

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

*MCP-1 (A-2518G) VE CCR2 (G190A) POLİMORFİZMLERİNİN VE
MCP-1 GEN EKSPRESYONUNUN FMF KLİNİĞİ/MEFV GEN
MUTASYONLARIYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

Dr. Şenol ÇİTLİ

*TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI*

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

KONYA-2013

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

*MCP-1 (A-2518G) VE CCR2 (G190A) POLİMORFİZMLERİNİN VE
MCP-1 GEN EKSPRESYONUNUN FMF KLİNİĞİ/MEFV GEN
MUTASYONLARIYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

Dr. Şenol ÇİTLİ

*TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI*

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

Bu araştırma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından T-511 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

ÖNSÖZ

ÖZET

SUMMARY

SİMGELER VE KISALTMALAR

1. GİRİŞ

1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF)	1
1.1.1. FMF Tarihçesi ve Epidemiyolojisi	1
1.1.2. Sıklık	2
1.1.3 Klinik	2
1.1.4 Patogenez	6
1.1.5. FMF Genetiği	9
1.1.6. FMF Tanı	11
1.1.7. FMF Tedavi	13
1.2 Kemokinler	14
1.2.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı	15
1.2.2. Kemokin Reseptörleri	17
1.2.3. Kemokin Üretimi ve Etkileri	22
1.2.4. Kemokinler ve İnflamasyon	22
1.2.5. İnflamatuvar Hastalıklarda Kemokinlerin Rolü	23
1.2.6. Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP1 /CCL2)	24
1.2.6.1. MCP-1'in Yapısı	26
1.2.6.2. MCP-1'in Görevleri	26
1.2.6.3. MCP-1'in (A-2518G) Polimorfizmi	27
1.2.7. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2)	29
1.2.7.1. CCR2 G190A Polimorfizmi	31

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmaya Alınan Bireylerin Tanımı	32
2.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	32
2.1.3. Kullanılan Kit ve Kimyasallar	33

2.2. Metod	34
2.2.1. Hastaların Değerlendirilmesi	34
2.2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması	34
2.2.3. DNA İzolasyonu	35
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	35
2.2.5. Sınırlanmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragments Length Polymorphism)	36
2.2.5.1. MCP-1 Geni A-2518G Polimorfizm Analizi	37
2.2.5.2. CCR2 Geni Exon-2 V94I (G190A) Polimorfizm Analizi	39
2.2.6. Kandan Lökosit İzolasyonu	41
2.2.7. Lökositlerden RNA İzolasyonu	42
2.2.8. RNA dan cDNA Sentezi	43
2.2.9. Ekspresyon analizi	43
2.3. İstatistik Analiz	46
3. BULGULAR	
3.1. MEFV Gen Mutasyonları ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	47
3.2. FMF Kliniği ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	50
3.3. FMF’li Hastalarda Ateş ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	52
3.4. FMF’li Hastalarda Karın Ağrısı ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	54
3.5. FMF’li Hastalarda Ağrı Kesiciye Cevap Verme ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	56
3.6. Ekspresyon Analizleri	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
5. KAYNAKLAR	68
6. ÖZET	80
7. SUMMARY	81
8. EKLER	82

UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

Uzmanlık öğrencisinin

Adı Soyadı

: Şenol GİTİ

Uzmanlık Dalı

: Tıbbi Genetik

Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. Nadir KOŞAK

Tezin Adı

: MCP-1 (A-2518G) ve CCR2 (G190A)
Polimorfizmlerinin ve MCP-1 Gen
Ekspresyonunun FMF Kliniği/MEFV
Gen Mutasyonlarıyla İlişkisinin
Araştırılması

Dr. Şenol GİTİ hazırlamış olduğu tezini 03/06/2013

tarihinde aşağıda isimleri yazılı olan jüri huzurunda savunmuştur.

SONUÇ:

TEZ BAŞARILIDIR ☒

TEZ BAŞARILI DEĞİLDİR ☐

Jüri

H.A.S.

Prof. Dr. Hasan ACAR

Jüri

T.Ç.

Prof. Dr. Tülin ÇARA

Jüri

N.K.

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOŞAK

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan ve tez çalışmalarımı sabırla takip eden kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a; beni her türlü konuda maddi ve manevi olarak destekleyen kıymetli fikirlerinden her anlamda istifade ettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Hasan ACAR ve Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya; tezimin kararlaştırılmasında ve sunumunda bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. İlhan SEZGİN'e; ayrıca tez çalışmam süresince yardımlarından dolayı Süleyman NERGİZ'e; laboratuvar çalışmalarında bana destek veren Gökhan BAĞCI ve Binnur KÖKSAL'a; doktora öğrencilerimiz V. Betül UÇAR ve Z. Betül BULUT'a birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve kürsü çalışanlarımıza teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Amiloid protein A
AD	: Alzheimer hastalığı
A>G	: Adenin Guanin baz değişimi
APC	: Antijen Sunan Hücreler
ASC	: Apoptosis-associated speck like protein containing a CARD domain
BAL	: Bronkio alveolar lavaj
BKH	: Beyaz kan hücresi
C	: Kompleman
CCR-2	: CC kemokin reseptör 2
CRP	: C Reaktif Protein
CT	: Cycle treshold
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamino tetra asetik asit
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
FMF	: Ailevi Akdeniz Ateşi
G>A	: Guanin Adenin baz değişimi
GAPDH	: Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
HIV	: Human immün defisiensi virüs
ICE	: IL-1beta konverting enzim
IL	: İnterlökin
IP3	: İnozitol trifosfat
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LARC	: Liver-and activation-regulated chemokine
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
MCP-1	: Monosit Kemotaktik Protein-1
MEFV	: MEiterranean FeVer
MS	: Multiple Skleroz
NF-kB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Natüral killer
PAN	: Poliarteritis Nodosa
PDGF	: Platelet Derivated Growth Faktör
PZR	: Polimeraz Zincir reaksiyonu

RA	: Romatoid Artrit
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	: R estriction F ragments L enght P olymorphism)
RNA	: Ribonükleik asit
RPL	: Ribozomal Protein L
sIL-2R	: Çözünmüş İnterlökin- 2 Reseptör
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozis
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	: Tek Zincir konformasyon Polimorfizmi
TAE	: Tris asetik asit edta
TAM	: Tümör ilişkili makrofaj
TGF-β	: Transforming growth factor-beta
TNF- α	: Tumor necrosis factor- α
TRIM	: TRI partite M otif
UBB	: ubiquitin B
UV	: Ultra viyole
VEGF	: Vasküler Epitelyal Growth Faktör

1. GİRİŞ

1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF)

FMF genetik geçişli, otoinflatuar periyodik ateş ataklarıyla karakterize hastalıkların en yaygın olanıdır (Gretau 2004). Başlıca Ermeni, Yahudi, Türk ve Araplar gibi Doğu Akdeniz çevresinde yaşayan toplumlarda sık görülmektedir. Ateş yüksekliği, seröz zarların ağırlı inflamatuar atakları ve zamanla amiloidozis gelişimi ile karakterize otozomal resesif kalıtmı bir hastalıktır (Erdogan ve Öner 2002, Koşan, 2003, Kastner 2005). Hastaların % 95’inde ateş, şiddetli karın ağrısı ve karında yaygın hassasiyete eşlik etmektedir (Atabek 2007). Hastaların çoğunda ataklar çocuklukta başlamaktadır. Etkilenmiş bireylerin %25-60 kadarında bulgular 10 yaşından önce başlarken 20 yaşına kadar oran % 90’a kadar yükselmektedir (Gettarno ve ark 2008). Türk FMF Çalışma Gurubu’nun 35 merkezde 2838 vakalı çalışmasında Türk popülasyonun’da FMF hastalığının ortalama başlangıç yaşı 9.6 iken ortalama tanı koyma yaşı ise 16.4 olarak tespit edilmiştir (Tunca ve ark 2005). Hastalığın en korkulan etkisi sistemik amiloidozis (hastaların % 11’i) gelişimidir. Sistemik amiloidozis başta böbrek olmak üzere daha az sıklıkla sürrenal bezler, akciğerler, bağırsaklar, karaciğer, dalağı ve testisleri tutmaktadır (Booty ve ark 2009). Amiloid proteini özellikle böbreklerde birikir ve böbrek yetmezliğine götürür. FMF sonucu ölümlerin %99’una amiloidozisin sebep olduğu bildirilmiştir (Şahan ve Cengiz 2005).

1.1.1. FMF Tarihçesi ve Epidemiyolojisi

FMF ilk kez 1908’de Janewey ve Mosenthal tarafından tekrarlayan yüksek ateş, karın ağrısı ve lökositöz bulguları olan 16 yaşındaki bir çocukta paroksizmal bir hastalık olarak bildirilmiştir (Janevay ve Mosenthal 1908). Daha sonra kendisi de bir FMF hastası olan Amerikalı araştırmacı Siegal tarafından 1945 yılında klinik bulgular bir araya getirilerek hastalığın belirtileri tanımlanmış ve “Bening Paroksizmal Peritonit” şeklinde adlandırılmıştır (Siegal 1945). Ülkemizde ise ilk kez 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından garip bir karın ağrısı sendromu şeklinde bildirilmiştir (Marmaralı 1946). 1951 yılında Catton ve Mamou ilk kez hastalığın ailevi olduğuna dikkat çekmişler ve aynı araştırmacılar hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını ortaya koymuşlardır (Örün ve Yalçınkaya 2003). Ailevi Akdeniz Ateşi

tanımını 1961 yılında Heller ve Sohar adlı araştırmacılar ilk kez kullanmışlar ve aynı yazarlar hastalığı ayrıntılı olarak tanımlamışlardır (Heller ve ark 1958).

1.1.2. Sıklık

FMF, Akdeniz çevresinde yaşayan toplumlarda daha sık görülmektedir. Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da daha sık görülmekle beraber Akdeniz çevresindeki diğer ülkelerden de (İspanya, İtalya, Yunanistan) artan sıklıkta hasta bildirilmektedir (La Regina ve ark 2003, Aldea ve ark 2004, Tunca ve ark 2005, Giaglis ve ark 2007). Moleküler tanı imkânlarının artması ile birlikte dünyanın her tarafından bildirilen vakalar artmaktadır (Kastner ve Asebtijevich 2005, Mikula ve ark 2008). Ülkemizde ise FMF çalışma grubunun verilerine göre FMF hastalığı Akdeniz çevresinden ziyade İç Anadolu, Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha sık görülmektedir (Nussbaum ve ark 2001). Hastalığın Türkiye'de ki sıklığı 1/1075 (İç Anadolu bölgesindeki sıklığı 1/395) olarak bulunurken taşıyıcı frekansı ise 1/5 olarak tespit edilmiştir (Önen 2006, Yılmaz ve ark 2001).

1.1.3 Klinik

FMF'li hastaların % 90'ında klinik bulgular 5-15 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. FMF'li hastalarda ilk atak % 80'den fazla vakada 20 yaşından önce başlar (Ben-Chetrit ve Levy 1998a). Çocuklarda FMF başlangıç yaşı ortalama beş olarak bildirilmiştir (Gretau 2004). Literatürde hastalığın erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmesine rağmen ülkemizde kız ve erkek hasta sayılarının birbirine eşit olduğu bildirilmiştir. Hastalık ileri yaşlarda çok nadir görülmektedir (Rozenbaum ve Rosner 1984, Kasapçopur ve Arısoy 2006, Dilşen 2007).

FMF üç ayrı fenotipte görülebilir. FMF fenotip tip 1, tekrarlayan ateş ve seröz zarların inflamatuvar tutulumu ile karakterize ailesel otoinflamatuvar bir hastalık olarak görülür. FMF fenotip tip 2, tekrarlayan inflamasyon ve ateş öyküsü olmadan hastada ilk bulgu olarak amiloidozis ortaya çıkması durumudur. FMF fenotip tip 3 (sub/preklinik FMF) ise klinik olarak hasta olmayan ancak MEFV mutasyonu saptanan bireyleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Blum ve ark 1962, Sohar ve ark 1967, Ben-Chetrit ve Levy 1998a, Boxer 2000, Shinar ve ark 2000). FMF atakları yüksek ateşe neden olabilecek herhangi bir neden olmaksızın gelişen ateş ve bu ateşe eşlik eden karın ağrısı, göğüs ağrısı ve/veya eklem ağrısı/artrit tablosu ile ortaya

çıkabilir. Atakları başlatan neden tam olarak bilinmemekle birlikte ağır egzersiz, yorgunluk, stres, ruhsal travma, uzun süre hareketsizlik, soğuk ve menstruasyonun atakları tetiklediği düşünülmektedir (Barakat ve ark 1986, Yalçinkaya ve ark 2000, Koşan 2003, Sayarlıoğlu ve ark 2005, Kastner ve Asebtijevich 2005, Mikula ve ark 2008).

Ateş: Hastaların ortalama %90'ından fazlasında görülür. Ateş hastalığın tanısı için majör kriter olup 38-40 dereceye kadar çıkabilmektedir. Ateş yüksekliği birkaç saat sürebileceği gibi dört güne kadar da devam edebilir. Ancak genellikle 24 saatte düşmesi beklenir. Kolşisin kullanımı FMF nöbetlerindeki ateşin oluşumunu engelleyebilmektedir (Erdogan ve Öner 2002, Koşan 2003).

Karın Ağrısı: Olguların yarısında genellikle ilk bulgudur. Fakat FMF'li hastaların %95'inde karın ağrısı görülür. Karın ağrısı ile birlikte ateş, batında distansiyon, direk grafide hava sıvı seviyeleri de görülebilmektedir (Kastner ve Asebtijevich 2005, Sayarlıoğlu ve ark 2005, Mikula ve ark 2008).

Artrit/Artralji: Çoğunlukla mono artrit olmak üzere FMF'de %50-75 sıklıkta bildirilmiştir. FMF'de eklem tutulumu kendiliğinden olabileceği gibi travma sonrası da oluşabilmektedir. Egzersizde, artriti tetikleyebilir. Çoğunlukla alt ekstremitenin büyük eklemlerini (diz, ayak bileği vb) tutmaktadır. FMF'de eklemler ataklar arasında normaldir. Bazen FMF'in tek bulgusu şeklinde karşımıza çıkabilir (Barakat ve ark 1986, Ben-Chetrit ve Levy 1998a, Boxer 2000, Yalçinkaya ve ark 2000, Sayarlıoğlu ve ark 2005).

Deri Tutulumu: FMF'in karakteristik deri lezyonu erizipel benzeri eritem şeklindeki deri döküntüsüdür. Vakaların %30-46'sında görülmektedir. Döküntü genellikle 2-3 gün içinde kendiliğinden düzelmektedir (Ben-Chetrit ve Levy 1998a, Boxer 2000, Erdogan ve Öner 2002, Koşan 2003, Dilşen 2007).

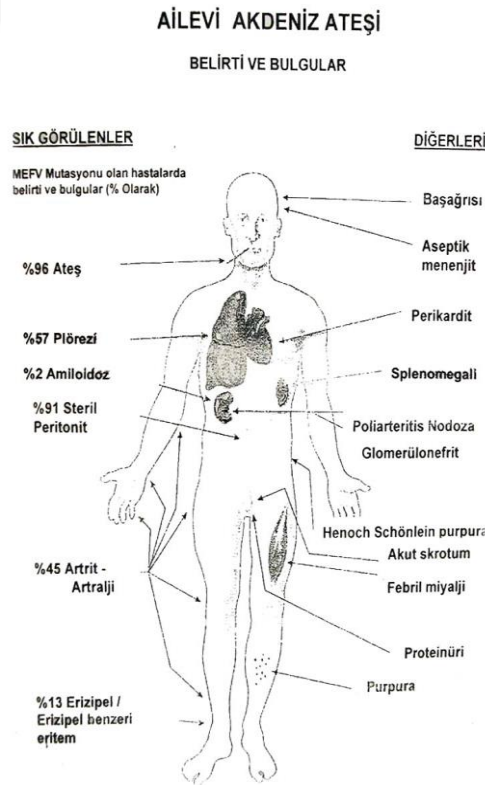
Kas Tutulumu: Yaygın kas ağrıları bazen tek bulgu olabilir. Ağrıların süresi değişkendir. Kısa süreli olabileceği gibi 2-3 hafta kadar da sürebilir. Kas tutulumunda kolşisine iyi yanıt alınmaz. Bu durumda tedavi seçeneği olarak steroidler ve non steroid antiinflamatuvar ilaçlar kullanılabilmektedir (Barakat ve ark 1986, Kastner ve Asebtijevich 2005, Kaplan ve ark 2007). Kas tutulumunda ateş bulunmaz ve hastanın şikâyetlerini destekleyecek muayene ve laboratuvar bulgusu

yoktur. FMF’de kas tutulumu vakaların % 30-40’ında görülebilmektedir (Erdoğan ve Öner 2002, Koşan 2003).

Torasik Tutulum: FMF’li hastalarda plöreziye bağlı oluşan göğüs ağrısı % 25-80 olarak bildirilmektedir. Bazı hastalarda göğüs ağrısına perikardit neden olabilir. FMF’li hastalarda perikardit sıklığı % 5 olarak raporlandırılmıştır (Örün ve Yalçinkaya 2003).

FMF’in otoimmün vaskülitlerle artmış birlikteliği mevcuttur. Özellikle PAN (%1) ve Henoch-schönlein purpurası (%5-7) ile olan birlikteliği toplum ortalamasının üstündedir (Ozdoğan ve ark 1997). Bunun dışında SLE ve Behçet gibi diğer vaskülitlerle ve bazı glomerulonefritlerle birlikte gözükabilir (Özdoğan ve ark 1997, Atagündüz ve ark 2003, Rabinovich ve ark 2007).

FMF’de sık olarak görünmese de birçok atipik tutulum olabilir. Bunlar genelde skrotal inflamasyon, nörolojik tutulum, splenomegali, hepatomegali vb bulgulardır (Örün ve Yalçinkaya 2003).



Şekil 1.1. FMF hastalığında görülen belirti ve bulgular. Akut skrotum dışındaki tüm belirti ve bulguların görülme sıklığı cinsiyet ayrımı yapılmadan hesaplanmıştır.

Amiloidozis: FMF hastalarındaki en önemli ve klinik prognozu belirleyen komplikasyonu AA tipi amiloidozistir. Genellikle 40 yaşından önce ortaya çıkmaktadır. Amiloidozis nedeniyle ölen hastaların %90'ı 40 yaşından önce kaybedilmektedir (Ben-Chetrit ve Levy 1998a, Dilşen 2007). Amiloidozis sıklığı toplumlar arası değişkenlik göstermektedir. Ülkemizde amiloidozis sıklığını % 60 lara kadar yüksek gösteren çalışmalar bulunmasına rağmen bunlar hastaneye başvuranlar içindeki sıklığı olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte toplum sıklığının daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. (Yalçınkaya ve ark 2000, Tuğlular ve ark 2002, Kastner ve Asebtijevich 2005, Cefle ve ark 2005, Yönm ve Bayraktar 2007, Dilşen 2007).

FMF'li hastalarda gelişen amiloidozis için tipik ataklara gerek yoktur. Düzenli kolşisin tedavisinin amiloidozis gelişimini önlediği hatta gerilettiği bildirilmektedir. FMF'de oluşan amiloidozisin, atakların sıklığından, süresinden ve şiddetinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Ailede amiloidozis öyküsünün bulunması ve akraba evliliğinin olması durumunda amiloidozis gelişme riskinin 6 kat arttığı bildirilmiştir. Genetik mutasyon analizlerinde, amiloidozisin en sık homozigot M694V mutasyonunda ortaya çıktığı belirlenmiştir (Padeh 2005, Tunca ve ark 2005, Galeazzi 2006).

Laboratuar Bulguları: FMF'de görülen laboratuar bulgularının hiçbiri FMF'e özgü değildir ve FMF dışında pek çok hastalıkta görülebilmektedir. Bundan dolayı FMF tanısında laboratuar bulgusu olarak zorluklarla karşılaşmaktadır. Non spesifik bulgu olarak en sık kullanılan belirteçler ateşli ataklar boyunca serum amiloid A, fibrinojen ve C reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanlarının artışıdır (Joost ve ark 2001, Korkmaz ve ark 2002). FMF'li hastalarda sIL-2R (çözülmüş interlökin- 2 Reseptör)'ünün düzeyi FMF atağı esnasında atak arası döneme göre daha yüksektir. Dahası ataklar arası periyotta IL-10 düzeyi azalmaktadır. Bu durum ataklar arası periyotta daimi bir subklinik immün aktivasyona yatkınlık oluşturabilir (Musabak ve ark 2004). Proinflamasyon sitokinleri olan IL-17 ve IL-18 düzeyleri de FMF atakları esnasında artış göstermektedir (Haznedaroğlu ve ark 2005). FMF hastalarında interferon gama düzeyleri hasta olmayan kontrol grubuna oranla daha yüksek seyretmektedir. Ayrıca, FMF atakları esnasında anlamlı derecede artmaktadır (Koklu ve ark 2005).

1.1.4 Patogenez

FMF hastalığından sorumlu tutulan MEFV geni doğuştan gelen bağışıklık sisteminin inflamatuvar yollarına katılan 781 aminoasit uzunluğundaki pirin/meranostrin proteinini sentezlemektedir (Gumucio ve ark 2002). MEFV geni başlıca granülositlerde, sitokin tarafından aktive edilen monositlerde, serozal ve sinovyal fibroblastlarda exprese edilir (Centola ve ark 2000). Pirin genellikle nötrfillerde ve monositlerde (makrofaj) sentezlenirken diğer inflamatuvar hücrelerde daha az sentezlenmektedir (Diaz ve ark 2004). Pirin proteini tripartite motif protein (TRIM) ailesinin bir üyesidir (Weinert ve ark 2009). Bu protein ailesi N-terminal RING domaini, ardından bir veya iki adet B-Box domaini, sonra coiled coil domaini ve buna bağlı C-terminal domaini bulundurmaktadır (Nersisyan ve Arakelyan 2012). Bu güne kadar pirin proteinin sadece üç domaini açıklanabilmiştir. Bunlar N-terminalindeki pirin domaini, tip-2 B-Box domaini ve C-terminal ucundaki B30.2 domainidir (Weinert ve ark 2009). Geri kalan pirin kısımları hala aydınlatılamamıştır.

Pirin genellikle sitoplazmada bulunur ve hücre iskeletindeki aktin filamentleri ve mikrotübüllerde bulunduğu yada stoplazmada homojen olarak dağıldığı bildirilmiştir. Hücre iskeletinde bulunan pirin hücrenin yapısını, büyüklüğünü ve hareketini şekillendirirken, sitoplazmada bulunan pirin ise inflamatuvar yanıtın oluşmasında rol almaktadır (Nersisyan ve Arakelyan 2012). FMF'in moleküler genetik temeline yönelik ilerlemeler olmuşsa da hastalığın patogenezinde hala aydınlatılamamış birçok nokta bulunmaktadır. Hastalığın patogenezinde mutasyona uğramış olan MEFV gen ürünü olan pirin/meranostrin fonksiyonunun bozulması, C5a inhibitör proteininin yetersizliği, inflamasyon, fiziksel ve emosyonel stres gibi birçok faktör suçlanmıştır.

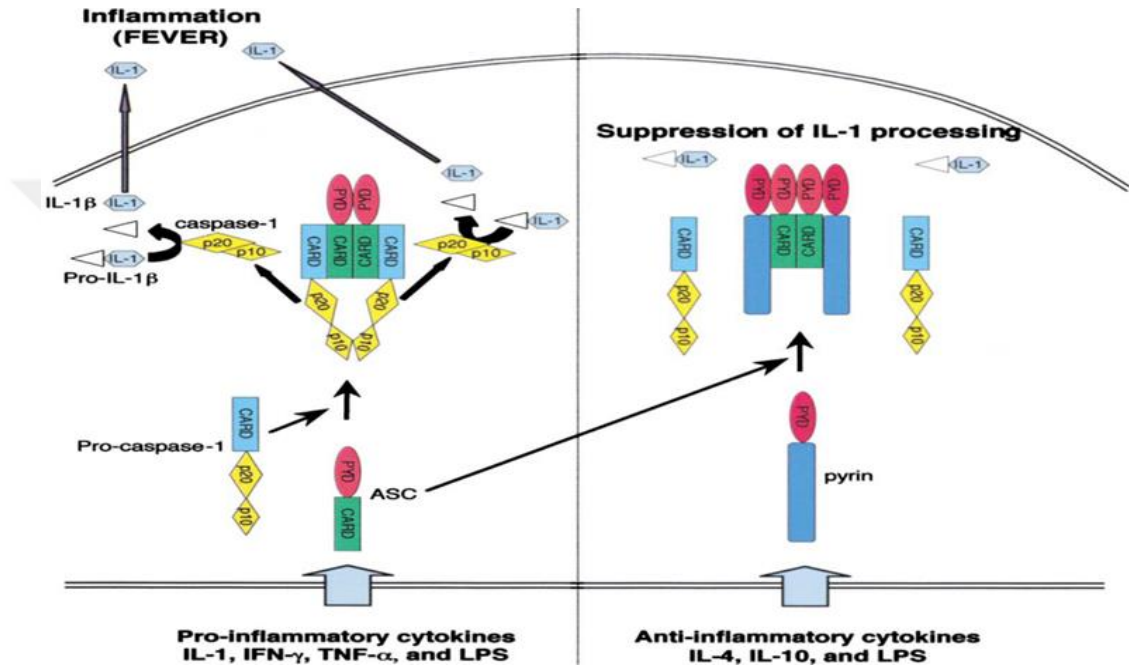
FMF'den sorumlu tutulan MEFV geninin kodladığı gen ürünü olan pirin/meranostrin proteini normal şartlarda inflamasyonu kontrol altında tutmaktadır. FMF patogenezinde kabul görmüş en yaygın görüş pirin/meranostrin'in lökosit aracılıklı inflamatuvar süreci kontrol altına alıp inflamasyonu baskılamasında yetersizlik olmasıdır. Mutasyona uğramış MEFV geninin ürünü olan protein inflamatuvar süreçteki kontrol görevini yapamamakta ve indüklenmiş olan inflamatuvar süreç baskılanamamaktadır. Bunun sonucu olarakta FMF'deki tipik bulgular olan

ateş ile birlikte seröz zarlarda inflamasyon atakları şeklindeki klinik tablo karşımıza çıkmaktadır (Ben-Chetrit ve Levy 1998a, Boxer 2000, Kastner ve Asebtijevich 2005). Yani, pirinin lökosit aracılıklı inflamasyonu yine lökosit düzeyinde baskılamasında aksaklık olmaktadır.

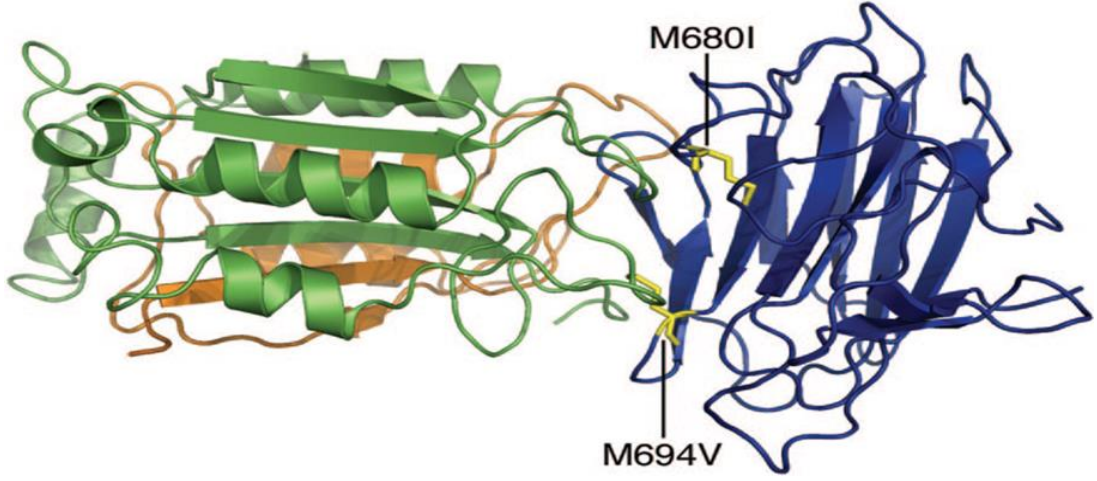
FMF’de en dikkat çekici özellik seröz zarlara lökosit göçüdür. Normal özelliklerdeki pirin proteini, çeşitli uyarıcı etkenle seröz zarlarda hasar oluştuğunda, inflamasyona neden olan inflamatuvar araçların (IL-8, Cox-2 vb) salınımını, mikrotübül aktivasyonunu ve adezyon molekül ekspresyonunu inhibe ederken, inflamasyonu baskılayıcı araçların (C5a inhibitör, lipokortin-1) salınımını artırarak lökosit göçünü kontrol eder ve inflamasyonun subklinik kalmasını sağlar (Erdoğan ve Öner 2002). FMF’deki ataklar sırasında serözal bölgelere toplanan lökositlerden kemotaktik faktörler salınmakta ve bunun etkisiyle inflamatuvar alana daha fazla lökosit çekilmekte ve neticede inflamatuvar atağın şiddeti artmaktadır (Bareli ve ark 1981). FMF’li hastalarla ilgili yapılan lökosit fonksiyon çalışmalarında FMF’li hastaların FMF’li olmayan kontrol grubuna göre morfoloji, kemotaksis, fagositoz ve mikrotübüler fonksiyon açısından bazı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Bar-Eli ve ark 1982, Daniel 1997). Ayrıca Pirin kaspaz-1’in proteolitik aktivitesini inhibe ederek IL-1beta parçalanmasını düzenlemektedir. Bunun için pirin ASC (apoptosis-associated speck like protein containing a CARD domain) proteinine bağlanmak için kaspaz-1 ile yarışmaktadır (Chae ve ark 2003). ASC kaspaz aktivasyonunu sağlamaktadır. N-terminalinde PYD ve C-terminalinde CARD domaini bulundurmaktadır (Srinivasula ve ark 2002 Stehlik ve ark 2003). ASC inflamazom diye adlandırılan kompleks bir yapıyı bir araya getirir. Oluşan bu makro moleküler kompleks proinflamatuvar sitokinlerin varlığında pro-kaspaz-1’i (ICE, IL-1beta konverting enzim) aktive etmektedir. Kaspaz-1, IL-1beta’nın 31 kDa’luk kısmını parçalayarak inflamasyon ve ateş nedeni olan 17 kDa’luk aktif IL-1beta formunu oluşturmaktadır. Bu metabolik yolda pirinin görevi proinflamatuvar sitokinlerin uyarısıyla ASC’ye bağlanarak pro-kaspaz-1’in aktif hale geçmesini önlemek ve bunun sonucunda oluşacak olan IL-1beta salınımını engellemektir. Mutasyona uğramış pirin proteini ASC’ye bağlanamayacağından inflamatuvar süreci engelleyemez (Chae ve ark 2003).

2006 yılında Chae ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada pirinin B30.2 alt birimiyle kaspaz-1’e doğrudan bağlanarak kaspaz-1’i inaktive ettiği ortaya

konmuştur (Chae ve ark 2006). Gerek bu çalışmada gerekse 2006 yılında Goulielmos ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada B30.2 alt biriminin üç boyutlu yapısı gösterilmiş ve FMF hastalığında ciddi klinik tablo oluşturan mutasyonların (M680I, M694V vb) bu alt birimin kaspaz-1 ile ilişkili bölgesinde olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda fenotip-genotip arasındaki korelasyona moleküler bir boyut kazandırılmıştır.



Şekil 1.2. ASC aracılıklı kaspaz-1 oligomerizasyonunda pirinin rolü. Sol taraf: ön yangı sitokinleri ve LPS ASC'yi uyarır, ASC CARD etkileşimleri tarafından pro-kaspaz-1'e bağlanarak oligomerizasyonunu ve otakatalizi başlatır. Aktif P10/p20 alt üniteleri Pro-IL-1β' yı olgun IL-1β' ya çevirerek ateş ve inflamasyonu başlatır. Sağ taraf: yangı önleyici sitokinler pirini indükler, pirin homotipik pirin alt üniteleri etkileşimi ile ASC' ye bağlanır ve kaspaz-1 ile olan etkileşimleri bloke olur (Chae ve Ark 2003)



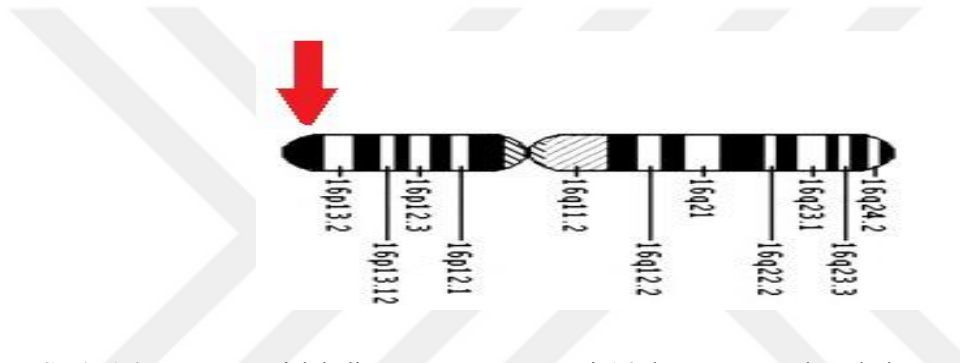
Şekil 1.3. Pirin ve kaspazın etkileşim modeli. M694V ve M680I bağlanma yüzeylerinde bulunmaktadır (Chae ve Ark 2006).

1.1.5. FMF Genetiği

FMF hastalığı klasik olarak otozomal resesif kalıtım paterni göstermektedir (Shohat ve ark 1992). Ülkemizde FMF Çalışma Grubunun verilerine göre; FMF'in ortalama hastalık prevalansının 1/1075, taşıyıcılık oranının ise 1/5 olarak bildirilmiştir (Nussbaum ve ark 2001). Bu verilere göre; hasta sıklığının Hardy-Weinberg eşitliğine göre beklenen oran %13-16 olması gerekirken daha düşük bulunmuştur. Bu durum hastalığın tipik klinik bulgularının ortaya çıkmasında çevresel faktörler ve/veya birden fazla genin etkileşiminin olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, FMF'de klinik tablo yakın akraba dahi olsalar her vakada farklılık göstermektedir. Bu durum otozomal resesif olarak kalıtılmasına rağmen eksik ekspressitivite olarak değerlendirilmesine yol açacak bir sonuç doğurmaktadır. Fakat otozomal dominant kalıtılan hastalıklarda rastlanan eksik ekspressitivite kavramı otozomal ressesif olarak kalıtılan bu hastalıkta gözlenen bu durumu açıklamak için uygun olmayacağından epigenetik mekanizmaları düşünmek doğru olacaktır. (Nussbaum ve ark 2001). 2007 yılında 192 FMF'li hastada yapılan bir çalışmada MEFV lokusu dışında başka gen/genlerdeki mutasyonların fenotipi etkileyebileceğini ileri sürmüşler ve bağlantı analiziyle araştırılmasını önermişlerdir (Yosunkaya 2007).

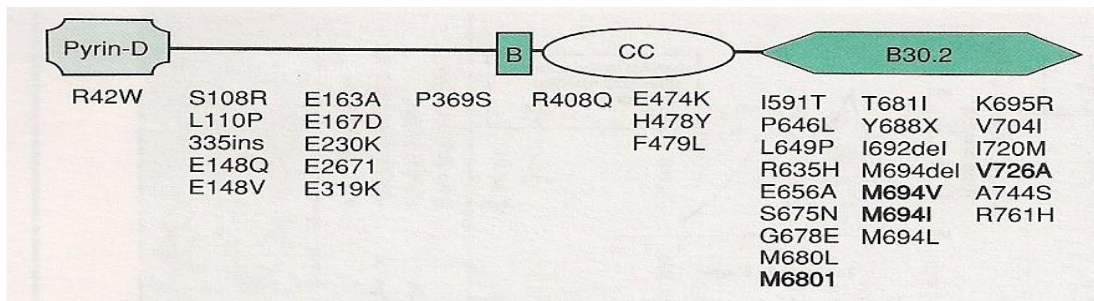
İlk olarak 1992 yılında Pras ve arkadaşlarının yaptıkları pozisyonel klonlama çalışmalarıyla FMF'den sorumlu tutulan genin (MEFV) tüm etnik gruplarda 16. kromozomun kısa kolunda olduğu gösterilmiştir. Daha sonra 1997 yılında gerek

uluslararası FMF konsorsiyumu ve eş zamanlı olarak da Fransız FMF konsorsiyumu MEFV (**ME**diterranean **Fe**Ver) geni olarak adlandırılan bu genin tam lokalizasyonunu 16p13.3 olarak bildirmişlerdir (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997). Daha sonraki çalışmalarda bu genin 14.78 kb uzunluğunda olup 10 ekzondan oluştuğu ve transkripsiyon ürününün 3.7 kb olduğu belirlenmiştir (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997, McDermott ve Aksentijevich 2002, OMIM). Bu proteini uluslararası FMF konsorsiyumu ateş anlamına gelen “pyrin” olarak adlandırırken eş zamanlı olarak Fransız FMF konsorsiyumu latince bizim akdeniz anlamında “marenostin” olarak adlandırmışlardır (Boxer 2000, Ben-Chetrit ve Levy 1998a, OMIM).



Şekil 1.4. MEFV geni lokalizasyonu. MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunun 13.3 bölgesinde, 3.232.028-3.246.627 baz çiftleri arasında lokalize olmuştur (Haddad 2009).

Pirin proteini dört farklı domain içerir; N-terminal ucunda yaklaşık 92 aminoasitlik PYD/pirin domaini, C-terminalinde B30.2/rfp/SPYD domaini, PYD ve B30.2 rfp/SPYD domainleri arasında sıkışmış B-box ve CC (coiled-coil/sarmallanmış sarmal) segmentleridir. Patojenik MEFV gen mutasyonlarının çoğu genin karboksi terminal ucunda bulunmaktadır (Simon ve ark 2006, Infevers 2011).



Şekil 1.5. Pirin (marenostin) proteininin şematik gösterimi. Siyah harflerle belirtilenler FMF’de bulunan yaygın yanlış anlamlı mutasyonlardır (Simon ve ark 2006).

Tüm FMF hastalarının altı yaygın mutasyonu, toplumda rastlanan mutasyonların % 99'unu oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar M694V (incelenen popülasyona bağlı olarak vakaların % 20-65'inde bulunur), V726A (% 7-35'inde), M680I, M694L V694I ve E148Q'dur. Bu mutasyonların sıklığı toplumlar arasında farklılıklar göstermesine rağmen sık rastlanan mutasyonların bu toplumlarda da sıklık açısından önde geldikleri görülmektedir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Çeşitli etnik gruplarda en sık izlenen mutasyonlar (Ben-Chetrit ve Touitou 2009).

Kuzey Afrika Yahudileri	M694V, E148Q
Irak Yahudileri	V726A, M694V, E148Q, M680I
Ashkenazi Yahudileri	E148Q, V726A
Araplar	V726A, M680I, M694V, M694I, E148Q
Türkler	M694V, M680I, V726A, E148Q
Ermeniler	M694V, M680I, V726A, E148Q
Japonlar	M694I, [L110P;E148Q], R761H, E84

1.1.6. FMF Tanı

FMF tanısında karakteristik klinik özellikler, aile öyküsü, kolşisine cevap ve moleküler tarama temel teşkil eder. Atak sırasında sedimantasyon, C-reaktif protein, fibrinojen, heptaglobülin, C3, C4 gibi akut faz reaktanlarının artışı da klinik tablo ile birlikte FMF tanısı koymaya yardımcı unsurlardır (Önen 2006).

FMF'in tanısında değişik kriterler geliştirilmiş olup en sık olarak Tell-Hashomer kriterleri kullanılmaktadır. Tell-Hashomer tanı kriterleri majör kriterler ve minör kriterler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır:

Tell-Hashomer majör FMF kriterleri;

- 1- Peritonit, sinovit veya pleurit ile beraber tekrarlayan febril ataklar,
- 2- Predispoze hastalık olmadan amiloidoz tip AA,
- 3- Kolşisin tedavisine iyi cevap,

Tell-Hashomer minör FMF kriterleri;

- 1- Tekrarlayan ateş atakları
- 2- Erizipel şeklinde eritem
- 3- Birinci derece akrabalarda FMF öyküsü

Hastada iki majör veya bir majör ve iki minör kriterin mevcut olması durumunda kesin tanı, bir majör ve bir minör kriterin bulunmasında ise şüpheli tanı konulur (Erdoğan ve Öner 2002). Genetik tanı özellikle klinik tanının şüpheli olduğu durumlarda önemlidir. Aile taramalarında asemptomatik bireylerde mutasyon saptanması düşük penetrasyonlu bir mutasyona veya preklitik safhada olan bir hastanın erken saptanmasına bağlı olabilir. FMF tanısı daha çok klinik belirtilere dayalı olarak koyulsa bile taşıyıcılık oranının yüksekliği nedeniyle hasta yakınlarının mutlaka FMF mutasyonları açısından taranması gerekmektedir. FMF hasta ve taşıyıcılarının evlenecekleri kişilerin de FMF mutasyonları açısından taranması önem taşımaktadır. Test sonuçlarına göre genetik danışma alınması preimplantasyon genetik tanı yada prenatal tanı yoluyla bebek sahibi olunması önerilmektedir. Bazı araştırmacılar klinik herhangi bir belirti olmasada kötü prognozu gösteren M694V mutasyonuna sahip hastaların tedavi edilmesini önerirler (Erdoğan ve Öner 2002).

Çizelge 1.2. Ailesel Akdeniz Ateşinde genetik tanıya yaklaşım (Erdoğan ve Öner 2002)

Klinik Tanı	Genetik Analiz Sonucu	Son Tanı	Tedavi Kararı
Kesin FMF	Homozigot mutasyon Heterozigot mutasyon Mutasyon yok	Kesin FMF	Kolşisin
Şüpheli FMF	Homozigot mutasyon Heterozigot mutasyon Mutasyon yok	Kesin FMF Şüpheli FMF	Kolşisin Takip ve terapötik çalışma
FMF(yok)	Homozigot mutasyon Heterozigot mutasyon Mutasyon yok	Preklitik veya düşük penetrans Taşıyıcı FMF (yok)	Klinik izlem ve proteinüri takibi Takip ve tedavi

FMF' in genetik tanısında tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), revers-hibridizasyon esasına dayalı testler (Strip testler), Real time PZR mutasyon analizi veya doğrudan DNA dizi analizi gibi yöntemlerden herhangi biri kullanılabilir.

1.1.7. FMF Tedavi

FMF hastalarının tedavisi için kolşisin kullanımı ilk kez 1972 yılında Goldfinger tarafından ileri sürülmüştür. Daha sonra Özkan ve arkadaşları da FMF'nın tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kolşisin tedavisini bildirmişlerdir (Erdoğan ve Öner 2002). 1986 yılında da Zemer ve ark. kolşisin tedavisinin amiloidoza karşı etkili olduğunu göstermişlerdir.

Kolşisinin dozu hastaların cevabına göre, günde 1-2mg olarak ayarlanır. Böbrekte amiloidozis gelişen hastalarda kolşisin 2mg/gün olarak kullanılmalıdır. Düzenli kolşisin tedavisine rağmen FMF atakları sebat ediyorsa kolşisin dozu günlük 2,5-3,0 mg'a kadar çıkarılmalı ve hasta takip edilmelidir. FMF'li çocuklarda kolşisin dozu vücut ağırlığına veya vücut yüzey alanına göre ayarlanır. 1-2 yaşındaki çocuklarda minimal doz günlük 0,25mg'dır. 6-7 yaşındaki çocuklar 1mg/gün'lük tam dozla tedavi edilebilirler (Önen 2006).

Kolşisin yüksek konsantrasyonda bulunduğu lökosit mikrotübüllerini stabil ederek yeni mikrotübül polimerizasyonunu, hücre içi taşınımı, mitozu, yangı aracı salınımı ve kemotaksisi önler. Ayrıca membran üzerindeki adezyon moleküllerinin (endotel hücrelerinde E-selektin, nötrofillerde L-selektin) ifadesini azaltarak lökositlerin hedef serozal dokulara bağlanmasını engeller (Erdoğan ve Önen 2002, Rigante ve Ark 2006). FMF'de sıkıntı oluşturan serozal dokularda kolşisinle indüklenerek MEFV ekspresyonu artırılabilir (Abedat ve Ark 2002).

Kolşisinin en sık görülen yan etkileri gastrointestinal sistemde olur. Motilitenin artmasına bağlı olarak bulantı-kusma, karın ağrısı ve ishal görülebilir. Doza bağlı olan bu yan etkiler, genellikle dozun azaltılmasına iyi yanıt verir. Ancak kolşisin giderek artan dozlarda verilecek olursa pek çok hasta tarafından iyi bir şekilde tolere edilebilmektedir. Daha nadiren miyopati, periferik nöropati, alopesi, kemik iliği baskılanması, oligospermi, azospermi görülebilir. Laktoz intoleransı normal popülasyona göre üç kat daha sık gözlenmektedir. Laktozsuz diyet ve

simetikon ile düzelir. Çok yüksek dozlarda (6-8 mg/gün üzerinde) gastrointestinal kanama, deri döküntüsü, karaciğer ve böbrek yetersizliği, metabolik asidoz, hipokalsemi, konvülsiyon ve koma görülebilir (Ben-Chetrit ve Levy 1998b)

Kolşisin FMF hastalarının %5-10'unda atakları kontrol altına alamamaktadır. Seyahi ve ark. (2006) kolşisin tedavisine yanıt vermeyen dört hastaya günlük 100 mg talidomid ve 25 mg etanercept tedavisi uygulamış ve abdominal atakların azaldığını göstermişlerdir. Fakat talidomidin teratojenite ve periferik nöropati gibi toksik etkileri kullanımını sınırlamaktadır (Seyahi ve ark 2006). Sayarlioglu ve ark. (2006) kolşisin tedavisine dirençli üç FMF hastasına günlük olarak 100 mg azatiyopirin tedavisi uygulamış ve FMF ataklarında tam iyileşme gözlemlemişlerdir (Sayarlioglu ve ark 2006). Calguneri ve ark. (2004) kolşisin tedavisine ek olarak IFN- α tedavisinin kolşisine dirençli hastalarda iyileşmeye yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir (Calguneri ve ark 2004). Amiloidoza bağlı son dönem renal yetmezliklerde böbrek nakli iyi bir tedavi şekli olabilmektedir. Transplantasyonun uzun dönemli sonuçları genel transplant popülasyonundakilere benzer olmaktadır ve kolşisin tedavisi almayan hastalarda amiloidoz tekrar oluşabilmektedir (Önen 2006).

1.2 Kemokinler

Enfeksiyon hastalıklarında ve non enfeksiyöz inflamatuvar hastalıklarda lökositlerin dokulara göçü kritik bir basamağı oluşturmaktadır. Bu süreç kemotaktik sitokinler olarak adlandırılan kemokinler tarafından kontrol edilmektedir (Çağlar ve Kansu 2004, Murdoch ve Finn 2000). 1992 yılında enfeksiyon hastalıkları, non enfeksiyöz inflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis ve organogeneziste rol alan, lökositlere kemotaksis yaptıran bir grup sitokine kemotaktik sitokinlerden esinlenerek “Kemokin” adı verilmiştir (Lindley ve ark 1993). Kemokinler lökosit migrasyonunda görev almakla beraber buna ek olarak angiogenez ve lökosit degranülasyonunda aktif rol oynamaktadırlar (Çağlar ve Kansu 2004, Murdoch ve Finn 2000). Kemokinlerin T ve B lenfosit hücre maturasyonu, immün sistem, inflamatuvar hastalıklar, mukozal immünite, HIV enfeksiyonları başta olmak üzere birçok önemli olayda kritik rolleri bulunmaktadır (Luster 1998).

Yaklaşık 50 civarında kemokin bildirilmiş olup, inflamatuvar olaylar esnasında pekçok hücre tarafından sentezlenmekte ve kritik işlevleri bulunmaktadır (Ward ve Westwick 1998). İnflamasyon, doku hasarı, enfeksiyon, kardiyovasküler hastalıklar,

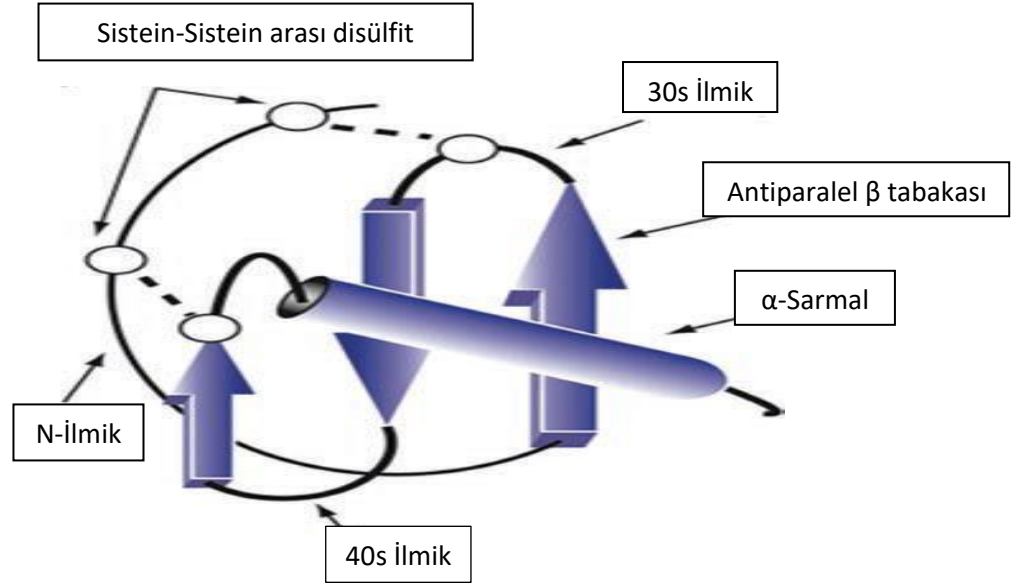
allerji, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol oynamaktadırlar (Lindley ve ark 1993). Kemokin sentezindeki çeşitlilik, kemokin tiplerinin ve sayılarının çokluğu, ayrıca birbirinden farklı birden fazla reseptör üzerinden etki göstermeleri nedeniyle bunların tanımlanması ve açıklanması zor olmaktadır (Lindley ve ark 1993).

Şu ana kadar belirlenen in vitro etkilerinden bazıları:

Kemotaksis, intraselüler depolardan enzim salınımı, oksijen radikal oluşumu, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile oluşan şekil değişikliği, lipid mediatörlerinin oluşumu, endotel veya ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmanın sağlanması, adezyon molekülleriyle koordineli etkileşimi ile lökositlerinin intaselüler alandan ekstraselüler bölgeye geçiş trafiğinin düzenlenmesi, anjiogenez ve sinir hücrelerinin kontrolü olarak sayılabilir (Ward ve Westwick 1998).

1.2.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı

Kemokinler 6-14 kDa moleküler ağırlığa sahip olan, aminoasit dizilimlerinde % 20-70 oranında benzerlik gösteren küçük proteinlerdir (Ward ve Westwick 1998, Navratilova 2006). Bilinen kemokinlerin tümü üç beta (β) tabakası (β 1- 3) ve C- terminal α heliks yapısı açısından benzerlik gösterirler (şekil 1a). Kemokinler N- terminaldeki sistein amino asitlerinin pozisyonlarına ve genetik yapılarına göre CXC, CC, C ve CX3C olmak üzere dört ana guruba ayrılırlar (Çizelge 1) (Bacon ve ark 2002). Kemokinler genellikle dört ana grup olarak sınıflandırılırlar dahi bunlardan iki tanesi çok iyi tanımlanmıştır (Oppenheim ve ark 1991, Baggiolini ve Loetscher 2000). Bunlardan ilki olan α kemokin ailesinin (CXC kemokin ailesi olarak da adlandırılmaktadır) N-terminaline yakın iki sistein aminoasidi arasına farklı bir aminoasit girmiştir. Bu kemokin ailesi genelde 14. kromozomun q12-21 lokusu üzerindedir. Bu grupta sadece SDF- 1 α (Stromal cell derived factor) 10. kromozom üzerinde lokalizedir. α kemokinler nötrofillere etki ederken; lenfositlere karşı etki göstermezler (Oppenheim ve ark 1991, Rollins 1997, Baggiolini ve Loetscher 2000).



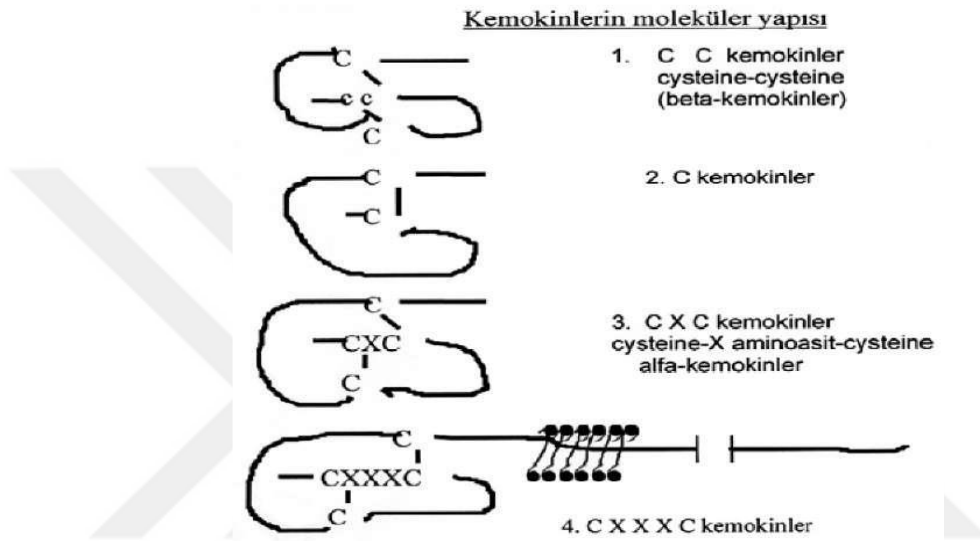
Şekil 1.6. Kemokinlerin üç boyutlu yapısının şematik görünümü

Kemokinlerden iyi tanımlanmış ikincisi olan β kemokin ailesi (CC kemokinler) α kemokin ailesinden farklı olarak N terminaline yakın iki sisteini ayıran aminoasit yoktur. β Kemokin ailesinin geni 17q 11.2-12'dedir. Bu aileden sadece MIP-3 β (Macrophage inflammatory protein) 9. Kromozom üzerinde, (MIP-3 α /LARC (MIP-3 α /liver-and activation-regulated chemokine)'da 2. kromozom üzerinde lokalizedir (Oppenheim ve ark 1991, Rollins 1997, Baggiolini ve Loetscher 2000). CC kemokinler ise genellikle nötrofillere karşı etki göstermezken, monosit, eozinofil, bazofil ve lenfositlere değişik derecelerde etki ederler (Rollins 1997, Baggiolini ve Loetscher 2000).

C kemokin olarak adlandırılan Lenfotaktin tek sistein içerir ve kromozom 1q23 üzerinde lokalizedir. CX3C kemokin ise Fraktalkin olarak adlandırılmaktadır ve bu kemokini kodlayan gen 16. kromozom üzerinde lokalizedir (Şekil 1) (Rollins 1997, Baggiolini ve Loetscher 2000).

Alfa (α) kemokinler, N-terminal uç bölgelerinde glutamik asit-lösin-arginin (Glu-Leu-Arg) sekansı gösterenler (ELR kemokinler) ve ilgili sekansı göstermeyenler (non-ELR kemokinler) olarak 2 alt gruba ayrılırlar (Luster ve ark 1985, Clark-Lewis ve ark 1993). Alfa-kemokinler CXC dizilerinde nötrofiller için kemotaktik özelliğe sahip olan glutamik asit-lösin-arjinin aminoasit dizilerini taşımaktadırlar. Buna karşılık, β -kemokinler CC dizilerinde lenfositler üzerinde rol oynayacak aminoasit dizileri taşımamaktadırlar (Luster ve ark 1985, Van Damme ve ark 1992).

Bu yapısal farklılıklar, kemokinlerin belirli lökosit alt gruplarına etki kabiliyetleri açısından önem kazanmaktadır. Bu yüzden, prototipini IL-8'in oluşturduğu CXC kemokinleri, hakim olarak nötrofiller üzerine etki etmekte; prototipini monosit kemotaktik protein-1'in (MCP-1) oluşturduğu CC kemokinleri, monositler, lenfositler, mast hücreleri ve eozinofiller üzerine etki etmektedir (Kelner ve ark 1994).



Şekil 1.7. Kemokinlerin Moleküler Yapılarına Göre Sınıflandırılmaları (Van Damme ve ark 1992).

1.2.2. Kemokin Reseptörleri

Kemokinlerin aracılık ettikleri hücre göçü ve aktivasyonu için bu kemokinlerin hücre üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanmaları gerekir. Reseptörlerin hücre lokalizasyonları değişkenlik göstermektedir. Kemokin reseptörlerinden bazıları tek bir hücrede bulunurken (CXCR1 sıklıkla nötrofilde); bazıları birden fazla hücrede bulunabilirler (CCR2 monosit, T lenfosit, NK hücre, dendritik hücre ve bazofilde). CCR1 ve CCR2 daha çok monositlerde bulunurken; IL-2 uyarımından sonra lenfositlerde de bulunabilir (Luster ve ark 1985, Clark-Lewis ve ark 1993, Luster 1998).

Kemokin reseptörlerinin hepsi hücre membranı bağımlı moleküllerdir. Kemokin reseptörlerinin yapılarında 7-transmembran domain yapıları bulunmaktadır (Şekil 2). Bu reseptörler G-proteinleri ile çiftler oluşturmaktadırlar. Kemokin

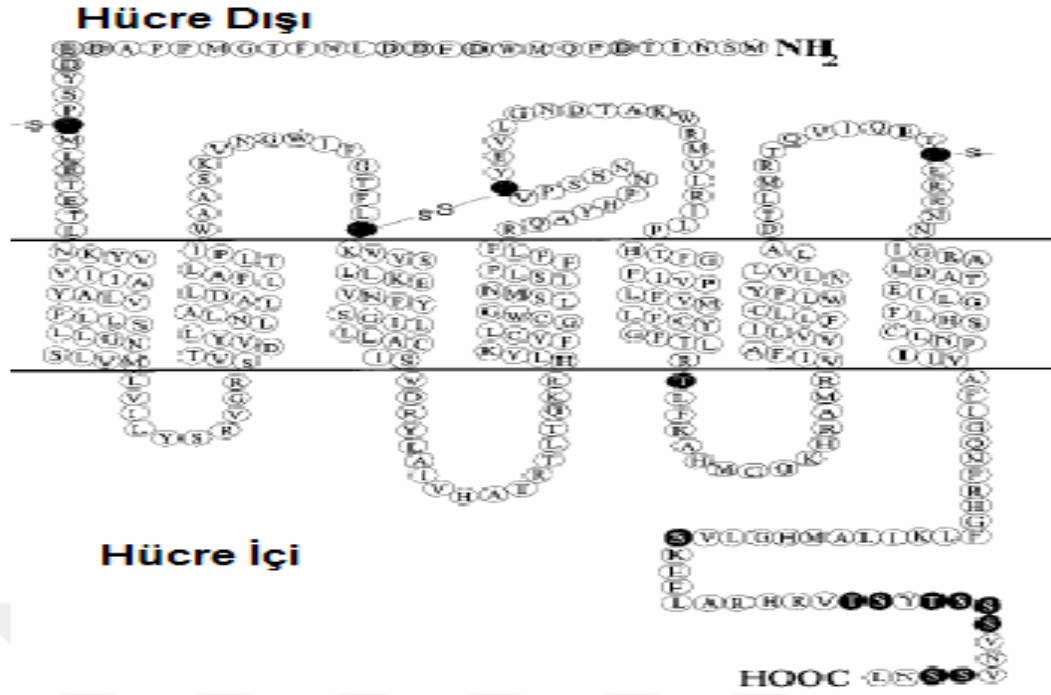
reseptörleri, “G-protein-coupled protein” yapısındadır ve lökositler üzerinde eksprese olmaktadır (Canet-Aviles ve ark 2004).

Kemokin reseptörlerinin birçoğuna birden fazla kemokin bağlanmaktadır ama her zaman aynı grup reseptörler ve kemokinler birbirine bağlanır. Yani CC kemokin reseptörlerine sadece CC kemokinleri, CXC kemokin reseptörlerine de CXC kemokinleri bağlanmaktadır. Bu reseptör-ligand bağlanma kısıtlılığı/özgüllüğü muhtemelen primer, sekonder ve tersiyer yapıları benzer ancak kuaterner yapıları birbirinden farklı olan CC ve CXC kemokinlerin yapısal farklılığından kaynaklanmaktadır (Laudanna ve ark 1996, Horuk ve ark 1993).

Kemokinler, hedef hücreler üzerindeki spesifik G-protein-coupled hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyali başlatırlar, devamında da hücre göçü ve aktivasyonunun indüklenmesine yol açarlar. Bu güne kadar yakalşık 20 tane kemokin reseptörü tanımlanmıştır (Canet-Aviles ve ark 2004).

Kemokin reseptörlerinin uyarımı inozitol trifosfat (IP3) oluşumuna neden olarak, hücre içi kalsiyum artışına ve protein kinaz C aktivasyonuna yol açar. Bu sinyal en sonunda hücrenin aktivasyonunu sağlar (Luster 1998). Kemokin reseptör sinyali ayrıca Ras ve Rho moleküllerinin guanozin trifosfat bağlayan küçük proteinlerini de aktive eder (Laudanna ve ark 1996). Bunlardan Rho proteinleri hücre membranı üzerine etki yaparak hücre membranında katlanma ile yalancı ayak oluşumuna ve lokal adezyon moleküllerinin kompleks şeklinde toplanması gibi aktin bağımlı süreçlerin düzenlenmesiyle hücre motilitesini sağlarlar (Luster ve ark 1985).

Kemokinler ayrıca iki tane sinyal üretmeyen moleküle de bağlanırlar. Bunlardan birincisi, eritrosit kemokin reseptörü olarak da bilinen DARC (Duffy Antigen reseptör for chemokin)'dir. Bu reseptör, eritrosit ve endotelial hücrelerde bulunmaktadır (Tanaka ve ark 1993). Bu kemokin reseptörünün görevi CC ve CXC kemokinleri bağlayıp, dolaşımdan uzaklaştırmak olduğu tahmin edilmektedir (Proost ve ark 1996). İkinci molekül ise heparan sülfat proteoglikan grubudur. Heparan sülfat proteoglikanlar ekstrasellüler matrikste ve endotelial hücre yüzeyinde kemokinleri bağlar ve lokal bir yoğunluk farkı oluşturarak kemokin salımına yol açar (Wenzel ve Stahl 1999).



Şekil 1.8. Kemokin reseptörlerinin hücre zarındaki temel yapısı (Menzies ve ark 2005)

Nöronlar, astrositler, epitelyal hücreler gibi birçok hücrede de birçok kemokin reseptörü tespit edilmiştir. Bu ise kemokinlerin diğer sistemler üzerinde de etkili olduğu ve kemokinlerin lökosit göçü dışında daha birçok açıklanamayan fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir (Meulener ve ark 2005).

Çizelge 1.3. Kemokin reseptörleri ve onların ligandları (Bacon ve ark 2002).

Kemokin Ailesi	Sistematik İsimlendirme	Alternatif İsimlendirme	Kemokin Reseptörü	Kromozom lokalizasyonu
C kemokin (γ kemokin)	XCL1	Lenfotaktin α, ATAC, SCM-1α	XCR1	1q24.2
	XCL2	SCM-1β	XCR2	1q24.2
CC kemokin (β kemokin)	CCL1	I-309	CCR8	17q11.2
	MCP-1	MCP-1, MCAF, TDCF	CCR2	17q11.2
	CCL3	MIP-1α, LD78α	CCR1, CCR5	17q12
	CCL3L1	LD78β		17q12
	CCL3L3	LD78β		17q12
	CCL4	MIP-1β	CCR5	17q12
	CCL4L1	AT744.2		17q12
	CCL4L2			17q12
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	17q12
	CCL6	Bilinmiyor	Bilinmiyor	
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	17q11.2
	CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	17q11.2
	CCL9/CCL10	Bilinmiyor	CCR1	
	CCL11	Eotaksin	CCR3	17q11.2
	CCL12	Bilinmiyor	CCR2	
	CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3	17q11.2
	CCL14	HCC-1	CCR1	17q12
	CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-1δ	CCR1, CCR3	17q12
	CCL16	HCC-4, LCC-1, LEC	CCR1, CCR2, CCR5	17q12
	CCL17	TARC	CCR4	16q13
	CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1	Bilinmiyor	17q12
	CCL19	ELC, Eksodus-3, MIP-3β	CCR7	9p13.3
	MCP-10	LARC, Eksodus-1, MIP-3α	CCR6	2q36.3

	MCP-11	SLC, 6Ckine, Eksodus-2	CCR7	9p13.3
	MCP-12	MDC, STCP-1	CCR4	16q13
	MCP-13	MPIF-1, Ckβ8, MIP-3	CCR1	17q12
	MCP-14	Eotaksin-2, MPIF-2	CCR3	7q11.23
	MCP-15	TECK	CCR9	19p13.3
	MCP-16	Eotaksin-3	CCR3	7q11.23
	MCP-17	CTACK, ILC	CCR10	9p13.3
	MCP-18	MEC	CCR3, CCR10	5p12
CX₃C kemokin (α kemokin)	CXCL1	GROα, MGSA-α	CXCR2, CXCR1	4q13.3
	CXCL2	GROβ, MGSA-β	CXCR2	4q13.3
	CXCL3	GROγ, MGSA-γ	CXCR2	4q13.3
	CXCL4	PF-4	CXCR3B	4q13.3
	CXCL4V1			4q13.3
	CXCL5	ENA-78	CXCR2	4q13.3
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	4q13.3
	CXCL7	NAP-2	Bilinmiyor	4q13.3
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	4q13.3
	CXCL9	MIG	CXCR3-A, CXCR3-B	4q21.1
	CXCL10	IP-10	CXCR3-A, CXCR3-B	4q21.1
	CXCL11	I-TAC	CXCR3-A, CXCR3-B	4q21.1
	CXCL12	SDF-1α/β	CXCR4, CXCR7	10q11.21
	CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5	4q21.1
	CXCL14	BRAK, Belokine	Bilinmiyor	5q31.1
	CXCL15	Bilinmiyor	Bilinmiyor	
	CXCL16		CXCR6	17p13
	CXCL17	DMC	Bilinmiyor	19
CX₃C kemokin (δ kemokin)	CX ₃ CL1	Fraktalkin	CX ₃ CR1	16q13

1.2.3. Kemokin Üretimi ve Etkileri

Kemokinler çoğunlukla bölgesel olarak salınan ve bölgesel etki eden moleküllerdir. Birçok dokuda bazal kemokin sentezi az miktardadır. İskemik hasar, toksik maruziyet veya inflamatuvar olaylar da kemokin sentezi büyük oranda artır. Kemokin sentezi için en güçlü tetikleyici faktörler şunlardır:

- Lipopolisakkaritler
- IL-1 β , TNF- α (Tumor necrosis factor- α)
- Bir çok büyüme faktörü (PDGF (platelet derived growth factor) gibi)
- Viral enfeksiyon ajanları
- Bakteriyel ürünler

Bunların aksine kemokin sentezinin baskılanması; TGF- β (transforming growth factor-beta), IL-4 ve IL-10 gibi anti inflamatuvar sitokinler tarafından sağlanmaktadır. Fakat bu etkileşim kemokinin tipine ve etkilediği hücreye göre değişiklik gösterir (Springer 1995, Mackay 1996, Ebnet ve ark 1996). Kandan ilgili dokuya lökosit transportu selektinler, integrinler ve kemokinler tarafından yönlendirilen bir dizi olay sonucunda sağlıklı olarak gerçekleşir. Bu bir dizi olay inflamasyonun özgülüğünü sağlar (Çağlar ve Kansu 2004, Adams ve Llyod 1997).

1.2.4. Kemokinler ve İnflamasyon

İnflamatuvar hastalıkların birçoğunda kemokinlerin hedef dokuya salgılandıkları gösterilmiştir. Bu inflamatuvar hastalıklarda kemokinler dokular da lökositlerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlamaktadırlar (Park ve ark 2005). Kemokinler, lökositlerin inflamasyon ve homeostasisinin sağlanması aşamalarında hücre hareketleri düzenlemektedirler (Çağlar ve Kansu 2004). İnflamatuvar süreç boyunca kemokinlerin sentezinde ve sekresyonun da dramatik bir şekilde artış gözlenmektedir. Kemokin sentezi için ana uyarı proinflamatuvar sitokinlerdir (Murdoch ve Finn 2000).

İnflamasyonda kemokinlerin sentezi ve salınımındaki belirgin artış lökositlerin inflamasyonlu dokuya geçişlerinde önemli rol oynamaktadır (Eisen 1994). Uygun uyarılar altında akciğerler, deri, beyin, eklemler, kan damarları, böbrekler ve meninksler gibi dokularda kemokinlerin sentezinin artışı gözlenmiştir (Çağlar ve Kansu 2004). Mukozalara ve seröz zarlara nötrofillerin, monositlerin ve

makrofajların gelmesi, yerlesmesi ve inflamatuvar sürece katılımları da yine büyük oranda kemokinlerin katkısına bağlıdır (Çağlar ve Kansu 2004, Navratilova 2006).

1.2.5. İnflamatuvar Hastalıklarda Kemokinlerin Rolü

Makrofajlar ile doku infiltrasyonu kronik bir çok olayda görülmektedir (Proost ve ark 1996). Kemokinlerin ekspresyonu inflamatuvar olduğu öngörülen geniş bir dizi hastalıkta araştırılmış ve bu moleküllerin hastalığa yatkınlığı, hastalığın ilerlemesini ve hastalığın şiddetini etkileyebileceğini düşündürmüştür. Son zamanlarda in vitro ve in vivo kemokin regülasyonundan sorumlu olan çeşitli polimorfizmler gösterilmiştir (Navratilova 2006).

Aterosklerozda, makrofaj ve T lenfositler asıl inflamatuvar hücre olarak kan damarlarında bulunur. Kemokinlerden MCP-1, MCP-4, bu süreçte tesbit edilmistir. MCP-1 lipit yüklü makrofajların ve monositlerin subendotelyal bölgeye göçünü sağlayarak intimal hiperplazi gelişimine katkıda bulunurlar (Rollins 1997, Proost ve ark 1996, Piemonti ve ark 2002). İnflamatuvar barsak hastalıklarından Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı mevcut olan hastaların barsak dokularında, birçok kemokinin anlamlı olarak arttığı gözlenmektedir (Piemonti ve ark 2002).

İnflamasyonlu bir deri hastalığı olan psoriaziste lezyonlar lökosit, aktive T hücre içerir. Lökosit ve aktive T hücre uyarıcısı olan; IP-10 ve MCP-1 normal deride olmamasına rağmen, psöriaziste bulunur ve tedavi ile IP-10 düzeyi azalır (Duque ve ark 1997).

Literatürde, daha önce yapılmış insan ve hayvan çalışmalarının birçoğun da Romatoid Artrit gibi kronik inflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal fibroblastlar ve doku makrofajlarından (Monocyte Chemoattractant Protein-1) MCP-1 ve (Macrophage Inflammatory Protein-1- α) MIP-1 α sekrete edilmekte ve hastalığın patogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir. (Adams ve Llyod 1997, Arimilli ve ark 2000, Luster 1998).

Eotaksin ve MCP Kemokinleri özellikle, antijen ve Ig G yokluğunda esas histamin salgılatıcı faktör olarak rol alırlar (Adams ve Llyod 1997). Astımlı hastaların hava yollarında birçok kemokin tesbit edilmistir (L 88). Multiple Skleroz (MS), demans, Alzheimer Hastalığı (AD) ve Spinoserebellar Ataksi Tip 3

(SCA/MJD) gibi nörodejeneratif hastalıklarda inflamasyonun rolünün bulunması ilgiyi bu yöne çekmiştir (Valente ve ark 2004, Deng ve ark 2005).

2003 yılında yapılan bir başka çalışmada ise özellikle beta kemokinlerden MCP1, MIP1- α ve RANTES'in Behçet hastalığının patogenezi ile ilişkisi tespit edilmiştir (Özer 2003).

Çizelge 1.4. Monosit Kemoatraktan Proteinler

MCP TİPLERİ	Lokalizasyonu	Fonksiyonu
MCP-1	Monosit, Hafıza T Lenfosit bazofil, NK hücresi, Hematopoietik progenitörler, dendritik hücre (?)	Kemotaksis, adezyon, Süperoksit salınımı histamin salınımı, lökotrien sentezi, araşidonikasit aktivasyonu
MCP-2	Monosit, Memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi	Kemotaksis, Histamin salınımı
MCP-3	Monosit, Memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi, dendritik hücre	Kemotaksis, Araşidonik asit aktivasyonu, Histamin salınımı
MCP-4	Monosit, T-lenfosit, eozinofil	Kemotaksis

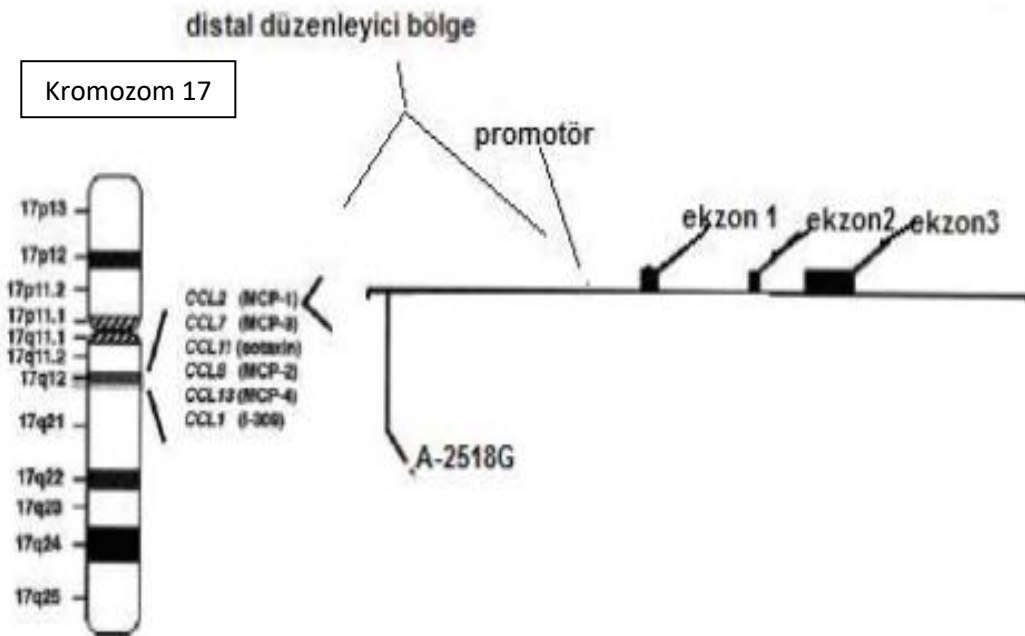
1.2.6. Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP1 /CCL2)

Monosit kemotaktik protein (MCP-1) CC kemokin ailesinin önemli bir üyesidir ve 17. kromozomun q12 lokusunda bulunan MCP-1 adındaki gen tarafından kodlanır (Jemaa ve ark 2008). MCP-1 geninin 3 ekzonu bulunmaktadır (Navratilova 2006). Sekil 2-1'de MCP-1 Geninin kromozomdaki yeri görülmektedir (McDermott ve ark 2005)

MCP-1 ilk keşfedilen insan CC kemokinidir. Kromozom 17 (chr.17, q11.2) üzerinde yer alan, insan MCP-1 proteini 76 amino asitten oluşmaktadır ve 13 kDa boyutundadır (Van Coillie ve ark 1999). MCP- 1 kemokini MCP-1 geni tarafından

kodlanmakta olup fonksiyon olarak sadece mononükleer hücrelerin aktivasyonu ve inflamasyon bölgesine göçüyle ilişkili kalmayıp, bunun dışında sitokin sentezi ve inflamasyon ile de ilişkilidir (Jemaa ve ark 2008).

MCP-1; monositler, lenfositler, vasküler düz kas hücreleri, keratinositler, fibroblastlar, mezangial hücreler, tubular epitelyal hücreler ve endotelyal hücreler gibi birçok hücre tarafından TNF- α , interferon- α , lipopolisakkarid, interlökin-1, PDGF ve okside LDL dâhil birçok inflamatuvar uyarana yanıt olarak sentezlenmektedir. MCP-1'in buna bağlı olarak farklı birçok fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. MCP-1'in invitro subnano molar konsantrasyon uygulamaların da monositlerin kemotaksisini indükleyebildiği, T hücrelerinin bir alt grubunu(T helper) ve IL-2'nin aktive ettiği doğal öldürücü hücreleri bölgeye çektiği saptanmıştır. Monositler üzerindeki etkisi sadece kemotaksisi indüklemek olmayıp ayrıca bu hücrelerde oksidatif stresi, araşidonik asit salınımını ve kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikleri de indükler. MCP-1; Hedef hücre özgüllüğünden dolayı, ateroskleroz, neoplazmi, inflamatuvar hastalıklar ve HIV dâhil mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize olan çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır (Jemaa ve ark 2008, Piemonti ve ark 2002).



Şekil 1.9. MCP-1 (MCP-1) Geninin Kromozomdaki Yeri ve Yapısı

MCP 1-4 olmak üzere dört çeşit MCP proteini izole edilmiştir (Baggiolini ve ark 1997). MCP-1'in mononükleer hücrelerin akümüasyonu için majör sinyal olduğu düşünülmüştür. MCP-1'in insan monositlerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırdığı ve böylelikle endotelial hücreleri adezyona ve migrasyona hazırladığı düşünülmektedir (Gunn ve ark 1997).

1.2.6.1. MCP-1'in Yapısı

MCP-1 proteini yapısal olarak 9 ve 13 kd molekül ağırlığına sahip iki formda sentez edilmektedir. Bu farklılık formlardaki O-glikozilasyon sonucu oluşmaktadır. MCP-1'in 13 kDa'luk formunda galaktoz- β -3d-N-asetilgalaktozamin disakkariti bulunurken daha küçük formu olan 9 kDa'luk izo formunda bu yapı bulunmaz. MCP kemokinlerinin biyolojik aktiviteleri için amino terminal bölgesi çok önemlidir. 1-6. amino asit kalıntıları MCP kemokinlerinin kemotaktik aktiviteleri için gereklidir ve 3. pozisyonundaki Asp'in aktivitede anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca birinci pozisyonundaki aminoasit ikincil yapı oluşumu için yada doğrudan reseptöre bağlanma için oldukça önemlidir (Malgarejo ve ark 2009, Mauduit ve ark 1984).

MCP-1'in transkripsiyon düzeyinde regülasyonu TNF- α , interferon gamma, PDGF ve stres faktörleri gibi stimülatör ajanlar tarafından yapılır. Buna zıt olarak retinoik asit, glukokortikoidler ve östrojenin MCP-1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu düzenleyici cevapların çoğunda pro inflamatuvar nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü (NF-kB) anahtar bir rol oynar. NF-kB ise; TNF- α , IL-1, okside LDL ve homosistein gibi birçok patojenik uyaran tarafından hızlıca aktive edilir (Malgarejo ve ark 2009).

1.2.6.2. MCP-1'in Görevleri

Kemokinler ve onların reseptörleri çoğu tümörde tespit edilmiştir.(Conti ve Rollins 2004). Kemokinler kanseri etkileyen birçok aktiviteye karışır ve kanser patogeneğinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu etkiler kanser hücresinin özelliğine bağlı olarak, ya büyümeyi teşvik edici ya da büyümeyi inhibe edici olarak meydana gelmektedir (Ohta ve ark 2003).

Şimdiye kadar yapılan bir çok çalışmada MCP-1'in meme, ovaryum, glioma, ve özafagus kanserleri de dahil olmak üzere pek çok tümörde yüksek miktarda eksprese

edildiği ortaya konmuştur (Malgarejo ve ark 2009). Kanser hücrelerinde MCP-1'nin fazla ekspresyonunun tümör damarlanması ve makrofaj infiltrasyonu ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (Sato ve ark 1995). Özellikle de MCP-1 ve VEGF ekspresyonları tümör ilişkili makrofaj (TAM) infiltrasyonu ile, anjiyogenezis ile pozitif ilişkilidir (Valkovic ve ark 2002). MCP-1 ya direkt olarak ya da büyüme faktörleri ve VEGF, FGF gibi anjiyogenik faktörler salgılayan tümörlerle ilişkili olarak makrofajlar aracılığıyla anjiyogenezi indükleyebilir. Son zamanlarda MCP-1'in indüklediği proteinin (MCP-1) sadece insan periferik kan monositlerinde değil endotel hücrelerinde de arttığı ve bu transkripsiyon faktörünün MCP-1 tarafından indüklenen anjiyogeneze aracılık ettiği gösterilmiştir (Malgarejo ve ark 2009).

MCP-1'in ateroskleroz patogeneğinde de rol oynamaktadır. Vasküler endotel hücrelerindeki hasarı takiben monositler, zarar görmüş bölgeye MCP-1 ile onun reseptörü CCR2'nin etkileşimi aracılığıyla oluşan konsantrasyon gradiyenti boyunca göç ederek kronik inflamasyona yol açarlar (Harrington 2000, Tiong ve Brieger 2005).

1.2.6.3. MCP-1'in Polimorfizmi

MCP-1 birçok polimorfizme sahiptir. Fakat en çok çalışılan MCP-1'in düzenleyici bölgesinde yer alan tek nükleotid polimorfizmi, A-2518G'dir. MCP-1 geninin A-2518G polimorfizminin MCP-1'in transkripsiyon aktivitesini etkilediği ve bu polimorfizmin birçok inflamatuvar hastalık, tip 2 diyabet, insülin direnci, tip 1 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Fakat bu ilişkiler halen tartışmalıdır (Kouyama 2007).

Hem MCP-1 hem de reseptörü olan CCR2 çeşitli hastalıklarla alakalıdır (çizelge 3). Bu alaka nakavt fareler, farelerde antikor ya da inhibitör yardımıyla oluşturulan nötralizasyon ve insanlardaki epidemiyolojik çalışmalar aracılığıyla gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Farklı hastalıklarda MCP-1'nin katılımı: MCP-1 tarafından etkilenen hastalıklardan bazıları

Hastalık	Mekanizma	Referans
Romatoid artrit	Romatoid artrit başlangıcından önce MCP-1 artışı	Rantapaa-Dahlqvist ve ark. 2007
İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (Ülseratif kolit, Crohn hastalığı)	İntestinal makrofajların MCP-1 aracılıklı farklılaşması	Spoetl ve ark. 2006
Tümör damarlanması	Makrofaj infiltrasyonunu etkileyen MCP-1 etkisi	Wang ve ark. 2006
HIV ilişkili nörokognitif bozukluklar	plazma MCP-1 ve doku TNF- α durumu ve anizotropi ölçümleri arasındaki korelasyon	Ragin ve ark. 2006
HIV'in nörolojik komplikasyonları	COX-2, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , ve iNOS Tat aracılıklı upregülasyonu ve mikrogial hücrelerin aktivasyonu	Flora ve ark.2005
Multipl skleroz Sekonder progresif multipl Skleroz	Hipertrofik astrositler de MCP-1 nin neden olduğu aksonal hasar	Tanuma ve ark. 2006
Tekrarlayan düşük	MCP-1 ile indüklenen IL-1 β artışı	Huang ve ark. 2006
Nosisepsiyon	MCP-1 aracılıklı nöronların depolarizasyonu	Sun ve ark. 2006
İnsulin direnci	MCP-1, TNF- α , IL-6 artışı	Kamei ve ark. 2006

HIV virüsü hücre içene girerken CCR2 reseptörünü kullanmaktadır. CD4+ T lenfosit hücreleri ve monositlerde CCR2 ekspresyonunun yüksek olması nedeniyle, bu hücreler MCP-1 tarafından hedeflenen ana hücrelerdir ve bu hücre reseptörleri aynı zamanda HIV-1 enfeksiyonu içinde ilk hedeftirler (Matsushima ve ark 1989). Gerek İn vitro ortamda ve gerekse invivo da monosit/makrofajların MCP-1'nin en büyük kaynağı olduğu bulunduğundan, bu bulgu HIV-1 ile enfekte olmuş sistemde dolaşan monositlerin hastalığı yaymada önemli faktör olduğunu düşündürmüştür (Cinque ve ark 1998).

Ayrıca Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1), Romatoid artrit (RA) içinde potansiyel bir hedeftir (Koch 2005). MCP-1 düzeyi RA hastalara ait periferik kanda, sinovyal sıvıda ve sinovyal dokuda yükselir ve T lenfositlerinin ve özellikle monosit / makrofajların migrasyonu için ana mediatör olur. Bu hücrelerin doğrudan sinovitin başlayıp sürmesine ve sonuçta RA hastasında izlenen eklem destruksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Haringman ve ark 2005). MCP-1 lökosit migrasyonunda anahtar rol oynar ve kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde potansiyel hedeftir (Koch 2005).

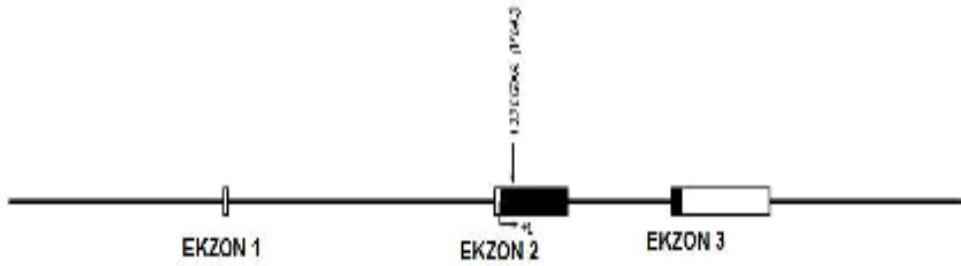
1.2.7. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2)

CCR2; MCP-1/CCL2, CCL7 , CCL8, CCL12, CCL16 ve CCL13 ligandlarına afinite gösteren bir CC kemokin reseptörüdür. Bu reseptör esas olarak monositler, T lenfositleri, dendritik hücreler, B lenfositleri ve bazofiller tarafından eksprese edilir. Bazı özel durumlarda nötrofiller de CCR2 eksprese ederler (Jemaa ve ark 2008).

Bu reseptörler çoğunlukla bir kısa ekstrasellüler N-terminali, her biri üç hücre dışı ve hücre içi üç loop ile bağlı yedi hidrofobik transmembran domeini ve bir C-terminal hücre içi domaininden oluşmaktadır. CCR2 gibi Kemokin reseptörlerinin çoğu birden fazla liganda yanıt verdiği için bu etkileşimlerin (kemokin- reseptör) in vivo etkilerini tahmin etmek güçleşmektedir (Mantovani 1999).MCP-1, CCR2 reseptörü aracılığıyla etki göstermektedir. Ayrıca MCP-1 den farklı olarak CCR2'nin ekspresyonu belirli hücrelerle sınırlıdır.

CCR2 geni 3. kromozomun p21-p24 bölgesinde CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 genlerinin yakınında bulunan CC kemokin reseptör kümelerindeki yerleşmiş bir gendir (Jemaa ve ark 2008). Bu gen 6.7 kb uzunluğundadır ve 3 ekzona sahiptir (Sekil 1.10.).

CCR 2 KEMOKİN [C-C MOTİF] RESEPTÖR 2 NİN KROMOZOM 3p21 deki haritası (6.7 kb)



Şekil 1.10. CCR2 G190A Polimorfizminin Kromozom Üzerindeki Yeri

CCR2'nin CCR2A ve CCR2B olmak üzere iki alternatif kesim formu vardır. Bunlar CCR2'nin sadece terminal karboksi kuyruğundaki farkla birbirinden ayrılan CCR2A (360 aminoasit) ve CCR2B (374 aminoasit) olmak üzere birbirinden ayrılırlar. CCR2A'nın büyük kısmı sitoplazmadayken CCR2B hücre yüzeyinde yerleşmiştir. Bunlar sadece C-terminal kuyruklarında değişiklik gösterirler (Charo ve ark). CCR2A mononükleer hücreler ve vasküler düz kas hücreleri tarafından eksprese edilen majör izoformdur (Bartoli ve ark 2001). Monositler ve aktifve edilmiş NK hücreleri ağırlıklı olarak CCR2B izoformunu eksprese ederler. Muhtemelen, CCR2A ve CCR2B farklı sinyal yollarını etkinleştirmek de ve farklı işler meydana getirmektedirler. Örneğin, CCR2A-pozitif hücrelerde MCP-1 kemotaksisi Ca^{2+} mobilizasyonu olmaksızın meydana gelirken CCR2B- pozitif hücreler de kemotaksis Ca^{2+} salınımı ile olmaktadır (Sanders ve ark 2000, Cho ve ark 2007). CCR2A ve CCR2B düzeyleri monositlerin makrofajlara farklılaşmasıyla azalmaktadır (B 12). Romatoid artrit hastalardan alınan sinoviyositler içinde MCP-1'nin CCR2A'nın ekspresyonunu arttırırken CCR2B'ninkini arttırmadığı bulunmuştur (Cho ve ark 2007).

CCR2 çift role sahip olduğu hem proinflamatuvar hem de anti inflamatuvar etkiye sahip olduğunu hatırlamak önemlidir. CCR2'nin pro-inflamatuvar rolü

APC'ler(antijen sunan hücreler) ve T hücrelerine bağlı iken anti-inflamatuar rolü düzenleyici T hücrelerindeki ekspresyonuna bağlıdır. (Yeo ve ark 2006). CCR2'den yoksun fareler duyuşal nöropati indüksiyonuna dirençlidir (Thacker ve ark 2007). Buna ek olarak tip II bovine kollajen ile immünize edilmiş CCR2 null farelerin kollajen tarafından indüklenen artrite yabancı tip farelerden daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Quinones ve ark 2004). CC-kemokin reseptör-2 (CCR2) hem İnflamatuar bölgelerde hem de bazal bölgelerde lökositlerin taşınmasında ilişkilidir. IL-2'nin CCR2 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Szalai ve ark 1999).

1.2.7.1. CCR2 G190A Polimorfizmi

Ayrıca CCR2 de 7 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır (Yeo ve ark 2006). CCR2'de tanımlanan bu değışik polimorfik bölgelerden en kapsamlı çalışılan polimorfizmi ekzon 2'de CCR2 proteinini kodlayan genin 190. pozisyonundaki G(guanin)'nin A(adenin)'ya dönüşümüne neden olanıdır. Bu nükleotid değışimi proteinin hücre zarındaki transmembran bölgesinde valin-64 (V) i izölösin(I)'e (V64I) dönüştürmektedir. Fonksiyonsuz mutant bir proteinle sonuçlanan bu polimorfizmin reseptör ekspresyonunu değıştirip değıştirmedeğı hala bilinmemektedir. Sadece bazı olgu-kontrol çalışmalarında CCR2-V64I genotipine sahip olan bireylerin inflammatuar hastalıklar için düşük bir risk oluşturduğu ileri sürülmüştür (Apostolakis ve ark 2007).

Bu literatür verilerine dayanarak bu çalışmada bir inflammatuar süreç olan ailesel Akdeniz ateşı FMF hastalığına neden olan MEFV gen mutasyonları ile değışik inflammatuar süreçlerde rol aldığı belirlenen monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve onun reseptörü olan CC kemokin reseptör 2 (CCR2) gen polimorfizmleri ve promotor bölgede mevcut olan MCP-1 A-2518G polimorfizmi için ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Kemokin ve kemokin reseptör mutasyonlarının birçok inflammatuar hastalıkdaki (RA, Behçet, inflammatuar bağırsak hastalıkları (crohn, ülseratif kolit) vb) ilişkisi literatürde bildirilmiş olup hastalık patogeneşleri ve tedavi protokolleri üzerine anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca literatürde FMF hastalığında kemokinlerin rolü ile ilgili bir çalışma olmadığı görölmektedir. Bu araştırma ile bu konudaki bilgi açığının giderilmesi amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmaya Alınan Bireylerin Tanımı

Bu çalışmaya Cumhuriyet üniversitesi Tıp Fakültesi tıbbi genetik Anabilim Dalı tarafından MEFV geni sekanslanan ve sonuçta homozigot mutasyon tespit edilen 75 birey, aynı gen için heterozigot mutasyon tespit edilen 77 birey ve mutasyon tespit edilmeyen 77 birey olacak şekilde 3 grup dâhil edilmiştir. Mutasyon tespit edilmeyen bireyler Tel-hashomer kriterleri kullanılarak hastalık ekarte edildikten sonra çalışmaya dâhil edilmiştir.

Ayrıca çalışmaya dahil edilen gruplardan rastgele olarak seçilen MEFV geni homozigot mutant 18 birey, heterozigot mutant 16 birey ve mutasyon tespit edilemeyen 14 birey ekspresyon analizi için çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma için Cumhuriyet üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan 13/12/2011 tarih ve 2011/014 sayılı etik kurul kararı ile onay alındı ve çalışmaya alınan bütün bireyler araştırma öncesinde ayrıntılı olarak bilgilendirilip yazılı olarak onamları alındı. Çalışmanın sonraki kısımları Cumhuriyet üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj (Sigma)
- Vortex (IKA-GENIUS3)
- Hassas terazi (ACCULAB)
- HPLC (Agilent 1100)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Shaker (BIO-TDB100)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems 2700)
- Görüntüleme cihazı (BIORAD)
- Elektroforez Tankı (SCI-PLUS)
- Elektroforez için Güç Kaynağı (NYXTECHNIK)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Spektrofotometre (Wealtec)

- -80 0C ve -20 0C derin dondurucu (Sanyo)
- UV transluminatör
- Isıtmalı su banyosu
- Real time PZR Cyclers (Rotor Gene Q Qiagen)

2.1.3. Kullanılan Kit ve Kimyasallar

- Taq Polimeraz (Fermantas)
- dNTP seti (Fermantas)
- PZR buffer (Fermantas)
- 25mM MgCl₂ (Fermantas)
- Reverse-forward primer (IDT)
- Restriksiyon enzimi (PvuII, BsaBI, Fermantas)
- Ladder 100 bp (Vivantis)
- Agaroz (Lonza)
- Etidyum Bromid (Olerup)
- Tris (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Asetik Asit (Merck)
- 6 x loading dye (Vivantis)
- Etanol (Merck),
- DNA İzolasyon Kiti (Vivantis)
- Amonyum klorür(Sigma)
- potasyum bikarbonat(Sigma)
- Guanidine-HCl (AppliChem)
- Tris-HCl (Vivantis)
- Triton-X-100 (Amresco)
- Trizol (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- İzopropanolol (Merck),
- Kloroform (Sigma)
- Oligo dT

- M.mulu (Revers transkriptaz)

MCP-1 geninde A-2518G polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.

Forvard primer: 5'-CCG AGA TGT TCC CAG CAC AG-3'

Reverse primer: 5'-CTG CTT TGC TTG TGC CTC TT-3'.

CCR2 geninde G190A polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği gibidir.

Forvard primer: 5'-ATT TCC CCA GTA CAT CCA CAA C-3'

Reverse primer: 5'-CCC ACA ATG GGA GAG TAA TAA G-3'

2.2. Metod

2.2.1. Hastaların Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan bireylerin tıbbi genetik polikliniğinde muayeneleri yapıldı. Bu bireyler tıbbi genetik anabilim dalına daha önceden başvurmuş ve MEFV geni açısından DNA dizi analizi (ABI 3130, genetic analyzer, japan) ile genetik analizleri yapılmış bireylerdi. Anamnezleri alınıp genel sistemik muayeneleri yapıldı. Bütün katılımcılara aydınlatılmış onam formu dolduruldu. Ayrıca çalışmaya katılan bireylerin hepsine önceden hazırlanmış tel-hashomer kriterleri doldurularak FMF kliniğinin varlığına göre sınıflandırıldı. MEFV gen mutasyonu bulunmayan bireylerde tel-hashomer kriterleri kullanılarak hastalık ekarte edildi. Mutasyonu ve kliniği bulunmayan bu grup homozigot mutasyonlu ve heterozigot mutasyonlu bireylerle karşılaştırmak amacıyla kontrol grubu olarak kullanıldı.

2.2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Çalışmaya alınan bütün bireylerden EDTA'lı tüplere 10 ml kan örnekleri alındı. Alınan bu örneklerden steril şartlarda DNA izolasyonu yapılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim kesimi (RFLP) çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıca çalışma grubunun içinden ayrıca seçilen örneklerden lökosit izolasyonu yapılarak -80 °C'de saklandı. Örneklerdeki bütün bireyler tamamlanınca

izole edilen lökositlerden total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra primerler (oligo dT) kullanılarak cDNA ya çevrildi.

2.2.3. DNA İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden steril şartlarda Vivantis (Malezya) Firmasından sağlanan DNA izolasyon kiti kullanılarak spin klon yöntemiyle aşağıdaki şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

- 1,5 ml'lik steril boş bir ependorf tüp içine 200 µl lizis tamponu konuldu.
- Lizis tamponun üzerine 200 µl periferik kan ilave edildi.
- Kan ve Lizis tamponu karışımının üzerine 20 µl Proteinaz-K ilave edilerek karıştırıldı.
- Karışım hot plate'de 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Sürenin sonunda karışım vortekslendi.
- İnkübasyonun sonunda karışıma 200 µl %100 etil alkol ilave edilerek pipetaj yapıldı ve spin kolona aktarıldı.
- 5000 g'de 1 dk santrifuj edildi.
- Spin kolon her defasında yeni bir ependorf tüpe aktarılacak şekilde üzerine 500'er µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 500 g'de 1'er dk aralar ile yıkama işlemlerine tabi tutuldu.
- Öncesinde inkübatörde 56 °C'de ısıtılmış 200 µl distile su, spin kolona ilave edildi ve 5000 g'de 1 dk santrifuj edilerek spin kolondaki filtreye tutunmuş olan DNA'nın ayrılması sağlandı.
- Elde edilen DNA, PZR analizinde kullanana kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

- 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik bir erlenmayere konuldu ve üzerine 100 ml 1X TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) tamponu eklendi. Mikrodalga fırında agar eriyene kadar yaklaşık 2 dakika tutuldu ve kaynatıldı.
- Eriyen agar solüsyonu oda ısısında bekletilerek yaklaşık 55°C'ye kadar soğutuldu ve 10 mg/ml'lik etidyum bromür'den 100 µl ilave edildi.

- Daha önceden tarakları tabana yaklaşık 1 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilen elektroforez kabına, hazırlanan agaroz jel döküldü ve donması için oda sıcaklığında 20-30 dk. bekletildi.
- Taraklar her iki uçtan tutularak dikkatlice çıkartıldı ve jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.
- Jelde ortaya çıkan kuyucuklara total 12 µl olacak şekilde uygun DNA markır ve PZR ürünleri (10 µl PZR ürünü + 2 µl 6X loading dye yükleme tamponu) aktarıldı.
- Elektroforez 125 volt'da (12.5 volt/cm²) 20-30 dakika süreyle yapıldı.
- Ortaya çıkan bandlar UV illüminatörde (görüntü analiz sistemi) markır ile kıyaslandı.

2.2.5. Sınırlandırılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragments Length Polymorphism)

RFLP, Genomik DNA'nın spesifik bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve DNA segmentlerinin agaroz jel elektroforez sisteminde ayrıştırılmasıyla oluşturulan, DNA profillerinin incelenmesine imkan tanıyan bir yöntemdir. Bakterilerden elde edilen bu enzimler DNA'daki özgün dizileri tanıyarak kesme işlemini, tanıma bölgesinde veya bu bölgenin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Bu yöntem ile tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk basamak hedef DNA daki incelenecek olan SNP (Single Nucleotid Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) etrafındaki baz dizisiyle beraber PZR ile çoğaltılarak, polimorfik bölgenin genotiplenmesi amacı ile PZR ürününün sekanslanmasına veya jel elektroforezinin ardından enzimle kesilmesine dayanmaktadır (Linn ve Arber 1968).

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, elde edilen DNA fragmentlerinin moleküler büyüklüklerine göre jel elektroforezde yürütülerek moleküler ağırlık standardı (markır) yardımıyla belirlenebilmektedir. Jel, ethidium bromid ile muamele edildikten sonra fragmentler UV ışık altında görünür hale getirilerek jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir. Çalışmamızda MCP1 geni (A-2518G) ve onun

reseptörünü kodlayan CCR2 geni (G190A) polimorfik bölgelerinin genotip analizleri RFLP yöntemi ile yapıldı.

2.2.5.1. MCP-1 Geni A-2518G Polimorfizm Analizi

MCP-1 geninin promotor bölgesinde -2518 Nükleotidinde A>G baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizm analizi için PZR-restriksiyon enzim kesimi metodu kullanılarak elde edilen kesim ürünlerinin uzunluk değişimine bakılarak (PZR-RFLP; PZR- restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) analiz yapıldı.

Bunun için Forward ve Reverse primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. Reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı.

dNTP (her biri 10 pmol)	1,5 µl
10 x PZR tamponu	2,5 µl
10 pmol primer	1 µl
Molekuler Grade dH ₂ O	17,25 µl
DNA Taq polimeraz enzimi	0,25 µl
<u>Genomik DNA</u>	<u>2,5 µl</u>
TOPLAM	25 µl

PZR reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

94 °C’de 7 dakika } 1 döngü

94 °C’de 25 saniye
60 °C’de 30 saniye
72 °C’de 30 saniye } 10 döngü

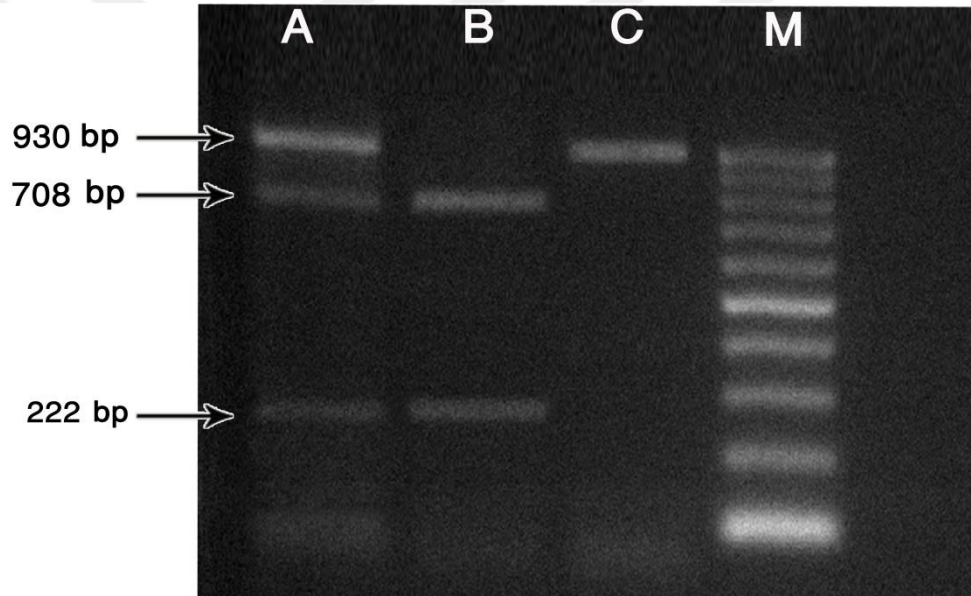
94 °C’de 25 saniye
58 °C’de 30 saniye
72 °C’de 30 saniye } 25 döngü

72 °C’de 7 dakika } 1 döngü

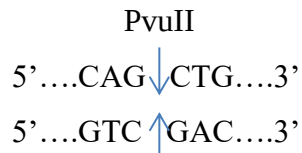
PZR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 930 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığı tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PZR ürünü PvuII (RE, fermentas) kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Molekuler Grade dH ₂ O	7 µl
Restriksiyon Enzim Buffer	2 µl
Restriksiyon Enzimi (PvuII)	1 µl
PZR ürünü	15 µl
Toplam	25 µl

Karışım su banyosunda 37°C'de 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. MCP-1 geni promotör bölgesi -2518. Nükleotidi A>G değişimi için PZR jel elektroforez görüntüsü, M) 100 bp markır, A) GA: heterozigot mutant, B) GG: homozigot mutant C) AA: homozigot normal, bp: baz çifti



PvuII enzimi yukarıdaki diziyi tanımakta ve okla gösterilen spesifik bölgeden kesmektedir. Normalde olması gereken üst sıra için okun solunda alt sıra için okun sağında A allelidir ve bu allelin varlığında kesmeyecektir. Eğer beklenen

polimorfizm olan A alleli yerine G alleli gelmişse PvuII enzimi spesifik şekilde o bölgeden kesecektir.

2.2.5.2. CCR2 Geni Exon2 V94I (G190A) Polimorfizm Analizi

CCR2 geninin 2. ekzonunda 190. nükleotitte G>A baz değişimi bulunmaktadır. Bu polimorfizmin analizi PZR-RFLP metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için Forward ve Reverse primerleri kullanılarak polimorfik olabilecek bölge çoğaltıldı. PZR reaksiyonu için aşağıdaki karışım hazırlandı.

dNTP (her biri 10 pmol)	1,6 µl
10 x PZR tamponu	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
10 pmol primer	1,2 µl
Molekuler Grade dH ₂ O	11,8 µl
DNA Taq polimeraz enzimi	0,4 µl
<u>Genomik DNA</u>	<u>2 µl</u>
TOPLAM	20,0 µl

PZR reaksiyonu termal cycler'da aşağıdaki şekilde yapıldı.

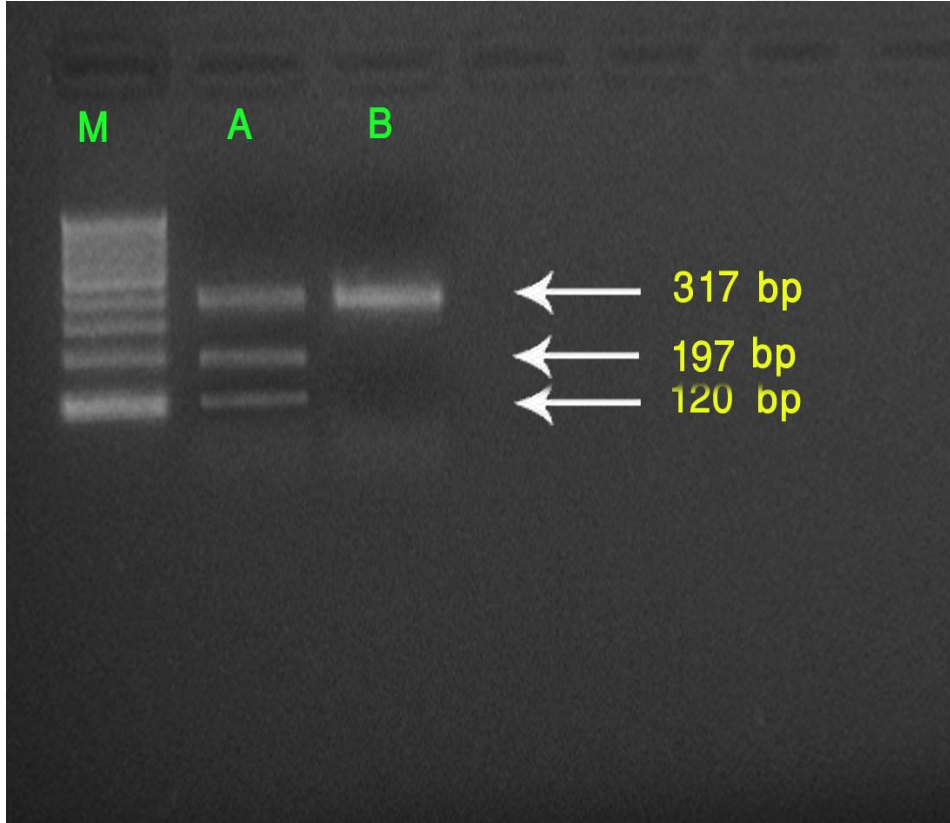
94 °C'de 7 dakika	} 1 döngü
94 °C'de 15 saniye	} 10 döngü
59 °C'de 30 saniye	
72 °C'de 20 saniye	
94 °C'de 15 saniye	} 25 döngü
57 °C'de 30 saniye	
72 °C'de 20 saniye	
72 °C'de 3 dakika	} 1 döngü

PZR ürününün 5 µl'si hazırlanan agaroz jelde yürütülerek 317 bp büyüklüğünde spesifik bandların olup olmadığı tespit edildi. Geri kalan 15 µl'lik PZR ürünü RE

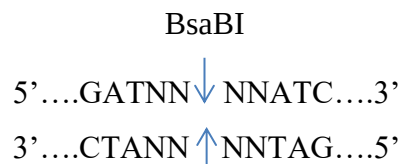
(Restriksiyon endonükleaz, kesim enzimi) BsaBI(fermantas) kullanılarak kesildi. Bunun için aşağıdaki karışım kullanıldı:

Moleküler Grade dH ₂ O	7 µl
Restriksiyon Enzim Buffer	2 µl
Restriksiyon Enzimi (MboI)	1 µl
<u>PZR ürünü</u>	<u>10 µl</u>
Toplam	20 µl

Karışım su banyosunda 65°C’de 12–16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri jelde yürütüldükten sonra UV illüminator kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. CCR2 geni 2. exondaki G>A polimorfizmi için PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü. M:100bp markır, A: heterozigot mutant, B: normal, bp: baz çifti.



BsaBI enzimi yukarıdaki diziyi tanımakta ve okla gösterilen bölgeden kesmektedir. Normalde olması gereken üst sıra için okun sağında 3. alt sıra için okun solunda 3.allel G allelidir ve bu allelin varlığında kesmeyecektir. Eğer beklenen polimorfizm olan G alleli yerine A alleli gelmişse BsaBI enzimi o bölgeyi tanıyacak spesifik şekilde o bölgeden kesecektir.

2.2.6. Kandan Lökosit İzolasyonu

Çalışmaya alınan bireylerden steril bir şekilde EDTA'lı tüplere 1-2 ml periferik kan alındı. Hastaların BKH (Beyaz Kan Hücresi) sayıları dikkate alınarak her hastanın BKH sayısı 3.000.000'a bölünerek ne kadar kandan lökosit izolasyonu yapılacağı hesaplandı. Bunu yapmamızın amacı mikrolitresinde her hastadan aynı oranda lökosit elde etmektir. Lökosit izolasyonunda kullanılan eritrosit liziz solüsyonu (bkz. Protokol 1) ve liziz bağlama solüsyonu (bkz. Protokol 2) optimize edildi. Lökosit izolasyonunun (bkz. Protokol 3) hemen ardından RNA izolasyonuna geçilmeyecek ise örnekler -80 dereceye kaldırıldı.

Protokol 1. Eritrosit liziz solüsyonu

❖ 8,3 gr Amonyum klorür

1 gr potasyum bikarbonat

%5' lik pH'ı 8 olan EDTA'dan (Etilen diamin tetra asetik asit) 1,8 ml alınarak 800 ml distile suda çözüldü. Steril olması için 0,2 µM lik filtreden geçirildi. Ardından solüsyon distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

Protokol 2. Liziz bağlama solüsyonu

❖ 4,5 M Guanidine-HCl (AppliChem)

50 mM Tris-HCl (Vivantis)

%30 Triton-X-100 (Amresco) karıştırılarak 25 ml'ye distile su ile tamamlandı ve pH'ı 6.6'ya ayarlandı. Guanidine-HCl, konsantrasyon ve serbest enerji arasındaki doğrusal ilişki ile proteinleri denatüre etmesi için, Triton-X-100 ise ökaryotik hücre zarının parçalanması için kullanıldı.

Protokol 3. Lökosit İzolasyonu

- Öncelikle materyalin BKH sayısına bakılarak ne kadar kan alınacağı hesaplanır. Örneğin BKH sayısı 6000 olan bir kişiden
- $3\ 000\ 000 / 6\ 000 = 500\ \mu\text{l}$ kan alınır.
- Alınan kanın üzerine kan miktarının iki katı kadar eritrosit liziz solüsyonu ilave edilip +4 derecede 10 dk alt-üst edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- Santrifüj sonrası aldığımız kan miktarı kadar yine eritrosit liziz solüsyonu ilave edilir ve +4 derece de 5 dk daha alt-üst edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- Pellet üzerine 250 μl serum fizyolojik ilave edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- 400 μl liziz bağlama solüsyonu ilave edildikten sonra RNA izolasyonu aşamasına geçilir.

2.2.7. Lökosit RNA İzolasyonu

İzole edilen lökositler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı atılarak pelletin miktarına göre 200-400 μl trizol direk eklenir. İyiçe vortekslenir. Sonra 60°C de 5 dk bekletilir. Sonra oda ısısına alınıp 5dk bekletilir. Daha sonra eklediğimiz trizolün yarısı kadar kloroform eklenerek 6-7 kez ters düz yapılır. 5 dk oda ısısında tutulup +4 °C de 12000 g de 15 dk santrifüj edilir.

Santrifüjden sonra fazlar ayrılır

- 1- En altta kalan pembe renkli kısım (Hücredeki diğer yıkım ürünleri prt, vb)
- 2- Ortada yer alan beyaz renkli kısım (DNA içermektedir.)
- 3- En üstteki şeffaf kısım (RNA içermektedir.)

En üstteki şeffaf kısım RNA içermektedir. Ortada DNA içeren beyaz renkli kısma hiç dokunmadan en üstteki şeffaf kısmı alıp temiz bir epandorfa aktarıyoruz. Sonra presipitasyon aşamasına geçiyoruz.

Presipitasyon için temiz bir epandorfa aktardığımız RNA miktarı kadar izopropanolol aynı epandorfa eklenir. Sonra onun yarısı kadar 1,2 Molarlık NaCl solüsyonu eklenir. Oluşan karışım 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra +4°C

15000 g de 15 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Sonra 200 µl % 70 lik etanol eklenir. 15000 g de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım atılır(emdirilerek). 10 dk havada kurutulur. Üzerine 50 µl RNAaz içermeyen su eklenir pipetajla homojen hale getirilir. Sonra spektrofotometre’de (NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer USA.) da konsantrasyon ölçülerek -80°C kaldırılır.

2.2.8. RNA’dan cDNA Sentezi:

Spektrofotometre’de ölçülen RNA miktarına göre eşit miktarda RNA alınıp 1 µl primer (oligo dT) ve dNTP eklenip 65°C de 5 dk bekletildikten sonra 2 dk buz da bekletilir. Üzerine 2 µl M MulV buffer eklenir ve 0,5 µl (100 Ü) M MulV (reverse transkriptaz) eklenir ve distile su ile 20 µl ye tamamlanır.

Oluşan karışım 42°C de 60 dk nın ardından 85°C de 5 dk inkübe edilerek cDNA elde edilmiş olunur ve alikotlanarak -80°C de saklanır.

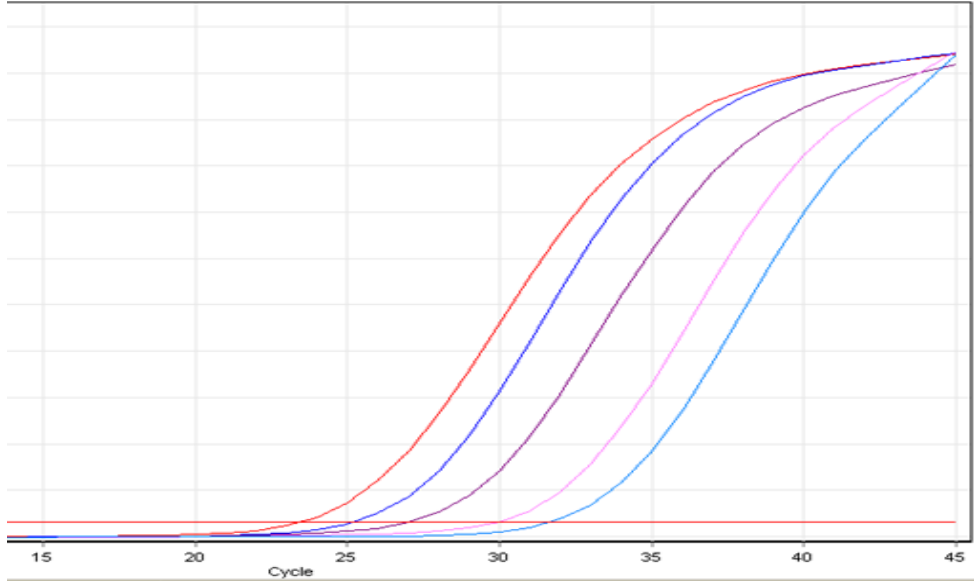
2.2.9. Ekspresyon Analizi

MCP-1 geni ve houskeeping gen olarak seçtiğimiz GAPDH (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase) geni ilgili primerler kullanılarak cDNA dan çoğaltıldı. Kantitatif Real time PZR (Rotor gene Q Qiagen USA) ile gen ekspresyonu tayinleri yapıldı.

Housekeeping gen seçiminde B-actin, 28S, 18S, RPL, UBB, GAPDH housekeeping genlerinin primer efficiency’leri yapıldı ve istatistik sonuçlarına göre en uygun housekeeping genin GAPDH olduğuna karar verildi. PZR etkinlik derecesi (Efficiency), $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

Ekspresyon standart eğri Standart cDNA sayısı elde etmek amacıyla Housekeeping gen olarak 93 bp’lık GAPDH DNA, hedef cDNA’dan klasik PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Daha sonra PZR ürünü isoproponal yöntemi ile presipite edildi ve saf 93 bp uzunluğunda GAPDH DNA’sı elde edildi. GAPDH DNA miktarı spektrofotometer cihazında ölçüldü ve 293 ng/µl olarak tespit edildi.

GAPDH DNA’sı 5 farklı logaritmik konsantrasyonda sulandırıldı. Her bir dilüsyondan GAPDH spesifik primerler ile Kantitatif Real time PZR yapıldı. Optimize olan dilüsyona bağlı GAPDH Kantitatif Real time PZR bulguları standart olarak kullanılmak üzere ekspresyon standart eğrileri elde edildi (şekil a).



Şekil 2.3. GAPDH primer efisiensi dilüsyon eğrileri

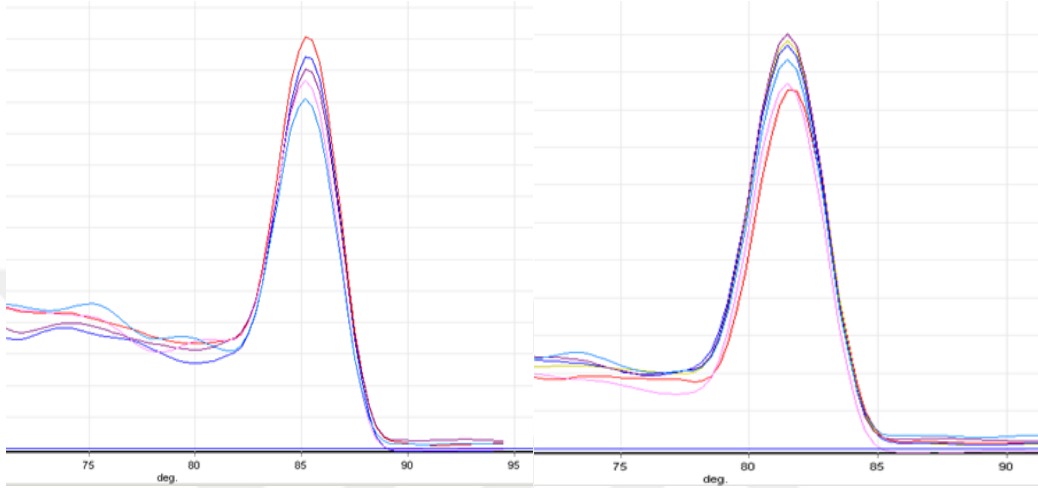
Kantitatif Real time PZR sonuçlarını dikkate alarak ekspresyon standart eğri çizildi. GAPDH ve MCP için ayrı tüpler alındı. Her bir tüpe 2 µl ilgili primerler eklendi ve üzerlerine 10 µl cDNA konuldu.

Kullanılan primerler:

GAPDH	Forward: 5'- CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG -3' 93 bç
	Reverse: 5'- CTGTTGAAGTCAGAGGAGACCA- 3'
MCP1	Forward: 5' - AGCAGAAGTGGGTTCAGGAT- 3' 82 bç
	Reverse: 5'- GGTTGTGGAGTGAGTGTTCAG- 3'

Bunun da üzerine 13 µl syber green (vivantis) eklendi ve aşağıdaki real time PZR protokolüne göre cihaza (rotor gene Q 5 plex+HRM (Qiagen) USA) yüklendi.

- 95⁰C 10 dk başlangıç denatürasyonu
 - 95⁰C 30 sn
 - 63⁰C 60 sn
 - 72⁰C 30 sn
- } 45 döngü
- 60⁰C den 95⁰C ye kadar her bir adımda (5sn) 1⁰C yükselerek melting curve değerleri ölçüldü.



Şekil 2.4. Soldaki GAPDH, Sağdaki MCP-1 melting curve eğrileri

Sonra CT (cycle treshhold) değerlerini aldık. Alınan ct değerleri aşağıdaki gibidir.

hasta no	Gapdh Ct	Mcp-1 Ct	hasta no	Gapdh Ct	Mcp-1 Ct	hasta no	Gapdh Ct	Mcp-1 Ct
9	17,46	19,95	6	17,84	19,7	53	18,17	20,48
26	17,96	19,8	45	17,69	20,73	27	16,44	19,44
12	17,64	20,54	63	17,16	19,99	49	17,32	20,5
20	17,32	19,61	30	14,2	20,04	23	16,19	19,9
22	17,32	20,78	67	18,3	21,81	15	18,15	21,65
1	17,68	21,36	33	17,4	21,69	61	17,13	21,66
4	17,01	21,92	47	18,43	22,18	56	16,38	20,54
37	17,27	19,29	40	18,34	20,96	34	18,1	21,75
17	16,31	20,81	60	15,22	19,85	32	16,92	22,78
25	17,49	20,24	28	16,09	21,27	29	15,96	19,76
41	15,09	21,52	7	18,55	22,35	2	17,42	22,17
58	16,88	21,45	8	17,06	21,52	13	17,18	21,9
s-1	16,1	20,17	48	16,16	21,48	42	17,36	21,36
s-2	19,05	22,8	39	16,28	19,64	5	17,38	22,68
s-3	18,71	20,6	3	17,28	20,8	21	17,08	19,66
16	17,71	17,94	38	16,14	20,42	55	18,54	19,9

Daha sonra rölatif gen ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı.

Hesaplamada önce her grup için mcp ve gapdh CT değerlerinin ortalaması alındı.
 $\Delta ct = \text{hedef gen ortalama CT} - \text{houskeeping gen ortalama CT}$

$\Delta\Delta ct = \text{hasta grup}(\Delta ct) - \text{kontrol grup}(\Delta ct)$

Kat farklılığı $2^{-\Delta\Delta ct}$ ile hesaplandı ve gruplar arasındaki ilişki araştırıldı.

2.3. İstatistik Analiz

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen veriler SPSS 20.0 (USA) programı kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasındaki genotip dağılımlarının ve allel frekanslarının karşılaştırılması ki-kare (X^2) testi ile yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda $p < 0.05$ olan sonuçlar önemli olarak kabul edildi. Ayrıca gruplar arasında MCP-1 gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla rölatif kantitasyon metodu kullanılarak kantitatif real time PZR analizi yapıldı ve sonuçlar $2^{-\Delta\Delta ct}$ livak metodu aracılığıyla değerlendirilerek kat artışları belirlendi.

3. BULGULAR

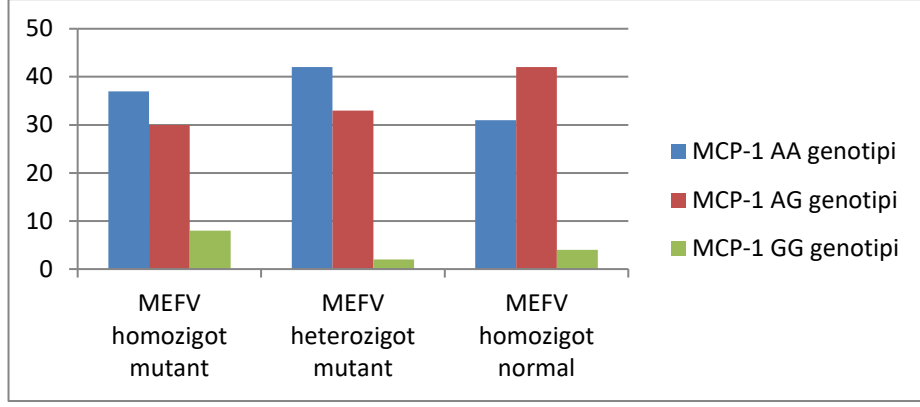
Çalışmaya Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D'nda MEFV gen analizi yapılmış 125 erkek ve 104 kadın toplam 229 birey dâhil edilmiştir. Bu bireylerden erkeklerin yaş ortalaması 22.91, kadınların yaş ortalaması ise 22.96 olarak tespit edilmiştir.

3.1. MEFV Gen Mutasyonları İle MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen bireylerin MEFV gen mutasyonları ile MCP-1 gen analizleri ve allel frekansları arasındaki ilişki çizelge 3.1'de görülmektedir.

Çizelge 3.1. MEFV geni ile MCP-1 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

		MCP-1 genotip			TOPLAM	MCP-1 allel	
		AA	AG	GG		A	G
MEFV Homozigot Mutant	Sayı	37	30	8	75	104	46
	Grup içindeki %	49,3	40	10,7	100		
	MCP-1 İçindeki %	33,6	28,6	57,1	32,8		
MEFV Heterozigot Mutant	Sayı	42	33	2	77	117	37
	Grup içindeki %	54,5	42,9	2,6	100		
	MCP-1 İçindeki %	38,2	31,4	14,3	33,6		
MEFV Homozigot Normal	Sayı	31	42	4	77	104	50
	Grup içindeki %	40,3	54,5	5,2	100		
	MCP-1 İçindeki %	28,2	40	28,6	33,6		
TOPLAM	Sayı	110	105	14	229	325	133
	Grup içindeki %	48	45,9	6,1	100		
	MCP-1 İçindeki %	100	100	100	100		



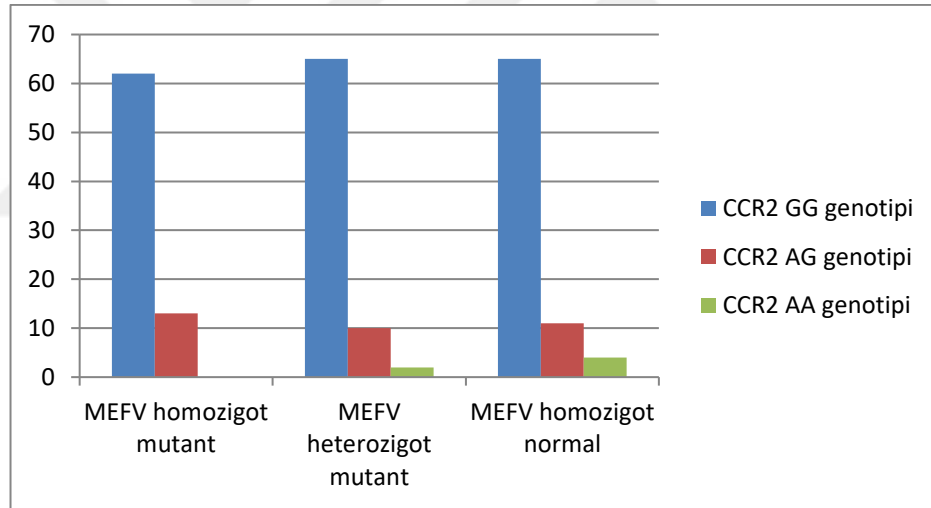
Şekil 3.1. MEFV geni ile MCP-1 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

MEFV homozigot mutant bireylerde MCP-1 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık AA genotipi (%49,3) olmak üzere AG (%40) ve GG (%10,7) şeklinde sıralanırken bunun MEFV geni heterozigot bireyler için en sık AA (%54,5) olmak üzere AG (%42,9) ve GG (%2,6) şeklinde olduğu MEFV geni homozigot normal bireylerde ise en sık AG (%54,5) olmak üzere AA (40,3) ve GG (%5,2) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p:0.097$). Allel frekanslarına bakıldığında MEFV geni homozigot mutant bireylerde MCP-1 A alleli %69, G alleli %31 oranında görülürken MEFV geni heterozigot bireylerde A alleli %76, G alleli %24 ve MEFV geni homozigot normal bireylerde ise A alleli %68, G alleli %32 oranında görüldü. Yapılan istatistiksel analizlerde ise bu dağılımın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p:0.377$).

Çalışmaya dahil edilen bireylerin MEFV gen analizleriyle CCR2 gen analizleri ve allel frekansları arasındaki ilişki çizelge 3.2’de görülmektedir.

Çizelge 3.2. MEFV geni ile CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

		CCR2 genotip			TOPLAM	CCR2 allel	
		GG	AG	AA		G	A
MEFV Homozigot Mutant	Sayı	62	13	0	75	137	13
	Grup içindeki %	82,7	17,3	0	100		
	CCR2 İçindeki %	33,6	38,2	0	32,8		
MEFV Heterozigot Mutant	Sayı	65	10	2	77	140	14
	Grup içindeki %	84,4	13	2,6	100		
	CCR2 İçindeki %	33,9	29,4	66,7	33,6		
MEFV Homozigot Normal	Sayı	65	11	1	77	141	13
	Grup içindeki %	84,4	14,3	1,3	100		
	CCR2 İçindeki %	33,9	32,4	33,3	33,6		
TOPLAM	Sayı	192	34	3	229	418	40
	Grup içindeki %	83,8	14,8	1,3	100		
	CCR2 İçindeki %	100	100	100	100		



Şekil 3.2. MEFV geni ile CCR2 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

MEFV geni homozigot mutant bireylerde CCR2 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık GG genotipi (%82,7) olmak üzere daha az sıklıkla AG (%17,3) görülmüştür ve AA genotipine ise hiç rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra MEFV geni heterozigot mutant bireyler için en sık GG (%84,4) genotipi olmak üzere sıralama AG (%13) ve GG (%2,6) şeklinde olduğu MEFV geni homozigot normal bireylerde de en sık GG (%84,4) olmak üzere AG (14,3) ve GG (%1,3) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0,648). Allel frekanslarına bakıldığında MEFV

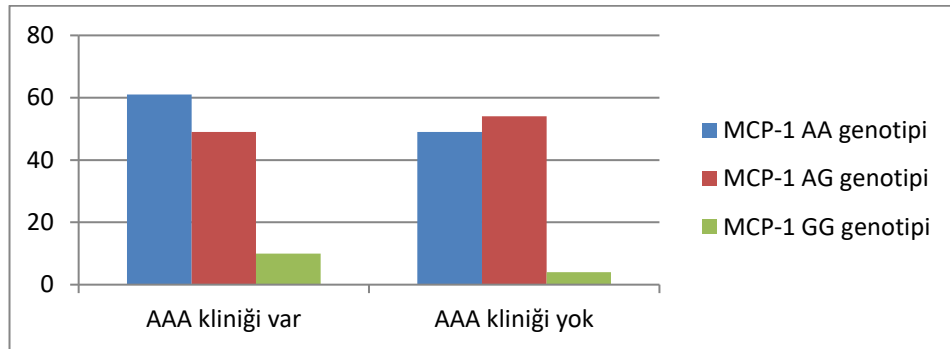
geni homozigot mutant bireylerde CCR2 G alleli %91,3, A alleli %8,7 oranında görülürken MEFV geni heterozigot bireylerde CCR2 G alleli %91, A alleli %9 ve MEFV geni homozigot normal bireylerde ise CCR2 G alleli %91,6, A alleli %8,4 oranında görüldü. Yapılan istatistiksel analizlerde ise bu dağılımın anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.887).

3.2. FMF Kliniği ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Çalışmaya alınan bireyler uluslararası tel-hashomer kriterleri kullanılarak FMF kliniği yönünden değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 120 bireyin FMF klinik pozitif, 107 bireyin FMF klinik negatif olduğu görüldü ve iki birey ise şüpheli klinik durum olarak tanımlandı. FMF kliniği olan ve FMF kliniği olmayan hastalardaki MCP-1 ve CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının karşılaştırılması çizelge 3.3-3.4’de görülmektedir.

Çizelge 3.3. FMF kliniğine göre MCP-1 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			MCP-1 genotip			TOPLAM	MCP-1 allel	
			AA	AG	GG		A	G
Klinik FMF	Var	Sayı	61	49	10	120	171	69
		Grup içindeki %	50,8	40,8	8,3	100		
		MCP-1 İçindeki %	55,5	46,7	71,4	52,4		
	Yok	Sayı	49	54	4	107	152	62
		Grup içindeki %	45,8	50,5	3,7	100		
		MCP-1 İçindeki %	44,5	51,4	28,6	46,7		
TOPLAM		Sayı	110	105	14	227	323	131
		Grup içindeki %	48	45,9	6,1	100		
		MCP-1 İçindeki %	100	100	100	100		

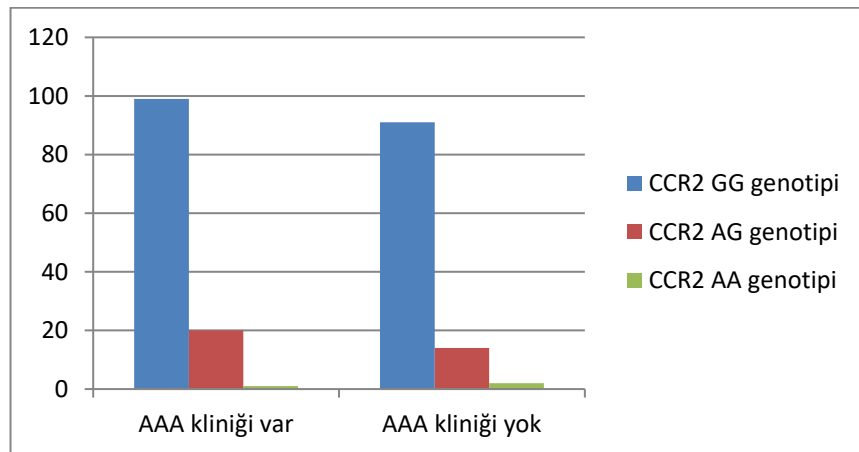


Şekil 3.3. FMF kliniğine göre MCP-1 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

FMF kliniği olan bireylerde MCP-1 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık AA genotipi (%50,8) olmak üzere AG (%40,8) ve GG (%8,3) şeklinde sıralanırken FMF kliniği olmayan bireyler için en sık AG (%50,5) olmak üzere AA (%45,8) ve GG (%3,7) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.216). Allel frekanslarına bakıldığında FMF kliniği olanlarda MCP-1 A alleli %71,3, G alleli % 28,7 bulunurken FMF kliniği olmayanlarda MCP-1 A alleli %71, G alleli %29 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.958)

Çizelge 3.4. FMF kliniğine göre CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			CCR2 genotip			TOPLAM	CCR2 allel	
			GG	AG	AA		G	A
Klinik FMF	Var	Sayı	99	20	1	120		
		Grup içindeki %	82,5	16,7	0,8	100	218	22
		CCR2 İçindeki %	51,6	58,8	33,3	52,4	%90.8	%9.2
	Yok	Sayı	91	14	2	107		
		Grup içindeki %	85	13,1	1,9	100	196	18
		CCR2 İçindeki %	47,4	41,2	66,7	46,7	%91.6	%8.4
TOPLAM		Sayı	192	34	3	227		
		Grup içindeki %	83,8	14,8	1,3	100	414	40
		CCR2 İçindeki %	100	100	100	100	%91.2	%8.8



Şekil 3.4. FMF kliniğine göre CCR2 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

FMF kliniği olan bireylerde CCR2 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık GG genotipi (%82,5) olmak üzere AG (%16,7) ve GG (%0,8) şeklinde sıralanırken

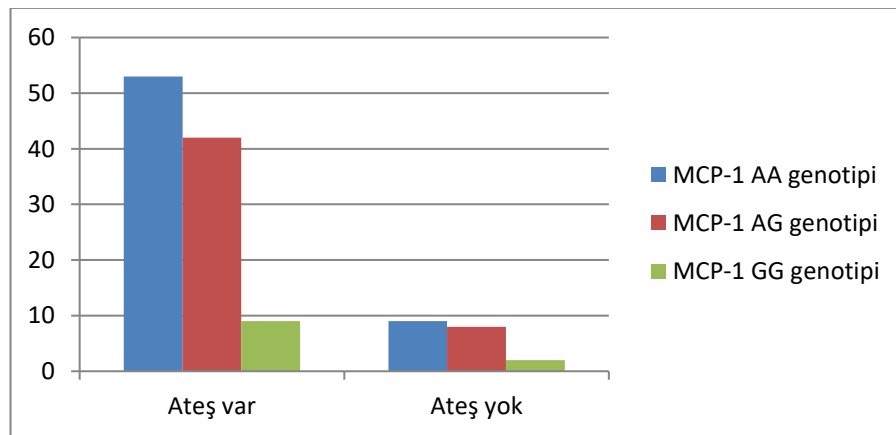
FMF kliniği olmayan bireyler içinde en sık GG (%85,0) olmak üzere AG (%13,1) ve GG (%1,9) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.847). Allel frekanslarına bakıldığında FMF kliniği olanlarda CCR2 G alleli %90.8, A alleli %9.2 bulunurken FMF kliniği olmayanlarda G alleli %91.6, A alleli %8.4 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.906).

3.3. FMF’li Hastalarda Ateş ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Klinik olarak FMF hastası olan 120 hasta ve şüpheli klinik durum olarak tanımlanan iki hastada gözlenen ateşin MCP-1 ve CCR2 genotipleri ile karşılaştırılması çizelge 3.5-3.6’da görülmektedir.

Çizelge 3.5. Ateş ile MCP1 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			MCP-1 genotip			TOPLAM	MCP allel	
			AA	AG	GG		A	G
Ateş	Var	Sayı	53	42	9	104		
		Ateş içindeki %	51	40,4	8,7	100	148	60
		MCP1 İçindeki %	85,5	84	90	85,2	%71.1	%28.9
	Yok	Sayı	9	8	1	18		
		Ateş içindeki %	50	44,4	5,6	100	26	10
		MCP1 İçindeki %	14,5	16	10	14,8	%72.2	%27.8
TOPLAM		Sayı	62	50	10	122		
		Ateş içindeki %	50,8	41	8,2	100	174	70
		MCP1 İçindeki %	100	100	100	100	%71.3	%28.7

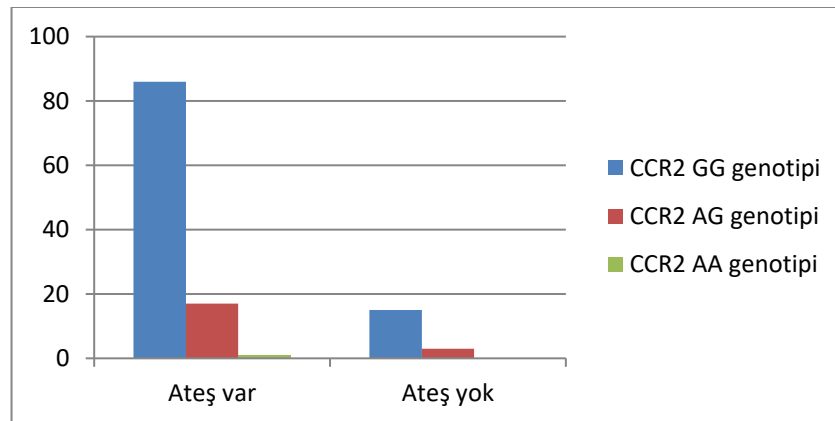


Şekil 3.5. Ateş ile MCP1 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

Ateş semptomu olan bireylerde MCP-1 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık AA genotipi (% 51,0) olmak üzere AG (%40,4) ve GG (%8,7) şeklinde sıralanırken ateş semptomu olmayan bireyler içinde en sık AA (%50,0) olmak üzere AG (%44,4) ve GG (%5,6) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.885). Allel frekanslarına bakıldığında ateşi olanlarda MCP-1 A alleli %71.1, G alleli % 28.9 bulunurken ateşi olmayanlarda MCP-1 A alleli %72.2, G alleli %27.8 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.895).

Çizelge 3.6. Ateş ile CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			CCR2 genotip			TOPLAM	CCR2 allel	
			GG	AG	AA		G	A
Ateş	Var	Sayı	86	17	1	104		
		Ateş içindeki %	82,7	16,3	1	100	189	19
		CCR2 İçindeki %	85,1	85	100	85,2	%90.9	%9.1
	Yok	Sayı	15	3	0	18		
		Ateş içindeki %	83,3	16,7	0	100	33	3
		CCR2 içindeki %	14,9	15	0	14,8	%91.7	%8.3
TOPLAM		Sayı	101	20	1	122		
		Ateş içindeki %	82,8	16,4	0,8	100	222	22
		CCR2 içindeki %	100	100	100	100	91%	9%



Şekil 3.6. Ateş ile CCR2 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

Ateş semptomu olan bireylerde CCR2 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık GG genotipi (%82,7) olmak üzere AG (%16,3) ve AA (%1) şeklinde sıralanırken ateş semptomu olmayan bireyler içinde en sık GG (%83,3) olmak üzere daha az

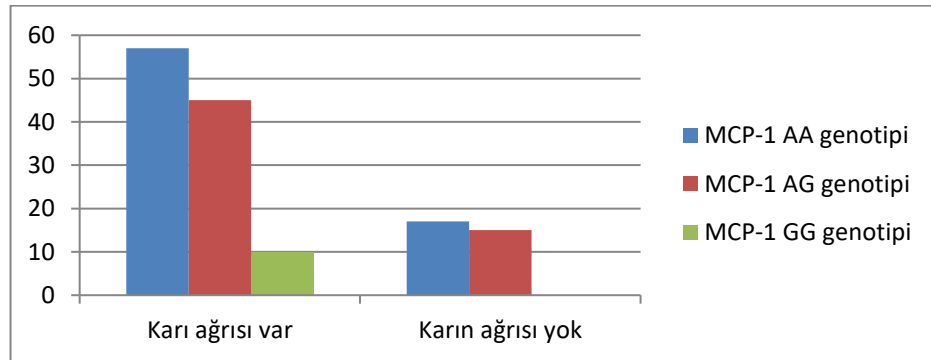
sıklıkta AG (%16,7) saptanmıştır ve AA genotipine ise hiç rastlanmamıştır. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.962). Sonrasında allel frekanslarına bakıldığında Ateşi olanlarda CCR2 G alleli %90.9, A alleli %9.1 bulunurken Ateşi olmayanlarda G alleli %91.7, A alleli %8.3 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.876).

3.4. FMF’li Hastalarda Karın Ağrısı ile MCP-1 ve CCR2 Genotip Dağılımlarının ve Allel frekanslarının karşılaştırılması:

Klinik olarak FMF hastası olan ve karın ağrısı şikayeti mevcut 112 hastanın MCP-1 ve CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının karşılaştırılması çizelge 3.7-3.8’de görülmektedir.

Çizelge 3.7. Karın ağrısı ve mcp-1 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			MCP-1 genotip			TOPLAM	MCP-1 allel	
			AA	AG	GG		A	G
Karın Ağrısı	Var	Sayı	57	45	10	112		
		Karın ağrısı içindeki %	50,9	40,2	8,9	100	159	65
		MCP1 İçindeki %	77	75	100	77,8	71%	29%
	Yok	Sayı	17	15	0	32		
		Karın ağrısı içindeki %	53,1	46,9	0	100	49	15
		MCP1 İçindeki %	23	25	0	22,2	%76.5	%23.5
TOPLAM		Sayı	74	60	10	144		
		Ateş içindeki %	51,4	41,7	6,9	100	208	80
		MCP1 İçindeki %	100	100	100	100	%72.2	%27.8

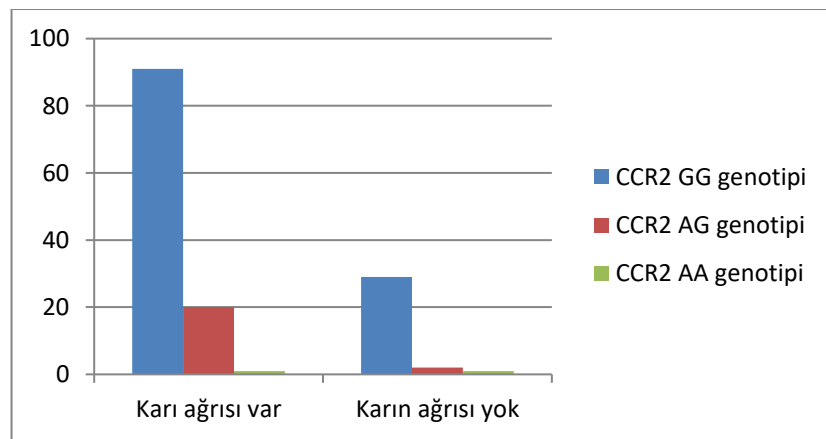


Şekil 3.7. karın ağrısı ile MCP1 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

Karın ağrısı olan bireylerde MCP-1 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık AA genotipi (%50,9) olmak üzere AG (%40,2) ve GG (%8,9) şeklinde sıralanırken Karın ağrısı olmayan bireyler için en sık AA (%53,1) genotipi olmak üzere daha az sıklıkta AG (%46,9) genotipine rastlanmıştır ve GG genotipine ise hiç rastlanmamıştır. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.207). Allel frekanslarına bakıldığında karın ağrısı olanlarda MCP-1 A alleli %71, G alleli % 29 bulunurken karın ağrısı olmayanlarda MCP-1 A alleli %76.5, G alleli %23.5 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.3794)

Çizelge 3.8. Karın ağrısı ve CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			CCR2 genotip			TOPLAM	CCR2 allel	
			GG	AG	AA		G	A
Karın Ağrısı	Var	Sayı	91	20	1	112	202	22
		Karın ağrısı içindeki %	81,2	17,9	0,9	100		
		CCR2 içindeki %	75,8	90,9	50	77,8		
	Yok	Sayı	29	2	1	32	60	4
		Karın ağrısı içindeki %	90,6	6,2	3,1	100		
		CCR2 içindeki %	24,2	9,1	50	22,2		
TOPLAM		Sayı	120	22	2	144	262	26
		Ateş içindeki %	83,3	15,3	1,4	100		
		MCPI İçindeki %	100	100	100	100		
							91%	9%



Şekil 3.8. Karın ağrısı ile CCR2 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

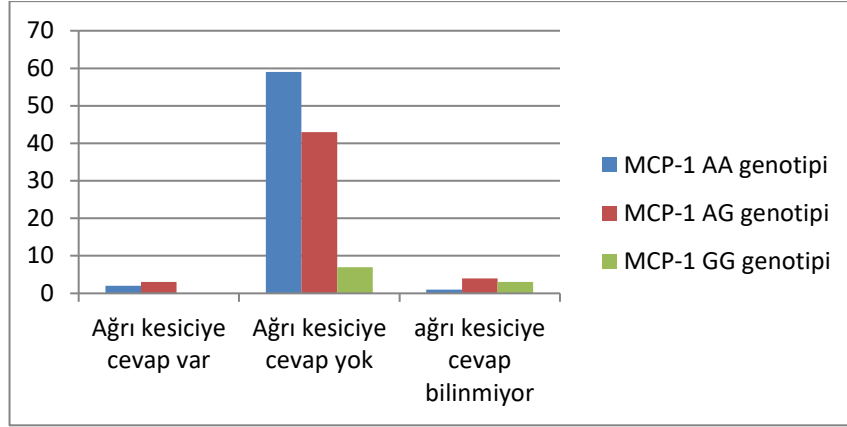
Karın ağrısı olan bireylerde CCR2 genotip dağılımlarına bakıldığında en sık GG genotipi (%81,2) olmak üzere AG (%17,9) ve GG (%0,9) şeklinde sıralanırken Karın ağrısı olmayan bireyler için en sık GG (%90,6) genotipi olmak üzere AG (%6,2) ve AA (%3,1) olarak sıralandığı görülmüştür. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.187). Allel frekanslarına bakıldığında karın ağrısı olanlarda CCR2 G alleli %90.1, A alleli %9.9 bulunurken karın ağrısı olmayanlarda G alleli %93.75, A alleli %6.25 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.3793)

3.5. FMF'lı hastalarda ağrı kesiciye cevap verme ile MCP-1 ve CCR2 genotip dağılımlarının ve allel frekanslarının karşılaştırılması:

FMF kliniği olan hastaların ağrılı atak dönemlerinde ağrı kesici ilaç kullanımları ve ilaca aldıkları cevap ile MCP-1 ve CCR2 genotipleri'nin ve allel frekanslarının karşılaştırılması çizelge 3.9-3.10 'da görülmektedir.

Çizelge 3.9. Ağrı kesiciye cevap ve MCP-1 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			MCP1 genotip			TOPLAM	MCP-1 allel	
			AA	AG	GG		A	G
Ağrı Kesiciye Cevap	Var	Sayı	2	3	0	5	7	3
		Grup içindeki %	40	60	0	100		
		MCP1 İçindeki %	3,2	6	0	4,1		
	Yok	Sayı	59	43	7	109	161	57
		Grup içindeki %	54,1	39,4	6,4	100		
		MCP1 İçindeki %	95,2	86	70	89,3		
	Bilinmiyor	Sayı	1	4	3	8	6	10
		Grup içindeki %	12,5	50	37,5	100		
		MCP1 İçindeki %	1,6	8	30	6,6		
TOPLAM		Sayı	62	50	10	122	174	70
		Grup içindeki %	50,8	41	8,2	100		
		MCP1 İçindeki %	100	100	100	100		

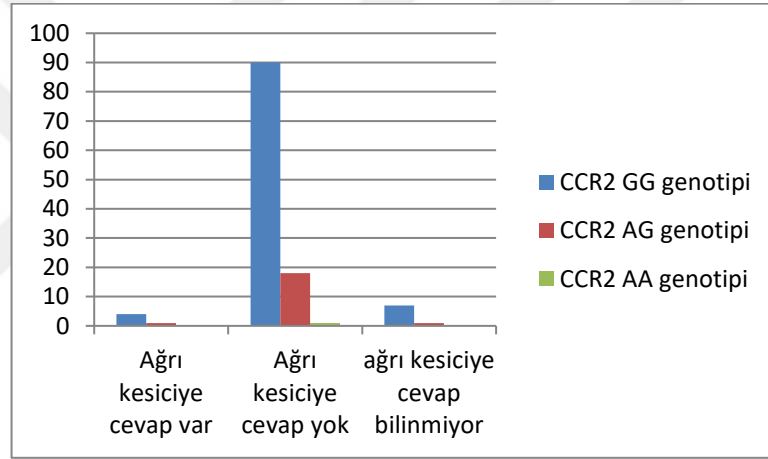


Şekil 3.9. Ağrı kesiciye cevap ile MCP-1 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

FMF kınığı olup ağrı kesici ilaca cevapları ve MCP-1 genotip dağılımlarına bakıldığında ağrı kesiciye cevap olan grupta en sık AG genotipi (%60,0) olmak üzere daha az sıklıkta AA (%40,0) genotipi görülmekte ve GG genotipi ise hiç görülmemektedir. Ağrı kesiciye cevap olmayan grupta ise en sık AA (%54,1) genotipi olmak üzere daha sonra AG (%39,4) ve GG (%6,4) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p:0.014$). Fakat özellikle ilaca cevap veren hasta sayısının az olması nedeniyle sağlıklı bir değerlendirme olmayacaktır. Daha geniş katılımlı bir araştırma yapılması uygun olacaktır. Allel frekanslarına bakıldığında ağrı kesiciye cevap olanlarda MCP-1 A alleli %70, G alleli % 30 bulunurken ağrı kesiciye cevap olmayanlarda MCP-1 A alleli %73.8, G alleli %26.2 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p:0.7867$).

Çizelge 3.10. Ağrı kesiciye cevap ile CCR2 genotiplerinin ve allel frekanslarının dağılımı

			CCR2 genotip			TOPLAM	CCR2	
			GG	AG	AA		allel	
							G	A
Ağrı Kesiciye Cevap	Var	Sayı	4	1	0	5	9 90%	1 10%
		Grup içindeki %	80	20	0	100		
		CCR2 içindeki %	4	5	0	4,1		
	Yok	Sayı	90	18	1	109	198 %90.8	20 %9.2
		Grup içindeki %	82,6	16,5	0,9	100		
		CCR2 içindeki %	89,1	90	100	89,3		
	Bilinmiyor	Sayı	7	1	0	8	15 %93.75	1 %6.25
		Grup içindeki %	87,5	12,5	0	100		
		CCR2 içindeki %	6,9	5	0	6,6		
TOPLAM		Sayı	101	20	1	122	222 91%	22 9%
		Grup içindeki %	82,8	16,4	0,8	100		
		CCR2 içindeki %	100	100	100	100		



Şekil 3.10. Ağrı kesiciye cevap ile CCR2 genotiplerinin dağılımının grafiksel gösterimi

FMF kınığı olup ağrı kesici ilaç kullanan bireyler ve ilaca verdikleri cevap ile CCR2 genotip dağılımlarına bakıldığında ağrı kesiciye cevap olan grupta en sık GG genotipi (%80,0) olmak üzere daha az sıklıkta AG (%20,0) genotipi görülmekte ve AA genotipi ise hiç görülmemektedir. Ağrı kesiciye cevap olmayan grupta ise en sık GG (%82,6) genotipi olmak üzere daha sonra AG (%16,5) ve GG (%0,9) şeklinde sıralandığı görülmektedir. Sonrasında yapılan istatistik analizlerde bu dağılımın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.992). Allel frekanslarına bakıldığında Ağrı kesiciye cevap olanlarda CCR2 G alleli %90, A alleli %10 bulunurken Ağrı kesiciye cevap olmayanlarda G alleli %90.8, A alleli %9.2 oranında bulundu. Sonrasında yapılan istatistiksel analizde bu allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (p:0.9296).

3.6. Ekspresyon analizleri

FMF'daki heterozigot ve homozigot mutasyonlar ve FMF'daki klinik durum ile MCP-1 geni promotor bölgede yer alan A-2518G polimorfizminin mcp-1 gen ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırıldı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Çizelge 3.11. MCP-1 genotipleri ile MCP-1 ekspresyon düzeyleri

	MCP-1 ct*	GAPDH ct*	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct
MCP-1 GG genotipi (homozigot mutant)	19,44	17,01	2,43	-1,62
MCP-1 AG genotipi (heterozigot mutant)	20,85	17,43	3,42	-0,63
MCP-1 AA genotipi (homozigot normal)	21,03	16,99	4,05	

*ortalama ct değerleri

$$2^{-\Delta\Delta ct} = 2^{-(-0,63)} = 1,55 \text{ kat artış}$$

Mcp-1'in promotor bölgesindeki AG(heterozigot mutant) genotipinde AA(normal) genotipine göre MCP-1'in 1,55 kat daha fazla eksprese olduğu bulundu.

$$2^{-\Delta\Delta ct} = 2^{-(-1,62)} = 3,07 \text{ kat artış}$$

Mcp-1'in promotor bölgesindeki GG(homozigot mutant) genotipinde AA(normal) genotipine göre MCP-1'in 3,07 kat daha fazla eksprese olduğu bulundu.

Çizelge 3.12. MEFV mutasyonları ile MCP-1 ekspresyonları

	MCP-1 ct*	GAPDH ct*	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct
MEFV Homozigot mutant	20,68	17,44	3,24	-0,88
MEFV Heterozigot mutant	20,94	17,15	3,79	-0,33
MEFV homozigot normal	20,86	16,75	4,11	

*ortalama ct değerleri

$$2^{-\Delta\Delta ct} = 2^{-(-0,33)} = 1,25 \text{ kat artış}$$

MEFV geni heterozigot mutant bireylerde MEFV geni homozigot normal bireylere göre Mcp-1'in ekspresyonu 1,25 kat daha fazla eksprese olduğu bulundu.

$$2^{-\Delta\Delta ct}=2^{-(-0,88)}=1,84 \text{ kat artış}$$

MEFV geni homozigot mutant bireylerde MEFV geni homozigot normal bireylere göre Mcp-1'in ekspresyonu 1,84 kat daha fazla eksprese olduğu bulundu.

Çizelge 3.13. FMF kliniği ile MCP-1 ekspresyonları

	MCP-1 ct*	GAPDH ct*	Δct	$\Delta\Delta ct$
FMF kliniği var	17,45	20,68	3,23	-0,95
FMF kliniği yok	16,81	20,99	4,18	

*ortalama ct değerleri

$$2^{-\Delta\Delta ct}=2^{-(-0,95)}=1,93 \text{ kat artış}$$

FMF kliniği olan bireylerde FMF kliniği olmayan bireylere göre MCP-1 ekspresyonu 1,93 kat artmış olarak bulundu.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnflamatuvar sistemik hastalıklar ile MCP-1/CCR2 ilişkisinin araştırıldığı pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Bu çalışmaların çoğunda özellikle MCP-1 ile olmak üzere inflamatuvar hastalıklar arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda inflamatuvar akciğer hastalıklarından olan astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH) inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunun kemokin ve kemokin reseptörleri tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (Guerra 2005, Barnes 2008). MCP-1 ve onun reseptörü olan CCR2'nin kronik obstrüktif akciğer hastalığı'nda hava yolları epiteline monositlerin yönlendirilmesinde majör rolü oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca migrasyon sırasında monositlerin makrofajlara dönüştüğü bunun da KOAH hastalarının akciğerlerinde makrofaj birikimine yol açtığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Kronik Akciğer hastalığı olan bireylerin Bronko Alveolar Lavaj (BAL) sıvılarında MCP-1 seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (De boer ve ark 2000, Traves ve ark 2002, Donnelly ve barnes 2006).

Astımda öncelikle hava yolu inflamasyonundan, aktive olmuş Th 2 (T helper 2) lenfositleri, eozinofiller ve mast hücreleri sorumlu tutulmaktadır (Bousqueut ve ark 2000, Ying ve ark 2006). İnsan Akciğer mast hücreleri çok sayıda farklı kemokin reseptörleri eksprese etmektedir. Bunların arasında CCR1, CCR3, CXCR1, CXCR3 ve CXCR4'ü saymak mümkündür (Galli ve ark 2005).

Ayrıca, Th 2 lenfosit hücreleri üzerindeki CCR2 reseptörlerinin ve onun ligandı olan MCP-1'nin Astımda ki T lenfosit hücre etkinliğinde önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir. CCR2 geni susturulmuş farelerin alerjen maruziyeti sonrası bronşiyal hiperaktivasyona direnç sergiledikleri gösterilmiştir (campbell ve ark 1999).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı şeklinde majör iki form ile karakterize edilebilen İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezinde kemokinlerin katkısını belirlemek için son dönemde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Bamias ve ark 2003, Monteleone ve ark 2009). Bu çalışmalarda özellikle farklı bir kaç kemokinin etkin olduğu ve hastalığın aktif fazları sırasında ekspresyon düzeylerinin belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Bunlardan özellikle CXCL8, CXCR1, CXCR2'nin inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastaların intestinal epitel hücrelerinde anlamlı düzeyde arttığı

gösterilmiştir (Puleston ve ark 2005). Buna ilave olarak CCR1, CCR2, CCR3 reseptörlerinin ve bunların ligandlarından MCP-1, CCL3, CCL4, CCL5'in inflamatuvar bağırsak hastalığında arttığı rapor edilmiştir (Banks ve ark 2003, Danese ve gabbarini 2005, Singh ve ark 2007). Ayrıca CCR2 ve CCR5 genleri susturulmuş fareler üzerinde yapılan bir çalışmada bu farelerde oluşturulan kolitte kolonik inflamasyon oranının kontrol grubuna göre belirgin oranda az olduğu belirlenmiştir (Andres ve ark 2000, Tokuyama ve ark 2005).

Romatoid Artrit'te ise lökositlerin sinovyaya göçünün çok aşamalı bir süreci tetiklediği ve bu süreçte özellikle kemokin ve kemokin reseptörlerinin etkin olduğu rapor edilmiştir (Buckley 2003). Bunlardan CCR2'nin ligandı olan MCP-1 nin Romatoid Artrit'li hastalarda sinovyal dokuda yüksek oranda eksprese olduğu belirlenmiştir (Koch ve ark 1992). Buna ilave olarak MCP-1 düzeyinin de Romatoid Artrit'li hastalarda periferik kanda, sinovyal sıvıda ve sinovyal dokuda yükseldiği ve bu yükselmenin T lenfositlerin ve özellikle monosit/makrofaj'ların migrasyonu üzerinde mediatör etki gösterdiği saptanmıştır. Bu hücrelerinde doğrudan sinovitin başlayıp sürmesine ve sonuçta da Romatoid Artrit hastasında izlenen eklem destrüksiyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (Haringman ve ark 2005).

Kollajenle indüklenmiş Rat artrit modellerinde MCP-1 antikoru aracılığıyla uygulanan tedavilerde eklem İnflamasyonun da belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Ogata ve ark 1997). Bu bulgular daha sonra CCR1/2 antagonistleri kullanılarak konfirme edilmiştir (Gong ve ark. 1997). İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda Romatoid Artrit (RA) gibi kronik eklem hastalıklarında sinoviyal fibroblastlarda ve doku makrofajlarında MCP-1 ve MIP-1 α salınımının arttığı ve bunun da patogenez üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Adams ve Llyod 1997, Luster 1998, Arimilli ve ark 2000).

Ateroskleroz'daki inflamasyonun gelişiminde MCP-1 ve CCR2'nin önemli rolleri olduğu MCP-1 ve CCR2 genleri susturulmuş farelerde yapılan deneylerle ortaya konmuştur. MCP-1 veya onun reseptörü olan CCR2'nin en az birinde oluşturulan delesyonun monositlerin ve T hücrelerinin damar lümeninden intimaya geçişini ve dolayısıyla ateroskleroz oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir (Boring ve ark 1998, Gu ve ark 1998, Breland ve ark 2010). Yeni kuşak CCR2 antagonistleriyle CCR2 inhibisyonu'nun sıçan ateroskleroz modellerinde lezyon bölgesinde makrofaj

infiltrasyonu'nu %30 oranında azalttığı saptanmıştır (Olzinski ve ark 2010). Ayrıca yapılan diğer farklı çalışmalar da çok sayıda farklı kemokinin aterosklerotik süreçte etkili olduğunu göstermiştir (Potteaux ve ark 2006, Braunersreuther ve ark 2007).

SSS nin inflamatuvar bir hastalığı olan multipl sklerozda da kemokin ve kemokin reseptörlerinin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir. Deneysel otoimmün ensefalomyelit oluşturulmuş hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda kemokin ve kemokin reseptörlerinin multiple skleroz patogenezinde katıldığı gösterilmiştir (Szcucinski ve losy 2007, Proudfoot ve ark 2008). Ayrıca insan multiple skleroz lezyonlarında da yüksek MCP-1 düzeyleri tespit edilmiştir (Mc manus ve ark 1998, Ubogu ve ark 2006).

MCP-1 ve CCR2 genleri susturulmuş farelerin deneysel otoimmün ensefalomyelit oluşumuna dirençli olduğu ve klinik semptomlar geliştirmedeği rapor edilmiştir (İzikson ve ark 2000, Huang ve ark 2001). Bunun yanında CCR2 antagonistleri ile tedavi edilen multiple skleroz'lu farelerde klinik semptomlarda belirgin düşüşlerin gözlemlenmesi CCR2'nin multiple skleroz patogenezin de önemli bir rolü'nün olabileceğini düşündürmüştür (Brodmerkel ve ark 2005, Handel ve ark 2008).

Derinin inflamatuvar bir hastalığı olan psöriazisin gelişiminde lökosit, sitokin ve kemokinlerin öncü rolleri bulunmaktadır (Lew ve ark 2004, Nickoloff ve nestle 2004, lowes ve ark 2007, nickoloff ve ark 2007). Psöriazis de ki keratonositlerde farklı kemokinlerin ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (De Groot ve ark 2007, Homey ve meller 2008). Burada MCP-1, CCR2 aracılığıyla psöriatik plaklara makrofajların katılımı indüklenirken CCL3, CCL4 ve CCL5 ise CCR1 ve CCR5 aracılığıyla da T hücrelerinin katılımını indüklemektedir (De Groot ve ark 2007). Normal sağlıklı deride MCP -1 varlığı saptanamazken psöriaziste deride yüksek oranda MCP-1 tespit edilmektedir (Duque ve ark 1997).

Proliferatif glomerülonefritli böbrek hastalıklarının da glomerüllerin histokimyasal incelemesinde MCP-1 kemokinlerinin miktarının arttığı gözlemlenmiştir (Rovin ve ark 1994). Glomerülonefritlerde üriner IL-8 ve MCP-1 atılımı ile lökosit infiltrasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Mı-la cho ve arkadaşlarının 2004 yılında Kore’de yaptıkları bir çalışmada Behçet hastalığında MCP-1(A-2518G) polimorfizminde kanda MCP-1 seviyesinin normal kontrollere göre arttığı tespit edilmiştir (Cho ve ark 2004).

Bunların yanında Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) otoenflamatuvar periyodik ateş ataklarıyla karakterize genetik geçişli hastalıkların en yaygın olanıdır (Gretau 2004). Ülkemizde Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) çalışma grubunun verlerine göre Ailevi Akdeniz Ateşi’nin hesaplanmış tahmini prevalansı 1/1075, taşıyıcılık oranı ise 1/5 olarak bulunmuştur (Nussbaum ve ark 2001). Hardy-weinberg eşitliğine göre hasta prevalansının yaklaşık olarak %13-16 olması beklenirken yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu oran daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç hastalığın patogenezinde ve klinik bulgularının ortaya çıkmasında çevresel faktörler ile birlikte infalamatuvar etkinliğe sahip diğer genlerin de rolü olabileceğini düşündürmüştür (Nussbaum ve ark 2001). 2007 yılında 192 Ailevi Akdeniz Ateşi’li hastada yapılan bir çalışmada MEFV gen lokusu dışında başka gen/genlerdeki mutasyonların da fenotipi etkileyebileceği ileri sürülmüş ve bu durumun gen mutasyon analizleriyle araştırılması önerilmiştir (Yosunkaya 2007).

Ailevi Akdeniz Ateşi klinik açıdan (klinik bulguların ağırlığı, başlangıç yaşı, atakların sıklığı ve şiddeti gibi) geniş bir yelpaze göstermektedir. Klinik spektrumda gözlenen bu belirgin farklılıklar hastalığın patogenezinde pirin proteini dışında başka faktörlerinde rolü olabileceği düşüncesini akla getirmiştir. Ailevi Akdeniz Ateşinin inflamatuvar bir hastalık olması nedeniyle inflamatuvar süreçte rol alan moleküllerin Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının klinik bulguları’nda gözlemlenen bu farklılıkların araştırılmasına yönelik çabalarda öncelikli hale getirmiştir. Ailevi Akdeniz Ateşinde ki inflamasyonda monositlerin /makrofajların önemli görevleri bulunmaktadır. Bu hücrelerin inflamasyon alanına yönlendirilmesi üzerinde etkili olan pek çok faktör bulunmasına rağmen MCP-1 ve reseptörü olan CCR2’nin bu hücreler üzerinde güçlü bir kemotaktik etki gösterdiği bilinmektedir (Cochran ve ark).

İnflamatuvar sistemik hastalıklar ile MCP-1/CCR2 ilişkisinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmasına rağmen Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığıyla MCP-1/CCR2 genotip ve ekspresyon ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde hali hazırda rastlanamamıştır.

Bu doğrultuda yaptığımız çalışmamızda MEFV geni için homozigot mutasyon ve heterozigot mutasyon taşıyan kişiler ile MEFV geni homozigot normal bireyler arasında MCP-1 ve CCR2 genleri açısından gerek genotip gerekse allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanında MEFV geninde heterozigot mutasyon taşıyan grupta MCP-1 gen ekspresyon düzeylerinin MEFV geni homozigot normal olan gruba göre 1,25 kat, arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca MEFV geninde homozigot mutasyon taşıyan grupta ise MCP-1 geni ekspresyon düzeylerinin MEFV geni homozigot normal gruba göre 1,84 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular MEFV gen mutasyonlarının MCP-1 ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Burada birbirleriyle ilişkileri şu ana kadar belirlenememiş iki farklı genin transkripsiyonel düzeyde birbirlerini etkilediğini düşündürmüştür. Özellikle mutant allel sayısı ile ilişkili olarak ekspresyonun da artıyor olması bu düşüncemizi desteklemektedir. Fakat böyle bir ilişkiden bahsedebilmek için bizim bir ipucu sağladığını düşündüğümüz verilerimizin daha ileri fonksiyon çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir. Burada bizim verilerimizi destekleyici yeni verilerin bulunması Ailevi Akdeniz Ateşi kliniğinde gözlemlenen farklılıkları daha iyi anlamamızı sağlayabilecektir. Bunun yanında elde edilecek destekleyici veriler yukarıda bahsettiğimiz ve şu ana kadar patogenezi tam olarak belirlenememiş diğer enflamatuvar hastalıkların da moleküler temelini anlamamıza yardımcı olabilecektir.

Çalışmamızda ayrıca Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği ile MCP-1 ve CCR2 genotipleri ve allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamazken Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği olan hastalarda MCP-1 ekspresyonunun kliniği olmayan gruba göre 1,93 kat arttığı görülmüştür. Bu artış Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği ile MCP-1 ekspresyonu arasında pozitif bir ilişkinin olabileceği şeklinde değerlendirilerek hastalığın patogenezi ve klinik çeşitliliğin oluşmasında bu verinin önemli olabileceğini düşündürmüştür. Yine de bu verilerin daha geniş ve ileri çalışmalarla konfirme edilmesi gerekmektedir.

Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği olan bireylerde karın ağrısı ve ateş bulguları ile MCP-1 ve CCR2 genotipleri ve allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği ile MCP-1 ve CCR2 genotipleri arasında ilişki olmaması majör klinik bulgular olan ateş ve karın ağrısı arasında da anlamlı ilişki olmamasıyla uyumlu bulunmuştur.

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında atak esnasında kullanılan ağrı kesiciye cevap verme ile MCP-1 ve CCR2 genotipleri ve allel frekansları arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Bunlardan MCP-1 genotipi ile ağrı kesiciye cevap verme arasında istatistiksel bir ilişki gözlemlenmesine rağmen ilaca cevap veren gruptaki birey sayısının az olması nedeniyle bunlar arasında anlamlı bir ilişkinin varlığından bahsetmenin yanıltıcı olacağı düşüncesindeyiz. Bu nedenle gözlemlenen bu ilişkinin anlamlı olup olmadığının değerlendirilmesi için daha geniş çaplı araştırmaların yapılması uygun olacaktır. Bunun yanında CCR2 genotipi, CCR2 ve MCP-1 allel frekansları ile ağrı kesiciye cevap arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda ayrıca MCP-1 genotipleri ile MCP-1 ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve MCP-1 heterozigot bireylerde MCP-1 ekspresyonunun 1,55 kat artarken MCP-1 homozigot mutant bireylerde ise MCP-1 ekspresyonu 3,07 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu artış MCP-1 mutant genotipi taşıyan bireylerde inflamatuvar sürecin daha ağır gelişmesinin olası olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Homozigot mutant genotipte (A-2518G) ekspresyon düzeyindeki artış gözlemlememiz inflamasyon bölgesine monosit/makrofaj göçünü artırdığı, bunda daha fazla MCP-1 salınımına yol açarak inflamasyon gelişimini şiddetlendirdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Bu çalışma da Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği olan hasta grubun da Ailevi Akdeniz Ateşi kliniği olmayan gruba göre MCP-1 ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Burada Ailevi Akdeniz Ateşi hastası olmayan grupta MCP-1 genotipi açısından mutant ve normal alleli taşıyan bireylerde saptanmıştır. Ayrıca Ailevi Akdeniz Ateşi hastası bireyler içerisinde MCP-1 gen ekspresyon bakımından MCP-1 heterozigot mutant ve homozigot mutant bireyler de homozigot normal bireyler ile karşılaştırıldığında homozigot normallerdekinden yüksek tespit edilmiştir. Bu bulguların hepsi beraber değerlendirildiğinde Ailevi Akdeniz Ateşi patogenezi ile MCP-1 proteininin ilişkili olduğu görülmektedir. Bu ilişki muhtemelen MCP-1 proteininin Ailevi Akdeniz Ateşi'ndeki inflamatuvar atakların tetiklenmesinde ve klinik bulguların oluşmasındaki sinyal yollarında rol oynamasıyla ilişkili olabilir. Ailevi Akdeniz Ateşi'ndeki ataklar sırasında serozal bölgelere toplanan lökositlerden kemotaktik faktörler salgılamakta ve bunun etkisiyle inflamatuvar alana daha fazla lökosit çekilmekte ve neticede inflamatuvar atağın şiddeti artmaktadır (Bareli ve ark 1981). Literatürdeki bu bilgiyle uyumlu olarak çalışmamızda MCP-1 (A-2518G) genotipi açısından homozigot mutant bireylerde MCP-1 ekspresyonunun artması MEFV geninde aynı

mutasyonu taşıyan bireylerdeki farklı klinik tabloların oluşmasından sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. MEFV gen mutasyonu yanında MCP-1 ekspresyonu artmış bireylerde ateş, karın ağrısı eklem ağrısı gibi klinik bulgular daha şiddetli olmakta ve daha uzun sürmekte olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca MEFV geni sekanslanmış ve mutasyon tespit edilememiş bireylerde görülen klinik bulgular için mcp-1 ekspresyon seviyelerinin yükselmesi açıklayıcı olabilir.

Bunun yanında Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının klasik kalıtım paterni göz önüne alındığında MEFV geni açısından heterozigot mutasyon tespit edilen bireylerin taşıyıcı olması beklenmektedir. Fakat bu bireylerin birçoğu tel-hashomer kriterleri temel alınarak yapılan değerlendirmede tipik hastalık bulguları göstermektedir ve hasta olarak kabul edilmektedir. Bu durumda çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri dikkate alarak MEFV genindeki heterozigot mutasyona mcp-1 seviyelerinin artışının eşlik ettiği ve bu ortak mekanizmayla hastalığın klinik bulgularının ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Elde edilen bu bulguları doğrulamak için MCP-1 geninin Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarından elde edilecek hücre hatlarında veya hayvan modellerinde fonksiyon çalışmaları yapılması gerekmektedir.

Ayrıca ailesel akdeniz ateşi hastalığındaki inflamatuvar süreçte MCP-1'in ana kaynağı ve temel hedefi olan monosit/makrofajların dışında MCP-1'in etkilemediği önemli bir diğer inflamatuvar hücre grubu nötrofillerdir. Nötrofillerle ilgili yapılacak bir çalışma inflamatuvar süreçle ilgili daha net bulgular verebilecektir.

Bu çalışmayla MCP-1 proteinini FMF hastalığında özellikle açıklanamayan durumlarda tanıya yardımcı bir test olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Ailesel Akdeniz Ateşi hastaları atak döneminde olan hastalardan seçilememiştir. MCP-1 ekspresyon düzeylerine atak esnasında bakılabilmesi halinde daha yüksek ekspresyon seviyeleri ile karşılaşmamız olasıdır. Böyle bir olasılık Ailevi Akdeniz Ateşi kliniğinde gözlemlediğimiz varyasyonları daha iyi anlamamıza yardımcı olabilecektir. Ayrıca bu verilerin patogenezi henüz tam olarak açıklayamadığımız kronik inflamatuvar hastalıkların anlaşılmasında önemli bir ipucu sağlayacağını düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- 1- Abedat S, Urieli-Shoval S, Shapina E, Calko S, Ben-Chetrit E, Matzner Y. Effect of colchicine and cytokines on MEFV expression and C5a inhibitor activity in human primary fibroblast cultures. *Isr Med Assoc J*. 2002, 4: 7-12
- 2- Adams D.H, Llyod A.R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 1997, 349:490-5
- 3- Aldea A, Calafell F, Aróstegui JI, Lao O, Rius J, Plaza S, Masó M, Vives J, Buades J, Yagüe J. The west side story: MEFV haplotype in Spanish FMF patients and controls, and evidence of high LD and a recombination "hot-spot" at the MEFV locus. *Hum Mutat*. 2004, 23(4):399.
- 4- Andres P.G, Beck P.L, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan A.K, Dawson T, et al. Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *J Immunol*. 2000, 164(12):6303–12.
- 5- Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis G. E, Igoumenidis N. E, Panutsopoulos D, Spandidos D.A. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. *Thrombosis Research*. 2007, 119: 63-71.
- 6- Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2000, 177:43-51.
- 7- Atabek C, Temiz A, Çalışkan B, Battal B, Deliağa H, Sürer İ, Demirbağ S, Öztürk H. How to distinguish: appendicitis or acute abdominal attack of FMF. *Gülhane Tıp Dergisi*. 2007, 49: 58-60
- 8- Atagunduz P, Ergun T, Direskeneli H. MEFV mutations are increased in Behçet's disease (BD) and are associated with vascular involvement. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Jul-Aug;21(4 Suppl 30):S35-7.
- 9- Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. (IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002, 22:1067–1068.
- 10- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997, 15:675-705
- 11- Baggiolini M. Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*. (2000), 21: 418-420.
- 12- Bamias G, Sugawara K, Pagnini C, Cominelli F. The Th1 immune pathway as a therapeutic target in crohn's disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003, 4(11):1279–86.
- 13- Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol*. 2003, 199(1):28–35.
- 14- Barakat MH, Karnik AM, Majeed HW, el-Sobki NI, Fenech FF. Familial Mediterranean fever. (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs--a study of 175 patients and review of the literature. *Q J Med*. 1986 Sep;60(233):837-47.

- 15- Bar-Eli M, Ehrenfeld M, Levy M, Gallily R, Eliakim M. Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Am J Med Sci*. 1981, 281(1):15-8.
- 16- Bar-Eli M, Wilson L, Peters RS, Schwabe AD, Territo MC. Microtubules in PMNs from patients with FMF. *Am J MED Sci* 1982, 284;2-7.
- 17- Barnes P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008, 8(3):183–92.
- 18- Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol*. 2001, 102:385–92.
- 19- Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean Fever. *Lancet*. 1998a, 35:659-64
- 20- Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine. Update. *Semin Arthritis Rheum* 1998b;28:48-59.
- 21- Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean Fever, Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research). 2009, 61 (10):1447-53
- 22- Blum A, Gafni J, Sohar E, Shibolet S, Heller H. Amyloidosis as the sole manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). Further evidence of its genetic nature. *Ann Intern Med*. 1962 Nov;57:795-9.
- 23- Booty M.G, Chae J.J, Masters S.L, Remmers E.F, Barham B, Lee J.M, Barron K.S, Holland S, Kastner D.L, Aksentijevich I. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation. Where is the second hit, *Arthritis Rheumatology*. 2009, 60(6):1851-61.
- 24- Boring L, Gosling, J., Cleary, M., & Charo, I. F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696), 894–897.
- 25- Bousquet J, Jeffery P.K, Busse W.W, Johnson M, Vignola A.M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000, 161(5),1720–45.
- 26- Boxer LA, familial mediterranean fever; IN cecil textbook of medicine, 21 st edition; goldman L and bennett JC eds, WB saunders company philadelphia 2000. 916-917
- 27- Brauersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2007, 97(5):714–21.
- 28- Breland U.M, Michelsen A.E, Skjelland M, Folkersen L, Krohg-Sorensen K, Russell D, et al. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation. *Cardiovasc Res*. 2010, 86(2):265–73.
- 29- Brodmerkel C.M, Huber R, Covington M, Diamond S, Hall L, Collins R, et al. Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. *J Immunol*. 2005, 175(8):5370–8.
- 30- Buckley C.D. Michael Mason Prize Essay 2003. Why do leucocytes accumulate within chronically inflamed joints? *Rheumatology*. 2003, 42(12):1433–44.
- 31- Çağlar M. Kansu E. Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. *ANKEM Derg*. 2004, 18 (Ek 2):164-8.

- 32- Calguneri M, Apras S, Ozbalkan Z, Ozturk M.A. The efficiency of interferon alpha in a patient with resistant familial Mediterranean fever complicated by polyarteritis nodosa. *Intern Med.* 2004, 43:612-614
- 33- Campbell E.M, Charo I.F, Kunkel S.L, Strieter R.M, Boring L, Gosling J, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells. *J Immunol.* 1999, 163(4):2160–7.
- 34- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteinesulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101:9103–8.
- 35- Cefle A, Kamali S, Sayarlioglu M, Inanc M, Ocal L, Aral O, Konice M, Gul A. A comparison of clinical findings of familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. *Rheumatol Int.* 2005 Aug;25(6):442-6.
- 36- Centola M, Wood G, Frucht D.M, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma, D.W, Horwitz M.E, Mansfield E, Holland S.M. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leucocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators *Blood.* 2000, 95: 3223-31
- 37- Chae J.J, Wood G, Komarow H.D, Raben N, Liu P.P, Kastner D.L. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell.* 2003,11:591-604
- 38- Chae J.J, Wood G, Masters S.L, Richard K, Park G, Smith B.J, Kastner D.L. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *PNAS.* 2006, 103:9982-7
- 39- Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:2752–6.
- 40- Cho ML, Kim JY, Ko HJ, Kim YH, Kim WU, Cho CS, Kim HY, Hwang SY. The MCP-1 promoter -2518 polymorphism in Behcet's disease: correlation between allele types, MCP-1 production and clinical symptoms among Korean patients. *Autoimmunity.* 2004, Feb;37(1):77-80.
- 41- Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK, Cho CS, Kim HY. Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med.* 2007, 39:499–507.
- 42- Cinque P, Vago L, Mengozzi M, Torri V, Ceresa D, Vicenzi E, Transidico P, Vagani A, Sozzani S, Mantovani A, Lazzarin A, Poli G. Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. *AIDS.* 1998, 12:1327–32.
- 43- Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 90:3574-3577.
- 44- Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell.* 1983, 33:939–47.
- 45- Conti I, Rollins BJ. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004, 14:149–154.

- 46- Danese S, Gasbarrini A. Chemokines in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol*. 2005, 58(10):1025–7.
- 47- Daniel LK. Intermittent and periodic arthritic syndromes. Editor: Kopman JK. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*, 13 ed. Williams and Wilkins Comp. 1997:1279-1306
- 48- De Boer W.I, Sont J. K, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken J. H, Hiemstra P. S. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol*. 2000, 190(5):619–26.
- 49- De Groot M, Teunissen M.B, Ortonne J.P, Lambert J.R, Naeyaert J.M, Picavet D.I, et al. Expression of the chemokine receptor CCR5 in psoriasis and results of a randomized placebo controlled trial with a CCR5 inhibitor. *Arch Dermatol Res*. 2007, 299(7):305–313.
- 50- Deng H, Jankovic J, Guo Y, et al. Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SHSY5Y. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 337:1133–8.
- 51- Diaz A, Hu C, Kastner D.L, Schaner P, Reginato A.M, Richards N, Gumucio D.L. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheumatology*. 2004, 50(11): p. 3679-89.
- 52- Dilşen N. Ailevi Akdeniz Ateşi. Editör: Prof. Dr. Kemalettin Büyüköztürk. İç hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevi. 2007:2767-2773.
- 53- Donnelly L.E, Barnes P.J. Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci* 2006, 27(10):546–553.
- 54- Duque N, Gomez-Guerrero C, Egidio J. Interactions of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa- β and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8 and IFN- inducible protein 10. *J Immunol*. 1997, 159:3474-82.
- 55- Ebnet K. Kaldjian EP. Anderson AO. Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol*. 1996, 14:155-77.
- 56- Eisen D. The vulvovaginal-gingival syndrome of lichen planus. The clinical characteristics of 22 patients. *Arch Dermatol* 1994; 130: 1379-82.
- 57- Elif yosunkaya fenerci doktora tezi, ailevi akdeniz ateşi hastalığında genotip-fenotip ilişkisi, İstanbul, 2007 istanbul üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü doktora tezi.
- 58- Erdogan Ö, Öner A. Ailevi Akdeniz ateşi. *T.Klin Pediatri*. 2002, 11:160-170
- 59- Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, et al. Autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Rheumatol*. 2006, 24:S79- 85.
- 60- Galli S.J, Kalesnikoff J, Grimbaldston M.A, Piliponsky A.M, Williams C.M, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005, 23:749–86.
- 61- Gattorno M, Federici S, Pelagatti M.A, Caorsi R, Brisca G, Malattia C, Martini A. Diagnosis And Management of Autoinflammatory Diseases in Childhood. *Journal of Clinic Immunology*. 2008, 28(1):73-8

- 62- Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, Rafail S, Kartalis G, Speletas M, Ritis K. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet.* 2007, 71(5):458-67.
- 63- Gong J.H, Ratkay L.G, Waterfield J.D, Clark-Lewis I. An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med.* 1997, 186(1):131-7.
- 64- Grateau G. Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology.* 2004, 43: 410-415
- 65- Gu L, Okada Y, Clinton S.K, Gerard C, Sukhova G.K, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998, 2(2):275-81.
- 66- Guerra S. Overlap of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2005, 11(1):7-13.
- 67- Gumucio D.L, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T. Fire and ice: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptoizis. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2002, 20 (4-26):4553
- 68- Gunn MD, Nelken NA, Liao X, Williams LT. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol.* 1997, 158(1):376-83.
- 69- Haddad J. The role of inflammatory cytokines and NF kappaB/MAPK signaling pathways in the evolution of familial Mediterranean fever: current clinical perspectives and potential therapeutic approaches. *Cell Immunol.* 2009, 260(1):6-13,
- 70- Handel T.M, Johnson Z, Rodrigues D.H, Dos Santos A.C, Cirillo R, Muzio V, et al. An engineered monomer of MCP-1 has anti-inflammatory properties emphasizing the importance of oligomerization for chemokine activity in vivo. *J Leukoc Biol.* 2008, 84(4):1101-8.
- 71- Haringman JJ, Oostendorp RL, Tak PP. Targeting cellular adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2005, 10:299-310
- 72- Harrington J. R. The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. *Stem Cells.* 2000, 18;65-6
- 73- Haznedaroglu S, Ozturk M.A, Sancak B, Goker B, Onat A.M, Bukan, N, Ertenli I, Kiraz S, Calguneri M, Serum interleukin-17 and interleukin-18 levels in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol.* 2005, 23:77-80
- 74- Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean fever. *Archives of Internal Medicine,* 1958, 102:5
- 75- Homey B, Meller S. Chemokines and other mediators as therapeutic targets in psoriasis vulgaris. *Clin Dermatol.* 2008, 26(5):539-45.
- 76- Horuk R, Chitnis C.E, Darbonne W.C, Colby T.J, Rybicki A, Hadley TJ ve ark. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science.* 1993, 261: 1182-4.
- 77- Huang D.R, Wang J, Kivisakk P, Rollins B.J, Ransohoff R.M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and

- antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2001, 193(6):713–26.
- 78- Infevers, Editor in chief: Isabelle Touitou, The registry of Hereditary Autoinflammatory Disorders Mutations, <http://FMF.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/schema.php?n=1> Accessed on: January, 7, 2011
- 79- İzikson L, Klein R.S, Charo I.F, Weiner H.L, Luster A.D. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med.* 2000, 192(7):1075–80
- 80- Janeway TC, Mosenthal HO. Unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of nitrogen metabolism. *Trans Assoc Am Physicians.* 1908, 23:504-518.
- 81- Jemaa R, Rojbani H, Kallel A, Ali S.B, Feki M, Chabrak S. ve ark. Association between the –2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clinica Chimica Acta.* 2008, 390:122–5.
- 82- Joost P.H, Drenth M.D, Jos W.M, Van Der Meer, M.D. Hereditary Periodic fever: *N Engl J Med.* 2001, 345:1748-1757
- 83- Kaplan E, Mukamel M, Barash J, Brik R, Padeh S, Berkun Y, Uziel Y, Tauber T, Amir J, Harel L. Protracted febrile myalgia in children and young adults with familial Mediterranean fever: analysis of 15 patients and suggested criteria for working diagnosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Jul-Aug;25(4 Suppl 45):S114-7.
- 84- Kasapçopur Ö, Arısoy N. Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuvar hastalıklar Familial Mediterranean Fever and other hereditary auto-inflammatory diseases. *Türk Pediatri Arşivi.* 2006, 41:9- 17.
- 85- Kastner DL, Asebtijevich I. Intermittent and periodic arthritis syndromes, IN *Arthritis and allied conditions A text book of rheumatology*, Philadelphia, Lippincott-wilkins. 2005, 1411-59
- 86- Kastner DL. Hereditary periodic fever Syndromes. *American Society of Hematology.* 2005. 74-81
- 87- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994, 266(5189):1395-9.
- 88- Koch A.E, Kunkel S.L, Harlow L.A, Johnson B, Evanoff H.L, Haines G.K, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992, 90(3):772–9.
- 89- Koch A.E. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum.* 2005, 52:710–21
- 90- Koklu S, Ozturk M.A, Balci M, Yuksel O, Ertenli I, Kiraz S. Interferon gamma levels in familial Mediterranean fever. *Joint Bone Spine.* 2005, 72:38-40
- 91- Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö, Yazıcı H, Acute phase response in familial Mediterranean fever: *Ann Rheum dis.* 2002, 61:79-81
- 92- Koşan C. Ailevi Akdeniz ateşine tanısal yaklaşım. *AÜTD.* 2003, 35:1-6

- 93- Kouyama K, Miyake K, Zenibayashi M, Hirota Y, Teranishi T, Tamori Y, ve ark. Association of Serum MCP-1 Concentration and MCP-1 Polymorphism with Insulin Resistance in Japanese Individuals with Obese type 2 Diabetes. *Kobe J. Med. Sci.* 2007, 53:345-54.
- 94- La Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, Kone-Paut I, Touitou I, Manna R. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet.* 2003, Jan;11(1):50-6.
- 95- Laudanna C, Campbell J.J, Butcher E.C. Role of Rho in chemoattractant-activated leucocyte adhesion through integrins. *Science.* (1996), 271:981-983.
- 96- Lew W, Bowcock A.M, Krueger J.G. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol.* 2004, 25(6):295-305.
- 97- Lindley I.J.D, Westwick J, Kunkel S.L. Nomenclature announcement of the chemokines. *Immunol Today.* 1993, 14: 24.
- 98- Lowes M.A, Bowcock A.M, Krueger J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007, 445(7130):866-73.
- 99- Luster A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998, 338: 436-445
- 100- Luster A.D, Rothenberg M.E. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 1997, 62:620-33.
- 101- Luster A.D, Unkeless J.C, Ravetch J.V. Gamma interferon transcriptionally regulates an early response gene containing homology to platelet proteins. *Nature;* 1985, 315.
- 102- Mackay C.R. Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med.* 1996, 184:799-802.
- 103- Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today.* 1999, 20:254-7.
- 104- Marmarali A. Garip bir karın sendromu. *Türk Tıp Cemi Mecm.* 1946, 12:436-443.
- 105- Matsushima K, Larsen C.G, DuBois G.C, Oppenheim J.J. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med.* 1989, 169:1485-90.
- 106- Mauduit G, Fernandez-Bussy R, Thivolet J. Sequential enumeration of peripheral blood T cell subsets in lichen planus. *Clin Exp Dermatol.* 1984, 9: 256-262.
- 107- McDermott D.H, Yang Q, Kathiresan S, Joseph L.A. MCP-1 Polymorphisms Are Associated with Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels and Myocardial Infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2005, 112:1113-20
- 108- McDermott M.F, Aksentijevich I. The autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002, Dec;2(6):511-6
- 109- McManus C, Berman J.W, Brett F.M, Staunton H, Farrell M, Brosnan C.F. MCP- 1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* 1998, 86(1):20-9.

- 110- Melgarejo E, Medina MA, Jimenez FS, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009, 41:998–1001
- 111- Menzies FM, Yenisseti SC, Min KT. Roles of *Drosophila* DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol*. 2005, 15:1578 –82.
- 112- Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, et al. *Drosophila* DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 2005, 15:1572–7.
- 113- Mikula M, Buller A, Sun W, Strom CM. Prevalence of known mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) in various carrier screening populations. *Genet Med*. 2008 10(5):349-52.
- 114- Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm*. 2009, 297645.
- 115- Murdoch C, Finn A: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases, *Blood*. 2000, 95:3032-43.
- 116- Musabak U, Sengül A, Oktenli C, Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol*. 2004, 138:526-533
- 117- Navratilova Z. Polymorphisms in MCP-1&CCL5 chemokines/chemokines receptors and their associations with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006, 150(2):191–204.
- 118- Nersisyan L, Arakelyan A. In silico structure characterization of Familial Mediterranean fever gene product (pyrin). 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology. 2012, IPCBEE 29
- 119 Nickoloff B.J, Nestle F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2004, 113(12):1664–75.
- 120- Nickoloff B.J, Xin H, Nestle F.O, Qin J.Z. The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007, 25(6):568–73.
- 121- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson and Thompson genetics in medicine. 6th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders company, 2001.
- 122- Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K, Takahashi K. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J Pathol*. 1997, 182(1):106–14.
- 123- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 2003, 22:773–8.
- 124- Olzinski A.R, Turner G.H, Bernard R.E, Karr H, Cornejo C.A, Aravindhan, K, et al. Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E^{-/-} mouse: magnetic resonance imaging assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30(2):253–9.
- 125- Onen, F. Familial mediterranean fever. *Rheumatol Int*, 2006, 26:489-496

- 126- Online mendelian inheritance in man, OMIM(TM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- 127- Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*; 1991, 9: 617-48.
- 128- Ozdogan H, Arisoy N, Kasapçapur O, Sever L, Çalışkan S, Tuzuner N, Mat C, Yazici H. Vasculitis in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):323-7.
- 129- Örün E, Yalçınkaya F. Türk tıbbında ailevi Akdeniz ateşi hastalığı ve amiloidoz. *Türk Nefroloji Dializ ve Transplantasyon Dergisi*. 2003, 12:1-7
- 130- Özer Hüseyin T.E. yandal uzmanlık tezi, Behçet hastalarında serum beta kemokin düzeyleri ailevi akdeniz ateşi hastaları ile yapılan karşılaştırmalı bir çalışma, Adana-2003 Çukurova Üniversitesi tıp fakültesi
- 131- Padeh S. Periodic fever syndromes. *Pediatr Clin N Am* 2005;52:577- 609.
- 132- Park J, Kim SY, Cha GH, et al. Drosophila DJ-1 mutants Show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*. 2005, 361:133-9.
- 133- Piemonti L, Biagio E.L, Nano R, Sacconi A, Monti P, Maffi P. Ve ark. Human Pancreatic Islets Produce and Secrete MCP-1/MCP-1: Relevance in Human Islet Transplantation. *Diabetes*. 2002, 51:55-65.
- 134- Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, Lecureuil C, Ait-Oufella H, Merval R, et al. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006, 26(8):1858-63.
- 135- Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res*. 1996, 26:211-23.
- 136- Proudfoot A.E, de Souza A.L, Muzio V. The use of chemokine antagonists in EAE models. *J Neuroimmunol*. 2008, 198(1-2):27-30.
- 137- Puleston J, Cooper M, Murch S, Bid K, Makh S, Ashwood P, et al. A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005, 21(2):109-20.
- 138- Quinones MP, Ahuja SK, Jimenez F, Schaefer J, Garavito E, Rao A, Chenuaux G, Reddick RL, Kuziel WA, Ahuja SS. Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2004, 113:856-66.
- 139- Rabinovich E, Shinar Y, Leiba M, Ehrenfeld M, Langevitz P, Livneh A. Common FMF alleles may predispose to development of Behcet's disease with increased risk for venous thrombosis. *Scand J Rheumatol*. 2007 Jan-Feb;36(1):48-52.
- 140- Rigante D, La Torraca I, Avallone L, Pualiese A.L, Gaspari S, Stabile A. The pharmacologic basis of treatment with colchicine children with familial Mediterranean fever. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2006, 10:173-178
- 141- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997, 90: 909-928.

- 142- Rovin BH, Rumencik B, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 1994, 71:536-42.
- 143- Rozenbaum M, Rosner I. The clinical features of FMF of elderly onset. *Clin Exp Rheumatol* 1984;12:347-48.
- 144- Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, Hunt SW 3rd. Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J Immunol.* 2000, 165:4877-83.
- 145- Sato K, Kuratsu J, Takeshima H, Yoshimura T, Ushio Y. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma. *J Neurosurg.* 1995, 82:874-8.
- 146- Sayarlioglu H, Erkoc R, Sayarlioglu M, Dogan E, Soyoral Y. Successful treatment of nephrotic syndrome due to FMF amyloidosis with azathioprine: report of three Turkish cases: *Rheumatol. Int.* 2006, 27:197-206
- 147- Sayarlioglu M, Cefle A, Inanc M, Kamali S, Dalkilic E, Gul A, Ocal L, Aral O, Konice M. Characteristics of patients with adult-onset familial Mediterranean fever in Turkey: analysis of 401 cases. *Int J Clin Pract.* 2005 Feb;59(2):202-5.
- 148- Seyahi E, Ozdogan H, Celik S, Ugurlu S, Yazici H. Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006, 24: 99-103
- 149- Shinar Y, Livneh A, Langevitz P, Zaks N, Aksentijevich I, Koziol DE, Kastner DL, Pras M, Pras E. Genotype-phenotype assessment of common genotypes among patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2000 Jul;27(7):1703-7.
- 150- Shohat M, Livneh A, Zemer D, Pras M, Sohar E. Twin studies in familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet.* 1992, Sep 15;44(2):179-82.
- 151- Siegal S. Bening paroksizmal peritonitis. *Ann Intern Med* 1945,1-21.
- 152- Simon A, Van Der Meer J.W.M, Drenth J.P.H. Ailesel Otoinflamatuvar Sendromlar. Kelley Romatoloji, Harris E.D, Budd Jr R.C, Firestein G.S, Genovese M.C, Sergeant J.S, Ruddy S, Sledge C.B, 7. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2006.1773-88
- 153- Singh U.P, Venkataraman C, Singh R, Lillard J.W, Jr. CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2007, 7(2):111-23.
- 154- Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med.* 1967 Aug;43(2):227-53
- 155- Springer T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 1995, 57: 827-72.
- 156- Srinivasula M, Poyet J.L, Razmara M, Data P, Zhang Z, Alnemri E.S. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002, 277(24):21119-22
- 157- Stehlik C, Lee S.H, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed J.C, Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *The Journal of Immunology.* 2003, 171:6154-6163

- 158- Szalai C, Csaszar A, Czinner A, Szabo T, Panczel P, Madacsy L, ve ark. Chemokine Receptor CCR2 and CCR5 Polymorphisms in Children with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Pediatric Research*. 1999, 46:82-4.
- 159- Szczucinski A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand*. 2007, 115(3):137–46.
- 160- Şahan C, Cengiz. İntrahepatik kolestazla başvuran sekonder amiloidozlu Ailevi Akdeniz Ateşi olgusu. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*. 2005, 4 (2): 117-120
- 161- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-celladhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 α . *Nature*. 1993, 361:79-82.
- 162- Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg*. 2007, 105:838–47.
- 163- The French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever: *Nat Genet* 1997, 17:25-31
- 164- The İnternational FMF Consortium. Ancient missence mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever: *Cell* 1997, 90:797-807
- 165- Tiong A.Y, Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J*. 2005, 150:11-18
- 166- Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Matsushima K, Moriyasu F, Blumberg R.S, et al. The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. *Int Immunol*. 2005, 17(8).
- 167- Traves S. L, Culpitt S.V, Russell R.E, Barnes P.J, Donnelly L.E. Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*. 2002, 57(7):590–5.
- 168- Tuglular S, Yalcinkaya F, Paydas S, Oner A, Utas C, Bozfakioglu S, Ataman R, Akpolat T, Ok E, Sen S, Düsünsel R, Evrenkaya R, Akoglu E. A retrospective analysis for aetiology and clinical findings of 287 secondary amyloidosis cases in Turkey. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Nov;17(11):2003-5.
- 169- Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E, Arici M, Bakkaloglu A, Besbas N, Akpolat T, Dinc A, Erken E; Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005, Jan;84(1):1-11.
- 170- Turkish FMF study group. Familial Mediterranean Fever in Turkey: results of anationwide study. *Medicine* 2005, 84:1-11.
- 171- Ubogu E.E, Cossoy M.B, Ransohoff R.M. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2006, 27(1):48-55.
- 172- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*. 2004, 56:336 –341.
- 173- Valkovic T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjic N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2002, 440:583–8.

- 174- Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/ eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999, 10:61–86.
- 175- Van Damme J, Probst P, Lenaerts J-P, Opdenakker G: Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic protein (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med.* 1992, 176:59-65.
- 176- Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T lymphocyte biology. *Biochem J*, 1998, 333:457-470.
- 177- Weinert C, Grütter C, Roschitzki-Voser H, Mittl P.R.E, Grütter M.G. The crystal structure of human pyrin b30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever. *Journal of Molecular Biology.* 2009, 394(2):226-3
- 178- Wenzel UO, Stahl RAK. Chemokines, Renal Disease, and HIV Infection. *Nephron.* 1999, 81:5-1
- 179- Yalçinkaya F, Cakar N, Misirlioğlu M, Tümer N, Akar N, Tekin M, Taştan H, Koçak H, Ozkaya N, Elhan AH. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology (Oxford).* 2000 Jan;39(1):67-72.
- 180- Yeo TK, Ahad MA, Kuo NW, Spagnolo P, Menezo V, Lympay P, Lightman S. Chemokine gene polymorphisms in idiopathic anterior uveitis. *Cytokine.* 2006, 35:29–35.
- 181- Yılmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloğlu, R, Besbas N, Saatci U, Bakkaloğlu A, Ozguc. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European Journal of Human Genetics.* 2001, 9: 553-555
- 182- Ying S, Zhang G, Gu S, Zhao J. How much do we know about atopic asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol.* 2006, 3(5):321–32.
- 183- Yonem O, Bayraktar Y. Clinical characteristics of Caroli's syndrome. *World J Gastroenterol.* 2007 Apr 7;13(13):1934-7

ÖZET

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ / SİVAS 2013

Dr. Şenol ÇİTLİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

MCP-1 (A-2518G) VE CCR2 (G190A) POLİMORFİZMLERİNİN VE MCP-1 GEN EKSPRESYONUNUN FMF KLİNİĞİ/MEFV GEN MUTASYONLARIYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda inflamatuvar bir hastalık olan Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığında farklı klinik bulguların varlığı ve bu duruma neden olabilecek mekanizmaları araştırmayı hedefledik. Bu amaçla inflamatuvar sürecin önemli elemanları olan ve inflamatuvar süreci yöneten kemokinler üzerine eğildik. Ailevi akdeniz ateşi hastalığında kritik rolleri üstlenen monosit/makrofajların üzerinde esas etkili kemokinler olan MCP-1 ve onun reseptörü CCR2 üzerine yoğunlaştık. Bu moleküllerin en sık çalışılan ve fonksiyonları üzerinde etkili olan MCP-1 (A-2518G) ve CCR2 (G190A) polimorfizmlerini ve promotor bölgede yer aldığı için MCP-1 (A-2518G) ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla 125 erkek ve 104 kadın toplam 229 birey çalışmaya dahil edilmiştir. Bunlardan 75 tanesi MEFV geni açısından homozigot mutant, 77 tanesi heterozigot mutant bireyler iken 77 tanesi MEFV geninde mutasyon taşııyordu. Ayrıca bunların tel hashomer kriterlerine göre yapılan klinik değerlendirmesinde ise 120 bireyin FMF kliniği mevcuttu, 107 bireyin ise FMF kliniği yoktu. Geri kalan iki bireyde ise şüpheli klinik durum söz konusuydu.

Vakalardan alınan kan örneklerinden DNA ve RNA izole edildi. PCR-RFLP tekniği ile genotiplendirme analizi yapıldı. Ayrıca Real-time PCR yöntemiyle de ekspresyon analizleri çalışıldı. Çıkan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmede FMF hastalığı/genetiği ile MCP-1 (A-2518G) ve CCR2 (G190A) genotipleri ve allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yapılan ekspresyon analizinde ise fmf kliniği olanlarda olmayanlara göre MCP-1 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca MEFV geni heterozigot mutant olan grupta MEFV geninde mutasyon taşımayan gruba göre MCP-1 ekspresyonu artarken MEFV geni homozigot olan grupta bu artış daha fazla tespit edildi. Bunun yanında, MCP-1 (A-2518G) homozigot mutant grupta daha yüksek olmak üzere MCP-1 homozigot ve heterozigot mutant grupta da MCP-1 ekspresyonu artmış olarak bulundu.

Bu bulgularla MCP-1 ekspresyonunun FMF hastalığında önemli olduğu, FMF hastaları arasındaki klinik farklılıkları açıklayabileceği ve şüpheli durumlarda bir gösterge olabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca MEFV mutasyonlarıyla MCP-1 ekspresyonunun ilişkili olduğu, MEFV mutasyonlarının MCP-1 transkripsiyonunu artırarak inflamasyonu şiddetlendirebileceği düşünüldü. Bunun yanında MCP-1(A-2518G) mutasyonlarıyla MCP-1 ekspresyonlarının artması FMF hastalığına ayrıca katkıda bulunduğu şeklinde yorumlandı.

Anahtar Sözcükler :MEFV, MCP-1, CCR2, ekspresyon

SUMMARY

T.C.
CUMHURİYET UNIVERSITY
MEDICAL FACULTY

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN MCP-1 ((A-2518G) AND CCR2 (6190A) GENE POLYMORPHISMS AS WELL AS MCP-1 GENE EXPRESSION AND FMF CLINIC / MEFV GENE MUTATIONS

In this study we aimed to investigate the presence of clinical symptoms of familial Mediterranean fever which is an inflammatory disease and different mechanisms that may cause this situation. For this purpose, we have investigated the important components of the inflammatory process and inflammatory chemokines that govern this process. We have been focusing on MCP-1 that these are effective chemokines on monocytes / macrophages undertaking a critical role in Familial Mediterranean Fever Disease and its receptor CCR2. We aimed to investigate the MCP-1 (A-2518G), which is the most commonly studied and the most effective of these functions, and CCR2 (G190A) polymorphisms as well as the MCP-1 (A-2518G) expression levels because it is in the promoter region.

For this purpose, a total of 125 male and 104 female 229 individuals were included in the study. Of these, 75 were homozygous for the mutant gene MEFV, 77 of them did not carry mutations in the MEFV gene while 77 of them were the heterozygous mutant individuals. 120 people have FMF clinic while 107 people did not have the FMF clinic when they are also clinically evaluated according to the criteria in Tel Hashomer. The remaining two individuals had the suspect clinical situation.

DNA and RNA was isolated from blood samples from subjects. Genotyping analysis was performed by PCR-RFLP technique. Expression analysis method also worked with real-time PCR method. The results were statistically analyzed.

MCP-1 (A-2518G) and CCR2 (G190A) genotypes and allele frequencies of them with FMF disease / genetics were no significant relationship in the evaluation of what we do. Also This increase was higher in the MEFV homozygous groups while The group with heterozygous mutant MEFV MEFV gene mutation increased the expression of MCP-1 according to the group don't have MEFV gene mutation. In addition, MCP-1 expression in homozygous and heterozygous mutant groups were found to be increased that is being higher in the group homozygous mutant. It was concluded that the expression of MCP-1 with these findings that is important FMF disease, may explain the clinical differences between FMF patients and may be an indication of suspicious circumstances. We also thought that the expression of MCP-1 mutations associated with MEFV mutations and MEFV mutations may exacerbate inflammation by increasing the transcription of MCP-1. Furthermore interpreted that MCP-1 (A-2518G) mutations to increase expression of MCP-1 also contribute to disease in the FMF.

Keywords: FMF, MCP-1, CCR2, expression

EK: ETİK KURUL KARARI

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	MEFV gen mutasyonu bulunan FMF hastalarında MCP 1 ve CCR 2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlhan Sezgin/Arş. Gör. Şenol Çitli			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik ABD			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi			
	DESTEKLEYİCİ	CÜBAP			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐			
	Yüksek Doz Araştırması	☐			
	Diğer ise belirtiniz: Uzmanlık tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

(Handwritten signatures and initials)

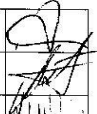
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
	BIYOKİMYA MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐			
	ILAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
KARAR BELGELERİ	Karar No: 2011/014	Tarih: 13.12.2011			
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üve tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayhan Koyuncu

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Ayhan Koyuncu	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Saadetin Kılıçkap	Medikal Onkoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Erol Kisi	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	Rapo. 24
Doç. Dr. Hülya Toker	Periodontolog	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	11/06/11
Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar	Biyoistatistik ABD	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	20/11/11
Yrd. Doç. Dr. Gulay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	11/06/11
Yrd. Doç. Dr. Köksal Deveci	Biyokimya Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐ H ☒	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Ali Kaya	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	11/06/11
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	11/06/11
Yrd. Doç. Dr. Fatih Kılıçlı	Endokrinoloji Bilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	11/06/11

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

Yrd. Doç. Dr. Ayşe Demirkazık	Biyofizik ABD	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Mutlu Doğan	Genel Cerrahi	Sivas Numune Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Levent Sağlam	Aile Hekimliği	Sivas Numune Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Öğr. Gör. Engin Daşlı	Avukat	Cumhuriyet Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐	
Öğret. Şemsettin Ağılas	Biyoloji Öğretmeni	Sivas Lisesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☒	

* Toplantıda Bulunma