

## AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ ÖN TANISI ALAN OLGULARDA MEFV GEN MUTASYON ANALİZ SONUÇLARININ ÖNEMİ\*

### The Importance of MEFV Gene Analysis in Cases Prediagnosed as “Familial Mediterranean Fever”

Emre Yalçınkaya<sup>1</sup>, Şefik Güran<sup>2</sup>, Burcu Gülay Nas<sup>2</sup>, Ahmet Dursun<sup>2,4</sup>, Necat İmirzalıoğlu<sup>4</sup>

#### Özet

**Amaç:** Sunulan çalışmada Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) ön tanısı almış hastalarda “familial Mediterranean fever locus”-MEFV gen mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve yöntem:** AAA ön tanısı konan 83 olguda MEFV geninde en sık mutasyon tanımlandığı bildirilen M680I, M694V, V726A ve E148Q mutasyonları PCR amplifikasyon sonrası kit kullanılarak (PRONTO™ AAA Basic) incelenmiştir.

**Bulgular:** Değerlendirilen 83 olgunun 29’unda bu bölge için mutasyon tanımlanamazken 54 olguda mutasyon tanımlanmıştır (%65). Olguların 14’ünde homozigot mutasyon bulunmuştur (%17). Homozigot mutasyon bulunan 14 olgunun dördünde M680I/M680I, onunda M694V/M694V saptanmıştır. Sonuçlar klinikte daha ağır tablo ile seyrettiği ileri sürülen M694V ve M680I mutasyonlarının bizim içinde bulunduğumuz toplumda çok sık gözlemlendiğini göstermektedir. 40 (%48) olguda heterozigot mutasyon tanımlanmıştır. Heterozigot mutasyon tanımlanan 40 olgunun yedisinde bu gene ait iki mutasyon gözlemlenmiştir-“compound heterozygote” (M680I/M694V iki olguda, M694V/V726A üç olguda, E148Q/M694V bir olguda, M680I/V726A bir olguda). **Sonuç:** Bulgular toplumumuzda MEFV genine ait mutasyonların yüksek taşıyıcılık oranını göstermesi yönünden ilgi çekicidir. Günümüzde AAA tanısında MEFV gen mutasyonlarının bulunması önemli bir tanı kriteridir.

**Anahtar Kelimeler :** Ailesel Akdeniz Ateşi; Marenosttrin; Mutasyon.

#### Summary

**Purpose:** In this study we aimed to determine “familial mediterranean fever locus” MEFV gene mutation in cases with a prediagnosis of familial mediterranean fever (FMF).

**Material and methods:** MEFV mutations reported as being frequently seen (M680I, M694V, V726A and E148Q) were analyzed with PCR amplification kit (PRONTO™ FMF Basic, Savyon Diagnostic Ltd.) on 83 cases who were suspected of having FMF.

**Results:** In 29 out of 83 cases, no mutations were observed whereas in 54 (65%) out of 83 cases, mutations in MEFV locus were observed. In 14 cases (%17), homozygote mutation of one locus was found. M680I/M680I homozygote mutation was observed in four cases and M694V/M694V homozygote mutation in ten cases. These results demonstrate that M694V and M680I (these mutations are suggested to have more serious clinic patterns) mutations are seen frequently in our country. Forty cases (48%) had heterozygote mutations in MEFV gene. Seven out of 40 cases had compound heterozygote mutations (M680I/M694V mutations in 2 cases, M694V/V726A mutations in three cases, E148Q/M694V mutations in one case, and M680I/V726A mutations in one case).

**Conclusion:** Our results represent a high carrier rate of mutations in MEFV gene in our country. Today, genetic analysis of MEFV gene is an important diagnostic criteria of FMF disease.

**Key Words:** Familial Mediterranean Fever; Marenosttrin; Mutation.

\*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinin tıp fakültesi öğrencileri arasında düzenlediği uluslararası 18th IMSSC (8-11 Mayıs 2003-İstanbul-TÜRKİYE) toplantısına sözlü tebliğ olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup>GATA, Tıp Fakültesi-Öğrenci

<sup>2</sup>GATA Tıbbi Biyoloji AD,

<sup>4</sup>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Tıbbi Genetik BD.

Geliş tarihi: 9 Şubat 2004

## **Giriş**

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) tekrarlayan karın ağrısı, ateş, eklem ağrıları, ciltte döküntü şikayetleri ile karşımıza çıkan otozomal resesif kalıtım kalıbı gösteren bir hastalıktır. Tekrarlayan karın ağrıları karın boşluğunun inflamasyonuna bağlı olarak karşımıza çıkmaktadır. Karın ağrısı ve ateş 12 ile 72 saat arasında sürmektedir. Olgularda eklem ağrıları daha uzun süreli olabilir. Vücutta amiloid birikimi önemli bir komplikasyondur. Amiloidozisin en fazla görüldüğü organ böbreklerdir. Olgularda karşılaşılan ölümler böbrek yetmezliğine bağlı olarak gelişmektedir (1).

Bu hastalık yaygın olarak ülkemizi de içine alan kuşakta gözlenir. Türklerde, Ermenilerde, Arap ve Yahudilerde görülme sıklığı diğer toplumlara oranla çok fazladır. Çalışmalar toplumumuz için hastalık taşıyıcılığı oranını %20 olarak göstermektedir (2). Karın ağrısı nedeni ile hastanelere başvuran olgular arasında apendektomi uygulanan olgu sayısı az değildir. Ağrı süresince yapılan analizlerde kanda artmış lökosit ve fibrinojen değerleri AAA tanısında önemlidir. Olgularda aile hikayesi mutlaka sorgulanmalıdır.

AAA etyolojisinde pirin proteini önemli rol oynar. Nötrofil aktivitesinde rolü olan bu protein 16p13.3'te bulunan MEFV geninden sentezlenir. MEFV geni 10 ekson içeren büyük bir gendir. Bu gene ait literatürde yaklaşık 20 farklı mutasyon tanımlandığı halde gene ait mutasyonların özellikle 10. eksonda bulunan küçük bir alana lokalize olduğu bilinmektedir (2).

Çalışmamızda AAA ön tanısı ile gönderilen 83 olguda MEFV genine ait en çok mutasyon tanımlandığı bildirilen M680I, M694V, V726A, E148Q bölgeleri incelenmiş, elde edilen sonuçlar olgu klinik verileri ile karşılaştırılmıştır.

## **Gereç ve Yöntem**

AAA ön tanısı konan olgular çalışmaya alınmış ve olgularda DNA izolasyonu Sambrook ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem ile gerçekleştirilmiştir

(3). İzole edilen DNA' larda MEFV genine ait 10. eksonda bulunan M680I, M694V, V726A ve 2. eksonda bulunan E148Q mutasyonları yönünden incelenmesi amacı ile "Savon Pronto FMF Basic Kit" kullanılmıştır. Uygulanan yöntem üretici firmanın önerdiği yöntemdir . Kit içinde hazır olarak tek nükleotid değişikliklerini gösteren primerler vardır. Elde edilen DNA' lar PCR reaksiyonuna alınmış, DNA ürününün uzaması-"extension assay" PCR amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (4). Kit ile birlikte verilen amplifikasyon solüsyonu olgu DNA' ları ile birlikte PCR amplifikasyonuna alınmıştır (2µl DNA, 18.0 l amplifikasyon karışımı, 0.5l Taq DNA polimeraz). PCR amplifikasyonunda 94 derece 30 saniye, 59 derece 45 saniye, 72 derece 30 saniye olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Elde edilen amplifikasyonun kalitesi DNA ürünleri agaroz jelde (%2lik) 60 Volt'ta 2 saat yürütüldükten sonra ultraviyole altında kontrol edilmiştir. Amplifikasyon gerçekleşmemiş olgularda PCR amplifikasyonu tekrarlanmıştır. AAA düşünülen olgulardan elde edilen amplifikasyon ürünü (15l) ve hazırlanan karışım (Pronto Bufer 2 60.0 µl, Solüsyon C 3.0 µl, Solüsyon D 2.0 µl) 37° de 30 dakika, 95° de 10 dakika tutulmuş, elde edilen ürün 94 derece 30 dakika, 60 derece 10 dakika (20 döngü) bir kez daha amplifiye edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar yıkama işlemine alınmıştır. Üretici firma protokolü izlenerek her mutasyon için bir normal bir mutant kuyucuğun olduğu 96' lık test tüplerinde ortaya çıkan renk değişimi esasına göre analiz yapılmıştır (Şekil 1). Renk değişim farkının az olduğu olgularda test tekrar edilmiştir.

## **Bulgular**

AAA ön tanısı ile gönderilen 83 olgunun anamnezinde 53 (%64) olguda şikayet yalnızca eklem ağrısıdır. Olguların 45' inde (%54) karın ağrısı şikayeti vardır. Bu olguların 41' inde (%49) karın ağrısına yüksek ateş şikayeti eklenmektedir. 28 olguda (%34) ilk şikayetler 20 yaş öncesinde, 47 olguda (%57) ilk şikayetler 20-40 yaş arasında, 7 (%8) olguda şikayetler 40 yaş üzerinde gözlenmiştir. Sadece 5 olguda (%6)

nöbet sırasında kanda fibrinojenin yükseldiğini gösteren laboratuvar tetkiki vardır. Dört olgu aile öyküsünde AAA tanısı almış yakınları olduğunu bildirmiştir. Başvuran olguların tümünde amiloid birikimine ve böbrek yetmezliğine ait bir bulgu tanımlanmamıştır. Mutasyon analizine alınan 83 olgunun 54'ünde homozigot veya heterozigot mutasyon tespit edilmiştir (%65). Değerlendirmeye alınan 29 olguda aranan mutasyonlar saptanmamıştır. Dört olguda M680I / M680I, 10 olguda M694V / M694V homozigot mutasyonları tespit edilmiştir. M694V / M694V homozigot mutasyon tanımlanan olgulardan onunun yaşlarının 25 ve altında olması dikkat çeken bir bulgudur. Çalışılan olguların 14'ünde homozigot mutasyon tanımlanması (olguların %17 si) hastalık tanısında önemlidir. Heterozigot mutasyon tanımlanan 40 olgunun, yedisinde iki lokusa ait heterozigot mutasyon birlikte gözlenmiştir. İki olguda M680I/M694V, üç olguda M694V/V726A, bir olguda E148Q/M694V, bir olguda M680I/V726A gözlenmiştir. 33 olguda tek bir gene ait heterozigot mutasyon tanımlanmıştır. Tek bir gene ait heterozigot mutasyon tanımlanan 33 olgunun 3 ü M680I mutasyonunu, 19'u M694V mutasyonunu, dört olgu V726A mutasyonunu, yedi olgu E148Q mutasyonunu göstermektedir. Çalışmaya alınan 29 olguda tanımlanan bölgelere ait mutasyon tanımlanmamıştır. Olgularda elde edilen mutasyonlara ait dağılım Tablo 1' de, bu bulgulara göre mutasyonları Türk toplumu için taşıma yüzdeleri Tablo 2 de görülmektedir.

### Tartışma

AAA yurdumuzda sık gözlenen ve klinikte tanısı çoğu zaman güçlükle konabilen bir hastalık tablosudur. Olgularda 12-72 saat arasında süren karın ağrısı ve ateş bulguları klinikte bizi AAA ' ye yaklaştırmaktadır. Olgularda genellikle karın ağrısı şikayetleri %95 olguda, göğüs ağrısı %50 olguda, eklem ağrısı bulguları %50' nin altında bir oranda gözlenmektedir. Karın ağrısı şikayetleri %50 oranında ilk bulgudur (4). Bizim grubumuzda eklem ağrısı bulgularının %50' nin üzerine görülmesi dikkat çekmektedir. Kriz süresince

alınan kan değerlerinde lökosit ve fibrinojen yüksekliği bir diğer önemli tanı kriteridir (5). Ancak moleküler tanı amacı ile gönderilen olguların sadece %6 sında kriz süresince bu analiz yapılabilmiş ve yüksekliği gösterilebilmiştir. Olguların tümünde amiloid birikimine bağlı böbrek yetmezliği bulgusu tespit edilmemiştir.

Klinik tanısı zor olan AAA hastalığının moleküler genetiğinin anlaşılması yönünde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kromozom 16p13.3' te bulunan MEFV geni nötrofil aktivitesinde önemli birin proteinini kodlamaktadır (6). AAA olgularının etyolojisinde önemli rolü olan MEFV geni ile ilgili mutasyonların toplumlarda 4-6 mutasyondan köken aldığı-“founder effect”, bilinen bir gerçektir (2). Bu nedenle toplumumuzda en fazla mutasyon gözleendiği rapor edilen MEFV genine ait 4 bölge çalışmaya alınmıştır ve hasta grubumuzun mutasyon taşıma oranı %65 olarak bulunmuştur. Daha önce benzer bir seride çalıştığımız bölgelere ek olarak M694I bölgesini de içeren seride Türk toplumunun mutasyon taşıma oranı %74 olarak rapor edilmiştir (7). Türk toplumunda geniş bir seride yapılan çalışmada M694V %51.55, M680I %9.22, V726A %2,88, M694I %0.44, E148Q %3.55 mutasyon oranları rapor edilmiştir (8). Bizim çalışmamızda genlere ait mutasyon sıklığı bu çalışmadaki verileri destekler nitelikte olup M680I, V726A ve E148Q değerleri bu değerlerin üzerinde bulunmuştur (Tablo 2). MEFV geni ile ilgili mutasyon taşıma yüzdesi Ermeni toplumu için yüksek oranda rapor edilmektedir (farklı kaynaklarda %37 ile %50 arasında) (2, 9). Bu oran toplumumuzda %20' dir (2, 8, 10). Klinikte tanı koymada büyük problemler yaşanan AAA olguları gibi olgularda MEFV geni ile ilgili mutasyonların bulunmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Çalışmaya alınan olguların %17 sinde gösterilen homozigot mutasyon varlığı tanı için değerli bir bulgudur. Homozigot mutasyon tanımlanmayan ancak aile öyküsü, klinik ve laboratuvar bulguların ışığında AAA düşünülen olgularda bu gene ait mutasyon taranmayan bölgelerde veya halen bu

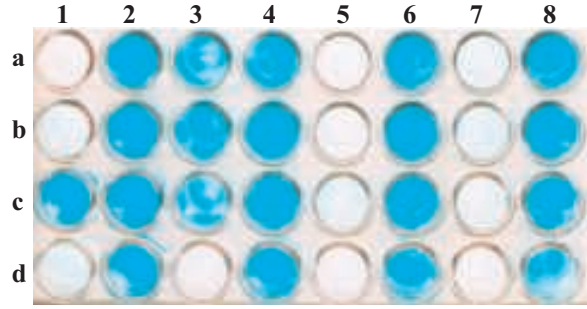
hastalığın etyolojisinde rolü olduğu halde tanımlanmamış olan başka bir gendeki probleme bağlı olarak bu hastalığın geliştiği söylenebilir.

Literatürde daha ağır klinik tablo ile seyrettiği düşünülen kodon 680 ve kodon 694 mutasyonlarının çalıştığımız hasta grubunda tanımlanan mutasyonların %88' ini oluşturması da diğer önemli bir bulgudur. Serimizde M694V / M694V homozigot mutasyon tanımlanan olguların onunun yaşlarının 25 ve altında olması dikkat çeken bir bulgudur. AAA gelişimdeki rolü günümüzde tartışılan, daha hafif klinik tablo ile seyrettiği bildirilen E148Q genine ait sadece bir olguda taşıyıcılık tespit edilmesi de toplumumuzda bu tür hafif klinik tablo ile seyreden AAA olgularının daha az görüldüğünü düşündürmektedir (8, 12, 13, 14).

Klinikte mutasyon tanımlanmamış 29 olgudan sadece 5' inde klinik ve diğer laboratuvar verilerinin ışığında AAA tanısı konmuş ve olgulara tedavi başlatılmıştır. Dört olgu tedaviden yarar gördüğünü belirtirken bir olgudan haber alınmamıştır.

Homozigot mutasyon tanımlanan olgularda AAA tanısı klinik olarak da desteklenmiş ve tüm olgularda tıbbi tedavi başlanmıştır. Bu 14 olguda uygulanan test ile kesin tanının konması ve tedaviye başlanması önemlidir. "Compound heterozygote" olguların 6' sında klinik bulgular AAA tanısını destekler nitelikte olduğu için tedavi önerilmiştir. Tek bir bölgede heterozigot mutasyon tanımlanan 33 olgudan sadece 2' sinde klinik olarak AAA düşünülmüş ve tedavi başlanmıştır. Bu 2 olguda genin başka bir mutasyona bağlı hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Elde edilen veriler rutin kullanıma yeni giren moleküler genetik testlerin AAA gibi yurdumuzda sık tanımlanan bir hastalık tanısında ne derece yararlı olduğunu kanıtlar niteliktedir.



**Şekil 1** : FMF analiz sonuçları. Sıra 1 mutant M608I, sıra 2 normal M608I, sıra 3 mutant M694V, sıra 4 normal M694V, sıra 5 mutant V726A, sıra 6 normal V726A, sıra 7 mutant E148Q, sıra 8 normal E148Q' yu göstermektedir. A ve B sırası M694V heterozigot mutasyonu, C sırası M608I/M694V "compound heterozigot" mutasyonu D sırası normal olgu sonuçlarını yansıtmaktadır.

**Tablo 1.** Olgularımızda mutasyon dağılımı

Homozigot Mutasyon Tipi	Olgu Sayısı	Heterozigot Mutasyon Tipi	Olgu Sayısı
M694V/M694V	10	M694V/V726A	3
M680I/M680I	4	M680I/M694V	2
		M680I/V726A	1
		E148Q/M694V	1
		M694V	19
		M680I	3
		V726I	4
		E148Q	7

**Tablo 2.** Elde edilen sonuçlar ışığında bulunan Türk toplumu için mutasyon taşıma yüzdeleri (mutant alel sayıları baz alınarak bulunmuştur)

Mutasyon Tipi	Türk Toplumuna İçin Mutasyon Taşıma Yüzdesi Sonuçlarımız	Daha Önce Yayınlanan Türk Toplumuna İçin Mutasyon Taşıma Yüzdesi Sonuçları (Ref 9)
M694V	%51.88	%51.33
M680I	%13.20	%9.22
V726A	%7.54	%2.88
E148Q	%7.54	%3.55

## KAYNAKLAR

1. Berhman RE, Vaughan VC. *Nelson Textbook of Pediatrics. (Twelfth ed)*. WB. Saunders Company, Philadelphia, 1983, pp 1223.
2. Mor A, Gal R, Livneh A. *Abdominal and digestive system associations of familial Mediterranean fever. Am. J Gastroenterol* 2003; 98: 2594-604.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, A Laboratory Manual. (Second ed)* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989, pp 1443.
4. Babior MB, Matzner Y. *Clinical implications of basic reserach, The Familial Mediterranean Gene-cloned at last. The New England Journal Of Medicine* 1997; 337: 1548-1549.
5. Ben-Chetrit E, Levy M. *Familial Mediterranean fever (Seminar). Lancet* 1998; 351: 659-663.
6. Akarsu AN, Saatçi U, Özen S, Bakkaloğlu A, Besbas N, Sarfarazi M. *Genetic lincage study of FMF to 16p13.3 and evidence of genetic herterogenity in Turkish population. J. Med Genet* 1997; 34: 573-578.
7. Touitou I: *The spectrum of Familial Mediteranean Fever (FMF) mutations. Eur J. Human Genet* 2001; 98: 473-483.
8. Yılmaz E, Özen S, Balcı M et al: *Mutation frequency of FMF and evidence for a high carrier rate in the Turkish Population. Eur J. Human Genet* 2003; 9(7): 553-555.
9. Caraneuve C, Havanesyon Z, Genevieve D et al. *Familial Mediterranean Fewer among patients from Karabakh and the diagnostic value of MEFV gene analysis in all classically affected populations. Arthritis Rheum.* 2003; 48: 2324-2331.
10. Bakkaloğlu A. *Familial Mediterranean Fever. Pediatr. Nephrol* 2003; 18: 853-859.
11. Majeed HA, El-Shanti H, Al-Khateeb MS, Rabaiha ZA. *Genotype/phenotype correlation's in Arab patients with Familial Mediterranean Fever. Semin Arthritis Rheum* 2002; 31: 371-376.
12. Ozen S, Besbos N, Bakkaloğlu A, Yılmaz E. *Pyrin Q 148 mutation and FMF, QJM* 2002; 95: 332-3.
13. Tchernitcko D, Legendre M, Cozeneuve C, Delohaye A, Niel F, Amselem S. *The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of Familial Mediterranean Fewer. Human Mutat* 2003; 22: 339-340.