



BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞI (FMF) TANISI ALMIŞ VE
MUTASYONU OLAN HASTALARDA HLA B* ANTİJEN SIKLIĞI

Utku AKSU

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

Doç. Dr. Sevim GÖNEN

KARS – 2024



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞI (FMF) TANISI ALMIŞ VE
MUTASYONU OLAN HASTALARDA HLA B* ANTİJEN SIKLIĞI**

Utku AKSU

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

Doç. Dr. Sevim GÖNEN

EKİM – 2024

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Utku AKSU' nun, Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE ve Doç. Dr. Sevim GÖNEN danışmanlığında Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı (FMF) Tanısı Almış ve Mutasyonu Olan Hastalarda HLA B* Antijen Sıklığı” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

22/10 /2024

	Adı Soyadı	imza
Başkan	: Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE	
Üye	: Doç. Dr. Gökhan NUR	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖNEN ÇELEBİ	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun . . / . . /20.. gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Vedat ADIGÜZEL

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlar bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğum,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi durumda aleyhime doğabilecek tüm hak ve kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Utku AKSU

22.10.2024

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALIĞI (FMF) TANISI ALMIŞ VE MUTASYONU OLAN HASTALARDA HLA B* ANTİJEN SIKLIĞI

Utku AKSU

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE

İkinci Danışman: Doç. Dr. Sevim GÖNEN

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarına 2020-2023 yılları arasında başvuran, klinik olarak Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterian Fever-FMF) tanısı konmuş ve FMF mutasyonu tespit edilen toplam 347 hastanın HLA B* antijenlerine bakılarak, FMF mutasyonları ile HLA B* antijenleri arasındaki ilişki incelendi. FMF mutasyonları için Pyrosekans yöntemi, HLA B* antijenleri için Luminex SSO yöntemi kullanıldı. FMF mutasyonları açısından bakıldığında M694V, E148Q ve V726A mutasyonlarının hasta popülasyonunda çok olduğu gözlemlendi. HLA B* açısından bakıldığında sırasıyla HLA B*35, -B*51 ve -B*27 antijenleri yüksek tespit edildi.

Hem kadın hem de erkek hasta popülasyonunda HLA B* antijenleri ve FMF mutasyonları karşılaştırıldığında; HLA B*35 ve M694V/? birlikteliği % 11, 23 (39 hasta), HLA B*35 ve E148Q/? birlikteliğinin % 10,37 (36 hasta), HLA B*35 ve V726A/? birlikteliğinin % 3,45 (12 hasta) olarak bulundu. HLA B*51 ve M694V/? birlikteliği % 9,22 (32 hasta), HLA B*51 ve E148Q/? birlikteliği % 6,05 (21 hasta), HLA B*51 ve V726A birlikteliği % 3,17 (11 hasta) olarak bulundu. HLA B*27 ve

M694V/? Birlikteliği % 4,89 (17 hasta), HLA B*27 ve E148Q/? birlikteliği % 2,59 (9 hasta), HLA B*27 ve V726A/? birlikteliği % 2,01 (7 hasta) olarak bulundu.

Literatür taramasına göre ÷lkemizde detaylı bir çalışma bulunamamıştır. Dñnyada yapılan çalışmalarda farklı pop÷lasyonlarda farklı antijenler ve mutasyonlar gözlenmiştir. Mevcut çalışma klinik olarak FMF tanısı almış hastalarda HLA B* antijenleri ile FMF mutasyonları arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Pop÷lasyon genetiği alanında yapılan çalışmalarda hem HLA B* allellerinin hem de diğer allellerin daha fazla hasta ve ileri mutasyon analizi ile incelenmesi önemlidir.

Anahtar Kelimeler: FMF mutasyon, HLA B* antijen, Pyrosekans, Luminex

ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

HLA B* ANTIGEN FREQUENCY IN PATIENTS DIAGNOSIS OF FAMILIAL
MEDITERRANEAN FEVER (FMF) AND HAVING A MUTATION

Utku AKSU

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Pınar AKSU KILIÇLE

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Sevim GÖNEN

The study examined the relationship between the Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations and the HLA B* antigens in a total of 347 patients who were clinically diagnosed with FMF and found to be FMF-mutated who applied to the Tissue Typing Laboratory of the Health Research and Application Centre of the Faculty of Medicine of the University of Gazi between 2020-2023. For FMF mutations, the pyrosequencing method and for HLA B* antigens, the Luminex SSO method were used. In terms of FMF mutations, M694V, E148Q and V726A mutations were observed to be high in the patient population. In the case of HLA B*, HLA-B*35, -B*51, and -B*27 antigens were high, respectively.

When comparing HLA B* antigens and FMF mutations in both female and male patient populations, the following combinations were observed: HLA B*35 with M694V/? : 11.23% (39 patients), E148Q/? : 10.37% (36 patients), and V726A/? : 3.45% (12 patients).

The coherence of HLA B*51 and M694V/? was 9.22 % (32 patients), HLA B*51 and E148Q/? was 6.05 % (21 patients), HLAB*51 and V726A was 3.17 % (11 patients). The coherence of HLA B*27 and M694V/? was 4.89 % (17 patients), HLA B*27 and

E148Q/? was 2.59 % (9 patients), HLA B*27 and V726A/? was 2.01 % (7 patients). According to literature review a detailed study has not been found in our country. In studies conducted worldwide, different antigens and mutations have been observed in different populations. Present study showed a relationship between HLA B* antigens and FMF mutations in clinically diagnosed patients with FMF. In studies conducted in the field of population genetics, it is important to examine both HLA B* alleles and other alleles with more patients and advanced mutation analysis.

Key Words: FMF Mutation, HLA B* Antigens, Pyrosequencing, Luminex



ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarı sorumlusu Doç. Dr. Sevim GÖNEN danışmanlığında hazırlanarak Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek Lisans eğitim dönemim boyunca, bana her zaman destek olan, her konuda yol gösteren, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hayatımın her alanında örnek almak istediğim çok kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE'ye çalışmamın laboratuvar ve yazım aşamasında bana yardımcı olan eş danışmanım sayın Doç. Dr. Sevim GÖNEN'e tezimin yapım ve yazım aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca bugüne kadar ki eğitim hayatım boyunca her zaman bana güç veren, destek olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme, sonsuz teşekkür ederim.

Utku AKSU

22.10.2024

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. İnsan Lökosit Antijenleri (HLA).....	3
2.2.1. HLA sisteminde genetik yapı.....	3
2.2.2. HLA moleküllerinin vazifeleri	5
2.2.3. HLA moleküllerinde polimorfizm.....	5
2.2.4. HLA antijenlerinin kalıtımı.....	6
2.2.5. HLA antijenlerinin kullanım alanları	6
2.2.6. HLA ve hastalık ilişkisi	6
2.2.7. HLA- hastalık ilişkisi hipotezleri	7
2.2.8. HLA tiplene.....	7
2.3. Sekansa Özgü Oligonukleotidler Kullanarak Hibridizasyon Yapılması (SSO)	7
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi	8
2.4.1 Tarihçe	8
2.4.2 Epidemiyoloji.....	8
2.4.3 Genetik.....	9
2.4.4. Patogenez	10
2.4.5. Klinik bulgular	11
2.4.6. Tanı.....	11

BÖLÜM 3	12
MATERYAL ve METOT	12
3.1. Çalışma Prosedürü	12
3.1.1. Çalışmada kullanılan malzeme ve cihazlar	12
3.2. DNA İzolasyonu	12
3.3. HLA B* Doku Grubu Antijenlerinin Belirlenmesi	13
3.3.1. DNA amplifikasyonu (PZR)	13
3.3.2. Hibridizasyon	14
3.4. FMF Mutasyon analizi	15
3.4.1. PZR ürünlerinin streptavidin sepharose bead'lerine immobilizasyonu	15
3.4.2. Pyrosekans için örnek hazırlama prosedürü.....	16
3.5. İstatistiksel Analiz	21
BÖLÜM 4	22
BULGULAR	22
BÖLÜM 5	29
TARTIŞMA ve SONUÇ	29
KAYNAKLAR	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
---	-------

Kısaltmalar

APC	Antijen Sunucu Hücre
MHC	Doku Uyumluluk Kompleksi
HLA	İnsan Lökosit Antijenleri
BF	Properdin Faktör
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
Ig	İmmünglobulin
RA	Romatoid Artrit
JIA	Juvenil İdyopatik Artrit
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
BH	Behçet Hastalığı
AS	Ankilozan Spondilit
FMF	Ailesel Akdeniz Ateşi
MEFV	Marenostrin Encoding Fever
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
DTL	Doku Tipleme Laboratuvarı
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR-SSP	Sekans Spesifik Primer Analizi
PZR-SSO	Sekans Spesifik Oligonükleotid Problar
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 6. kromozomun kısa kolu üzerindeki HLA gen bölgesinin yerleşimi (Berlingerio vd., 2009).....	4
Şekil 2.2. 16. Kromozomda <i>MEFV</i> Lokalizasyonu (Haddad, 2009).	9
Şekil 3.1. Çalışma tüpleri (Anıl, 2022).....	13
Şekil 3.2. Pyrosekans Cihazı.....	19
Şekil 3.3. Pyrosekans Çalışma İstasyonu.....	20
Şekil 3.4. Pyrosekans Analiz Programı	20
Şekil 3.5. Luminex Cihazı.....	21
Şekil 3.6. Luminex Analiz programı	21

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. FMF'in genetik tanısına yönelik tarama için önerilen dizi varyantı.....	10
Tablo 3.1: DNA izolasyonunda, HLA B* tiplerinde ve FMF mutasyon analizlerinde kullanılan malzemeler ve cihazlar	13
Tablo 3.2. PZR'da kullanılan belirteç ve miktarları.	14
Tablo 3.3. PZR Döngü programı	14
Tablo 3.4. Hibridizasyon reaksiyon koşulları.....	15
Tablo 3.5. PZR yöntemi.....	15
Tablo 3.6. Çalışma master mix	16
Tablo 3.7. FMF geninde görülen mutasyonlar, polimorfizmler ve aminoasit değişimleri.	17
Tablo 4.1: Erkek hastalarda HLA B* alel sıklığı.....	22
Tablo 4.2: Kadın hastalarda HLA B* alel sıklığı.	23
Tablo 4.3. Erkek hastalarda FMF mutasyonları ve sıklıkları.	24
Tablo 4.4. Kadın hastalarda FMF mutasyonları ve sıklıkları.	25
Tablo 4.5. Kadın ve erkek hastalarda en fazla görülen HLA B** antijenleri.	25
Tablo 4.6. Kadın ve erkek hastalarda en fazla görülen FMF mutasyonları.	26
Tablo 4.7. En sık HLA B* antijen ve FMF mutasyonları sıklığı.....	26

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bağışıklık sistemi, enfeksiyona karşı koruma sağlayan hücre, doku ve moleküllerden oluşur. Ayrıca, doğuştan gelen bağışıklıktan ve daha sonra daha yavaş ama etkili koruma sağlayan edinilmiş bağışıklıktan oluşur. Doğal bağışıklığın ilk savunma hattı cilt epitel hücreleri ve doğal antibiyotiklerdir. Patojen; dokulara girdiğinde fagositler, doğal öldürücü hücreler ve kompleman sisteminin proteinleri aktive olur. Adaptif bağışıklık, humoral ve hücresele bağışıklıktan oluşur. Humoral bağışıklıkta B lenfositleri tarafından üretilen antikorlar dolaşım sistemine girerek hücreyi dış yabancı antijenlerden korur. Hücresele bağışıklıkta T lenfositler yoluyla hücreye giren antijenlere karşı bir savunma oluşur. Hem B hem de T hücreleri, yüzeylerindeki antijen reseptörleri sayesinde yabancı antijenleri tanıyabilir. B hücrelerindeki reseptörler proteinler, polisakkaritler ve lipitler gibi büyük molekülleri tanırken, T hücrelerinin yüzeyindeki reseptörler protein antijenlerinin peptid kısımlarını tanıyabilir. T hücreleri, konakçı antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerinde doku uyumluluk kompleksi (MHC)'ne bağlanan ve onlar tarafından görüntülenen antijenleri tanıyabilirler (Abbas vd., 2014).

Tüm omurgalı canlılarda bulunup ve bağışıklık sistemiyle alakalı görevleri bulunan ve bulunmayan gen grubu MHC 'dir. MHC antijenleri insanlarda 6. kromozomda kısa kolu üzerinde kodlanmaktadır. HLA alelleri yapı ve işlevlerine göre üç grupta toplanmaktadır: HLA -A, -B, -C antijenlerini taşıyan Sınıf I, HLA-DR, -DQ, -DP antijenlerini taşıyan Sınıf II ve properdin faktör B (BF), tümör nekrozis faktör (TNF), C4A, C4B, C2'yi taşıyan Sınıf III (Klein ve Sato, 2000).

Transplantasyon ve hastalık ile ilgili araştırmalarda HLA antijenleri önem kazanmaktadır. Hastalıklar ve HLA antijenleri arasında ilişki bulunduğunu gösteren birçok yayın mevcuttur. Hastalık risklerini taşıyıp taşımadığını anlamak, koruyucu etkenleri saptamak ve tedaviye katkı sağlamak için bu tür çalışmalar yaygınlaşmıştır. HLA molekülleri yalnızca duyarlılığı gösteren bir özelliktir. Genellikle hastalığın ortaya çıkmasının nedeni çeşitli faktörlerin etkileşimidir. Yapılan çalışmalarla HLA ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Bazı hastalıklar aynı alelleri taşıyan bireylerde sık görülebilmektedir (Dick, 1978).

Romatizmal hastalıklar, bağışıklık sisteminin eklemlere, tendonlara ve kaslara saldırmasına neden olan otoimmün hastalık grubudur. Genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel faktörlerin etkilemesiyle ortaya çıkmaktadır. Etkilenen organlara göre türlere ayrılır. En çok görülenler: Romatoid Artrit (RA), Juvenil İdyopatik Artrit (JIA), Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), Behçet Hastalığı (BH), Ankilozan Spondilit (AS) ve Ailesel Akdeniz Ateşidir (FMF) (Çevirgen, 2005; Reinhold vd., 1991). En yaygın görülen AS'dir. Ençok omurgayı etkileyen kronik inflamatuvar rahatsızlıktır. AS ile HLA-B*27 arasında, Behçet ile HLA-B*5 arasında ilişki bulunan birçok yayın bulunmaktadır (Märker-Hermann ve Höhler, 1998). 16. kromozomun kısa kolunda bulunan MEFV (MEditerranean FeVer) geni otoinflamatuvar dönemsel ateş belirtisi gösteren Ailevi Akdeniz Ateşi ile ilişkili bulunmuştur (French vd., 1997). BH'da yapılan bir genetik çalışma, MEFV mutasyonu taşımanın hastalık şiddetini arttırdığını ve Behçet hastalığı olan kadın hastalarda damar sistemi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Atagündüz vd., 2003). Benzer bir başka çalışmada BH 'de MEFV gen mutasyonlarının sıklığının normal popülasyona göre daha yüksek olduğunu doğrulamıştır (Touitou, 2001). Otoinflamatuvar hastalıkların prototipi sayabileceğimiz FMF, MEFV genindeki nokta mutasyonlar sonucunda aynı gen tarafından üretilen Pyrin proteininin defektif üretimine bağlı olarak doğal immün sistemin aktivasyonu ile oluşan IL-1 β ve IL18 üretiminin regülasyonunun yapılamaması ve inflamasyonun sonlandırılmaması neticesinde ortaya çıkmaktadır (Schnappauf vd., 2019).

Otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalık olan FMF, tekrarlayan ateşle karakterizedir. Özellikle Yahudiler, Araplar, Türkler ve Ermeniler arasında yaygındır. Ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı, şişlik ve kızarıklık en sık görülen belirtileridir. FMF ateşinin patogenezi ile ilgili çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolunda yer alan MEFV geni etken olarak gösterilmiş ve 80'den fazla mutasyon rapor edilmiştir (Etem vd., 2010; Touitou, 2001). Bazı çalışmalarda hem hücresel hem de humoral bileşenlerde çeşitli immünolojik anormallikler tespit edilmiştir. Ülkemizde, FMF ve HLA B* antijenleri ile ilgili kapsamlı bir yayın bulunmamaktadır. Bu çalışmada FMF klinik tanısı ile başvuran, mutasyon tespit edilen hastalarda HLA B* antijenleri ile arasında ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda HLA B* antjenlerini Luminex SSO yöntemi ile, FMF genetik mutasyonlarını da Pyrosekans yöntemi ile araştırıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

George Snell ve ekibi MHC'yi 1940'larda keşfettiler. Snell ve ekibi iki farklı fare grubuyla deri grefti çalışmaları yürütmüşler ve bu çalışmalar sonucunda deri greftleri genetik olarak farklı bir grup farede redde neden olmuş, genetiksel açıdan benzeşen farelerde deri greftleri başarılı olmuştur. Bu farklılığın nedeninin genomdaki büyük bir gen kompleksi olduğu tespit edilmiş, MHC olarak isimlendirilmiştir. İlerleyen senelerde Snell ve ekibi dev kompleksin insanlarda da olduğunu keşfetmişler, HLA adını vermişlerdir. Snell ve ekibi tüm MHC'yi ve işlevini tanımlamışlar, 1980 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü almışlardır (Yalçın, 2013). İnsanda doku ve organ nakillerinin yapılması MHC 'nin bulunmasıyla başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü İsimlendirme Komitesi (WHO) 1968 yılında insandaki MHC' yi HLA olarak adlandırmış ve MHC'deki ilişkili genlerle düzenlendiğini açıklamıştır (Chinen ve Buckley, 2010).

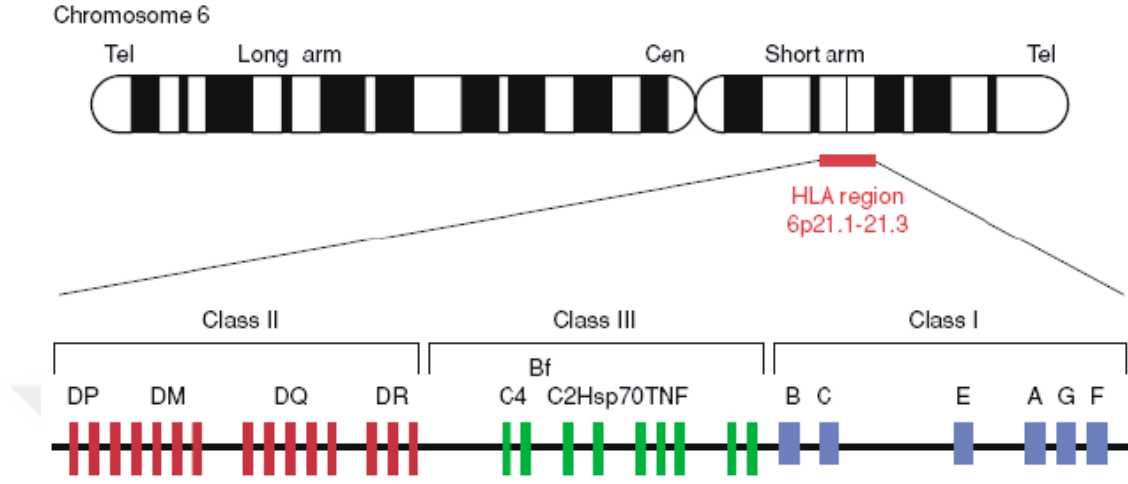
2.2. İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)

MHC, bir dizi genden oluşur ve bu genler tarafından üretilen ürünler, tüm omurgalılarda yabancı cisimleri tanımak ve bağışıklık sisteminin büyük bir bölümünü kontrol etmek için hücre yüzeyinde bulunur. Bağışıklık sisteminin ana işlevi, yabancı organizmalar, proteinler ve antijenler de dahil olmak üzere yabancı maddeleri tanımak ve ortadan kaldırmaktır. MHC molekülleri, uygun T hücreleri tarafından tanınmaya hizmet etmek üzere patojenden türetilmiş antijenleri bağlamak üzere hücre yüzeyinde bulunur. MHC bölgesi, 6. kromozom üzerinde yer alır ve 3,6 megabaz çiftine yayılmış 240 gen içerir. Bu genlerden en az 120'sinin immünolojik işlevleri bulunmaktadır. İnsanlarda MHC bölgesine HLA (insan lökosit antijeni) bölgesi adı verilir ve insan genomunun en polimorfik bölgelerinden biridir (Klein ve Sato, 2000).

2.2.1. HLA sisteminde genetik yapı

250'den fazla sayıda gen içeren HLA bölgesi, kapladığı 7,6 Mb'lik alanı ile, 6. Kromozomun (6p21.31) kısa kolunda yer almaktadır. Şu anda insan kromozomal

bölgelerinde gen yoğunluğu ve polimorfizmi en yüksek olarak bilinen gendir (Liu vd., 2021). İşlevlerine göre 3 bölgeye ayrılan insan MHC gen bölgesi Şekil 2.1’ de gösterilmiştir (Dalva, 2003).



Şekil 2.1. 6. kromozomun kısa kolu üzerindeki HLA gen bölgesinin yerleşimi (Berlingerio vd., 2009)

HLA sınıf I genleri -A, -B ve -C'yi içermekte olup insan hücre tiplerinin çoğunda bulunur ve dokuya özgü düzeyde eksprese edilir. Sınıf I genleri, virüslerden veya parazitlerden gelen antijenleri sitotoksik T lenfositleri CTL olarak da adlandırılan öldürücü T hücrelerine sunarak hücrel bağışıklıkta önemli bir rol oynar. CTL yalnızca T hücresi reseptörlerini (TCR'ler) değil aynı zamanda yüzeylerinde CD8 moleküllerini de eksprese eder. TCR'ler, peptit-HLA kompleksi formundaki peptitleri tanıyabilir. CD8 ayrıca HLA sınıf I molekülünün alfa-3 kısmına bağlanarak TCR ile peptit-HLA kompleksi arasındaki ilişkiyi kolaylaştırır (Abbas vd., 2000; Kubi, 1992).

HLA sınıf II genleri, -DP, -DQ ve -DR'yi içermektedir. Sınıf II proteinleri, HLA sınıf I proteinlerinin (CTS hücreleri tarafından tanınan) aksine, bir grup T hücresi (T yardımcı veya TH hücreleri olarak adlandırılır) tarafından tanınan patojenden türetilmiş kısa peptitler içerir. Sınıf I ve sınıf II proteinlerin aksine; HLA sınıf II proteinleri, fagositler, B hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve aktive edilmiş T hücreleri olmak üzere spesifik antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından eksprese edilir (Ayala-García vd., 2012; Kronenberg ve Rudensky, 2005).

Sınıf I ve II'den farklı olarak, HLA Sınıf III genleri HLA-DR ve HLA-B bölgeleri

arasında bulunur. C2C4, B faktörü, TNF- α , LTA ve LTB gibi sitokinler ve ısı şoku proteinleri dahil olmak üzere 60 gen içermektedir (Roitt ve Delves, 2001).

2.2.2. HLA moleküllerinin vazifeleri

Lenfositler, antijenlere karşı spesifik bağışıklık tepkisinden sorumlu hücrelerdir. B lenfositleri immünoglobulin (Ig) üretir. T lenfositleri B hücrelerine yardım eder, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu üretir ve virüsle enfekte olmuş hücreleri seçip öldürür. B hücrelerinin özgülüğü sentezledikleri antikorlardan gelse; T hücresi reseptörleri (TCR) ve MHC molekülleri, T lenfositlerinin özgülüğünü sağlar. HLA sınıf I ve II 'nin immün cevap üzerinde çeşitli etkileri vardır. Sınıf I molekülleri antijeni CD8 taşıyan T lenfositlere sunarken, sınıf II molekülleri antijeni CD4 taşıyan T lenfositlerine sunar. Sınıf I tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde, sınıf II yalnızca B lenfositlerinde, profesyonel antijen sunan (APC) monositlerde, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde bulunur. Dağılımdaki bu farklılık aynı zamanda moleküler işlevlerdeki farklılığı da yansıtır. Sınıf I molekülleri, otolog proteinler ve viral antijenlerin peptid yapısı gibi hücre içi peptidleri içerir ve CD8 taşıyan sitotoksik hücrelerin uyarılmasına neden olur. Sınıf I molekülleri, peptitleri sergileyerek hücrelerin bağışıklık sisteminin kontrolü altında kalmasını sağlar. Sınıf II molekülleri CD4 taşıyan yardımcı T lenfositlerin uyarılmalarını ve hücre dışında sentezlenen proteinlerden kaynaklanan peptidleri sunmaya olanak sağlar. Sınıf I ve II molekülleri aracılığıyla sergilenen antijenlerin özgülüğü, hücre içinde bulunan "Antijen İşleme" ünitelerince sağlanmaktadır (Thorsby, 1994; Wiczorek vd., 2017).

2.2.3. HLA moleküllerinde polimorfizm

Genetik polimorfizm insan biyolojisinde ayırt edici özelliktir. HLA genleri polimorfizmi en yüksek genlerdir. Peptid bağlanma alanında HLA moleküllerinin değişkenliği meydana gelir. Patojenler ve patojenlere verilen bağışıklık sistemin yanıtı ile popülasyonda HLA molekülleri farklılık göstermektedir. Çeşitli viral peptidlerin bağlanma kapasitesinin artırılması, patojenlere karşı tepkiyi maksimuma çıkarmaktadır. Toplumdaki bireyler arasında immünolojik olarak yüksek oranda çeşitlilik oluşması MHC' nin kodominant kalıtılması ve mutasyonların devam etmesi ile ilişkilidir. İki veya daha fazla lokusun allellerinin rastgele olmayan birlikteliği bağlantı dengesizliği olarak

adlandırılır. Belirli HLA haplotipleri bağlantı dengesizliği sebebiyle diğerlerinden daha yaygındır (Walport vd., 2001).

2.2.4. HLA antijenlerinin kalıtımı

İnsanlarda MHC genleri Mendel kuralına göre ebeveynlerden çocuklara aktarılır. HLA antijenleri fetüste 6. haftada ortaya çıkar ve sentezleri hayat boyu sürer. MHC sisteminde özgül olan, bir kromozom üzerinde bulunan genleri belirtmek için haplotip ismi kullanılır. Bir bireyde bulunan 2 haplotip, bireyin genotipini oluşturur. Her bireyde 23 çift kromozomun yarısı anne, yarısı babadan miras alınır. Ebeveynler ve çocuklar arasında haplotip eşleşmesi olur. Haplotip alelleri blok halinde iletilir (Gayon, 2016)

2.2.5. HLA antijenlerinin kullanım alanları

1. Organ ve doku naklinde hem HLA antijenlerinin hem de kan grubu antijenlerinin belirlenmesi önemlidir.
2. Babalık tayininde kan grubu antijenleri ve sonrasında HLA tiplmesi gerçekleştirilir. Çocuğun, babada olmayan bir HLA tipine sahip olması babalığın reddedilmesinde önem taşır.
3. Antropolojik çalışmalarda da HLA tiplmesi önemlidir.
4. HLA tiplmesi aynı zamanda bazı hastalıkların teşhisine de yardımcı olur. Bazı hastalıklarda belirli HLA tipleri yüksek seviyelerde görülmektedir (Geo vd., 2024; Mrazek, 2023).

2.2.6. HLA ve hastalık ilişkisi

Teknolojinin ilerlemesi ile HLA alelleri hakkındaki bilgiler artmaktadır. Hastalıklarda da HLA alelleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle otoimmün hastalıklarda HLA incelemeleri önem kazanmaya başlamıştır. HLA' nın önemli olmasının yanısıra birçok gen ve çevresel faktör de hastalıkların ortaya çıkışında görev alır. Yapılan çalışmalarla bazı hastalıklar ve bazı HLA alelleri arasında sıkı ilişkiler gösterilmektedir. Hastalığın risklerini ve koruyucu faktörlerini belirlemek, tedaviyi tasarlamak, hastalığın genetik geçişli olup olmadığını belirlemek ve moleküler patogeneze ulaşmak için bu tür çalışmalar yapılmaktadır (Galipeau vd., 2024; Kötter ve Krusche, 2023).

2.2.7. HLA- hastalık ilişkisi hipotezleri

1. HLA alelleri virüsler, toksinler ve çeşitli yabancı maddeler gibi etiyolojik ajanlara reseptör işlevi yaparlar.
2. Hastalığa sebep olan antijenik peptidler, belirli HLA moleküllerinin antijen bağlama alanlarına bağlanabilir.
3. Patojenler, HLA molekülünü taklit edebilir (moleküler taklit). Bu moleküler taklit hipotezi şöyle açıklanabilir:
 - a. HLA antijeni ile etiyolojik faktör benzer olursa etiyolojik faktör vücudun kendi molekülü olarak kabul edilir, herhangi bir immün cevap gelişmez ve konağın bağışıklık sistemini harekete geçirmeden hastalığa neden olur.
 - b. Etiyolojik ajan yabancı kabul edilir ve otoimmün hastalığa yol açan ciddi bir bağışıklık reaksiyonuna neden olur (Temiz, 2005; Altuntaş vd., 1996). Çoğu otoimmün hastalık HLA ile ilişkilidir. Yani belirli alelleri taşıyan kişilerde belirli hastalıklar daha sık ortaya çıkar (Dendrou vd., 2018; Ghodke vd., 2005).

2.2.8. HLA tipleme

HLA alellerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler; serolojik ve moleküler yöntemler olarak ayrılmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle birçok laboratuvar HLA polimorfizmini, moleküler yöntemler kullanarak raporlamaktadır. HLA alel polimorfizmini belirlemek için serolojik yöntemler yetersiz olduğundan, serolojik olarak ayırt edilemeyen ancak işlevsel olarak farklı HLA alel ürünlerini tiplendirmek için moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Dyer vd., 1993). En sık kullanılan moleküler yöntemler; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tabanlı sekans spesifik primer analiz tekniği (PZR-SSP) ve çok sayıda örneğin tiplemesine olanak sağlayan gene PZR tabanlı sekans spesifik oligonükleotid problemler (PZR-SSO) kullanılarak yapılan analiz tekniğidir (Chee, 2002; Erlich, 2012; Dunckley, 2012).

2.3. Sekansa Özgü Oligonükleotidler Kullanarak Hibridizasyon Yapılması (SSO)

HLA lokusunun PZR ile çoğaltılmasını takiben alellere özgün oligonükleotidler kullanılarak, çoğalmış DNA segmenti ile özgün oligonükleotidlerin katı bir ortam

üzerinde (nylon bir membran, kuyucuklar ya da boncuklar) hibridleşmesi sağlanır. Kullanılacak oligonukleotidler işaretli olup; ortama eklenen reaktiflerle renkli ürün oluşturulur. Oligonukletid probolar, DNA 'daki alele özgü ise membran üzerinde bu probolar ve çoğalmış DNA arasında hibridleşme olur. Kişinin taşıdığı HLA aleli, çeşitli reaktiflerle görünür hale getirilerek tespit edilir (Trachtenberg ve Erlich, 1996; Kulcsárová ve Fazekasová 1998; Onizuka vd., 2005).

2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi

FMF, tekrar eden ateş ile görülen otozomal çekinik geçiş gösteren inflamatuvar bir rahatsızlıktır (Lidar ve Livneh, 2007; Demirkaya vd., 2016). Hastalık, pirin proteinini kodlayan FMF genindeki mutasyonlarla ilişkilidir (Touitou, 2001). FMF, başta Türkler, Araplar, Sefarad Yahudileri ve Ermeniler olmak üzere Doğu Akdeniz toplumlarında yaygın olmasına rağmen, son yıllarda dünyanın başka yerlerinde de rapor edilmiştir. Hastalık süresi ortalama 1-3 gündür. Hastalıkta klinik bulgular; tekrar eden ateş ve karın ağrısı, eklem ağrıları, döküntü ve febril miyalji biçiminde görülmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009; El-Shanti vd., 2006).

2.4.1 Tarihçe

FMF, eski ve çok sık görülebilen ailesel dönemsel ateşli hastalıktır. Ailesel periyodik ateşler 20. yüzyılın son çeyreğinde ayrıntılı olarak tanımlanmış olsada, periyodik ateşlerin çok eski çağlardan beri var olabileceği düşünülmektedir. Kolşisin bitkisi, FMF tedavisinin temel dayanağıdır ve FMF'nin en tehlikeli etkisi olan amiloidoz ilerlemesini engellemektedir. 1997 yılı itibariyle MEFV (MEditerranean FeVer) geni tanımlanmıştır. MEFV geninde kodlanmış olan pirin/marenostrin proteinlerinin bulunması FMF 'nın patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlamıştır. 2007 yılında Papin ve ekibi, pirinin, interlökin-1 β aracılı inflamasyon düzenleme görevi yaptığını göstermiştir (Papin vd., 2007).

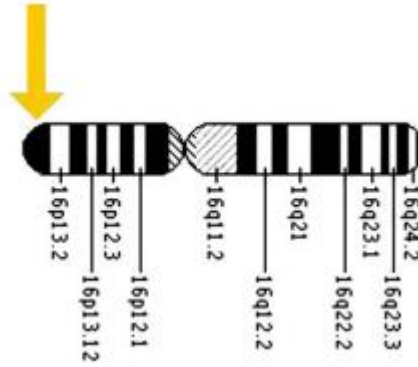
2.4.2 Epidemiyoloji

FMF prevalansı Yahudiler, Ermeniler, Türkler ve Araplar arasında yüksektir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). Hastalığa rastlanma oranı Türkiye, Ermenistan ve İsrail'de ortalama 1-2:1000'dir (Sarkisian vd., 2008). Türkiye'deki çalışmalarda Orta

Anadolu’da görülme oranı 8:1000 iken Trakya bu oran daha düşüktür (6:10,000) (Önen vd., 2004; Kısacık vd., 2009). Bu çalışmaların sonucunda, FMF’nın Türkiye’nin bölgeleri arasında farklı dağılım gösterdiği ve topluluklardaki kalıtsal çeşitliliğinin dikkate alınması gerektiğini işaret etmektedir.

2.4.3 Genetik

FMF geni, 10 ekzondan oluşmaktadır ve 16. kromozomun kısa kolunda (16p 13.3) bulunmaktadır. Dizi değişikliği 360’dan fazladır ve birçok varyantın önemi hala tespit edilememiştir. FMF mutasyonlarının önemli bir bölümü 2., 3., 5. ve 10.ekzonlarda yer almaktadır. En çok tespit edilen mutasyonlar ekzon 10’daki M694V, M680I, V726A, M694I ve ekzon 2’deki E148Q mutasyonlarıdır. Bilinen en eski mutasyon E148Q’dur (Jalkh vd., 2008).



Şekil 2.2. 16. Kromozomda *MEFV* Lokalizasyonu (Haddad, 2009).

En sık görülen M694V mutasyonudur (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). M694V homozigot olan hastalarda amiloidoz gelişimi sık görülür. Türk ve Ermeni populasyonlarında M680I, Yahudi populasyonunda V726A ve Arap populasyonunda M694I sık görülmektedir (Touitou, 2001). Yeryüzünde ve FMF’nın görülme oranının nispeten az olduğu bölgelerde en sık görülen mutasyon E148Q’dur (Giancane vd., 2015).

Özen ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile FMF fenotipinin modifikasyon etkeni genler, epigenetik değişiklikler, çevre ve kültür özellikleri gibi çeşitli faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıktığı görülmektedir. Bu çalışma sonucunda, Türkiye’deki çocukların hastalık şiddetinin daha fazla olduğu bulunmuştur (Ozen vd., 2009).

FMF, Ortadoğu ve Akdeniz ülkelerinde prevalansı yüksek olan otozomal resesif geçişli

sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın majör belirtileri ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı ve deri lezyonlarıdır. Hastalar dünya çapında bildirilse de öncelikle Doğu Akdeniz kökenli popülasyonları etkilemektedir. FMF temel olarak tekrarlayan kısa süreli peritonit, plörit, artrit, döküntü ve genellikle eşlik eden ateş ataklarıyla karakterizedir. MEFV geninin 10 eksonu vardır ve bugüne kadar tanımlanmış 370' den fazla varyantı bulunmaktadır. FMF'nin endemik olduğu bölgelerde en sık görülen MEFV varyantı M694V'dir (c.2080A>G). Diğer sık görülen ekson 10 varyantları ise M694I (c.2082G>A), V726A (c.2177T>C) ve M680I (c.2040G>C ve c.2040G>A) olup, bu varyantlar tüm FMF hastalarının neredeyse %75'ini oluşturmaktadır (Tablo 2.1) (Touitou, 2001; Yaşar Bilge vd., 2019).

Tablo 2.1. FMF'in genetik tanısına yönelik tarama için önerilen dizi varyantı

	Patojenik varyantlar	Bilinmeyen önem
Ekzonlar 10	M694V	K695R
	V726A	
	M680I	
	M694I	
	R761H	
	A744S	
	I692del	
Ekzonlar 2	E167D	E148Q 1
	T267I	
Ekzonlar 3		P369S
Ekzonlar 5		F479L
Ekzonlar 9		I591T

2.4.4. Patogenez

FMF, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir hastalığıdır. Patogenezde pirin proteinin bozukluğu önemlidir. Pirin proteini nötrofillerin, monositlerin, dentritik hücrelerin ve sinovyal ve seröz fibroblastların sitoplazmasında eksprese edilir. Bu proteinin ana fonksiyonunun inflamasyonu düzenlemek olduğu düşünülse de pirinin fizyolojik rolü konusunda tam bir fikir birliği yoktur. Normal koşullar altında pirin, kaspaz-1 enzimini aktive etmek için adaptör proteinle etkileşime girer, IL-1 β üretimi baskılanır. Mutasyona uğrayan genden elde edilen ürün olan pirin proteini ile kaspaz-1 enzimi arasındaki etkimenin azalışı, pirin ürününün IL-1 β salınımında engelleyici tesirini düşürür, IL-1 β aracılı inflamasyon oluşur (Yang vd., 2014).

2.4.5. Klinik bulgular

- a. Ataklar: FMF en sık görülen kalıtsal ateşli hastalık olarak tanımlansa da nöbetler düzenli değil sık görülür.
- b. Ateş: FMF'in ana klinik bulgusudur. FMF'li hastaların hemen hemen hepsinde görülür. Çocukluk döneminde, ateş FMF'in en önemli klinik belirtisidir (Shohat, 2016).
- c. Peritonit: Hastaların % 90'ında görülen en yaygın atak çeşididir (Turkish AAA Study Group, 2005).
- d. Plörit: Hastaların yaklaşık % 30 ile % 50 oranında plevral efüzyona bağlı göğüs sancısı vardır (Kucuk vd., 2014).
- e. Sinoviyal tutulum: Artrit hastaların %50'sinde ve daha sıklıkla çocuklarda görülür (Ugurlu vd., 2013)
- f. Eritem: FMF'in karakteristik cilt belirtisidir. Bunlar genellikle ayak bileği eklemlerinde, ayağın arkasında bulunan ve bazen ateşin de eşlik ettiği kırmızı, hassas, sertleşmiş lezyonlardır. 2-3 gün içerisinde kendiliğinden kaybolur.
- g. Miyalji: FMF hastalarında en sık görülen bulgudur. Atak sırasında ateş ve diğer klinik bulguların eşlik ettiği jeneralize miyalji, akut inflamatuvar miyalji olarak tanımlanır ve atakla sonlanır.
- h. Amiloidoz: FMF'in ölüm ile ilişkili başlıca komplikasyondur. Türkiye'de yapılmış olan iki çalışmada amiloidoz görülme sıklığını % 8,6 ile % 12,9 olarak bildirilmiştir (Turkish AAA Study Group, 2005; Kaşifoğlu vd., 2014).

2.4.6. Tanı

Klinik belirtiler, ataklar, kolşisin cevabı ve genetik testler çok önemlidir. FMF klinik tanını desteklemek için genetik testler yapılır (Booty vd., 2009). 2012 yılında 14 MEFV mutasyonu test edilmeye başlanmıştır. Ekzon 10'da bulunan Türkiye'de en çok görülen 4 mutasyon (M694V, M680I, V726A, M694A) ekzon 10'da bulunmaktadır. E148Q mutasyonu da ekzon 2'de yer alan ve sık görülen mutasyonlardandır.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOT

3.1. Çalışma Prosedürü

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Etik Komisyonu 10.09.2024 tarih, 14 sayı ve 2024-1392 araştırma kodu izni ile çalışma onayı alındı. İki basamaklı olarak yapılan çalışmada ilk olarak Gazi Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarına son 3 yıl (2020-2023) içinde gelen hastaların FMF mutasyonları (homozigot, heterozigot, birleşik heterozigot) incelenmiştir. İkinci olarak FMF mutasyonu olan (169 kadın,178 erkek yaş aralığı: 29-69) bireylerin HLA B* antijenleri tespit edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada kullanılan malzeme ve cihazlar

Çalışmamızda, Doku Tipleme Laboratuvarı'na 2020–2023 yılları arasında gelen hem FMF mutasyonu tespit edilen hem de HLA B* antijenleri çalışılan hastalar dahil edilmiştir. Hastalardan alınan EDTA'lı kan örneklerinden (hem HLA antijenleri hem de FMF mutasyonları için) DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonu için DNA Qiagen (Almanya) kiti kullanılmıştır. İzolasyon için EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) aleti ve DNA konsantrasyonun ölçümleri için Thermo Scientific (Nanodrop 2000 United Kingdom) aletinden yararlanılmıştır. HLA tiplemesi için, Lifecodes firmasına ait HLA-B* eres SSO typing kit, Taq Polimeraz, Streptavidin-PE (SA-PE), Luminex Sheath Fluid (1x veya 20x) kimyasalları ile Termocycle (Sensequest, Almanya) ve Luminex (Luminex®xMAP; Austin, Amerika) cihazlarında çalışılmıştır. FMF mutasyon analizlerinde Pyrosekans (PyroMark Q24 MDx, Almanya) cihazı kullanılmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonda Qiagen EZ1 Advanced XL cihazı ve kitleri kullanılmıştır. Çalışma örnekleri için 5 mL periferik kan örneği alınmış ve 100 µL DNA elde edilmiştir. DNA yoğunlukları Nanodrop 2000 aleti ile ölçülmüştür. Çalışmada DNA yoğunlukları 10-50 ng/ul aralıklarında bulunmuştur. İzole edilen DNA örnekleri hem doku grubu

belirlemede hem de FMF analizinde kullanılmıştır.

3.3. HLA B* Doku Grubu Antijenlerinin Belirlenmesi

HLA B* antijenleri için, PZR-SSO Luminex yöntemi (Yoshiki vd., 2005) ile laboratuvarımızda Lifecodes HLA-B* Eres Rapid kitleri kullanılmıştır. DNA örneklerinin HLA tiplenişi Quick-Type for Lifematch programıyla analiz edilmiştir.

Tablo 3.1: DNA izolasyonunda, HLA B* tiplenişinde ve FMF mutasyon analizlerinde kullanılan malzemeler ve cihazlar

DNA İzolasyon kiti	Qiagen/ALMANYA
DNA İzolasyon cihazı	EZ1 Advanced XL, Qiagen, GERMANY
DNA konsantrasyon cihazı	Nanadrop, Thermo Scientific, UK
Lifecodes HLA-B* Eres SSO Typing Kit	Lifecodes, USA
Lifecodes Taq Polimeraz	Lifecodes, USA
Streptavidin-PE (SA-PE)	Lifecodes, USA
Lifecodes Luminex Sheath Fluid (1x veya 20x)	Lifecodes, USA
Luminex	Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, Texas, USA
Pyrosekans cihazı	PyroMark Q24 MDx, GERMANY
FMF Primerleri	PyroMark Q24, GERMANY

3.3.1. DNA amplifikasyonu (PZR)

Şekil 3.1. Tablo 3.2 ve 3.3’de planlanan çalışmalar için; 0,2 mL’lik PZR tüpü kullanılmıştır. Çalışmalar için 4’er μ L DNA, PZR tüplerine pipetlenmiştir ve kullanılacak çalışma karışımı hazırlanmıştır. Uygun PZR döngü programı seçilerek çalışmalar yapılmıştır (Anıl, 2022).



Şekil 3.1. Çalışma tüpleri (Anıl, 2022)

Tablo 3.2. PZR’da kullanılan belirteç ve miktarları.

Belirteçler	Tek Örneklik
Çalışma karışımı (+4°C)	6 µL
Steril distile su	10 µL
Taq Polymerase enzimi (-20°C)	0,2 µL

6 µL çalışma karışımı, 10 µL steril distile su ve 0,5 µL Taq Polymerase enzimi DNA örnekleri üzerine pipetlenmiştir. PZR döngü programına göre DNA amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.3. PZR Döngü programı

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	300	1 döngü
Denatürasyon	95	30	8 döngü
Bağlanma	60	45	8 döngü
Uzama	72	45	8 döngü
Denatürasyon	30	300	32 döngü
Bağlanma	60	45	32 döngü
Uzama	72	45	32 döngü
Son uzama	72	900	1 döngü
Bekleme	4	300	1 döngü

3.3.2. Hibridizasyon

Çalışma öncesi kit içindeki dilüsyon solüsyonu 45°C’de 5 dakika ısıtılmıştır 5 µL PZR ürünü Costar Plate’e kotlanmıştır. Probe Mix, ısı bloğunda 55°C’de 10 dakika ısıtılmıştır. 15 saniye sonikasyon işleminden sonra, 15 saniye vortekslenmiştir. 15 µL Probe karışımı, tüm kuyulara dağıtılmıştır. Plate üzeri seal ile kaplanmış ve Thermal Cycler aletine yerleştirilmiştir. Gerekli program seçilerek, çalışma gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. Hibridizasyon reaksiyon koşulları

ISI (°C)	Süre (dk)
97°C	2
47°C	10
56°C	8
56°C	∞

HLA B* antijenleri Quick-Type for LifeMatch programıyla analiz edilmiştir.

3.4. FMF Mutasyon analizi

PZR ile MEFV geni ekzon 2, 3, 5, ve 10 bölgelerinin amplifikasyonu sağlanır. PZR reaksiyonun örnek DNA'sı hariç tüm bileşenleri 8'li PZR striplerine koyularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Reaksiyonu hazırlamaya başlamadan önce DNA örnekleri hafifçe vortekslenmiş ve santrifüjlenmiştir. Bir stripin 8 tüpüne konsantrasyonu yaklaşık 2 ng/ul'ye ayarlanmış DNA örneğinden 5'er ul koyulmuştur. Bu şekilde ilgili DNA örneğinden 25 ul'lik reaksiyon başına yaklaşık 10 ng konulacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 3.5. PZR yöntemi

Aktivasyon aşamaları	95°C	15 dakika
Denaturation	94°C	30 sn
Annealing	60°C	30 sn
Extension	72°C	30 sn
Döngü sayısı: 45		
Final extension	72°C	10 dakika

3.4.1. PZR ürünlerinin streptavidin sepharose bead'lerine immobilizasyonu

Streptavidin Sepharose bilyelerini içeren şişeyi nazik bir şekilde çalkalayarak homojen bir solüsyon elde edilmiştir. Çalışma için gerekli Mastermix aşağıdaki tabloya uygun hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Çalışma master mix

Karışım	Miktar	24 örneklilik
Streptavidin Sepharose boncuk	2 µl	2 x 26 = 52 µl
Binding Buffer	40 µl	40 x 26 = 1040 µl
Ultrapure H ₂ O	28 µl	28 x 26 = 728 µl
Toplam	70 µl	

1. Her bir çalışma kuyusu için 70 ul mastermix konulmuştur.
2. Çalışma protokolünde gösterildiği gibi her kuyu için 10 ul PZR ürünü eklenmiştir. Bu düzende her 8'li sıra bir hasta için kullanılmıştır
3. PZR plate'inin veya striplerin kapağı sızdırma olmayacak şekilde kapatılmıştır.
4. Oda sıcaklığında 1400 rpm'de 5-10 dakika çalkalanmıştır.

3.4.2. Pyrosekans için örnek hazırlama prosedürü

1. Q24 Plate'in her bir kuyucuğuna run dosyasında hazırlandığı şekilde 2.5 ul sekans primeri ve 22.5 ul annealing buffer konulmuştur.
2. PZR plate veya striplerini ve Q24 plate'i aynı oriyantasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilmiştir.
3. Filtre problemlerini PZR plate'in veya striplerin dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırılmış ve 15 saniye kadar tutarak bilyeleri yakalanmıştır.
4. El ünitesini %70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilmiştir.
5. El ünitesini "Denaturation Solution" içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletilmiştir.
6. El ünitesini "Washing Buffer" içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilmiştir.
7. El ünitesini dikey biçimde 90°'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlamıştır.
8. Çalışmada kullanılan problemler, cihaz plate kuyucuklarına daldırılıp hafifçe sallanarak bilyeleri sekans primeri bulunduran buffera bırakılmıştır.
9. Cihaz plate'i sıcaklığı 80°C'ye ayarlanmış plate holder üzerinde 120 saniye tutulmuştur.
10. Cihaz plate'i 80°C den alınmış plate holder ile birlikte oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

11. Çalışma ile ilgili bütün işlemler gerçekleştirildikten sonra Pyrosekans cihazında çalışma protokolü seçilerek FMF geninde görülen mutasyonlar, polimorfizmler ve aminoasit değişimleri Tablo 3.7 'ye göre analiz edilmiştir (Taşpınar, 2011).

Tablo 3.7. FMF geninde görülen mutasyonlar, polimorfizmler ve aminoasit değişimleri.

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
1	R42W	c.124 C>T	42. Kodon Arg→Trp
1	A89T	c.265 G>A	89. Kodon Ala→Thr
2	S108R	c.322A>C	108. Kodon Ser→Arg
2	L110P	c.329T>C	110. Kodon Leu→Pro
2	334_335insG	c.334_335insG	334_335. Kodon Glu→fsX130
2	P124H	c.371C>A	124. Kodon Pro→His
2	390_391insGAGG	c.382_390dup	390_391. Kodon Glu→Asn
	GGAC		
2	S141I	c.422G>T	141. Kodon Ser →Ile
2	R143P	c.428G>C	143. Kodon Arg→ Pro
2	E148Q	c.442G>C	148. Kodon Glu →Gln
2	E148V	c.443A>T	148. Kodon Glu→Val
2	A149T	c.445G>A	149. Kodon Glu→Val
2	R151S	c.453G>C	151. Kodon Arg→Ser
2	E163A	c.488A>C	163. Kodon Glu→Ala
2	E167D	c.501G>C	167. Kodon Glu→Asp
2	A171T	c.511G>A	171. Kodon Ala→Thr
2	P175H	c.524C>A	175. Kodon Pro→His
2	T177I	c.530C>T	177. Kodon Thr→Ile
2	S179I	c.536G>T	179. Kodon Ser→Ile
2	P180R	c.539 C>G	180. Kodon Pro→Arg
2	G196W	c.586G>T	196. Kodon Glu→Trp
2	R202Q	c.605G>A	202. Kodon Arg→Gln
2	606_621dup	c.606_621dup	606_621. Kodon Ser→AlafsX39
2	E225D	c.675G>C	225. Kodon Glu→Asp
2	E230K	c.688G>A	230. Kodon Glu→Lys
2	G236V	c.707G>T	236. Kodon Gly→Val
2	S242R C>G	c.726C>G	242. Kodon Ser→Arg
2	S242R C>A	c.726C>A	242. Kodon Ser→Arg
2	E251K	c.751G>A	251. Kodon Glu→Lys
2	761_764dup	761_764dupCG>A	761_764. Kodon sn→ArgfsX70
2	T267I	c.800C>T	267. Kodon Thr→Ile
2	A268V	c.803C>T	268. Kodon Ala→Val
2	R278P	c.833G>C	278. Kodon Arg→Pro
2	P283R	c.848C>G	283. Kodon Pro→Arg
2	P283L	c.848C>T	283. Kodon Pro→Leu
2	A289V	c.866C>T	289. Kodon Ala→Val
2	E299G	c.896A>G	299. Kodon Glu→Gly
3	G304R	c.910G>A	304. Kodon Gly→Arg
3	T309M	c.926 C>T	309. Kodon Thr→Met
3	R314H	c.941G>A	314. Kodon Arg→His
3	E319K	c.955G>A	319. Kodon Glu→Lys
3	V328A	c.983T>C	328. Kodon Val→Ala

Tablo 3.7. FMF geninde görülen mutasyonlar, polimorfizmler ve aminoasit değişimleri (Devam).

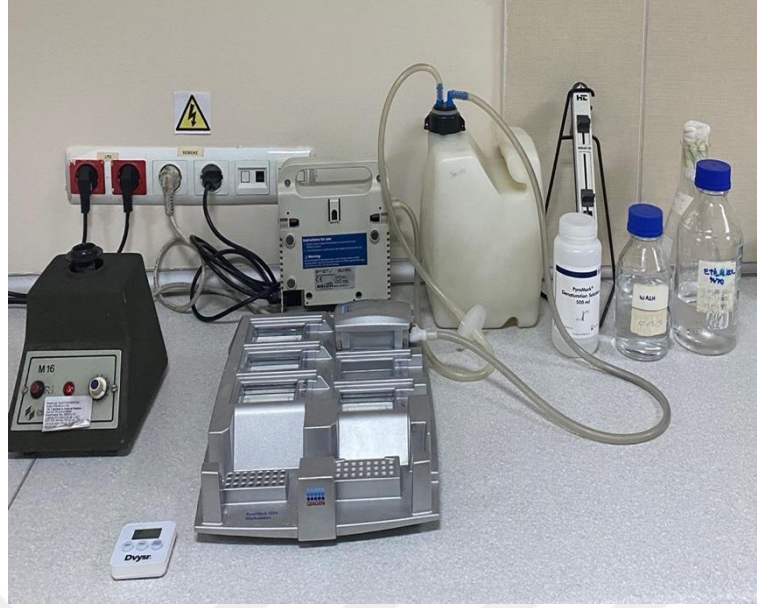
EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
3	R329H	c.986G>A	329. Kodon Arg→His
3	S339F	c.1016C>T	339. Kodon Ser→Phe
3	R348H	c.1043G>A	346. Kodon Arg→His
3	R354W	c.1060C>T	354. Kodon Arg→Trp
3	P369S	c.1105C>T	369. Kodon Pro→Ser
3	Q383K	c.1147C>A	383. Kodon Gln→Lys
3	R408Q	c.1223G>A	408. Kodon Arg→Gln
4	I423V	c.1267A>G	423. Kodon Ile→Val
4	Q440E	c.1318C>G	440. Kodon Gln→Glu
5	A457V	c.1370C>T	457. Kodon Ala→Val
5	V469L	c.1405G>T	469. Kodon Val→Leu
5	E474K	c.1420G>A	474. Kodon Glu→Lys
5	H478Y	c.1432C>T	478. Kodon His→Tyr
5	F479L	c.1437C>G	479. Kodon Phe→Leu
5	V487M	c.1459G>A	487. Kodon Val→Met
5	R501G	c.1501C>G	501. Kodon Arg→Gly
5	R501H	c.1502G>A	501. Kodon Arg→His
5	I506V	c.1516A>G	506. Kodon Ile→Val
5	I513T	c.1538T>C	513. Kodon Ile→Thr
5	G514E	c.1541G>A	514. Kodon Gly→Glu
7	L559F	c.1675C>T	559. Kodon Leu→Phe
8	T577S	c.1729A>T	577. Kodon Thr→Ser
8	M582L	c.1744A>C	582. Kodon Met→Leu
9	I591T	c.1772T>C	591. Kodon Ile→Thr
9	A595V	c.1784C>T	595. Kodon Ala→Val
10	G632S	c.1894G>A	632. Kodon Gly→Ser
10	I640M	c.1920C>G	640. Kodon Ile→Met
10	I641F	c.1921A>T	641. Kodon Ile→Phe
10	P646L	c.1937C>T	646. Kodon Pro→Leu
10	L649P	c.1946T>C	649. Kodon. Leu→Pro
10	R653H	c.1958G>A	653. Kodon Arg→His
10	E656A	c.1967A>C	656. Kodon Glu→Ala
10	D661N	c.1981G>A	661. Kodon Asp→Asn
10	S675N	c.2024G>A	675. Kodon Ser→Asn
10	G678E	c.2033G>T	678. Kodon Gly→Glu
10	M680L	c.2038A>C	680. Kodon Met→Leu
10	M680IGC	c.2040G>C	680. Kodon Met→Ile
10	M680IGA	c.2040G>A	680. Kodon Met→Ile
10	T681I	c.2042C>T	681. Kodon Thr→Ile
10	Y688C	c.2063A>G	688. Kodon Tyr→Cys
10	Y688X	c.2064C>G	688. Kodon Tyr→X
10	I692DEL	c.2076_2078del	692. Kodon Ile→del
10	M694V	c.2080A>G	694. Kodon Met→Val
10	M694L	c.2080A>T	694. Kodon Met→Leu

Tablo 3.7. FMF geninde görülen mutasyonlar, polimorfizmler ve aminoasit değişimleri (Devam).

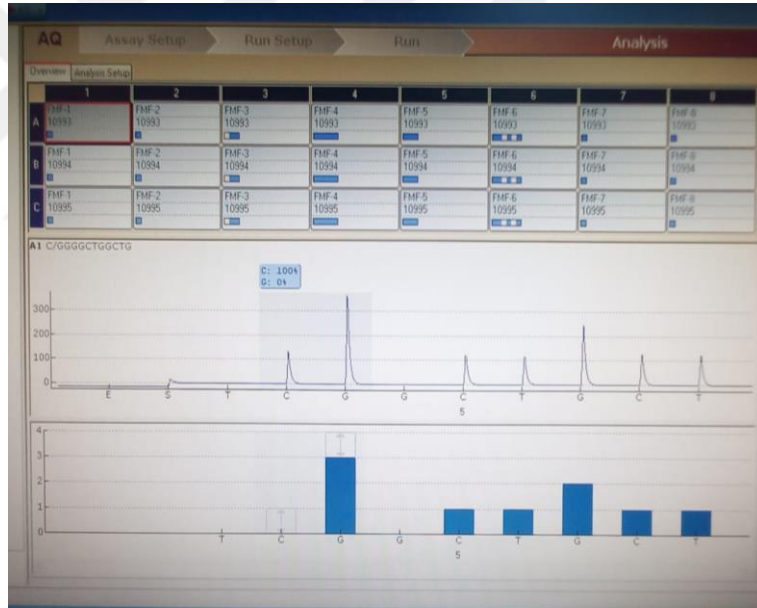
EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEğİŞİMİ	KODON DEğİŞİMİ ve ETKİŐİ
10	M694DEL	c.2081_2083del	694. Kodon Met→del
10	M694I	c.2082G>A	694. Kodon Met→Ile
10	K695R	c.2084A>G	695. Kodon Lys→Arg
10	K695M	c.2084A>T	695. Kodon Lys→Met
10	S702C	c.2105C>G	702. Kodon Ser→Cys
10	V704I	c.2110G>A	704. Kodon Val→Ile
10	P705S	c.2113C>T	705. Kodon Pro→Ser
10	R708C	c.2122C>T	708. Kodon Arg→Cys
10	L709R	c.2126T>G	709. Kodon Leu→Arg
10	R717S	c.2149C>A	717. Kodon Arg→Ser
10	I720M	c.2160C>G	720. Kodon Ile→Met
10	V726A	c.2177T>C	726. Kodon Val→Ala
10	F743L	c.2229C>G	743. Kodon Phe→Leu
10	A744S	c.2230G>T	744. Kodon Ala→Ser
10	S749C	c.2246C>G	749. Kodon Ser→Cys
10	I755V	c.2263A>G	755. Kodon Ile→Val
10	P758S	c.2272C>T	758. Kodon Pro→Ser
10	R761H	c.2282G>A	761. Kodon Arg→His
10	I772V	c.2314A>G	772. Kodon Ile→Val
10	P780T	c.2338C>A	780. Kodon Pro→Thr



Şekil 3.2. Pyrosekans Cihazı



Şekil 3.3. Pyrosekans Çalışma İstasyonu



Şekil 3.4. Pyrosekans Analiz Programı



Şekil 3.5. Luminex Cihazı



Şekil 3.6. Luminex Analiz programı

3.5. İstatistiksel Analiz

Mutasyon tipleri ve HLA B* antijenleri arasındaki ilişki tespiti için Chi-square testi kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Erkek hastalarda bulunan HLA B* alelleri ve sıklıkları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Erkek hastalarda HLA B* alel sıklığı.

ALEL	HASTA SAYISI n:178 sayı / %
B07	12 / 6.74
B08	17 / 9,55
B13	7 / 3.93
B14	8 / 4,49
B15	11/ 6.17
B18	24 / 13.48
B27	24 / 13.48
B35	63 / 35.39
B38	11 / 6.17
B39	4 / 2.24
B40	10 / 5.61
B41	12 / 6.74
B44	30 / 16.85
B48	1 / 0.56
B49	19 / 10.67
B50	9 / 5.05
B51	46 / 25.84
B52	9 / 5.05
B53	4 / 2.24
B55	9 / 5.05
B56	2 / 1.12
B57	10 / 5.61
B58	6 / 3.37

Erkek hastalarda tespit edilen HLA B* antijenleri; HLA-B*07, -B*08, -B*13, -B*14, -B*15, -B*18, -B*27, -B*35, -B*38, -B*39,- B*40, -B*41, -B*44, -B*48, -B*49, -B*50, -B*51, -B*53, -B*55, -B*56, -B*57,-B*58. Erkek hastalarda –B* 35 (%35.39), -B*51 (%25,84) ve -B*44 (%16,85) en sık antijenler olarak bulunmuştur. Türk popülasyonlarında yapılan kontrol grubu bulunan bazı çalışmalarda en sık görülen –B*35 ve –B51 olarak karşımıza çıkmaktadır (Gönen vd., 2017; Peru vd., 2008). En sık

tespit edilen 3.antijen olarak –B* 44 gözlenmiştir.

Kadın hastalarda bulunan HLA B* alelleri ve sıklıkları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Kadın hastalarda HLA B* alel sıklığı.

ALEL	HASTA SAYISI Nn:169 Sayı / %
B07	15/8.87
B08	11/6.50
B13	12/7.10
B14	13/7.69
B15	9/5.32
B18	11/6.50
B27	23/13.60
B35	64/37.86
B38	15/8.87
B39	5/2.95
B40	17/10.05
B41	13/7.69
B44	20/11.83
B45	3/1.77
B48	1/0.59
B49	10/5.91
B50	9/5.32
B51	40/23.66
B52	15/8.87
B53	2/1.18
B54	2/1.18
B55	6/3.55
B56	1/0.59
B57	10/5.91
B58	6/3.55

Kadın hastalarda tespit edilen HLA B* antijenleri; HLA-B*07, -B*08, -B*13, -B*14, -B*15, -B*18, -B*27, -B*35, -B*38, -B*39, -B*40, -B*41, -B*44, -B*45, -B*48, -B*49, -B*50, -B*51, -B*52, -B*53, -B*54, -B*55, -B*56, -B*57, -B*58. Türk popülasyonlarında yapılan kontrol grubu bulunan çeşitli çalışmalarda en sık görülen –B*35 ve –B*51 olarak karşımıza çıkmaktadır (Gönen vd., 2017; Peru vd., 2008). En sık tespit edilen 3.antijen olarak –B* 27 gözlenmiştir.

Erkek hastalardan farklı olarak, kadın hastaların üçünde –B*45 (%1,77) antijeni

ikisinde de –B*54 (%1,18) antijeni tespit edilmiştir. Erkek ve kadın hastalarımızda cinsiyete göre genotip dağılımı Heterozigot: Tek bir mutasyon değişim görülmesi, Homozigot: Aynı mutasyonun iki allelde görülmesi, Birleşik heterozigot: İki farklı mutasyonun bulunması şeklinde ifade edilmektedir. Erkek hastalarda bulunan FMF mutasyonları ve bulunma sıklıkları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Erkek hastalarda FMF mutasyonları ve sıklıkları.

MUTASYON	HASTA SAYISI	SAYI	HETEROZİGOT (%)	SAYI	BİRLEŞİK HETEREZİGOT (%)	SAYI	HOMOZİGOT (%)
E148Q	178	42	23.59	8	4.49	2	1.12
P369S	178	8	4.49	4	2.24	-	
F479L	178	1	0.56	2	1.12	-	
M680I	178	13	7.30	10	5.61	-	
M694V	178	43	24.5	15	8.42	15	8.42
V726A	178	16	8.98	1	0.56	1	0.56
A744S	178	9	5.05	1	0.56	1	0.56
R761H	178	1	0.56	-		-	

178 erkek hastanın 43’ünde heterozigot M694V, 42’sinde heterozigot E148Q, 16’sında heterozigot V726A, 13’ünde heterozigot M680I, 9’unda heterozigot A744S, 8’inde heterozigot P369S, 1’inde heterozigot F479L ve 1 ‘inde heterozigot R761H mutasyonları tespit edilmiştir. 178 erkek hastanın 15’inde birleşik heterozigot M6947V, 10’unda birleşik heterozigot M680I, 8’inde birleşik heterozigot E148Q, 2’sinde birleşik heterozigot F479L, 1’inde birleşik heterozigot V726A ve 1’inde birleşik heterozigot A744S mutasyonları saptanmıştır. 178 erkek hastanın 15’inde homozigot M694V, 2’sinde homozigot E148Q, 1’inde homozigot V726A ve 1’inde homozigot A744S mutasyonları görülmüştür.

Kadın hastalarda bulunan FMF mutasyonları ve bulunma sıklıkları Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Kadın hastalarda FMF mutasyonları ve sıklıkları.

MUTASYON	HASTA SAYISI	SAYI	HETEROZİGOT (%)	SAYI	BİRLEŞİK HETEROZİGOT (%)	SAYI	HOMOZİGOT (%)
E148Q	169	37	21.89	11	6.50	1	0.59
P369S	169	8	4.73	5	2.95	-	
F479L	169	2	1.18	-		-	
M680I	169	7	4.14	9	5.32	1	0.59
M694V	169	49	28.99	4	2.36	12	7.10
V726A	169	14	8.28	6	3.55	-	
A744S	169	8	4.73	2	1.18	-	
R761H	169	1	0.59	1	0.59	-	

169 kadın hastanın 49'unda heterozigot M694V, 37'sinde heterozigot E148Q, 14'ünde heterozigot V726A, 8'inde heterozigot P369S, 8'inde heterozigot A744S, 7'sinde heterozigot M680I, 2'sinde heterozigot F479L ve 1'inde heterozigot R761H mutasyonları tespit edilmiştir. 169 kadın hastanın 11'inde birleşik heterozigot E148Q, 9'unda birleşik heterozigot M680I, 4'ünde birleşik heterozigot M694V, 2'sinde birleşik heterozigot A744S, 1'inde birleşik heterozigot ve 1'inde birleşik heterozigot R761H mutasyonları saptanmıştır. 169 kadın hastanın 12'sinde homozigot M694V, 1'inde homozigot E148Q ve 1'inde homozigot M680I mutasyonları görülmüştür.

Tablo 4.5. Kadın ve erkek hastalarda en fazla görülen HLA B** antijenleri.

HLA B* Antijen	KADIN HASTA SAYISI	Kadın hasta (%)	ERKEK HASTA SAYISI	Erkek hasta (%)
B*35	169	64 (37,86)	178	63 (35,39)
B*51	169	40 (23,66)	178	46 (25,84)
B*27	169	23 (13,60)	178	24 (13,48)
B*44	169	20 (11,83)	178	30 (16,85)
B*18	169	11 (6,5)	178	24 (13,48)

Erkek hastalarda sırasıyla en sık görülen antijenler HLA B*35, HLA B*51, HLA B*44, HLA B*27 ve HLA B*18 olarak tespit edilmiştir. Kadın hastalarda da sırasıyla en sık

görülen antijenler HLA B*35, HLA B*51,HLA B*27,HLA B*44 ve HLA B*18 bulunmuştur.

Tablo 4.6. Kadın ve erkek hastalarda en fazla görülen FMF mutasyonları.

FMF mutasyonu	KADIN HASTA SAYISI	KADIN HASTA	Kadın hasta (%)	ERKEK HASTA SAYISI	ERKEK HASTA	Erkek hasta (%)
M694V/?	169	61	36,09	178	57	32,02
E148Q/?	169	41	24,26	178	47	26,40
V726A/?	169	20	11,83	178	20	11,23
P369S/?	169	12	7,10	178	14	7,86
M680I/?	169	19	11,24	178	19	10,67

Kadın ve erkek hastalarda en sık görülen FMF mutasyonları karşılaştırıldığında; 169 kadın hastanın 61'inde heterozigot M694V, 41'inde heterozigot E148Q, 20'sinde heterozigot V726A, 19'unda heterozigot M680I ve 12'sinde heterozigot P369S mutasyonları gözlenmiştir. 178 erkek hastanın 57'sinde heterozigot M694V, 47'sinde heterozigot E148Q ,20'sinde heterozigot V726A, 19'unda heterozigot M680I ve 14'ünde heterozigot P369S mutasyonları gözlenmiştir.

Tablo 4.7. En sık HLA B* antijen ve FMF mutasyonları sıklığı.

HLA B*	M694V/? (%)	E148Q/? (%)	V726A/? (%)	P369S/? (%)	M680I/? (%)
B*35	39 (11,23)	36 (10,37)	12 (3,45)	12 (3,45)	15 (4,32)
B*51	32 (9,22)	21 (6,05)	11 (3,17)	5 (1,44)	8 (2,30)
B*27	17 (4,89)	9 (2,59)	7 (2,01)	5 (1,44)	8 (2,30)
B*44	16 (4,61)	16 (4,61)	6 (1,72)	2 (0,57)	6 (1,72)
B*18	14 (4,03)	6 (1,72)	4 (1,15)	2 (0,57)	1 (0,28)

Hem kadın hem de erkek hastaların toplamında en sık görülen HLA B* 35 antijeni ile M694V mutasyonu görülme sıklığı % 11,23 E148Q mutasyonu görülme sıklığı % 10,37, M680I mutasyonu görülme sıklığı % 4,32, V726A ve P369S görülme sıklıkları da % 3,45 olarak saptanmıştır. Hem kadın hem de erkek hastaların toplamında en sık görülen HLA B* 51 antijeni ile M694V mutasyonu görülme sıklığı % 9,22, E148Q mutasyonu görülme sıklığı % 6,05, V726A mutasyonu görülme sıklığı % 3,17, M680I görülme sıklığı % 2,3, P369S görülme sıklığı %1,44 olarak saptanmıştır. Hem kadın hem de erkek hastaların toplamında en sık görülen HLA B* 27 antijeni ile M694V

mutasyonu görülme sıklığı % 4,89, E148Q mutasyonu görülme sıklığı % 2,59, M680I mutasyonu görülme sıklığı % 2,30, V726A mutasyonu görülme sıklığı % 2,01 ve P369S görülme sıklığı % 1 ,44 olarak saptanmıştır. Hem kadın hem de erkek hastaların toplamında en sık görülen HLA B* 44 antijeni ile M694V mutasyonu görülme sıklığı % 4,61, E148Q mutasyonu görülme sıklığı % 4,61, M680I mutasyonu görülme sıklığı % 1,72, V726A mutasyonu görülme sıklığı % 1,72 ve P369S görülme sıklığı % 0 ,57 olarak saptanmıştır. Hem kadın hem de erkek hastaların toplamında en sık görülen HLA B* 18 antijeni ile M694V mutasyonu görülme sıklığı % 4,03, E148Q mutasyonu görülme sıklığı % 1,72, V726A mutasyonu görülme sıklığı % 1,15 P369S görülme sıklığı % 0,57 ve M680I mutasyonu görülme sıklığı % 0,28 olarak saptanmıştır.

FMF mutasyonları açısından bakıldığında kadın hastalardaki mutasyon sıklığı; 49' unda M694V mutasyonu (% 28.99) heterozigot, 14 inde M694V mutasyonu (% 2.36) birleşik heterozigot ve 12' sinde M694V mutasyonu (% 7.10) homozigot şeklinde bulunmuştur. 37' sinde E148Q (% 21.89) heterozigot, 11' inde E148Q mutasyonu (% 6.50) birleşik heterozigot, 1 inde E148Q mutasyonu (% 0.59) homozigot bulunmuştur. 14 hastada V726A mutasyonu (% 8.28) heterozigot, 6 hastada ise V726A mutasyona (% 3.55) birleşik heterozigot olarak tespit edilmiştir.

FMF mutasyonlarının 178 erkek hastadaki dağılımında; 43 hastada M694V mutasyonu (% 24.15) heterozigot, 15'inde M694V mutasyonu (% 8.42) birleşik heterozigot ve yine 15 hastada M694V mutasyonu (% 8.42) homozigot şeklinde bulunmuştur. 42 hastada E148Q mutasyonu (% 23.53) heterozigot, 8 hastada E148Q mutasyonu (% 4.49) birleşik heterozigot, 2 hastada E148Q mutasyonu (% 1.12) homozigottur. Hastaların 16'sında V726A mutasyonu (% 8.98) heterozigot, 1 tanesinde V726A mutasyonu (% 0.56) birleşik heterozigot ve başka bir hastada da V726A homozigot olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; HLA B* antijenleri açısından bakıldığında 169 kadın hastanın; 64 'ünde HLA B*35 (% 37.86, 40' inda HLA B*51(% 23.66), 23' ünde HLA B*27 (% 13.60) antijeni bulunmuştur. Erkek hastalarda HLA B* antijeni sıklığına bakıldığında 178 hastanın; 63'ünde HLA B*35(% 35,39), 46'sında HLA B*51(% 25.84), 24 hastada ise HLA B*27 ve HLA B*18 (% 13.48) antijeni olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak hem kadın hem de erkek hasta popülasyonunda HLA B* antijenleri ve

FMF mutasyonları karşılaştırıldığında; HLA B*35 ve M694V/? Birlikteliği % 11,23 (39 hasta), HLA B*35 ve E148Q/? birlikteliği %10,37 (36 hasta), HLA B*35 ve V726A/? birlikteliği % 3,45 (12 hasta) olarak bulunmuştur. HLA B*51 ve M694V/? birlikteliği % 9,22 (32 hasta), HLA B*51 ve E148Q/? birlikteliği % 6,05 (21 hasta), HLA B*51 ve V726A/? birlikteliği % 3,17 (11 hasta) olarak bulunmuştur. HLA B*27 ve M694V/? Birlikteliği % 4,89 (17 hasta), HLA B*27 ve E148Q/? birlikteliği % 2,59 (9 hasta), HLA B*27 ve V726A/? birlikteliği % 2,01 (7 hasta) olarak bulunmuştur.



BÖLÜM 5

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada Gazi Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarına FMF klinik tanısı ile başvuran, mutasyon tespit edilen hastalarda HLA B* antijenleri ile arasında ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda HLA B* antijenleri Luminex SSO yöntemi ile, FMF genetik mutasyonları da Pyrosekans yöntemi ile araştırılmıştır.

FMF, Doğu Akdeniz bölgesinden gelen popülasyonlarda özellikle Türkler, Yahudiler, Araplar ve Ermeniler’de yaygındır. Bununla birlikte, Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'dan yüzlerce hasta bildirilmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009; Migita vd., 2016).

Ülkemizde FMF prevalansı yüksek olduğu için birçok bölgede FMF mutasyonları ve sıklığı ile ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır.

Yapılan bu tez çalışması, 2015 yılında Japon popülasyonunda yapılan bir çalışma ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada; HLA polimorfizmlerinin FMF riskine katkısı, değiştirici genlerin güçlü adayları olarak belirlenmiştir. FMF’li hastalarda özellikle HLA B* ve HLA DRB1* antijenleri incelenmiştir. Hasta sayısı ve popülasyon açısından yapılan bu tez çalışmasından farklı sonuçlar tespit edilmiştir (Yasunami vd., 2015).

Yalçinkaya ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu çalışmada en sık gözlenen mutasyonlar M694V (% 51.4), M680I (% 14.4), V726A (% 8.6) olarak bildirilmiştir (Yalçinkaya vd., 2000) .Türkiye’de 2005 yılında çok merkezli yapılan çalışmada M694V (% 67.2), V726A (% 15.5), M680I (% 12) olarak bulunmuştur (Turkish AAA Study Group, 2005)

2011 yılında yapılan bir yüksek lisans tezinde Doğu Anadolu bölgesindeki FMF mutasyonlarının dağılımı bu çalışmalardan biridir (Taşpınar, 2011). M694V/ ? (% 57,25), V726A/ ? (% 23,72) ve M680I / ? (% 27,29) olarak tespit edilmiştir. 2011 yılında yapılan başka bir çalışmada M694V/ ? (% 18,86), E148Q/? (% 12,16), M680I/? (% 7,66), V726A/? (% 5,74) ve P369S/? (% 2,68) olarak bulunmuştur (Dundar vd.,

2011).

2012 yılında yapılan bir çalışma Batı Anadolu'da M694V/? , E148Q/ ? ve P369S/ ? mutasyon oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiş (Ozturk vd., 2012) .

2020 yılında Tokat bölgesinde yapılan bir çalışmada en sık tespit edilen mutasyonlar; M694V/? (% 58,2), R202Q/? (% 27,6) ve V726A/? (% 18,2) olarak bulunmuştur (Kevser vd., 2020).

2023 yılında Sivas bölgesinde yapılan başka bir çalışmada en sık saptanan genotiplerin frekans yüzdeleri; M694V/- (% 47.40), V726A/- (% 15.90) ve M680I(C)/- (% 9.99) olarak bulunmuştur (Demir ve Yakar, 2023).

Moleküler biyoloji teknikleri gelişmeden ve popülasyon genetiği ile ilgili olarak az sayıda hasta ile yapılan bazı çalışmalarda HLA ve B antijenleri arasındaki ilişkilere bakıldığında; 1985 yılında yapılan sınırlı sayıda hasta ile yapılan bir çalışmada HLA ve FMF mutasyonları arasında da ilişki bulunamamıştır (Fradkin vd., 1985).

2005 yılında yapılan çalışmada HLA DR*, HLA DQ* alelleri ve FMF mutasyonları arasındaki ilişkiye bakılmış, hasta sayısı az olmasına rağmen HLA DR*, -DQ* alelleri ile bazı mutasyonlar arasında ilişki tespit edilmiştir (Kınıklı vd., 2005).

2009 yılında yapılan başka bir çalışmada FMF sakroloitinde HLA B*27 antijenleri ve mutasyonlar arasındaki ilişki çalışılmış. Sakroloit gelişiminde M694V ve HLA27 birlikteliğinin rol oynayacağı gösterilmiş (Kaşifoğlu vd., 2009).

2010 yılında Behçet hastalığında en sık görülen HLA B*51 antijenleri ve FMF arasındaki ilişki araştırılmış. Çalışma grubu için bir Ermeni okulu seçilmiş. Yapılan çalışmada önemli bir ilişki tespit edilememiş (Seyahi vd., 2010).

2010 yılında Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada ankilozan spondilitli hastalar ve FMF mutasyonlarına bakılmış.HLA B*27 ve özellikle M694V mutasyonu ilişkili bulunmuş (Cosan vd., 2010).

FMF ülkemizde çok sık görülen ve ayırıcı tanıda güçlük yaşanan bir hastalıktır. Otoinflamatuvar bir hastalık olup çeşitli inflamatuvar hastalıklar ve vaskülitler ile birlikte görülebilir. MEFV genindeki mutasyonlar FMF hastalarının büyük bir çoğunluğunda tespit edilmektedir. Farklı etnik gruptan birçok FMF hastasında MEFV geninin karboksiterminal parçasında üç missense mutasyonu allellerin % 80'inde gözlenmiştir.

FMF hastalarında hem hücrel hem de humoral immün sistemde anormallikler bulunmuştur. Bu gözlemler FMF -HLA bölgesinin analiz yolunu işaret etmiştir.

FMF'in periyodik ateş semptomlarının nasıl tetiklendiği hala belirsiz kalsa da, MEFV ürünü, aktivitesi patojenik mutasyonlar tarafından artırılan inflamatuvarin hücrel bileşenleriyle etkileşime girer (Chae vd., 2009). Bu nedenle, FMF ile ilişkili MEFV mutasyonları, aynı zamanda belirli HLA polimorfizmleriyle de ilişkili olan inflamatuvar hastalıklarda hücrel tepkileri arttırdığı düşünülmektedir. HLA-MEFV etkileşimi bağlamında bu inflamatuvar hastalıkların patogenezindeki ortak altta yatan mekanizmanın ortaya çıkarılması, yeni terapötik veya önleyici önlemlerin etkili bir hedefinin bulunmasına yardımcı olacaktır.

Ateşin yanısıra FMF hastalarının ankilozan spondilit ve Behçet hastalığı gibi diğer inflamatuvar hastalıklara yatkın olduğu bildirilmektedir. (Ben-Chetrit vd., 2002; Akar vd., 2013).

Bu çalışmada; FMF hastalarında HLA-B allelleri ile MEFV genindeki mutasyonlar karşılaştırıldı. Sonuç olarak; FMF hastalarında HLA-B allelleri ve FMF mutasyonları arasındaki ilişki Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına gelen hasta popülasyonlarında gösterilmiş oldu. Bununla birlikte, popülasyon genetiği için daha fazla sayıda hem HLA-B allelleri hem de diğer alellere bakılması önem kazanmaktadır. Bu alellerin FMF patogenezindeki rolleriyle ilgili ileri analizlere ve karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2014). Cellular and Molecular Immunology E-Book: Cellular and Molecular Immunology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Abbas, A., Lichtman, A. and Pober, J. (2000). The major histocompatibility complex, cellular and molecular immunology. United State: Saunders, 63-75.
- Akar, S., Soysal, O., Balci, A., Solmaz, D., Gerdan, V., Onen, F., Tunca, M. and Akkoc, N. (2013). High prevalence of spondyloarthritis and ankylosing spondylitis among familial Mediterranean fever patients and their first-degree relatives: further evidence for the connection. *Arthritis research & therapy*, 15, 1-8.
- Altuntaş, Y., Yılmaz, E., Tapan, E. and Hatemi, H. (1996). Türk toplumunda HLA dağılımı ve bazı HLA'lar ile bazı hastalıklar arasındaki ilişkiler. *Endokrinolojide yönelişler*, 2, 58-63.
- Anıl, B. N. (2022). Böbrek Transplantasyonu Yapılacak PRA (Panel Reaktif Antikor) Pozitif Hastalarda HLA Haplotipleri ile İmmünofenotip İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Atagunduz, P., Ergun, T. and Direskeneli, H. (2003). MEFV mutations are increased in Behçet's disease (BD) and are associated with vascular involvement. *Clinical and experimental rheumatology*, 21(4; SUPP/30), S35-S37.
- Ayala- García, M. A., Ramírez-Barba, E. J., Soel Encalada, J.M. and González Yebra, B. Renal Transplantation – Updates and Advances. *Renal Explantation Techniques*. Publisher: Intech 2012: 49-74.
- Ben-Chetrit, E. and Levy, M. (1998). Familial mediterranean fever. *The Lancet*, 351(9103), 659-664.
- Ben-Chetrit, E. and Touitou, I. (2009). Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Care & Research*, 61(10), 1447-1453.
- Ben-Chetrit, E., Cohen, R. and Chajek-Shaul, T. (2002). Familial mediterranean fever and Behçet's disease--are they associated? *The Journal of rheumatology*, 29(3), 530-534.

- Berlengerio, M., Bonchi, F., Curcio, M., Giannotti, F. and Turini, F. (2009). Mining clinical, immunological, and genetic data of solid organ transplantation. In *Biomedical Data and Applications* (pp. 211-236). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bilge, N. Ş. Y., Sari, I., Solmaz, D., Şenel, A. S., Emmungil, H., Kilic, L., Öner, S. Y., Yılmaz, S., Ersözlü, E.D., Tufan, M. A., Yılmaz, S., YZISIZ, V., Pehlivan, Y. and Bes, C. (2019). The distribution of MEFV mutations in Turkish FMF patients: multicenter study representing results of Anatolia. *Turkish journal of medical sciences*, 49(2), 472-477.
- Booty, M. G., Chae, J. J., Masters, S. L., Remmers, E. F., Barham, B., Le, J. M., Barron, K.S.; Holland, S.M.; Kastner, D.L. and Aksentijevich, I. (2009). Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 60(6), 1851-1861.
- Chae, J. J., Aksentijevich, I. and Kastner, D. L. (2009). Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British journal of haematology*, 146(5), 467-478.
- Chee, R.E. Histocompatibility testing (2002). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 33 (2): 112-4.
- Chinen, J. and Buckley, R. H. (2010). Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 324-S335.
- Chinen, J. and Buckley, R. H. (2010). Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 324-S335.
- Cosan, F., Üstek, D., Oku, B., Duymaz-Tozkir, J., Cakiris, A., Abaci, N., Ocal L. and Gül, A. (2010). Association of familial Mediterranean fever-related MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, 62(11), 3232-3236.
- Cosan, F., Üstek, D., Oku, B., Duymaz-Tozkir, J., Cakiris, A., Abaci, N., Ocal, L., Aral, O. and Gül, A. (2010). Association of familial Mediterranean fever-related

MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, 62(11), 3232-3236.

Çevirgen, T. (2005) Multipl myelomlu hastalarda HLA sınıf-I ve HLA sınıf-II alel sıklığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Dalva, K. (2004). Her yerde karşında: Nedir bu HLA tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu, 23-28.

Demir, A. K., Deveci, H., Özmen, Z. C., Kefeli, A., Şahin, Ş., Taşlyurt, T. and Deveci, K. (2020). Ailevi akdeniz ateşi aenetik özellikleri ve sistemik hastalıklarla ilişkisi. *Fırat Tıp Dergisi*, 25(1), 18-22.

Demir, A. Y. and Yakar, Ö. (2023). Sivas'taki ailesel akdeniz ateşi hastalarının Mefv gen mutasyonları bakımından değerlendirilmesi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(2), 231-236.

Demirkaya, E., Sağlam, C., Turker, T., Koné-Paut, I., Woo, P., Doglio, M., Amaryam, G., Frenkel, J., Uziel, y., Insalaco, A., Cantarini, L., Hofer, M., Boiu, S., Duzova, A., Modesto, C., Bryant, A., Rigante, D., Papadopoulou-Alataki, E., Guillaume-Czitrom, S., Kuemmerle-Deschner, J., Neven, B., Lachmann, H., Martini, A., Ruperto, N., Gattorno, M. and Ozen, S. (2016). Performance of different diagnostic criteria for familial Mediterranean fever in children with periodic fevers: results from a multicenter international registry. *The Journal of rheumatology*, 43(1), 154-160.

Dendrou, C. A., Petersen, J., Rossjohn, J. and Fugger, L. (2018). HLA variation and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(5), 325-339.

Dick, H. M. (1978). HLA and disease: introductory review. *British Medical Bulletin*, 34(3), 271-274.

Dunckley, H. (2012). HLA typing by SSO and SSP methods. *Immunogenetics: methods and applications in clinical practice*, 9-25.

Dundar, M., Emirogullari, E. F., Kiraz, A., Taheri, S. and Baskol, M. (2011). Common Familial Mediterranean Fever gene mutations in a Turkish cohort. *Molecular biology reports*, 38, 5065-5069.

- Dyer, P. A., Jawaheeri, D., Allier, B., Poulton, K., Sinnott, P. and Thomson, W. (1993). Hlaallele Detection Using Molecular Techniques. *Disease markers*, 11(4), 145-160.
- El-Shanti, H., Majeed, H. A. and El-Khateeb, M. (2006). Familial mediterranean fever in Arabs. *The Lancet*, 367(9515), 1016-1024.
- Erlich, H. (2012). HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue antigens*, 80(1), 1-11.
- Etem, E., Deveci, S. D., Erol, D., Yuce, H. and Elyas, H. (2010). Familial Mediterranean fever: a retrospective clinical and molecular study in the East of Anatolia region of Turkey. *The open rheumatology journal*, 4, 1.
- Fradkin, A., Pras, M., Zemer, D. and Gazit, E. (1985). Familial Mediterranean fever: no association of HLA with amyloidosis or colchicine treatment response. *Israel Journal of Medical Sciences*, 21(9), 757-758.
- French, F.M.F., Consortium, Bernot, A., Clepet, C., Dasilva, C., Devaud, C., Petit, J. L., Caloustian, C., Cruaud, C., Samson, D., Pulcini, F., Weissenbach, J., Heilig, R., Notanicola, C., Domingo, C., Rozenbaum, M., Benchetrit, E., Topaloglu, R., Dewalle, M., Dross, C., Hadjari, P., Dupont, M., Demaille, J., Touitou, I., Smaoui, N., Nedelec, B., Mery, J.P., Chaabouni, H., Delpech, M. and Grateau, G. (1997). A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature genetics*, 17(1), 25-31.
- Galipeau HJ, Hinterleitner R, Leonard MM, Caminero A. (2024). Non-Host Factors Influencing Onset and Severity of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2024 Jun;167(1):34-50.
- Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes rendus biologiques*, 339(7-8), 225-230.
- Geo, J. A., Ameen, R., Al Shemmari, S. and Thomas, J. (2024). Advancements in HLA Typing Techniques and Their Impact on Transplantation Medicine. *Medical Principles and Practice*, 33(3), 215-231.
- Ghodke, Y., Joshi, K., Chopra, A. and Patwardhan, B. (2005). HLA and disease. *European journal of epidemiology*, 20, 475-488.

- Giancane, G., Ter Haar, N. M., Wulffraat, N., Vastert, S. J., Barron, K., Hentgen, V., Kallinich, T., Ozdogan, H., Anton, J., Brogan, P., Cantarini, L., Frenkel, J., Galeotti, C., Gattorno, M., Grateau, G., Hofer, M., Kone-Paut, I., Kuammerle-Deschner, J., Lachmann, H., Simon, A., Demirkaya, E., Feldman, B., Uziel, Y. and Ozen, S. (2015). Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(4), 635-641.
- Gönen, S., Dizbay, M. and Söylemezoğlu, H.O. (2017). Investigation of human leukocyte antigen in osteoarticular brucellosis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(5), 1505-1508.
- Haddad, J. J. (2009). The role of inflammatory cytokines and NF- κ B/MAPK signaling pathways in the evolution of familial Mediterranean fever: Current clinical perspectives and potential therapeutic approaches. *Cellular immunology*, 260(1), 6-13.
- International FMF Consortium (1997). Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*, 90(4), 797-807.
- Itoh, Y., Mizuki, N., Shimada, T., Azuma, F., Itakura, M., Kashiwase, K., Kikkawa, E., Kulski, J.K., Satake, M. and Inoko, H. (2005). High-throughput DNA typing of HLA-A,-B,-C, and-DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics*, 57, 717-729.
- Jalkh, N., Genin, E., Chouery, E., Delague, V., Medlej-Hashim, M., Idrac, C. A., M'egarban'e., A. and Serre, J. L. (2008). Familial Mediterranean fever in Lebanon: founder effects for different MEFV mutations. *Annals of human genetics*, 72(1), 41-47.
- Kasifoglu, T., Bilge, S. Y., Sari, I., Solmaz, D., Senel, S., Emmungil, H., Kilic, L., Yilmaz-Oner, S., Yildiz, F., Yilmaz, S., Ersozlu-Bakirli, D., Aydin-Tufan, M., Yilmaz, S., Yazisiz, V., Pehlivan, Y., Bes, C., Yildirim-Cetin, G., Erten, S., Gonullu, E., Temel, T., Sahin, F., Akar, S., Aksu, K., Kalyoncu, U., Direskeneli, H., Erken, E., Kisacik, B., Sayarlioglu, M. and Korkmaz, C. (2014). Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology*, 53(4), 741-745.

- Kaşıfoğlu, T., Çalışır, C., Cansu, D. Ü. and Korkmaz, C. (2009). The frequency of sacroiliitis in familial Mediterranean fever and the role of HLA-B27 and MEFV mutations in the development of sacroiliitis. *Clinical rheumatology*, 28, 41-46.
- Kisacik, B., Yildirim, B., Tasliyurt, T., Ozyurt, H., Ozyurt, B., Yuce, S., Kaya, S., Ertenli, I. and Kiraz, S. (2009). Increased frequency of familial Mediterranean fever in northern Turkey: a population-based study. *Rheumatology international*, 29, 1307-1309.
- Klein, J.A.N. and Sato, A. (2000). The HLA system. *New England journal of medicine*, 343(10), 702-709.
- Kötter, I. and Krusche, M. (2023). Inflammatory rheumatic diseases in migrants. *Innere Medizin (Heidelberg, Germany)*. 64 (5):426-434
- Kronenberg, M. and Rudensky, A. (2005). Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*, 435(7042), 598-604.
- Kubi, J. (1992). Major Histocompatibility Complex. *Immunology*. 9: 187-214.
- Kucuk, A., Gezer, I. A., Ucar, R. and Karahan, A. Y. (2014). Familial Mediterranean Fever. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 57(3), 97–104.
- Kulcsárová, E. and Fazekasová, H. (1998). DNA typing of class I HLA alleles. *Bratislavske Lekarske Listy*, 99(11), 597-600.
- Lidar, M. and Livneh, A. (2007). Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *The Netherlands Journal of Medicine*, 65(9), 318-24.
- Liu, B., Shao, Y. and Fu, R. (2021). Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9(2), 340-350.
- Liu, B., Shao, Y., & Fu, R. (2021). Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9(2), 340-350.
- Märker-Hermann, E. and Höhler, T. (1998). Pathogenesis of human leukocyte antigen B27–positive arthritis: information from clinical materials. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 24(4), 865-881.

- Migita, K., Izumi, Y., Jiuchi, Y., Iwanaga, N., Kawahara, C., Agematsu, K., Yachie, A., Masumoto, J., Fujikawa, K., Yamasaki, S., Nakamura, T., Ubara, Y., Koga, T., Nakashima, Y., Shimizu, T., Umeda, M., Nonaka, F., Yasunami, M., Eguchi, K., Yoshiura, K. and Kawakami, A. (2016). Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Japan. *Arthritis research & therapy*, 18, 1-10.
- Mrazek, F. (2023). Population genetics and external proficiency testing for HLA disease associations. *Frontiers in Genetics*, 14, 1268705.
- Onen, F., Sumer, H., Turkay, S., Akyurek, O., Tunca, M. and Ozdogan, H. (2004). Increased frequency of familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey. *Clinical and experimental rheumatology*, 22(4).
- Onizuka, M., Yoshikawa, E. and Inoko, H. (2005). HLA typing and transplantation. *Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 63(11), 1945-1949.
- Ozen, S., Aktay, N., Lainka, E., Duzova, A., Bakkaloglu, A. and Kallinich, T. (2009). Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(2), 246-248.
- Ozturk, C., Halıcıoğlu, O., Coker, I., Gulez, N., Sutçuoğlu, S., Karaca, N., Aksu, G. and Kutukçuler, N. (2012). Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clinical rheumatology*, 31, 493-501.
- Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H. D., Grütter, C., Grütter, M. and Tschopp, J. (2007). The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death & Differentiation*, 14(8), 1457-1466.
- Peru, H., Soylemezoglu, O., Gonen, S., Cetinyurek, A., Bakkaloğlu, S. A., Buyan, N. and Hasanoglu, E. (2008). HLA class 1 associations in Henoch Schonlein purpura: increased and decreased frequencies. *Clinical rheumatology*, 27, 5-10.
- Reinhold, U., Kukel, S., Goeden, B., Neumann, U., Wehrmann, W. and Kreysel, H. W. (1991). Interleukin-4 promotes the expansion of skin-infiltrating lymphocytes

- from atopic dermatitis in vitro. *Journal of investigative dermatology*, 96(3), 370-375.
- Roitt, I. and Delves, P. (2001). *Essential Immunology*. Blackwell Publishers, Oxford, UK. 108.
- Sarkisian, T., Ajrapetian, H., Beglarian, A., Shahsuvarian, G. and Egiazarian, A. (2008). Familial Mediterranean fever in Armenian population. *Georgian Med News* 156(156), 105-11.
- Schlesinger, M., Ilfeld, D. N., Zamir, R. and Brautbar, C. (1984). Familial Mediterranean fever: no linkage with HLA. *Tissue antigens*, 24(1), 65-66.
- Schnappauf, O., Chae, J. J., Kastner, D. L. and Aksentijevich, I. (2019). The pyrin inflammasome in health and disease. *Frontiers in immunology*, 10, 1745.
- Seyahi, E., Tahir Turanli, E., Mangan, M. S., Celikyapi, G., Oktay, V., Çevirgen, D., Kuzuoğlu, D., Özoglu, Ş. and Yazıcı, H. (2010). The prevalence of Behçet's syndrome, familial Mediterranean fever, HLA-B51 and MEFV gene mutations among ethnic Armenians living in Istanbul, Turkey. *Clinical & Experimental Rheumatology*, 28(4), 67.
- Shohat, M. (2016). *Familial mediterranean fever*.
- Taşpınar, N. (2011). *Doğu Anadolu Bölgesi FMF hastalığı Mefv Gen Mutasyonları Dağılımlarının İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Temiz, N. (2005). *Akdeniz Bölgesinde HLA (Human Leucocyte Antigens) Tipleri ve Sıklığının Saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Thorsby, E. (1994). The HLA molecules: function and role in allorecognition. In *Transplantation proceedings*, 26 (3):1699-1701.
- Touitou, I. (2001). The spectrum of familial mediterranean fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*, 9(7), 473-483.
- Trachtenberg, E. A. and Erlich, H. A. (1996). DNA-based HLA typing for cord blood stem cell transplantation. *Journal of Hematotherapy*, 5(3), 295-300.

- Tuncer, S., Kınıklı, S. and Tokgöz, G. (2005). Relationship between HLA-DR, HLA-DQ alleles and MEFV gene mutations in familial mediterranean fever (FMF) patients. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 16(3), 143-146.
- Turkish FMF Study Group. (2005). Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84(1), 1-11.
- Ugurlu, S., Mehmedali, F., Nalci, F., Gurbuz, A., Canbay, B., Sengul, Y., Hatemi, G. and Ozdogan, H. (2013). THU0389 Erythema over the joint may help to distinguish familial mediterranean fever from other rheumatologic conditions. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(3): 287-287.
- Walport, M., Janeway, C.A. and Travers, P. (2001). HLA polymorphism. Yale University School of Medicine, Anthony Nolan Research Institute, London, Imperial College School of Medicine, London.
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F. and Freund, C. (2017). Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in immunology*, 8, 292.
- Yalçın, B. (2013). Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm*.
- Yalçınkaya, F., Cakar, N., Mısırlıoğlu, M., Tümer, N., Akar, N., Tekin, M., Taştan, H., Koçak, N., Özkaya, N. and Elhan, A. H. (2000). Genotype–phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology*, 39(1), 67-72.
- Yang, J., Xu, H. and Shao, F. (2014). The immunological function of familial Mediterranean fever disease protein Pyrin. *Science China Life Sciences*, 57, 1156-1161.
- Yasunami, M., Nakamura, H., Agematsu, K., Nakamura, A., Yazaki, M., Kishida, D., Yachie, A., Toma, T., MAsumoto, J., Ida H., Koga, T., Kawakami, A., Eguchi, K., Furukawa, H., Nakamura, T., Nakamura, M. and Migita, K. (2015).

Identification of disease-promoting HLA class I and protective class II modifiers in Japanese patients with familial Mediterranean fever. *PLoS One*, 10(5), e0125938.