

## Trakya Populasyonundaki Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında MEFV Geni Ekson 2 Ve Ekson 10 Gen Bölgesi Mutasyonları

*MEFV Gene Exon 2 and Exon 10 Gene Region Mutations of Familial Mediterranean Fever Patients in Trakya Population*

Hakan GÜRKAN,<sup>1</sup> Emine NEŞE ÖZKAYIN,<sup>2</sup> Kiymet TABAKÇIOĞLU,<sup>3</sup> Çetin ALGÜNES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tibbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul;  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi <sup>2</sup>Pediatrik Nefroloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Tibbi Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne

Başvuru tarihi / Submitted: 01.09.2008 Kabul tarihi / Accepted: 27.11.2008

**Amaç:** Çalışmamızın amacı Trakya populasyonunda Ailevi Akdeniz Ateşi etyopatogenezinde yer alan MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgesi mutasyonlarının otomatize DNA dizi analizi metodu ile araştırılarak elde edilen sonuçların literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılmasıdır.

**Hastalar ve Yöntemler:** Çalışmaya Ailevi Akdeniz Ateşi tanılı hastalardan, birbirileri ile akrabalık ilişkisi bulunanmayan, aynı karakteristik dil özellikleri gösteren ve en az üç kuşaktır Trakya Bölgesi'nde yaşayanlar (34 kadın, 34 erkek) dahil edildi. MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgeleri polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltılarak, otomatize DNA dizi analizi metodu ile nükleotid dizileri belirlendi.

**Bulgular:** Trakya populasyonunda MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde G442C, T306C, A414G, C495A, G605A, ekson 10 gen bölgesinde G2040C, A2080G, G2082A, A2084G, T2177C, G2282A tek nükleotid değişimleri belirlendi.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde belirlediğimiz T306C, A414G, C495A, G605 tek nükleotid değişiklikleri ve ekson 10 gen bölgesinde belirlediğimiz mutasyonların sıklıkları açısından literatür ile farklılıklar göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Ailevi Akdeniz Ateşi; DNA dizi analizi; mutasyon; tek nükleotid değişimi.

**Objectives:** The objective of the study is to explore the MEFV gene exon 2 and exon 10 gene region mutations which take place in etiopathogenesis of Familial Mediterranean Fever in the Thrace population with the DNA sequence analysis method and to compare the results with the other studies.

**Patients and Methods:** The study included patients with Familial Mediterranean Fever who have no relative relationship, have the same linguistic characteristic and live in the Thrace region for at least three generations (34 females, 34 males). MEFV gene exon 2 and exon 10 gene regions multiplied with PCR and their nucleotids were determined with the DNA sequence analysis method.

**Results:** G442C, T306C, A414G, C495A, G605A SNPs were found in MEFV gene exon 2 gene region and G2040C, A2080G, G2082A, A2084G, T2177C, G2282A SNPs were found in MEFV gene exon 10 gene region in the Thrace population.

**Conclusion:** The T306C, A414G, C495A, G605 single-nucleotide polymorphisms in MEFV gene exon 2 gene region and the mutations in exon 10 gene region are not compatible in terms of their frequencies with the results of the other studies.

**Key words:** Familial Mediterranean Fever; DNA sequencing; mutations; single-nucleotide polymorphisms.

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA; MIM 249100) sıklıkla Akdeniz etnik kökenine sahip Ashkenazi olmayan Yahudiler, Araplar, Ermeniler ve Türklerde görülen, otozomal resesif geçişli, kendini sınırlayıcı tekrarlayan ateş atakları, serozal membranların (periton, plevra, sinova) inflamasyonu, artrit ve ikincil amiloid (AA amiloidoz) birikimi ile karakterize mikrobiyal ya da otoimmün tetikleme kanıtı olmadan spontan inflamatuvar oluşum ile ortaya çıkan otoinflamatuvar sendromun en yaygın tipidir.<sup>[1-4]</sup> Ailevi Akdeniz Ateşi Kıbrıs, İtalya, İspanya ve Yunanistan gibi diğer Akdeniz ülkelerinde de inkomplet penetrasyon ile rapor edilmekle birlikte dünya üzerinde 100 000'den daha fazla insanı etkileyen kalıtsal bir hastalıkta.<sup>[3-5]</sup> Dünyadaki AAA hastaları büyük oranda 67 milyondan fazla nüfusa sahip olan Türkiye'de yaşamaktadır ve ülkemizde hastalığın tahmini prevalansı 1/1000 olup, taşıyıcılık oranı 1:5'tir.<sup>[6]</sup>

1997 yılında Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu bağımsız olarak 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3 bölgesinde) bu hastalığa ait geni klonlamışlar ve AAA taşıyıcı kromozomlar üstünde dört yanlış anlamlı mutasyon (M694V, M680I, V726A, M694I) tanımlamışlardır.<sup>[2,7]</sup> Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının çoğu pirin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonları taşırlar. Pirin, 781 aminoasitlik bir protein olup granülosit, monosit, dendritik hücreler, sinoviyal, peritoneal ve deri fibroblastlarında eksprese edilmektedir. Pirin proteininin interlokin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) süreci, NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve apoptozis düzenlenmesi ile kalıtsal immünlitede önemli bir rol oynadığı iddia edilmektedir.<sup>[1,8]</sup> Bugüne kadar pirin proteinini kodlayan MEFV gen bölgesinde AAA ile bağlantılı 152 adet mutasyon ve tek nükleotid değişimi tanımlanmıştır.<sup>[9]</sup> Bu mutasyonlardan 78'i yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyon, sekizi splicing mutasyonu, ikisi regülatör bölge mutasyonu, ikisi küçük delesyon ve ikisi de küçük insersiyondur. Literatürde tanımlanmış olan tek nükleotid değişiklikleri ise ekson 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 kodlayıcı gen bölgelerinde yer almaktadır.<sup>[10]</sup> Literatürde MEFV geninde yer alan beş mutasyonun (M694V, M680I, M694I, E148Q ve V726A) AAA'dan sorumlu olabilecek tüm mutasyonların %70-80'ini kapsadığı ve M694V mutasyonunun Kuzey Afrikalı hastalarda %97, Iraklı Yahudi hastalarda %30 ve Ermenilerde yaklaşık %25 olarak görüldüğü ifade edilmektedir.<sup>[2,7,11]</sup>

Ailevi Akdeniz Ateşi'nin semptomları hastaların %50'sinde yaşamlarının ilk on yılında, %90'ında ilk 20 yıl tamamlanmadan ve %5'inde 30 yaşından sonra görülmektedir. Abdominal ataklar hastaların %95'inde en yaygın şekilde ortaya çıkan semptomdur. Ailevi Akdeniz Ateşi'nin en yıkıcı komplikasyonu kronik böbrek yetmezliğine yol açan amiloidozdur. Amiloidoz prevalansı etnik gruppala göre farklılıklar göstermektedir. Yapılan karşılaştırma çalışmaları sonucunda Türk hastalarda diğer etnik kökenli hastalara göre amiloidoz gelişme insidansının daha yüksek olduğu sonucuna

varılmıştır. Amiloidoz gelişimi yüksek insidanslı populasyonlarda en yaygın şekilde görülen mutasyonun M694V olduğu ve M694V mutasyonunu homozigot olarak taşıyan hastaların amiloidoz geliştirmeye diğer MEFV gen mutasyonlarını taşıyan hastalara göre eğilimli oldukları iddia edilmektedir.<sup>[7]</sup>

Çalışmamızın amacı Trakya populasyonunda Ailevi Akdeniz Ateşi etyopatogenezinde yer alan MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgesi mutasyonlarının otomatize DNA dizi analizi metodu ile araştırılarak ve elde edilen sonuçların literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılmasıdır.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Ocak 2003 - Haziran 2008 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı ile Romatoloji Anabilim Dalı'nda Tel Hashomer kriterlerine<sup>[5]</sup> göre AAA tanısı konularak Tibbi Biyoloji Anabilim Dalı'na MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerindeki mutasyonların araştırılması amacıyla gönderilen 220 hastadan aşağıda belirtilen koşulları sağlayan 68 hasta (34 kadın, 34 erkek) çalışmaya dahil edildi: hastalıkla ilişkili olabilecek mutasyonların genotip freksanslarının doğru hesaplanabilmesi için birbirleri ile akrabalık ilişkisi bulunmayanlar, ortak bir atasal soydan köken almış olmak için aynı karakteristik dil özellikleri gösterenler, gen-çevre etkileşimini göz ardı etmemek için en az üç kuşaktır Trakya Bölgesi'nde yaşayanlar. Çalışmaya alınan her hastaya, çalışma hakkında bilgi içeren ve hastanın onayının alındığını belgeleyen "Bilgilendirilmiş Olur Formu" imzalatıldı. Genomik DNA periferik venöz kandan (lökositlerden) QIAMP DNA Blood Mini Kit (Katalog no: 51104, Qiagen, Almanya) kullanılarak izole edildi. MEFV geni ekson 2 ve ekson 10'un kodladığı bölgeler sentetik oligonükleotidlere kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile çoğaltıldı (çalışmamızda PZT cihazı olarak Applied Biosystems 9700 kullanıldı).

Ekson 2 bölgesi için 50  $\mu$ l PZT reaksiyon karışımı universal koşullara uygun olarak hazırlandı: 22.25  $\mu$ l steril distile su, 5  $\mu$ l 10x PZT tampon çözeltisi ( $MgCl_2$  içermeyen), 3.5  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l her bir deoksiribonükleozid trifosfatdan, 5  $\mu$ l 25 picomol her bir sentetik oligonükleotidten (ileri yönde (F): 5'- ACG TGG GAC AGC TTC ATC AT -3', geri yönde (R): 5'- ATT TCC AGG GCC TTC CTT CA -3'), 0.25  $\mu$ l DNA Taq polimeraz ve 5  $\mu$ l (25-175 ng) genomik DNA. Ekson 2 bölgesi için PZT: 95°C'de 4 dakika denaturasyon, 35 siklus 95°C'de 60 saniye, 56°C'de 60 saniye ve 72°C'de 60 saniye, final ekstensiyonu 72°C'de 5 dakika.

Ekson 10 bölgesi için 50  $\mu$ l PZT reaksiyon karışımı universal koşullara uygun olarak hazırlandı: 12.75  $\mu$ l steril distile su, 5  $\mu$ l 10x PZT Tampon çözeltisi ( $MgCl_2$  içermeyen), 3.5  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l her bir deoksiribonükleozid trifosfatdan 10  $\mu$ l 25 picomol her bir sentetik oligonükleotidten (ileri yönde (F): 5'- CCT AGG TAT TCA AAT TTT -3', geri yönde (R): 5'- CTT CCT GCT

TCT GGC CTT -3'), 0.25  $\mu$ l DNA Taq polimeraz ve 5  $\mu$ l (25-175 ng) genomik DNA. Ekson 10 bölgesi için PZT: 94°C'de 10 dakika denatürasyon, 40 siklus 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye, final ekstensiyonu 72°C'de 5 dakika.

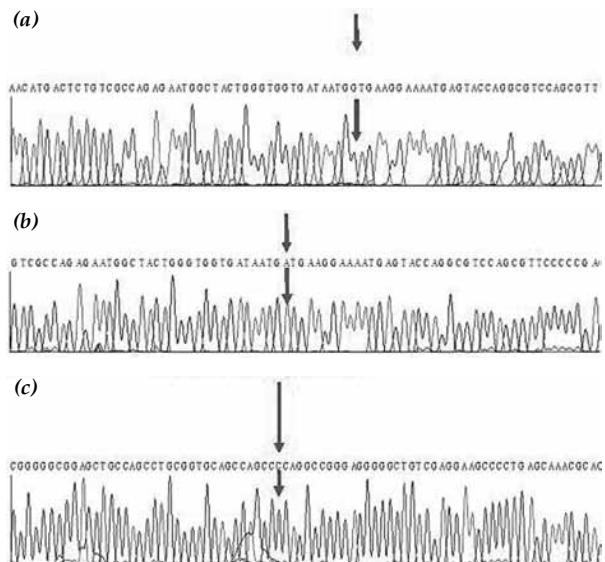
Polimeraz zincir tepkimesi uygulanan DNA örneklerinde ilgili gen bölgelerinin çoğaltılmış çoğaltılamadığını kontrol etmek amacıyla her bir PZR ürünü (5  $\mu$ l), %2.5'luk agaroz jele yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez uygulanan örnekler translüminatörde değerlendirilerek bant (+) olanlar QIAquick Gel Extraction Purification Kit (Katalog no: 28104, Qiagen, Almanya) kullanılarak pürifiye edildi. DNA dizi analizi için BigDye Terminator V<sub>3.1</sub> sekans kiti kullanılarak final hacmi 20  $\mu$ l olacak şekilde reaksiyon karışımı (7-8  $\mu$ l steril distile su, 2  $\mu$ l BigDye Terminator V<sub>3.1</sub>, 3  $\mu$ l 5x sekans tampon çözeltisi, 5  $\mu$ l ileri yönde veya geri yönde sentetik oligonükleotid, 2-3  $\mu$ l pürifiye PZT ürünü) hazırlandı. PZT 94°C'de 2 dakika denatürasyon, 40 siklus 94°C'de 0.10 saniye, 50°C'de 0.05 saniye ve 60°C'de 2 dakika 30 saniye, final ekstensiyonu (+) 4°C'de  $\alpha$  şeklinde uygulandı. Çoğaltılan ürünler Sephadex (Katalog no: 064K1118, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak spin kolon yöntemi ile tekrar pürifiye edildi ve DNA dizi analizi için ABI 3100 Avant (Applied Biosystems, İngiltere) otomatize DNA kapiller sekans sistemine yükleni. Örnekler 50 cm<sup>3</sup>'lik kapiller ve POP 6 polimer kullanılarak dye set Z'de yürütüldü.

DNA dizi analizi sonuçları öncelikle Genescan Version 3.7 (Applied Biosystems, Serial no: 8171) bilgisayar yazılım programında kalite yönünden kontrol edildi. Değerlendirilmesi uygun bulunan analiz sonuçları Proseq ve BioEdit bilgisayar programları kullanılarak MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerine ait referans (Ensembl Human Gene View, Vega Gene ID: OTTHUMG00000129324) kabul ettiğimiz diziler ile karşılaştırıldı ve olası nükleotid değişiklikleri belirlendi. Nükleotid değişikliği ilgili gen bölgesindeki tek bir alleli kapsiyorsa heterozigot mutant, her iki alleli kapsiyorsa homozigot mutant, ilgili gen bölgesine ait nükleotid dizisi referans dizi ile birebir uyumlu ise homozigot sağlam kabul edildi (Şekil 1).

### Istatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na ait S0064 Minitab Relase 13 paket programı (Lisans No: wcp 1331.00197) kullanılarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çalışmada istatistiksel analiz yöntemi olarak, gruplar arası karşılaştırmalarda (kadın ve erkek cinsiyetler arasında "ekson 2 gen bölgesi" ve "ekson 10 gen bölgesi" mutasyonları dağılımı) değişkenlerin dağılımlarına ve türlerine göre Ki-kare testi kullanıldı.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda,  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.



**Şekil 1.** (a) MEFV geni ekson 10 gen bölgesi A 2080 G (M694V) mutasyonu: Homozigot Mutant. (b) MEFV geni ekson 10 gen bölgesi A 2080 G (M694V) mutasyonu: Homozigot Sağlam. (c) MEFV geni ekson 2 gen bölgesi G 442 C (E148Q) mutasyonu: Homozigot Mutant.

### BULGULAR

Çalışmaya dahil olan hastalarda yapılan tetkikler sonucunda amiloidoz gelişimine rastlanmadı. MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerinin DNA dizi analizi sonucunda 18 hastada (%26.4) nükleotid değişikliği saptanmadı. MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde 23 hastada (%34), ekson 10 gen bölgesinde ise 49 hastada (%72) nükleotid değişikliğine rastlanmadı. MEFV geni ekson 10 gen bölgesinde nükleotid değişikliği saptanmayan 49 hastanın 31'i (%63.2) ekson 2 gen bölgesinde nükleotid değişikliği taşımaktaydı. 14 hasta (%20) ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerinde eş zamanlı olarak nükleotid değişikliği taşımaktaydı. İlgili gen bölgelerinde belirlenen nükleotid değişikliklerine ait genotipler ve sıklıkları Tablo 1'de yer almaktadır.

MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde belirlenen G442C (E148Q) tek nükleotid değişikliği literatürde tanımlanmış olan bir mutasyon olup, aynı gen bölgesinde belirlenen T306C, A414G, C495A, G605A tek nükleotid değişiklikleri Trakya populasyonunda saptadığımız tek nükleotid değişiklikleridir. Sadece ekson 2 gen bölgesinde nükleotid değişiklikleri taşıyan 31 hastadan 17'si T306C, A414G, C495A, G605A tek nükleotid değişikliklerini, altısı ise T306C, A414G, C495A tek nükleotid değişikliklerini birlikte taşımaktaydı. MEFV geni ekson 10 gen bölgesinde belirlenen G2040C (M680I), A2080G (M694V), G2082A (M694I), A2084G (K695R), T2177C (V726A), G2282A (R761H) tek nükleotid değişiklikleri literatürde tanımlanmış olan MEFV geni ekson 10 gen bölgesi mutasyonları olup bu gen bölgesinde literatürde belirtilmiş olan

**Tablo 1. Trakya populasyonu MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerinde belirlenen nükleotid değişiklerine ait genotipler ve sıklıkları**

Taşınan mutasyon	Hasta sayısı (n), (%)	Gen bölgesi
Mutasyon saptanamayan (0 mutasyon)	18 (%26.4)	
1 allelde mutasyon (Heterozigot mutant)		
M680I/-	1 (%0.14)	Ekson 10
M694V/-	4 (%0.58)	Ekson 10
M694I / -	1 (%0.14)	Ekson 10
K695R / -	2 (%0.29)	Ekson 10
V726A/ -	1 (%0.14)	Ekson 10
R761H/ -	1 (%0.14)	Ekson 10
E148Q/ -	1 (%0.14)	Ekson 2
A165A/ -	1 (%0.14)	Ekson 2
R202Q/-	2 (%0.29)	Ekson 2
Aynı 2 allelde mutasyon (Homozigot mutant)		
M680I/M680I	1 (%0.14)	Ekson 10
M694V/M694V	2 (%0.29)	Ekson 10
D102D/D102D	15 (%22)	Ekson 2
G138G/G138G	14 (%20.5)	Ekson 2
A165A/A165A	14 (%20.5)	Ekson 2
R202Q/R202Q	12 (%17.6)	Ekson 2
Farklı 2 allelde mutasyon (Bileşik heterozigot)		
M680I/M694V	1 (%0.14)	Ekson 10
M680I/R202Q	3 (%0.44)	Ekson 10/Ekson 2
D102D/A165A	1 (%0.14)	Ekson 2
A165A/R202Q	1 (%0.14)	Ekson 2
G138G/A165A	1 (%0.14)	Ekson 2
G138G/R202Q	1 (%0.14)	Ekson 2
Farklı 3 ve üzeri allelde mutasyon		
M680I/V726A/E148Q	1 (%0.14)	Ekson 10/Ekson 2
D102D/G138G/A165A	7 (%10.2)	Ekson 2
D102D/G138G/A165A/R202Q	10 (%14.7)	Ekson 2
M694V/ A165A/R202Q/E148Q	1 (%0.14)	Ekson 10/Ekson 2
D102D/G138G/A165A/E148Q	2 (%0.29)	Ekson 2
D102D/G138G/A165A/R202Q/ E148Q	2 (%0.29)	Ekson 2
M680I/D102D/G138G/A165A/R202Q	1 (%0.14)	Ekson 10/Ekson 2
R761H/ D102D/G138G/A165A/R202Q/E148Q	1 (%0.14)	Ekson 10/Ekson 2

mutasyonlardan farklı olarak yeni bir nükleotid değişikliği saptanmadı.

Çalışmamızda erkek ve kadın cinsiyetler arasında MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerinde belirlenen mutasyon ve tek nükleotid değişiklikleri toplamı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Ancak kadın hastalarda A2080G (M694V), ( $n=5$ , %14.7) ve G2040C (M680I), ( $n=4$ , %11.7) mutasyonları MEFV geni ekson 10 gen bölgesindeki diğer mutasyonlara oranla daha sık görülmekteydi ( $p<0.05$ ). Erkek hastalarda ise MEFV geni ekson 10 gen bölgesinde belirlenen mutasyonların görülmeye sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p>0.05$ ), (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi hastaları arasındaki erkek ağırlığı (Arap populasyonda %63, Ermeni populasyonunda %65.5, Yahudi populasyonunda %60-72) birçok etnik grupta ortaya konmasına rağmen, AAA'nın her iki cinsiyeti de benzer oranlarda etkilediği birçok çalışma tarafından rapor edilmiştir.<sup>[12]</sup> Türk AAA çalışma grubu<sup>[6]</sup> (hem yetişkinleri hem de çocukların içeren hasta grubunda) ile Paşa ve ark.<sup>[7]</sup> çalışmalarında erkek:kadın oranını 1.2:1 olarak bildirmiştir. Düşünsel ve ark.<sup>[12]</sup> ise çalışmalarında erkek:kadın oranını 1:1.3 olarak bulmuşlardır ve bu sonucun istatistiksel olarak belirgin olmadığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda erkek:kadın oranı 1:1 olarak belirlendi. Ancak bizim çalışmamızın temel amacı

**Tablo 2. Trakya populasyonu MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerinde belirlenen mutasyon ve tek nükleotid değişikliği sıklıkları**

	Tek nükleotid değişimleri	Heterozigot Mutant (n=68) (%)			Homozigot Mutant (n=68) (%)		
		Bay	Kadın	Toplam	Bay	Kadın	Toplam
Ekson 2 gen bölgesi							
1	T306C*	11	13	24	5	10	15
2	A414G*	12	13	25	5	9	14
3	C495A*	13	15	28	5	9	14
4	G605A*	12	10	22	4	4	8
5	G442C**	5	3	8	-	-	-
	Toplam	53	54	107	19	32	51
Ekson 10 gen bölgesi							
1	G2040C***	3	3	6	-	1	1
2	A2080G***	3	3	6	-	2	2
3	G2082A***	1	-	1	-	-	-
4	A2084G***	1	1	2	-	-	-
5	T2177C***	1	1	2	-	-	-
6	G2282A***	1	-	1	-	-	-
	Toplam	10	8	18	-	3	3

\* Trakya populasyonunda belirlenen tek nükleotid değişiklikleri

\*\* Literatürde tanımlanmış MEFV geni ekson 2 gen bölgelerine ait mutasyon

\*\*\* Literatürde tanımlanmış MEFV geni ekson 10 gen bölgelerine ait mutasyon

mutasyon sıklıklarının belirlenmesi olduğundan, çalışmaya her iki cinsiyet eşit sayıda dahil edildi. Cinsiyet sayısının bu şekilde rastgele olmayarak belirlenmiş olmasının çalışmamızın erkek:kadın oranı sonucunu istatistiksel olarak anlamsız kıldığı öngörüsündeyiz.

Çalışmamızın sonuçları Türkiye'de Paşa ve ark.'nın<sup>[7]</sup> Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Yiğit ve ark.'nın<sup>[13]</sup> Karadeniz Bölgesi'nde, Günel-Özcan ve ark.'nın<sup>[14]</sup> İç Anadolu Bölgesi'nde yapmış oldukları çalışmaların sonuçları ile bazı farklılıklar göstermektedir (Tablo 3). Çalışma sonuçları arasındaki bu farklılıkların birden fazla nedeni olabilir: 1- Çalışılan hasta sayılarının ve çalışmaya dahil olma kriterlerinin birbirinden farklı olması, 2- Kullanılan laboratuvar analiz yöntemlerinin farklılık göstermesi, 3- Aynı coğrafyada dahi olsa bazı bölgelerdeki etnik tabakaşımaya bağlı olarak gelişmiş olabilecek genetik polimorfik farklılıklar.

MEFV geni ekson 10 gen bölgeleri mutasyonları coğrafi bölgelerdeki görülme sıklıklarına göre sıralandığında: Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgeleri'nde M694V, V726A, M680I, Karadeniz Bölgesi'nde M694V, M680I, V726A, K695R, R761H, M694V ve Trakya Bölgesi'nde M694V, M680I, K695R, V726A, M694I, R761H şeklindedir.<sup>[7,13,14]</sup> Türkiye'de üç farklı coğrafik bölgede yapılmış olan çalışmaların yukarıda belirtilen sonuçları ile diğer çalışmaların sonuçları da dikkate alındığında Türk populasyonunda MEFV geni ekson 10 gen bölgelerinde en sık görülen mutasyon M694V'dir.<sup>[11,12]</sup> Bizim çalışmamızın sonucu da bu hipotezi destekler niteliktedir.

Çalışmamızda MEFV geni ekson 2 gen bölgelerinde belirllediğimiz T306C, A414G, C495A, G605A tek nükle-

otid değişimlerine Paşa ve ark.'nın,<sup>[7]</sup> Yiğit ve ark.'nın,<sup>[13]</sup> Günel-Özcan ve ark.'nın<sup>[14]</sup> yapmış oldukları çalışmalarında rastlanmamıştır (Tablo 3). Yiğit ve ark.<sup>[13]</sup> çalışmalarında ARMS (amplification refractory mutation analyses system) ve PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) metotları ile 205 hastada MEFV geni ekson 10 gen bölgesinde M694V, M680I, V726A mutasyonlarını, FMF StripAssay (reverse hybridization assay) metodу ile de 79 hastada MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde E148Q, ekson 3 gen bölgesinde P369S, ekson 5 gen bölgesinde F479L ve ekson 10 gen bölgesinde M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H mutasyonlarını araştırmışlardır. Paşa ve ark.<sup>[7]</sup> 119 hastada, Günel-Özcan ve ark.<sup>[14]</sup> 136 hastada FMF StripAssay metodу ile MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde E148Q, ekson 3 gen bölgesinde P369S, ekson 5 gen bölgesinde F479L ve ekson 10 gen bölgesinde M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H mutasyonlarını araştırmışlardır. Bilindiği üzere ARMS ve PCR-RFLP metotları ile sadece araştırmacı tarafından belirlenen gen bölgelerine ait mutasyonlar araştırılabilirken, FMF StripAssay metodуyla kullanılan kitin içerisinde mevcut olan gen bölgelerindeki mutasyonlar araştırılabilmektedir. Oysa otomatize DNA dizi analizi metodу ile ilgili gen bölgelerine ait tüm nükleotid dizisi belirlenebilmekte ve dolayısıyla daha önce belirlenmemiş olan, literatürde yer almayan nükleotid değişiklikleri de saptanabilmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda kullanmış olduğumuz otomatize DNA dizi analizi metodу diğer çalışmalarında tercih edilmiş olan ARMS, PCR-RFLP ve FMF StripAssay metodlarına göre

**Tablo 3. Türkiye'deki bazı coğrafi bölgelere göre MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgeleri mutasyon ve tek nükleotid değişikliği sıklıkları**

Trakya Bölgesi populasyonu		Güneydoğu Anadolu Bölgesi populasyonu		Karadeniz Bölgesi populasyonu		İç Anadolu Bölgesi populasyonu	
Homozygot n (%)	Heterozygot n (%)	Homozygot n (%)	Heterozygot n (%)	Homozygot n (%)	Heterozygot n (%)	Homozygot n (%)	Heterozygot n (%)
<b>Ekson 2 gen bölgesi</b>							
T306C	15 (22)	24 (35.2)	–	–	–	–	–
A414G	14 (20.5)	25 (36.7)	–	–	–	–	–
C495A	14 (20.5)	28 (41.1)	–	–	–	–	–
G605A	12 (17.6)	22 (32.3)	–	–	–	–	–
E148Q	–	8 (11.7)	3 (2.52)	21 (17.64)	1 (0.2)	19 (0.3)	1 (0.07)
<b>Ekson 10 gen bölgesi</b>							
M680I	1 (0.14)	6 (0.88)	4 (3.36)	3 (2.52)	30 (4.8)	41 (6.6)	1 (0.07)
M694V	2 (0.29)	6 (0.88)	17 (14.28)	21 (17.64)	119 (19)	93 (14.9)	2 (0.14)
M694I	–	1 (0.14)	–	6 (5.04)	1 (0.2)	–	–
K695R	–	2 (0.29)	–	–	–	5 (0.8)	–
V726A	–	2 (0.29)	2 (1.68)	12 (10.08)	–	13 (2.1)	–
R761H	–	1 (0.14)	1 (0.08)	1 (0.08)	–	3 (0.5)	–

daha yüksek maliyete sahip olsa da çok daha hassas bir moleküler genetik analiz metodudur.

MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde saptadığımız T306C, A414G, C495A tek nükleotid değişimleri bir aminoasidi belirleyen üçlü genetik şifreyi (kodon) değiştirse de taşıyıcı RNA (t-RNA) düzeyinde translasyonu gerçekleşen aminoasidin yapısında [D102D, G138G, A165A] değişiklik oluşturmayan eşanlamlı nükleotid değişiklikleridir.<sup>[15]</sup> Ancak çalışmamızın sonuçları genotip-fenotip ilişkisi yönünden değerlendirildiğinde, sadece ekson 2 gen bölgesinde T306C, A414G, C495A eşanlamlı nükleotid değişikliklerini bileşik heterozygot (2 allelde 2 farklı nükleotid değişikliği taşıyan) olarak taşıyan hastaların da AAA'nın klinik belirtilerini taşıdıklarını görüldü. Bu bağlamda hastalarda görülen klinik belirtilerin sadece bileşik heterozygotluktan kaynaklanabileceğini ifade edebilmek için MEFV geninin diğer eksonlarının da otomatize DNA dizi analizi metodu ile çalışmasına ihtiyaç vardır.

MEFV geni ekson 2 gen bölgesinde 605. nükleotiddede belirlediğimiz guaminin adenine dönüşümü (G605A), 202. kodonda arjinin (Arg, R) aminoasidinin glutamin (Glu, Q) aminoasidine dönüşümüne neden olarak, translasyonu gerçekleşen aminoasidin yapısında değişikliğe neden olmaktadır (yanlış anlamlı mutasyon). Aldea ve ark.<sup>[1]</sup> İspanyol populasyonunda yapmış oldukları çalışmalarında R202Q aminoasit değişikliğinin AAA ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Giaglis ve ark.<sup>[3]</sup> ise Yunan populasyonunda MEFV geni değişimlerinin analizine yönelik yapmış oldukları büyük bir kohort çalışmasında R202Q değişiminin homozigotluğunu AAA hastalarında %9.2 (14/152) oranında ve sağlıklı kontrollerde ise %0.7 (1/140) oranında saptamışlardır.

14 AAA hastasından R202Q homozigot olan 12'sinin hastalığa neden olan başka bir mutasyon taşımadığını belirlemişler ve bu sonuçlara bağlı olarak R202Q homozigotluğunun Yunan populasyonunda AAA fenotipi ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Biz de çalışmamızda sadece ekson 2 gen bölgesinde nükleotid değişiklikleri taşıyan 31 AAA hastasından R202Q homozigot olan dördünün (%1.3) beraberinde T306C, A414G, C495A nükleotid değişikliklerini (yukarıda da belirtildiği üzere “eş anlamlı” nükleotid değişiklikleri) homozigot olarak taşıdıklarını ve hastalığa neden olan başka bir mutasyon taşımadıklarını belirledik. Bununla birlikte, R202Q heterozygotluğunun sağlıklı bireyler arasında oldukça sık ve zararsız olduğu, bu yüzden R202Q heterozygotluğu için yararlı bir etki düşünülebileceği, bunun yanında, sağlıklı bireyler arasında R202Q homozigotluğunun göreceli yokluğunun potansiyel bir dozaja bağlı geciktirici etkiyi yansıtabileceği iddia edilmektedir.<sup>[3]</sup> Elde edilen bu bilgiler neticesinde G605A nükleotid değişikliğinin Trakya populasyonunda AAA hastalığı fenotipi ile ilişkisinin belirlenebilmesi için hem hasta hem de sağlıklı kontrol grubunda MEFV genine ait diğer ekson bölgelerinin de otomatize DNA dizi analizi metodu ile çalışmasına ihtiyaç vardır.

Ailevi Akdeniz Ateşi hastaları için önemli olan bir diğer nokta ise MEFV geni ekson 10 gen bölgesindeki mutasyonun genotipine göre amiloidoz gelişme riskinin varlığıdır.<sup>[16]</sup> Yiğit ve ark.<sup>[13]</sup> çalışmalarında M694V / M694V genotipine sahip amiloidozlu hasta oranını %37 (14/38) olarak bulmuşlar ve Türkiye'deki AAA hastaları arasında M694V / M694V genotipinin amiloidoz için bir risk faktörü olduğu sonucuna varmışlardır. Düşünsel ve ark.<sup>[12]</sup> da 102 AAA hastası ile yapmış oldukları çalışma-

larında, hastaların %45'inde (46/102) M694V/M694V genotipinin amiloidoz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Tekin ve ark.<sup>[17]</sup> ise çalışmalarında AAA'ya bağlı amiloidoz gelişen 18 hastanın hiçbirinde M694V mutasyonunu homozigot olarak saptamamışlar, 11 hastada sadece bir allelde V726A mutasyonunu (heterozigot mutant) rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 68 hastadan ikisi (%0.29) M694V/M694V genotipine (homozigot mutant) sahipti fakat amiloidoz gelişimi söz konusu değildi. Bu bilgiler ışığında mutasyonların amiloidoz oluşumunu açıklamada tek başına yeterli olmadığı, M694V homozygotluğu olsun ya da olmasın tüm AAA hastalarının risk altında olduğu, çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar ise hastalığa tanı konulma yaşı ve populasyonlar arasındaki genetik polimorfik farklılıklar ile ilgili olabileceğin sonucuna vardık.

Çalışmamızda analizler sonucunda mutasyon saptanamayan ancak klinik olarak AAA tanısı almış olan 18 (%26.4) hastada MEFV genine ait diğer eksonların ve gerekli görüldüğü takdirde intron-ekson birleşim bölgelerinin de otomatize DNA dizi analizi metodu ile çalışmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak Trakya populasyonunda MEFV geni ekson 2 ve ekson 10 gen bölgelerine ait mutasyonların taşıyıcılık oranı yüksektir ve bu hastalara mutlaka genetik danışmanlık verilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Aldea A, Calafell F, Aróstegui JI, Lao O, Rius J, Plaza S, et al. 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;23:399.
- Ustek D, Ekmekci CG, Selçukbiricik F, Cakiris A, Oku B, Vural B, et al. Association between reduced levels of MEFV messenger RNA in peripheral blood leukocytes and acute inflammation. *Arthritis Rheum* 2007;56:345-50.
- Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, Rafail S, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007;71:458-67.
- Sahin FI, Yilmaz Z, Yurtcu E, Baskin E. Comparison of the results of PCR-RFLP and reverse hybridization methods used in molecular diagnosis of FMF. *Genet Test* 2008;12:171-4.
- Lidar M, Livneh A. Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *Neth J Med* 2007;65:318-24.
- Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005;84:1-11.
- Pasa S, Altintas A, Devecioglu B, Cil T, Danis R, Isi H, et al. Familial Mediterranean fever gene mutations in the Southeastern region of Turkey and their phenotypical features. *Amyloid* 2008;15:49-53.
- Fragouli E, Eliopoulos E, Petraki E, Sidiropoulos P, Aksentijevich I, Galanakis E, et al. Familial Mediterranean Fever in Crete: a genetic and structural biological approach in a population of 'intermediate risk'. *Clin Genet* 2008;73:152-9.
- Sarrauste de Menthière C, Terrière S, Pugnère D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 2003;31:282-5.
- The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Demirkaya E, Tunca Y, Gok F, Ozen S, Gul D. A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:729-32.
- Duşünsel R, Dursun I, Gündüz Z, Poyrazoğlu MH, Gürgöze MK, Dundar M. Genotype-phenotype correlation in children with familial Mediterranean fever in a Turkish population. *Pediatr Int* 2008;50:208-12.
- Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, Ozdamar K, Cengiz K, Akpolat T. MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever in the Black Sea region of Turkey: Samsun experience [corrected]. *J Rheumatol* 2008;35:106-13.
- Gunel-Ozcan A, Sayin DB, Misirlioglu ED, Güliter S, Yakaryilmaz F, Ensari C. The spectrum of FMF mutations and genotypes in the referrals to molecular genetic laboratory at Kirikkale University in Turkey. *Mol Biol Rep* 2009;36:757-60.
- Moleküler genetik. In: Passarge E, editör. Renkli genetik atlası. Çev. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. p. 32-77.
- Medlej-Hashim M, Delague V, Chouery E, Salem N, Rawashdeh M, Lefranc G, et al. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet* 2004;5:4.
- Tekin M, Yalcinkaya F, Cakar N, Akar N, Misirlioglu M, Taştan H, et al. MEFV mutations in multiplex families with familial Mediterranean fever: is a particular genotype necessary for amyloidosis? *Clin Genet* 2000;57:430-4.