

## ARAŞTIRMA

**Retrospektif moleküler bir çalışma: FMF ön tanısı alan hastalarda MEFV gen mutasyonları**

Ahmet Dönder<sup>1</sup>, Ragıp Balahoroğlu<sup>1</sup>, Erdem Çokluk<sup>1</sup>, Mehmet Ramazan Şekeroğlu<sup>1</sup>,  
Haluk Dülger<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Konya, Türkiye

**Özet**

**Amaç:** Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) tekrarlayan kısa süreli ateş ile birlikte karın, göğüs ve eklem ağrıları, eritem benzeri deri lezyonları ile karakterizedir. Hastalığın karakteristik özelliklerinden biri sinoviyal ve serözal membranların inflamasyonuna eşlik eden tekrarlayan febril ataklardır. AAA' n den sorumlu olan Mediterranean Fever (MEFV) geni 16. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Çalışmamızın amacı AAA ön tanısı ile laboratuvarımıza başvuran hastalarda mutasyon dağılımını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya AAA ön tanısı alan 560 hasta alındı ve bu hastalarda MEFV gen mutasyon analizi yapıldı. Analiz için ters hibridizasyon yöntemini temel alan FMF StripAssay kiti kullanıldı. Bu yöntemle E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), M694V, M694I, I692DEL, A744S, R761H, V726A, K695R mutasyonları tarandı.

**Bulgular:** Hastaların 240'ında MEFV gen mutasyonu (%42.85) tespit edildi. Taranan 12 mutasyon açısından 36 hasta homozigot, 45 hasta bileşik heterozigot, 156 hasta tek bir mutasyon ve 3

hasta da kompleks genotip mevcuttu. Mutasyonlar allel frekansı olarak değerlendirildiğinde, 240 mutasyon saptanan hastada 327 allel saptandı. En yüksek frekansa sahip olan mutasyon M694V (%36.69) idi. Bunu takip edenler sırasıyla E148Q (%32.71), V726A (%13.45), R761H (%5.81), P369S (%4.58), M680I (G/C) (%3.66), M694I (%1.83), F479L (%0,61), A744S, K695R (%0,30) allel frekansı olarak tespit edildi. I692DEL, M680I (G/A) mutasyonlarına ise rastlanmadı.

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları, Van ve çevresinde yaşayan ve AAA ön tanısı ile değerlendirilen hastalarımızda MEFV gen mutasyon sonuçlarının allel frekansı açısından ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu, M680I (G/C) mutasyonunun ise ülkemizde yapılan diğer çalışmalara göre allellik frekansının oldukça düşük bir prevalansa sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca R761H mutasyonunun yöremizde daha yüksek bir prevalansa sahip olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ailesel Akdeniz Ateşi, Mutasyon Dağılımı, MEFV Geni, PCR

**A study of retrospective molecular: MEFV gene mutations on pre-diagnosed familial mediterranean fever patients****Abstract**

**Objective:** Familial Mediterranean Fever (FMF) is characterized with repeated short-term fever, abdomen, chest and joint pain, and like skin lesions of erythema. One of the characteristic features of the disease is febrile attacks followed and repeat to inflammation of synovial and serosal. Mediterranean Fever (MEFV) gene which responsible for FMF has been localized in short arm of 16th chromosome. The aim of our study is

Bu çalışma poster bildiri olarak sunulmuştur. (23. Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Kasım-2 Aralık 2011, Adana, Türkiye)

**Yazışma Adresi:**

Ahmet DÖNDER  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Van-Türkiye.  
Tel: 0544 860 54 08  
E-mail: ahmetdunder83@hotmail.com

to research the distribution of mutation on patients referred with FMF pre-diagnosed.

**Methods:** It was accepted FMF 560 pre-diagnosed patients and on these patients was performed MEFV gene mutations analysis. For analysis, it was used FMF StripAssay kit based on reverse hybridization method. With this method, it was screened E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), M694V, M694I, I692DEL, A744S, R761H, V726A, K695R mutations.

**Results:** It was detected MEFV gen mutation (42.85%) on 240 patients. In terms of screened 12 mutations, 36 patients had homozygous, 45 patients had compound heterozygous, 156 patients had a single mutation and also 3 patients complex genotype. When the mutations was evaluated as allele frequency, 327 allele was detected on 240 patients who is determined mutation. Mutation which has highest frequency was the M694V (36.69%). Those which follow this, respectively; it was determined E148Q (32.71%), V726A (13.45%), R761H (5.81%), P369S (4.58%), M680I (G/C) (3.66%), M694I (1.83%), F479L (0,61%), A744S, K695R (0,30%) allele frequency. It wasn't observed I692DEL, M680I (G/A) mutations.

**Conclusion:** The results of this study revealed that on patients lived in Van and its around and on patients with pre-diagnosed FMF. The results of MEFV gene mutations are compatible with another studies in our country in terms of allele frequency, but M680I (G/C) mutation and its allele frequency has a very low prevalence according to the another studies in our country. Also, it revealed R761H mutation has a higher prevalence in our region.

**Key words:** Familial Mediterranean Fever, Distribution of Mutation, MEFV Gene, PCR

Ailesel Akdeniz Ateşi, Akdeniz bölgesinde yaşayan Sefardik Ashkenazi Yahudileri, Türkler, Araplar ve Dürzî gibi etnik grupları etkileyen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (1).

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığının karakteristik özelliklerinden sinoviyal ve serözal membranların inflamasyonuna eşlik eden tekrarlayan febril ataklardır. Türk toplumu diğer etkilenen toplumlar ile kıyaslandığında, amiloidozisden kaynaklanan böbrek yetmezliğinin, hastalığın şiddetini artırdığı görülmektedir (2).

Ailesel Akdeniz Ateşi tekrarlayan kısa süreli ateş ile birlikte karın, göğüs ve eklem ağrıları, eritem benzeri deri lezyonları ile karakterizedir. Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) hastaları ateş ve ağrı atakları geçirirler. Atakların süresi ve tipi mutasyon çeşidine, etnik kökene ve kolşisin kullanımına olduğu kadar yaşa ve cinsiyete göre de farklılıklar gösterir. Bazı olgularda gelişen amiloidoz, hastanın yaşamını tehdit eden en önemli komplikasyonudur (3).

Ailesel Akdeniz Ateşi'nden sorumlu olan MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Pýrin veya marenostrin olarak adlandırılan proteini kodlamaktadır. 10 ekzondan oluşan MEFV geninde en çok bulunan dört mutasyon M680I, M694V, M694I, V726A 10. ekzonda bulunmaktadır. Araştırmacılar tarafından, ikinci ekzonda bulunan E148Q mutasyonunun ılımlı bir mutasyon olduğu ve hastalık rolünde tartışmalı bir mutasyon olduğu belirtilmektedir (4).

Bu çalışmanın amacı, Van ve çevresindeki illerde yaşayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesine gelen AAA ön tanıli hastalarda, MEFV genindeki mutasyonları saptamak ve mutasyon dağılımlarını tespit etmektir.

### Materyal ve Metod

Bu çalışmaya, çeşitli şikayetlerle farklı birimlere gelen (Pediatri, Gastroenteroloji, Nefroloji, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon ve Enfeksiyon Hastalıkları) AAA ön tanısı alan hastalar dahil edildi. Çalışmamıza yaklaşık bir yıllık sürede (2009 Ekim-2010 Kasım) hastaneye başvuran 560 (281 kadın, 279 erkek) hasta dahil edildi. Hastalar laboratuvarımıza MEFV gen mutasyon analizi için gönderildi ve bu hastalardan alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

Son yıllarda moleküler çalışmaların yaygınlık kazanmasıyla MEFV geni mutasyon analizleri için birçok yöntem kullanılmakta olup bizim bu çalışmamızda kullandığımız yöntem strip test yöntemidir. Ters hibridizasyon yöntemini temel alan strip test yöntemiyle hazır ticari kit kullanılarak (FMF StripAssay, ViennaLab Labordiagnostika GmbH, Austria) PCR metoduyla araştırıldı. Bu metot ile E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), M694V, M694I, I692DEL, A744S, R761H, V726A, K695R mutasyonları taranmaktadır.

StripAssay yöntemi dört aşamada yapıldı. Standart metotla periferik lökositlerden DNA izolasyonu yapıldı ve genomik DNA elde edildi. Multiplex PCR ile taradığımız mutasyonların buldukları 2. 3. 5. ve 10. ekzonları biotin ile işaretlenmiş primerler kullanılarak amplifikasyonu gerçekleştirildi. PZR ile amplifikasyonun ardından %3'lük agaroz jelde 4 adet amplikonun (206, 239, 295 ve 318 bp) gözlenmesi ile PCR ürünleri kontrol edildi. PCR ürünlerinin hibridizasyon safhasında striplere immobilize edilmiş 8 adet wild type ve 12 adet mutant bölgede oligonükleotidler ile PCR ürünleri ile hibridizasyon işlemi yapıldı.

## Bulgular

Ailesel Akdeniz Ateşi moleküler tanısı için laboratuvara gönderilen 560 olgunun 240 tanesinde mutasyon (%42.85) saptandı. Tablo 1 ve Tablo 2' de mutasyon analizi yapılan hastaların sonuçları taşıyıcı ve hasta olması bakımından değerlendirilmiş olup ayrıca allel frekansları tespit edildi. Çalışmaya dahil

ettiğimiz hastaları MEFV gen mutasyon sonuçlarına göre dört gruba ayırdık. MEFV geni taranan 12 mutasyon açısından homozigot hasta (n=36), bileşik heterozigot hasta (n=45), tek bir mutasyon taşıyan hasta (n=156), kompleks genotipe sahip (n=3) hasta saptanmıştır. Çalışmamızda ise I692del ve M680I (G/A) mutasyonlarına hiç rastlamadık (Tablo 1).

**Tablo 1.** Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanısı alan hastaların genotip frekansı

Heterozigot Genotip (156)	Genotip sayısı (n=560)	Genotip frekansı (%)
E148Q/-	70	12.5
M694V/-	40	7.14
V726A/-	21	3.75
R761H /-	10	1.78
P369S /-	6	1.07
M680I (G/C)/-	6	1.07
A744S/-	1	0.17
K695R/-	1	0.17
M694I/-	1	0.17
I692del/-	0	0
M680I (G/A)/-	0	0
F476L/-	0	0
<b>Bileşik Heterozigot Genotip (45)</b>		
E148Q/M694V	13	2.32
M694V/V726A	13	2.32
E148Q/P369S	7	1.25
F476L/V726A	2	0.35
E148Q/R761H	2	0.35
M694V/R761H	2	0.35
M680I (G/C)/V726A	2	0.35
P369S/M694I	1	0.17
E148Q/ M680I (G/C)	1	0.17
E148Q/V726A	1	0.17
M680I (G/C)/ R761H	1	0.17
<b>Homozigot Genotip (36)</b>		
M694V/ M694V	25	4.64
E148Q/ E148Q	5	0.89
M694I/ M694I	2	0.35
R761H/ R761H	2	0.35
V726A/ V726A	1	0.17
M680I (G/C)/ M680I	1	0.17
<b>Kompleks Genotip (3)</b>		
E148Q/M694V/V726A	2	0.35
E148Q/P369S/V726A	1	0.17
<b>Normal Genotip</b>		
	320	57.15
<b>Mutasyonlu Genotip</b>		
	240	42.85

Mutasyonları allel frekansı olarak değerlendirdiğimizde 240 mutasyon saptanan AAA hastasında total olarak 327 allel saptandı. En yüksek frekansa sahip olan mutasyon ise M694V (%36.69) en fazla rastlanırken bunu takip

eden E148Q (%32.71), V726A (%13.45), R761H (%5.81), P369S (%4.58), M680I (G/C) (%3.66), M694I (%1.83), F479L (%0,61), A744S, K695R (% 0,30) allel frekansı olarak tespit ettik (Tablo 2).

**Tablo 2.** Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanısı alan hastaların allel frekansı

Mutasyon Tipi	Allel sayısı	Allel frekansı (%)
M694V	120	36.69
E148Q	107	32.71
V726A	44	13.45
R761H	19	5.81
P369S	15	4.58
M680I(G/C)	12	3.66
M694I	6	1.83
F479L	2	0.67
A744S	1	0.30
K695R	1	0.30
M680I(G/A)	0	0
I692DEL	0	0
<b>Toplam</b>	<b>n=327</b>	<b>100</b>

**İstatistiksel analiz**

Mutasyon saptanan hastaların genotip ve allel frekansları için tanımlayıcı istatistikler; sayı ve yüzde olarak ifade edildi.

**Tartışma**

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığının etiopatogenezi tam olarak bilinmemektedir. Etnik köken, çevresel faktörler ayrıca genetik yatkınlık hastalığın etiopatogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Bugüne kadar MEFV geninde yaklaşık 140 mutasyon belirlenmiştir. Mutasyonların çoğunluğu yanlış anlamli (missens) mutasyon olmak üzere, bir anlamsız (nonsense) ve üç delesyon ve iki insersiyon mutasyonları da tanımlanmıştır. Bunlardan 680. kodonda M680I (G/A), M680I (G/C), M680L olmak üzere üç adet mutasyon saptanmış, 694. kodonda ise dört adet (M694V, M694I, M694del, M694L) mutasyon bulunmuştur. Bunlardan 10. ekzonda bulunan dört (M680I, M694V, M694I, V726A) ve 2. ekzonda bulunan bir (E148Q) mutasyon olmak üzere toplam 5 mutasyon hastalığın sık görülen toplumlardaki mutasyonların %85 ini kapsamaktadır (5).

Bu çalışmada Ailesel Akdeniz Ateşi' nden yakınan hastalarda MEFV genindeki 12 mutasyonu değerlendirdik. Çalışmamızda genelde sık görülen mutasyonları (E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), M694V, M694I, I692DEL, A744S, R761H, V726A, K695R) taradık.

Özdemir ve ark.(6) Sivas' ta 3340 Ailesel Akdeniz Ateşi hastası üzerinde yaptıkları bir çalışmada mutasyon prevalansını M694V

(%43.12) başta olmak üzere bunu takip eden E148Q (%20.18), M680I (G/C) (%15.00) ve V726A (%11.32) allel bazında elde etmişler. Ayrıca E148Q mutasyonun taşıyıcı frekansını diğer bölgeler ile kıyasladıklarında oldukça yüksek bulmuşlar.

Akın ve ark. (4) Ege bölgesinde yaptıkları bir çalışmada dört tane genel mutasyon arasında allellik frekansı olarak M694V (%47.60 ), E148Q (%16.75), V726A (%12.95), M680I (G/C) (%11.94) diğer kalan alleller (%10.76) kısmını oluşturuyordu. Yaptıkları bu çalışmada ülke genelinde yapılan çalışmalarla kıyaslandığında V726A mutasyon frekansında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Çağlayan ve ark.(7) Ailesel Akdeniz Ateşi hastaları üzerinde hem fenotip hem genotip olarak yaptıkları retrospektif bir çalışmada, allel bazında en sık görülen mutasyonun M694V (%32) olduğu ve bunu takip eden mutasyonları sırasıyla E148Q (%20.6), V726A (%17), M680I (G/C) (%14.5), P369S (%10.8) olarak bulmuşlardır.

Erden ve ark. (8) tarafından Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanılı 98 hastada yapılan çalışmada, mutasyon prevalansı değerlendirilmiş ve sırasıyla M694V (%46.26), E148Q (%16.41), V726A (%13.43), M680I (G/C) (%5.97), R761H (%2.98) olarak bulunmuştur. Diğer nadir mutasyonlar ise çok düşük frekansta bulunmuştur.

Yeşilada ve ark. (9) 197 Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanılı hastada mutasyon prevalansını değerlendirmiş olup, yaptıkları çalışmada allel frekansları açısından M694V (%31), M680I (%12) ve E148Q (%9) olarak bulmuşlardır ve bunları A744S (%4) ve V726A (%3) izlemektedir. P369S mutasyonu allellerin %2'sini oluştururken F479L, M694I, K695R ve R761H mutasyonlarının oldukça düşük frekanslarda olduğunu belirtmişler. M680I (G/A) ve I692del mutasyonlarına ise rastlamamışlardır.

Çalışmamızda elde edilen veriler, ülkemizde bazı bölgelerde yapılan ve yukarıda özetlenen çalışmalar ile uyumlu idi. Bu çalışmamızda M694V frekansı (%36.69) olarak bulundu ve bu mutasyonun allel frekansı en yüksek idi. Türkiye de yapılan diğer çalışmalar ile uyumluydu. Bunu takip eden E148Q (%32.71), V726A (%13.45), R761H (%5.81), P369S (%4.58), M680I (G/C) (%3.66), M694I(%1.83), F479L (%0,61) , A744S, K695R (% 0,30) allel frekansı olarak tespit ettik. M680I (G/A) ve I692del mutasyonlarına bu çalışmada hiç rastlamadık. Bizim çalışmamızın sonucunda 320 hastada herhangi bir mutasyona rastlamadık (Tablo 2).

Yeşilada ve ark. (9) ve Erden ve ark.(8)'nin yaptıkları çalışmalarda en sık mutasyonlar

değerlendirilirken M680I (G/C) üçüncü ve dördüncü sırada yer aldığı bizim çalışmamızda ise altıncı sırada yer aldığı görülmektedir. Diğer yandan, bizim çalışmamızda M680I (G/C) (%3.45) allel sıklığı diğer çalışmalara göre oldukça düşük bir frekansa sahipti. Ayrıca bu çalışmada R761H ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında mutasyon prevelansı daha yüksek bir frekans göstermektedir.

Yılmaz ve ark. (10) Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanısı almış 450 hastada yaptıkları çalışmada mutasyon prevelansını kontrol grubu kullanarak değerlendirmişler ve E148Q mutasyonu prevelansını çok düşük bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda kontrol grubu kullanılmadı ve E148Q mutasyonu allelik frekansı olarak (%32.71) ikinci en sık görülen mutasyondur. Tek bir mutasyon taşıyan hastalarda ise E148Q mutasyon sayısı (n=70) en yüksekti. E148Q mutasyonunun ise Avrupa'da yaygın olduğu belirtilirken ülkemiz için sıklığı %13 olarak rapor edilmiştir (11).

Evliyaoğlu ve ark.(12) Diyarbakır yöresinde Ailesel Akdeniz Ateşi tanısı alan 332 hastada yaptıkları çalışmada E148Q (%30.8) mutasyonunu M694V (%18.3) mutasyonundan daha sık rastlandığını ve bu farklılığın demografik yapı veya yöntemle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Van ve çevresinde yaşayan ve Ailesel Akdeniz Ateşi ön tanısı ile değerlendirilen hastalarımızda MEFV gen mutasyon sonuçlarının allel frekansı açısından ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu, M680I (G/C) mutasyonunun ise ülkemizde yapılan diğer çalışmalara göre allelik frekansının oldukça düşük bir prevelansa sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca R761H mutasyonunun yöremizde daha yüksek bir prevelansa sahip olduğu gösterilmiştir.

## Kaynaklar

1. Padeh S, Berkun Y. Autoinflammatory fever sendromes. *Rheum Dis Clin N Am* 2007; 33(3): 585-623.
2. Delibaş A, Öner A, Balcı B, Demircin G, Bülbül M, Bek K, Erdoğan O, Baysun S, Yılmaz E. Genetic risk factors of amyloidogenesis in Familial Mediterranean Fever. *Am J Nephrol* 2005; 25(5):434-440.
3. Akar N, Mısıroğlu M, Yalçınkaya F, Akar E, Çakar N, Tümer N, Akcaş M, Taştan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from Familial Mediterranean Fever. *Hum Mut.* 2000; 15(1): 118-9.
4. Akın H, Onay H, Türker E, Coğulu O, Özkınay F. MEFV mutations in patients with Familial Mediterranean Fever from the Aegean region of Turkey. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(1): 93-8.
5. Yepiskoposyan L, Harutyunyan A. Population of Familial Mediterranean Fever: a review. *Eur J Hum Genet,* 2007; 15(9): 911-6.
6. Özdemir O, Sezgin I, Kurtulgan HK, Candan F, Koksall B, Sümer H, İcagasioğlu D, Uslu A, Yıldız F, Arslan S, Çetinkaya S, Citli S, Öztumur Z, Kayataş M. Prevalence of known mutations in the MEFV gene in a population screening with high rate of carriers. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(5): 3195-200.
7. Çağlayan AO, Demiryılmaz F, Özyazgan İ, Gümüş H. MEFV gene compound heterozygous mutations in Familial Mediterranean Fever phenotype: a retrospective clinical and molecular study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(8): 2520-3.
8. Erden G, Bal C, Torun OG, Uğuz N, Yıldırımkaş MM. Evaluating the frequency of MEFV gene in a group of patients with a pre-diagnosis of Familial Mediterranean Fever. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2008; 65(1):1-5.
9. Yeşilada E, Savacı S, Yüksel Ş, Gülbay G, Otlu G, Kaygusuzoğlu E. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 12(4): 235-238.
10. Yılmaz E, Özen S, Balcı B, Düzova A, Topaloğlu R, Besbas N, Saatçi U, Bakkaloğlu A, Özgüç M. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(7): 553-555.
11. Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Megarbane A. Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment. *Sante.* 2004; 14(4): 261-6.
12. Evliyaoğlu O, Bilici S, Yolbaş İ, Kelekçi S, Şen V. Diyarbakır yöresi Ailevi Akdeniz Atesli çocuklarda MEFV gen mutasyon sıklıkları. *2009; 36(2): 80-84.*