonuçlanmıştır. Oto-inhibitördür ve normal olarak yapısal enzim fonksiyonunu önlemektedir.



Şekil 3.1. PLCG2 kodlayan Fosfolipaz C $\gamma$ 2'deki genomik delesyon işlemleri:

Panel A. Üç ailenin soyağacını PLAİD ile göstermektedir. Kesintisiz semboller etkilenen konuları gösterir, semboller etkilenmeyen akrabaları ve kareler erkek denekleri işaretlerken çevreler kadın denekleri gösteriyor. Ölmüş konuları eğik çizgiler gösterir. Aile 3'deki başrol üyesi pnömoniden 1 yaşındayken ölmüş. Panel B. Aile 1'deki bağlantı aralığının kesişmesiyle tanımlanan 16 nolu uzun kromozom kolu aday adayını ve Aile 2'deki aday aralığın kesişimi ile tanımlanan aday aralığını göstermektedir. Üç ailede üç ayrı PLCG2 delesyonu (kırmızı yatay çubuklar) tanımlanmıştır (Ombrello et al.,2012).

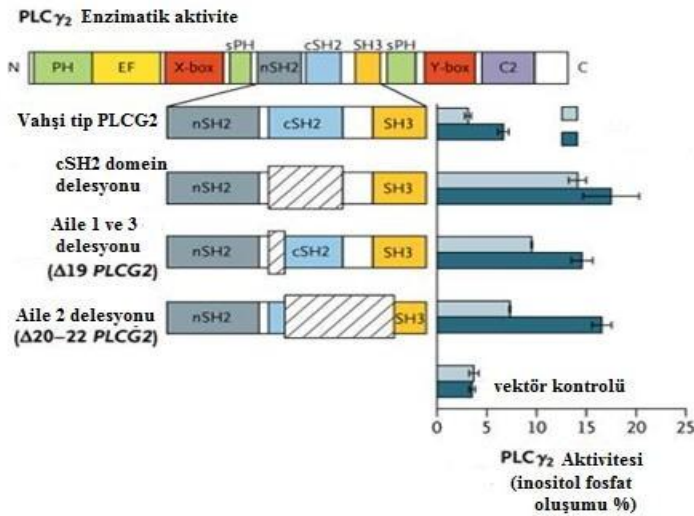
Tablo 3.1. Allelik varyantlar.

Numara	Fenotip	mutasyon	dbSNP	exac	ClinVar
0,0001	AİLE SOĞUK OTOİNFLAMATORY SENDROMU 3	PLCG2, 5,9-KB DEL	-	-	[ RCV000022952 ]
0,0002	AİLE SOĞUK OTOİNFLAMATORY SENDROMU 3	PLCG2, 8,2-KB DEL	-	-	[ RCV000022953 ]
0,0003	AİLE SOĞUK OTOİNFLAMATORY SENDROMU 3	PLCG2, 4,8-KB DEL	-	-	[ RCV000022954 ]
0,0004	OTOMİNFLAMASYON, ANTİKOR BOZUKLUK VE İMMÜNSİZ DİZÜSTÜŞÜ, PLCG2-ASSOCIATED	PLCG2, SER707TYR	[rs397514562 ]	-	[ RCV000032898 ]

3. PLCG2, 4.8-KB DEL. PLCG2 geninde oto-inhibitör olan, normal yapısal enzim fonksiyonunu önleyen C-terminal Src-homoloji-2 (cSH2) domeninin silinmesi ile sonuçlanan heterozigos 4.8-kb delesyonu tanımlanmıştır (Tablo 3.1, Şekil 3.1) (Ombrello et al., 2012).

### 3.2 PLCG2-İlişkili Antikor Eksikliği, Otoinflamasyon ve İmmün Disregülasyon

PLCG2 geninde (600220.0001 - 600220.0003) 3 farklı heterozigot intragenik delesyonu tanımlanmış ve mutasyonlar, bağlanma analizi ve ardından gen dizilemesi ile bulunmuştur. 6 delesyon ara noktasından 5'i tekrarlayan elemanlar içinde meydana gelmiştir. 3 delesyonun her biri, C-terminal Src-homoloji-2 (cSH2) domeni ni kapsamakta olup, oto-inhibitördür. Normal olarak yapısal enzim fonksiyonunu önler. COS-7 hücrelerinin tam alandan yoksun olduğu PLCG2 yapıları, ekzon 19'un delesyonu veya ekzon 20-22'nin delesyonu, vahşi tipe karşılaştırıldığında artan bazal ve Rac ile aktive edilmiş fosfolipaz aktivitesi ile sonuçlanmıştır (Şekil 3.2). Distal sinyalizasyon ve PLCG2'ye bağlı fonksiyonlar, fizyolojik sıcaklıklarda hasta immün hücrelerinde azalmış ve alt akış fonksiyonunun paradoksik kaybı, negatif geri besleme ile kronik sinyalmeden kaynaklanmış olabilir. Hasta B hücreleri ve doğal öldürücü hücreler, her ikisi de hücre yüzeylerinde reseptör aktivasyonuna yanıt olarak kusurlu kalsiyum akışı göstermiştir. Mutant PLCG2'nin mast hücreleri içine transfeksiyonu 20 santigrat derecede spontan degranülasyona yol açmıştır.



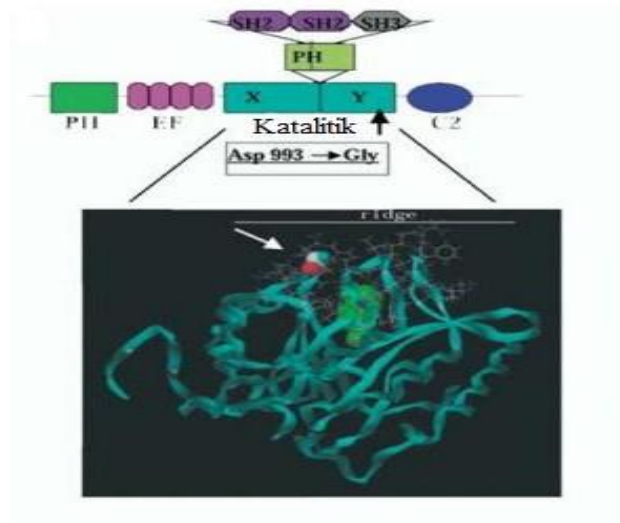
Şekil 3.2. PLC $\gamma$ 2 enzimatik aktivitesi.

Mutant B hücrelerinde kusurlu reseptör sinyallemesinin sıcaklığa bağlı olduğunu, antikor eksikliği ve anormal aktivasyona ve sınıf değiştirmeye ve merkezi toleransın bozulmasına neden olduğunu göstermiştir. Subfizyolojik sıcaklıklarda mast hücrelerinin artmış aktivasyonu soğuk ürtikerden sorumlu olmuştur (Ombrello et al.,2012).

### 3.3 PLCG2 Gen Mutasyonu

PLCG2’de germinin delesyonu ve nokta mutasyonları karmaşık bağışıklık bozukluklarına ve insanlarda otoinflamatuvar hastalığa neden olur (Ombrello et al., 2012; Zhou et al., 2012). Benzer şekilde farelerde iki Plcg2 mutasyonu (Ali5, D993G; Ali14, Y495C) ciddi otoinflamasyon ve antikor eksikliklerine yol açmaktadır (Yu et al., 2005; Abe et al., 2011; Everett et al., 2009).

PLC $\gamma$ 2Ali5’te mutasyona uğramış aspartik asit kalıntısı geniş membran etkileşimlerini önleyerek PLC aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği öne sürülen PLC $\gamma$ 2’nin aktif alan açıklığını çevreleyen bir “çıkıntı” olarak tanımlanan katalitik domenin bölgesinde bulunur (Şekil 3.3) (Ellis et al., 1998) . Ökaryotik plazma zarlarının iç kısmının negatif yüklü olduğunu not etmek ilginçtir. Bu nedenle molekülün bu önemli bölgesinde D993G mutasyonu tarafından negatif bir yük kaybı Plc $\gamma$ 2Ali5’in membrandan itilmesini azaltabilir (Yu et al., 2005).



Şekil 3.3. Plcg2 ekspresyonu, Mutant Plc $\gamma$ 2’nin membran lokalizasyonu.

Murin Plc $\gamma$ 2'nin katalitik domenlerinin (X ve Y) fare Plc $\gamma$ 1 kristal yapısına (Essen et al., 1996) dayanarak Plc $\gamma$ 2 ve şerit diyagramı modelinin etki domeni yapısı. Aktif merkezi çevreleyen üç döngü substratı (yeşil) içeren sitoplazmik zarın iç tarafına doğru uzanır. Membranı işaret eden bir çıkıntı oluşturulmuştur. Asp993 ile gly993 mutasyonunun pozisyonu küreler (ok) ile tasvir edilmiştir.

Fosfoinositide spesifik fosfolipaz C (PLC) çeşitli hücre fonksiyonlarını içeren bir sinyal iletim efektörüdür. PLC plazma membranının bir bileşeni olan fosfatidilinositol 4,5 – trifosfat hidrolize ederek ikinci haberci moleküller inositol 1,4,5 – trifosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) üretmektedir. DAG plazma zarında kalmaktadır ve IP3 endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınımını uyarırken protein kinaz C'yi aktive etmektedir. DAG ve IP3 alt akış hücre-içi hedeflere hormonlar, nörotransmitterler, antijenler ve büyüme faktörlerinin yüksek düzeyde spesifik reseptörlerin gelen sinyallerinin iletimine aracılık etmektedir. Bu nedenle hücre hareketliliği, döllenme ve bağışıklık gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesine katkıda bulunurlar. PLC enzimleri 6 farklı alt tipe ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , and  $\zeta$ ) ait 13 izozimden oluşmaktadır. Fosfolipazlar C $\gamma$ 1 ve C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 1 ve PLC $\gamma$ 2) PLC $\gamma$  alt tipleri olarak tanımlanmıştır. PLC $\gamma$ 2 en çok dalak ve lenf düğümü gibi hematopoetik organlarda eksprese edilir ve bağışıklık sisteminin kurulmasında anahtar rol oynamaktadır. İnsan B hücrelerinde PLC $\gamma$ 2 sinyalinin kaybı X'e bağlı agamaglobülinemi olarak adlandırılan bir immün yetmezlik sendromu ile sonuçlanmaktadır (Abe et al., 2011).

APLAID ile ilişkili p.Ser707Tyr mutasyonu art arda hücre içi IP3 üretimine ve hücre içi Ca<sup>2+</sup> salınımının artmasına neden olan bir çift oto- inhibitör SH2 domeni çiftinin korunmuş C-terminal kopyasını bozar (Chae et al., 2014).

Tekrarlayan / hotspot PLCG2 mutasyonları ilk ibrutinib başlatılmasının ardından 35.1 aylık bir medyan meydana gelen, 36 hasta (% 9.7) içinde 57 farklı mutasyonlar dahildir; non-hotspot PLCG2 mutasyonları nadirdir (her biri bir kez tespit edilen 7 farklı varyant).

İnsan PLCG2'deki S707Y varyantı patolojik otoimmüniteye neden olan kalıtsal bir mutasyon olarak belgelenecek oto-inhibitör domeninin SH2

lokuslarındaki sapmaların PLC $\gamma$ 2'nin enzimatik aktivitesini güçlendirebileceğini düşündürmektedir. R665W ve S707Y'nin aynı bölgede barındırıldığı göz önüne alındığında benzer bir kabiliyet varsayılmıştır (Liu et al., 2015).

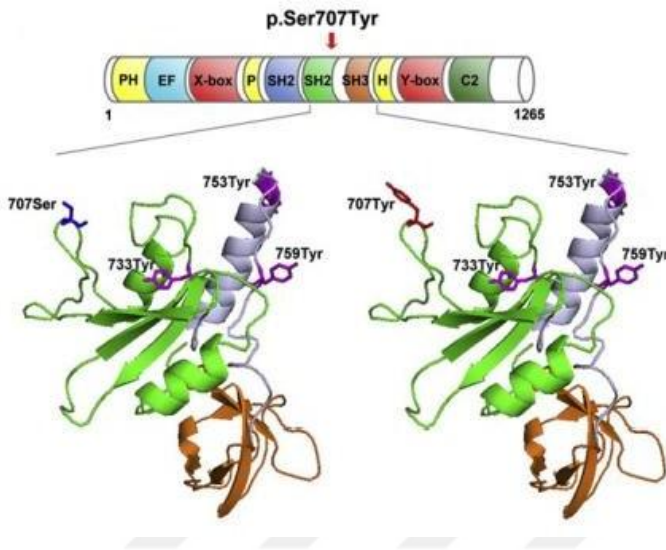
Fosfolipaz C- $\gamma$ 2'yi (PLC $\gamma$ 2) kodlayan gendeki mutasyonlar Bruton tirozin kinaz inhibitörü ibrutinib ile kronik lenfositik lösemi (CLL) 'nin hedefli tedavisine dirençliliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PLC $\gamma$ 2 üzerine B hücresi antijen reseptörü (BCR) bağlanmasından sonra sitosolik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunda 2-3 misli ibrutinib duyarsız bir artış kazandırdığı bu mutasyonların ikisi R665W ve L845F iki mutant yapısal olarak arttırılmış esas aktivite göstermiştir. İki PLC $\gamma$ 2 mutantının Rac2 tarafından aktivasyona karşı aşırı duyarlı olduğunu ve böylece vahşi tip Rac2'nin bile mutant enzimlerin bozulmamış hücrelere girmesi üzerine aktive olmaya yettiğini göstermektedir. Sağlam hücrelerde PLC $\gamma$ 2 'nin arttırılmış "bazal" aktivitesi yapısal olarak arttırılmış PLC $\gamma$ 2 aktivitesinden ziyade Rac tarafından uyarılan Rac direncine aracılık eden farmakolojik Rac inhibitörü EHT 1864 ve PLC $\gamma$ 2 F897Q mutasyonu gösterilmiştir (Walliser et al., 2016).

Vahşi tip PLC $\gamma$ 2'nin yapısal olarak aktif Rac2 tarafından uyarıcılara karşı R665W ve L845F mutantlarının duyarlılıklarını belirlemek ve karşılaştırmak için PLC  $\gamma$ 2 izozimleri artan miktarlarda Rac2G12V ile birlikte eksprese edilmiştir. Artan miktarda Rac2G12V'ye yanıt olarak inositolfosfat oluşumunda çarpıcı artışlar olduğunu göstermektedir. Rac2G12V etkinliğinde maksimum artış PLC $\gamma$ 2 R665W ve PLC  $\gamma$ 2L845F için sırasıyla 6.7 ve 35 kat olmaktadır. İki noktalı mutasyonun PLC $\gamma$ 2 R665W ve PLC  $\gamma$ 2L845F için sırasıyla 4.5 ve 6.5 kat olan Rac2G12V 'nin potansiyelinde bir artışa neden olduğunu sürekli olarak gözlemlenmiştir.

### **3.4 p.Ser707Tyr Bilgisi**

p.Ser707Tyr, Tyr733'ün içinde bulunduğu bilinen üç fosforilasyon bölgesine yakındır ve aynı cSH2 domeni, Tyr753 ve Tyr759'un her ikisi de cSH2 domeninin yanında bulunan bir bağlayıcı bölgede yer alır. Aynı zamanda p.Ser707Tyr süstitüsyonunun PLCG2'de yeni bir fosforilasyon bölgesi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Ekstra fosforilasyon bölgesi daha kolay ve verimli bir şekilde indüklenebilir bir PLCG2 formu üretebilir. PolyPhen-2 ve SIFT ile yapılan hesaplamaların esaslı tahminlerine dayanarak, bu varyantın p.Ser707Tyr süstitüsyonunun oynayacağı, PLCG2'nin daha fazla moleküler ve yapısal analizini gerektirdiği rolün kesin olmasına rağmen protein fonksiyonunu etkilemesi muhtemeldir. Verilmiş bu bilgi ve özelliğin baskın kalıtı, p.Ser707Tyr süstitüsyonunun PLCG2 sinyal yollarında artırılmış bir fonksiyon sağlamaktadır (Zhou et al.,2012).

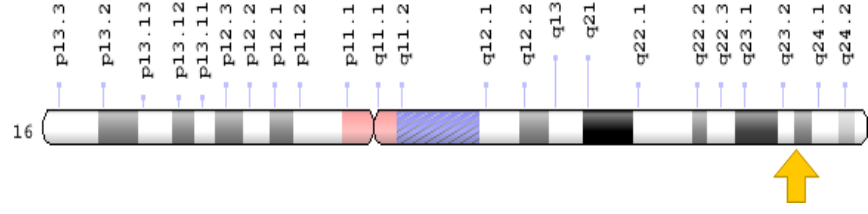


Şekil 3.4. PLCG2'nin şematik görünümü ve SWISS modelinin homoloji modellemesi. Üst panel, PLCG2'nin şematik gösterimini ve p.Ser707Tyr ikamesinin yeri göstermektedir. Alt panel, SWISS Modeline göre homoloji modellemesi kullanılarak PLCG2 cSH2 domeni (yeşil) ve SH3 domeni (turuncu) üç boyutlu bir yapısal model göstermektedir. Ser 707'nin (mavi) Tyr (kırmızı) ile değiştirilmesi cSH2 domeniinde bulunuyor. Bilindik üç fosforilasyon yeri macentadagösterilmiştir; Tyr733 cSH2 domeniinde, Tyr753 ve Tyr759 ise bağlayıcı bölgede (mavi gri) cSH2 domeni ve SH3 domeni arasında bulunuyor (Zhou et al.,2012).

Alt panel, SWISS Modeline göre homoloji modellemesi kullanılarak PLCG2 cSH2 domeni (yeşil) ve SH3 domeni (turuncu) üç boyutlu bir yapısal model göstermektedir. Ser 707'nin (mavi) Tyr (kırmızı) ile değiştirilmesi cSH2 domeniinde bulunuyor. Bilindik üç fosforilasyon yeri macentadagösterilmiştir; Tyr733 cSH2 domeniinde, Tyr753 ve Tyr759 ise bağlayıcı bölgede (mavi gri) cSH2 domeni ve SH3 domeni arasında bulunuyor (Zhou et al.,2012).

### 3.5 PLCG2 Geninin Kromozomal Lokasyonu

Sitogenetik lokasyonu: kromozom 16'nın 23.3 pozisyonundaki uzun(q) kolu olan 16q23.3.



Şekil 3.5. PLCG2 geninin sitogenetik diyagramı.

Molekülerlokasyonu:kromozom16üzerinde81,779,258ila81,962,693 numaralı baz çiftleri.

#### **4. AİLESEL SOĞUK OTOİNFLAMATUVAR SENDROM-4 (FCAS4)**

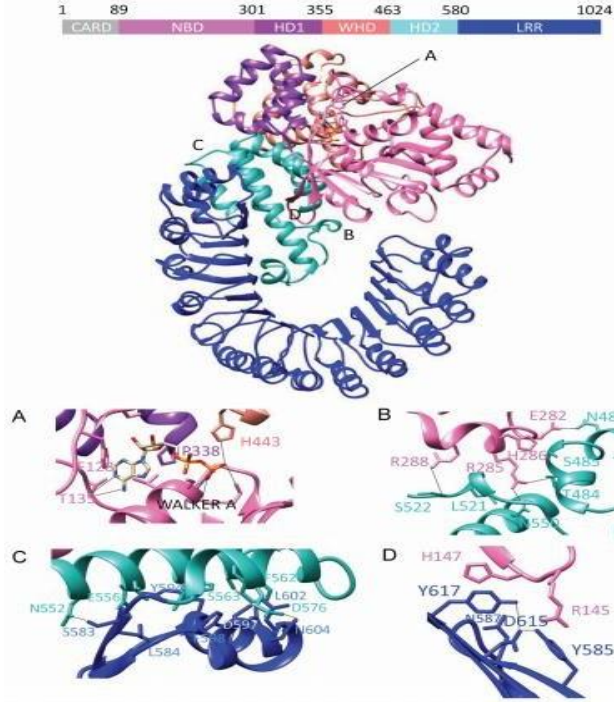
Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom-4 (FCAS4), kromozom 2p22 üzerindeki NLRC4 genindeki heterozigot mutasyondan kaynaklanır. Bu gendeki mutasyonlar, infantil enterokolit ile otoinflamasyona neden olur. Artralji, miyaljiler, ateş ve üşüme, ekstremitte şişmesi ve konjunktivit genel olarak soğuğa maruz kaldıktan sonra tekrarlayan makülopapüler döküntü olayları ile karakterize nadir otozomal dominant sistemik bir hastalık şeklindedir.

İnfantil enterokolit ile otoinflamasyon (AIFEC) diye de bilinen FCAS4, yenidoğan başlangıçlı enterokolit, periyodik ateş ve ölümcül otoinflamasyon atakları ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Etkilenen bireyler bebeklik döneminde genel büyüme ve gastrointestinal semptomlar, splenomegali ile tekrarlayan ateşli nöbetler ve bazen de hematolojik rahatsızlıklar, eklem ağrıları veya miyaljilere sahip olma eğilimindedir.

##### **4.1 NLR Family CARD Domain Containing 4 ( NLRC4) Gen**

IPAF, CARD12 veya CLAN olarak da bilinen NLRC4 2001'de rapor edilmiştir. Pro-kaspaz-1 ile etkileşime girdiği, kaspaz-1 proteolizi ve 293T hücrelerinde kaspaz-1 bağımlı hücre ölümünü indüklediği görülmüştür.

NLRC4 sitozolde inaktif bir formda bulunuyor. NLRC4, apoptoz, Apaf-1 ve CED-4'te yer alan moleküllerle birlikte çok sayıda domain içeren (STAND) AAA adenosin trifosfataz ailesine aittir. N-terminal CARD domenine sahip olmayan fare NLRC4 yapısı 2013'te belirlenmiştir ve NBD, HD1, WHD'den oluşan bir NOD modülü ortaya çıkmıştır. NOD modülü HD2 ve LRR tarafından izlenilmektedir ve bu yapı NLRC4'ü inaktif bir formda temsil ederek tersine çevrilmiş bir soru işareti şekline sahip olmaktadır (Şekil 4.1).



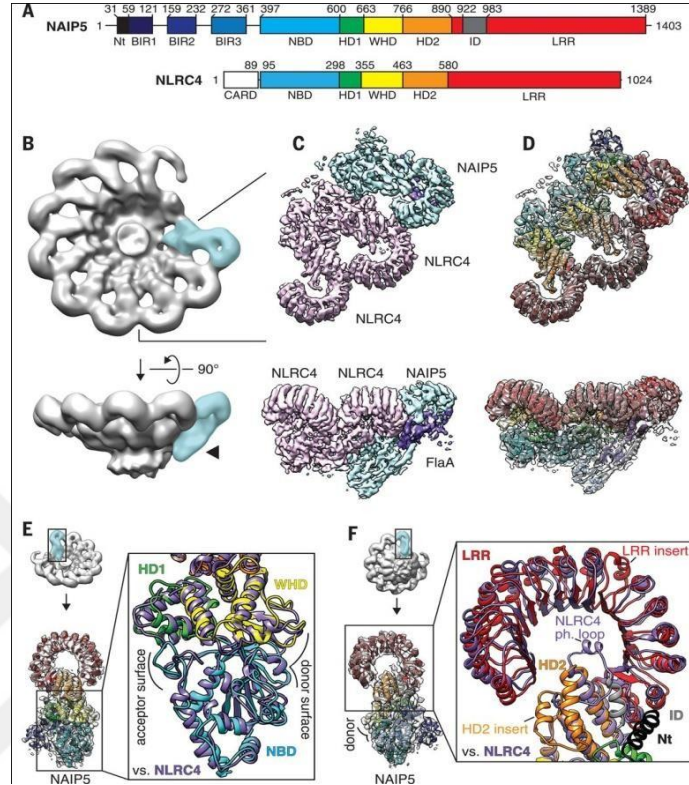
Şekil 4.1. Çoklu etkileşimler NLRC4'ü inaktif formda stabilize eder. A) NLRC4'ün şematik gösterimi ve CARD domeni olmayan NLRC4'ün yapısı. Hidrojen bağları ve tuzlu köprüler kesikli çizgiler olarak gösterilmiştir. Aktif olmayan yapıyı stabilize eden etkileşimler: A) ADP ve NBD arasındaki ağırlıklı olarak H-bağları (NBD'den Walker A, Thr135 ve WHD'den H438) arasındaki etkileşimler. B) HD2 kalıntıları, NLRC4'ün ve STAND ailesinin diğer üyelerinin oligomerizasyonu için kritik olan a8 NBD ile temaslara sahiptir; C) HD2 ve LRR'nin N-ucu arasındaki kapsamlı etkileşimler; D) N-terminal LRR ve NBD arasındaki etkileşimler (Y617- H147 ve Y585- R 145, LRR domenindeki hidrojen bağının aracılık ettiği). (Hafner-Bratkovič- Inflammasome 2017)

ADP, NLRC4'ün aktif olmayan formunun stabilizasyonu için kritik görünüyor, çünkü birkaç H-bonusu ile NBD'den Walker A motifi ve Thr135 ile etkileşime girmektedir. ADP ayrıca WHD'den His438 ile de etkileşime girmektedir (Şekil4.1.A) ve hatta HD2, NBD'nin a8'i (Şekil4.1.B) ve LRR domeninin N-terminal kısmı (Şekil4.1.C) ile etkileşime girmesine ek olarak aktif olmayan formu stabilize etmektedir. LRR domeni, ADP ile etkileşime girmez, fakat NOD ile bir  $\beta$  hairpin aracılığıyla etkileşimler yoluyla bir çözücünden oklüzyon yapmaktadır(Şekil4.1.D).

## 4.2 NLRC4 Gen İnflamasyonu ve Apoptozom

NLRC4 geni kaspaz alım domenini içeren NLR ailesinin bir üyesini kodlar. Aile üyeleri, çok çeşitli patojenik organizmalara, doku hasarına, diğer hücrel streslere karşı doğal immün cevapta önemli rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar, infantil enterokolit ile otoinflamasyona neden olur ve alternatif ekleme çoklu transkript varyantlarına yol açar. Tüm memeli NLR'ler gibi NAIP5 ve NLRC4 iki korunmuş bir nükleotid bağlayıcı domeni (NBD), sarmal domeni 1 (HD1), kanatlı helis domeni (WHD), sarmal domeni 2 (HD2) ve lösün açısından zengin tekrar domeni (LRR) içerir (Şekil 4.2A). Ek olarak NLRC4 fakat NAIP5 bilinmeyen fonksiyona sahip üç baculovirüs apoptoz tekrar inhibitörü (BIR) domeni içeren kaspaz-1'i toplayan bir CARD içerir. *Legionella pneumophila* flagelline (FlaA) bağlı NAIP5-NLRC4 enflamasomun yapısını belirlemek için kriyo-EM kullanılmıştır (Şekil 4.2B). Üç boyutlu rekonstrüksiyonları tek bir FlaA monomerine (Şekil 4.2B, mor) kolayca bağlanmış hacimli BIR domeni (Şekil 4.2B, ok başı) ile kolayca tanımlanan tek bir NAIP5 alt birimi (Şekil 4.2B, mavi) içeren düzenekleri ortaya koymaktadır. Oligomerin tek bir NAIP ile çekirdeklenmesi daha sonra değişken sayıda NLRC4 alt birimi ile birleşmektedir. Tek NAIP5'i ve bitişik NLRC4 alt birimlerinden ikisini (Şekil 4.2C ve D) içeren enflamasomlu bölgeye odaklanarak genel olarak  $5,2 \text{ \AA}$  çözünürlüğe sahip bir yeniden yapılanma sağlanmıştır. NAIP5 esas olarak hidrofobik kalıntılardan (Şekil 1E ve Şekil S5A) oluşan WHD ve NBD'nin katkıda bulunduğu bir oligomerizasyon "donör" yüzeyi ile NLRC4 ile temas eder. NLRC4'ün ortak "alıcı" yüzeyi tamamlayıcı asidik ve hidrofobik kalıntılardan oluşur. NLRC4 alıcı yüzeyindeki çoklu kalıntılar NLRC4'ün NAIP5'e bağlanması için gereklidir. Bu kalıntıların çoğu özellikle I124 ve D125 NLRC4'ün komşu NLRC4'ü bağlaması için de gereklidir. İki bitişik NLRC4 molekülünün konformasyonları simetri yüklenmemiş olsa bile aynıdır. NAIP-NLRC4 enflamasomunun önceki ortalama rekonstrüksiyonlarının ve apoptozomlar gibi ilişki komplekslerin yapılarının aksine kapalı gibi görünen önemli sayıda halka gözlemlenmiştir (Şekil 4.2B). Halka kapanma eksikliği NAIP5'teki donör yüzeyinin NLRC4 üzerindeki konjuge alıcı yüzeyini toplaması ve aktive etmesine rağmen, NLRC4'teki donör yüzeyinin sadece ilave NLRC4 protomerleri ile etkileşime girebilmesi ve halkayı bir etkileşime girerek kapatamaması gibi NAIP5 akseptör yüzeyi ile tutarlıdır.

NAIP5 ve NLRC4 arasındaki yapısal homoloji oligomerizasyona aracılık eden bölgelerde yüksek olsa da (Şekil 4.2E), NAIP5 ve NLRC4'ün bazı bölgeleri özellikle HD2 ve LRR (Şekil 4.2F) nispeten farklıdır (Tenthorey et al., 2017).



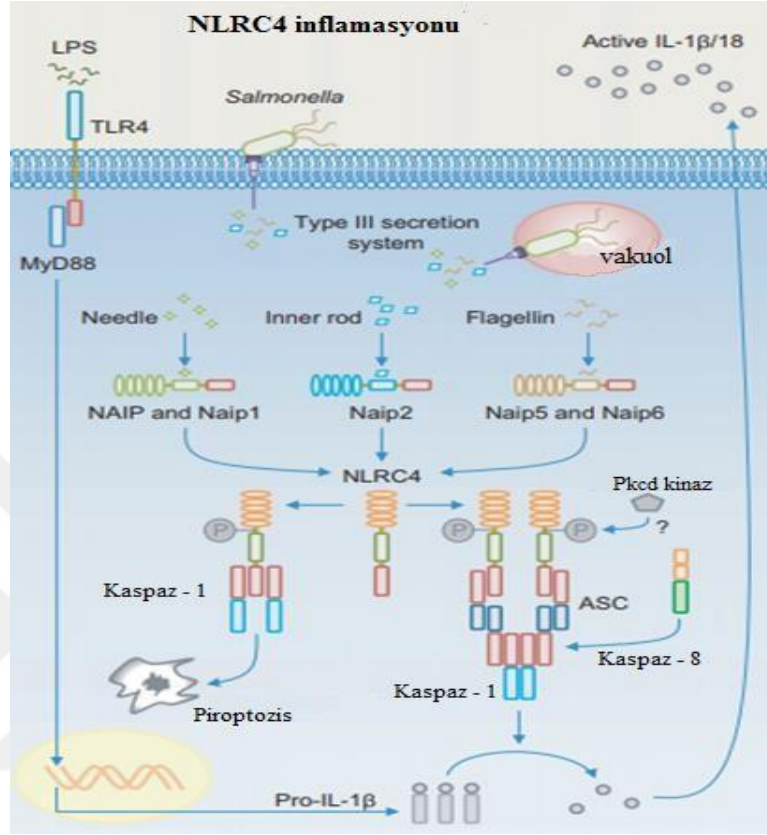
Şekil 4.2. NAIP5-NLRC4 inflamasyon.

(A) NAIP5 ve NLRC4 için domein mimarisinin şeması. (B) Tek bir NAIP5-FlaA (mavi) ve dokuz NLRC4 protomeri (gri) içeren iltihaplanmaların 3D rekonstrüksiyonu. Ok ucu NAIP5 protomerini tanımlayan ekstra yoğunluğu vurgular. (C) NAIP5 ve daha yüksek çözünürlükteki ilk iki NLRC4 protomeri için Rafine 3D rekonstrüksiyonu (NAIP5 mavi, pembe iki NLRC4 protomeri ve mor olarak FlaA). (D) Tümü (A)'da olduğu gibi domeinler tarafından renklendirilmiş olan NAIP5 ve iki NLRC4 protomerinin modellendirilmiş yapıları EM haritasına yerleştirilmiştir. (B) ile (D) 'de iki ortogonal görünüm gösterilmiştir. (E ve F) NAIP5'in yapısı ((A)'da olduğu gibi renkli) bir NLRC4 protomerin (mor) ile aynı hizadadır.

(E) NAIP5 ve NLRC4'ün NBD, HD1 ve WHD oligomerizasyon bölgeleri oldukça benzerdir. Oligomerizasyon donörü ve alıcı yüzeyleri (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015) gösterilir. Net olması için NAIP5 BIR etki domeini iç görünümünden çıkarılmıştır (sağda). (F) NAIP5'in HD2 ve LRR'si NLRC4'ün HD2 ve LRR'sinden ayrılır. NLRC4 S533 fosforilasyon döngüsü NAIP5'te iki alfa helezonu ile değiştirilir (HD2 eki; 818 ila 851) (Tenthorey et al., 2017).

NAIP üyeleri (NLR ailesi, apoptoz inhibitörü protein) ailesi daha sonra NLRC4 inflamasyonunun yukarı akış sensörleri olarak tanımlandı. Sadece bir fonksiyonel NAIP insan genomunda kodlanmıştır. NAIP, Tip III salgılama sisteminin iğne proteinini *S. Typhimurium*'dan ve *Chromobacterium violaceum* (CprI), *S. flexneri* (MxiH), *P. aeruginosa* (PscF), *B. thailandensis* (BsaL), and enterohaemorrhagic *E. Coli* (EprI)'de bulunan homolog iğne alt birimlerinden tanır. Flagellini ve bakteriyel sekresyon sistemlerinin bileşenlerini tanıyabilme yeteneği NLRC4 inflamasyonunun *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *C. rodentium*, *L. pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia*, and *C. albicans* da dahil olmak üzere bir dizi patojene konak savunması sağlamasını sağlar. Bazı durumlarda NLRC4 inflamasyonunun yol açtığı aşırı inflamasyonun bakteriyel enfeksiyona cevabı konakçı için zararlıdır. NLRC4, ASC yokluğunda kaspaz-1'in CARD'ı ile doğrudan etkileşime girebilen bir CARD içerir ve bu etkileşim NLRC4'ün neden ASC'den bağımsız olarak proptozu indükleyebildiğini açıklayabilir. Hatta, ASC IL-1 $\beta$ 'nin proteolitik bölünmesi için kaspaz-1'i toplayan büyük bir benek halinde toplanarak hücrede NLRC4 aracılı IL-1 $\beta$  ve IL-1 $\beta$  salınımını güçlendirmeye hizmet etmektedir. *S. Typhimurium* ile enfekte makrofajlarda endojen ASC, leke merkezinde kaspaz-1 ile NLRC4'ün bir iç halkasını çevreleyen bir dış çekirdek oluştururken, NLRC4 inflamasyonu *S. Typhimurium* ile makrofajların enfeksiyonu üzerine kaspaz-8 dahil olmak üzere komplekste çoklu efektör proteinler toplar. Kaspaz-8'in hücre ölümü fonksiyonlarını uyardığı ve NLRP3 ve pro-IL1 $\beta$  ekspresyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir. Ek olarak kaspaz-7, *L. pneumophila* içeren vakuoller ile lizozom füzyonunu kolaylaştırmak NLRC4 inflamasyonunun aşağı yönünde aktive edilir. *S. Typhimurium* enfeksiyonuna cevabında NLRC4 inflamasyon düzenineğinin indüksiyonu NBD ve NLRC4'ün C- terminal LRR domeini arasında bulunan tek evrimsel olarak korunan kalıntının Ser533'ün fosforilasyonunu indükleyen Pkd

kinaz gerektirir. Hatta Pkcd kinazın Salmonella veya Shigella enfeksiyonuna cevabında NLRC4 inflamasonu aktivasyonu için vazgeçilmez olduğu savunulmaktadır (Man et al., 2015).



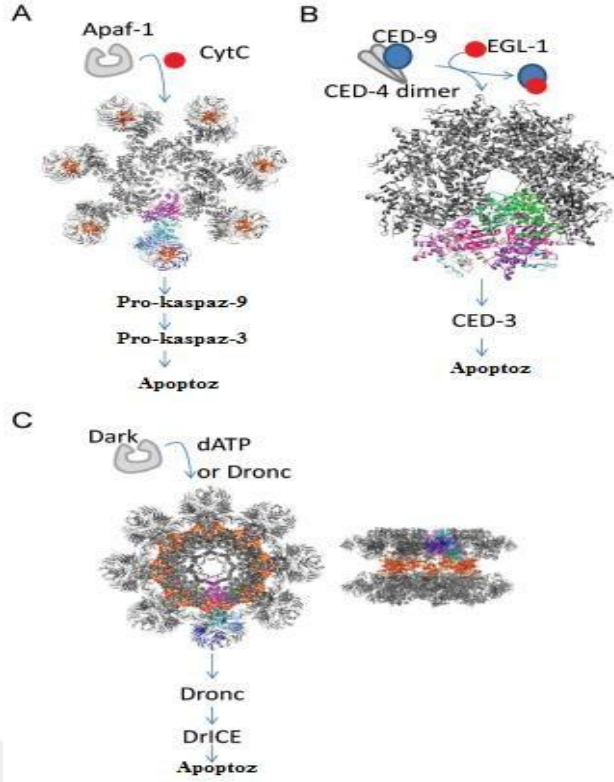
Şekil 4.3. NAIP-NLRC4 inflamasyonunun aktivasyonu.

Toll benzeri reseptörler (örneğin TLR4), pro-IL-1β'nin MyD88 ve NF-κB yoluyla üretilmesine aracılık eder. Bazı patojenik bakteriler, konakçı hücre fonksiyonlarını alt etmek için efektör proteinleri iletmek üzere Tip III salgılama sistemini (T3SS), (örneğin, Salmonella enterica serovar Typhimurium, Salmonella Patojenite Adası-1 veya SPI-1-T3SS) kullanır (Man et al., 2015).

İnflamasonların temel bileşeni dolaylı patojenik bakteriler ve mantarlar ile ilgili spesifik proteinlerin, kaspaz-1 aktivasyonu, sitokin üretimi ve makrofaj piroptosisini destekleyen bir inflamason kompleksine yanıt verip vermediğini algılar. NLRC4 inflamasyonu bir dizi hücre içi bakteriye karşı doğal immün yanıtın bir parçası olarak aktive edilir.

Disk benzeri görünümünde NLRC4 inflammasomları apoptozomlara benzer. Apaf-1 (Şekil4.4A), CED-4 (Şekil4.4B) ve Dark (Şekil4.4C) ayrıca STAND sınıf ATPas sınıfının üyeleridir ve NLRC4 olarak N- terminal CARD domenini, NOD modülünü (NBD, HD1 ve WHD) ve HD2 etki domeni içerir. Apaf-1 ve Dark ayrıca C-terminali içerir. Apaf-1 ve Dark ayrıca C-terminali içeren WD40 iki  $\beta$  pervaneli, WD1 ve WD2'yi tekrarlar. Memeli heptamerik Apaf-1 apoptozom, mitokondriden sitokrom c salımı üzerine monte edilir. Sitokrom c, Apaf-1'in otomatik olarak inhibe olan monomerik formunu kararsız hale getiren, ATP veya dATP ve oligomerizasyon için ADP'nin maruz kalmasına ve yer değiştirmesine yol açan iki  $\beta$ -pervane bölgesi arasında bağlanır. (Şekil4.4A). Apaf-1 platformunun temel işlevi, efektör kaspazlar-3 ve 7'yi daha da aktive eden prokaspaz-9'u öncü kaspazın aktif hale getirilmesidir (Şekil4.4A). *Caenorhabditis* CED-4 apoptozom düzeneği ve öncü kaspaz CED-3'ün aktivasyonu üç sıralı adımda ilerliyor (Şekil4.4B). İskele proteini CED-4, aktif olmayan bir dimer olarak stabilize edilmiş CED-9 monomeri tarafından mevcut edilmiştir. Hücre ölümü uyarıcıları CED-9'u bağlayan ve CED-9'un CED-4 dimerlerinden ayrışmasına neden olan, kaspaz CED-3'ü aktive edebilen CED-4 apoptozom içinde oligomerize olmalarını sağlayan EGL-1 aktivasyonunu indükler (Şekil4.4B). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sadece iki CED-3 molekülünün oktamerik CED-4 halkasına kaspaz ve CARD domenleri aracılığıyla bağlandığını ve bir holoenzim olarak işlev görerek bağlı kaldığını göstermektedir.

Her ne kadar *Drosophila melanogaster* apoptozom adaptörü Dark, Apaf-1 ile aynı domen yapısına sahip olsa da Dark oligomerizasyonuna yol açan mekanizma oldukça farklı görünmektedir (Şekil C). Bu apoptoz substratı Drice'yi ayıran ve parçalayan Dronc'un etkin aktivasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Şekil C) (Hafner-Bratkovič Inflammasome, 2017).



Şekil 4.4. Apoptozom düzeneğinin mekanizmaları ve aktivasyonu.

Modeller elektron mikroskopisinden elde edilen yapılara dayanmaktadır. A) Apaf-1(PDB: 3JBT), B) CED-4 (PDB: 3LQQ), C) Dark/DroncCARD (PDB: 3J9K). Dark/DroncCARD partikülünün yandan görünüşünün, iki halkanın mekansal düzenlemesini gösterdiği gösterilmiştir. DroncCARD molekülleri kırmızı renktedir. DarkCARD yeşil renktedir (Hafner-Bratkovič Inflammasome, 2017).

İnflamasomlar ve apoptozomlar kaspaz aktivite eden platformlardır. İskele proteinleri aynı yapısal süper aileye ait olsa da aktivasyon mekanizmaları çok farklıdır. En büyüleyici aktivatör/iskele protein oranındaki farktır. Apaf-1 ve Dark, onların aktivatörleri (Apaf-1 için sitokrom c ve Dark için DroncCARD) ile 1:1 kompleksi gibi aktifleştirilirler. NLRC4 inflammasom durumunda, bir NAIP ailesi üyesine bağlanan tek bir mikrobiyal molekül muazzam bir yanıtı tetikleyebilir. Bu, NLRC4 seviyesinde yükseltilmiş ve sonra her ikisinin de in vitro indüksiyon üzerine filamentler oluşturduğu pro-kaspaz-1 veya ASC seviyesinde muhtemelen daha da büyütülmesi ilktir. Sinyalin bu şekilde yükseltilmesi, etkili immüno-gözetimi mümkün kılarken, aynı zamanda enfeksiyon giderildikten

sonra immün yanıtın çözülmesiyle ilgili yeni sorular ortaya çıkar. NLRC4 inflamasyon aktivasyonu ile ilgili üstü açık sorular da kalmaktadır. Apoptozda öncü kaspazların aktivasyonu için farklı mekanizmalar da kullanılır. Bir subtoichiometric pro-kaspaz-9 molekülü Apaf-1 apoptozomuna bağlanarak bağlı kalır. Bu CED-3 için de geçerlidir, ama Dronc 1:1 oranında Dark'a bağlanır ve apoptozom parçacıklarından ayrışır. NLRC4 inflamasyon düzenindeki nükleotid değişiminin rolüdür. Apaf-1 apoptozom durumunda, aktif olmayan monomerdeki ADP apoptozomdaki ATP ile değiştirilir (Zhang et al., 2015).

### 4.3 P.Val341Ala Bilgisi

NLRC4 aktivitesi HEK293 hücrelerinde analiz edilmiştir (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan) ve yabancı tip insan NLRC4, pMycB'ye (Santa Cruz Biotechnology) klonlanarak Sanger sekanslaması ile doğrulanmıştır. Bölgeye yönelik mutagenез (Stratagene QuickChange) ile tanıtılan C.1022T → C mutasyonu Sanger sekanslaması ile doğrulanmıştır. Mutant ve vahşi tip Myc-NLRC4 için yapılar bir N-terminal Flag tag ve Lipofectamine2000 (Invitrogen) kullanılarak GFP-etiketli insan ASC'si ile HEK293 hücrelerine geçici olarak transfekte edilmiştir. NLRC4 aktivitesi transfekte edildikten 30 saat sonra görsel olarak GFP-ASC odaklarının (canlı hücrelerde epifloresan mikroskopisi ile görselleştirildiği şekilde) oluşumu ile ölçülmüştür. Procaspase-1 p45 otoproteolizi doğrudan p35 (anti-Flag M2 (F1804), Sigma; 1:1000 dilüsyon) ve p10 (kaspaz-1 p10 (sc-514), Santa Cruz Biotechnology; 200 seyreltme) fare IgG veya tavşan IgG'ye (Bio-Rad) HRP-konjuge sekonder antikor ve gelişmiş kemilüminesans kullanarak ölçülmüştür (Neil Romberget al., 2014). İnsan genetik çalışmaları NLRC4'teki fonksiyon kazancı mutasyonlarının otoinflamasyon ve enterokolit ile ilişkili olduğunu göstermektedir. NLRC4 HD1 domeni deneyimi tekrarlayan otoinflamasyon ve enterokolit içindeki bir p.Val341Ala ikame mutasyonu ile aynı ailenin birkaç üyesi gösterilmiştir. Bu aileden aynı mutasyonu olan bir yenidoğan şiddetli gastrointestinal komplikasyonlar, ateş ve sistemik inflamasyon geçirdi ve doğumdan 23 gün sonra ölmüştür.



V341A ve T337S hastalarında sağlıklı gönüllülere veya CAPS hastalarına kıyasla serum IL-18 düzeyleri çok yüksekti.Üç NLRC4 patolojik missense mutasyonunun tümü NOD modülünde bulunur (NLRC4ilk Şekil).T337 ve V341 HD1'de bulunur ve değiştirmeler HD1 /NBD etkileşimlerinin veya ADP bağlanmasının dengesizleşmesine yol açabilirdi.H443, WHD'de yerleşerek doğrudan ADP ile hidrojen bağları oluşturmaktadır (NLRC4ilk Şekil A).H443P mutasyonunun olması bekleniyor ADP bağlanmasını ve NOD modülündeki ana etkileşimleri dengesizleştirir.Otoinflamatuvar koşullarla ilişkili NLRP3 veya NOD2'de 100'den fazla mutasyon vardır.Yakın gelecekte daha fazla NLRC4 patolojik mutasyonunun tanımlanacağını öngörüyoruz.Yapılan bir çalışmada NOMID'li bir hastada NLRC4 geninin somatik mozaikliliğini de tanımladı. Bu hastada NLRP3 geninde kazançlı işlev mutasyonları veya NLRP 3'te somatik mozaikliği taşımadı ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden elde edilen hasta makrofajlarında mutasyona uğramış NLRC4'ün bozulması, inflamatuvar fenotipin bir NLRC4 T177A mutasyonundan kaynaklandığını doğrulamıştır. Yeni nesil dizilimin ve transkriptominin gelişmesiyle birlikte NLRC4'ün diğer inflamatuvar hastalıklarda rolünün tanımlanması muhtemel görünmüştür.Aktif sistemik başlangıçlı juvenil idiyopatik artritler ile hastalarda yüksek NLRC4 transkript seviyeleri gözlemlenmiştir.MAS hastalarında yüksek serum IL-

18 seviyeleri IL-18 hedeflemesinin bu hastalar için yararlı olabileceğini göstermektedir. Bir NLRC4 (V341A) –MAS hastasının bir vaka çalışması rhIL-18BP (IL-18'i bağlayan ve sinyallemesini bloke eden) rekombinant insan IL-18 bağlanma proteini üzerinde hızlı bir iyileşme bildirmiştir (Hafner-Bratkovič et al.,2017).

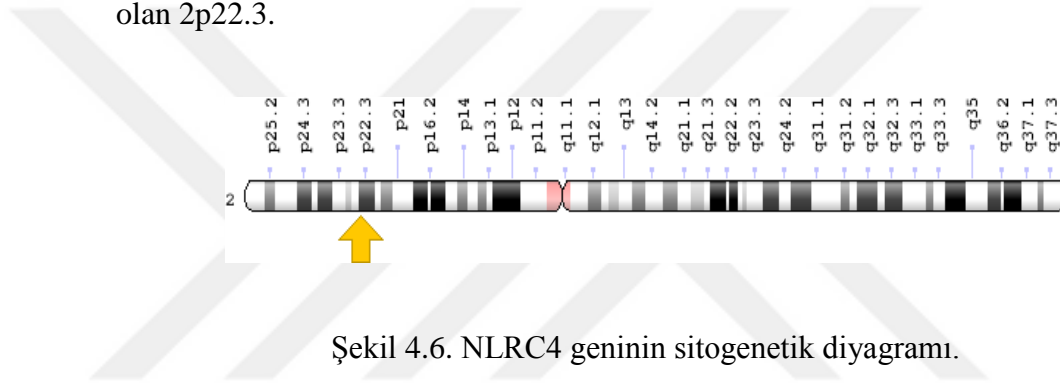
#### **4.5 NLRC4'te Olan İnsan Fonksiyon Kazancı Mutasyonları**

Her biri NLRC4 NBD ile ilişkili HD1 ve ya WHD etki domenlerinde tekli amino asit ikameleri (V341A, T337S ve H443P) ile sonuçlanan üç farklı hastalık-ilişkili mutasyon tanımlanmıştır.Mutasyonların NLRC4'ün kendisini otomatik olarak inhibe edilmiş bir durumda tutma kabiliyyetini bozduğu ve CASP1'in kendiliğinden aktivasyonu için artmış bir eğilime sahip bir NLRC4 proteini ile sonuçlandığı görülmektedir.NLRC4'teki heterozigoz fonksiyon kazancı

mutasyonlarının bazı durumlarda tolere edebileceği değişken klinik sonuçlar verebileceğini göstermektedir. Sendrom NLRC4-MAS (NLRC4 makrofaj aktivasyon sendromu) veya SCAN4 (NLRC4'te mutasyonla ilişkili enterokolit ve otoinflamasyon sendromu olarak adlandırılmıştır. NAIP/ NLRC4 inflamasyonu hematopoetik olmayan bağırsak epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve hastalardaki bazı hastalık semptomlarının bu hücrelerde NLRC4 aktivasyonundan kaynaklandığı tahmin edilmiştir.

#### 4.6 NLRC4 Geninin Kromozomal Lokasyonu

Sitogenetik Lokasyon: 22.3 pozisyonundaki kromozom 2'nin kısa (p) kolu olan 2p22.3.



Şekil 4.6. NLRC4 geninin sitogenetik diyagramı.

Moleküler Lokasyon: kromozom 2 üzerinde 32,224,449 ila 32,265,743 numaralı baz çiftleri.

## 5. MATERYAL VE METOD

### 5.1 DNA Eldesi

Hastalardan alınan EDTA'lı tüpteki 1ml periferik kandan 200  $\mu$ l alınarak genomik DNA elde edildi.



Şekil 5.1. EDTA'lı tüp.

DNA eldesi için IPrep™ PureLink® gDNA Kan Kiti genomik DNA'nın (gDNA) hızlı ve otomatik çıkarılmasını sağlamak üzere kullanıldı.



Şekil 5.2. IPrep™ PureLink® otomatik DNA izolasyon cihazı.

Bu yöntem için Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification (K1820-01) DNA izolasyon mini kiti kullanıldı.

PureLink® Genomik DNA Mini Kiti çok çeşitli örnek türlerinden yüksek verim, yüksek saflıkta genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonları sağlar.

PureLink® Genomic DNA Mini Kit'in özellikleri:

Kit esnekliği — bir kit çeşitli örnek tipleri ve boyutlarla çalışır

Ultraclean gDNA — DNA ürününün asgari düzeyde kirlenmesi, başarılı akış aşağı uygulama anlamına gelir

Geliştirilmiş tasarım - daha iyi verim ve saflık için optimize edilmiş döner kolon tasarımı ve tampon formülasyonu.



Şekil 5.3. Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (K1820-01).

Kit prospektüsüne göre DNA eldesi işlemleri yapıldı. Genomik DNA eldesinin aşamalarında kullanılan solüsyonların amaçları şu şekildedir:

Hücre lizis solüsyonu ile hücre zarının uzaklaştırılıp hücre içeriklerinin açığa çıkmasını, proteinaz K ile tüm hücresel ve nükleer histon proteinlerin ve RNA'nın uzaklaştırılmasını sağlar. Alkolle DNA'nın membranda presipitasyon basamağı ile yıkaması gerçekleştirilir. Membrana bağlama basamakları sonucunda alkol, protein ve membran lipid kontaminasyonlarından uzaklaştırılmış halde en son uygulanan Elution basamağında DNA'nın saf olarak eldesi sağlanır. Elution tampon çözeltisi ile membrana bağlı kalan nükleik asidin %85-100'ü elde edilir.

## 5.2 Hazırlama ve Prosedür

Thermo-Shaker 550C'ye ayarlanır.

Her hasta için 1,5 ml'lik ependorf, spin ve Columns tüpler hazırlanır. Hastaların isimleri tüplerin üzerine ve kapaklarına yazılır.

Etil alkol saf olması için yeni olarak hazırlanır. (%95>)

Steril bir ependorf tüpüne 200µl donmuş ya da taze kan örneği konur. Üzerine 20 µl Proteinaz-K eklenir.

20 µl Rnase A ekleyin ve vortekslenir, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.

200 µl Genomik/Lysis tamponundan eklenir ve homojen olana kadar vortekslenir.

Protein sindirimini hızlandırmak için 550C'de 30 dk. Thermo-Shaker inkübe edilir.

200 µl %96-100'lük etil alkol eklenir, 15 saniye kadar vortekslenir.

Ependorftaki lizattan collection tüplerine ~640 µl eklenir.

10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edin. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir. • 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilir.

10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edin. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.

500 µl Wash Buffer 2 ilave edilir.

3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Kolonları atın ve temiz tüpe yerleştirilir.

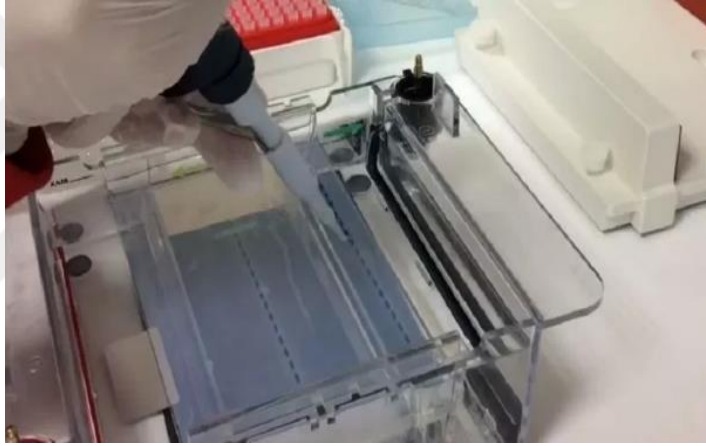
50-200  $\mu$ l (ort. 100  $\mu$ l) Elution Buffer eklenir, 5 dakika oda ısısında bekletilir.

Maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.

Elde edilen DNA toplama tüpünde birikmiştir, burdan mikropipetle ependorfa aktararak +4C'de ya da -200C'de saklanılarak, gerekirse dilüe edilerek kullanılır.

### 5.2.1 DNA'nın kontrol edilmesi

2  $\mu$ l (100 ng) DNA çözeltisi %1'lik agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı.



Şekil 5.4. Agaroz jelde elektroforez işlemi.

DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop Spektrofotometre cihazında 260/280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kontrolü tamamlanan DNA molekülleri, DNA sekans analizine başlamak üzere +40C'de saklandı.

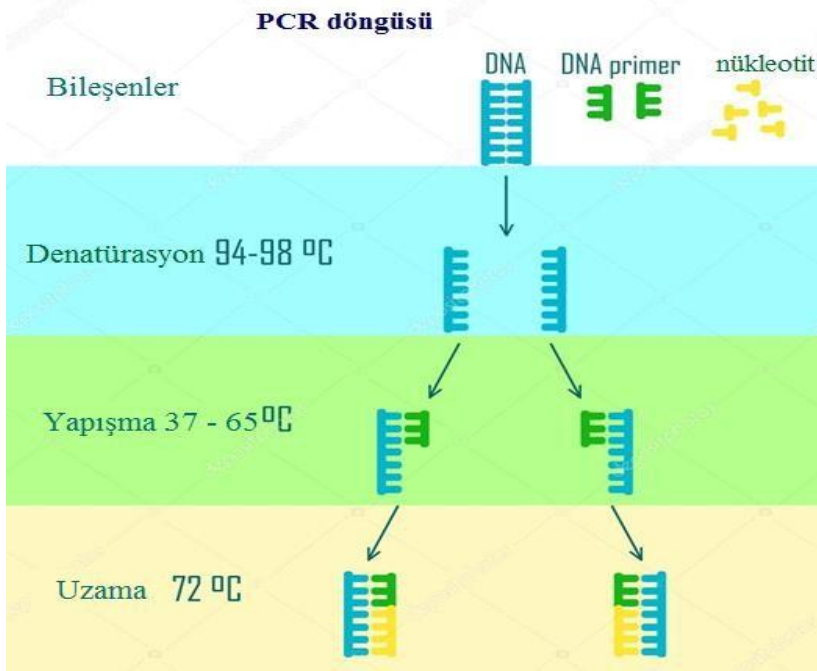
### 5.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR) DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan reaksiyonlara verilen ortak bir isimdir. PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkıyı Taq Polimeraz enziminin

bulunması yapmıştır ki bu da yüksek sıcaklıklara dahi dayanabilen tek enzimdir. Bu enzim ilk olarak Yellowstone milli parkında bir kaplıcada yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmiştir. Dr. Kary B. Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel Ödülü almıştır.

Yöntem basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94 °C-98 °C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37 °C-65 °C aralığında gerçekleştirilen yapışma (İng. annealing) ve 72 °C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (Bartlett et al., 2003).

Tablo 5.1. PCR döngüsü.



Bu tekrarlanışında iki primer arasında kalan üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık  $t \times 2^n$  sayısına ulaşır. Hedef sayısı, enzim, dNTP, primer konsantrasyonu ve çoğaltılan bölgenin birikmesi gibi

nedenlerle ürün miktarı formüldeki sayıya ulaşmaz.Fakat yinede milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır. (Mikael et al., 2006)

PCR işlemi için toplamda 25 µl olacak şekilde; içerisinde; 1µl genomic DNA, Gene Amp Gold Buffer (15 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/lKCl), 2.5 mmol MgCl<sub>2</sub> hazırlandı her birinden 50 µmol/l dGTP,dATP, dTTP ve dCTP, 5 pmol forward ve reverse primer ve 1.0U Ampli Taq Gold polimeraz eklendi. PCR reaksiyonu 1 ul (100 ng) genomik DNA, Enhancer Buffer (20 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)

2.5 uL, d NTP mix karışımı 0.5 uL (0.2 mM), forward primer 1 uL (10 pmol/ul), reverse primer 1 ul (10 pmol/ul) (Invitrogen) , 1.0 U PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), deiyonize su ile 25 uL total volüme tamamlanmıştır.



Şekil 5.5. MyGene Gradient Thermal Cycler cihazı.

MyGene Gradient Thermal Cycler cihazında gradient programında PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

## 5.4 DNA Dizileme

Cycle Sequencing PCR Big Dye Terminator v3.1 kiti kullanılarak ve her sekans bölgesine uygun reverse ya da forward primer kullanılarak kit 31 prospektüsünde yazılan protokole göre yapıldı. Elde edilen Cycle Sequencing PCR ürünleri BigDyeXT (Applied Biosystems; USA) saflaştırma kiti kullanılarak yapıldı. DNA dizi analizleri ABI 3100 Otomatik Jel Kapiller Analizatör sisteminde sekans bölgesinin boyutlarına göre kısa ve ya uzun kapiller seti kullanılarak yapıldı.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir.

Elde edilen diziler aynı sistemin kendi software ve SeqScape2.0 programı kullanılarak FASTA elektronik kütüphaneden elde edilen normal NLRP12 "NM\_001277126.1", PLCG2 "NM\_002661.5", NLRC4

"NM\_021209.4" gen dizisi ile karşılaştırıldı ve varolan nukleotid yer değişimleri ve uygun aminoasit mutasyonları kayıt edildi.

### 5.4.1 NLRP12 geni için referans dizisi

Saptanan 1061 aminoasitten oluşan protein yapısına yansıması UniProtKB P59046 protein veritabanlarından elde edilmiştir.

10      20      30      40

MLRTAGRDGL CRLSTYLEEL EAVELKKFKL YLGTATELGE

50

GKIPWGSMEK

60 70 80 90

AGPLEMAQLL ITHFGPEEAW RLALSTFERI NRKDLWERGQ

100

REDLVRDTPP

110 120 130 140

GGPSSLGNQS TCLLEVSLVT PRKDPQETYR DYVRRKFRLM

150

EDRNARLGEC

160 170 180 190

VNLSHRYTRL LLVKEHSNPM QVQQQLLDTG RGHARTVGHQ

200

ASPIKIETLF

210 220 230 240

EPDEERPEPP RTVVMQGAAG IGKSMLAHKV MLDWADGKLF

250

QGRFDYLFYI

260 270 280 290

NCREMNQSAT ECSMQDLIFS CWPEPSAPLQ ELIRVPERLL

300

FIIDGFDELK

310 320 330 340

PSFHDPQGPW CLCWEEKRPT ELLNSLIRK KLLPELSLLI

350

TTRPTALEKL

360 370 380 390

HRLLEHPRHV EILGFSEAER KEYFYKYFHN AEQAGQVFNY

400

VRDNEPLFTM

410 420 430 440

CFVPLVCWVW CTCLQQQLEG GLLRQTSRT TTAVYMLYLL

450

SLMQPKPGAP

460 470 480 490

RLQPPPNQRG LCSLAADGLW NQKILFEEQD LRKHGLDGED

500

VSAFLNMNIF

510 520 530 540

QKDINCERYY SFIHLSFQEF FAAMYYILDE GEGGAGPDQD

550

VTRLLTEYAF

560 570 580 590

SERSFLALTS RFLFGLLNEE TRSHLEKSLC WKVSPHIKMD

600

LLQWIQSKAQ

610 620 630 640

SDGSTLQQGS LEFFSCLYEI QEEEFIQQAL SHFQVIVVSN

650

IASKMEHMVS

660 670 680 690

SFCLKRCRSA QVLHLYGATY SADGEDRARC SAGAHTLLVQ

700

LPERTVLLDA

710 720 730 740

YSEHLAAALC TNPNIELSL YRNALGSRGV KLLCQGLRHP

750

NCKLQNLRLK

760 770 780 790

RCRISSACE DLSAALIANK NLTRMDLSGN GVGFPGMMLL

800

CEGLRHPQCR

810 820 830 840

LQMIQLRKQC LESGACQEMA SVLGTNPFLV ELDLTGNALE

850

DLGLRLLCQG

860 870 880 890

LRHPVCRLRT LWLKICRLTA AACDELASTL SVNQSLRELD

900

LSLNELGDLG

910 920 930 940

VLLLCEGLRH PTCKLQTLRL GICRLGSAAC EGLSVVLQAN

950

HNLRELDLSF

960 970 980 990

NDLGDWGLWL LAEGLQHPAC RLQKLWLDSC GLTAKACENL

1000

YFTLGINQTL

1010 1020 1030 1040

TDLYLTNNAL GDTGVRLCK RLSHPGCKLR VLWLFMDLN

1050

KMTSRLAAL

1060

RVTKPYLDIG C

1 gtcgttgca acaaattgat gagcaatgct ttttataat gccaaacttg tacaaaaaag

61 ttggcatgct acgaaccgca ggcagggacg gcctctgctg cctgtccacc tacttgaag

121 aactcgaggc tgtggaactg aagaagtca agttatacct ggggaccgac acagagctgg

181 gagaaggcaa gatcccctgg ggaagcatgg agaaggccgg tcccctggaa atggcccagc

241 tgctcatcac ccaactcggg ccagaggagg cctggagggt ggctctcagc acctttgagc

301 ggataaacag gaaggacctg tgggagagag gacagagaga ggacctggtg agggatacce

361 cacctggtgg cccgtcctca ctgggaacc agtcaacatg cttctggaa gtctctttg  
421 tcaactcaag aaaagatccc caggaaacct acagggacta tgtccgagg aaattccggc  
481 tcatggaaga ccgcaatgcg cgcctagggg aatgtgtcaa cctcagccac cggtagaccc  
541 ggctctgct ggtgaaggag cactcaaacc ccatgcaggt ccagcagcag cttctggaca  
601 caggccgggg acacgcgagg accgtgggac accaggctag cccatcaag atagagacc  
661 tctttgagcc agacaggag cgccccgagc caccgcgac cgtggctatg caaggcggg  
721 cagggatagg caagtccatg ctggcacaca agtgatgct ggactgggcg gacgggaagc  
781 tctccaagg cagattgat tatctctt acatcaactg cagggatag aaccagagt  
841 ccacggaatg cagcatgcaa gacctatct tcagctgctg gcctgagccc agegcgcct  
901 tccaggagct catccgagtt cccgagccc tcttttcat catcgacggc ttcgatgagc  
961 tcaagcctt ttccacgat cctcagggac cctggtgcct ctgctgggag gagaaacgg  
1021 ccacggagct gcttctaac agcttaattc ggaagaagct gctcctgag ctatcttgc  
1081 tcatcaccac acggcccacg gctttggaga agctccaccg tctgctggag caccccaggc  
1141 atgtggagat cctgggcttc tctgaggcag aaaggaagga atacttctac aagtattcc  
1201 acaatgcaga gcaggcgggc caagtctca attacgtgag ggacaacgag cctctctca  
1261 ccatgtgctt cgtccccctg gtgtgctggg tgggtgttac ctgctccag cagcagctgg  
1321 agggggggg gctgttgaga cagacgtcca ggaccaccac tgcagtgtac atgctctacc  
1381 tgctgagtct gatgcaacce aagccggggg ccccgccct ccagcccca cccaaccaga

1441 gagggttgtg ctcttggcg gcagatgggc tctggaatca gaaaatccta tttgaggagc

1501 aggacctccg gaagcacggc ctagacgggg aagacgtctc tgccttctc aacatgaaca

1561 tcttcagaa ggacatcaac tgtgagaggt actacagctt catccactg agtttcagg

1621 aattctttgc agctatgtac tatacctgg acgaggggga gggcggggca ggcccagacc

1681 aggacgtgac caggctgtg accgagtac cgttttctga aaggagctc ctggcactca

1741 ccagccgctt cctgtttgga ctctgaacg aggagaccag gagccacctg gagaagagtc

1801 tctgctggaa ggtctcgccg cacatcaaga tggacctgtt gcagtggatc caagcaaag

1861 ctcagagcga cggctccacc ctgcagcagg gctccttggga gttcttcagc tgcttgtacg

1921 agatccagga ggaggagttt atccagcagg ccctgagcca ctccaggtg atcgtggtca

1981 gcaacattgc ctccaagatg gagcacatgg tctcctcgtt ctgtctgaag cgctgcagga

2041 gcgcccaggtgctgcacttgtatggcgcca cctacagcgggacggggaa gaccgcgcga

2101 ggtgctccgc aggagcgcac acgctgttgg tgcagctacc agagaggacc gttctgctgg

2161 acgcctacag tgaacatctg gcagcggccc tgtgcaccaa tccaaacctg atagagctgt

2221 ctctgtaccg aatgccctg ggcagccggg ggggtgaagct gctctgtcaa ggactcagac

2281 accccaactg caaacttcag aacctgaggc tgaagaggtg ccgcattcc agctcagct

2341 gcgaggacct ctctgcagct ctcatagcca ataagaattt gacaaggatg gatctcagtg

2401 gcaacggcgt tggattccca ggcattgatgc tgctttgcga gggcctgcgg catccccagt

2461 gcaggctgca gatgattcag ttgaggaagt gtcagctgga gtccggggct tgctcaggaga

2521 tggtctctgt gctcggcacc aaccacatc tggttgagtt ggacctgaca ggaaatgcac  
 2581 tggaggattt gggcctgagg ttactatgcc agggactgag gcaccagtc tgcagactac  
 2641 ggactttgtg gctgaagatc tgccgcctca ctgctgctgc ctgtgacgag ctggcctcaa  
 2701 ctctcagtgt gaaccagagc ctgagagagc tggacctgag cctgaatgag ctggggggacc  
 2761 tcgggggtgct gctgctgtgt gagggcctca ggcatccac gtgcaagctc cagaccctgc  
 2821 ggttgggcat ctgccggctg ggctctgccg cctgtgaggg tctttctgtg gtgctccagg  
 2881 ccaaccacaa cctccgggag ctggactga gttcaacga cctgggagac tggggcctgt  
 2941 ggttgctggc tgaggggctg caacatcccg cctgcagact ccagaaactg tggctggata  
 3001 gctgtggcct cacagccaag gcttgtgaga atcttactt caccctgggg atcaaccaga  
 3061 ccttgaccga cctttacctg accaacaacg ccctagggga cacaggtgtc cgactgcttt  
 3121 gcaagcggct gagccatcct ggctgcaaac tccgagtcct ctggttattt gggatggacc  
 3181 tgaataaaat gaccacagt aggttggcag cgcttcgagt aacaaaacct tatttgaca  
 3241 ttggctgctg cccaacttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa  
 3301 tttgtgcaa cgaac

#### 5.4.2 PLCG2 geni için referans dizisi

Saptanan 1265 aminoasitten oluşan protein yapısına yansıması UniProtKB P16885 protein veritabanlarından elde edilmiştir.

10      20      30      40

MSTTVNVDSL AEYEKSQIKR ALELGTVM TVFSFRKSTPER

50

RTVQVIMETR

60 70 80 90

QVAWSKTADK IEGFLDIMEI KEIRPGKNSK DFERAKAVRQ

100

KEDCCFTILY

110 120 130 140

GTQFVLSTLS LAADSKEDAV NWLSGLKILH QEAMNASTPT

150

IIESWLRKQI

160 170 180 190

YSVDQTRRNS ISLRELKTIL PLINFKVSSA KFLKDKFVEI

200

GAHKDELSFE

210 220 230 240

QFHLFYKKLM FEQQKSILDE FKKDSSVFIL GNTDRPDASA

250

VYLHDFQRFL

260 270 280 290

IHEQQEHWAQ DLNKVRERMT KFIDDTMRET AEPFLVDEF

300

LTYLFSRENS

310 320 330 340

IWDEKYDAVD MQDMNNPLSH YWISSHNTY LTGDQLRSES

350

SPEAYIRCLR

360 370 380 390

MGCRCIELDC WDGPDGKPVI YHGWTRTTKI KFDDVVQAIK

400

DHAFVTSSFP

410 420 430 440

VILSIEEHCS VEQRHMAKA FKEVFGDLLL TKPTEASADQ

450

LPSPSQLREK

460 470 480 490

IIKHKKLGP RGDVDVNMED KKDEHKQQGE LYMWDSIDQK

500

WTRHYCAIAD

510 520 530 540

AKLSFSDDIE QTMEEEVPQD IPPTELHFGE KWFHKKVEKR

550

TSAEKLLQEY

560 570 580 590

CMETGGKDGT FLVRESETFP NDYTLSFWRS GRVQHCRIRS

600

TMEGGTLKYY

610 620 630 640

LTDNLTFSSI YALIQHYRET HLRCAEFELR LTDPVNPNP

650

HESKPWYYDS

660 670 680 690

LSRGEAEDML MRIPRDGAFL IRKREGSDSY AITFRARGKV

700

KHCRINRDGR

710 720 730 740

HFVLGTSAYF ESLVELVSYY EKHSLYRKMR LRYPVTPPELL

750

ERYNMERDIN

760 770 780 790

SLYDVSRMYV DPSEINPSMP QRTVKALYDY KAKRSDELSF

800

CRGALIHNVS

810 820 830 840

KEPGGWWKGD YGTRIQQYFP SNYVEDISTA DFEELEKQII

850

EDNPLGSLCR

860 870 880 890

GILDLNTYNV VKAPQGKNQK SFVFILEPKQ QGDPPVEFAT

900

DRVEELFEWF

910 920 930 940

QSIREITWKI DTKENNMKYW EKNQSIAIEL SDLVVYCKPT

950

SKTKDNLENP

960 970 980 990

DFREIRSFVE TKADSIIRQK PVDLLKYNQK GLTRVYPKGQ

1000

RVDSSNYDPF

1010 1020 1030 1040

RLWLCGSQMV ALNFQTADKY MQMNHALFSL NGRTGYVLQP

1050

ESMRTEKYDP

1060 1070 1080 1090

MPPEQRKIL MTLTVKVLGA RHLPKLGRSI ACPFVEVEIC

1100

GAEYDNNKFK

1110 1120 1130 1140

TTVVNDNGLS PIWAPTQEKV TFEIYDPNLA FLRFVVYEED

1150

MFSDPNFLAH

1160 1170 1180 1190

ATYPIKAVKS GFRSVPLKNG YSEDIELASL LVFCEMRPVL

1200

ESEEELYSSC

1210 1220 1230 1240

RQLRRRQEEL NNQLFLYDTH QNLRNANRDA LVKEFSVNEN

1250

QLQLYQEKCNC

1260

KRLREKRVSNSKFYS

1 agggcatgta gcaggtcggc cttctggtc agagtctcgt gttctccgtc ctgcagaggc

61 gatgggaagg tgaagcactg ccgatccag aaggaggca gcgtctacct gctggggacc

121 accacggagt tcgagtctct ggtggagtgt gtgaactact tcaagaagaa accgtgtat

181 cgcaagatca agctcgtta cccagtgacg ccggagctgg tggagcgctt cagtgcaaac

241 gagaactgct ctccatata catggagacg tacgtgaagc ccaacgagat tgagccgtcg

301 ctgccccaga atacggtccg ggctttgtac agctaccagg ccaagcgacc cgacgagctg

361 agcttcacta aaggagcact gattcataac ggtcctcaaac aagtggacgg gtggtggaaa

421 ggcgactacg gagggcgact gcagctcttc ttcctgcca attacgtgga ggaagtgtcc

481 aactcagcac agactgacgc caaagctcag gagatggaag acaaccctct gggggaactc

541 tgcaagggaa tcgtggagat ctccatgtac aac

### 5.4.3 NLRC4 geni için referans dizisi

Saptanan 1024 aminoasitten oluşan protein yapısına yansıması UniProtKB Q9NPP4 protein veritabanlarından elde edilmiştir.

10 20 30 40

MNFIKDNSRA LIQRMGMTVI KQITDDLFW NVLNREEVNI

50

ICCEKVEQDA

60 70 80 90

ARGIIHMILK KGSESCNLFL KSLKEWNYPL FQDLNGQSLF

100

HQTSEGLDD

110 120 130 140

LAQDLKDLYH TPSFLNFYPL GEDIDIIFNL KSTFTEPVLW

150

RKDQHHRVE

160 170 180 190

QLTLNGLLQA LQSPCIEGE SGKKGKSTLLQ RIAMLWGSGK

200

CKALTKFKFV

210 220 230 240

FFRLSRAQG GLFETLCDQL LDIPGTIRKQ TFMAMLLKLR

250

QRVLFLLDGY

260 270 280 290

NEFKPQNCPE IEALIKENHR FKNMVIVTTT TECLRHIRQF

300

GALTAEVGDM

310 320 330 340

TEDSAQALIR EVLIKELAEG LLLQIQKSRC LRNLMKTPLF

350

VVITCAIQMG

360 370 380 390

ESEFHSHTQT TLFHTFYDLL IQKNKHKHKG VAASDFIRSL

400

DHCGDLALEG

410 420 430 440

VFSHKDFEL QDVSSVNEDV LLTTGLLCKY TAQRFKPKYK

450

FFHKSFQEYT

460 470 480 490

AGRRLSSLLT SHEPEEVTKG NGYLQKMVSI SDITSTYSSL

500

LRYTCSGSSVE

510 520 530 540

ATRAVMKHLA AVYQHGCLLG LSIKRPLWR QESLQSVKNT

550

TEQEILKAIN

560 570 580 590

INSFVECGIH LYQESTSKSA LSQEFEAFFQ GKSLYINSGN

600

IPDYLFDFFE

610 620 630 640

HLPNCASALD FIKLDFYGGA MASWEKAAED TGGIHMEEAP

650

ETYIPRAVS

660 670 680 690

LFFNWKQEFR TLEVTLRDFS KLNKQDIRYL GKIFSSATSL

700

RLQIKRCAGV

710 720 730 740

AGSLSLVLST CKNIYSLMVE ASPLTIEDER HITSVTNLKT

750

LSIHDLQNQR

760 770 780 790

LPGGLTDSLGL NLKNLTKLIM DNIKMNEEDA IKLAEGLKNL

800

KKMCLFHLTH

810 820 830 840

LSDIGEGMDY IVKSLSSSEPC DLEEIQLVSC CLSANAVKIL

850

AQLHNLVKL

860 870 880 890

SILDLSENYL EKDGNEALHE LIDRMNVLEQ LTALMLPWGC

900

DVQGSLSSLL

910 920 930 940

KHLEEVQLV KLGLKNWRLT DTEIRILGAF FGKNPLKNFQ

950

QLNLAGNRVS

960 970 980 990

SDGWLAFMGV FENLKQLVFF DFSTKEFLPD PALVRKLSQV

1000

LSKLTFLQEA

1010 1020

RLVGWQFDDD DLSVITGAFK LVTA

1 ctgctggaag tcctctggga ttcaagaatg aagagtagtt ttacagaaaa aagaggacaa

61 tattgggatc accttgacc ttccattg gaataatat tttctattgt gttatagaaa

121 ggtgggaagc tttcatccag aacaatgaat ttcataaagg acaatagccg agcccttatt

181 caaagaatgg gaatgactgt tataaagcaa atcacagatg acctattgt atggaatgtt

241 ctgaatcgcg aagaagtaaa catcatttgc tgcgagaagg tggagcagga tgctgctaga

301 gggatcattc acatgatttt gaaaaagggt tcagagtcct gtaacctett tcttaaatcc

361 cttaaggagt ggaactatcc tctatttcag gacttgaatg gacaaagtct tttcatcag

421 acatcagaag gagacttggga cgatttggct caggatttaa aggacttga ccatacceca

481 tcttttctga acttttatcc ccttggtgaa gatattgaca ttatttttaa ctgaaaagc

541 accttcacag aacctgtcct gtggaggaag gaccaacacc atcaccgcgt ggagcagctg

601 acctgaatg gcctctgca ggctcttcag agcccctgca tcattgaagg ggaatctggc

661 aaaggcaagt cactctgct gcagegaatt gccatgctct ggggctccgg aaagtgcaag

721 gctctgacca agtcaaat cgtctcttc ctccgtctca gcagggecca ggttgactt

781 ttgaaacc tctgtgatca actcctggat atacctggca caatcaggaa gcagacattc

841 atggccatgc tgctgaagct gggcagagg gttctttcc ttcttgatgg ctacaatgaa

901 ttcaagcccc agaactgcc agaaatcgaa gccctgataa aggaaaacca ccgcttcaag

961 aacatggtca tcgtaccac taccactgag tgctgaggc acatacggca gtttggtgcc

1021ctgactgctgaggtgggggatatgacagaagacagcgccc      aggctctcat ccgagaagtg

1081 ctgatcaagg agcttctga aggcttcttg ctccaaatc agaaatccag gtgcttgagg

1141 aatctcatga agaccctct ctttgggtc atcacttgat caatccagat ggtgaaagt

1201 gaggccact ctacacaca aacaacgtg ttccatacct tctatgatct gttgatacag

1261 aaaaacaaac acaaacataa aggtgtggct gcaagtgact tcattcggag cctggaccac

1321 tgtggagacc tagctctgga ggggtgttc tcccacaagt ttgatttga actgcaggat  
1381 gtgtccagcg tgaatgagga tgtcctgctg acaactgggc tcctctgtaa atatacagct  
1441 caaaggtca agccaaagta taaattcttt cacaagtcac tccaggagta cacagcagga  
1501 cgaagactca gcagtttatt gacgtctcat gagccagagg aggtgaccaa ggggaatggt  
1561 tacttgcaaa aatgggttc catttcggac attacatcca cttatagcag cctgctccgg  
1621 tacacctgtg ggtcatctgt ggaagccacc agggctgta tgaagcacct cgcagcagtg  
1681 tataacacg gctgccttct cggactttcc atcgccaaga ggctctctg gagacaggaa  
1741 tctttgcaaa gtgtgaaaa caccactgag caagaaatc tgaagccat aaacatcaat  
1801 tcctttgtag agtgtggcat ccatttatat caagagagta catccaaatc agccctgagc  
1861 caagaattg aagctttctt tcaaggtaaa agcttatata tcaactcagg gaacatcccc  
1921 gattacttat ttgacttctt tgaacatttg cccaattgtg caagtgcctt ggacttcatt  
1981 aaactggact tttatggggg agctatggct tcatgggaaa aggtgcaga agacacaggt  
2041 ggaatccaca tggaagagc cccagaaacc tacattccca gcagggtgt atctttgtc  
2101 tcaactgga agcaggaatt caggactctg gaggtcacac tccgggattt cagcaagttg  
2161 aataagcaag atacagata tctggggaaa atattcagct ctgccacaag cctcaggctg  
2221 caaataaaga gatgtgctgg tgtggctgga agcctcagtt tggctctcag cacctgtaag  
2281 aacatttatt ctctcatggt ggaagccagt ccctcacca tagaagatga gaggcacatc  
2341 acatctgtaa caaacctgaa aaccttgagt attcatgacc tacagaatca acggctgccg

2401 ggtggtctga ctgacagctt gggtaacttg aagaacctta caaagctcat aatggataac

2461 ataaagatga atgaagaaga tgctataaaa cttagctgaag gcctgaaaaa cctgaagaag

2521 atgtgtttat ttcatttgac ccacttctct gacattggag agggaatgga ttacatagtc

2581 aagtctctgt caagtgaacc ctgtgacctt gaagaaattc aattagtctc ctgctgcttg

2641 tctgcaaatg cagtgaaaat cctagctcag aatcttcaca atttggtaa actgagcatt

2701 cttgatttat cagaaaatta cctggaaaaa gatggaaatg aagctcttca tgaactgatc

2761 gacaggatgaacgtgctagaacagctcaccgactgatgctgccctgggg ctgtgacgtg

2821 caaggcagcctgagcagcctgttgaacatttgaggagggtcccacaact cgtaagctt

2881 ggggtgaaaa actggagact cacagatata gagattagaa ttttaggtgc atttttgga

2941 aagaacctc tgaaaaactt ccagcagttg aatttggcgg gaaatcgtgt gacagtgat

3001 ggatggcttg ccttcatggg tgtatttgag aatcttaagc aattagtgtt tttgacttt

3061 agtactaaag aatttctacc tgatccagca ttagtcagaa aacttagcca agtgttatcc

3121 aagttaactt ttctgcaaga agctaggctt gttgggtggc aattgatga tgatgatctc

3181 agtgttatta cagtgcttt taaactagta actgcttaaa taaaggtac tcgaagccag

3241 taaaaaaaaa aaaa

Mutasyonsınıflaması Human Genome Variation Society yönetmeliğine göre yapılmıştır.

## 5.5 İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, Kruskal-Wallis analizi ile SPSS 13.0 programında karşılaştırılarak  $p > 0,005$  düzeyleri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiş ve Finch TV, CLC Sequence Viewer ve MEGA7 biyanformatik programları ile okunmuştur.



## 6. BULGULAR

### 6.1 Hasta Grubu

Otoinflamatuvar hastalıklara özgü tekrarlayan ateş ve üşüme , poliartralji ve konjunktivit, aşırı terleme , sersemlik , başağrısı , aşırı susama , bulantı ve miyalji gibi klinik bulguları olan, FCAS2, FCAS3 ve FCAS4 gen analizleri negatif saptanan 25 hastada NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 genlerini DNA dizileme yöntemi ile çalıştık.

#### 6.1.1 NLRP12genindesaptananThr260Metheterozigotmutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>T260M</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.779C>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. <u>Thr260Met</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> TGAACCAGAGTGCCA <u>C</u> GGAATGCAGCATGC A
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger, Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Ghost K. et al
<b>Girilen tarih</b>	2011-02-07

NLRP12 geninin 3.eksonunda 779.nükleotit pozisyonunda C >T (ACG > ATG) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Thr260Met missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.2 NLRP12genindesaptananPhe402Leuheterozigotmutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>F402L</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1206C>G
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<b><u>p.Phe402Leu</u></b>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA:</u> CTTCACCATGTGCTT<u>C</u>GTCCCCCTGGTGTGC</b>
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger,
<b>Referans</b>	Aksentijevich et al
<b>Girilen tarih</b>	2008-03-04

NLRP12 geninin 3.eksonunda 1206.Nükleotit pozisyonunda C > G (TTC>TTG) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır.Bu yerdeğişim Phe402Leu missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.3 NLRP12 geninde saptanan Arg352Cys heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>R352C</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1054C>T
<b>Variasyon tipi</b>	<u>Heterozigot Missense</u>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Arg352Cys</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> TTGGAGAAGCTCCAC <u>C</u> GTCTGCTGGAGCACC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger,
<b>Referans</b>	Jeru I. Amselem S.
<b>Girilen tarih</b>	2011-06-06

NLRP12 geninin 3.eksonunda 1054.nükleotitinde C>T (CGT > TGT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Arg352Cys missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

#### 6.1.4 NLRP12genindesaptananp.His304Tyrheterozigotmutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>H304Y</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.910C>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.His304Tyr</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> CTCAAGCCTTCTTTCCACGATCCTCAGGGAC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger,
<b>Referans</b>	Silvia Borghini
<b>Girilen tarih</b>	2010-12-09

NLRP12 geninin 3.eksonunda 910.nükleotit pozisyonunda C>T (CAC > TAC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, His304Tyr missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.5 NLRP12 geninde saptanan p.Gly39Val heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>G39V</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.116G>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Gly39Val</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> CCGCGACAGAGCTGG <u>G</u> AGAAGGCAAGATCC C
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 1</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger,
<b>Referans</b>	Rittore C. Fabre A. Touitou I.
<b>Girilen tarih</b>	2010-02-10

NLRP12 geninin 1.eksonunda 116. nükleotit pozisyonunda G >T (GGA>GTA) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Gly39Val missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.6 NLRP12 geninde saptanan p.Gly448Ala heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>G448A</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1343G>C
<b>Varyasyon tipi</b>	<b>Heterozigot Missense</b>
<b>Protein değişimi</b>	p.Gly448Ala
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> TGCAACCCAAGCCGGGGCCCCGCGCCTCC A
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger, RFLP
<b>Referans</b>	Faivre L. Rittore C. Touitou I.
<b>Girilen tarih</b>	2008-09-02

NLRP12 geninin 3.eksonunda 1343. nükleotit pozisyonunda G >C (GGG > GCG) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Gly448Ala missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.7 NLRP12 geninde saptanan p.Arg1016\* heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>R1016X</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.3046C>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p.Arg1016*
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> GGGGACACAGGTGTC <b>CG</b> ACTGCTTTGCAAGC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 9</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	NCBI
<b>Girilen tarih</b>	2010-02-10

NLRP12 geninin 9.eksonunda 3046. nükleotit pozisyonunda C>T (CGA > TGA) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Arg1016\* missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.8 NLRP12 geninde saptanan p.Ile474Phe heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak INFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>I474F</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1420A>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Ile474Phe</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> TGGGCTCTGGAATCAGAAAATCCTATTGA
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Isabelle JERU
<b>Girilen tarih</b>	28-01-2013

NLRP12 geninin 3.eksonunda 1420. nükleotit pozisyonunda A>T (ATC > TTC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Ile474Phe missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.9 NLRP12genindesaptananp.Ile196Thrheterozigotmutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak VARSOME veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>I196T</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.587T>C
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. Ile196Thr
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> GCTAGCCCCATCAAGATAGAGACCCTCTTT
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Isabelle JERU
<b>Girilen tarih</b>	28-01-2013

NLRP12 geninin 3.eksonunda 587. nükleotit pozisyonunda T>C (ATA > ACA) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Ile196Thrmisense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.1.10 NLRP12 geninde saptanan p.Arg329Gln het heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak INFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>R329Q</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.986G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. Arg329Gln het
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> TTAACAGCTTAATTCGGAAGAAGCTGCTCC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 2 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 3</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Isabelle JERU
<b>Girilen tarih</b>	28-01-2013

NLRP12 geninin 3.eksonunda 986. nükleotit pozisyonunda G>A (CGG>CAG) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Arg329Gln hetmissense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

## 6.2 PLCG2 geninde saptanan mutasyonlar

### 6.2.1 PLCG2 geninde saptanan p.Gly805Asp heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>G805D</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2414G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Gly805Asp</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> CCAAGGAGCCCGGGGGCTGGTGGAAAGGA G
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 22</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	<u>Ivona AKSENTIJEVICH</u>
<b>Girilen tarih</b>	<u>2010-02-10</u>

PLCG2 geninin 22.eksonunda 2414. nükleotit pozisyonunda G>A (GGC > GAC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Gly805Asp missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.2 PLCG2 geninde saptanan p.Asn798Ser heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>N798S</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2393A>G
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Asn798Ser</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA:</u></b> GGTGCCCTCATCCACAATGTCTCCAAGGAG
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 22</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	2010-02-10

PLCG2 geninin 22.eksonunda 2393. nükleotit pozisyonunda A>G (AAT > AGT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Asn798Ser missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.3 PLCG2 geninde saptanan p.Ala776Thr heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>A776T</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2326G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. <u>Ala776Thr</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA:</u></b> GCCTCAGAGAACCGTGAAAGCTCTGTATGA
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 22</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 22.eksonunda 2326. nükleotit pozisyonunda G>A (GCT > ACT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Ala776Thr missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

#### 6.2.4 PLCG2 geninde saptanan p.His257Leu heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
H257L	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.770A>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.His257Leu</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> GAACAGCAGGAGCATTGGGCTCAGGATCTG
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 10</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 10.eksonunda 770. nükleotit pozisyonunda A>T (CAT > CTT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, His257Leu missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.5 PLCG2genindesaptananp.Tyr482Hisheterozigotmutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>Y482H</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1444T>C
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. <u>Tyr482His</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> AGCAACAGGGGGAGCTGTACATGTGGGATT
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 15</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 15.eksonunda 1444. nükleotit pozisyonunda T>C (TAC > CAC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Tyr482His missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.6 PLCG2 geninde saptanan p.Met28Leu heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>M28L</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.82A>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Met28Leu</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> GAGCTGGGGACGGTGATGACTGTGTTTCAGC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 2</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 2.eksonunda 82. nükleotit pozisyonunda A>T (ATG> TTG) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Met28Leu missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.7 PLCG2genindesaptananp.Ser110Asnheterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>S110N</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.3329G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Ser110Asn</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> ATAATGGCCT CAGCCCTATCGGGCTCCAA
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 30</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	<b>Ivona AKSENTIJEVICH</b>
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 30.eksonunda 3329. nükleotit pozisyonunda G>A (AGC > AAC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Ser110Asnmissense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.8 PLCG2 geninde saptanan p.Ile671Val heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>I671V</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2011A>G
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	p. <u>Ile671Val</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA:</u></b> ACGGGGCCTTCCTGATCCGGAAGCGAGAGG
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 19</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 19.eksonunda 2011. nükleotit pozisyonunda A>G (ATC > GTC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Ile671Val missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.2.9 PLCG2 geninde saptanan p.Asn1096del heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>I671V</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.3284.3286delGACA>G
<b>Variasyon tipi</b>	<b>Heterozigot Missense</b>
<b>Protein değişimi</b>	p.Asn1096del
<b>Sequenc değişimi</b>	<b>cDNA:</b> CTGTGGAGCC GAGTATGACA ACAACAAGTT
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 3</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 29</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing Sanger
<b>Referans</b>	Ivona AKSENTIJEVICH
<b>Girilen tarih</b>	26-02-2014

PLCG2 geninin 29.eksonunda 3284.3286. nükleotit pozisyonunda GACA>G yerdeğişimi heterozigot olarak saptanarak, Asn1096del missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.3 NLRC4 geninde saptanan mutasyonlar

#### 6.3.1 NLRC4 geninde saptanan p.Gly786Val heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>G786V</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2357G>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<b><u>p.Gly786Val</u></b>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA: ACTAGCTGAAGGCCTGAAAAACCTGAAGAA</u></b>
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 4 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 6</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Neil ROMBERG
<b>Girilen tarih</b>	16-04-2019

NLRC4 geninin 6.eksonunda 2357.nükleotit pozisyonunda G>T (GGC > GTC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Gly786Val missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.3.2 NLRC4 geninde saptanan p.Ala160Thr heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>A160T</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.478G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<u>Heterozigot Missense</u>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Ala160Thr</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	cDNA: GGCCTCCTGCAGGCTCTTCAGAGCCCCTGC
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 4 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 4</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Neil ROMBERG
<b>Girilen tarih</b>	16-04-2019

NLRC4 geninin 4.eksonunda 478. nükleotit pozisyonunda G>A (GCT > ACT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Ala160Thr missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.3.3 NLRC4 geninde saptanan p.Ala622Val heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>G786V</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.1865C>T
<b>Variasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<b><u>p.Ala622Val</u></b>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA: TTTTATGGGGGAGCTATGGCTTCATGGGAA</u></b>
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 4 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 4</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Neil ROMBERG
<b>Girilen tarih</b>	16-04-2019

NLRC4 geninin 4.eksonunda 1865.nükleotit pozisyonunda C>T (GCT > GTT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Ala622Val missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.3.4 NLRC4 geninde saptanan p.Ile811Thr heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>I811T</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.2432T>C
<b>Varyasyon tipi</b>	<b><u>Heterozigot Missense</u></b>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Ile811Thr</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<b><u>cDNA: GAGGGAATGG ATTACATAGT CAAGTCTCTG</u></b>
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 4 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 6</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Neil ROMBERG
<b>Girilen tarih</b>	16-04-2019

NLRC4 geninin 6.eksonunda 2432. nükleotit pozisyonunda T>C (ATA > ACA) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Ile811Thr missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

### 6.3.5 NLRC4 geninde saptanan p.Arg204His heterozigot mutasyonu

<b>Aşağıdaki bilgilerin fenotip-genotip korelasyonu için bir referans olarak İNFEVERS veritabanında özetlenmesi.</b>	
<b>R204H</b>	
<b>cDNA pozisyonu</b>	c.611G>A
<b>Variasyon tipi</b>	<u>Heterozigot Missense</u>
<b>Protein değişimi</b>	<u>p.Arg204His</u>
<b>Sequenc değişimi</b>	<u>cDNA: TCGTCTTCTTCCTCCGTCTCAGCAGGGCCCA</u>
<b>Fenotipi</b>	<b>FCAS 4 ve semptomatik</b>
<b>Bölge</b>	<b>Ekson 4</b>
<b>Kullanılan teknikler</b>	Sequencing NGS
<b>Referans</b>	Chinn IK, Eckstein OS. <u>et al</u>
<b>Girilen tarih</b>	2018-12-27

NLRC4 geninin 4.eksonunda 611.nükleotit pozisyonunda G>A (CGT > CAT) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nükleotit yerdeğişimi Arg204His missense aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır.

## 7. TARTIŞMA

NLRP12 gen ürünü NALP12 Interleukin -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve Interleukin-18 (IL-18) dahil olmak üzere enflamatuar sitokinlerin olgunlaşmasını düzenleyen inflammasom adaptör proteini ASC ile etkileşime girdiği gösterilen ilk NLR olmuştur (Stephan Borte et al., 2014). Yabani tip NLRP12'nin işlevi diğer çalışmalara uygun olarak kullanılan deneysel sisteme göre tartışılabilir. NLRP12'nin kaspaz 1 sinyalleşmesinde ve benek oluşumunda proinflammatuar bir protein gibi ve NF-kB aktivasyonu üzerinde bir antiinflammatuar protein olarak etki ettiğini göstermektedir. NLRP12'nin fizyolojik rolünün sadece in vitro analizlerden çıkarılmasının basit olacağını özellikle NF-kB ve IL-1'in birbirine bağlı ağların bir parçası olduğu ve hem indüksiyonda hem de inflamasyonun çözünürlüğünde NF-kB'nin iyi olduğu kanıtlanmıştır. NLRP12 ile ilişkili bozuklukların altında yatan mekanizmalar hastalığa neden olan mutasyona bağlı olarak da değişebilmektedir. Aslında p.Arg352Cys missense mutasyonunun kaspaz-1 işleminin bir fonksiyon kazancı ile ilişkili olduğunu gösterirken daha önce bildirilen nonsense mutasyonları NF-kB inhibisyon işlevinin kaybına yol açmaktadır. NLRP12 mutasyonlarının nadir olması göz önüne alındığında bu yeni moleküler kusurun tanımlanması NLRP12 ile ilişkili hastalıkların klinik spektrumunun tanımlanmasına yardımcı olur. NLRP12 missense mutasyonunun zararlı etkisinin in vivo ve in vitro kanıtları sunulmuştur (Jéru et al., 2011).

NLRP12'nin bulaşıcı ajanlara karşı konak direncindeki rolü ele alınmıştır. NLRP12 veba etkeninin etken maddesi olan *Y.pestis*'i tanıyan bir enflamatuar bileşen olarak gösterilmiştir. NLRP12<sup>-/-</sup> fareler *Y.pestis* enfeksiyonundan sonra daha yüksek ölüm oranı ve bakteri yükü sergilemişler ve burada NLRP12 inflamasyonunun kaspaz-1 aktivasyonunun aracılık ettiği IL-18 ve IL-1 üretiminin merkezi bir regülatörü olduğu gösterilmiştir. NLRP12 ayrıca IFN-yi indükleyerek IL-18 yoluyla üretim ve hatta NLRP12<sup>-/-</sup> *Y.pestis* suşları ile enfeksiyon sonrası NF-kB sinyalleşmesinde minimum etkiye sahip olmaktadır.

*K.pneumoniae* ve *M.tuberculosis* enfeksiyonlarının kanonik NF-kB sinyalleşmesinin aktivasyonu üzerindeki bilinen etkilerine rağmen, NLRP12<sup>-/-</sup> ve vahşi tip fareler arasında *K.pneumoniae* veya *M.tuberculosis* enfeksiyonlarından

fark gözlemlenmiştir. NLRP12 in vitro konakçıya LPS uyarımı veya *M.tuberculosis* enfeksiyonuna karşı doğuştan gelen immün yanıtta önemli ölçüde katkı yapmamış, hatta in vitro LPS uyarımı veya *M.tuberculosis* enfeksiyonundan sonra NF-kB sinyalini negatif bir regülatör olarak NLRP12'yi uygulamaktadır. *S.typhimurium* enfeksiyonunun etkin kontrolü için NLRP12'nin kanonik NF-kB ve ERK sinyallerinin aktivasyonunu baskıladığı ve enflamatuar sitokin ve NO üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. *Yersinia* enfeksiyonunun aksine NLRP12'nin *M.tuberculosis* ve *K.pneumoniae* enfeksiyonları sırasında enflamasyon aracılıkonakçı doğuştan gelen yanıtlara katkıda bulunmadığını ve aklagelebilecek şekilde NLRP12'nin yerine diğer NLR'lerin ortaya çıktığını göstermektedir. NLRP12 -/- fareler salmonelloza karşı oldukça dirençli olsalar da NLRP12 *S.typhimurium* enfeksiyonu sırasında klasik bir enflamasyon aktivatörü olarak hiçbir rol oynamaz. *S.typhimurium* enfeksiyonu vahşi tip farelerdeki makrofajlardaki NLRP12 mRNA transkriptlerinin seviyesini arttırırken THP-1 monositik hücre hattının *M.tuberculosis* enfeksiyonunun daha önce NLRP12 transkripsiyonunu aşağı düzenlediği gösterilmiştir. Bir çalışmada malaria hastalarından türetilmiş monositlerde ve fare modellerinde NLRP3/NLRP12'nin varlığını, kaspaz- 1'in NLRP3/NLRP12'ye bağlı aktivasyonunun muhtemel olduğu sonucuna varmasına neden olduğunu göstererek IL-1 $\beta$ 'in sistemik ekspresyonunu düzenleyen ve malaria hastalarının sekonder bakteriyel enfeksiyonlara aşırı duyarlı olmasına aracılık etmektedir. NLRP12 inflamasyonunun enfeksiyonlarla mücadelesindeki rolü sporadik görünmekte olup NLRP12'nin eyleminin içeriğe bağlı olması ve uyarıcıların spesifik yapısına duyarlı olması, aksi takdirde NLR ailesinin diğer üyelerinin gereksiz eylemleri tarafından maskelenmesi mümkündür. NLRP12'nin inflamasyon sırasındaki düzenleyici rolüne uygun olarak NLRP12 genindeki mutasyonların bazı ailevi soğuk otoenflamatuar sendrom formlarını içeren NLRP12AD adı verilen yeni bir oto-enflamatuar sendrom sınıfı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. NBD içinde yer alan nonsense mutasyon p.Arg284X'in vahşi tip NLRP12 ile karşılaştırıldığında NF-kB aktivitesinin baskılanmasında nasıl daha az etkili olduğunu göstermişlerdir. Enflamasyona neden olan fonksiyon kaybıyla paralel olarak bir birleştirme kusur üreten bir yerleştirme de NF-kB sinyaline NLRP12 inhibe edici özellikleri net bir azalmaya neden olmaktadır. NBD içinde haritalanan missense mutasyon p.Asp294Glu NF-kB sinyallemesinin inhibisyonundan ziyade

artan kaspaz-1 aktivasyonu ile birleşmektedir. CpG bölgesini (p.Arg352Cys) içeren başka missense mutasyon proteinin nükleotit bağlama bölgesini kodlayan NLRP12'nin 3. Eksonunda tanımlanmıştır. Bu yine NF-kB sinyallemeşi üzerinde, leke oluşumunda ve aktif kaspaz-1 sinyallemeşinde artan bir etki göstermemektedir. NLRP12AD'li hastaların PBMC'lerinin sağlıklı bireylerden PBMC'lerle karşılaştırıldığında kendiliğinden çok miktarda IL-1 $\beta$  salgıladığı gösterilmiştir. NLRP12'nin periyodik ateş sendromundaki fizyolojik alaka düzeyi kesin olmasına rağmen NF-kB yolunu düzenlemek için hareket etme şekli tanımlanmaya devam etmektedir. NLRP12'nin NF-kB sinyallemeşi ve enflamasyonu üzerindeki inhibitör rolü in vivo kolon enflamasyonu ve kolorektal kanser modellerinde de incelenmiştir. NLRP12-/- farelerden alınan kemik iliğı kaynaklı makrofajlar, kanonik NF-kB yolağıının düzenlenmesinde NLRP12'nin rolünü destekleyen LPS uyarmasına cevap olarak artan pp105/NF-kB1 göstermektedir. NLRP12-/- fareler kolon iltihabına karşı oldukça hassas olup NF-kB ve ERK aktivasyonu yoluyla proinflatuar sitokin ve kemokinlerin üretiminde çarpıcı bir artış göstermektedir. NLRP12'nin NF-kB sinyallemeşi ve enflamasyonu üzerindeki inhibitör rolü, in vivo kolon enflamasyonu ve kolorektal kanser modellerinde de incelenmiştir. NLRP12-/- fareler kolonilerindeki ve barınma koşullarındaki farklılıkların bağırsak mikrobiyotasını ve enflamatuar sinyalleme eşiğini etkilemesi mümkündür. NLR'ler patojen / hasar algılamasından enflamatuar sinyalleşme ve antijen sunumunun modülasyonuna kadar çeşitli işlevlerde rol oynayan heterojen bir protein grubunu temsil etmektedir (Tuncer et al., 2014). İn vitro ve in vivo deneylerin uzlaştırılması zordur ve NLRP12'nin farklı deney ortamlarında enflamasyonu hafifletip azaltmadığını veya aktive etmesinin belirlenmesinde birçok faktör rol oynayabilmektedir. NLRP-/- fareleri Walker A ve Walker B sekanslarını içeren bir ekson 3 bölgesini neomisin direnç geni ile değıştirerek üretildi. İnsan NLRP12'sine benzer olarak murin NLRP12'si BM ve dalakta ve nötrofiller ve DClerde hücresele düzeyde eksprese edilmiştir (Arthur et al., 2010). Mikroplar, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik kronik yaralar gibi bazı kronik enflamatuar bozukluklarda gösterildiğı gibi dokulara zarar verebilecek enflamasyonu güçlendirmek ve sürdürmek için kritik bir bileşen olmaktadır (Rosenfeld et al., 2011).

Hatalı mutasyon p.Asp294Glu ATP bağlanması için temel olan ve fenotipte konservatif bir değişikliğe dahi izin vermeyen 294 pozisyonu dahil evrimsel olarak korunan bir domeni etkilemektedir. S. Borghini ve arkadaşları WT NLRP12 cDNA'sını klonlayarak yapının p.Asp294Glu mutant versiyonunu NF-kB kanonik yolu üzerindeki in vitro etkilerini incelemek için hazırlamışlar. Hatta Jeru ve arkadaşlarının önceki çalışmasındaki bulguların aksine IRAK-1 ve MyD88 ekspresyon vektörleri kullanılarak yapılan transfeksiyon deneyleri ile gösterildiği gibi NLRP12'nin p.Asp294Glu mutantının NF-kB sinyali üzerindeki inhibitör özelliklerinde belirgin azalma gözlemlenmedi. Mutant NLRP12 geninin NF-kB aktivasyonu üzerindeki p65 etkisi test edilememiştir. Aslında NLRP12'nin NF-kB sinyalleri üzerindeki inhibe edici aktivitesinin hem TLR hem de TNF reseptör yollarının başlangıç aşamalarına etki ettiği NLRP12 yapılarının transfeksiyonu p65'in zorla ekspresyonu tarafından indüklenen NF-kB aktivitesini inhibe edememiştir. Ye ve arkadaşlarına göre ATP bağlanma domeninin bozulması kanonik ve kanonik olmayan NF-kB aktive edici yolları etkileyerek NLRP12'nin antiinflamatuvar aktivitesini azaltmaktadır. NLRP12'nin inhibitör etkisini hala bilinmeyen NF-kB'den bağımsız bir yolla uygulanabileceğini düşündürmektedir. İn vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrol hücrelerinde karşılaştırılabilir olan TNF $\alpha$  stimülasyonuna bir cevap gösteren hasta monositlerinde NF-kB aktivite seviyelerinin değerlendirilmesiyle doğrulanmıştır. NLRP12 mutasyona uğramış monositlerin IL-1 $\beta$  salgılanmasının analizi salgılanan sitokinin global seviyesinin sağlıklı monositlerde olduğu kadar karşılaştırılabilir olmasına rağmen salgılanmanın kinetiğinin hızlandığını ortaya koymuşlar. İlginç bir şekilde hem ROS hem de antioksidanların daha yüksek bazal seviyeleri ve TLR tetiklemesi üzerine antioksidan sistemlerinin daha hızlı düzenlenmesi ile karakterize edilen aynı redoks imzası NLRP12 mutasyonu olan hastalardan gelen monositler tarafından paylaşılmıştır. IL-1 $\beta$  salgılanmasının kinetiği ve redoks remodelingi arasındaki fonksiyonel ilişkiyi doğrulamaktadır. S. Borghini ve arkadaşları NLRP12 mutasyonlarının patogenezi tamamen açıklanmamış, değişmiş bir redoks durumundan dolayı IL-1 $\beta$  salgılanmasının kuralsızlaştırılmasının ve stres yanıtının ilgili bir rol oynayabileceğini önermişler.

NLRP12'nin mikrobiyal bileşenlere yanıtında, kolit ve kolorektal

tümörögenizde NF-kB ve ERK yollarının aktivasyonunu kontrol ederek proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin baskılanmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. NLRP12 eksikliği enflamatuvar sinyal yollarını azaltmadaki bir başarısızlıkla kolit ve kolitle ilişkili tümörögenize duyarlılığının artmasına yol açtığını göstermiştir (HasanZaki et al., 2011). Makrofajlardaki NLRP12 aktivitesinin kolon enflamasyonu ve tümörögenizin azaltılmasında önemli bir rol oynadığını önermektedirler. Miyeloid bölmesindeki NLRP12 aktivitesinin kolit ile ilişkili kolon tümör oluşumuna karşı korunmada kritik olduğunu göstermektedirler. NLRP12 eksikliği olan makrofajlar NF-kB ve ERK aktivasyonunun artmış olduğunu gösteren TLR ligandlarına aşırı duyarlı olmaktadır. Tümör dokusunda artan makrofaj yoğunluğu insan kanserinin kötü prognozu ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır (Chen et al., 2005). İnsan kolorektal tümörlerinde aktive edilmiş makrofajların IL-6R ve TNF- $\alpha$ , kemokinler KC ve MIP2, matriks metaloproteinazları enzimleri, COX2 ve NOS2'yi ve büyüme faktörleri gibi tümör teşvik eden sitokinleri ürettiğini göstermektedir (Pollard 2010). NLRP12'de mutasyonu olan insan monositik hücrelerinin doğada hiperinflamatuvar olduğu ve inflamatuvar hastalık periyodik ateş sendromuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Jéru et al., 2008). İnsan kolon inflamasyonu ve kolorektal kanserin korunmasında NLRP12'nin kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Tümör ile ilişkili makrofajlar tarafından üretilen birkaç tümöröjenik faktör, NF-kB, STAT3 ve ERK sinyal yolları ile düzenlenmektedir (Greten et al., 2004). NLRP12 yukarı düzenleme iltihabına ve antimikrobiyal tepkiye aracılık eden TLR yolağına karşı negatif bir düzenleyicidir. TLR'nin aktivasyonu ile mikroorganizmalar NLRP12'nin ekspresyon seviyesini etkileyebilmektedir. NLRP12 esas olarak mononükleer hücrelerde eksprese edilmektedir ve TLR yolağında negatif bir regülatör görevi görmektedir (Williams et al., 2005). Proteinin NBS domeni içinde missense mutasyon (p.Arg352Cys) tanımlanmıştır (Jéru et al., 2011). NLRP12 ile ilişkili bozuklukları olan geniş bir ailede soğukta maruz kalmaya karşı özel bir duyarlılık gözlemlenmiştir (Gattorno et al., 1995). p.Arg352Cys sekans varyasyonu popülasyon eşleşmeli DNA kontrollerinde (İtalya'dan n=104) bulunmamıştır, bu varyantın sık sık bir polimorfizm olmadığını göstermiştir (Jéru et al., 2011). NLRP12, dendritik hücrenin (DC) lenf nodlarına iletim kapasitesini etkileyebilmektedir. Bu da temas aşırı duyarlılığındaki immün yanıtı etkilemektedir (Arthur et al., 2010).

PLCG2 1-fosfatidil-1D-miyo-inositol 4,5-bifosfatın 1D-miyo-inositol 1,4,5-trisfosfata (IP3) ve diasilgliserin (DAG) dönüşümünü katalize eden bir transmembran sinyal enzimi olmaktadır. IP3 ve DAG büyüme faktöründen ve immün sistem reseptörlerinden gelen sinyalleri hücre zarı boyunca iletmek için önemli olan ikinci haberci moleküllerdir. Protein PLCG2 bağışıklık sisteminin kompleks düzenlenmesinde önemli olan sinyal molekülü olmuştur. Murin PLCG2'deki fonksiyon kazancı mutasyonu proliferatif glomerulonefrit dahil enflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. R665W'nin fonksiyonel sonuçlarını değerlendirmek için tavuktan türetilmiş bir PLC $\gamma$ 2 eksikliği olan DT40 hücre çizgisi, WT veya mutant insan PLC $\gamma$ 2 ile stabil bir şekilde tanıtılarak  $\alpha$ -IgM tarafından uyarılmıştır. PLC $\gamma$ 2 eksikliği olan DT40 anti-IgM stimülasyonuna cevap vermekte başarısız olurken insan PLC $\gamma$ 2'sinin tanıtılması sinyal olayını geri yükleyebilir. PLCg2R665W'nin kalsiyum akışını arttırdığını ve bu etkinin WT ile karşılaştırıldığında toibrutinib tedavisine dirençli olduğu bulunmuştur. R665W modelinde sağlam  $\alpha$ -IgM stimülasyonundan sonra akış aşağı p-ERK aktivasyonu tepki göstermiştir, oysa WT ise ibrutinib tarafından yeterince engellerken PLCG2, IP3 ve DAG üretmek için zara bağlı substratını temizler. IP3 endoplazmik retikulumdan kalsiyum akmasına neden olur ve protein kinaz C sinyalini tetikler. PLCg2R665W'nin IP3 üretimini artırıp arttırmadığını incelemek için 293T hücreleri WT veya PLCG2R665W ile stabil bir şekilde tanıtılmıştır. IP1 birikimi ile ölçülen IP3 üretimi PLCG2R665W'de yükselerek R665W mutasyonunun aşağı akış sinyalleşmesini artırarak hiperaktivite kazandığını gösterir.

Fosfolipaz C- $\gamma$ 2'yi (PLC $\gamma$ 2) kodlayan gendeki mutasyonlar Bruton tirozin kinaz inhibitörü ibrutinib ile kronik lenfositik lösemi (CLL) 'nin hedefli tedavisine dirençliliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PLC $\gamma$ 2 üzerine B hücresi antijen reseptörü (BCR) bağlanması sonrası sitosolik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunda 2-3 misli ibrutinib duyarsız bir artış kazandırdığı bu mutasyonların ikisi R665W ve L845F iki mutant yapısal olarak arttırılmış esas aktivite göstermiştir. İki PLC $\gamma$ 2 mutantının Rac2 tarafından aktivasyona karşı aşırı duyarlı olduğunu ve böylece vahşi tip Rac2'nin bile mutant enzimlerin bozulmamış hücrelere girmesi üzerine aktive olmaya yettiğini göstermektedir. Sağlam hücrelerde PLC $\gamma$ 2'nin arttırılmış "bazal" aktivitesi yapısal olarak arttırılmış PLC $\gamma$ 2 aktivitesinden ziyade Rac tarafından uyarılan Rac direncine aracılık eden farmakolojik Rac inhibitörü EHT 1864 ve PLC $\gamma$ 2 F897Q mutasyonu gösterilmiştir (Walliser et al., 2016).

PLCG2 32 ekzon içeren büyük bir genidir. PLCG2'deki mutasyonların embriyogenezde veya erken gelişmede öldürücü olan bir fenotiple sonuçlanabilir (Wang et al., 2001). PLAID ile ilişkili PLCG2 delesyonları PLCG2'nin enzimatik aktivitesini yukarı akış yollarına bağlayan otoinhibitör cSH2 domeni dahil olmak üzere düzenleyici bölgeyi etkilemektedir. cSH2'nin PLC $\gamma$ 2 katalitik bölgesini tıkadığı ve bu inhibitör etkileşimin PLC $\gamma$ 2'de konformasyonel bir değişimi kolaylaştıran ve katalitik bölgeyi açığa çıkaran kritik tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile hafifletildiği hipotezi ile tutarlıdır (Macaluso et al., 2007). PLCG2, B hücresi aktivasyonunda rol alan proteinleri etkileyen mutasyonlarla ilişkilidir. Üç ailedeki delesyonlar anormal rekombinasyon olaylarını kolaylaştırdığı bilinen tekrarlayan elementler bakımından zengin bir PLCG2 bölgesinde meydana geliyor. Altı delesyon sınır değerinin beşi tekrarlayan elementler içinde meydana gelmiş bu ise sporadik PLAID vakalarının, de novo veya PLCG2 'deki somatik mutasyonlardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. PLC $\gamma$ 2 mutant formlarının etkileri lökosit fonksiyonundaki rolü konukçu savunması ve kendi kendine toleransı dahil olmak üzere fosfolipaz aracılı sinyalleme hayati unsurlarını aydınlatmaktadır (Ombrello et al., 2012). İnsan hücrelerinde ekspresyon modeline ve PLCG2'nin sinyal iletim yollarındaki rolüne bağlı olarak PLCG2'deki mutasyonların bağışıklık tipi bozukluklarına yol açmaktadır. 16p13-q22 inversiyon sınır değerlerinde genomik diziler tanımlanmamış gen olmasına rağmen klonlanmıştır (Dauwerse et al., 1993). PLCG2'nin bu bağışıklık sistemi kanserlerinde yer alıp almadığını belirlemek için klonlanmış kesme noktalarına göre PLCG2'nin tam yerini belirlenebilir (Argeson et al., 1994). PLCG2'deki hiper-morfik değişikliklerle gelişmiş sinyalleşmenin altında yatan kesin değişiklikler açıklanmaya devam etse de insanlarda PLCG2 hastalığına bağlı missense mutasyonların geçmişte tanımlanmadığı düşünüldüğünde PLCG2 biyolojisi alanında önemli ilerleme sunulmaktadır. PLCG2 delesyonları olan bireylerdeki bulgularla uyumlu olarak etkilenen bireyler aynı genin aynı bölgedeki mutasyonlarla oluşabilecek geniş fenotipik değişkenlik göstermektedir. Geniş fenotipik farklılıklar bozulmuş B hücre hafızası ve immüoglobulin üretimi arasındaki benzerliklerin yanı sıra çok çeşitli hastalıkların PLCG2 mutasyonlarından kaynaklanabileceğini ve humoral immün sisteminin ve çeşitli inflamasyon formlarının dahil olduğunu ortaya koymaktadır. PLCG2 yolunda bir oto-enflamatuar hastalığın nedeni olarak bir

mutasyon tanımlanmıştır (Zhou et al., 2012). Sinyal transdüksiyonu ve protein sentezi ile ilgili birçok genin ekspresyonunun T hücreleri üzerindeki spesifik olmayan diğer uyarıcılara karşı farklı şekilde değiştiği bulunmuştur. NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenebilecek  $\gamma$ - radyasyon, fosfolipaz C $\gamma$ 2 ve sitoplazmik epoksit hidrolaz tarafından indüklenen iki yeni gen üzerinde durulmuştur. Membranlarda fosfolipitlere etki eden fosfolipazlar tarafından üretilen lipitlerden ve ya lipid türevli ürünlerden birçoğu sinyal iletimi sırasında aracılar ve ikinci haberciler olarak gösterilmiştir. İyonlaştırıcı radyasyonun sitokin reseptörleri ve G proteinlerinin ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (Fuks et al., 1993). Bu reseptörlerin ve G proteinlerinin sinyalini veren akış yönünde fosfolipaz C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), protein kinaz C (PCK)/ Ras / Raf ağı muhtemelen proliferatif yanıtta rol oynamaktadır (Dent et al., 1995). PLCG2'nin yukarı akış promotörü SP1, NF1, AP2 ve EBF'yi içerir ve PLCG2'nin NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenmesini önermektedirler. PLC geninin indüklenmesinin proliferatif potansiyeli arttırmak için bir tür adaptif cevap olduğunu varsayılmıştır (Denekamp et al., 1973). *In vivo* olarak immün sistemin sinyalizasyonu ve fonksiyonel serbest bırakılması ile bağlantılı Plcg2'de bir fonksiyon kazancı mutasyonu tanımlanmaktadır (Yu et al., 2005). B hücrelerinin sinyal bağlamında Plcg2<sup>Ali5</sup>'teki mutasyon baskın bileşen olarak hücre dışı kalsiyum akışı ile artan ve sürekli kalsiyum tepkilerine neden olmaktadır. Plcg2'nin PI-3K ve Btk-aracılı aktivasyonunu içerir; bu IP3 üretiminin kalsiyumun iç iç endoplazmik retikulum depolarından ve daha sonra plazma membranının depo tarafından işletilen kanallarından (SOC'ler) sitoplazmaya akmasına neden olmaktadır. DT40 hücre hattını kullanan *in vitro* deneyler Plcg1 ve Plcg2'nin plazma membran kalsiyum kanallarının aracılık ettiği harici Ca<sup>2+</sup> girişini kontrol edebileceğini göstermiştir. Lipaz eksikliği olan bir mutant olan PLC $\gamma$  aktif olduğu ve muhtemelen genellikle ürettiği ikincil habercilerden bağımsız olarak çalışan bir sistemdir (Patterson et al., 2002). PLC $\gamma$ 'nin katalitik fonksiyonunun mutlak bir gerekliliğinin bulunmaması PLC $\gamma$ 'nin klasik SOC'ler veya depo tüketmeden bağımsız kalsiyum kanalları üzerinde doğrudan bir etkisi olduğu anlamına gelir (Putney et al., 2002). D993G amino asit değişikliği negatif yüklü olan iç plazma zarı ile yakınlaşması gereken molekülün kritik bir yükü uzaklaştırır ve mutasyona uğramış Plc $\gamma$ 'nin azaltılmış bir itme olabilir (Yu et al., 2005). Dominant kalıtsal soğuk ürtiker sendromu ve pleiotropik immün düzensizliği sendromu olan üç ailede PLCG2'deki genomik

delesyonlar fenotipden sorumlu olmaktadır. PLAID B hücrelerinde azalmış reseptör aracılı sinyalleşme, antikor eksikliği, tekrarlayan enfeksiyon ve bozulmuş merkezi toleransla ilişkilendirilen anormal aktivasyon, sınıf anahtarı rekombinasyonu ve reseptör düzenlemesi ile sonuçlanmaktadır. PLAID ile ilişkili PLCG2 delesyonları normal olarak PLCG2'nin enzimatik aktivitesini yukarı akış yollarına bağlayan oto-inhibitör cSH2 domeni dahil olmak üzere düzenleyici bölgeyi etkilemektedir. PLAID ile ilişkili delesyonlar standart enzimatik deneylerle ölçüldüğü üzere otomatik inhibisyonun ve kurucu fosfolipaz aktivitesinin başarısızlığına yol açmaktadır. Dinlenme halinde cSH2'nin PLC $\gamma$ 2 katalitik bölgesini tıkadığı ve bu inhibitör etkileşimin PLC $\gamma$ 2'de konformasyonel değişimi kolaylaştıran ve böylece katalitik bölgeyi açığa çıkaran kritik tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile hafifletildiği hipotezi ile tutarlı olmaktadır. Artan fosfolipaz aktivitesi PLC $\gamma$ 2'ye yakın substrat PIP2'nin tükenmesine yol açarak IP3 üretimi ve IP3 kaynaklı kalsiyum salınımının bozulmasına neden olmaktadır ve PLC $\gamma$ 2 ürünlerinin aşırı yüksek konsantrasyonları, distal sinyal yollarının geri besleme aracılı aşağı regülasyonunu indükleyebilmektedir. Anormal rekombinasyon olaylarını kolaylaştırdığı bilinen tekrarlayan elementler bakımından zengin PLCG2 bölgesinde meydana gelmektedir. Altı delesyon sınır değerinin beşi tekrarlayan elemanlar içinde meydana gelerek sporadik PLAID vakalarının de novo veya PLCG2'deki somatik mutasyonlardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. PLAID ile ilişkili PLCG2 mutasyonları ve ortaya çıkan fenotipler atopik bir fenotip tarafından tanımlanan monogenik hastalığın nadir örneği sağlanmıştır. PLC $\gamma$ 2 mutant formlarının etkileri lökosit fonksiyonundaki rolü, konukçu savunması ve kendi kendine toleransı dahil olmak üzere fosfolipaz aracılı sinyalleşmenin hayati unsurlarını aydınlatmaktadır.

Tüm memeli NLR'ler gibi NAIP5 ve NLRC4 iki korunmuş bir nükleotid bağlayıcı domeni (NBD), sarmal domeni 1 (HD1), kanatlı helis domeni (WHD), sarmal domeni 2 (HD2) ve lösin açısından zengin tekrar domeni (LRR) içerir (Bkz. Şekil 4.2A). Ek olarak NLRC4 fakat NAIP5 bilinmeyen fonksiyona sahip üç baculovirüs apoptoz tekrar inhibitörü (BIR) domeni içeren kaspaz-1'i toplayan bir CARD içerir. *Legionella pneumophila* flagelline (FlaA) bağlı NAIP5-NLRC4 enflamasomun yapısını belirlemek için kriyo-EM kullanılmıştır. NAIP-NLRC4 enflamasomunun önceki ortalama rekonstrüksiyonlarının ve apoptozomlar gibi

ilişki komplekslerin yapılarının aksine kapalı gibi görünen önemli sayıda halka gözlemlenmiştir (Bkz.Şekil 4.2B).Halka kapanma eksikliği NAIP5'teki donör yüzeyinin NLRC4 üzerindeki konjuge alıcı yüzeyini toplaması ve aktive etmesine rağmen, NLRC4'teki donör yüzeyinin sadece ilave NLRC4 protomerleri ile etkileşime girebilmesi ve halkayı bir etkileşime girerek kapatamaması gibi NAIP5 akseptör yüzeyi ile tutarlı olduğu görülmüştür. NAIP5 ve NLRC4 arasındaki yapısal homoloji oligomerizasyona aracılık eden bölgelerde yüksek olsa da (Bkz.Şekil 4.2E), NAIP5 ve NLRC4'ün bazı bölgeleri özellikle HD2 ve LRR (Bkz.Şekil 4.2F) nispeten farklı olduğu bilinmektedir (Tenthorey et al.,2017). NLRC4'ün flagellin ve çubuk proteinleri yoluyla T3SS'yi tespit etmedeki rolü ilk önce *S.typhimurium* ve *L.pneumophila* ile makrofajlarla etkileşimlerini inceleyen araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. NLRC4'ün epitelyal hücreler tarafından değil makrofajlar tarafından ifade edilmesi ve *S.typhimurium*'un iki hücre tipini hedef almak için farklı virülans faktörlerini kullanmasıdır. *S.typhimurium* flagelline baskı yaparak ve NLRC4 tarafından tespit edilmeyen bir çubuk proteinini eksprese ederek NLRC4'ten kaçınır. *S.typhimurium* NLRC4 tarafından saptanan bir çubuk(rod) proteini eksprese etmek için değiştirildiğinde NLRC4 kaçınma önemini vurgulayarak sistemik enfeksiyon sırasında temizlenir. *S.typhimurium* enfeksiyon sırasında NLRC4'ten tamamen kaçamaz. Kaspaz-1 eksikliği olan fareler *S.typhimurium* enfeksiyonuna karşı artan bir duyarlılığa sahip olarak NLRC4 ve NLRP3 sinyalleşmesinin birleşik etkisine bağlanmıştır(Tejero et al., 2006). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi PrgJ rod proteinine veya flagelline NLRC4 yoluyla cevap verme şansına sahip olmaktadır (Sutterwala et al., 2008).

Mutant NLRC4 kaspaz-1'i aktive ederek IL-1 $\beta$  sekresyonunu arttırmaktadır.Mutant Nlrc4 proteini tarafından indüklenen enflamatuar yanıtlar nötrofil infiltrasyonu ile uyum içinde hareket etmek IL-1 $\beta$  ve IL- 17A'ya bağlı olmaktadır. IL-17A üretimi T hücrelerine değil, nötrofillere bağlı olmaktadır.NLRC4 inflamatörü *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella enterica* dahil olmak üzere çoğu Gram-negatif hücre içi bakteriye verilen yanıtlar için çok önemlidir (Miao et al., 2010). NLRC4 bakteriler tarafından eksprese edilen flagellin proteini ve *Salmonella* tip III salgılama sisteminin bazal gövde çubuğu bileşeni tarafından aktive edilebilmektedir.

NLRC4'teki bir mutasyonun flagellin veya bazal gövde çubuğu bileşeni aracılı stimülasyonun yokluğunda NLRC4 iltihabı oluşumunu arttırdığını göstermektedir. Mutasyon NOD bölgesinde bulunduğu göre diğer NLRC4 monomerlerinin bağlanma afinitesi(ilgisini) artırarak NLRC4'ün oligomerizasyonunu artırabilmektedir. Mutant NLRC4'ün dış kaynaklı herhangi bir uyarın olmadan oligomerizasyonunu, FCAS hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinden IL-1 $\beta$  üretiminin ve bakteri ürününe yanıt olarak kontrol grubundan daha fazla arttırdığı saptanmıştır. Vahşi tip ve mutant NLRC4 proteinlerinin yapılarının karşılaştırılması ile mutant NLRC4 ve ayrıca vahşi tip NLRC4 için aktivasyon mekanizmalarının ortaya çıkmasına yardımcı olabildiği öne sürülmüştür. NLRP3 ve NLRC4'teki mutasyonlar muhtemelen farklı moleküler ağlar yoluyla IL-17A'nın üretimine yol açmaktadır. NLRC4 polimorfizmlerinin atopik dermatit ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Otoinflamatuvar sendromlu hastalarda ve inflamatuvar bozukluğu olan hastalarda NLRC4 genotipleri – fenotipleri ilişkisini karakterize etmek önemlidir (Akiko Kitamura et al., 2014). Düşük NLRC4 protein ekspresyonuna rağmen T337S hücrelerinde artmış spontan kaspaz-1 bölünmesi ölçülmüştür. T337S hücrelerinden türetilen makrofajlar IL-1 $\beta$ 'nin salgılanmasını göstermiştir (Scott W Canna et al., 2014). NLR proteinleri toplanma eğiliminde olan saflaştırılması zor olan nispeten çok domenli proteinlerdir. CARD domeninin kaldırılması kristalleşmeye izin vermek için kritik olduğu kanıtlanmıştır. NLRC4'ün otomatik olarak inhibe edilmiş yapısı apoptozu düzenleyen NBD içeren protein olan Apaf-1'in inhibe edilmiş yapılarına benzemektedir. NLRC4'ün otomatik inhibisyonu kompakt bir üçüncül katlamayı stabilize eden alan-içi temasları içermektedir. NBD ile HD2 ve LRR domenleri arasındaki domen - içi temasların kapalı ve aktif olmayan bir konformasyonu stabilize etmektedir. NLRC4'ten başka NAIP proteinlerinin hiçbiri için kristal yapı bildirilmemiştir (E Vance et al., 2015).

Bu çalışmada NLRP12 geninde 10 mutasyon, PLCG2 geninde 9 mutasyon ve NLRC4 geninde ise 6 mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların hepsi farklı mutasyonla ilişkili olup İNFEVERS, PolyPhen2 veritabanında bildirilen verilere benzemektedir.

Saptadığımız mutasyon ve lokasyonu genotip ve fenotip ilişkileri, Otoinflamatuvar hastalığının tanısında ve danışmanlığında NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 gen testinin faydasını belgelemekte olup bu mutasyonlar hakkında ayrı ayrılıkta veriler sunmaktadır.

PCR, 0,2 ml ince duvarlı PCR strip tüplerinde (Axygen Scientific, Inc., CA), 25 µl reaksiyon karışımında Veriti Gradyentli PCR System ( PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 1µl genomik DNA solüsyonu, Invitrogen Platinyum Enhancer Buffer (15 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/l KCl; PE Applied Biosystems), 1.5 mmol MgCl<sub>2</sub>, dGTP, dATP, dTTP ve dCTP ( Promega, Madison, WI)'nın her birinden 50µmol/l, sense ve antisense primerlerin herbirinden 5 pmol ve 1.0 U Invitrogen Platinyum Taq Polimeraz kullanılır.

PCR siklusu aşağıdaki şekilde uygulanmıştır: 950C'de 10 dk; 950C'de 30 sn, 560C'de 45 sn ve 720C'de 1 dk uygulamasını 35 siklusu ve 720C'de 7 dk final uzatma. Amplifikasyon her egzon için farklı boyutlarda PCR ürünleri ile sonuçlanır. Pozitif PCR ürünlerinin görüntülenmesi etidyum bromür ile boyanmış ve 1xTBE buffer içerisindeki %2.0 agaroz (15x15 cm) jelde elektroforez yapılarak Dijital Jel Görüntüleme sisteminde yapılır. Pozitif PCR ürünleri EXO-SAP enzim karışımı kullanılarak enzimatik yöntemle saflaştırılır. Pürüfiye PCR ürünü yeniden %2 'lik agaroz jel elektroforozunda kontrol edilir. Jelde görüntülenen PCR ürünleri cycle sequencing PCR işlemine tabi tutulur. Bu amaçla BigDye Terminatör (PE Applied Biosystems) Cycle Sequencing PCR kiti (versiyon 3.2) kullanılır. Önce reverse primer kullanılarak PCR işlemi aşağıdaki protokole göre yapılır. BigDye 8 µl, tek zincir DNA 10 ng, primer 3.2 pmol ve reaksiyon volümü deiyonize su ile 20µl'ye tamamlanır. PCR koşulları 96 0C 10 sn, 50 0C 5 sn, 60 0C 4 dk ve 25 siklus olmakla Veriti Termal Cyler makinesinde yapılır. PCR sonucu sonrası ürün BigDye XT solüsyonu ile karıştırılarak ek boyadan arındırılır. Nükleotid dizilimi otomatik ABI 3130 Genetic Analyzer ( PE Applied Biosystems) sisteminde polimer jel elektroforezi kullanılarak (POP-7) DNA sekanslama yöntemi ile elde edilir. Elde edilen nükleotid dizilimi analizi yapılan genin dizilimi (NM\_144687.3) ile karşılaştırılarak Gene Scan bilgisayar programında değerlendirilecektir.

Verilerimiz PCR analiziyle yapılan moleküler genetik testi Otoinflamatuvar hastalığının kesin teşhisi için doğru araç olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca CAPS benzeri klinik özelliklere sahip FCAS2,FCAS3,FCAS4 gibi hastalıkların ayırt edilmesinde ve genotip/fenotip ilişkisinde yarar sağlamaktadır.

Bu çalışmada FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromu hastalıklarının nedensel genleri olan NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 genlerinin DNA dizisinde, protein kodlayan eksonlarında ve biyolojik anlamı olan intron bölgelerinde saptanan tüm nükleotit yer değişimlerinin incelenmesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 8. SONUÇ

Bu çalışmada FCAS2, FCAS3, FCAS4 sendromlu hastalıkla ilişkili NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 geninde saptanan mutasyonlar çalışılmıştır.

NLRP12 geninde 11 hastada DNA dizisinde mutasyona sebep olan tüm nükleotit yer değişimleri saptanmıştır. Çalışmada 2 hastada Thr260Met mutasyonu ve His304Tyr, Phe402Leu, Arg1016\* , Gly448Ala, Gly39Val, Arg352Cys, Arg329Gln net, Ile474Phe mutasyonları saptanmıştır. Mutasyonlar NLRP12 geninin 1.ekson, 3.ekson ve 9.eksonunda saptanmıştır

PLCG2 geninde 9 hastada DNA dizisinde mutasyona sebep olan tüm nükleotit yer değişimleri saptanmıştır.Çalışmada Gly805Asp, Asr798Ser, Ala776Thr, His257Leu, Tyr482His, Met28Leu, Ser110Asr, Ile671Val, Asr1096Del mutasyonları saptanmıştır. Mutasyonlar PLCG2 geninin 2., 10., 15., 19., 22., 29., 30. eksonunda saptanmıştır.

NLRC4 geninde 5 hastada DNA dizisinde mutasyona sebep olan tüm nükleotit yer değişimleri saptanmıştır.Çalışmada Gly786Val, Arg310\* , Ala160Thr, Ala622Val, Ile811Thr, Arg204Hrs mutasyonları saptanmıştır. Mutasyonlar NLRC4 geninin 4.,6. eksonunda saptanmıştır.

Kontrol grubunda hastalıkla ilişkili NLRP12, PLCG2, NLRC4 geninde hiçbir mutasyona rastlanmamıştır.

Sonuç olarak tezde sağlıklı ve otoinflamatuvar klinik ve laboratuvar bulguları olan hastalarda NLRP12, PLCG2 ve NLRC4 gen analizi yapılarak hastalıkların nedensel genetik varyantları, saptanmış, proteine etkileri ve genotip / fenotip ilişkileri sunulmuştur.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelaziz, D.H., Amr, K. and Amer, A.O.**, 2010, *Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: More than a flagellin sensor*, 789-791
- Abe, K., Fuchs, H., Boersma, A., Hans, W., Yu, P., Kalaydjiev, S., Kluft, M., Adler, T., Calzada-Wack, J., Mossbrugger, I., Rathkolb, B., Rozman, J., Prehn, C., Maraslioglu, M., Kametani, Y., Shimada, S., Adamski, J., Busch, D.H., Esposito, I., Klingenspor, M., Wolf, E., Wurst, W., Gailus-Durner, V., Katan, M., Marschall, S., Soewarto, D., Wagner, S. and Angelis, M.H.**, 2011, *A novel N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation in phospholipase C $\gamma$ 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and male infertility in vitro in a murine model*, 30280
- Aderibigbe, O.M., Priel, D.L., Lee, C.R., Ombrello, M.J., Prajapati, V.H., Liang, M.G., Lyons, J.J., Kuhns, D.B., Cowen, E.W. and Milner, J.D.**, 2015, *Distinct Cutaneous Manifestations and Cold-Induced Leukocyte Activation Associated With PLCG2 Mutations*, 627-634.
- Argeson, A.C., Druck, T., Veronese, M.L., Knopf, J.L., Buchberg, A.M., Huebner, K. and Siracusa, L.D.**, 1995, *Phospholipase C  $\gamma$ -2 (*Plcg2*) and phospholipase C  $\gamma$ -1 (*Plcg1*) map to distinct regions in the human and mouse genomes*, 80106.
- Arthur, J.C., Lich, J.D., Ye, Z., Allen, I.C., Gris, D., Wilson, J.E., Schneider, M., Roney, K.E., O'Connor, B.P., Moore, C.B., Morrison, A., Sutterwala, F.S., Bertin, J., Koller, B.H., Liu, Z. and Ting, J.P.Y.**, 2010, *Cutting Edge: NLRP12 Controls Dendritic and Myeloid Cell Migration To Affect Contact Hypersensitivity*. *The Journal of Immunology*, 4515-19.
- Bønnelykke, Sparks, K.R., Waage, J. and Milner, J.D.**, 2015, *Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations*, 115-126.
- Borghini, S., Tassi, S., Chiesa, S., Caroli, F., Carta, S., Caorsi, R., Fiore, M., Delfino, L., Lasigliè, D., Ferraris, C., Traggiai, E., Duca, M.D., G. Santamaria, G., D'Ossualdo, A., Tosca, M., Martini, A., Ceccherini, I., Rubartelli, A., M. and Gattorno, M.**, 2010, *Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an *NLRP12* mutation*, 30170.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borte, S., Celiksoy, M.H., Menzel, V., Ozkaya, O., Ozen, F.Z., Hammarström, L. and Yildiran, A.,** 2014, Novel NLRP12 mutations associated with intestinal amyloidosis in a patient diagnosed with common variable immunodeficiency, 105-111
- Breuning, M.H., Dauwerse, H.G., Fugazza, G., Saris, J.J., Spruit, L., Wijnen, H., Tommerup, N., Hagen, C.B., Imaizumi, K., Kuroki, Y., Boogaard, M.J., Pater, J.M., Mariman, E.C.M., Hamel, B.C.J., Himmelbauer, H., Frischauf, A.M., Stallings, R.L., Beverstock, G.C., Ommen, G.J.B. and Hennekam, R.C.M.,** 1993, Rubinstein-Taybi syndrome caused by submicroscopic deletions within 16p13.3. *American Journal of Human Genetics*, 249-254.
- Canna, S.W., Jesus, A.A., Gouni, S., Brooks, S.R., Marrero, B., Liu, Y., DiMattia, M.A., Zaal, K.J.M., Sanchez, G.A.M., Kim, H., Chapelle, D., Plass, N., Huang, Y., Villarino, A.V., Biancotto, A., Fleisher, T.A., Duncan, J.A., O'Shea, J.J., Benseler, S., Grom, A., Deng, Z., Laxer, R.M. and Goldbach-Mansky, R.,** 2014, An activating *NLR4* inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome, 1140-46.
- Chae, J.J., Park, Y.H., Park, C., Hwang, I.Y., Hoffmann, P., Kehrl, J.H., Aksentijevich, I. and Kastner, D.L.,** 2014, Brief Report: Connecting Two Pathways Through Ca<sup>2+</sup> Signaling: NLRP3 Inflammasome Activation Induced by a Hypermorphic *PLCG2* Mutation, 38961.
- Chen, L., Wilson, J.E., Koenigsnecht, M.J., Chou, W., Montgomery, S.A., Truax, A.D., Brickey, W.J., Packey, C.D., Maharshak, N., Matsushima, G.K., Plevy, S.E., Young, V.B., Sartor, R.B. and Ting, J.P.,** 2017, NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth. *Nature Immunology*, 18:541-551.
- Dent, P., Reardon, D.B., Morrison, D.K. and Sturgill, T.W.,** 1995, Regulation of Raf-1 and Raf-1 Mutants by Ras-Dependent and Ras-Independent Mechanisms In Vitro. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 4125-35

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diebold, C.A., Halff, E.F., Koster, A.J., Huizinga, E.G. and Koning, R.I.,** 2015, Cryoelectron Tomography of the NAIP5/NLRC4 Inflammasome: Implications for NLR Activation, 2349-57.
- Fuks, Z., Haimovitz, A., Friedman, Ph.D., Hallahan, D.E., Kufe, D.W., Ralph R. and Weichselbaum, R.R.,** 1993, Stress response genes induced in mammalian cells by ionizing radiation. *Radiation Oncology Investigations*, 1:81-93.
- Gbadegesin, R.A., Adeyemo, A., Webb, N.J.A., Greenbaum, L.A., Abeyagunawardena, A., Thalagahagoda, S., Kale, A., Gipson, D., Srivastava, T., Lin, J., Chand, D., Hunley, T.E., Brophy, P.D., Bagga, A., Sinha, A., Rheault, M.N., Ghali, J., Nicholls, K., Abraham, E., Janjua, H.S., Omoloja, A., Barletta, G., Cai, Y., Milford, D.D., O'Brien, C., Awan, A., Belostotsky, V., Smoyer, W.E., Homstad, A., Hall, G., Wu, G., Nagaraj, S., Wigfall, D., Foreman, J. and Winn, M.P.,** 2015, HLA-DQA1 and PLCG2 Are Candidate Risk Loci for Childhood-Onset Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome, 1701-10.
- Greten, F.R. and Karin, M.,** 2004, The IKK/NF- $\kappa$ B activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Letter*, 193-199.
- Hafner-Bratkovič, I.,** 2017, The NLRC4 inflammasome: The pieces of the puzzle are falling into place, 10-23.
- Hua, B., Elinava, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowiga, T., Jina, C., Eisenbartha, S.C. and Flavell, R.A.,** 2010, Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4, 21635-40.
- Je'ru, I., Duquesnoy, P., Fernandes-Alnemri, T., E. Cochet, Yu, J.W., Allen, I.C., Wilson, J.E., Schneider, M., Lich, J.D., Roberts, R.A., Arthur, J.C., Woodford, R.M.T., Davis, B.K., Uronis, J.M., Herfarth, H.H., Jobin, C., Rogers, A.B. and Ting, J.P.Y.,** 2012, NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- $\kappa$ B Signaling, 742- 754.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jéru, I., Borgne, G.L., Cochet, E., Hayrapetyan, H., Duquesnoy, P., Grateau, G., Morali, A., Sarkisian, T. and Amselem, S.,** 2011 Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndromes, 30241.
- Jones, D., Woyach, J.A., Zhao, W., Caruthers, S., Tu, H., Coleman, J., Byrd, J.C., Johnson, A.J. and Lozanski, G.,** 2017, *PLCG2* C2 domain mutations co-occur with *BTK* and *PLCG2* resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment, 1645-47.
- Kitamura, A., Sasaki, Y., Abe, T., Kano, H. and Yasutomo, K.,** 2014, An inherited mutation in *NLRC4* causes autoinflammation in human and mice, 2385.
- Lackmy-Port-Lis, M., Grimprel, E., Landman-Parker, J., Hentgen, V., Marlin, S., McElreavey, K., Sarkisian, T., Grateau, G., Alnemri, E.S. and Amselem, S.,** 2008, Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes, 1614-19.
- Lara-Tejero, M., Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Flavell, R.A. and Galán, J.E.,** 2006, Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis, *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6):1407.
- Liu, T., Woyach, J.A., Zhong, Y., Lozanski, A., Lozanski, G., Dong, S., Strattan, E., Lehman, A., Zhang, X., Jones, J.A., Flynn, J., Andritsos, L.A., Maddocks, K., Jaglowski, S.M., Blum, K.A., Byrd, J.C., Dubovsky, J.A. and Johnson, A.J.,** 2015, Hypermorphic mutation of phospholipase C, *g2* acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation, 126(1):61-68.
- Lord, C.A., Savitsky, D., Sitcheran, R., Calame, K., Wright, J.R., Ting, J.P.Y. and Williams, K.L.,** 2009, Blimp-1/PRDM1 Mediates Transcriptional Suppression of the NLR Gene NLRP12/Monarch-1, 2948-58.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Macaluso, F., Nothnagel, M., Parwez, Q., Parwez, E.P., Bechara, F.G., Epplen, J.T. and Hoffjan, S.,** 2007, Polymorphisms in NACHT-LRR (*NLR*) genes in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 1600-06.
- Man, S.M. and Kanneganti, T.D.,** 2015, Regulation of inflammasome activation, 265:6-21.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A. and Aderem, A.,** 2010, Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome, 3076- 80.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A. and Aderem, A.,** 2010, Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome, 3076-80.
- Ombrello, M.J., Remmers, E.F., Sun, G., M.D., Freeman, A.F., et al,** 2012, Cold Urticaria, Immunodeficiency, and Autoimmunity Related to *PLCG2* Deletions, 330-338.
- Park, W., Hwang, C., Im, C., Kang, M., Woo, J., Kim, J., Kim, Y.S., Kim, J., Kim, H., Kim, K., Yu, H., Lee, S., Lee, Y. and Seo, J.,** 2002, Identification of radiation-specific responses from gene expression profile, 8521-28.
- Putney, L.K., Denker, S.P. and Barber, D.L.,** 2002, The Changing Face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger, NHE1: Structure, Regulation, and Cellular Actions, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42:527-552.
- Qian, B.Z. and Pollard, J.W.,** 2010, Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 39-51.
- Romberg, N., Moussawi, K.A., Nelson-Williams, C., Stiegler, A.L., Loring, E., Choi, M., Overton, J., Meffre, E., Khokha, M.K., Huttner, A.J., West, B., Podoltsev, N.A., Boggon, T.J., Kazmierczak, B.I. and Lifton, R.P.,** 2014, Mutation of *NLRC4* causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation, 1135-39.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rosenfeld, J.S., Campbell, K., Leung, E.S., Bernhard, J. and Post, J.,** 2011, Habitat effects on depth and velocity frequency distributions: Implications for modeling hydraulic variation and fish habitat suitability in streams . *Geomorphology*, 127-135.
- Rossi, D. and Gaidano, G.,** 2016, The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia, 849-854.
- Schade, A., Walliser, C., Wist, M., Haas, J., Vatter, P., Kraus, J.M., Filingeri, D., Havenith, G., Kestler, H.A., Milner, J.D. and Gierschik P.,** 2016, Cool-temperature-mediated activation of phospholipase C- $\gamma$ 2 in the human hereditary disease PLAID, 1237-51.
- Shen, M., Tang, L., Shi, X., Zeng, X. and Yao, Q.,** 2017, NLRP12 autoinflammatory disease: a Chinese case series and literature review, 1661- 67.
- Sinisa, S., Dickie, Battellino, L.J., Michele, Michael, F.M.,** 2012, Familial Mediterranean fever and related periodic fever syndromes/autoinflammatory diseases, *Department of Clinical Immunology*, 103-112.
- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I. and Flavell, R.A.,** 2007, Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of Experimental Medicine*, 3235-45.
- Tenthorey, J.L., Haloupek, N., López-Blanco, J.R., Grob, P., Adamson, E., Hartenian, E., Lind, N.A., Bourgeois, N.M., Chacón, P., Nogales, E. and Vance R.E.,** 2017, The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion, 888- 893.
- Tuncer, S., Fiorillo, M.T. and Sorrentino, R.,** 2014, The multifaceted nature of NLRP12, 991-1000.
- Vance, R.E.,** 2015, The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Current Opinion Immunology*, 84-89.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vladimer, G.I., Weng, D., Paquette, S.W.M., Vanaja, S.K., Rathinam, V.A.K., Aune, M.H., Conlon, J.E., Burbage, J.J., Proulx, M.K., Liu, Q., Reed, G., Mecsas, J.C., Iwakura, Y., Bertin, J., Goguen, J.D., Fitzgerald, K.A. and Lien, E., 2012, The NLRP12 Inflammasome Recognizes *Yersinia pestis*, 96-107.**
- Walliser, C., Hermkes, E., Schade, A., Wiese, S., Deinzer, J., Zapatka, M., Desire, L., Mertens, D., Stilgenbauer, S. and Gierschik, P., 2016, The Phospholipase C2 Mutants R665W and L845F Identified in Ibrutinib-resistant Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Are Hypersensitive to the Rho GTPase Rac2 Protein, 22136-48.**
- Wang, D., Boylin, E.C., Minegishi, Y., Renren, W.C.I., Smith, E., Ihle, J.N. and Conley, M., 2001, Variations in the human phospholipase C $\gamma$ 2 gene in patients with B-cell defects of unknown etiology, 53:550-556.**
- Williams, R.L., 1999, Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C, 255-267.**
- Yu, P., Constien, R., Dear, N., Katan, M., Hanke, P., Bunney, T.D., Kunder, S., Quintanilla-Martinez, L., Huffstadt, U., Schröder, A., Jones, N.P., Peters, T., Fuchs, H., Angelis, M.H., Nehls, M., Grosse, J., Wabnitz, P., Meyer, T.P.H., Yasuda, K., Schiemann, M., Schneider-Fresenius, C., Jagla, W., Russ, A., Popp, A., Josephs, M., Marquardt, A., Laufs, J., Schmittwolf, C., Wagner, H., Pfeffer, K. and Mudde, G.C., 2005, Autoimmunity and Inflammation Due to a Gain-of-Function Mutation in Phospholipase C $\gamma$ 2 that Specifically Increases External Ca<sup>2+</sup> Entry, 451-465.**
- Zaki, Md.H., Man, S.M., Vogel, P., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T.D., 2014, Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection, 385-390.**

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Zaki,Md.H., Vogel, P., Malireddi, R.K.S., Body-Malapel, M., Anand,P.K.,Bertin,J., Green, D.R., Lamkanfi,M. andKanneganti,T.,** 2011, The NOD-Like Receptor NLRP12 Attenuates Colon Inflammation and Tumorigenesis, 10-022.

**Zhou,Q.,Lee,G.S.,Brady,J.,Datta,S.,Katan,M.,Sheikh,A.,Martins,M.S.M.,Bunney,T.D.,Santich,B.H.,Moir,S.,Kuhns,D.B.,Priel,D.A.L.,Ombrello,A.,Stone,D.,Ombrello,M.J.,Khan,J.,Milner,J.D.,Kastner,D.L. andAksentijevich, I.,** 2012,A Hypermorphic Missense Mutation in *PLCG2*, Encoding Phospholipase  $C\gamma 2$ , Causes a Dominantly Inherited Autoinflammatory Disease with Immunodeficiency, 713-720.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma bana yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, öğle dinlenmelerini bana ayıran, her sorumu sabırla,güler yüzü ve samimiyetiyle cevaplandıran, bir sorunum olduğunda elinden gelen yardımı esirgemeyen tez danışmanıma, sayın Prof. Dr. Afig BERDELİ'ye teşekkürü borç bilirim.

Özellikle tez çalışmamın yürütülmesinde, laboratuvar işlerimde, daha fazla bilgi edinmemde ilgi ve desteğini esirgemeyen, verileri toplamamda yardımcı olan sayın Demet Tığlı ÖZKAN, Merve ARYA , M.Nihan ATALAY ve Ceren YAŞAR'a ve tez çalışmam süresi boyunca değerli katkılarını aldığım Aras ARYA'ya teşekkür bir borç bilirim.

Ayrıca bana hem maddi, hem manevi destek olan aileme, özellikle sevgisini hiç esirgemeyen anneme sonsuz teşekkür ederim.

15/01/2020

Sona MAMMADOVA

**ÖZGEÇMİŞ**

Ben Sona MAMMADOVA 1994 yılında Azerbaycan Bakü şehrinde doğdum.2011 yılında Bakü'de liseyi bitirip üniversiteye başladım.Azerbaycan Cumhuriyeti Bakü Devlet Üniversitesi'ni 2016 yılında bitirdim.2018-2019 eğitim-öğretim yılında Türkiye Cumhuriyeti Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisansa başladım.

