



Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda *MEFV* Gen Mutasyonları

Elif Yeşilada*, Serap Savacı*, Şengül Yüksel*, Gonca Gülbay**, Gonca Otlu*,
Ebru Kaygusuzoğlu*

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
** İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ailesel Akdeniz ateşi (FMF), *MEFV* genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Bu gen, kromozom 16p13.3'da haritalanmıştır ve özellikle granülositlerde bulunan bir proteini (pirin) kodlamaktadır. Bu çalışmada FMF ön tanısı ile refere edilen 197 olguda *MEFV* geninde sıklıkla rastlandığı bildirilen *E148Q*, *P369S*, *F479L*, *M680I (G/C)*, *M680I (G/A)*, *I692del*, *M694V*, *M694I*, *K695R*, *V726A*, *A744S* ve *R761H* mutasyonları incelenmiştir. Çalışılan olguların 93'ünde *MEFV* gen mutasyonları gözlenmiştir (%47). Bunlar arasında, 15 hasta pirin mutasyonları için homozigot; 22 hasta bileşik heterozigot olarak belirlenirken 57 hastanın ise test edilen mutasyonlardan yalnızca birini taşıdığı bulunmuştur. Heterozigot veya homozigot hastalarda sıklıkla rastlanılan mutasyonlar sırası ile *M694V* (%31), *M680I* (%12) ve *E148Q* (%9)'dır ve bunları *A744S* (%4) ve *V726A* (%3) izlemektedir. *P369S* mutasyonu allellerin %2'sini oluştururken *F479L*, *M694I*, *K695R* ve *R761H* mutasyonlarının oldukça düşük frekanslarda olduğu belirlenmiştir. *M680I (G/A)* ve *I692del* mutasyonlarına ise bu çalışmada rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), *MEFV* Geni, Mutasyon

***MEFV* Mutations in Cases with Familial Mediterranean Fever (FMF)**

Familial Mediterranean fever is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the FMF gene (*MEFV*). This gene has been mapped to chromosome 16p13.3 and generates a protein (pyrin) found exclusively in granulocytes. In this study, the most prevalent *MEFV* gene mutations (*E148Q*, *P369S*, *F479L*, *M680I (G/C)*, *M680I (G/A)*, *I692del*, *M694V*, *M694I*, *K695R*, *V726A*, *A744S* and *R761H*) were analyzed for 197 cases referred to our department with the diagnosis of FMF. Of these cases, 93 (47%) were identified with an *MEFV* gene mutation. Among those, 15 patients were found to be homozygote for pyrin mutations; 22 patients were with compound heterozygosity; 57 patients were found to carry only one of the screened mutations. The most frequent mutations in heterozygous or homozygous patients were *M694V*, *M680I* and *E148Q*, comprising 31%, 12% and 9% of the alleles, respectively. They were followed by *A744S* and *V726A* with rates of 4% and 3% of the alleles, respectively. The *P369S* mutation accounted for 2% of the alleles only and *F479L*, *M694I*, *K695R* and *R761H* mutations were rarely determined. *M680I (G/A)* and *I692del* mutations were not found in our patients.

Key Words: Familial Mediterranean Fever (FMF), *MEFV* gene, Mutation

Ailesel Akdeniz ateşi (Familial Mediterranean fever-FMF) özellikle Musevi, Ermeni, Türk ve Arap toplumlarında sık görülen otozomal resesif bir hastalıktır. FMF'in ülkemizde görülme sıklığı 1/1000 olarak bilinmektedir. Taşıyıcılık oranı ise değişik araştırmalarda %15-34 olarak rapor edilmiştir. Bir başka deyişle ülkemizde her 5 kişiden birisi taşıyıcı konumundadır.¹ FMF tekrarlayan kısa süreli ateş ile birlikte karın, göğüs ve eklem ağrıları, eritem benzeri deri lezyonları ile karakterizedir. Hastalar ateş ve ağrı atakları geçirirler. Atakların süresi ve tipi mutasyon, etnik köken ve kolçisin kullanımına olduğu kadar yaşa ve cinsiyete göre de farklılıklar gösterir. Bazı olgularda gelişen amiloidoz hastalığın yaşamı tehdit eden en önemli komplikasyonudur.²⁻⁴

MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalize olmuştur ve 781 aminoasitli bir proteini (pirin) kodlamaktadır. Pirin proteininin FMF atakları sırasında inflamasyon yerinde nörofillerin aktivitesi ve inflamasyonun inhibe edilmesinde rol aldığı belirtilmektedir.^{5,6} Bu bulgulara rağmen yine de FMF'in kesin patojeni anlaşılmamıştır.

On exondan oluşan gende hastalıkla ilgili mutasyonlar 1997 yılından itibaren tanımlanmaya başlanmıştır. FMF genine ait literatürde yaklaşık 40 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Söz konusu mutasyonların çoğunluğu missens mutasyon olmakla birlikte nonsens ve delesyon mutasyonları da tanımlanmıştır. Mutasyonların büyük bir bölümü ekson on içerisinde küçük bir alanda lokalize olmuştur.^{7,8}

MEFV geninin belirlenmesi FMF'in tanısı için moleküler genetik çalışmalara olanak sağlamıştır. Gerçekleştirilen tanı testleri non-invasiv olup klinik sendrom öncesinde hastaların tanısını sağlamada önemli rol oynamaktadır. Moleküler genetik testler FMF hastası olduğu daha önceden bilinen hastaların risk taşıyan kardeşlerinin belirlenmesi ve kolşisin tedavisine zamanında başlanması bakımından da önem taşımaktadır.

Çalışmamızda FMF ön tanısı ile refere edilen 197 olguda *MEFV* geni en sık rastlandığı belirtilen 12 mutasyon bakımından incelenmiştir. Söz konusu mutasyonlar: *E148Q*, ekson 2 de; *P369S* ekson 3 de; *F479L* ekson 5 de ve *M680I (G/C)*, *M680I (G/A)*, *I692del (2076 -2078)*, *M694V*, *M694I*, *K695R*, *V726A*, *A744S*, ve *R761H* ekson 10 da bulunmaktadır.^{9, 10} Elde edilen veriler 2004-2005 döneminde Turgut Özal Tıp Merkezi'ne ait istatistiksel veriler olarak sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada farklı birimlerden (Pediatri AD, Gastroenteroloji AD, Nefroloji AD, Hematoloji AD, Kadın Doğum AD, Göğüs Hastalıkları AD, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon AD ve Enfeksiyon Hastalıkları AD) FMF ön tanısı ile refere edilen 197 olgudan alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. *MEFV* geni ile ilişkili 12 mutasyonun taranması için pratik ve güvenilir bir çalışma olanağı sağlayan ters hibridizasyon yöntemini temel alan FMF StripA^{ssay} kiti (ViennaLab Labordiagnostika) kullanılmıştır.^{9, 10}

Bu yöntem beş aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalarda sırası ile aşağıdaki işlemler yapılmıştır. (a) DNA kan örneklerinden standart yöntem ile izole edilmiştir, (b) *in vitro* multiplex amplifikasyon (multiplex PCR)'un ardından (c) %3 lük agaroz jelde 4 adet ampikonun (206, 239, 295 ve 318 bp) gözlenmesi ile multiplex PCR kontrol edilmiştir. Daha sonra (c) 8 tane wild-type ve 12 tane de mutant-spesifik immobilize oligonucleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanmıştır. Son aşamada (e) biyotinle

işaretlenen dizilerin streptavidine-alkaline fosfataz ve renk substratları kullanarak belirlenmesinin ardından sonuçlar analiz edilmiştir.

BULGULAR

FMF ön tanısı ile refere edilen 197 olgunun 93'ünde mutasyon belirlenmiştir (%47.21) (Tablo 1). Mutasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Bazı olgularda çalışma kapsamına alınan 12 bölgenin birinde mutasyon gözlenirken bazı olgularda iki bölgede birden mutasyon gözlenmiştir. Bunlar arasında homozigot mutasyonlar; *M694V/M694V* (N=12) ve *M680I(G/C)/M680I(G/C)* (N=3) olmak üzere tanımlanmıştır. Heterozigot mutasyonlar arasında *M680I (G/C)* (N=8), *M694V* (N=22), *M694I* (N=1), *E148Q* (N=12), *A744S* (N=8), *P369S* (N=3), *K695R* (N=1) ve *V726A* (N=2) belirlenmiştir. Ayrıca, iki ayrı mutasyonu birlikte taşıyanlar içerisinde *M694V/V726A* (N=3), *M694V/E148Q* (N=2), *M694V/M680I(G/C)* (N=5), *M694V/R761H* (N=1), *M694V/A744S* (N=1), *M694V/M694I* (N=1), *E148Q/P369S* (N=2), *E148Q/M680I(G/C)* (N=2), *M680I(G/C)/K695R* (N=1), *M680I(G/C)/V726A* (N=1), *M680I(G/C)/R761H* (N=1) ve *F479L/V726A* (N=1) belirlenmiştir. *M680I(G/A)* ve *I692del* mutasyonlarına ise olgularımız arasında rastlanmamıştır.

Tablo 1. FMF ön tanılı hastada *MEFV* genotipleri

Genotipler		Hasta Sayısı
Allel 1	Allel 2	
E148Q	P369S	2
E148Q	M680I (G/C)	2
E148Q	M694V	2
E148Q	wt	12
P369S	wt	3
F479L	V726A	1
M680I (G/C)	M680I (G/C)	3
M680I (G/C)	M694V	5
M680I (G/C)	K695R	1
M680I (G/C)	V726A	1
M680I (G/C)	R761H	1
M680I (G/C)	wt	8
M694V	M694V	12
M694V	V726A	3
M694V	R761H	1
M694V	M694I	1
M694V	A744S	1
M694V	wt	22
M694I	wt	1
K695R	wt	1
V726A	wt	2
A744S	wt	8
wt	wt	104
Toplam		197

wt, yabancı tip, normal allel

TARTIŞMA

Hızla gelişmekte olan moleküler genetik yöntemler ile FMF'in moleküler temelini anlaşılması ve tanısının konulması yönünde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Yakın döneme kadar çok sayıdaki olgunun mutasyonlarının belirlenememesi nedeni ile tanı alamadığı belirtilmektedir.² FMF olgularının etiolojisinde rol alan *MEFV* genindeki mutasyonların sayısı ve çeşidi toplumlar arasında değişiklik göstermektedir.^{1,6,11} Çalışmamızda FMF ön tanısı ile laboratuvarımıza gönderilen olgularda sıklıkla gözlemlendiği rapor edilen 12 mutasyon taranmıştır. Elde edilen verilere göre olguların %47 sinde mutasyon belirlenmiştir. Çalışmamızda homozigotların oranı %16 olup daha ağır klinik tablo ile ortaya çıkan M694V ve M680I(G/C) mutasyonlarını içermektedir. Çeşitli mutasyonları homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan bireyler dikkate alındığında %50 oranında M694V mutasyonu taşıyan bireye rastlanmıştır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda bu oran Türkler için %41- 45 olarak belirtilirken Musevilerde %65 ve Araplarda ise %20 olarak rapor edilmiştir. Farklı etnik gruplardaki FMF hastaları dikkate alındığında M694V mutasyonuna Akdeniz mutasyonu adı verilmiştir. Söz konusu mutasyonun 2000 yıl önce tek bir atasal kromozomdan köken aldığı belirtilmektedir.³

MEFV geninde bulunan tüm mutasyonlar arasında M680I, M694V, V726A ve E148Q'nun en yaygın mutasyonlar olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca bunlar arasında ilk üçünün ekson 10'da bulunduğu ve FMF mutasyonu taşıyan kromozomlarda %85 sıklıkla rastlandığı rapor edilmektedir.⁴ Çalışmamızda FMF mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda (N=93) allellerin frekansları göz önüne alındığında M694V mutasyonuna %31.72 ile en fazla rastlanırken bunu sırası ile M680I(G/C) (%12.90) ve E148Q (%9.68) izlemektedir (Tablo 2). Bu sonuç yukarıdaki verileri destekler niteliktedir. Amiloidozun yüksek frekansta olduğu populasyonlarda M694V mutasyonunun da yaygın olması amiloidozun ortaya çıkışının olası açıklaması olarak düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda M694V mutasyonu ve amiloidoz arasındaki pozitif ilişki vurgulanırken¹² bazı çalışmalarda ise amiloidoz gelişen hastalarda bu mutasyonun dışında diğer mutasyonlar da rapor edilmektedir. Bu çalışmaların birinde amiloidoz gelişen 2 hasta bileşik heterozigot (V726A/M680I) olarak¹³ belirtilirken başka bir çalışmada ise bir hasta V726A mutasyonu için homozigot olarak rapor edilmiştir.¹⁴

Tablo 2. *MEFV* mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda (N=93) allellerin frekansları

Mutasyon	Allel Sayısı	(%)
E148Q	18	9.68
P369S	5	2.69
F479L	1	0.54
M680I (G/C)	24	12.90
M694V	59	31.72
M694I	2	1.08
K695R	2	1.08
V726A	7	3.76
A744S	9	4.84
R761H	2	1.08
wt	57	30.64
Toplam	186	100

wt, yabancı tip, normal allel

Çalışmamızda ikinci sıklıkta gözlenen M680I (G/C) mutasyonunun yurdumuzdaki FMF hastaları arasındaki allel frekansının %14 olduğu belirtilmektedir.^{1,15} M694V mutasyonu ile benzer etkilere sahip olduğunu rapor eden çalışmalar vardır.²

E148Q mutasyonunun ise Avrupa'da yaygın olduğu belirtilirken ülkemiz için sıklığı %13 olarak rapor edilmiştir.¹⁶ Bu mutasyonun fenotipik etkisi ile ilgili farklı yorumlar çeşitli çalışmalarda verilmektedir. Bir çalışmada E148Q mutasyonu bakımından homozigot olanların hasta olmadığı, hastalığın ortaya çıkması için başka mutasyonların da gerektiği vurgulanırken¹⁷ bir başka çalışmada ise bu mutasyonun FMF'in patofizyolojisinde rol oynadığı belirtilmektedir.¹⁸ Tchernitchko ve ark.¹⁰ ise E148Q'nun polimorfik bir varyant olduğunu ve zararlı olmadığını belirtmektedir.

Sıklıkla Arap populasyonlarında rastlandığı belirtilen A744S mutasyonuna¹⁶ çalışma grubumuzda %4.84 oranında rastlanmıştır.

M726A mutasyonuna ülkemiz FMF hastaları arasında %9 sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir.^{1,15} Düşük etkili bir mutasyon olarak tanımlanmasına karşın amiloidoz gelişen hastalar da rapor edilmiştir.¹⁶ Çalışma grubumuzda bu mutasyon %3.76 oranında belirlenmiştir.

Çalışma grubumuzda P369S (%2.69), F479L (%0.54), M694I (%1.08), K695R (%1.08) mutasyonları oldukça düşük frekanslarda bulunmuştur. Literatür çalışmalarımızda ülkemizde bu mutasyonların bulunma sıklığına ilişkin verilere rastlanmamıştır.

Çalışmalarımız henüz çok yeni olduğundan olguların prognozları ile ilgili ayrıntılı bilgi toplanamamıştır. Sonraki dönem içerisinde olgularımız bu yönleri ile de değerlendirilecektir. FMF mutasyonlarının saptanması

sonucunda öncelikle klinik tanı konfirme edilmiş olacak ve zaman kaybetmeden kolşisin tedavisine başlanması sağlanacaktır. Ayrıca, taşıyıcılık oranının çok yüksek olduğu ülkemizde hasta yakınlarının mutlaka belirlenen mutasyon açısından taranması gerekmektedir. FMF taşıyıcılarının evlenecekleri kişilerin de FMF taşıyıcılığı açısından incelenmesi önem taşımaktadır. Genetik analizlerin ömür boyu bir kez yapıldığı, elde edilen bulguların hasta ve yakın akrabaları açısından önemli olduğu unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bakkağolu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2003;18:853-9.
2. Akar N, Mısıroğlu M, Yalçinkaya F, Akar E, Çakar N, Tümer N, Akcakus M, Tastan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mut.* 2000; 15:118-9.
3. Yalçinkaya F, Tekin M, Çakar N, Akar E, Akar N, Tümer N. Familial Mediterranean fever and systemic amyloidosis in untreated Turkish patients. *Q J Med.* 2000;93:681
4. Olgun A, Akman S, Kurt I, Tuzun A, Kutluay T. MEFV mutations in familial Mediterranean fever: association of M694V homozygosity with arthritis. *Rheumatol Int.* 2005;25:255-9.
5. Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, Atamian V, Mavrogianni D, Tzioufas AG, Kollainis I, Ritis K, Moutsopoulos HM. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis* 2003;62:479-481.
6. Güran Ş, Gök F, Erdem H, Erdil A, Yakıncı C, Dursun A, Orkunoglu FE, İmirzaloğlu N. Ailesel Akdeniz Ateşi-“Familial Mediterranean Fever-FMF” düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *Moleküler Tanı Dergisi.* 2003;1:42-4.
7. Timmann C, Muntau B, Kuhne K, Gelhaus A, horstmann RD. Two novel mutations R653H and E230K in the Mediterranean fever gene associated with disease. *Mutat Res* 2001;8:235-9.
8. Ritis K, Giaglis S, Spathari N, Micheli A, Zonios D, Tzoanopoulos D, Deltas CC, Rafail S, Mean R, Papadopoulos V, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Kartalis G. Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients. *Ann Rheum Dis* 2004;63:438-43.
9. Oberkanins C, Weinhausel A, Kriegshauser G, Moritz A, Kury F, Haas OA. Genetic testing for familial Mediterranean fever in Austria by means of reverse-hybridization test strips. *Clin Chem.* 2003;49:1948-50.
10. Tchermitchko D, Legendre M, Delahaye A, Cazeneuve C, Niel F, Goossens M, Amselem S, Girodon E. Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve MEFV gene mutations. *Clin Chem.* 2003;49:1942-5.
11. Savacı SS. Elazığ ili ve çevresinde ailevi Akdeniz ateşli (FMF) olgularda MEFV mutasyonlarının incelenmesi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 2003.
12. Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, Halpern GJ, Rotter JI, Fischel-Ghodian N, Danon YL, Shohat M. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics.* 2000; 105: p. e70.
13. Yalçinkaya F, Akar N, Mısıroğlu M. Familial Mediterranean fever-amyloidosis and the Val726Ala mutation. *N Engl J Med.* 1998;338:993-4.
14. Pars M. Familial Mediterranean fever. From the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 1998;27:92-7.
15. Yalçinkaya F, Topaloğlu R, Yılmaz E, Emre S, Erken E, on behalf of the Turkish FMF Study Group. Distribution of MEFV mutations and phenotype genotype analysis in Turkish patients with FMF: a nationwide study (abstract). *Clin Exp Rheumatol* 2002;20 [Suppl 26]:s90.
16. Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Megarbane A. Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment *Sante.* 2004;14:261-6.
17. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentjevich I, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and co localizes with actin filaments. *Blood* 2001;98:851-9.
18. Ozen S, Besbas N, Bakkağolu A, Yılmaz E. Pyrin Q148 mutation and familial Mediterranean fever. *QJM* 2002;95:332-3.
19. Tchermitchko D, Legendre M, Cazeneuve C, Delahaye A, Niel N, Amselem S. The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of familial Mediterranean fever. *Hum Mutat* 2003;22:339-40.

Yazışma Adresi:

Doç Dr. Elif Yeşilada
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Malatya
Tel. : 422 341 06 60
Fax. : 422 341 00 36
E-Posta : eyesilada@inonu.edu.tr