

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEFV GENİNİN SEÇİLMİŞ BÖLGELERİNDE
HETEROZİGOT VE HOMOZİGOT MUTASYONLARIN
FRAGMAN ANALİZ YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI.

Mahsun ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Nisan, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEFV GENİNİN SEÇİLMİŞ BÖLGELERİNDE
HETEROZİGOT VE HOMOZİGOT MUTASYONLARIN
FRAGMAN ANALİZ YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI.

Mahsun ÖZDEMİR tarafından hazırlanan tez çalışması 19.04.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emre TEPELİ, Üye
Atlas Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “MEFV Geninin Seçilmiş Bölgelerinde (R761H, M694I, E148Q, P369S, M694V, M694L, F479L, V726Ala, V726Asp, M680IGC, M680IGA, A744S, A744T, K695R, K695M, R408Q) Heterozigot ve Homozigot Mutasyonların Fragman Analiz Yöntemiyle Araştırılması.” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardanaldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Mahsun ÖZDEMİR

İmza



*Aileme
ve
eşime*

TEŞEKKÜR

Üç yıllık Yüksek Lisans eğitimim süresince her daim bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu tezin hazırlanmasında bana tüm özveri ve sabırla yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhammed Hamza Müslümanoğlu ve tüm saygıdeğer hocalarıma, hayatıma girdikten sonra beni her zaman destekleyen en yakın arkadaşım, sevgili eşime, bugüne kadar ki eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen kıymetli annem ve babama ve bu süreçte beni eğlendiren neşem olan sevgili minik kızıma teşekkürlerim sunarım.

Mahsun ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 MEFV geni mutasyon bölgeleri	3
2.1.1 A744S-A744T.....	3
2.1.2 M694V - M694L.....	3
2.1.3 V726Ala - V726Asp	3
2.1.4 E148Q	4
2.1.5 F479L.....	4
2.1.6 P369S	4
2.1.7 R408Q.....	5
2.1.8 M680I.....	5
2.1.9 M694I.....	5
2.1.10 K695R – K695M	5
2.1.11 R761H.....	5
2.2 MEFV Geni Çalışma Yöntemleri	6
2.2.1 Real Time PCR	6
2.2.2 Multipleks PCR.....	7
2.2.3 Sekans PCR.....	8
2.3 Moleküler Tanıda Kullanılan Cihazlar	9
2.3.1 Termal Döngüleyiciler	9
2.3.2 Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System.....	11
2.3.3 NanoDrop™ 2000 Spektrofotometresi	11
2.3.4 Kapiller Elektropherez Cihazı	12

2.4	Fragman Analiz Programı: GeneMapper	18
2.4.1	Mutasyon bölgelerinin GeneMapper Programı ile Analizi.....	19
3	MATERYAL METOT	27
3.1	Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	27
3.2	Materyal	27
3.2.1	DNA Ekstraksiyonu	29
3.2.2	PCR Reaksiyonu	31
3.2.3	Kapiller Elektroforez Cihazına Numuneleri Yükleme	34
3.3	GeneMapper Programı İle Analiz	35
4	BULGULAR	36
4.1	SPSS istatistik programı Ki-kare testi uygulaması ve verilerin incelenmesi.....	36
5	SONUÇ	52
	KAYNAKÇA	58
	A EK	61
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	64

SİMGE LİSTESİ

μ l	Mikrolitre
ng	Nanogram



KISALTMA LİSTESİ

AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FMF	Familial Mediterranean feverynamic
MEFV	Mediterranean FeVer
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Phirin Proteini	4
Şekil 2.2 Termal döngüleyici blokları; A, gradient temperature control B, Applied Biosystems VeriFlex" better than gradient "temperature control.	9
Şekil 2.3 Applied Biosystems SimpliAmp Termal Döngüleyici.....	10
Şekil 2.4 Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System	11
Şekil 2.5 NanoDrop™ 2000 Spektrofotometresi	12
Şekil 2.6 Applied Biosistemleri 3500xL	14
Şekil 2.7 Aygıt Dahili Komponentleri.....	15
Şekil 2.8 Aygıt İç Komponentleri	15
Şekil 2.9 Bütün bölgeleri normal data görüntüsü	19
Şekil 2.10 M694V bölgesi Heterozigot görüntüsü	20
Şekil 2.11 M694V Bölgesi Homozigot görüntüsü.	21
Şekil 2.12 A744S bölgesi Heterozigot analiz görüntüsü	22
Şekil 2.13 V726A bölgesi Homozigot mutasyon görüntüsü	23
Şekil 2.14 E148Q bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü	23
Şekil 2.15 F479L ve M680IG>C bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü	24
Şekil 2.16 P369S, M680IG>C ve R408Q bileşik heterozigot analiz görüntüsü	25
Şekil 2.17 F479L ve M680IG>C bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü	26
Şekil 2.18 M694I ve E148Q mutasyona sahip bileşik heterozigot görüntüsü.	26
Şekil 3.1 GeneMapper ile açılmış analiz ekranı.	35
Şekil 4.1 Yaş ve Mutasyon Zigozite sütun grafiği.	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Kapiller Elektforez Aygıt parçaları ve fonksiyonları	16
Tablo 3.1 MEFV geni mutasyon bölgeleri.....	31
Tablo 3.2 PCR protokol thermal programı.	32
Tablo 3.3 Enzimatik Clean-Up PCR thermal programı	33
Tablo 3.4 Snapshot PCR thermal programı.	34
Tablo 4.1 Saptanan mutasyonlarda alel frekansı.....	36
Tablo 4.2 SPSS veri istatistik programında elde edilen kişi sayısına göre görülen mutasyonların frekans ve yüzdelik değerleri.	37
Tablo 4.3 İncelenen hastalarda kadın ve erkek yüzdelik ve sayısal oranları.	38
Tablo 4.4 İncelenen hastaların poliklinik bilgilerine ait frekans ve yüzdelik değerleri.	38
Tablo 4.5 Türkiye'nin yedi bölgesinden gelen hastaların frekans ve yüzdelik olarak sınıflandırılması.	40
Tablo 4.6 Çalışılan hastaların yaşa göre SPSS frekans ve yüzdelik değerleri.	41
Tablo 4.7 Hastaların cinsiyete göre SPSS frekans ve yüzdelik değerleri.	42
Tablo 4.8 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$).....	42
Tablo 4.9 Bölgelere göre dağılımı yapılmış mutasyonlu ve normal hastalar frekans ve yüzdelik sonuçları.....	43
Tablo 4.10 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)	44
Tablo 4.11 Normal ve Mutasyonlu hastaların yaşa göre değerlendirilmesi.....	44
Tablo 4.12 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$).	46
Tablo 4.13 Yaşa göre Heterozigot Homozigot ve Normal Karşılaştırılması.	46
Tablo 4.14 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)	47
Tablo 4.15 Mutasyon çeşitlerinin bölgelere göre karşılaştırılması..	47
Tablo 4.16 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$).	49
Tablo 4.17 Mutasyon çeşitlerinin yaşa göre karşılaştırılması..	49
Tablo 4.18 Ki Kare testi sonucunda istatikselsel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. ($p<0,01$).....	50

MEFV Geninin Seçilmiş Bölgelerinde Heterozigot ve Homozigot Mutasyonların Fragman Analiz Yöntemiyle Araştırılması.

Mahsun ÖZDEMİR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M. Hamza Müslümanoğlu

MEFV geni insanda yaklaşık 25.000 genden birisi olup 23 kromozom çifti arasında 16. Kromozomda yer almaktadır.

Bu çalışmada MEFV geninde belirlemiş olduğumuz 16 bölgeyi Fragman Analiz yöntemiyle inceledik. Ankara Etlik Şehir Hastanesi'nin etik kurulundan alınan onayla birlikte hastaneye gelen hastalar ilgili polikliniklerden belirli endikasyonla uzman hekimler tarafından muayene edilip, içerisinde bulunan etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'lı kan tüpleri ile Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderilmiştir. Tez çalışmamıza Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) şüphesiyle muayene edilen hastaların cinsiyet, yaş, bölge ve poliklinik bilgileri ile 1388 hasta almış olup, hastaları 1 Mayıs 2023 tarihi ile 20 Aralık 2023 tarih aralığında gelenler olarak seçtik. Gelen hastaların kanlarını otomatik Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) izolasyon cihazıyla ekstrakte edip üç basamaklı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çalıştık. MEFV geninde belirlemiş olduğumuz 16 bölgenin Fragman Analiz yöntemiyle inceledik. Çalışma

sonuçlarına gore hastaların istatistik olarak, gönderildiği poliklinik, cinsiyet, yaş ve hastaların yaşadıkları bölgelere göre sınıflandırıp inceledik.

Sonuç olarak mutasyon mekanizmalarını inceleyip, tespit edilen mutasyon bölgeleri ile cinsiyet, yaş, gönderildiği poliklinik ve yaşadığı bölge verilerini kullanarak SPSS istatistik programında Ki-kare testini uyguladık. Hastaların mutasyon çeşitlerinin yüzdelik oranları ve ortalama değerlerini belirledik. Elde edilen sonuçlarda en sık rastlanan mutasyon çeşidinin zigosite olarak heterozigot mutasyonlar olduğunu ve mutasyon bölgesi olarak ise M694V bölgesi olduğunu belirledik. Klinik korelasyon ile birlikte sonuç elde edebilmek için hastaların aile soy ağaçları, klinik bilgileri ve hasta dosyalarındaki diğer bilgilerinde ele alınması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: MEFV, M694V, FMF, Ankara Etlik şehir Hastanesi

Investigation of Heterozygotic and Homozygotic Mutations In Selected Regions of the MEFV Gene By Fragment Analysis Method.

Mahsun ÖZDEMİR

Department of Molekuler Biology and Genetics

Master of Science

Supervisor: Prof. Dr. M. Hamza Müslümanoğlu

The MEFV gene is one of approximately 25,000 genes in humans and is located on chromosome 16 among 23 chromosome pairs.

In our thesis study, we examined the 16 regions we identified in the MEFV gene using the Fragment Analysis method. With the approval received from the ethics committee of Ankara Etlik City Hospital, the patients who came to the hospital were examined by specialist physicians from the relevant polyclinics with certain indications and sent to the Molecular Genetics Laboratory with blood tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). We included 1388 patients in our thesis study with gender, age, region and outpatient clinic information of patients who were examined with suspicion of Familial Mediterranean Fever (FMF), and we selected the patients as those who came between May 1, 2023 and December 20, 2023. We extracted the blood of the incoming patients with an automatic Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) isolation device and worked with the three-step Polymerase Chain Reaction (PCR) method. We examined the 16 regions we identified in the MEFV gene using the Fragment Analysis method. According to the study results, we statistically classified and examined the

patients according to the outpatient clinic to which they were sent, gender, age and the region where the patients lived.

As a result, we examined the mutation mechanisms and applied the Chi-square test in the SPSS statistical program using the detected mutation regions and gender, age, outpatient clinic to which the patient was sent and the region where he lived. We determined the percentage rates and average values of the patients' mutation types. In the results obtained, we saw that the most common type of mutation was heterozygous mutations in zygoty and the M694V region was the mutation site. In order to obtain results with clinical correlation, patients' family trees, clinical information and other information in the patient files must also be considered.

Keywords: MEFV, M694V, FMF, Ankara Etlik City Hospital

1 GİRİŞ

MEFV geni lokasyon veya konum olarak 16. Kromozomda bulunmaktadır. . Pirin, Yunanca lisanına göre "alev" manasına gelmektedir. Ayrıca Latince’ de ise "deniz" manasına gelir [18]. MEFV genindeki FMF hastalığı ile ilişkili 16 bölge incelemesinde araştırdığımız bölgeler M694V, V726A, M680I, R761H, F479L, E148Q, P369S, M694L, V726Ala, V726Asp, A744S, A744T, K695R, , K695M ve R408Q bölgeleridir. Otozomal resesif kalıtımla geçen Ailevi Akdeniz Ateşi’ne neden olan gen Familial Mediterranean Fever Gene; MEFV [1,2]. 16. kromozomun kısa kolunda (16p13,3) olduğu belirlenmiş olan MEFV geni 781 amino asid içeren Pirin (Pyrin= Marenostin) adlı bir proteini kodlar [3, 4]. Granülositlerde eksprese olan bu proteinin, inflamatuvar cevapta negatif regülatör rol oynadığı belirtilmektedir. Mutasyona uğramış Pirin yapısal değişikliğe uğrar ve inhibisyon yeterli olmadığı için fazla lökosit migrasyonu ile inflamasyon oluşur. Pirin proteininin inflamasyon baskılama özelliği olduğu ve her dokuda değil özellikle nötrofillerde bulunduğu ortaya çıkmıştır. Pirin proteini nötrofil aktivasyonunu baskılar ve inflamasyonu durdurur. [5].

Ankara Etlik Şehir Hastanesine gelen hastaların, polikliniklerde belirli bir endikasyon ile hekim muayenesinden geçtikten sonra MEFV genindeki mutasyonları, çeşitli illerden gelen ve Türkiye’ nin farklı bölgelerine, yaşa, cinsiyete, sevk edildikleri polikliniğine göre inceledik. Çalışmamıza 1388 hasta katılmıştır. Ankara Etlik Şehir Hastanesi etik kurulundan etik izin onayı aldıktan sonra, Mayıs 2023 ile Aralık 2023 tarihleri arasında gelen hastaları çalışmamıza aldık.

MEFV geninde iki belirgin mutasyon noktasından biri ekson 2’de diğeri ekson 10’da bulunmaktadır. Ekson 10’da kodon 680 ve kodon 694 olmak üzere iki önemli mutasyon noktası bulunur. En sık görülen mutasyonlar (M680I, M694V, V726A, M694I ve E148Q) vakaların üçte ikisinden fazlasında görüldüğü bilinmektedir [9].

Hastaların yaklaşık %74'ünde rastlanan mutasyonlar sırasıyla; M694V, V726A, M680I, M694I (Ekzon 10) ve E148Q (Ekzon 2) olarak bildirilmiştir. [6, 7].

Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı alan 332 hastanın gen mutasyonları sıklık sırasına göre; E148Q (%30.8), M694V (%18.3), P369S (%10.6), V726A (%8.6), A744S (%2.9), R761H (%2.9), M694I (%1.9), K695R (%1.9) ve I692del (%1.0). Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı konan hastaların 15'inde (%14.4) hiçbir mutasyon saptanmazken, 13'ünde (%12.5) iki farklı mutasyon aynı anda belirlenerek bileşik heterozigot olarak tanımlandığı bilinmektedir [8].

Hastaların %60,2'sinde mutasyonların 10 yaşından önce başladığı ve ortalama hastalık başlama yaşı $8,58 \pm 3,74$ yıl (2-16) yıl olduğu bilinmektedir [10].

Cinsiyetler açısından mutasyonlar incelendiğinde % 45,2'si erkek , % 54,8'i kız ve Erkek / Kız oranı 0,82 bulunduğu, bu oran Türk AAA çalışma grubunun 1,2:1 oranı ile karşılaştırıldığında kız cinsiyetin baskınlığı görülmekte olup Majeed ve arkadaşları tarafından 476 Arap kökenli AAA hastası çocukta bulunan %54 kız, %46 erkek oranı ile uyumlu olduğu bilinmektedir [11,12].

MEFV geninin ilişkili olduğu genetik hastalık olan Ailevi Akdeniz Ateşi otozomal resesif ve yüksek ateş ve enflamasyon endikasyonunda ağrı atakları ile devam eden özellikle Arap, Musevi, Ermeni ve Türk toplumlarında yaygın görülen genetik hastalıktır [19].

MEFV genindeki mutasyonların sayısı ve çeşidi toplumlar arasında değişiklik göstermektedir [13, 14, 15]. M694V mutasyonu %46,26 ile en fazla rastlanırken bunu sırası ile E148Q (% 16,41), V726A (% 13,439), M680I (G/C) (% 5,97) izlendiği bilinmektedir [16]. Türklerde en sık görülen mutasyonlar sıklık sırasına göre M694V (%51), M680I (%14), ve V726A (%8) dır [17].

Bu çalışmanın amacı, MEFV genindeki 16 bölgenin heterozigot ve homozigot mutasyonların yaşa, cinsiyete, polikliniklere ve yaşadıkları bölgelere göre fargman analiz yöntemiyle incelenmesidir.

2.1 MEFV geni mutasyon bölgeleri

2.1.1 A744S-A744T

A744S ekzonik konum olarak 10. Ekzon olup c.2230G>A nükleotid değişimine sahiptir. Protein değişimi olarak ise s.Ala744Thr sahiptir. A744T ise aynı şekilde ekzonik konum olarak 10. Ekzon' dur. c.2230G>T nükleotid değişimine sahiptir. Protein değişimi olarak ise s.Ala744Ser' dir. Kromozom lokasyonu olarak ise chr16-3293257'dir. A744S ve A744T mutasyonlarını fragman analizi yöntemiyle incelemiş olup PCR aşamalarından ve DNA izolasyonundan primer özelliklerine kadar bu çalışmada yer verilecek. A744S mutasyonu eğer G nükleotidi A nükleotidine dönüşürse gerçekleşir bunun sonucu olarak ise amino asit değişimi gerçekleşir. A744T mutasyonu ise G nükleotidi T nükleotidine dönüştüğü zaman ortaya çıkar.

2.1.2 M694V - M694L

M694V ekzonik konum olarak 10. Ekzon' da olup c.2080 A>G nükleotid değişimine sahiptir. Protein değişimi olarak ise p.Met694Val sahiptir. M694L de aynı şekilde 10. Ekzon' da olup farklı olarak A nükleotidi yerine T nükleotidinin gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. Protein değişimi ise p.Met694Leu' dir. M694L mutasyonunun M694V mutasyonuna göre daha az rastlandığını tezimizde incelediğimiz hasta gruplarında tespit ettik. M694V ve M694L mutasyonları chr16-3293407 lokasyonunda gerçekleşmektedir.

2.1.3 V726Ala - V726Asp

V726Ala ekzonik konum olarak 10. Ekzon' dadır. c.2177 T>C nükleotid değişimine sahip olmakla beraber protein değişimi olarak ise s.Val726Ala sahiptir. V726Asp de aynı şekilde 10. Ekzon' da olup farklı olarak T nükleotidi yerine A nükleotidinin gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. Protein değişimi ise p.Val726Asp' dir. V726Ala ve V726Asp mutasyonları kromozom lokasyonu olarak ise chr16-3293310' dir.

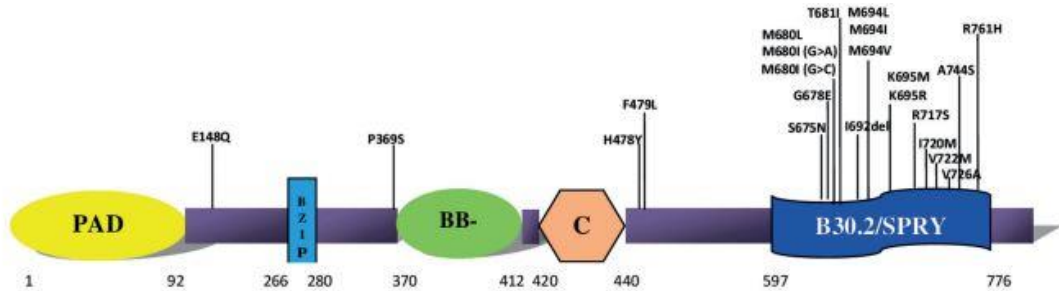
2.1.4 E148Q

E148Q mutasyonu ekzonik konum olarak 2. Ekzon' da yer almaktadır.

E148Q mutasyonu üç farklı değişime sahiptir ancak bu çalışmada en sık karşılaştığımız mutasyon çeşidi c.442G>A nükleotid değişimine sahip olan mutasyondur. Diğer iki değişim ise c.442G>T ve c.442G>C değişimleridir. c.442G>A nükleotid değişimi, protein değişimi olarak ise p.Glu148Lys dönüşmektedir. c.442G>T nükleotid değişiminin sonucu olarak ise s.Glu148* protein değişimi gerçekleşmektedir. c.442G>C nükleotid değişiminin sonucu olarak ise p.Glu148Gln protein değişimi gerçekleşmektedir. Bu çalışmada en sık rastlanan mutasyonlardan bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.5 F479L

F479L ekzonik konum olarak 5. Ekzon' dadır. c.1437C>G nükleotid değişimine sahip olmakla beraber s.Phe479Leu protein değişimine sahiptir. F479L mutasyonu fragman analiz yöntemiyle ele alındığında Adenin, Timin, Guanin ve Sitozin nükleotidlerine atanan renklere özel analiz gerçekleşmektedir. Molekül ağırlıklarına ve geçiş hızlarına göre analizde lokasyonları değişmektedir.



Şekil 2.1 Pirin Proteini

2.1.6 P369S

P369S ekzonik konum olarak 3. Ekzon' dadır. c.1105C>A nükleotid değişimine sahip olmakla beraber s.Pro369Thr protein değişimine sahiptir.

2.1.7 R408Q

R408Q ekzonik konum olarak 3. Ekzon' dadır. c.1223G>T nükleotid değişimine sahip olmakla beraber p.Arg408Leu protein değişimine sahiptir. R408Q MEFV fragman analiz yönteminde genellikle bileşik yani diğer adıyla compound heterozigotluk durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Birden fazla birbirinden farklı mutasyonlar ile beraber görölmektedir. Ele aldığımız hasta gruplarında bunu daha net bir şekilde görmüş olacağız.

2.1.8 M680I

M680I mutasyonu ekzonik konum olarak 10. Ekzon' da yer almaktadır.M680I mutasyonları yaygın olarak iki farklı varyasyona sahiptir. Bunlar M680IG>A ve M680IG>C dir. M680IG>A mutasyonun nükleotid değişimi c.2040G>A dır. Protein değişimi olarak ise p.Met680Ile durumundadır. M680IG>C ise nükleotid değişimi olarak c.2040G>C, protein değişimi olarak p.Met680Ile durumundadır. Bu çalışmada daha çok ikinci varyasyonun daha sık görüldüğü ortaya çıkmaktadır.

2.1.9 M694I

M694I ekzonik konum olarak 10. Ekzon' dadır. c.2082G>A nükleotid değişimine sahip olmakla beraber p.Met694Ile protein değişimine sahiptir. M694I mutasyonu fragman analiz yöntemiyle ele alındığında Adenin, Timin, Guanin ve Sitozin nükleotidlerine atanan renklere özel analiz gerçekleştirilmektedir.

2.1.10 K695R – K695M

K695 mutasyonunda iki farklı çeşidi olmakla beraber en fazla görülen çeşidi K695R mutasyonudur. c.2084A>G nükleotid değişimine sahip olan K695R mutasyonu protein değişimi olarak ise p.Lys695Arg durumundadır. Ekzonik konum olarak ise 10. Ekzonda bulunmaktadır.

2.1.11 R761H

c.2282G>A dönüşümüne sahip R761H mutasyonu ele aldığımız hasta gruplarında diğer 15 çeşit mutasyona göre daha az rastlanan bir mutasyon çeşididir. Bu da genellikle bileşik heterozigotluk durumlarında ortaya çıkmaktadır. Ekzonik konum olarak 10. Ekzonda bulunmaktadır. Protein değişimi olarak ise p.Arg761His' dir.

2.2 MEFV Geni Çalışma Yöntemleri

MEFV, enflamasyonun oluşumunu başlamasını riske edebilen ve enfeksiyon halinde enflamatuvar aracılardan sentezine izin veren doğuştan gelen bir bağışıklık sensörü olarak işlev gören pirini kodlamaktadır [20].

Uluslararası FMF Konsorsiyumu, konumsal klonlamayla 16p kromozomunda *MEFV* genini tanımladı. Fare *MEFV* genini kromozom 16, A3-B1 bölgesine lokalize ederek insan 16p13.3 ile sentenik homoloji bölgesini genişletti [21,19].

2.2.1 Real Time Pcr

MEFV hedef bölge mutasyonlarını tespit etmek için birkaç farklı moleküler genetik tekniği vardır. Biz bunlardan yaygın olan bir kaçını örnek vereceğiz ve kendi bu çalışmada kullandığımız yöntemi detaylı bir şekilde paylaşacağız.

İlk yöntem olarak Real- Time PCR yöntemidir. Bilindiği üzere Real-Time PCR çalışması, elde edeceğimiz sonuçların veya dataların durumunu çalışma devam ederken eş zamanlı olarak bize sunması ve kendi kopya sayısını çeşitli yazılımsal programlar yardımıyla bize göstermesidir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Real-Time PCR tekniği kullanılan PCR kiti ile değişkenlik göstermekle birlikte, temel basamakları genel olarak aynıdır. Real-Time PCR tekniğinin diğer PCR tekniklerinden ayrılan belirgin özelliklerinden bir tanesinde primerlerin daha hassas ve çalışma esnasında kullanılan çalışma plate veya tüpünün ışığı daha geçirgen halde olmasıdır. Real- Time PCR tekniğinde DNA nın çalışılacaksa hangi yöntemle ekstrakte edildiği, mikrolitre/nanogram oranı gibi bir çok değişken çalışmayı etkilemektedir. Bunu kit üreticileri belirli optimizasyona getirip, rutin test çalışan laboratuvarlara hazır olarak teslim etmektedir.

Test genel olarak, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Proben 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışınmasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla floresan ışınma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problarda

gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte floresan ışığa doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eşzamanlı olarak tespit edilmektedir.

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”, “Chromo4”, “Smart Cycler”, “RotorGene”, “LightCycler” en fazla kullanılanlardır [22].

2.2.2 Multipleks PCR

Bir diğer yöntem ise Multipleks PCR yöntemi olarak isimlendirilen PCR tekniğidir. İki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesi işlemine dayanmaktadır. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir ancak çoklu primer setleri kullanılmaktadır. Bu setler ampikon denen amplifikasyon ürünlerini oluştururlar. PCR çalışmasını yaptığımız kit ard arda 3 PCR aşamadan meydana gelmektedir. Birinci aşamada PCR ampifikasyonu hedeflenmektedir ve 25-30 cycle döngüye sahip özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. PCR da kullanılan nanogram ve mix miktarları kit üretici firma tarafından belirlenmiştir. PCR Mix (MgCl₂, ddNTP, su, NaCl, vs.), Primer Mix, PCR optimizer ve PCR Grade Water kullanılarak ilk aşama gerçekleşir. İlk PCR yapılan çalışmanın ikinci kısmında Enzymatic Clean-Up dediğimiz bir temizleme kiti ile analiz ederken fazladan çıkacak pikleri ve kirlilikleri ortadan kaldırmaktadır. Son aşama olarak ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren “nested” primerleri ile yapılmaktadır. İlk PCR ürünleri 3. PCR için kalıp olarak kullanılmaktadır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilmektedir. Bu sayede Özgün olmayan amplifikasyonlar önlenmiş olmaktadır. Problemlerin hedef bölgeye bağlanarak çoğaltılması ve PCR ın bitmesinin ardından ışığa yapmak üzere Sanger Sekans Kapiller Elektforez cihazında yürütmesi yapılır. Belirlenen Voltaj aralıklarında gerçekleştirilen bu olay problemlerin bağlandığı ve çoğaltıldığı bölgelerin ağırlıklarına göre geçiş hızları belirlenir ve ekranda kırmızı, yeşil, sarı ve mavi renk olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2.3 Sekans PCR (Dizileme) Yöntemi

Bir diğer yöntem olan Sanger sekans dizilemede, temel olarak 3 basamaklı PCR kullanılır. İlk PCR aşamasında kullanılan materyaller Taq Polimeraz enzimi, görmek istediğimiz hedef DNA bölgesine eş olan Primer, Su, PCR mix ve PCR optimizer ile gerçekleşir. İkinci PCR aşamasında exosap veya enzimatik Clean UP kiti kullanılarak 45 dakika süren bir protokol izlenir. Son aşamada ise varsa özel primer bölgesi yok ise Common Sequencing primer dediğimiz primerleri kullanarak Forward ve Reverse olarak iki yönlü görebilmemiz için bir örneğe iki ayrı PCR yapmış oluyoruz. Kullanılan diğer materyaller ise Quantum Dye Terminator, 5X sequencing buffer ve sudur. Dizileme yöntemiyle nokta mutasyonları yani SNP, nükleotid baz değişimlerini ve delesyonları tespit etmek için kullanılır.

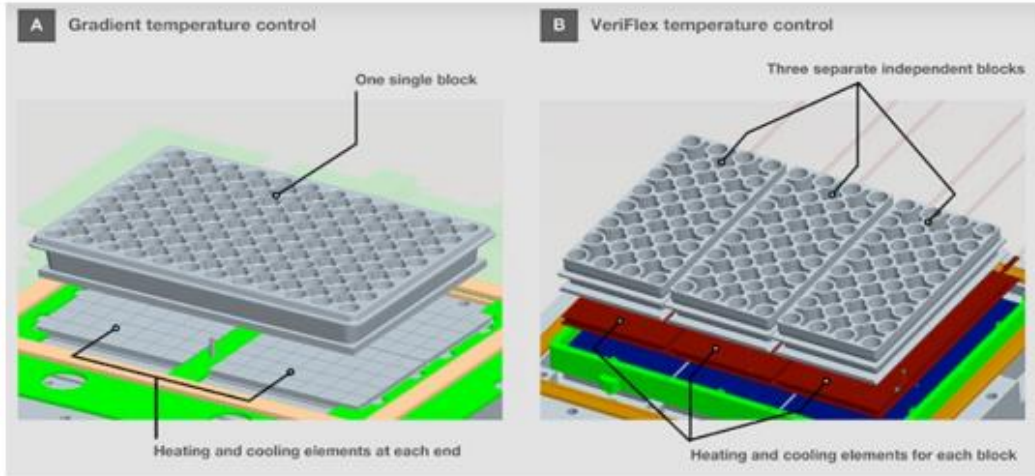
Kullanılan diğer yöntemlerden birisi ise Yeni Nesil Dizileme dediğimiz Moleküler Biyolojide son teknolojilerden birisi olan NGS yöntemi ile çalışmaktır. Ancak bir NGS çalışmasında Run verildiği zaman çalışmalarda genellikle tek gen bölgesinden daha fazla bölgeler incelenmektedir. Ayrıca şunu da belirtmek gerekir ki bazı durumlarda NGS çalışması doğrulaması olarak sekans dizileme yöntemide tercih edilir bunun sebebi Sanger sekans dizileme yönteminde analiz ekranı bize daha manuel yönden inceleme imkanı sağlamaktadır.

2.3 Moleküler Tanıda Kullanılan Cihazlar

2.3.1 Termal Döngüleyiciler

Günümüzde termal döngüleyiciler, PCR protokollerinin kolay programlanması için tasarlanmıştır. PCR protokolleri genellikle DNA hedeflerine, primer dizilerine, kullanılan DNA polimerazlarına ve deneysel hedeflere göre değişir. Bu nedenle, dokunmatik ekranlar ve kolay programlama özellikleri gibi kullanıcı arayüzleriyle donatılmış termal döngüleyiciler, hızlı ve verimli protokol kurulumu sağlar. Son zamanlarda bir mobil cihaz veya masatüstü bilgisayar kullanarak her zaman ve her yerden termal döngüleyicilere kolay erişim sağlanmaktadır. Buluta bağlantı, parmaklarınızın ucunda gelişmiş erişilebilirlik ve protokoller oluşturma ve paylaşmanın yanı sıra PCR çalışmalarını planlama, başlatma/durdurma ve izleme özgürlüğü sunar.

Günümüzde kullanılan bazı Termal Döngüleyiciler şunlardır; Applied Biosystems, AlphaHelix AB, Agilent, Analytik Jela, Ahram Biosystems, Bioer technology, Bio-Rad, Bulldog Bio, Cole-Parmer, Edvotek, Eppendorf, Esco, Falc Instruments, Labnet international, MIDSCI, Qiagen.



Şekil 2.2 Termal döngüleyici blokları; A, gradient temperature control B, Applied Biosystems VeriFlex " better than gradient "temperature control.

2.3.1.1 Applied Biosystems SimpliAmp Termal Döngüleyici

Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific şirketinin Life Technologies markası altındaki çeşitli markalardan biridir.

PCR cihazı ("ısıtıl döngüleyici", "termal döngüleyici" olarak da bilinir), DNA ve RNA parçalarını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla amplifiye etmek için kullanılan bir araçtır. PCR cihazı, birbirinden ayrı daha öncesinden planlanmış aşamalarda bir blok içerisinde bulunan örneklerin sıcaklığını hassas ve hızlı bir şekilde arttırarak ve azaltarak, numunelerin denatürasyonunu ve belirli reaktiflerle tekrar bağlanması işlemi sağlar. Amplifiye edilmiş materyaller, dizileme, klonlama, ekspresyon analizi ve genotipleme gibi birçok alt uygulamada kullanılabilir. Termal döngüleyiciler, ayrıca restriksiyon enzim kesimi veya hızlı teşhisde olmak üzere diğer sıcaklığa duyarlı reaksiyonlara olanak sağlamak için de laboratuvarlarda kullanılmaktadır.



Şekil 2.3 Applied Biosystems SimpliAmp Termal Döngüleyici

2.3.2 Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System

Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System otomatik DNA ekstraksiyon cihazı da kullanılan kit olan Lab-Aid 824s DNA Ekstraksiyon Kiti, manyetik parçacık teknolojisi ile tam kan, tükürük, doku, kan lekeleri, amniyotik sıvı, bakteri, kan pıhtısı vb. DNA'nın otomatik izolasyonu ve saflaştırılması için tasarlanmıştır. Ürün, Lab-Aid 824s/808 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi ile birlikte amplifikasyon veya diğer enzimatik reaksiyonlar gibi aşağı yönlü uygulamalar için yüksek kaliteli DNA sağlar. Lab-Aid 824s Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi, tek seferde 24'e kadar numune çıkarabilen numune hazırlamanın tüm adımlarını gerçekleştirir.



Şekil 2.4 Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System

2.3.3 NanoDrop™ 2000 Spektrofotometresi

Nanodrop cihazı, cihaz numunesinin kalitesini ve miktar tayinlerini belirlemek için kullanılır. Spektrofotometreler 0,5-2 ul numuneleri yüksek doğrulukla ölçer.



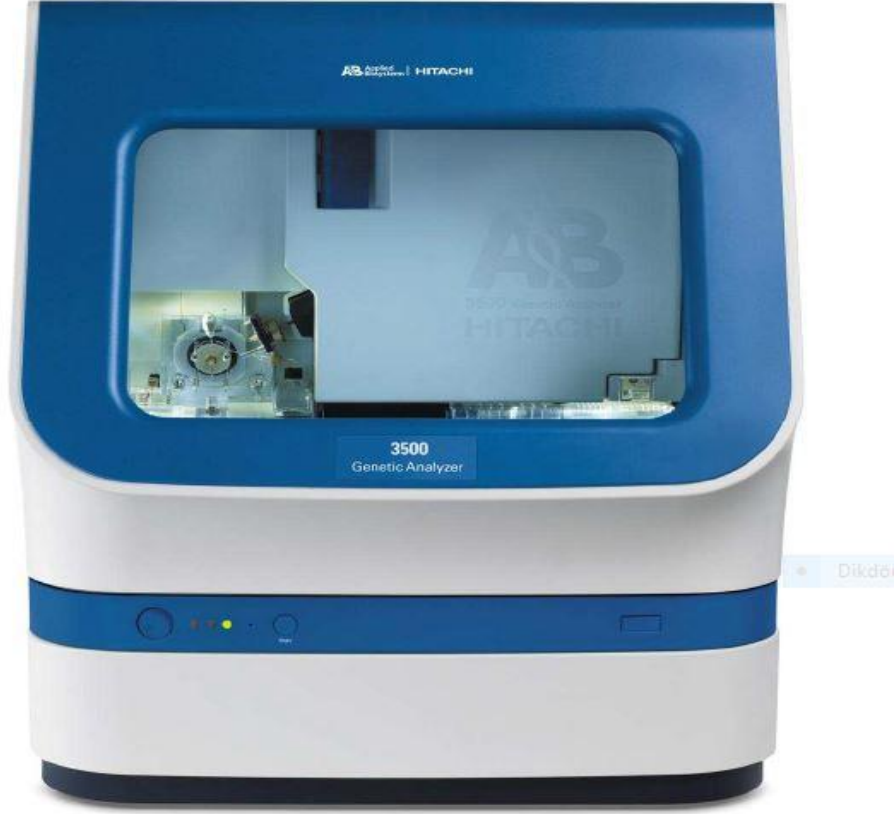
Şekil 2.5 NanoDrop™ 2000 Spektrofotometresi

2.3.4 Kapiller Elektroferez Cihazı

Proteinler, peptidler, amino asitler, nükleik asitler, inorganik iyonlar, organik bazlar, ve organik asitlerin ayırma işlemini yapma görevindedir ve bunu gerçekten başarılı bir şekilde gerçekleştirir. Çabuk ve verimli ayırtırmaya olanak tanınması düşük miktarda örnek miktarının gayet makul olarak yeterli olması ve yüksek seçici olması, otomasyon, miktar belirlemesi, tekrar edilebilirlik olması cihazı oldukça kullanışlı hale getirmektedir. Kapiller Elektroferez, özetle ifade edecek olursak elektroferez ve kromatografinin bileşimi olarak ifade edebileceğimiz bir tekniktir. Elektroforetik davranış yeteneği, faz ayrışımı çok küçük moleküler düzeydeki farklılıklara veya bunlar gibi bir kaçıyla alakalı elektroforetik ayırıştırma yapabilen bir tekniktir. Kapiller elektroferez tekniğinin önemli bir yanı ise bir başka yönüyle nörokimyasal analiz ve DNA dizilemesinde de kullanılabilmesidir. Kromatografik olan yöntemlerle kıyas edildiğinde daha güncel ve yenidir. Ayrıca kısa zamanda yapabildiği analiz süresi ile çok daha kolay ve rahat bir şekilde gerçekleştirilebilir.

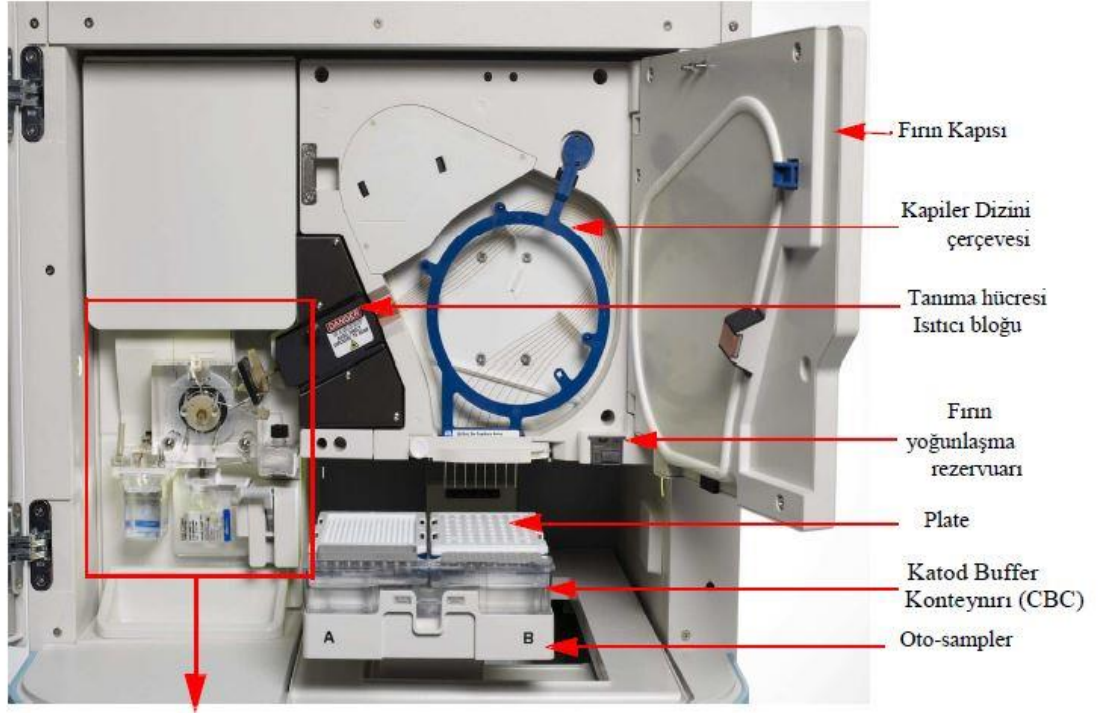
2.3.4.1 Applied Biosistemleri 3500xL Genetik Analizör

Çalışmada kullandığımız Applied Biosistemleri 3500xL Genetik analizörleri, 24 kapilerli, kapiler elektroforesis teknolojisini kullanan florasan tabanlı DNA analizi aygıtıdır. Bir çalışma esnasında, sistem Katod Buffer Konteynırı (CBC) içindeki pozisyonu yıkamak için polimer gönderme pompasından yüksek basınç altında taze polimer solusyonu pompalayarak kapileri hazırlar. Birkaç saniyeliğine düşük voltaj kullanarak numuneyi kapilerin içine elektro kinetik olarak injekte eder. CBC'nin durulama pozisyonu içinde kapiler uçlarını yıkar, sonra CBC'nin buffer pozisyonuna kapileri döndürür. Voltajı, sürekli bir voltaja yükseltir. Yüksek bir voltaj alanı, Anot Buffer Konteynırı (ABC) bitimi arasında oluşturulur ve negatif voltaj, kapiler sırasının yüklü başlığına uygulanır. Bu alan, ayırma polimeri aracılığıyla negatif şarj edilen DNA'yı çeker. Daha küçük fragmanlar, büyüklerden daha hızlı hareket ederler ve detektöre ilk varırlar. Optimal ayrımı garanti altına almak için ve DNA'nın bozulmasını sürdürmek için, kapilerler deteksiyon hücrelerinde ve fırında termal olarak kontrol edilirler. Fırın, Peltier ısıtma ünitesine ve fan sirkülasyonlu havaya sahiptir. Peltier, fırını, SSCP gibi doğallığı bozmayan uygulamalar için yararlı olan sub-ambient sıcaklıklarını sürdürmek için

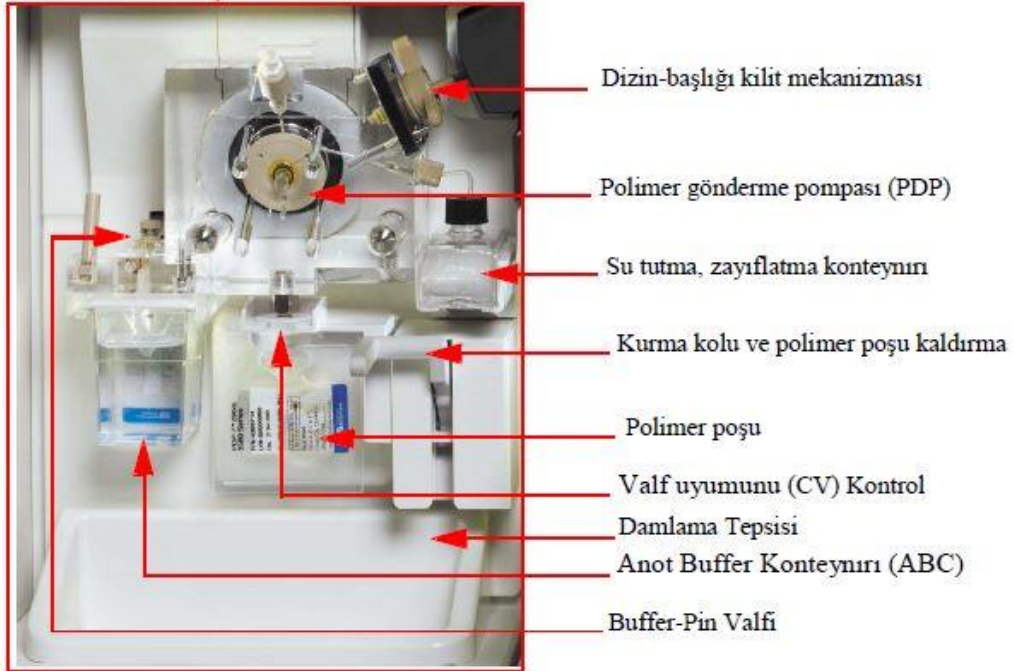


Şekil 2.6 Applied Biosistemleri 3500xL

fırını ısıtır ve soğutur. Deteksiyon hücrelerinde, DNA'ya iliştirilen boyalar, ince bir lazer ışığı demetiyle harekete geçirilirler. Lazer ışığı, kapilerin en üst ve altından kapilerin kanadına yönlendirilirler. Az miktar lazer ışığı, boyalar tarafından emilirler ve tüm yönlerdeki dalgaboyu ışığınca yayılırlar. Lazer ışığını bloke ederken, aygıt optikleri üzerindeki florasan ışığı yakalar. Işık, ışığı dışarı yayan bir transmisyon parmaklığı aracılığıyla geçer. Işık, soğutulmuş bilimsel-düzyer CCD dizini üzerine imajlanır. Her kapiler için, CCD'deki 20 bölge, her kapiler için 20-renk sağlamak için toplanır. 20-renk datayı, tam bir çalışma için, çoklu-boya datasına dönüştürür. Sekanslama uygulamaları 4 farklı boya, 4 tabana (A, G, C, ve T) karar vermek için kullanılır. Fragman ve HID analysis dye sets (HID) analizi uygulamaları için, 6 boyaya kadar, daha yüksek ham madde miktarı için tek bir çalışmada kullanılır.



Şekil 2.7 Aygıt Dahili Komponentleri



Şekil 2.8 Aygıt İç Komponentleri

Tablo 2.1 Kapiller Elektroferez Aygıt parçaları ve fonksiyonları

Parça	Fonksiyon
Oto-Sampler	Numune plate'lerini ve Katod Buffer Konteynırını (CBC) tutar ve plate'leri ve CBC'yi kapillerlerle hizalamak için hareket eder.
Fırın	Birleşik kapiler sıra sıcaklığını korur.
Fırın yoğunlaşma rezervuarı	Fırından yoğunlaşmayı toplar
Pompa Bloğu	Kaldırma pompa odasını, polimer odalarını, piston su mühürünü, sıra ilişirme noktasına uyan şırınga (dizin portu), alt polimer bloğu, ve CV/Uyma (Valf poşu ilişirme uyumunu kontrol ediniz) içerir.
Tanımlama hücresi ısıtıcı bloğu	Laser deteksiyonu için yerde tanıma hücresini tutar ve 50 °C'lik tanıma hücresi sıcaklığını korur.
Polimer gönderme pompası (PDP)	Polimeri sıraya pompalar ve otomatikleştirilmiş koruma prosedürüne izin verir.
Alt polimer bloğu	Buffer valfini, anot elektrodunu, buffer gasketini içerir ve anot buffer konteynırını tutar.
Radyo frekansı tanımlaması (RFID)	Birincil aygıt kullanılabilirleri için aşağıdaki bilgiyi okumak üzere RFID sekmesi: <ul style="list-style-type: none">• Parça numaraları• Seri numaraları• Tarihler (sona erme)• Kapasite (kullanım) Birincil kullanılabilirler: <ul style="list-style-type: none">• Kapiler Sırası• Katod Buffer Konteynırı (CBC)• POPTM Polimer• Anot Buffer Konteynırı (ABC)
Kapiler Sırası	Elektroferez ile florasan-etiketli DNA fragmanın ayrımını etkinleştirir. O, 8 veya 24 kapilerlerden oluşan değiştirilebilen bir ünitedir. (50 cm ve 36 cm uzunluk). Not: Sadece HID uygulamaları için 36 cm kapiler.
Anot Buffer Konteynırı (ABC)	Anot Buffer Konteynırı (ABC) aygıt üzerindeki tüm elektroferez uygulamalarını desteklemek için 1x çalışması içerir. O, sürekli sıvı boyunu korumak için yapıllı oda akışına sahiptir.
Katod Buffer Konteynırı (CBC)	Katod Buffer Konteynırı (CBC) aygıt üzerindeki tüm elektroferez uygulamalarını desteklemek için 1x çalışması içerir.
Polimer poşu	Polimer gönderme pompasına polimer sağlar.
Şartlandırma belirteci	Poş polimer pompasını hazırlamak, polimer tipi değişiklikleri arasında polimer pompasını yıkama ve aygıtın kapatılması esnasında kullanılır. Bir kerelik kullanımı için yeterli volümü vardır.

Kapiller ya da daha basit tabirle boru içerisinde gerçekleşen bir elektroforezdir. Elektroforez demek aslında bir elektrik alan iyonlarının mobilitesine bağlı ayırma tekniği demektir. Bir yürütmede ki hızı, büyüklüğüne bağlıdır. Kapiller elektroforez, yüklü olan taneciklerin elektirik alanda daha farklı hızlarda hareket edebilmelerinden yararlanılarak ayrıştırılmasını yapan yöntemdir. Daha detaylı yapısını inceleyecek olursak yüksek voltaj güç desteği, erimiş silika kapiller, iki adet tampon rezarvuarı, iki adet elektrot ve bir adet dedektör bulunmaktadır. Ayrıca ek olarak otomatik numune verici, enjeksiyon aparatı, dedektör çeşitleri ve ısı kontrolü sağlayıcı bölümler ilave edilebilmektedir.

Temelde inceleyecek olursak elektroforetik hareket edebilme yeteneği faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara veya bunlara bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapabilen bir yöntemdir. Gen teknolojisi içinde önemli yöntemlerden biridir. Kapiller elektroforez, DNA dizileme ve fragment analizi için kullanılır, bir DNA bçlgesinde ki baz dizisinin tespit edilip analiz edilmesi konusunda oldukça önem taşımaktadır.

2.3.4.2 Kapiler Elektroforez Çalışma Prensibi

Kapiller elektroforez cihazının çalışma prensibine bakacak olursak kapiler boru belirli düzeyde PH'da iletken bir sıvı ile doldurulur. Örnek verecek olursak ayrılacağı tampon çözeltidir. Enjeksiyon ile kapillere uygulanmaktadır ve bu durum kapiller üzerindeki voltajı çok yüksek bir hale getirmektedir. Bu yüzden yürüyecek olan örneklerin kapiller dediğimiz ince borular hattında farklı hızlarda hareket etmektedir. Pozitif bileşenler negatif elektroda, negatif bileşenler pozitif elektroda hareket ederler. Bu durum cihazdan önce hızlı geçen bileşikler geçerken yavaş geçen bileşikler daha sonra geçmektedirler. Kapiller elektroforezde ise ayırt edici olay, iyon büyüklüğüne karşı yüklerin oranıdır. Akışla değil elektriksel alan ile ayrılma sağlanmaktadır. Yüksek elektrik alanlarının kullanımına imkan sağlayan şey ise küçük çaplı kapillerin olmasıdır. Bu ayırma yöntemi ise etkili ve çok verimli bir ayırma ve süresinin çok önemli düzeyde kısılmasını sağlar.

Kapiller Elektroforez cihazının Moleküler Genetik tekniklerinde ve tayinlerinde büyük bir avantaj sağladığı önemli bir gerçektir. Avantajlarını şu şekilde

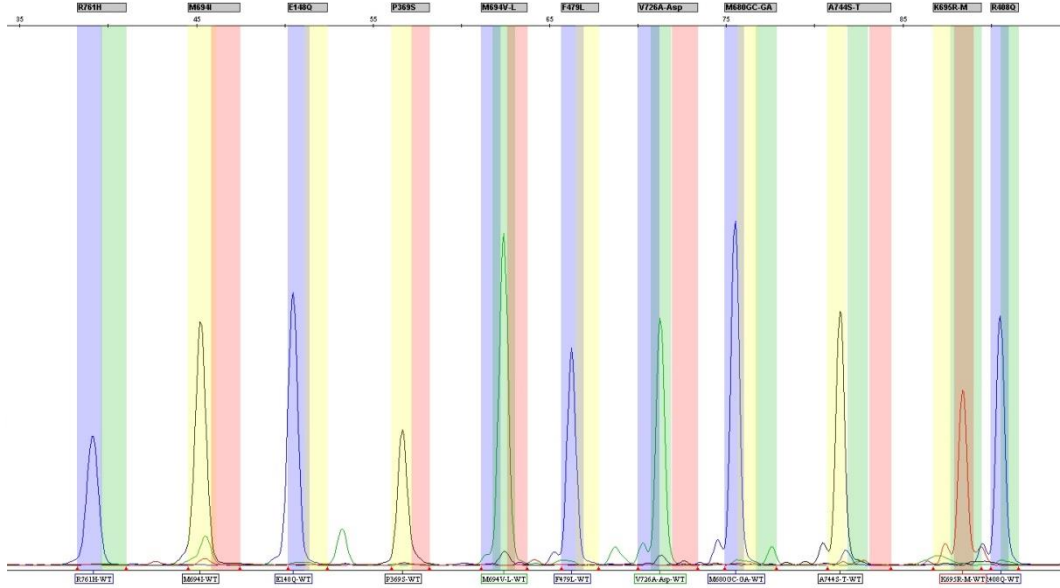
özetleyebiliriz. Öncelikle Hızlı ve oldukça verimli ayırma sağlamasıdır, az miktarda numunenin yeterli olmasıdır, seçiciliğinin çok iyi olması ve miktar belirlenmesinde büyük bir avantaj sağlamaktadır.

2.4 Fragman Analiz Programı: GeneMapper

GeneMapper Yazılımı, tüm Thermo Fisher Scientific elektroforez tabanlı genotipleme sistemleri için DNA boyutlandırması ve kaliteli alel çağrılarını sağlayan esnek bir genotipleme yazılım paketidir. Bu yazılım, güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), heterozigotluk kaybı (LOH), mikrosatellit ve SNP genotipleme analizi dahil olmak üzere çoklu uygulama işlevselliğinde uzmanlaşmıştır. Dideoksi zincir sonlanması olarak bilinen Sanger sekanslama, en önemli gen dizileme yöntemlerinin ilki konumundadır. Gen bölgesindeki değişimlerin tespit edilmesinde ve moleküler tanıda kullanılan bir yöntem olup, 3'-OH ucu kopartılan ve dideoksi nükleotitler olarak isimlendirilen ddNTP'ler ile DNA'da replike olan dizinin sonlandırılmasıdır. Aslına bakacak olursak tekniğin temel kuralı ve amacı ana DNA zincirinde ki seçilmiş hedef bir noktanın nükleotid dizisini belirleyebilmektir. Sangerin tekniğinin temel kuralı zincir sonlandırıcı nükleotit olarak ddNTP'lerin kullanılıyor olmasıdır. DNA dizi analizlerinin artmasında ki temel sebebi ise bu prensibin jel temelli sistemler yerine kullanılmasıdır. Bu yöntemler günümüz dünyasında hala hızla gelişim göstermektedir ve böylece proteomik ve genomik dallarında bize yardımcı olmaktadır.

MEFV geninde 16. Kromozom'da bulunan 16 bölgenin analizi temelde Homozigot, Heterozigot ve Wilde Type yani normal olarak incelenmektedir. Heterozigot mutasyon sonucunun bize verdiği sonuç iki allelden birisi farklılaşma yaşaması sonucu ekranda çift pik görüntüsü elde ederiz. Bu renkler kırmızı, siyah, yeşil ve mavi olmak üzere dört çeşittir. Analiz yaptığımız Gene Mapper programında tanımlanan FMF Snapshot analiz programımızda piklerle aynı hizada ve hemen arkasında duran renkli paneller vardır, bu renkli panellerin hangi renk olduğu ise çıkan farklı renkli piklere göre değişmektedir. Örneğin mavi renkli pik, mavi renkli panelin üstünde çıkmaktadır. Yeşil renkli pik, yeşil renkli panelin üstünde çıkmaktadır. Sarı renkli pik, siyah renkli panelin üstünde çıkmaktadır. Kırmızı renkli pik ise kırmızı renkli panelin üstünde çıkmaktadır.

Heterozigot bir mutasyonda pikler çift renkli çıkmaktadır. Mutant pik ve normal pik yan yana çıkmaktadır.



Şekil 2.9 Bütün bölgeleri normal data görüntüsü.

Homozigot olarak adlandırılan mutant analiz görüntüsünde ise tanımlanmış mutant bölgelerinde tek pik görüntü elde ederiz. Homozigot, birisi anneden diğeri babadan gelen iki allin ikisinde aynı dönüşüme sahip olması anlamına gelmektedir. Pik rengi tek renk olup aynı sütunda görülmektedir.

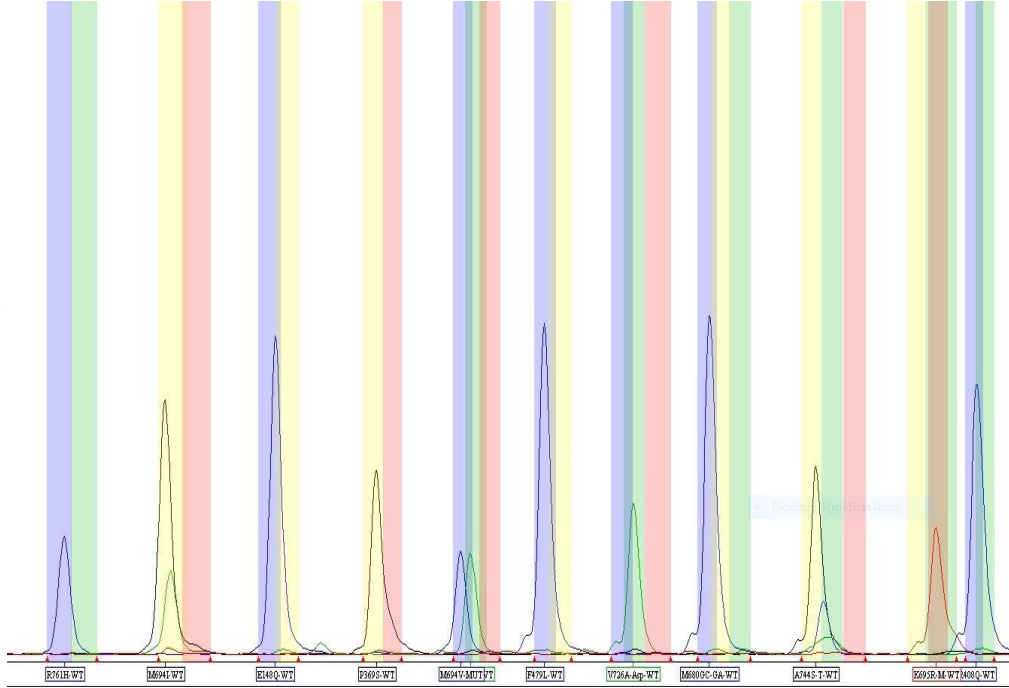
Wild Type dediğimiz normal olarak sınıflandırılan hastaların ise tek pik görüntüsü vardır. Herhangi farklı bir dönüşüme sahip değildirler. İki allelinde görüntüsü ve genotipi normaldir.

2.4.1 MEFV geni 16 Mutasyon bölgesinin GeneMapper Programı ile Analiz İncelemesi

2.4.1.1 M694V Mutasyonları

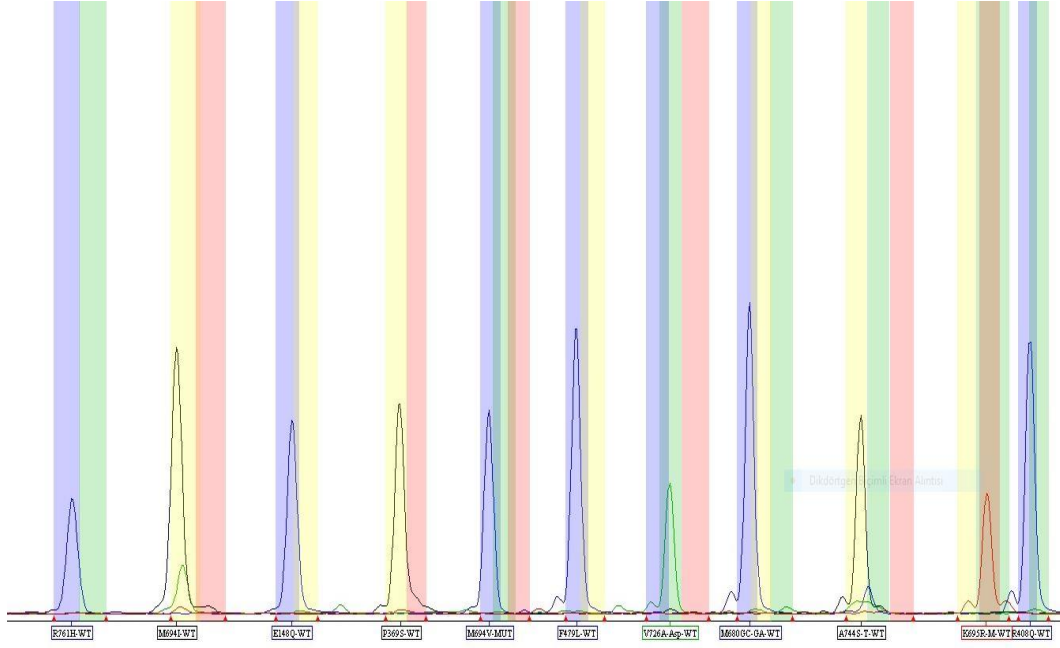
M694V ekzonik konum olarak 10. Ekzon' da olup c.2080 A>G nükleotid değişimine sahiptir. M694V mutasyonu moleküler ağırlık olarak orta sıralarda yer almaktadır. Bunu kapiller elektroforez cihazında, kapillerden geçen ve dedektörden geçerken ışımaya yapan problemlerin geçiş sırası belirlemektedir. Önce ışımaya yapan yani önce geçiş yapan daha önce pik görüntüsü vermektedir. Normal

pik görüntüsünde sadece yeşil sütunun üstünde, yeşil renkte pik görüntüsü vermektedir. Heterozigot olarak adlandırdığımız allellerin biri farklı bir dönüşüme sahip olup analiz ekranında çift pik görüntüsü ortaya çıkmaktadır. Mutant pik sol tarafta mavi renkteyken normal pik sağtarafa yeşil renk olarak görülmektedir.



Şekil 2.10 M694V bölgesi Heterozigot görüntüsü.

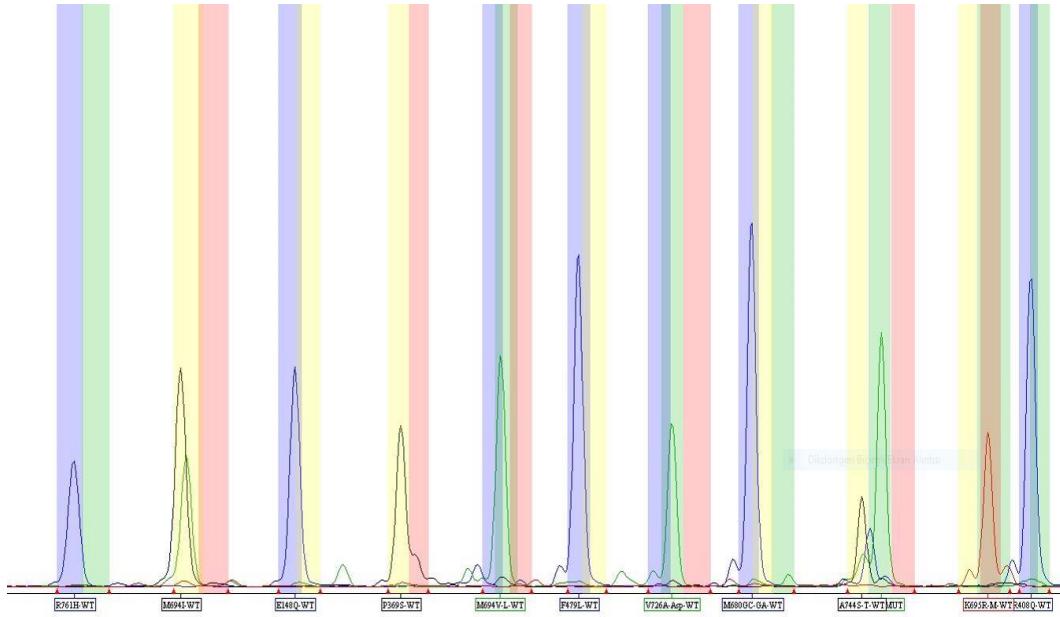
M694V homozigot olan mutasyonda iki allelde aynı farklılıkta dönüşüme sahip olup elde edilen data görüntüsünde ise sadece tek pik görüntüsü vardır. Ve bu pik mutant piki olup Mavi renkte sol tarafta görülmektedir.



Şekil 2.11 M694V Bölgesi Homozigot görüntüsü.

2.4.1.2 A744S Mutasyonları

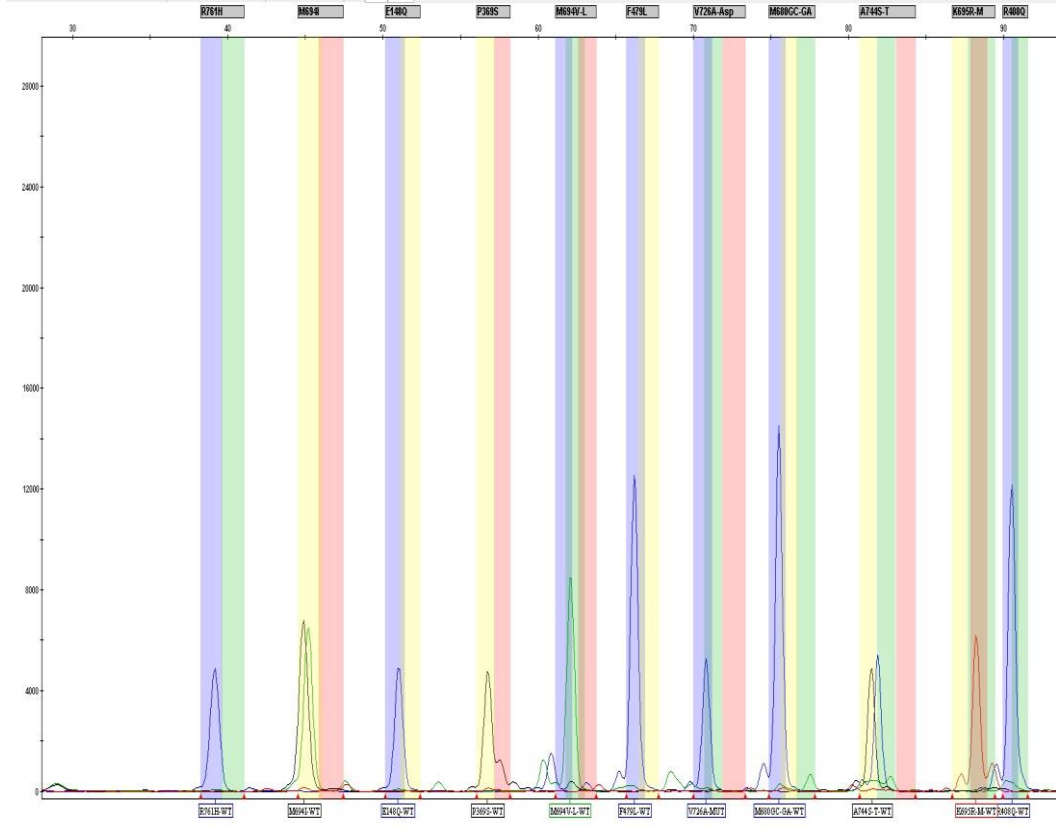
A744S Mutasyon bölgesi ekzonik konum olarak 10. Ekzon olup c.2230G>A nükleotid değişimine sahiptir. Analiz ekranında bakacak olursak bu mutasyonu iki farklı renk temsil etmektedir. Eğer baktığımız bölge normal olarak çıkarsa analiz ekranında pik rengimiz siyah olup, sarı sütun üzerinde yer almaktadır. Heterozigot çıkması halinde ise yeşil sütun üzerinde yeşil pik görüntüsü elde ederiz. Homozigot mutant görüntüsünde ise sadece yeşil sütun üzerinde yeşil pik rengi görürüz. M694V mutasyonunun aksine A744S mutasyonunun mutant piki normal pikten önce değil sonra gelmektedir.



Şekil 2.12 A744S bölgesi Heterozigot analiz görüntüsü.

2.4.1.3 V726A Mutasyonları

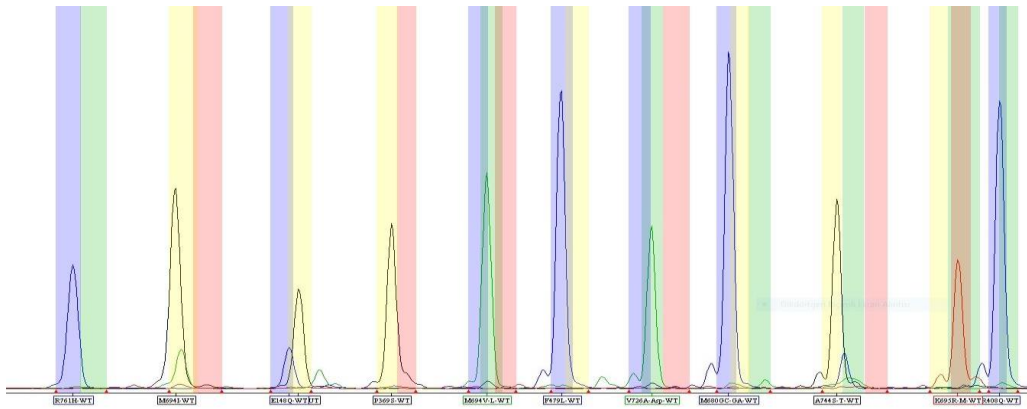
V726Ala ekzonik konum olarak 10. Ekzon' dadır. c.2177 T>C nükleotid değişimine sahiptir. V726A mutasyonunda normal bölge pik rengi yeşil olup, mutant bölgenin pik rengi ise mavidir. M694V mutasyonunda olduğu gibi bu mutasyon analizinde de mutant pik normal pikin gerisindedir. Bunun sebebi daha önceden açıklamıştık. Diğer mutasyonların analizinde de olduğu gibi heterozigot mutasyonda yeşil ve mavi olmak üzere çift pik, homozigot mutasyonlarda ise sadece mutant pik olan mavi pik görülmektedir.



Şekil 2.13 V726A bölgesi Homozigot mutasyon görüntüsü.

2.4.1.4 E148Q Mutasyonları

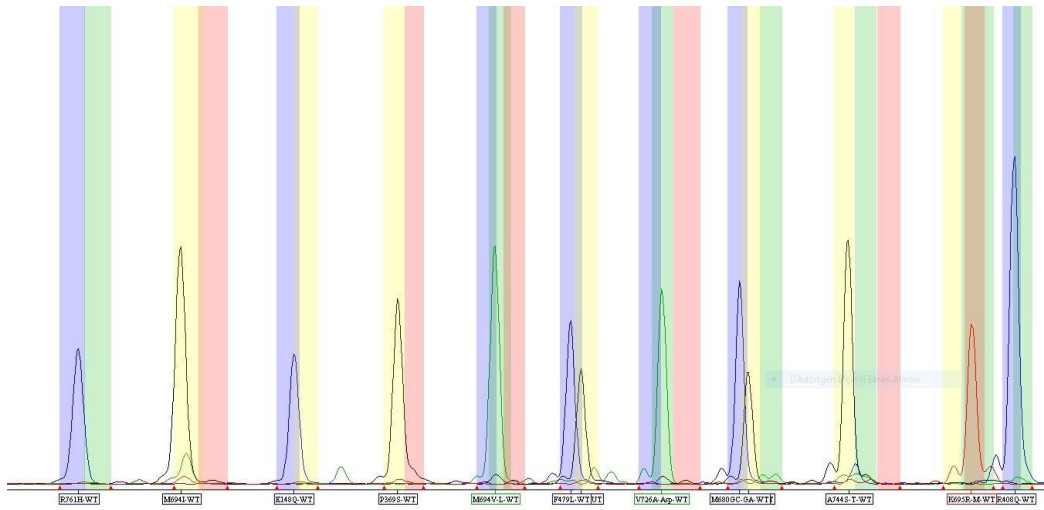
E148Q mutasyonu ekzonik konum olarak 2. Ekzon' da yer almaktadır. E148Q mutasyonunda en sık karşılaştığımız mutasyon çeşidi c.442G>A nükleotid değişimine sahip olan mutasyondur. Diğer iki değişim ise c.442G>T ve c.442G>C değişimleridir. E148Q mutasyonu analiz görüntüsünde normal pik rengi mavi sütun üzerinde mavi iken mutant pik rengi ise sarı sütun üzerinde siyah pik görüntüsü ile ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2.14 E148Q bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü.

2.4.1.5 F479L Mutasyonları

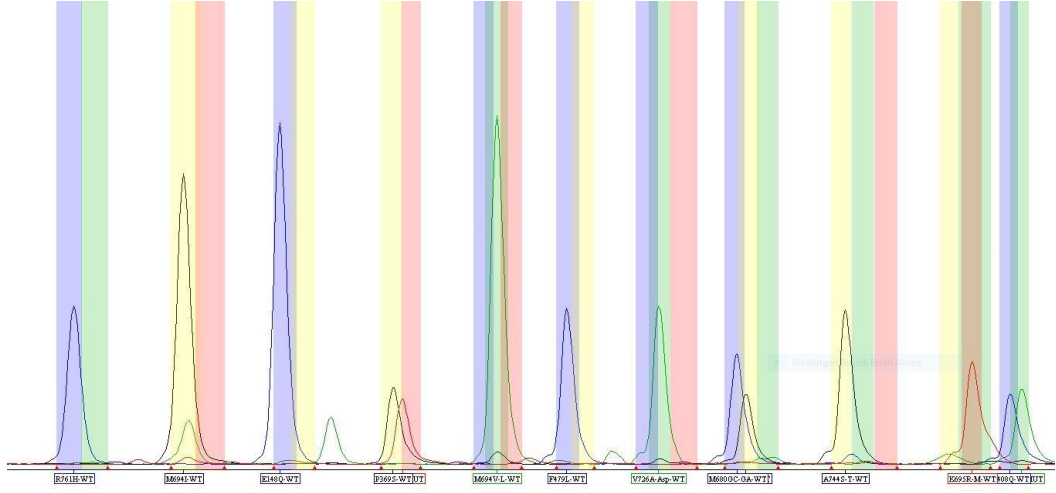
F479L ekzonik konum olarak 5. Ekzon' dadır. c.1437C>G nükleotid değişimine sahiptir. F479L mutasyonunda normal pik görüntüsü mavi sütun üstünde mavi pik rengindedir. Mutant piki sarı sütun üzerinde siyah renkte görülmektedir. Sütunların belirlenmesi ise tanımlanan mutasyon daha doğrusu beklenen ve kitin problemlerini içeren bölgeleri işaretlemek amacıyla yerleştirilmiştir. Analiz programında bu tanımlı bölgelerin lokasyonunu belirleyen sütunları, pik çıktığı zaman uyarı verme amacıyla kit üreticileri tarafından tanımlanmıştır.



Şekil 2.15 F479L ve M680IG>C bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü.

2.4.1.6 P369S Mutasyonları

P369S ekzonik konum olarak 3. Ekzon' dadır. c.1105C>A nükleotid değişimine sahiptir. Diğer mutasyonlar gibi normal, heterozigot ve homozigot olarak adlandırılan analiz görüntülerine sahiptir. Normal olarak adlandırdığımız yani bir değişimin olmadığını gösteren analiz ekranında siyah renkte pik görülmektedir. Heterozigot mutasyon görüntüsünde ise çift pik görülmektedir. Siyah ve kırmızı renge sahip olan bu piklerden kırmızı olanı mutant yani değişimin olduğunu gösteren piktir. Homozigot mutant değişimine sahip analiz görüntüsünde ise sadece mutant yani değişimi gösteren kırmızı pik karşımıza çıkmaktadır.



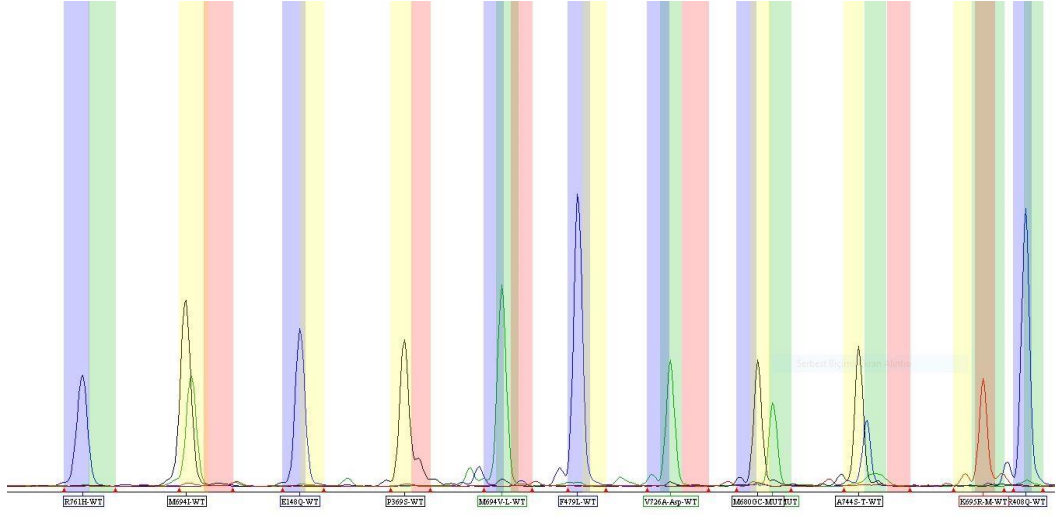
Şekil 2.16 P369S, M680IG>C ve R408Q bölgesi.bileşik heterozigot analiz görüntüsü.

2.4.1.7 R408Q Mutasyonları

R408Q ekzonik konum olarak 3. Ekzon' dadır. c.1223G>T nükleotid değişimine sahiptir. Değişimin olmadığı normal pik rengi mavi renktedir. Mutant yani değişime uğramış pik rengi ise yeşildir. Heterozigot mutasyon görüntüsünde mavi olan pik ile yeşil renkte olan mutant piki yan yana çıkmaktadırlar.

2.4.1.8 M680I Mutasyonları

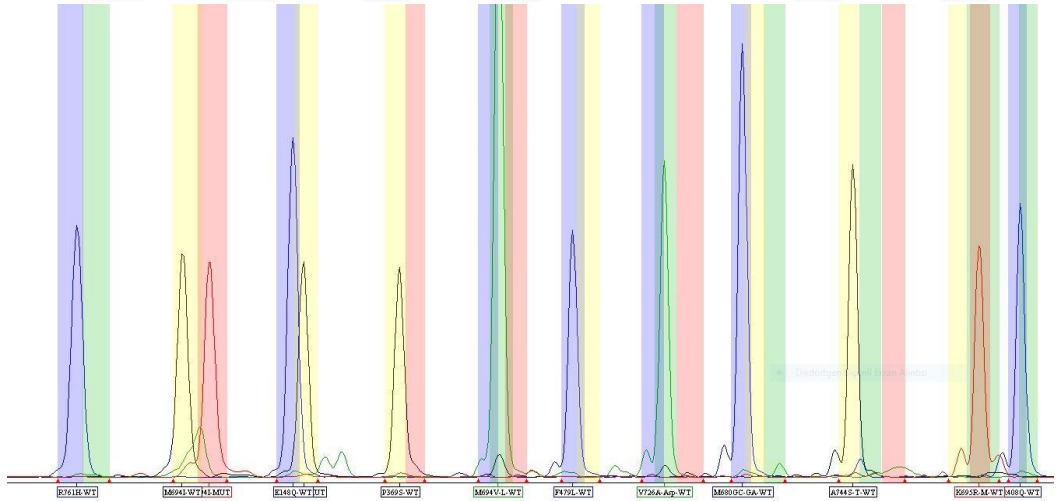
M680I mutasyonu ekzonik konum olarak 10. Ekzon olarak konumlandırılmıştır. M680IG>C nükleotid değişimi olarak c.2040G>C dir. Adenin nükleotidine de dönüşebilmektedir. Üç farklı durumda da analiz ekranında çıkacak olan pikler yan yana yer aldığı görülmektedir. c.2040G>C dönüşümünün incelendiği analiz ekranında normal pik rengimiz sarı sütun üzerinde siyah renktedir. c.2040G>A dönüşümünde aynı şekilde normal pik rengi siyahtır ancak mutant pik rengi yeşildir.



Şekil 2.17 F479L ve M680IG>C bölgesi Heterozigot mutasyon görüntüsü.

2.4.1.9 M694I Mutasyonları

M694I ekzonik konum olarak 10. Ekzon' dadır. c.2082G>A nükleotid değişimine sahiptir. M694I mutasyonunu incelediğimizde normal yani değişime sahip değilse siyah renkte pik görürüz. Mutant pik rengi ise kırmızıdır. Heterozigot değişime sahip ise siyah ve kırmızı renkte pikleri diğer analizlerde de olduğu gibi yan yana görürüz. Homozigotta ise kırmızı olan mutant pikini tek başına görürüz.



Şekil 2.18 M694I ve E148Q mutasyona sahip bileşik heterozigot görüntüsü.

3.1 Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu tez çalışması kapsamında, Ankara Etlik Şehir Hastanesine gelen hastaların kan örnekleri Genetik Polikliniğinde toplanmıştır. Tez kapsamında yapılacak çalışmalar için, Ankara Etlik Şehir Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme ve Etik Kurulu onayı alınmıştır. (Tarih: 06.09.2023, Karar no: AEŞH-EK1-2023-515), (Bkz. Ek-1) Kontrol grupları hastaneye gelen ve Genetik Polikliniğine ait laboratuvarlara testi gönderilen bireylerden seçilmiştir. Yaş, cinsiyet, ikamet ettiği bölge ve yönlendiren poliklinik için ayrı çalışma grupları oluşturulmuştur. Yaş grupları için 0-12, 13-25, 26-45, 46-65 ve ≥ 65 yaş aralığındaki, cinsiyet grupları için kadın ve erkek bireyler kullanılmıştır. Yönlendiren poliklinik grubu için Algoloji, Çocuk Alerjisi, Çocuk Enfeksiyon, Çocuk Gastroenteroloji, Çocuk Genetik, Çocuk İmmunoloji, Çocuk Nöroloji, Çocuk Ortopedi, Çocuk Romatoloji, Çocuk Üroloji, Dermatoloji, Enfeksiyon Hastalıkları, Ftr, Gastroenteroloji, Genel Cerrahi, Genetik, Göğüs Hastalıkları, Hematoloji, İç Hastalıkları, Kardiyoloji, Kulak Burun Boğaz, Nefroloji, Nöroloji, Ortopedi, Perinatoloji, Romatoloji, Üroloji Poliklinikleri ve diğer poliklinikler olarak oluşturulmuştur. Yaşadığı bölge grubu için İç Anadolu, Marmara, Akdeniz, Ege, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesi olarak oluşturulmuştur. Oluşturulan gruplar ile MEFV geni incelediğimiz mutasyon bölgeleri ki kare testi ile karşılaştırılıp anlamlılık sonuçları incelenmiştir. Çalışma ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,01$ olarak kabul edilmiştir.

3.2 Materyal

Tez çalışmasında MEFV geninin 16 bölgesini incelerken kullandığımız EYS Medikal ve Laboratuvar Projeleri İnş. Tic. Ltd. Şti. tarafından üretilen Seqline FMF Fragman Analiz Kitidir. Kit içeriği sırasıyla aşağıdaki gibidir;

- 2X PCR Master Mix
- Multiplex PCR Optimizer
- Seqline FMF FRG Primer Mix
- Seqline FMF FRG Probe Mix-1
- Seqline FMF FRG Probe Mix-2
- SNP Genotyping Multiplex
- PCR Grade water
- Seqline 110 Size Standard

MEFV genine bakarken kullandığımız yöntem fragman PCR yöntemidir. Bu yöntemde üç ayrı PCR aşamasından oluşur.

Çalışmamda kullanmış olduğum analiz program olan GeneMapper, bir çok fragment PCR yöntemiyle çalışılan analizleri açmaktadır. Örnek verecek olursak CALR ekzon 9 Fragment testi, Y-Mikro Delesyonu Testi, Amniyotik sıvıdan trizomi testleri, kimerizm testleri ve CVD genine bağlı Trombofil Snapshot Multipleks testi gibi bir çok örnek verebiliriz.

MEFV genine bağlı FMF (Ailevi Akdeniz Ateşi) Fragman testi de bunlardan bir tanesidir. Çalışmamda MEFV geninin 16. Kromozomunda yer alan ekzon 2, ekzon 3 , ekzon 5, ekzon 10 bölgelerinde bulunan belirli 16 bölgesini inceledik belirlenen bu bölgelerine seçilmiş veya hedef bölge olarak da isimlendirebiliriz bunun sebebi ise şüphelendiğimiz bölgeleri doğrudan inceliyor olmamızdır. Çalıştığım kitin adı EYS Medikal Şirketine ait Seqline FMF Fragman Analiz Kitidir. PCR çalışması 3 aşamalı gerçekleşmektedir. Kit içeriğinde ise 2X PCR Master Mix, Multiplex PCR Optimizer, Seqline FMF Fragman Primer Mix, Seqline FMF FRG Probe Mix-1, Seqline FMF FRG Probe Mix-2, SNP Genotyping Multiplex, PCR Grade water, Seqline 110 Size Standard ve Enzimatik Clean-Up bulunmaktadır. Birinci PCR aşamasında, PCR Mix, Primer Mix, PCR Optimizer ve PCR grade water dır. DNA örneğini ise mikrolitre başına 30-60 ng olmak üzere ayarlanmıştır.

Çalışılan 1388 hasta içerisinde yaklaşık değerler bu şekildedir. PCR çalışmasını etkileyen en önemli faktörler olarak şunlar tespit edilmiştir, ortam ısısı, ortamdaki ışık şiddeti, çalışma hızı, bütün kullanılan materyallerin birbiri ile homojen olarak karıştırılması ve PCR cihazının geçiş sıcaklık geçiş performansdır. Özellikle Probe ve SnapShot mixlerin ortam ışığında uzun süre aydınlıkta kalmaları çalışmanın verimini düşürmektedir.

İlk PCR da kullandığım protokol denaturasyon aşaması olarak 95 C derecede 10 dakika ve 1 döngü, ikinci aşama primerlerin bağlanması aşamasıdır ve sırasıyla 95 C derecede 10 saniye, 50 C derecede 5 saniye, 72 derecede 30 saniyedir. En son aşama olarak bağlanan primerlerin uzamasıdır ve 72 C derecede 7 dakikadır.

İkinci PCR aşamasında ise ayrı tüplere 2 ul dağıtılmak üzere Enzimatik CleanUp kullanılır. 2 ul Enzimatik CleanUp'a karşılık 7ul ilk PCR ürünü kullanılır. PCR program ise 37 C derecede 30 dk, 80 C derecede ise 15 dk dır. Üçüncü PCR aşamasında ise her bir örnek Probe 1 ve Probe 2 olmak üzere iki ayrı kuyucuğa ayrılmaktadır. Üçüncü PCR aşamasından sonra artık PCR aşamamız bitirmiş olup Formamide ve Size 110 karışımı ile örneklerimizi Kapiller Elektforez cihazına yüklemek için hazırladık. Aslında Kapiller Elektforez cihazında yürütmek için 96 kuyucuklu yükleme plate ine koyulup cihaza yerleştirilir.

3.2.1 DNA Ekstraksiyonu

Endikasyonlara Çalışmada iki farklı DNA izolasyon cihazı kullanılmıştır. Bunlardan bir tanesi Zeesan Biotech şirketine ait Lab-Aid 824s Nucleic Acid Extraction System otomatik DNA ekstraksiyon cihazıdır. Diğer cihaz ise Tamed otomatik DNA izolasyon cihazıdır. DNA göre farklı polikliniklerden yönlendirilen hastalardan öncelikle en az 200 ml edtalı kan tüplerine kanları alındı. Kan haricinde vücudun herhangi bir yerinden canlı hücre alındığı sürece DNA ekstraksiyonu yapıldı ancak nanogram olarak düşük çıkacağından ve bu durumda çalışmayı olumsuz etkileyeceğinden dolayı kan örneği uygun görüldü. Diğer sebep ise izolasyon cihazının kan örneğinden hızlı ve verimli DNA izolasyonu yapmasından kaynaklıdır.

3.2.1.1 Numune ön işlemleri

EDTA ile muamele edilmiş tam kan numuneleri kullanıldı. Dondurulmuş numuneler ise işleme başlamadan önce hafif çalkalanarak 15-30 C'de çözüldü. Saflaştırılmış DNA'nın verimi ve kalitesi kanın saklama koşullarına bağlıdır. Daha taze kan örnekleri daha iyi sonuçlar vermektedir.

10 güne kadar kısa süreli saklama için kanı EDTA içeren tüplerde topladık ve 2-8 C'de sakladık. Uzun süreli depolama için (10 günden fazla). Kan, standart bir antikoagülan (yüksek moleküler ağırlıklı DNA gerekiyorsa tercihen EDTA) içeren tüplere alınır ve -70 C'de saklanır.

3.2.1.2 Prosedür Prensipleri

Nükleik asitlerin otomatik saflaştırılması, manyetik parçacıkların manyetik parçacık teknolojisine dayanmaktadır. Saflaştırma prosedürü 4 adımdan oluşur: lizis, bağlanma, yıkama ve elüsyon.

Lizis: Nükleik asitleri serbest bırakmak için numuneler ilk önce lizis tamponu ile parçalanır.

Bağlanma: Bağlanma koşullarını ayarlamak için lizis örneklerine bağlanma tamponu eklenir. Lizatlar, Nükleik asitlerin silika yüzeyine optimal adsorpsiyonunu sağlamak için manyetik parçacıklarla iyice karıştırılır. Tuz ve pH koşulları, PCR'yi ve diğer aşağı yönlü enzimatik reaksiyonları engelleyebilen protein ve diğer kirlenici maddelerin manyetik parçacıklara bağlanmamasını sağlar.

Yıkama: Nükleik asitler manyetik parçacıklara bağlı kalırken, bir dizi yıkama adımı sırasında kirlenici maddeler verimli bir şekilde yıkanarak uzaklaştırılır.

Elüsyon: Yüksek derecede saf Nükleik asitler elüsyon tamponunda elüte edilir.

3.2.1.3 NanoDrop™ 2000 Spektrofotometresi ile ölçümü

Elde edilen DNA örneklerinin nanogramı MEFV geni çalışması için nanodropta ölçülmüştür. Ortalama olarak 30-60 nanogram/mikrolitre oranında sonuçlar elde ettik.

1 - 2 µL numuneyi pipetledikten sonra Nanodrop küvetine koyduktan sonra ölçüm değerlerini DNA tüplerine yazdık. Ve çalışma sırasına göre kutulara yerleştirdik.

3.2.2 PCR Reaksiyonu

Seqline FMF Fragman Analiz Kiti ile tek kapiler elektroforez işleminde 11 farklı gen lokusunun 16 mutasyon için amplifikasyonu ve PCR primer çiftleri ilgili bölgeleri amplifiye ederken, mutasyon problemleri aynı PCR ürününü kullanarak tabloda gösterilen mutasyon noktalarına karşılık gelen tek bazı bağlar ve uzatır;

Tablo 3.1 MEFV geni mutasyon bölgeleri

Target Mutation	Size-WT	Size-MUT-1	Size-MUT-2
rs104895097-R761H	39bp	40bp	
rs28940578-M694I	45bp	46bp	
rs3743930-E148Q	51bp	52bp	
rs11466023-P369S	57bp	58bp	
rs61752717-M694V, M694L	62,5bp	61,5bp	63bp
rs104895083-F479L	66bp	67bp	
rs28940579- V726Ala, V726Asp	71,5bp	70,5bp	72,5bp
rs28940580- M680IGC, M680IGA	75bp	76bp	77bp
rs61732874-A744S, A744T	82bp	83bp	84bp
rs104895094- K695R, K695M	88bp	87bp	88,5bp
rs11466024-R408Q	90bp	91bp	

Test daha önceden de belirttiğim gibi üç farklı PCR aşamasından geçmektedir. İlk aşamada gerçekleştirdiğimiz PCR yöntemi ise thermal cycler program olarak üç aşamada gerçekleşmektedir. PCR a başlamadan önce hazırlık olarak hazırlık olarak Tüm PCR reaktiflerini buz üzerinde çözeriz. PCR reaktiflerini vorteksledik ve kapaktaki tüm kalıntıları çıkarmak için kısaca döndürdük. Dış yüzeyde ve kapakta birşeykalmadığından emin olduktan sonra, pipetleri ve pipet uçlarını hazır hale getirdik. Her örnek için 0,2 ml PCR tüpüne 13,5µl reaksiyon karışımını aktardık.13,5 µl reaksiyon karışımını eklediğimiz PCR tüplerine 1.5 µl DNA ekleriz. Eklediğimiz DNA nın nanogram değeri ise µl başına 20-60 ng aralığında olmalıdır. Artık hazır olan PCR tüplerini vorteksleyip ve döndürdük. Tüp duvarında veya kapağında damla kalmadığından emin olduktan sonra tüpleri termal döngüleyiciye yerleştiririz.

Amplifikasyon için aşağıdaki PCR programını kullandık.

Tablo 3.2 PCR protokol thermal programı.

Stage	Stage Description	Temp. Time	Time
1	Activation	95 °C	2 minutes
2	Amplification 35 cycle	95 °C	40 seconds
		62 °C	1 minute 30 seconds
		72 °C	1 minute
3	Extension	72 °C	10 minutes
4	Hold	4 °C	Hold

İlk PCR aşamamız bittikten sonra termal döngüleyiciden ürünlerimizi aldık ve bir sonraki PCR aşamamızı gerçekleştirmek üzere buzlu plate üzerine yerleştirdik.

Her bir hasta için örnekten 5,25µl PCR ürünü ve Seqline PCR Clean-Up kiten ise 1,5 µl 0,2 ml hacmine sahip tüplerde karışımı gerçekleştirdik. Bu aşamaya PCR Clean-Up aşamasında deriz yani türkçe karşılık olarak PCR temizleme reaksiyonu olarak ifade edilir. Tekrardan her PCR ürününü içeren tüpleri vorteksledik ve döndürdük. Tüp duvarında veya kapağında damla kalmadığından emin olduk. Tüpleri termal döngüleyiciye yerleştirdik. Reaksiyon için aşağıdaki PCR programını kullandık.

Tablo 3.3 Enzimatik Clean-Up PCR thermal programı.

Stage	Description	Temp.	Time
1	Activation	37 °C	30 minutes
2	Inactivation	80 °C	15 minutes
3	Hold	4 °C	Hold

Program sonrası ürünleri bir sonraki PCR aşamasında kadar bu sefer -20 °C ısısında beklettik.

Mini Sequencing (Snapshot Reaction) Instructions aşamasında ise elde ettiğimiz Clean-Up PCR ürünlerinden 2,25 µl yeni hazırlayacağımız PCR karışımına ekledik. Her bir hasta için yeni hazırladığımız tüplere 1,125 µl SNP Genotyping Multiplex karışımından, Seqline FMF FRG Probe Mix 1 ve 2 karışımından ayrı tüplere olmak üzere 1,5 µl, PCR Grade Water karışımından ise 2,625 µl ekledik. Tüpleri termal döngüleyiciye yerleştirdik ve aşağıdaki PCR programını kullandık.

Tablo 3.4 Snapshot PCR thermal programı.

Stage	Description	Temp. Time	Time
2	Elongation	96 °C	10 seconds
	35 cycle	53 °C	5 seconds
		60 °C	30 seconds
4	Hold	4 °C	Hold

Termal döngüleyiciyi 2°C/sn rampa hızına getirdik. Yani artış hızını düşürdük.

3.2.3 Kapiller Elektroferez Cihazına Numuneleri Yükleme

PCR protokolünü tamamladıktan sonra PCR ürünlerimizi buzlu plate üzerine koyduk. Her birçalışma ve yürütme için özel olarak ayarlanmış, analizin standart piklerini belirleyen ve analizde referans olarak piklerin yerinin tayin edilmesinde belirleyici olan size standartımız olan Eys size-110 standardı +4°C buzdolabından çıkarttık. Ve Metanamid olarak da bilinen , formik asitin amidi olan, su ile karışabilen ve amonyak benzeri bir kokuya sahip berrak bir sıvı olan formamidi -20°C buzdolabından çıkarttık ve çözünmeye bıraktık.

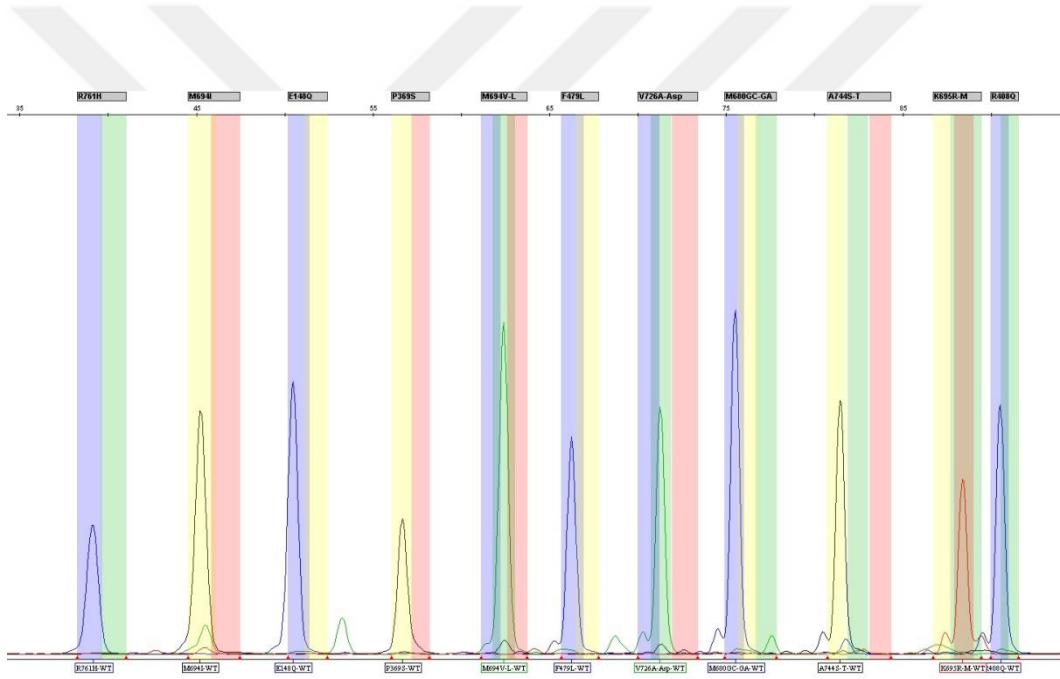
Kapiller Elektroferez cihazına ait olan yürütme yapmak için kullandığımız plate kuyucuklarının her birine, 1 µL Eys-110 size, 10 µL formamide ve ayrı olarak PCR yapılan Probe-1 ve Probe-2 ürünlerini birleştirerek 2 µL kuyucuklara koyduk. Vorteks ve spin yaptıktan sonra hava kabarcığının kalmadığında emin olduktan sonra cihaza dikkatli bir şekilde yerleştirip program başlattık. Her 24 hasta için yürütme program süresi 30 dakikadır.

3.3 GeneMapper Programı İle Analiz

Bir plate 96 hasta kapasitesine sahiptir. Yaptığımız her çalışmaya 96 hasta ekledik ve toplamda 15 çalışmada hastalarımızın sonuçlarını çıkarttık. Analiz programı olarak ise GeneMapper analiz programını kullandık. Cihazda yürüyen örnekler, fsa uzantılı dosyalar olarak programa kaydedilmektedir.

Programı açarken kullandığımız ayarlar kit üreticileri tarafından düzenlenmiş olup seçilen ayarlar değişmemektedir.

MEFV genine ait bölgeleri içeren ve Heterozigot, Homozigot ve Normal bölgeleri içeren bölgeler ekranda belirli sıraya göre yerleştirilmiş ve analizimizde kullandığımız duruma getirilmiştir.



Şekil 3.1 GeneMapper ile açılmış analiz ekranı.

Analiz ekranında görünen ve sırasıyla temsil edilen bölgeler şunlar olmuştur: R761H, M694I, E148Q, P369S, M694V, M694L, F479L, V726Ala, V726Asp, M680IGC, M680IGA, A744S, A744T, K695R, K695M, R408Q.

4.1 SPSS istatistik programı Ki-kare testi uygulaması ve verilerin incelenmesi

1388 hastanın PCR çalışması yapıldıktan sonra SPSS analiz programında Ki-kare testi ve verilerin incelenmesi yapılmıştır.

Tablo 4.1 Saptanan mutasyonlarda alel frekansı

Mutasyon Tipi	Saptanan Alel Sayısı	Alel % si
M694V	213	41,9
E148Q	133	26,2
F479L	6	1,20
M680IG>C/A	67	13,16
K695R	5	1,1
V726A	62	12,2
R761H	7	1,4
A744S	15	2,95
M694I	1	0,20

Tablo 4.2 SPSS veri istatistik programında elde edilen kişi sayısına göre görülen mutasyonların frekans ve yüzdelik değerleri.

MUTASYONLAR				
Location	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
M694V HET	173	12,5	12,5	12,5
M694V HOM	40	2,9	2,9	15,3
E148QHET	125	9,0	9,0	24,4
E148QHOM	8	0,6	0,6	24,9
F479LHET	5	0,4	0,4	25,3
F479LHOM	1	0,1	0,1	25,4
M680IG>CHET	56	4,0	4,0	29,4
M680IG>CHOM	10	0,7	0,7	30,1
M694IG>AHOM	1	0,1	0,1	30,2
K695RHET	5	0,4	0,4	30,5
V726AHET	57	4,1	4,1	34,7
V726AHOM	5	0,4	0,4	35,0
NORMAL	674	48,6	48,6	83,6
BİLESİK MUTANT	206	14,8	14,8	98,4
R761HHET	6	0,4	0,4	98,8
R761HHOM	1	0,1	0,1	98,9
A744SHET	14	1,0	1,0	99,9
A744SHOM	1	0,1	0,1	100,0

Tabloda MEFV mutasyonlarının 1388 hastada yüzdelik oranları ve kişi sayılarına oranları görülmektedir. En sık rastalanan mutasyon çeşidi çoktan aza doğru sırasıyla M694V Heterozigot olmakla beraber onu takip eden, E148Q heterozigot, V726A heterozigot, M680IG>C heterozigot, M694V homozigot, A744S heterozigot, M680IG>C homozigot, E148Q Homozigot, R761H heterozigot, V726A homozigot, K695R heterozigot, F479L heterozigot, F479L Homozigot, M680IG>A homozigot, R761H homozigot ve A744S homozigot olarak devam etmektedir.

Tablo 4.3 İncelenen hastalarda kadın ve erkek yüzdelik ve sayısal oranları.

CİNSİYET	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
ERKEK	560	40,3	40,3	40,3
KADIN	828	59,7	59,7	100,0
Total	1388	100,0	100,0	

İncelediğimiz 560 erkek ve 828 kadın olmak üzere toplam 1388 hasta bulunmaktadır. Yüzdelik olarak ise %40,3 erkek, %59,7 ise kadın hastalardan oluşmaktadır.

Tablo 4.4 İncelenen hastaların poliklinik bilgilerine ait frekans ve yüzdelik değerleri.

POLİKLİNİK	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
ALGOLOJİ	1	0,1	0,1	0,1
ÇOCUK ALERJİSİ	2	0,1	0,1	0,2
ÇOCUK ENFEKSİYON	8	0,6	0,6	0,8

Tablo 4.4 İncelenen hastaların poliklinik bilgilerine ait frekans ve yüzdelik değerleri (devamı)

ÇOCUK GASTROENTEROLOJİ	4	0,3	0,3	1,1
ÇOCUK GENETİK	78	5,6	5,6	6,7
ÇOCUK NÖROLOJİ	2	0,1	0,1	6,8
ÇOCUK ORTOPEDİ	1	0,1	0,1	6,9
ÇOCUK ROMATOLOJİ	460	33,1	33,1	40,1
ÇOCUK ÜROLOJİ	1	0,1	0,1	40,1
DERMATOLOJİ	2	0,1	0,1	40,3
ENFEKSİYON HASTALIKLARI	2	0,1	0,1	40,4
FTR	7	0,5	0,5	40,9
GASTROENTEROLOJİ	9	0,6	0,6	41,6
GENEL CERRAHİ	4	0,3	0,3	41,9
GENETİK	484	34,9	34,9	76,7
GÖĞÜS HASTALIKLARI	3	0,2	0,2	76,9
HEMATOLOJİ	3	0,2	0,2	77,2
İÇ HASTALIKLARI	37	2,7	2,7	79,8
KARDİYOLOJİ	8	0,6	0,6	80,4
KULAK BURUN BOĞAZ	1	0,1	0,1	80,5

Tablo 4.4 İncelenen hastaların poliklinik bilgilerine ait frekans ve yüzdeler (devamı)

NEFRÖLOJİ	7	0,5	0,5	81,0
NÖROLOJİ	1	0,1	0,1	81,1
ORTOPEDİ	1	0,1	0,1	81,1
PERİNATOLOJİ	1	0,1	0,1	81,2
ROMATOLOJİ	189	13,6	13,6	94,8
ÇOCUK ACİL	59	4,3	4,3	99,1
DİĞER	13	0,9	0,9	100,0
Total	1388	100,0	100,0	

MEFV genleri çalışılan hastaların hangi poliklinikten geldiği tabloda görülmektedir. 1388 hastanın çeşitli endikasyonlarla beraber Moleküler Genetik Laboratuvarında çalışılmak üzere en fazla yönlendiren ilk 5 poliklinik sırasıyla Genetik Polikliniği 480, Çocuk Romatoloji 460, Romatoloji 189, Çocuk Genetik 78 ve Çocuk Acil 59 hasta göndermiştir. En az hasta gönderen poliklinik ise Nöroloji polikliniği, Ortopedi polikliniği ve Üroloji polikliniği olarak sıralayabiliriz.

Tablo 4.5 Türkiye'nin yedi bölgesinden gelen hastaların frekans ve yüzdeler olarak sınıflandırılması.

BÖLGE	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
İÇANADOLU	1181	85,1	85,1	85,1
MARMARA	51	3,7	3,7	88,8
AKDENİZ	14	1,0	1,0	89,8

Tablo 4.5 Türkiye'nin yedi bölgesinden gelen hastaların frekans ve yüzdeler olarak sınıflandırılması.(devamı)

EGE	14	1,0	1,0	90,8
KARADENİZ	89	6,4	6,4	97,2
GÜNEYDOĞU ANADOLU	23	1,7	1,7	98,8
DOĞU ANADOLU	16	1,2	1,2	100,0
Total	1388	100,0	100,0	

MEFV geninin 16 bölgesini incelediğimiz hasta gruplarının ,İç Anadolu bölgesinden gelenlerin oranı %85,1 ,Marmara bölgesi %3,7 , Akdeniz Bölgesi %1, Ege Bölgesi %1, Karadeniz Bölgesi %6,4 , Güney Doğu Anadolu bölgesi %1,3 ve Doğu Anadolu Bölgesi ise %1,2 olarak görülmüştür.

Tablo 4.6 Çalışılan hastaların yaşa göre SPSS frekans ve yüzdeler değerleri.

YAŞ	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0-12	253	18,2	18,2	18,2
13-18	218	15,7	15,7	33,9
19-25	173	12,5	12,5	46,4
26-45	410	29,5	29,5	75,9
46-65	252	18,2	18,2	94,1
>65	82	5,9	5,9	100,0

MEFV geni incelenen 1388 hastadan % 18,2' si 253 kişi ile 0-12 yaş grubundadır. %15,7 ile 218 kişi 13-18 yaş grubunda, %12,5 ile 179 kişi 19-25 yaş grubunda,

%29,5 ile 410 kişi 26-45 yaş grubunda, %18,2 ile 252 kişi 46-65 yaş grubunda ve en son olarak ise %5,9 ile 82 kişi 65 yaş üstü grubunda bulunmaktadır.

Tablo 4.7 Hastaların cinsiyete göre SPSS frekans ve yüzdelik değerleri.

CİNSİYET	NORMAL	MUTANT	Total
ERKEK	264	296	560
	47,1%	52,9%	100,0%
KADIN	410	418	828
	49,5%	50,5%	100,0%
TOTAL	674	714	1388
	48,6%	51,4%	100,0%

İncelediğimiz hasta gruplarından toplam gelen hasta sayısı 1388 kişidir. Bu kişiler önce poliklinikte endikasyonla muayene oldular sonra kan örneği verip bu kan örnekleri istenilen MEFV testi çalışılmak üzere laboratuvara gelmiştir. Gelen 1388 hastanın normal ve mutasyonlu olarak istatistik sonuçlarına baktığımız zaman, erkek hastaların 264 kişi ile %47,1' i normal olarak sonuçlanırken, kadın hastaların 410 kişi ile %49,5' u normal olarak sonuçlanmıştır. Erkek ve kadın normal sonuçlanan hastaların oranı ise 674 kişi ile %48,6 olarak sonuçlanmıştır.

Mutasyonlu olarak sonuçlanan erkek hastaların 296 kişi ile %52,9, mutasyonlu olarak sonuçlanan kadın hastaların 418 kişi ile %50,5' i oranında çıktığını görmekteyiz. Erkek ve kadın mutasyonlu sonuçlanan hastaların oranı ise 714 kişi ile %51,4 olarak sonuçlanmıştır.

Tablo 4.8 Ki Kare testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	,754 ^a	1	0,385

Tablo 4.9 Bölgelere göre dağılımı yapılmış mutasyonlu ve normal hastalar frekans ve yüzdeler sonuçları.

BÖLGE	NORMAL	MUTASYONLU	Total
İÇ ANADOLU	572	609	1181
	48,4%	51,6%	100,0%
MARMARA	25	26	51
	49,0%	51,0%	100,0%
AKDENİZ	8	6	14
	57,1%	42,9%	100,0%
EGE	7	7	14
	50,0%	50,0%	100,0%
KARADENİZ	46	43	89
	51,7%	48,3%	100,0%
GÜNEYDOĞU ANADOLU	8	15	23
	34,8%	65,2%	100,0%
DOĞU ANADOLU	8	8	16
	50,0%	50,0%	100,0%

1388 hastadan 1181 kişi İç Anadolu bölgesinden, 51 kişi Marmara bölgesinden, 14 kişi Ege bölgesinden, 14 kişi Akdeniz bölgesinden, 89 kişi Karadeniz bölgesinden, 23 kişi Güney Doğu Anadolu bölgesinden ve 16 kişi Doğu Anadolu bölgesinden gelmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakarsak İç Anadolu bölgesinden gelen 1181 kişiden 572 kişi ile %48,4 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 609 kişi ile %51,6 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Marmara bölgesinden gelen 51 kişiden 25

kişi ile %49 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 26 kişi ile %51 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Akdeniz bölgesinden gelen 14 kişiden 8 kişi ile %57,1 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 6 kişi ile %42,9 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Ege bölgesinden gelen 14 kişiden 7 kişi ile %50 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 7 kişi ile %50 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Karadeniz bölgesinden gelen 89 kişiden 46 kişi ile %51,7 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 43 kişi ile %48,3 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Güney Doğu Anadolu bölgesinden gelen 23 kişiden 8 kişi ile %34,8 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 15 kişi ile %65,2 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Doğu Anadolu bölgesinden gelen 16 kişiden 8 kişi ile %50 oranında normal olarak sonuçlandırılırken, 8 kişi ile %50 oranında mutasyonlu sonuç verilmiştir. Gelen hastaların total olarak %48,6 oranında normal, %51,4 oranında ise mutasyonlu olarak sonuçlanmıştır.

Tablo 4.10 Ki Kare testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	2,545 ^a	6	0,863

Tablo 4.11 Normal ve Mutasyonlu hastaların yaşa göre değerlendirilmesi.

YAŞ	NORMAL	MUTASYONLU	Total
0-12	126	127	253
	49,8%	50,2%	100,0%
13-18	120	98	218
	55,0%	45,0%	100,0%

Tablo 4.11 Normal ve Mutasyonlu hastaların yaşa göre değerlendirilmesi
(devamı)

19-25	72	101	173
	41,6%	58,4%	100,0%
26-45	190	220	410
	46,3%	53,7%	100,0%
46-65	129	123	252
	51,2%	48,8%	100,0%
>65	37	45	82
	45,1%	54,9%	100,0%
Total	674	714	1388
	48,6%	51,4%	100,0%

Yaş grubuyla mutasyonlu ve normal hastaları incelediğimizde, 0-12 yaş grubunda gelen hastaların sayısı 253 kişi, 13-18 yaş grubunda ki hastaların 218 kişi, 19-25 yaş grubunda ki hastaların 173 kişi, 26-45 yaş grubunda ki hastaların 410 kişi, 46-65 yaş grubunda ki hastaların 252 kişi ve 65 yaş üstü hastaların sayısı 45 kişi olup bunların mutasyonlu ve normal çıkan oranları incelendi. SPSS veri istatistik programında analiz edildiği zaman gelen yaş gruplarının totalinde 714 kişi yani %51,4 oranında mutasyonlu bulunmuştur. Sonucu normal çıkan hastaların ise 674 kişi ile % 48,6 oranında çıktığı görülmektedir.

0-12 yaş grubunda mutasyonlu hasta 126 kişi ile %49,8, normal hasta 127 kişi ile %50,2 oranında çıkmıştır. 13-18 yaş grubunda mutasyonlu hasta 120 kişi ile %55, normal hasta 98 kişi ile %45 oranında çıkmıştır. 19-25 yaş grubunda mutasyonlu hasta 72 kişi ile %41,6, normal hasta 101 kişi ile %58,4 oranında çıkmıştır. 26-45 yaş grubunda mutasyonlu hasta 190 kişi ile %46,3, normal hasta 220 kişi ile %53,7 oranında çıkmıştır. 46-65 yaş grubunda mutasyonlu hasta 129 kişi ile

%51,2 , normal hasta 123 kişi ile %48,8 oranında çıkmıştır. 65 yaş üstü yaş grubunda mutasyonlu hasta 37 kişi ile %45,1, normal hasta 45 kişi ile %54,9 oranında çıkmıştır. Sonuçlara baktığımız zaman en fazla gelen yaş grubu 26-45 yaş grubu olup, gelen kişi sayısına oranla en fazla mutasyonun yakalandığı yaş grubu ise %58,4 ile 19-25 yaş grubu olduğu görülmektedir.

Tablo 4.12 Ki Kare testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	9,059^a	5	0,107

Tablo 4.13 Yaşa göre Heterozigot Homozigot ve Normal Karşılaştırılması.

CİNSİYET	HETEROZİGOT	HOMOZİGOT	NORMAL	Bileşik	
ERKEK	179	30	264	87	560
	32,0%	5,4%	47,1%	15,5%	100,0%
KADIN	262	37	410	119	828
	31,6%	4,5%	49,5%	14,4%	100,0%
Total	441	67	674	206	1388
	31,8%	4,8%	48,6%	14,8%	100,0%

Çalışılan erkek hastaların mutasyonlu sonuç alanların heterozigot çıkma yüzdesi 179 kişi ile %32 oranında, homozigot çıkma yüzdesi 30 kişi ile %5,4 oranında, bileşik mutasyon çıkma yüzdesi 87 kişi ile %15,5 oranında ve normal yüzdesi daha önce belirttiğim gibi 264 kişi ile %47,1 oranında sonuç elde edilmiştir.

Kadın hastaların ise mutasyonlu sonuç alanların heterozigot çıkma yüzdesi 262 kişi ile %31,6 oranında, homozigot çıkma yüzdesi 37 kişi ile %4,5 oranında, bileşik mutasyon çıkma yüzdesi 119 kişi ile %14,4 oranında ve normal yüzdesi daha önce belirttiğim gibi 410 kişi ile %49,1 oranında sonuç elde edilmiştir.

Tablo 4.14 Ki Kare testi sonucunda anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	1,250 ^a	3	0,741

Tablo 4.15 Mutasyon çeşitlerinin bölgelere göre karşılaştırılması.

BÖLGE	HETERO ZİGOT	HOMO ZİGOT	NORMAL	BİLEŞİK
İÇ ANADOLU	378	54	572	177
	32,0%	4,6%	48,4%	15,0%
MARMARA	17	3	25	6
	33,3%	5,9%	49,0%	11,8%
AKDENİZ	4	1	8	1
	28,6%	7,1%	57,1%	7,1%
EGE	6	0	7	1
	42,9%	0,0%	50,0%	7,1%
KARADENİZ	21	7	46	15
	23,6%	7,9%	51,7%	16,9%
GÜNEYDOĞU ANADOLU	12	1	8	2
	52,2%	4,3%	34,8%	8,7%

Tablo 4.15 Mutasyon çeşitlerinin bölgelere göre karşılaştırılması (devamı)

DOĞU ANADOLU	3	1	8	4
	18,8%	6,3%	50,0%	25,0%
Total	441	67	674	206
	31,8%	4,8%	48,6%	14,8%

Mutasyonlu ve normal çıkan hastaların daha önceden istatistiğini yapmıştık, tabloda görülen incelemede ise mutasyonlu çıkan hastaların yüzdeleri değerlerini kişi başlı olarak ele aldık. İç Anadolu bölgesinden gelen 1181 hastadan %32 oran ile 378 kişi heterozigot mutasyona, %4,6 oran ile 54 kişi homozigot mutasyona ve %17 oran ile 177 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Bileşik mutasyon birden fazla bölgede mutasyon tespit edilmesi şeklinde ifade edilebilir. Marmara bölgesinden gelen 51 hastadan %33,3 oran ile 17 kişi heterozigot mutasyona, %5,9 oran ile 3 kişi homozigot mutasyona ve %11,8 oran ile 6 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Akdeniz bölgesinden gelen 14 hastadan %28,6 oran ile 4 kişi heterozigot mutasyona, %7,1 oran ile 1 kişi homozigot mutasyona ve %7,1 oran ile 1 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Ege bölgesinden gelen 14 hastadan %42,9 oran ile 6 kişi heterozigot mutasyona sahipken homozigot mutasyona sahip hasta çıkmamıştır. %7,1 oran ile 1 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Karadeniz bölgesinden gelen 89 hastadan %23,6 oran ile 21 kişi heterozigot mutasyona, %7,9 oran ile 7 kişi homozigot mutasyona ve %16,9 oran ile 15 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Güney Doğu Anadolu bölgesinden gelen 23 hastadan %52,2 oran ile 12 kişi heterozigot mutasyona, %4,3 oran ile 1 kişi homozigot mutasyona ve %8,7 oran ile 2 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir. Doğu Anadolu bölgesinden gelen 16 hastadan %18,8 oran ile 3 kişi heterozigot mutasyona, %6,3 oran ile 1 kişi homozigot mutasyona ve %25 oran ile 4 kişi ise bileşik mutasyona sahiptir.

Tablo 4.16 Ki Kare testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	13,984 ^a	18	0,730

Tablo 4.17 Mutasyon çeşitlerinin yaşa göre karşılaştırılması.

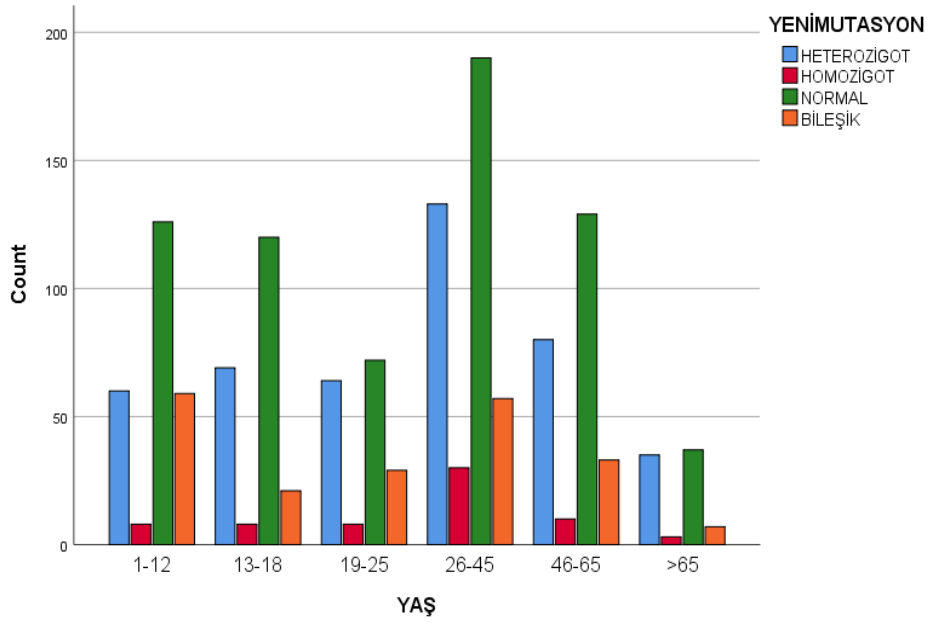
YAŞ	HETEROZİGOT	HOMOZİGOT	NORMAL	BİLEŞİK
1-12	60	8	126	59
	23,7%	3,2%	49,8%	23,3%
13-18	69	8	120	21
	31,7%	3,7%	55,0%	9,6%
19-25	64	8	72	29
	37,0%	4,6%	41,6%	16,8%
26-45	133	30	190	57
	32,4%	7,3%	46,3%	13,9%
46-65	80	10	129	33
	31,7%	4,0%	51,2%	13,1%
>65	35	3	37	7
	42,7%	3,7%	45,1%	8,5%
Total	441	67	674	206
	31,8%	4,8%	48,6%	14,8%

0-12 yaş grubuna ait gelen 253 hastanın 60 kişi ile %27 oranında heterozigot, 8 kişi ile %3,2 oranında homozigot, 53 kişi ile %23,3 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır. 13-18 yaş grubuna ait gelen 218 hastanın 69 kişi ile %31,7 oranında heterozigot, 8 kişi ile %3,7 oranında homozigot, 21 kişi ile %9,6 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır. 19-25 yaş grubuna ait gelen 173 hastanın 64 kişi ile %37 oranında heterozigot, 8 kişi ile %4,6 oranında homozigot, 29 kişi ile %16,8 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır. 26-45 yaş grubuna ait gelen 410 hastanın 133 kişi ile %32,4 oranında heterozigot, 30 kişi ile %7,3 oranında homozigot, 57 kişi ile %13,9 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır. 46-65 yaş grubuna ait gelen 252 hastanın 80 kişi ile %31,7 oranında heterozigot, 10 kişi ile %4 oranında homozigot, 33 kişi ile %13,1 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır. 65 yaş üstü yaş grubuna ait gelen 82 hastanın 35 kişi ile %42,7 oranında heterozigot, 3 kişi ile %3,7 oranında homozigot, 7 kişi ile %8,5 oranında bileşik mutasyon olarak sonuçlanmıştır.

Tablo 4.18 Ki Kare testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür.

($p < 0,01$)

	Value	df	Asymptotic Significance
PearsonChiSquare	42,028^a	15	0,000



Şekil 4.1 Yaş ve Mutasyon Zigozite sütun grafiği.

Ankara Etlik Şehir Hastanesine gelen ve FMF test isteği ile yönlendirilen hastalar, EDTA' lı kan tüpleriyle numuneleri Genetik Laboratuvarına gönderilmektedir. Ankara etlik şehir hastanesi etik kurulundan aldığımız onayla Mayıs 2023 – Aralık 2023 tarihleri arasında gelmiş olan 1388 hastayı çalışmamıza aldık.

DNA ekstraksiyonu yaptık ve mikrogram/nanogram tespit edildi. DNA saflıkları belirlendi. Elde edilen DNA lar PCR reaksiyonu için buzdolaplarına kaldırıldı. 3 basamaklı PCR reaksiyonunu çalıştıktan sonra, elde ettiğimiz reaksiyon ürünlerini ABI 3500xL Sanger Sekans kapiller elektroforez cihazında yürüttük. GeneMapper analiz programında açtığımız verilerin sonuçlarını Fragman analiz yöntemiyle analiz ettik.

Analiz sonuçlarımız; M694V Heterozigot çıkan hasta sayısı 173, M694V Homozigot çıkan hasta sayısı 40, E148Q Heterozigot çıkan hasta sayısı 125, E148Q Homozigot çıkan hasta sayısı 8, F479L Heterozigot çıkan hasta sayısı 5, F479L Homozigot çıkan hasta sayısı 1, M680IG>C Heterozigot çıkan hasta sayısı 56, M680IG>C Homozigot çıkan hasta sayısı 10, K695R Heterozigot çıkan hasta sayısı 5, K695R Homozigot çıkan hasta sayısı 0, V726A Heterozigot çıkan hasta sayısı 57, V726A Homozigot çıkan hasta sayısı 5, R761H Heterozigot çıkan hasta sayısı 6, R761H Homozigot çıkan hasta sayısı 1, A744S Heterozigot çıkan hasta sayısı 14, A744S Homozigot çıkan hasta sayısı 1 olarak tespit edilmiştir.

Bileşik Heterozigot çıkan hasta sayısı ise 206 olarak tespit edilmiştir. Hiçbir mutasyonu bulunmayan hasta sayısı ise 674 olarak bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, en sık rastlanan mutasyonun 173 hasta ile M694V Heterozigot mutasyonudur. Toplam hastaların % 12,5 ' ni oluşturmaktadır. En az rastlanan mutasyonlar ise 1 hasta ile R761H Homozigot, A744S Homozigot mutasyonlarıdır. K695R Homozigot mutasyonu ise hiç tespit edilmemiştir.

Elde ettiğimiz sonuçları yaşa, cinsiyete ve yaşadıkları bölgelere göre karşılaştırdık.

Çalışmaya aldığımız 1388 hastanın 560'ı erkek, 828'i kadın hastadır.

Yönlendirildiği poliklinik olarak incelediğimiz zaman, en fazla hasta gönderilen poliklinik 484 hasta ile Genetik Polikliniği olmuştur. Bunu takip eden poliklinikler ise 460 hasta ile Çocuk Romatoloji ve 189 hasta ile Yetişkin Romatoloji polikliniği olmuştur. En az gönderilen poliklinik ise 1 hasta ile Kulak Burun Boğaz Polikliniği olmuştur.

Bölgelere baktığımız zaman ise en fazla 1189 hasta ile İç Anadolu Bölgesinden gelmiştir. En az geldiği bölge 14 hasta ile Ege Bölgesi ve Akdeniz Bölgesidir.

Yaş grupları olarak inceledik ve 0-12 yaş aralığından 253 hasta, 13-18 yaş aralığından 218 hasta, 19-25 yaş aralığından 173 hasta, 26-45 yaş aralığından 410 hasta, 46-65 yaş aralığından 252 hasta ve 65 yaş üzeri hasta grubundan ise 82 hasta gelmiştir.

Hastaların tespit edilen mutasyonlarının cinsiyete göre SPSS frekans ve yüzdeler değerlerini karşılaştırdığımızda 560 Erkek hastadan 296'sı mutant, 296 hastadan ise 179'u Heterozigot, 30'u Homozigot, 87' si Bileşik Heterozigot mutasyona sahiptir. Mutant ve Normal sonuçlara Ki-kare testi yaptığımızda anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,01$). Heterozigot, Homozigot, Bileşik Heterozigot ve Normal sonuçlara Ki-kare testi uyguladığımızda anlamlı bir fark görülmemiştir.

828 Kadın hastadan 418'i mutant, 418 hastadan ise 267 hasta Heterozigot, 37 hasta Homozigot, 119 hasta Bileşik Heterozigot mutasyona sahip olduğu görülmüştür. Normal ve Mutant hasta gruplarına Ki-kare testi yaptık ve anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,01$). Heterozigot, Homozigot, Bileşik Heterozigot ve Normal sonuçlara Ki-kare testi uyguladığımızda anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,01$).

İç Anadolu bölgesinden gelen 1181 hastadan 609'u mutant, Marmara bölgesinden gelen 51 hastadan 26'sı mutant, Akdeniz bölgesinden gelen 14 hastadan 6'sı mutant, Ege bölgesinden gelen 14 hastadan 7'si mutant, Karadeniz bölgesinden gelen 89 hastadan 43'ü mutant, Güney Doğu Anadolu bölgesinden gelen 23 hastadan 15'i mutant ve Doğu Anadolu bölgesinden gelen 16 hastadan 8'i mutant olarak tespit edilmiştir. Bulgulara Ki-kare testi yaptık ve anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,01$). Bölgelerden gelen mutasyonlu hastaların totalde 441'i Heterozigot, 67'si Homozigot, 206'sı Bileşik Heterozigot ve 674'ü Normal olarak

tespit edilmiştir. Sonuçlara Ki-kare testi yapıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,01$).

0-12 yaş grubu 253 hastadan 60'ı Heterozigot, 8'i Homozigot, 59'u Bileşik Heterozigot ve 126'sı Normal olarak tespit edildi. 13-18 yaş grubu 218 hastadan 69'u Heterozigot, 8'i Homozigot, 21'i Bileşik Heterozigot ve 120'si Normal olarak tespit edildi. 19-25 yaş grubu 173 hastadan 64'ü Heterozigot, 8'i Homozigot, 29'u Bileşik Heterozigot ve 72'si Normal olarak tespit edildi. 26-45 yaş grubu 410 hastadan 133'ü Heterozigot, 30'u Homozigot, 57'si Bileşik Heterozigot ve 190'ı Normal olarak tespit edildi. 46-65 yaş grubu 252 hastadan 80'i Heterozigot, 10'u Homozigot, 33'ü Bileşik Heterozigot ve 129'u Normal olarak tespit edildi. 65 yaş üstü grubu 82 hastadan 35'i Heterozigot, 3'ü Homozigot, 7'si Bileşik Heterozigot ve 37'si Normal olarak tespit edildi. Bulgulara Ki-kare testi yapıldı ve anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,01$).

Hızlı şekilde ilerlemekte olan moleküler genetik teknikler ile FMF'in genetiğinin anlaşılabilmesi ile kayda değer ilerlemeler gerçekleşmiştir. Daha yakın zamana kadar çok sayıdaki olgunun mutasyonunun tespit edilemediği için herhangi bir tanı konulamadığı bildirilmektedir [21]. MEFV genindeki mutasyon bölgelerinin sayısı ve çeşidi insanlar arasında farklılık göstermektedir [23,32,33]. Ailesel Akdeniz ateşinde, klinik işaretler de ırklar arasında, değişiklik gösterebilmektedir [35]. Ailesel Akdeniz Ateşi; Akdeniz bölgesinde yaşamını sürdüren Türk toplumları, Ermeni toplumları, Arap toplumları ve Yahudi toplumlarında diğer toplumlara göre sık görülmektedir [17]. Ailesel Akdeniz ateşi, tekrarlayan ateş ile birlikte otozomal resesif geçişli hastalıktır. Hastalık daha çok Orta doğu ve Akdeniz bölgesi ülkelerinde sık olmakla birlikte, diğer bölgelerde de artan sıklıkla rapor edilmektedir [20]. Türkiye'de 14 yıl önce yapılmış araştırmada yaygınlığı %0,006 olarak tespit edilmiştir [24]. Çoğu yaş grubunda görülmektedir ve sıklıkla 4-16 yaş aralığında olan çocuklarda belirtilerin yeni yeni ortaya çıktığı belirtilmektedir [17]. Geçtiğimiz senelerde yapılmış olan bir çok çalışmada hastalığın tanısının koyulduğu yaş ortalamasının küçüldüğü belirtilmiştir [25,26]. Kız ve erkek cinsiyetlerinin aynı derecede etkileniyor olduğu gösterilse de, yapılan bazı çalışmalarda erkek veya kız cinsiyetin birbirlerinden farklı oranda baskın olabildiği belirtilmiştir [17,27]. Bizim çalışmamızda da kız cinsiyetin daha fazla olduğunu gördük ancak coğrafi konum ve sınıflara göre farklılıklara bağlı

olarak değişmektedir. Hastalığın, cinsiyetler arasında farklı sıklıklarda görüldüğünü bildiren ve sonuçları birbirleri ile çelişkili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunluğunda erkeklerde biraz daha sık olduğu bildirilse de, kadın/erkek oranının eşit, hatta kadınlarda daha sık olduğunu gösteren çalışmalar da vardır [37]. AAA araştırma ekibi 2005-2006 yılında 2840 hasta olarak kabul edilen kişilerde, cinsiyet açısından, 1/1,2 yani 0.8333 olarak bulmuşlar ve erkeklerin kızlara göre baskınlığını belirtmişlerdir [17]. Hastalığın, Akdeniz bölgesinde ve civar bölgelerde bulunan Türk toplumlarında yaygın olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir [17]. AAA araştırma ekibi 2840 hastada yapmış olduğu bilimsel çalışmada, hastaların %86'sının İzmir, Ankara ve İstanbul; %52'sinin Orta Anadolu Bölgesi, %8'inin ise Ege Bölgesi doğumlu olduklarını göstermişlerdir [17]. Bu çalışmada hastalarda %86 oranında İzmir, İstanbul ve Ankara; %52 oranında Anadolu Bölgesi ve %8 oranında Ege Bölgesi'nde doğmuş olduklarını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada hastaların %85,1'nin İç Anadolu Bölgesi'nden geldiği, Ege Bölgesi'nden ise %1'inin geldiği görülmüştür. Hastalığın daha fazla Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olduğu bilinmektedir ancak; yaptığımız çalışmada İç Anadolu Bölgesi'nden gelen hastaların sayısı daha fazladır, nedeni ise hastanenin İç Anadolu Bölgesi sınırları içerisinde yer almasıdır. Fakat çalışmamız bölge dağılımını belirlemek amacıyla belirlenmiş bir çalışma değildir.

Hastalarda genel olarak endikasyonların belirti verdiği yaş ile beraber belirli bir zaman geçtiği ve bu durumda hastalığın tanısının koyulmasında gecikme olduğu belirtilmiştir [17]. Bu gecikme zamanını; bir çalışma ekibi 2005-2006 yıllarında, ortalamalarının 6,88 yıl, Yalçınkaya ile çalışma arkadaşları 2009-2010 yıllarında ortalama 3 yıl olduğunu belirtmişlerdir [17,25]. Bizim çalışmada, 0-12 ve 13-18 yaş grupları arasında polikliniklerden gelen hasta yüzdesi totalin %33,1 olarak tespit ettik. Klinik korelasyon detayları ele alınırsa bulgular değişecektir. Son zamanlarda test sürelerinin gecikmelerde ki kısa olmasının sebebi; hastalık açısından halkın bilgilendirilmesine ve doktorların hastalıkla alakalı bilgilerini arttırarak iyi bir şekilde hakim olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Test isteme süresindeki uzun aralık, hastalık komplikasyonları açısından çok kritiktir. MEFV geninde bulunan tüm mutasyonlar arasında M680I, M694V, V726A ve E148Q'nun en yaygın mutasyonlar olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca bunlar

arasında ilk üçünün ekson 10'da bulunduğu ve FMF mutasyonu taşıyan kromozomlarda %85 sıklıkla rastlandığı rapor edilmektedir [34].

Bu çalışmada M694V mutasyonu %12,5'lik oran ile en sık görülen mutasyondur. Araştırmalarında, İnal ve çalışma arkadaşları en az bir adet mutant bölge olduğunu belirtmişler ve M694V bölgesinde bulunan mutasyonun karşılaşma değerini %46 olarak belirlemişlerdir [28]. Mutant yüzdelerini; Yalçinkaya ile çalışma ekibi M694V mutasyonu için yaklaşık %52, M680I mutasyonu için yaklaşık %16, V726A mutasyonu için yaklaşık %15, M694I mutasyonu için yaklaşık %3; Topaloğlu ile çalışma ekibi M694V mutasyonu için yaklaşık %51, M680I mutasyonu için yaklaşık %10, V726A mutasyonu için yaklaşık %3, E148Q mutasyonu için yaklaşık %4, M694I mutasyonu için yaklaşık %0,05; Akar ve çalışma ekibi ise M694V mutasyonu için yaklaşık %44, M680I mutasyonu için yaklaşık %12, V726A mutasyonu için yaklaşık %12, M694I mutasyonu için yaklaşık %3 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir [29, 30,31]. Türk AAA çalışma grubunun çalışmasında M694V %51,4, M680I %14,4, V726A %8,6 bulunurken; Canpolat ve arkadaşlarının çalışmasında en sık üç mutasyon M694V %57,8, V726A %10,5, M680I %10,5 oranında gösterilmiştir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da AAA'lı hastalarda M694V mutasyonu en sık görülen mutasyon olup, mutasyon sıklığı %41-70 arasında değişmektedir [17,18,19]. Bu çalışmada, M694V mutasyon oranı Topaloğlu ve arkadaşları ile Türk AAA çalışma grubunun tespit ettiği orandan daha düşüktü [17,30]. Bu çalışmada ise E148Q mutasyon bölgesi %9,0 ile ikinci sırada, M680I mutasyon bölgesi %4 oran ile en sık üçüncü görülen mutasyonlar olarak tespit edildi. K695R Homozigot ise bazı toplumların aksine bu çalışmada tespit edilmedi. Çalışmada homozigotlar %5 oranında tespit edilirken, M694V homozigot bölgesi ise %60 oranında bulunmuştur.

Ülkemizde mutasyon taşıyıcı oranlarının yüksek olduğundan hasta akrabalarında mutlaka tespit edilen mutasyon açısından taranması gerekmektedir. Türkiye, hastalığın prevalansının en yüksek olduğu ülkelerdendir. Türkiye'de AAA prevalansının 1/1000, taşıyıcılık oranının ise %20-25 düzeylerinde olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir [36]. Taşıyıcı olanların, evlenecekleri kişiler ile de MEFV mutasyonu taşıyıcısı olması açısından araştırılması çok önemlidir. Genetik test çalışmalarının bir çoğunun yaşamda

sadece bir kez yapıldığı, ve elde edilen sonuçların diğer yakın olan akrabaları açısından önemliliği unutulmamalıdır.

Bu çalışmada, Türkiye’de en sık görülen 16 mutasyonun sonuçları da sunulmuştur. Bu mutasyonlardan en sık görüleni M694V idi, ki bu bulgu daha önce Türkiye’den yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur [38].

Bu çalışmada, AAA ile ilişkili MEFV gen mutasyonu incelenmek üzere geniş bir hasta grubunda MEFV gen mutasyon sıklıklarını Fragman analizi yöntemiyle bildirdik. Ancak çalışmanın yapıldığı hastanenin, daha çok İç Anadolu Bölgesi’nde yaşayan topluluğa hizmet vermesi nedeniyle bu oranın toplum genelini yansıtmayacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamız literatüre; AAA hastalığında görülen MEFV mutasyonlarının genotipik farklılıklarını açıklayabilmemize olanak sağlayan, mutasyon bölgelerinin belirlenmesinde ve toplum çalışmaların da analitik katkılar sağlayabilecektir. Elde edilen bulgular ayrıca benzer genotiplerin tespit edildiği başka otoinflamatuar hastalıklar değerinden de yönlendirici olabilecek, yeni çalışmalar için destek sağlayabilecektir.

KAYNAKÇA

- [1] Manna R, Cerguaglia C, Curigliano V, et al. Clinical features of familial Mediterranean fever: an Italian overview. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009;13 Suppl 1 (1): 51- 3.
- [2] Grateau G. Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology.* 2004; 43 (4): 410- 5.
- [3] Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, et al. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9 (8): 364-7
- [4] Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1748- 57
- [5] Çobankara,V., Balkarlı, A. 2011.Ailesel Akdeniz Ateşi. *Pamukkale Tıp Dergisi*,:86-98.
- [6] International FMF Consortium: Ancient missense mutations in a new member of the RoRetgene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell.* 1997; 90 : 797- 807.
- [7] The French FMF Consortium: A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet.* 1997; 17: 25-31.
- [8] Osman E, Salim B, İlyas Y, Selvi K, Velat Ş, Common MEFV gene mutations in children with FMF in Diyarbakır, Turkey. *Dicle Tıp Dergisi*, 2009 Cilt: 36, Sayı: 2,
- [9] Etem, Ebru, et al. Familial Mediterranean fever: a retrospective clinical and molecular study in the East of Anatolia region of Turkey. *The open rheumatology journal*, 2010, 4: 1.
- [10] Mahmut A, Cemil K, Ahmet G . Evaluation of the MEFV gene mutations and clinical symptoms in186 patients diagnosed as familial Mediterranean fever, *Dicle Medical Journal*, 2015; 42 : 61-65
- [11] Majeed HA, Rawashdeh M, el-Shanti H, et al. Familial Mediterranean fever in children: The expanded clinical profile. *QJM* 1999;92:309-318.
- [12] Ozen S, Demirkaya E, Amaryan G, et al. Results from a multicentre international registry of familial Mediterranean fever: impact of environment on the expression of a monogenic disease in children. *Ann Rheum Dis* 2014;73:662- 667.
- [13] Bakkalloğlu A. Familial Mediterranean Fever. *Pediatr Nephrol.*2003; 18:853 9.

- [14] Güran Ş, Gök F, Erdem H ve ark. Ailesel Akdeniz ateşi “Familial Mediterranean fever-FMF” düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *Moleküler Tanı Dergisi*. 2003;1:42-4.
- [15] Derya K, Bahtiyar Ş, Abdullah İ, Turkish FMF study Group. Familial Mediterranean Fever, (FMF) in Turkey, Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine*. 2005; 84:1-11.
- [16] Gönül E, Ceylan B, Oya G, Nihal U, M. Metin Y. Evaluating the Frequency of MEFV Gene in a Group of Patients with a Pre-diagnosis of Familial Mediterranean Fever, Original Article, Cilt 65 – Sayı 1 – 2008
- [17] Sahin FI, Yilmaz Z, Yurtcu E, Baskin E. Comparison of the results of PCR-RFLP and reverse hybridization methods used in molecular diagnosis of FMF. *Genet Test* 2008;12:171-4.
- [18] Canpolat U, Dural M, Aytemir K, Akdoğan A, Kaya EB, Şahiner L. Evaluation of various cardiac autonomic indices in patients with familial Mediterranean fever on colchicine treatment. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2012;1(67):70–4.
- [19] Ülgenalp A. DEGETAM’a yönlendirilen hastalardaki MEFV geni mutasyonlarının dağılımı. *DEÜ Tıp Fakültesi Derg* 2009;23(2):53-8.
- [20] Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1447–1453.
- [21] Akar N, Misiroğlu M, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N, Tumer N, Akcakus M, Tastan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mut.* 2000; 15:118-9.
- [22] Kubista M, A Stalberg A, Bar T. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari R, Tan W, eds. *Genomics and Proteomics Technologies*. 1st ed. Proceedings of SPIE; 2001.p.53-8
- [23] Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol*. 2003;18:853-9.
- [24] Cakır N, Pamuk ÖN, Derviş E, İmeryüz N, Uslu H, Benian Ö et al. The prevalences of some rheumatic diseases in western Turkey: Havsa study. *Rheumatol Int* 2012; 32:895–908.
- [25] Yalcinkaya F, Ozen S, Ozcakar ZB, Aktay N, Cakar N, Düzova A, et al. A new of criteria fort he diagnosis of Familial Mediterranean Fever in chilhood. *Rheumatology* 2009;48:395–8.
- [26] Ece A, Çakmak E, Uluca Ü, Kelekçi S, Yolbaş İ, Güneş A, et al. The MEFV mutations and their clinical correlations in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatol Int* 2014;34:207-12.
- [27] Ülgenalp A. DEGETAM’a yönlendirilen hastalardaki MEFV geni mutasyonlarının dağılımı. *DEÜ Tıp Fakültesi Derg* 2009;23(2):53-8.
- [28] İnal A, Yılmaz M, Kendirli S, Altıntas D and Karakoç G. The clinical and genetical features of 124 children with Familial Mediterranean fever: experience of a single tertiary center. *Rheumatol Int* 2009;29:1279-85.

- [29] Yalçinkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, Tümer N, Akar N, Tekin M, et al. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with Familial
- [30] Topaloğlu R, Özaltın F, Yılmaz E. E148Q is a disease causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2005;64:750-2.
- [31] Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçinkaya F, Akar E, Çakar N, Tümer N, et al. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mutation* 2000;15:118-9.
- [32] Güran Ş, Gök F, Erdem H, Erdil A, Yakıcıer C, Dursun A, Orkunoğlu FE, İmirzalıoğlu N. Ailesel Akdeniz Ateşi-“Familial Mediterranean Fever-FMF” düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *Moleküler Tanı Dergisi*. 2003;1:42-4.
- [33] Savacı SS. Elazığ ili ve çevresinde ailevi Akdeniz ateşli (FMF) olgularda MEFV mutasyonlarının incelenmesi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 2003
- [34] Olgun A, Akman S, Kurt I, Tuzun A, Kutluay T. MEFV mutations in familial Mediterranean fever: association of M694V homozygosity with arthritis. *Rheumatol Int*. 2005;25:255-9.
- [35] Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005; 84: 1–11.
- [36] Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, Saatci U, Bakkaloglu A, Ozguc M. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 553–555.
- [37] Yilmaz E, Dinçel N, Sözeri B, Ozdemir K, Bulut IK, Berdeli A, Mir MS. Familial Mediterranean fever in children from the Aegean region of Turkey: gene mutation frequencies and phenotype-genotype correlation. *Turk J Med Sci*. 2015;45: 1198-206.
- [38] Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005; 84: 1–11.

A

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Tarih: 06.09.2023, Karar no: AEŞH-EK1-2023-515







TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Muhammed Hamza M., Mahsun Ö., (2024). “Comparative analysis of heterozygous and homozygous mutations in 16 gene regions of MEFV gene”, Hagia Sophia 7th International Conference On Multidisciplinary Scientific Studies, 3-5 February 2024, Istanbul, 349-351.



