

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TEK TARAFLI MUTASYON TAŞIYAN TÜRK FMF HASTALARINDA  
*MEFV* GEN MUTASYONLARININ TARANMASI**

Ayşenur ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Nejat AKAR

2009-ANKARA

## KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Ayşenur ÖZTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 21.01.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Nejat AKAR

imza : .....

Üye : Prof.Dr. Nurşen DÜZGÜN

imza : .....

Üye : Prof.Dr. Mesiha EKİM

imza : .....

Üye : Prof.Dr. Fatoş YALÇINKAYA

imza : .....

Üye: Prof.Dr. Şehsuvar ERTÜRK

imza : .....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA  
Enstitü Müdürü

# TEK TARAFLI MUTASYON TAŞIYAN TÜRK FMF HASTALARINDA *MEFV* GEN MUTASYONLARININ TARANMASI

## ÖZET

Bu çalışmada, klinik olarak Tel-Hashomer kriterlerine göre FMF tanısı almış ancak tek kromozomunda mutasyon taşıyan, pediatrik yaş grubunda bulunan 80 hastanın diğer ekzonlarında mutasyon taşıyabileceği göz önünde bulundurularak, ilgili bölgelerin taranması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile Türklere özgü mutasyonlar belirlendiği takdirde, direkt olarak bu mutasyonların taramaları yapılarak daha kısa sürede ve doğru tanı konulabilecektir.

Olguların, ekzon 2, 3, 5, 9-10 ve 3'UTR bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifiye edildikten sonra 2. ekzonda yer alan R202Q, PvuII restriksiyon endonükleaz enzimi kesim yöntemiyle, diğer ekzonlar ise PCR ürünlerinin saflaştırılmasını takiben DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiştir.

Çalışmada, R202Q, P369S R653H ve R761H mutasyonlarıyla birlikte R314R, R408Q, E474E, Q476Q, D510D, R501R, P588P polimorfizmleri belirlenmiştir. Bunların dışında intron 8'de c.1760-30 T>A ve intron 9'da c.1792+39 G>A değişimleri de gösterilmiştir. Ancak 3'UTR'in taranan bölgesinde gen değişimi bulunamamıştır.

Çalışmada belirlediğimiz R202Q'nun M694V mutasyonu ile birlikte kalıtım göstermeyen, birden fazla haplotipinin olduğu görülmüştür. Bu da R202Q'nun en azından bazı FMF hastalarında hastalıkla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Amiloidli 2 olguda R202Q'nun homozigot olarak saptanmış olmamız da bu hipotezi desteklemektedir. Kontrol grubumuzda R202Q'nun sıklığı yüksektir. Bu da heterozigotluk durumunda etkisinin olmadığını göstermekte buna rağmen, hastalıkla ilişkili bir mutasyonla beraberliği durumunda hastalıkla ilgili klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Bu da tanı için R202Q gen değişiminin önemli olduğunu vurgulamaktadır.

R202Q allellerin %31.3'ünde, P369S %1.3'ünde, R653H ve R761H mutasyonları ise sırayla allellerin %1 ve %3'ünde bulunmuştur. Allellerin %46.3'ünde ise mutasyon saptanamamıştır.

Çalışma grubumuzda, E148Q/P369S ve E148Q/P369S/R408Q birlikteliği birer hastada saptanmış ve literatürle uyumlu olarak, iki gen değişiminin birleşik heterozigotluğunda hastalığın ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yine aynı şekilde, bir hastada R653H, V726A mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak saptanmış, hastanın diğer ekzon araştırmalarında mutasyon tespit edilememiş olması V726A ile birlikte hastalığın ortaya çıkmasına neden olduklarını göstermektedir. R761H mutasyonu bu güne kadar heterozigot veya birleşik heterozigot olarak gösterilmesine karşın homozigot mutanlığı literatürde bildirilmemiştir. Bizim hasta grubumuzda 2 hastada saptanmış olup hastaların birinde E148Q/R761H/R761H, diğerinde ise M694V/R761H şeklinde bulunmuştur.

Kontrol grubu olarak alınan 122 olguda M694V mutasyonu 8 bireyde, M680I ise 2 bireyde saptanmıştır.

Sonuçlarımız, Türk toplumunda R202Q gen değişiminin rutin FMF analizlerine dahil edilmesi gerektiğini ayrıca P369S, R653H ve R761H mutasyonlarının görülme sıklığının nadir olduğunu göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), *MEFV* Geni, Amiloidoz

## SCREENING OF *MEFV* GENE MUTATIONS IN TURKISH FMF PEDIATRIC PATIENTS WITH AT LEAST ONE DETERMINED MUTATION

### ABSTRACT

In this study, we aimed to screen related gene regions in 80 FMF pediatric patients according to Te-Hashomer criteria who could carry mutations in other exons. With this study, if specific mutations of Turkish population were detected, the exact molecular diagnosis would have taken shorter time.

After amplification of exon 2, 3, 5, 9-10 and 3'UTR regions with polymerase chain reaction (PCR), we analysed R202Q at exon 2 with PvuII restriction endonuclease enzyme digestion method, DNA sequencing method was performed to other exons following PCR products were purified in all cases.

We detected R314R, R408Q, E474E, Q476Q, D510D, R501R and P588P polymorphisms with R202Q, P369S R653H and R761H mutations. Also, it was shown that c.1760-30 T>A in intron 8 and c.1792+39 G>A in intron 9. But no changes were found in 3' UTR.

R202Q exists at exon 2 was observed that there is one more haplotype which is not in linkage with M694V mutation. This indicates that it might be a disease-causing mutation. This may also confirm our hypothesis in two cases with amyloidosis. The R202Q frequency is high in our control group. It seems that it has no effect when it is in heterozygous state, however, when combined with another disease-causing mutation, the clinical spectrum appears. This emphasizes that R202Q alteration is important for diagnosis.

R202Q, P369S, R653H and R761H mutations were found in 31.3%, %1.3, %1 and %3 of the alleles, respectively. No mutation was detected in %46.3 of the alleles.

In our study group, compound heterozygosities of E148Q/P369S and E148Q/P369S/R408Q were detected in one patient and was shown that clinical spectrum appears when two gene alteration was in compound heterozygous in concordant with literature. Similarly, the same effect was observed for R653H which was in compound heterozygote with V726A mutation in one patient. Although R761H mutation was shown in heterozygous or in compound heterozygous states, homozygosity of this mutation was not reported in the literature, to date. In our patient group, R761H was determined in one patient as E148Q/R761H/R761H and in the other one as M694V/R761H.

When we screened 122 individuals without any symptoms of FMF, it was found that 8 controls had M694V mutation and 2 controls had M680I mutation in heterozygous state.

Our results show that R202Q gene alteration requires to be included in routine FMF analysis and also P369S, R653H and R761H mutations frequency is rare in Turkish population.

**Key Words:** Familial Mediterranean Fever (FMF), *MEFV* Gene, Amyloidosis

## ÖNSÖZ

Tezin oluşturulması sırasında beni başından sonuna kadar yönlendiren, her konuda yardım ve bilgilerini esirgemedi bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten değerli hocam Prof. Dr. Nejat Akar'a, engin tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım, her zaman manevi desteğini gördüğüm değerli ablam Uzm. Bio. Ece Akar'a, tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Tek. Kadir Sipahi, Tek. Çiğdem Aslan, Bio. Özge Cumaogulları ve Bio. Zehra Veli başta olmak üzere, tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Erkan YILMAZ'a ve ismini sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

Ayşenur ÖZTÜRK

Ankara, Ocak 2009

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

|                         |      |
|-------------------------|------|
| ÖZET .....              | i    |
| ABSTRACT .....          | ii   |
| ÖNSÖZ .....             | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....       | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | vi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ ..... | vii  |
| DİZİLER DİZİNİ .....    | viii |
| SİMGELER DİZİNİ .....   | ix   |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                            | <b>1</b>  |
| 1.1. GENEL BİLGİLER .....                                | 3         |
| 1.1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA, FMF) .....             | 3         |
| 1.1.2. Tarihçe .....                                     | 3         |
| 1.1.3. Epidemiyoloji .....                               | 4         |
| 1.1.4. Patogenez .....                                   | 5         |
| 1.1.5. Klinik Bulgular .....                             | 7         |
| 1.1.5.1. Amiloidoz .....                                 | 10        |
| 1.1.6. Kolşisin .....                                    | 12        |
| 1.1.7. Genetik .....                                     | 13        |
| 1.1.7.1. Genotip-Fenotip İlişkisi .....                  | 20        |
| 1.1.8. Pýrin / Marenostrin .....                         | 20        |
| 1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER .....                           | 22        |
| 1.2.1. DNA Ekstraksiyonu .....                           | 22        |
| 1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....           | 22        |
| 1.2.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim ..... | 24        |
| 1.2.4. DNA Dizi Analizi .....                            | 25        |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....</b>                    | <b>27</b> |
| 2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması .....                | 27        |
| 2.2. Yöntemler .....                                     | 29        |
| 2.2.1. DNA Ekstraksiyonu .....                           | 29        |
| 2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....           | 30        |

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.1. <i>MEFV</i> Geni Ekzon 2 PCR.....                                                     | 30        |
| 2.2.2.2. <i>MEFV</i> Geni Ekzon 3 PCR.....                                                     | 31        |
| 2.2.2.3. <i>MEFV</i> Geni Ekzon 5 PCR.....                                                     | 32        |
| 2.2.2.4. <i>MEFV</i> Geni Ekzon 9-10 PCR.....                                                  | 33        |
| 2.2.2.5. <i>MEFV</i> Geni 3'UTR PCR.....                                                       | 34        |
| 2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....                                                           | 35        |
| 2.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Muamelesi .....                   | 38        |
| 2.2.4.1. <i>MEFV</i> 2. Ekzon R202Q (c. 605 G>A) Gen Değişiminin PvuII ile<br>İncelenmesi..... | 38        |
| 2.2.5. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi .....                                                      | 39        |
| 2.2.6. DNA Dizi Analizi.....                                                                   | 41        |
| <b>3. BULGULAR .....</b>                                                                       | <b>42</b> |
| 3.1. <i>MEFV</i> 2. Ekzon R202Q (c. 605G>A p.Arg202Gln) Gen Değişimi.....                      | 43        |
| 3.2. <i>MEFV</i> 3. Ekzon .....                                                                | 47        |
| 3.3. <i>MEFV</i> 5. Ekzon .....                                                                | 50        |
| 3.4. <i>MEFV</i> 9. Ekzon .....                                                                | 54        |
| 3.5. <i>MEFV</i> 10. Ekzon .....                                                               | 57        |
| 3.4. <i>MEFV</i> 3'UTR .....                                                                   | 59        |
| <b>4. TARTIŞMA.....</b>                                                                        | <b>66</b> |
| <b>5. SONUÇLAR.....</b>                                                                        | <b>72</b> |
| KAYNAKLAR.....                                                                                 | 73        |
| EKLER .....                                                                                    | 83        |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                  | 87        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

|             |                                                                                      |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1.  | 16. kromozomda FMF geninin ( <i>MEFV</i> ) lokalizasyonu.....                        | 13 |
| Şekil 1.2.  | <i>MEFV</i> Geninde tanımlanmış mutasyonlar. ....                                    | 19 |
| Şekil 1.3.  | Pyrin proteinin yapısı ve mutasyon bölgeleri.....                                    | 21 |
| Şekil 2.1.  | 2. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....                                 | 36 |
| Şekil 2.2.  | 3. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....                                 | 36 |
| Şekil 2.3.  | 5. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....                                 | 37 |
| Şekil 2.4.  | Ekzon 9-10 PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....                               | 37 |
| Şekil 2.5.  | 3'UTR PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. ....                                   | 37 |
| Şekil 2.6.  | <i>MEFV</i> 2. ekzon R202Q (c. 605 G>A) gen değişiminin PvuII ile kesimi .....       | 38 |
| Şekil 2.7.  | 3. ekzonun pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. ....                     | 39 |
| Şekil 2.8.  | 5. ekzonun pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. ....                     | 40 |
| Şekil 2.9.  | Ekzon 9-10 pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.. ....                    | 40 |
| Şekil 2.10. | 3'UTR pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.....                           | 40 |
| Şekil 3.1.  | 369. kodonun homozigot normal ve heterozigot şekli .....                             | 47 |
| Şekil 3.2.  | 408. kodonun homozigot normal ve heterozigot şekli .....                             | 47 |
| Şekil 3.3.  | 314. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 48 |
| Şekil 3.4.  | 474. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 50 |
| Şekil 3.5.  | 476. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 51 |
| Şekil 3.6.  | 510. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 52 |
| Şekil 3.7.  | 501. kodonun homozigot normal ve heterozigot şekli .....                             | 53 |
| Şekil 3.8.  | 588. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 54 |
| Şekil 3.9.  | İntron 8 c.1760-30 T>A homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli ..... | 55 |
| Şekil 3.10. | İntron 9 c.1792+39G>A homozigot normal ve heterozigot şekli.....                     | 56 |
| Şekil 3.11. | 653. kodonun homozigot normal ve heterozigot şekli .....                             | 57 |
| Şekil 3.12. | 761. kodonun homozigot normal, heterozigot ve homozigot mutant şekli .....           | 58 |
| Şekil 3.13. | 3'UTR normal dizisi.....                                                             | 59 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No:

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Tel Hashomer kriterleri .....                                                                                                                            | 8  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> <i>MEFV</i> geninde nükleotid-aminoasit değişimleriyle beraber Türklerde tanımlanmış olanlar.....                                                        | 16 |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Tez çalışmasına dahil edilen 80 FMF hastasının 10. ekzon ve 2. ekzondaki E148Q mutasyon dağılımları .....                                                | 27 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> 80 FMF hastasının mutasyon dağılımı. ....                                                                                                                | 42 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> 2. ekzon R202Q (c.605G>A p.Arg202Gln) gen değişiminin FMF hastalarındaki genotip dağılımı.. ....                                                         | 43 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> 2. ekzon R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin M694V/M694V, M694V/- ve kontrol grubundaki genotip dağılımı.....                                              | 44 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> 2. ekzon R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin FMF/Amiloid hastalarındaki genotip dağılımı. ....                                                             | 45 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> 2. ekzon R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin FMF ve FMF/Amiloid hastaları ile sağlıklı kontroller arasında genotip dağılımının karşılaştırılması. ....     | 46 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> 3. ekzon R314R (c.942 C>T p.Arg314Arg) gen değişiminin FMF hastalarındaki genotip dağılımı .....                                                         | 49 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> 3. ekzonda yer alan P369S mutasyonunun 2 FMF hastasındaki sıralanımı.. ....                                                                              | 49 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> 5. ekzonda yer alan E474E (1422GA), Q476Q (1428AG) ve D510D (1530TC) polimorfizmlerinin FMF hastalarındaki dağılımı.....                                 | 53 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> 9. ekzonda yer alan P588P (c.1764G>A p.Pro588Pro) polimorfizmi ile intron 8'de yer alan c.1760-30 T>A gen değişiminin FMF hastalarındaki dağılımı.. .... | 56 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> 10. ekzonda yer alan R653H ve R761H mutasyonlarının FMF hastalarındaki dağılımı. ....                                                                   | 58 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> Tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının 2. ekzondaki R202Q, ekzon 3, 5, 9 ve 10'da saptanan gen değişimlerinin allellere göre dağılımı..... | 60 |
| <b>Çizelge 3.12.</b> Tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının mutasyon dağılımları .....                                                                          | 61 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> 80 hastanın 2. ekzondaki R202Q, 3. ekzon, 5. ekzon, 9.ekzon, 10. ekzon ve 3'UTR sonuçları.....                                                          | 62 |

## DİZİLER DİZİNİ

### Sayfa No:

|                  |                                                                          |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Dizi 1.1.</b> | <i>MEFV</i> geninin cDNA dizisi.....                                     | 14 |
| <b>Dizi 2.1.</b> | <i>MEFV</i> geni 2. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 658 bp'lik bölümü.....  | 31 |
| <b>Dizi 2.2.</b> | <i>MEFV</i> geni 3. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 480 bp'lik bölümü.....  | 32 |
| <b>Dizi 2.3.</b> | <i>MEFV</i> geni 5. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 526 bp'lik bölümü ..... | 33 |
| <b>Dizi 2.4.</b> | <i>MEFV</i> geni ekzon 9-10 PCR ile çoğaltılan 500 bp'lik bölümü.....    | 34 |
| <b>Dizi 2.5.</b> | <i>MEFV</i> geni 3'UTR PCR ile çoğaltılan 688 bp'lik bölümü... ..        | 35 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                                                 |                                                       |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| A                                               | : Adenin bazı                                         |
| A                                               | : Alanin                                              |
| AA                                              | : Amiloid A                                           |
| a.a                                             | : Amino asit                                          |
| AAA                                             | : Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF)                          |
| ABD                                             | : Amerika Birleşik Devletleri                         |
| Arg                                             | : Arjinin aminoasiti                                  |
| ASC                                             | : Apoptosis-associated speck like protein with a CARD |
| BBF                                             | : Bromfenol mavisi                                    |
| Bç                                              | : Baz çifti                                           |
| C                                               | : Sitozin bazı                                        |
| °C                                              | : Santigrat derece                                    |
| C5a                                             | : Kompleman 5a                                        |
| CARD                                            | : Caspase Recruitment Domain                          |
| cDNA                                            | : Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit                  |
| C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na | : Sodyum asetat                                       |
| CI                                              | : Güven aralığı                                       |
| D                                               | : Aspartik asit                                       |
| ddH <sub>2</sub> O                              | : Deiyonize su                                        |
| dk                                              | : Dakika                                              |
| DNA                                             | : Deoksiribonükleik asit                              |
| dNTP                                            | : Deoksinükleotid trifosfat                           |
| ddNTP                                           | : Dideoksinükleotid trifosfat                         |
| E                                               | : Glutamik asit                                       |

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| EDTA              | : Etilendiamintetraasetikası   |
| FMF               | : Familial Mediterranean Fever |
| g                 | : Gram                         |
| G                 | : Guanin bazı                  |
| Gln               | : Glutamin aminoasiti          |
| H                 | : Histidin                     |
| HCl               | : Hidroklorik asit             |
| HSP               | : Henoch Schönlein Purpurası   |
| I                 | : İzolösin                     |
| IL-1              | : İnterlökin-1                 |
| IL-1 $\beta$      | : İnterlökin-1 Beta            |
| IL-4              | : İnterlökin-4                 |
| IL-8              | : İnterlökin-8                 |
| K                 | : Lizin                        |
| K <sup>+</sup>    | : Potasyum iyonu               |
| kb                | : Kilobaz                      |
| KCl               | : Potasyum klorür              |
| kDa               | : Kilo Dalton                  |
| KHCO <sub>3</sub> | : Potasyum bikarbonat          |
| l                 | : Litre                        |
| M                 | : Metiyonin                    |
| M                 | : Molar                        |
| $\mu$ g           | : Mikrogram                    |
| $\mu$ l           | : Mikrolitre                   |
| MEFV              | : Ailevi Akdeniz Ateşi geni    |
| mg                | : Miligram                     |

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Mg <sup>+2</sup>   | : Magnezyum iyonu             |
| MgCl <sub>2</sub>  | : Magnezyum klorür            |
| ml                 | : Mililitre                   |
| mM                 | : Milimolar                   |
| NaCl               | : Sodyum klorür               |
| NH <sub>4</sub> Cl | : Amonyum klorür              |
| OR                 | : Odds değerleri              |
| OH                 | : Hidroksil                   |
| p                  | : Kromozomun kısa kolu        |
| P                  | : Prolin                      |
| P <sup>32</sup>    | : Fosfor 32                   |
| PAN                | : Poliarteritis Nodoza        |
| PCR                | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| pH                 | : Asitlik-Bazlık Derecesi     |
| pmol               | : Pikomol                     |
| PXE                | : Pseudoxantoma elasticum     |
| PyD                | : Pyrin domaini               |
| R                  | : Arjinin                     |
| RBC                | : Kırmızı Kan Hücresi         |
| RE                 | : Restriksiyon endonükleaz    |
| Q                  | : Glutamin                    |
| rpm                | : Dakikadaki dönüş sayısı     |
| S                  | : Serin                       |
| s                  | : Saniye                      |
| SAA                | : Serum Amiloid A             |
| SDS                | : Sodyum Dodesil Sülfat       |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| T             | : Timin bazı                          |
| Taq           | : <i>Thermus aquaticus</i>            |
| TBE           | : Tris-Borik asit-EDTA                |
| TE            | : Tris-EDTA                           |
| TNF- $\alpha$ | : Tümör nekroz faktörü alfa           |
| UTR           | : <b>Un</b> Translated <b>R</b> egion |
| V             | : Valin                               |
| V             | : Volt                                |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) (Familial Mediterranean fever, FMF, MIM249100), ateş ve seröz zarların (periton, sinovyum veya plevra) inflamasyonu ile karakterize, otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır (Sohar vd 1967). İlk olarak 1945’de Siegal tarafından klinik bir antite olarak tanımlanan hastalık, kalıtsal periyodik hastalıklar arasında en sık rastlanandır. Hastalığın en önemli komplikasyonu amiloidozdur. Türk FMF hastalarında amiloid gelişiminin diğer etnik gruplara göre daha yüksek oranda olduğu belirtilmiştir (Özdemir vd 1969, Özer vd 1971). Kolşisinin, FMF ataklarının sıklığı ve şiddetini azalttığı gibi (Dinarello vd 1974, Zemer vd 1974), amiloid gelişimini de önlediği gösterilmiştir (Zemer vd 1986).

FMF, Akdeniz kökenli toplumlarda, Askenazi olmayan Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplarda daha sık görülmekle beraber (Sohar vd 1967), diğer toplumlarda da gösterilmiştir (Eliakim vd 1981). Prevalansı, Askenazi olmayan Yahudilerde 1/256-1/500 (Daniels vd 1995), Türklerde 1/1073 olarak bildirilmiştir (Özen vd 1998). Taşıyıcı sıklığı Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/5, Askenazi Yahudilerinde 1/11 (Daniels vd 1995), Ermenilerde 1/7 (Rogers vd 1989) ve Türklerde ise 1/5 (Yılmaz vd 2001) olarak hesaplanmıştır.

FMF’den sorumlu gen (*MEFV*, MIM608107), kromozom 16p13.3’de haritalandıktan sonra (Pras vd 1992), Uluslararası FMF Konsorsiyumu ve Fransız FMF Konsorsiyumu tarafından birbirlerinden bağımsız olarak klonlanmış ve 15 kb uzunluğunda, 3505 nükleotidden oluşan, 10 ekzon içeren bir gen olduğu bildirilmiş, bununla birlikte, genin ürünü, 781a.a.’lik pyrin/marenostrin olarak adlandırılan protein tanımlanmıştır (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997). Pyrinin nötrofillerde eksprese olduğu ve inflamasyonda görev aldığı gösterilmiştir (Kastner 1998).

Genin klonlanmasının ardından öncelikli olarak M694V, M680I ve V726A mutasyonları tanımlanmış (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997) ve Türk FMF hastalarıyla yapılan bir çalışmada dağılımlar, M694V için mutasyonu %43.5, M680I mutasyonu için %12, V726A mutasyonu içinse %11.1 olarak bulunmuştur (Akar vd 2000).

Bu mutasyonları takiben 1998’de 2. ekzonda (E148Q, E167D ve T267I) (Bernot vd 1998, Samuels vd 1998), 5. ekzonda (F479L) (Bernot vd 1998) ve 10. ekzonda (M694I, K695R, A744S, R761H, T681I, I692del ve M694del) (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997, Bernot vd 1998, Booth vd 1998, Samuels vd 1998) yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. Günümüze kadar 180 gen değişimi FMF veri tabanında sunulmaktadır (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>).

Bu çalışmada, klinik olarak Tel-Hashomer kriterlerine (Livneh vd 1997) göre FMF tanısı almış ancak tek kromozomunda mutasyon taşıyan, pediatrik yaş grubunda bulunan 80 hasta tez çalışmasına dahil edilmiştir. Bu hastaların diğer ekzonlarında mutasyon taşıyabileceği göz önünde bulundurularak, mutasyon taşıdıkları ekzon haricindeki ekzonların incelenmesi çalışmamızın amacını oluşturmaktadır. Bu çalışma ile Türklere özgü mutasyonlar belirlendiği takdirde, direkt olarak bu mutasyonların taramaları yapılarak daha kısa sürede ve doğru tanı konulabilecektir.

## 1. 1. GENEL BİLGİLER

### 1. 1. 1. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA, FMF)

Ailevi Akdeniz ateşi, daha çok Akdeniz kökenli toplumları etkileyen, otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. FMF, Türkler, Ermeniler, Araplar ve Sefardik Yahudilerde yaygın olarak görülse de, Askenazi Yahudileri, İtalyanlar, Polonyalılar, Almanlar ve diğer etnik gruplarda da bildirilmiştir (Sohar vd 1967, Eliakim vd 1981, Domingo vd 2000). Hastalık, tekrarlayan ateş ataklarıyla birlikte peritonit, plörezi, artrit veya erizipel benzeri eritem ile karakterizedir. Amiloidoz ise, hastalığın en önemli komplikasyonu olup, böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir (Livneh vd 1997).

FMF semptomları, hayatın ilk on yılında ortaya çıkmakla birlikte, hastaların %80'inden fazlasında çocukluk veya ergenlik döneminde, %5'inde ise 30 yaşından sonra görülmektedir (Kastner 1998, Samuels vd 1998).

Ateş ve serözit atakları 1-4 gün sürer ve kendiliğinden kaybolur. Ataklar arasında hastalar genellikle semptomsuzdur. Tekrarlayan ataklar, menstrüasyon, stres, ağır fiziksel aktiviteler ve infeksiyonlara bağlı olarak sıklaşabilir. Atakların sıklığı ve şiddeti hastalar arasında, hatta hayatlarının farklı periyotlarında dahi değişiklik gösterebilmektedir. Hastalığın şiddeti genellikle yaş ile azalmaktadır (Majeed vd 1989, Pras 1998).

### 1. 1. 2. TARİHÇE

Dünya literatüründe, FMF semptomları gösteren olgularla ilgili bildiriler, ilk olarak 20. yüzyılın başlarında görülmüştür. 1908'de iki New York'lu hekim Janeway ve Mosenthal tarafından, 16 yaşında Yahudi bir genç kız hastada, yaklaşık ayda bir kez yineleyen karın ve göğüs ağrısı ile birlikte 40°C'ye varan ateş eşliğinde lökositoz rapor edilmiştir (Janeway vd 1908). İlk olgudan sonra 1945 yılında Amerikalı araştırmacı Siegal, 10 vakada **“Benign Paroksizmal Peritonitis”** adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları şeklinde görülen hastalığı klinik bir antite olarak tanımlamıştır (Siegal 1945). 1948 yılında Reimann **“Periyodik hastalık”** tanımlamasını kullanmıştır (Reimann 1948). 1952 yılında ilk kez Catton ve Mamou hastalığın ailevi olduğuna dikkat çekmiş ve FMF'li hastalarda amiloid

gelişebileceğini bildirmişlerdir (Mamou vd 1952). Heller ve Sohar, 1958 yılında ilk kez **“Ailevi Akdeniz Ateşi”** tanımını kullanmış (Heller vd 1958) ve 1961 yılında hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir (Sohar vd 1961). “Ailevi Akdeniz Ateşi” kelimeleri hastalığın 3 özelliğini; otozomal resesif kalıtım modeline sahip olduğunu, Akdeniz’den köken aldığını ve tekrarlayan ateş öyküsünün olduğunu göstermektedir. Sonrasında literatürde, hastalık **“Periyodik Peritonit”** (Schwartz 1960), **“Tekrarlayan Poliserözit”** (Ehrenfeld vd 1961) ve **“Tekrarlayan Kalıtsal Poliserözit”** (Barakat vd 1986) şeklinde de tanımlanmıştır.

Türkiye’de ise ilk olarak 1946 yılında Abrevaya Marmaralı, Siegal’ın 1945’deki yayınına atıf yaparak **“Garip Bir Karın Sendromu”** başlığı ile, izlediği FMF hastasını Tıp Cemiyeti Mecmuası’nda yayınlamıştır (Marmaralı 1946).

İlk defa 1972 yılında Goldfinger tarafından kolşisinin FMF üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Goldfinger 1972).

FMF’den sorumlu *MEFV* geni 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolunda haritalandıktan sonra (Pras vd 1992), 1997 yılında birbirlerinden bağımsız olarak Uluslararası FMF Konsorsiyumu ve Fransız FMF Konsorsiyumu tarafından klonlanmış ve kodladığı protein “pyrin/marenostrin” olarak adlandırılmıştır.

### 1. 1. 3. EPİDEMİYOLOJİ

Ailevi Akdeniz ateşi (FMF), otozomal resesif kalıtım gösteren, dünya çapında 100,000’den fazla insanı etkileyen, kalıtsal periyodik ateş hastalıkları arasında en yaygın olanıdır (Drenth vd 2001). Ailevi Akdeniz ateşi daha çok doğu Akdeniz kökenli toplumlarda, özellikle Askenazi olmayan Yahudiler, Ermeniler, Türkler ve Araplar arasında yaygındır (Sohar vd 1967). Hastalık diğer toplumlarda nadir görülmekle birlikte Yunanlılar, İtalyanlar, Almanlar, Polonyalılar, Avustralyalılar, Kübalılar, Belçikalılar, Brezilyalılar (Eliakim vd 1981) ve Mısırlılarda da (Öztürk vd 2009) tanımlanmıştır.

Askenazi olmayan Yahudilerde FMF prevalansının 1/250 ile 1/500 arasında olduğu, Kuzey Afrika Yahudilerinde ise 1/256'dan fazla olabileceği bildirilmiştir (Daniels vd 1995). Lübnan'da yaşayan Ermenilerde prevalans 1/500 olarak hesaplanmıştır (Schwabe vd 1974, Rogers vd 1989). Türklerde FMF prevalansı, Özdemir ve Sökmen (1969)'in yaptıkları bir çalışmada %0.3 olarak bulunmuştur. 1998 yılında Özen ve arkadaşlarının yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada ise, daha önceden FMF tanısı alan hasta prevalansı 1/4347, muhtemel FMF tanısı olan hastalarla beraber bu prevalans 1/1073 olarak saptanmıştır (Özen vd 1998). Bununla birlikte Orta Anadolu'daki hastalık prevalansı 1/395 olarak bildirilmiştir (Önen vd 2004).

Taşıyıcı sıklığı Türklerde (Yılmaz vd 2001) ve Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/5 iken (Daniels vd 1995), Ermenilerde 1/7 (Rogers vd 1989) olarak bildirilmiştir. Askenazi Yahudilerinde taşıyıcı sıklığı 1/11'e düşmektedir (Daniels vd 1995).

Bazı çalışmalarda hastalığın erkek ve kadınlardaki oranı 1.5-2.0:1.0 olarak (Schwartz 1960), erkeklerde daha çok görüldüğü şeklinde bildirilse de (Sohar vd 1967), hastalıktan iki cinsiyetin de benzer oranlarda etkilendiği gösterilmiştir (Tunca vd 2005).

#### **1. 1. 4. PATOGENEZ**

FMF atakları süresince inflamasyon bölgesinde nötrofillerin birikimi söz konusudur. FMF hastaları ile sağlıklı bireylerin nötrofilleri arasında bazı fonksiyonel farklılıklar bulunmuştur. *In vitro* çalışmalar, FMF nötrofillerinin ışık ve elektron mikroskopunda normal fagositoz, kemotaksi, mikrotübüler fonksiyon ve morfolojide olduğunu göstermiştir (Territo vd 1976). Asemptomatik FMF hasta nötrofillerinin, sıcak ve hipotonik koşullara cevap olarak daha fazla lizozim salınımını gerçekleştirdikleri ve artmış kemiluminessansa sahip oldukları saptanmıştır (Anton vd 1988).

Hastalar, serum immunoglobulinlerinde poliklonal bir artışa sahip olabilirler (Eliakim vd 1981), buna ek olarak, yapılan *in vitro* çalışmalar, ataklar sırasında hastalarda interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) indüksiyonunun azaldığını göstermektedir (Rozenbaum vd 1992).

FMF'den sorumlu *MEFV* geni tarafından kodlanan pyrin/marenostrin proteininin 92 aminoasitlik N-terminali, apoptoz ve inflamasyonda yer alan birçok proteinle homoloji göstermekle birlikte, 195 aminoasitten oluşan, amino ucunda pyrin domaini (PyD), karboksi ucunda CARD (caspase recruitment domain) içeren (Centola vd 2000) ve apoptotik hücrelerde “zerre (speck)” şeklinde ifade edilen agregatların oluşumuna sebep olan (Gumucio vd 2002) ASC (apoptosis-associated speck like protein with a CARD) proteiniyle ilişkili olduğu saptanmıştır. ASC'nin, PyD domaini sayesinde, diğer PyD içeren proteinlerle, protein-protein etkileşimine katıldığı gösterilmiştir. CARD domaini ise ASC'nin, fonksiyonel aktivitesinde önemli olduğu bilinen, IL-1 $\beta$ 'nın işlenmesi ve salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1'in oluşturulması ve aktivasyonunda rol alan domainidir (Centola vd 2000). ASC, prokaspaz-1'e (IL-1 $\beta$  converting enzim) bağlanarak onun agregasyonunu ve otoaktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1 $\beta$ 'yı IL-1 $\beta$ 'ya çevirmekte ve salgılanan IL-1, kendi reseptörüne bağlanarak inflamasyonu başlatmaktadır. Pyrin proteininin fonksiyonel olduğu zaman, ASC'ye bağlanarak, ASC-prokaspaz-1 ilişkisini engellediği ve bu sayede IL-1 işlenmesini baskıladığı düşünülmektedir. Pyrin proteini ve ASC arasındaki bağlantının önemi *in vivo* çalışmalarla da gösterilmiştir. Fonksiyonel pyrin proteininin eksprese edilmediği, pyrin geni ortadan kaldırılmış farelerle yapılan çalışmalarda, LPS ve IL-4 ile pyrin ekspresyonu indüklenmiş ve bunun sonucunda farelerin peritoneal makrofajlarında artan IL-1 $\beta$  işlenmesi ve defektif apoptoz görülmüştür. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, pyrin proteininin, ASC ile indüklenen IL-1 $\beta$  işlenmesini engelleyerek ve makrofaj apoptozuna izin vererek antiinflamatuvar bir molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Chae vd 2003).

Mutant bir pyrin muhtemelen, IL-1 üretimi ve lökosit apoptozunun inhibisyonu ile kontrolsüz inflamasyona neden olmaktadır. Ancak bu hipotezi desteklemeyen bildiriler de bulunmaktadır. Gumicio vd (2002), normal ve mutant pyrinin ASC proteini ile interaksiyonu ve hücre ölümü üzerine etkileri arasında fark olmadığını bildirmiştir. Özen ve arkadaşları, FMF atakları sırasında nötrofillerde apoptozun arttığını göstermiştir (Özen vd 2001). Artmış nötrofil apoptozu, inflamasyonun durdurulmasına bir cevap olarak gerçekleşebilir ve atakların spontan olarak ortadan kaybolmasını açıklayabilir.

Diğer bir hipotez, serozal sıvılarda ve eklemlerde, subklinik yaralanmalarda salınan kemotaktik faktör kompleman 5a (C5a)'yı ortamdan uzaklaştıran enzimlerin yokluğu ile inflamasyonun tetiklenmesi şeklindedir. Genel olarak, FMF krizleri, inflamasyonun olduğu

bölgelere çok sayıda polimorfonükleer lökositlerin akışı ile karakterizedir. FMF hastalarında periton sıvısında, normalin dışında C5a ve interlökin-8 (IL-8) inhibitörleri düşük seviyede bulunur. C5a'ya karşı oluşturulan inflamatuvar cevabın baskılanmasındaki eksiklik, tipik inflamatuvar FMF krizlerini açıklayabilir (Ayesh vd 1995).

Bir diğer patogenetik hipotez ise, bazı hastalarda FMF ataklarıyla emosyonel stresin ilişkili olduğuna dairdir. Barakat ve arkadaşları tarafından, FMF benzeri semptomlara neden olan endojen katekolamin salınımını stimüle etmek için, semptomimetik ajan metaraminol hastalara verilerek, FMF'e sebebin katekolamin metabolizmasındaki defekten olabileceği bildirilmiştir (Barakat vd 1984).

### **1. 1. 5. KLİNİK BULGULAR**

Ailevi Akdeniz ateşi, tekrarlayan ateş ataklarıyla birlikte peritonit, plörezi ve artrit ile karakterizedir (Livneh vd 1997). Daha seyrek olarak perikardit, orşioepididimit, miyozit ve menenjit gibi ataklar da görülebilir (Bakkaloğlu 2003). Semptomlar, vakaların yaklaşık %50'sinde hayatın ilk on yılında ortaya çıkmakla birlikte, nadiren 30 yaşından sonra da görülmeye başlayabilir ve genelde vakaların %80-90'ında hastalığın tanısı 20 yaşından önce konulur (Kastner 1998, Samuels vd 1998).

FMF atakları birden ortaya çıkar, kısa süre devam eder (6-96 saat) ve yavaş yavaş kendiliğinden geçer. Ataklar düzenli periyotlarda olmamakla birlikte her birkaç hafta veya ayda tekrarlayabilir. Ataklar arasında hastalar genellikle asemptomatiktir. Saatlerden günlere kadar sürebilen atakların başlangıcını, stres ve subklinik infeksiyonlar oluşturabilir. Atakların sıklığı ve şiddeti yaş ile azalır (Pras 1998).

FMF, klinik olarak 2 fenotipe ayrılır. Fenotip I, kısa peritonit, sinovit, plörezi, ve nadiren perikardit ve menenjit epizotları ile ilişkilidir. Bazı hastalarda, tipik FMF atakları olmadan amiloidoz gelişimi gözlenir ki, bunlar da Fenotip II olarak tanımlanır (Yılmaz vd 2001, Balcı vd 2002).

Tanıda Tel-Hashomer kriterleri (Çizelge 1.1) kullanılmakta ve kesin tanı için iki majör veya bir majör, iki minör kriter; muhtemel tanı için de bir majör ve bir minör kriter seçicidir (Livneh vd 1997).

**Çizelge 1.1.** Tel Hashomer kriterleri

***Majör kriterler***

Poliserözit ile giden tekrarlayan ateş atakları  
Başka bir nedene bağlanamayan AA tipi amiloidoz  
Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt

***Minör kriterler***

Yineleyen ateşli ataklar  
Erizipel benzeri döküntü  
Birinci derecede akrabada FMF varlığı

FMF'in kardinal belirtileri ateş (%96), peritonit (%91), plörezi (%57), artrit/artralji (%45), erizipel benzeri eritem (%13) ve amiloidozdur (%2) (Samuels vd 1998). Hastalığın diğer belirti ve semptomları baş ağrısı, aseptik menenjit, perikardit, splenomegali, akut skrotal inflamasyon, febril miyalji, purpura ve proteinüridir.

**Ateş**, epizotlar sırasında genellikle 38.5-40°C olup, 1-3 günde kendiliğinden sonlanır. Tekrarlayan ateş, çocukluk çağında tek belirti olabilir. Kolşisin kullanan hastalarda, kısa süren ataklarda ateş görülmeyebilir (Ben-Chetrit vd 1998, Samuels vd 1998).

**Karın ağrısı**, genellikle ateşten önce görülür ve daha uzun sürer. Karın muayenesinde, karın kaslarının sertliği, rebound hassasiyet ve azalmış bağırsak sesleri şeklindedir. Bazı bireylerde kabızlık görülmekle birlikte, çocuklarda diyare daha yaygındır (Ben-Chetrit vd 1998, Samuels vd 1998).

**Plörezi** atakları, tek başına veya abdominal ve eklem ataklarıyla birlikte görülebilir. Yedi gün içerisinde sonlanan plörezi, vakaların %5'inde hastalığı belirleyici bir semptom olabilir (Tunca vd 2005).

**Perikardit**, FMF hastalarında çok nadir görülmekle birlikte akut ataklarla takip eden konstriktif perikardit vakalarda bildirilmiştir (Tunca vd 2005).

**Artiküler atak**, FMF'in genel özelliğidir. Sefardik hastaların yaklaşık %75'inde oluşur ve %16'sında semptomlar mevcuttur (Sohar vd 1967). Artrit insidansı Türkler (Tunca vd 2005), Araplar (Majeed vd 1997) ve Ermenilerde (Schwabe vd 1974), Yahudilerden daha düşüktür. Genellikle monoartrit olarak görülmektedir.

**Miyalji**, FMF'de yaygın olarak görülmektedir. Uzamış febril miyalji, dayanılmaz kas ağrısı ve hassasiyet şeklinde, genellikle bilateral ve alt ekstremitelerde görülür (Langevitz vd 1994).

**Erizipel benzeri deri lezyonları**, alt ekstremitelerde, özellikle ayak bileği veya ayak arkasında görülmekle birlikte FMF'in en önemli bulgularındandır. Lezyona çoğunlukla ateş, bazen de artrit eşlik eder (Sohar vd 1967).

**Splenomegali**, genellikle amiloidoz ile birlikte görülmemektedir. Nadiren akut orşit tanımlanmıştır (Livneh vd 1996).

**Glomerulonefrit**, FMF hastalarında nadiren görülebilir. Sürekli proteinürisi olan glomerulonefritli FMF hastaları, amiloidoz olarak yanlış teşhis edilebilir (Tunca vd 2005).

Bazı **vaskülitler**, genel popülasyona oranla FMF hastalarında daha sık rastlanır. FMF'li çocuklarda yaklaşık %2.6-5 oranında Henoch Schönlein purpurası (HSP) yaygın görülmektedir. Poliarteritis nodoza (PAN), FMF hastalarının %0.8-1'inde oluşur (Sohar vd 1967, Bakkaloğlu vd 2002). Kompleman aktivasyonunun defektif inhibisyonundan dolayı oluşan toksisite, PAN'ın yaygın görülmesine sebep olur. FMF'de PAN genç yaşlarda ortaya çıkma eğilimindedir ve perirenal hematoma ile birlikte görülür (Henckes vd 1994). Uzamış febril miyalji de, FMF'le ilişkili diğer bir vaskülitir (Langevitz vd 1994). Türk araştırmacı Dr. Hulusi Behçet tarafından tanımlanmış bir vaskülit olan Behçet hastalığının, FMF hastalarında normal popülasyondan daha sık bulunduğu, Schwartz ve arkadaşlarının İsraili FMF hastalarında yapmış oldukları bir çalışmada gösterilmiştir (Schwartz vd 2000). Buna ek olarak Touitou ve arkadaşları tarafından, Behçet hastalarında *MEFV* mutasyonlarının sık görüldüğü bildirilmiştir (Touitou vd 2000). Türk FMF Çalışma Grubu

tarafından yapılan bir çalışmada, FMF hastaları arasında Behçet hastalığının prevalansı, tüm popülasyondakinden farklı bulunmamıştır (Tunca vd 2005).

Afrika kökenli Yahudilerde diğer etnik gruplara oranla artrit, Ermenilerde ise plevral ataklar daha yaygın (%75) görülmektedir (Samuels vd 1998). Türk FMF Çalışma Grubu tarafından ise 2838 hastada klinik özellikler, ateş (%92.5), peritonit (%93.7), plörezi (%31.2), artrit (%47.4), amiloidoz (%12.9) ve non-amiloid glomerular hastalıklar (%0.8) olarak bildirilmiştir (Tunca vd 2002).

#### **1. 1. 5. 1. AMİLOİDOZ**

Hastalığın en önemli komplikasyonu, genellikle böbrekleri etkileyen ve kronik böbrek yetmezliğine neden olan amiloidozdur. En yaygın klinik belirtisi olan nefrotik sendrom gelişimi dışında amiloidoz ayrıca, böbrek üstü bezi, gastrointestinal sistem, karaciğer, dalak ve ileri evrelerde ise kalp, akciğer ve tiroid bezini etkileyebilmektedir (Özdemir vd 2001). Klinik belirtiler erken yaşlarda ortaya çıkar. Amiloidozdan meydana gelen ölümler 40 yaşın altındaki vakalarda %90, 10 yaşın altındaki vakalarda ise %6 oranındadır (Pras vd 1982).

Albüminüri, renal amiloidoz oluşumunun erken evrelerinde görülmektedir. Bu yüzden rutin idrar analizleri FMF hastaları için zorunludur. Teşhisin doğrulanması ise renal veya rektal biyopsiyi gerektirmektedir (Samuels vd 1998).

FMF hastaları arasında amiloidoz prevalansının, hastalığın alevlenme sıklığı, devam süresi ve şiddetinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Bu bakış açısı, ilk ateş ve inflamasyon atağından önce amiloid nefropatisi bulunan Fenotip II hastalarının gözlenmesi ile oluşmuştur (Sohar vd 1967).

Amiloidoz gelişimini etkileyen risk faktörü çalışmaları, etnik köken, kalıtım ve çevreyi kapsamaktadır.

- Amiloidoz sıklığı çeşitli etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. Askenazi olmayan Yahudilerde %80 ve Anadolu Türklerinde %60 olarak bildirilmiştir

(Sohar vd 1967, Özdemir vd 1969). Yapılan son çalışmalar ise, Türk FMF hastalarında amiloidoz gelişiminin %7-13 oranında olduğunu göstermektedir (Saatçi vd 1997). Amiloidoz, Iraklılar, Askenazi Yahudileri ve Araplarda daha az görülmektedir (Barakat vd 1986).

- Ailesinde amiloidoz öyküsü bulunan hastalar bulunmayanlarla karşılaştırıldığında ise, amiloidoz gelişimi açısından altı katlık bir riske sahip oldukları bulunmuştur (Saatçi vd 1997).
- Amiloid patofizyolojisi üzerinde çevresel bir etkinin olabileceği kanısı, kolşisin kullanımından önce, amiloidoz oluş sıklığının Ermenistan'da yaşayan Ermenilerde Amerika'da yaşayan Ermenilere oranla daha yüksek olduğu gözlemi ile desteklenmektedir (Rogers vd 1989).

FMF'in en ağır belirtisi, amiloid A proteinin çökmesinden ileri gelir. Bu proteinin karaciğer tarafından sentezlenen akut-faz reaktanı, serum amiloid A (SAA)'nın yıkım ürünü olabileceği düşünülmektedir. Febril ataklar sırasında serum amiloid A konsantrasyonu 1000 kat artabilir. Hastaların %30'unda ataklar arasında da konsantrasyonun yüksek kaldığı gözlenmiştir (Knecht vd 1985). SAA1 ve SAA2, sekonder amiloid plaklarının başlıca komponentleri olan amiloid A1 (AA1) ve amiloid A2 (AA2) proteinlerinin serum prekürsörleridir. İnsan SAA akut-faz izotipleri SAA1, SAA2 ve SAA3 olmak üzere 3 farklı lokus tarafından kodlanmaktadır. Plazmada SAA'nın yüksek seviyede uzun süre seyretmesi, dokularda AA proteinlerinin birikmesine yol açabilmesine rağmen, amiloidoz gelişimi için SAA'nın yüksek konsantrasyonları yeterli değildir (Benson vd 1979). Son çalışmalar, amiloidogenezin genetik zeminini ortaya çıkarmak için SAA polimorfizmleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Cazeneuve ve arkadaşları, Ermeni FMF hastalarında SAA1 $\alpha/\alpha$  genotipinin renal amiloidozu 7 kat artırdığını göstermiştir (Cazeneuve vd 2000). Benzer sonuçlar Türk FMF hastalarında da bulunmuştur (Bakkaloğlu vd 2002). Akar ve arkadaşlarının, Türk FMF hastalarıyla yaptıkları çalışmalarda, SAA1 $\alpha/\alpha$  genotipinin amiloidoz gelişimi açısından 2,5 kat risk getirdiğini (Akar vd 2003), ayrıca SAA1 -13T/C gen değişiminin amiloidoz oluşumunda etkisi olduğunu göstermiştir (Akar vd 2006).

### 1. 1. 6. KOLŞİSİN

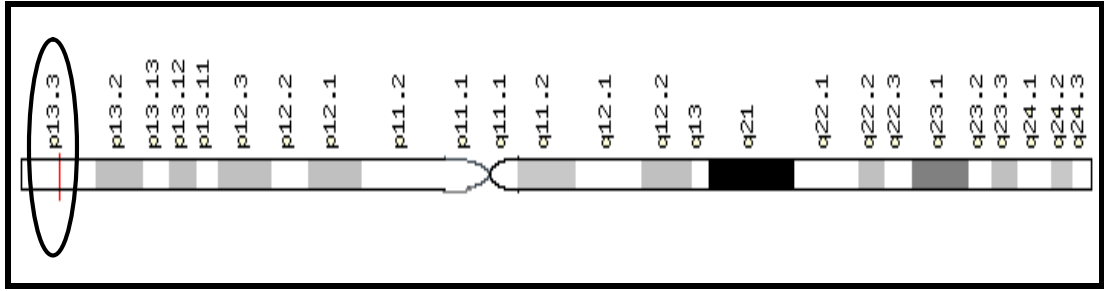
Kolşisin, 1972 yılından bu yana FMF tedavisinde kullanılmaktadır (Goldfinger 1972, Özkan vd 1972, Seidman vd 2003). FMF ataklarının sıklığı ve şiddetini azalttığı gibi (Dinarelo vd 1974, Zemer vd 1974), çeşitli dokularda amiloid fiberlerinin düzenlenmesi ve birikimini engelleyerek amiloidoz gelişimini de önlediği gösterilmiştir (Zemer vd 1986). Kolşisin, renal fonksiyon gerilemesini hafifleterek, amiloidozdan kaynaklı böbrek yetmezliği olan hastalarda proteinüriyi azaltabilir (Hojberg vd 1995).

Kolşisinin, kanda SAA düzeyini azaltmak suretiyle FMF ataklarının kontrolünde dolaylı, amiloid fiberlerinin organizasyonu ve birikimi üzerindeki direkt etki ile amiloidoz gelişimini önlediği ileri sürülmektedir (Ben-Chetrit 2003).

Kolşisin, lökosit kemotaksisini doğrudan inhibe eder. Ayrıca, beyaz kan hücreleri ve endotelial hücreler üzerinde adezyon moleküllerini azaltmak suretiyle, inflamasyon bölgesine lökosit transferini engeller (Centola vd 2000). Bunlara ek olarak, kolşisinin serozal hücrelerde C5a aktivitesini artırabildiği ve böylece akut FMF ataklarını ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir (Abedat vd 2002).

### 1. 1. 7. GENETİK

1992 yılında FMF’den sorumlu gen (*MEFV*), 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) pozisyonel klonlama tekniği kullanarak haritalanmıştır (Pras vd 1992) (Şekil 1.1). 1997 yılında da Uluslararası FMF Konsorsiyumu ve Fransız FMF Konsorsiyumu birbirlerinden bağımsız olarak geni klonlamıştır. Genin cDNA dizisi Dizi 1.1’de gösterilmektedir ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



Şekil 1.1. 16. kromozomda FMF geninin (*MEFV*) lokalizasyonu

1 ggaagccaga cagctggctc gagcctctcc tgctcagcac catggctaag acccctagtg  
 61 accatctgct gtccaccctg gaggagctgg tgccctatga ctcgagaag ttcaagtcca  
 121 agctgcagaa caccagtgtg cagaaggagc actccaggat ccccgaggag cagatccaga  
 181 gagccaggcc ggtgaagatg gccactctgc tggcaccta ctatggggaa gactacgccc  
 241 tgcagctcac cctgcaggct ctgcgggcca tcaaccagcg cctgctggcc gaggagctcc  
 301 acagggcagc cattcaggaa tatccacac aagaaaacgg cacagatgat tccgcagcgt  
 361 ccagctccct gggggagaa aagcccagga gctgaagac tccagaccac cccgagggga  
 421 acgaggggaa cggccctcgg cgtacgggg gcggagctgc cagcctgccc tgcagccagc  
 481 ccgagggcgg gagggggctg tcgaggaagc ccctgagcaa acgcagagag aaggcctcgg  
 541 agggccttga cgcgcagggc aagcctcggc cccggagccc ggcctgccc ggcgggagaa  
 601 gccccggccc ctgcaggcgg ctgagggggg gccaggccga ggtccggctg cgcagaaacg  
 661 ccagctccgc ggggaggtcg caggggctgg cggggggcgc cccggggcag aaggagtcca  
 721 ggcctctcga agtgtacctg cctcgggaa agatgcgacc tagaagcctt gaggtacca  
 781 ttctacagg ggagaaggcg cccgcaaatc gagaattct cctgactcta gaggaaaaa  
 841 cagctgcgaa tctggactcg gcaacagaac cccgggcaag gccactccg gatggagggg  
 901 catctcgcaa cctgaaggaa ggccttgaa atccagaaca ttcggtcacc ggaagggcac  
 961 cagacacggc tgcaggtccc cgctgccacg cccaggaagg agaccagtt gacggtacct  
 1021 gtgtgctgta ttctgcagc ttcccaggc cagtttctgg gcacccccag gcctcaggca  
 1081 gccgctcacc tggctgcccc cggtgccagg actccatga aaggagagc cgggaagcc  
 1141 taagcccca gccctgcca cagtgtlaag gccacctgaa gcaggtccag ctgctcttct  
 1201 gtgaggatca cgtatgagcc atctgctca tctgactct gactcaggag caccaaggcc  
 1261 accgggtgcg ccccatgag gaggtcgccc tggaaacaaa gaagaaaatt cagaagcagc  
 1321 tggagctatc gaagaagctg agaaaatcag gggaggagca gcgactctat ggggaggaga  
 1381 aggcagtgag cttctgaaa caaactgaag cgctgaagca gcgggtgag aggaagctgg  
 1441 acgaggtgta ctactctg gaacagcagg agcatttct tctgacctca ctggaggagc  
 1501 tgggcccagc ggttggcag atcaggaagg catatgacac ccgctatcc caggacatcg  
 1561 cctgctcga tgcgtgatt ggggaactcg aggcgaagga gtgcagatca gaatgggaac  
 1621 ttctgcagga cattggagac atctgcaca gggctaagc agtgcctgct cctgaaaagt  
 1681 ggaccactcc tcaagagata aaacaaaaga tccaactct ccaccagaag tcagagtttg  
 1741 tggagaagag cacaaagtac ttctcagaaa cctgcgttc agaaatggaa atgttcaatg  
 1801 ttccagagct gattggcgtc caggcacatg ctgttaagt gattctggat gcagaaaccg  
 1861 ctaccccaa cctcatctc tctgatgac tgaagagtgt tagacttga aacaagtggg  
 1921 agaggctgcc tgatggccc caaagatttg acagctgtat cattgttctg ggctctccga  
 1981 gtttctctc tggccgctg tactgggagg tggaggttgg agacaagaca gcatggatcc  
 2041 tgggagctg caagacatcc ataagcagga aagggaacat gactctgctg ccagagaatg  
 2101 gctactgggt ggtgataatg atgaagaaa atgagtacca ggcgtccagc gttccccga  
 2161 ccgcctgct aataaaggag cctcccaagc gtgtggcat cttcgtggac tacagagttg  
 2221 gaagcatctc ctttacaat gtgacagcca gatcccatc ctatacttc gccagctgct  
 2281 ctttctcgg gcccttcaa cctatctta gccctgggac acgtgatgga gggagaaca  
 2341 cagctcctct gactatctgt ccagtgggtg gtcaggggcc tgaactaatg cccaactg  
 2401 catctctct cctgctctg gcctgtatc ttgcattcac actcaatagt cacggaatgc  
 2461 cgactagggt ctactgcta tgggaaatgc aaaaataaca aaatagttac tgtgccacg  
 2521 gagcctccc gattataga gaggttaagt aggaacgaac atgttagtca atccgggtga  
 2581 agacatgtac tgatgacaca ccatggattt cagaggagga agtacggagt cgttcataa  
 2641 tccgccctg gtgggtggca ctctcaggtg ctctgaaca gaagatttg ccctctttt  
 2701 ccctcagaac cccacggcaa ggaatatagt cccctgttc tctctgctc tgtcttgagg  
 2761 atatgggaag cctagagaaa cgcaagcaga ctggattggg atagaagtat ttgtgtacct  
 2821 ggattaatga actatgattt tttttttt ttttgagac caaatctgc tctgtggccc  
 2881 aggttgaggt gcagtggcac gatctcagct cactgcaacc tccacctccc aggttcaagc  
 2941 gattctcctg cctcagcctc ctgagcagct gggattacag gtgcgtgcca ccacaccagg  
 3001 ctggttttct tgtatttta gtagagacgg gggtttacc atgttagcca ggctggtctc  
 3061 gaactcctga cctcaggtga tccacccgcc tcagcctccc aaagtgcctg gattacaggc  
 3121 atgagccact gtgccggccc tatgattctt tttttttt tttttgaga caaagtittg  
 3181 ctctgtcac ccaggctgga gtgcagtggt gcaatcttgg ctactgcaa cctccgctc  
 3241 ccaggttcaa gagattctcc tgcctcagcc tccgaagtag ctgggattac aggcggccgc  
 3301 caccatgccc ggctaattt ttgcattttt agtagacatg aggtttcatc atgttgcca  
 3361 gcccgtctc aaactcctga cctcaggtga tgcacccacc tcagcctccc aaagtgcagg  
 3421 gattacaggc atgagccacc atgctggcc atgattctta agagaattga ctgggcctca  
 3481 tgaataaaaa aattagaaaa tctaaaaaa a

## Dizi 1.1. *MEFV* geninin cDNA dizisi

*MEFV* (**ME**diterranean **FeV**er); 10 ekzon içeren, 15 kilobazlık, 3505 nükleotidden oluşan bir gendir. Öncelikle 10. ekzonda hastalıkla ilgili üç yanlış anlamlı mutasyon (M694V, M680I, V726A) tanımlanmıştır (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997).

### **M694V**

*MEFV* geni 2080. nükleotidde, proteinde Metiyonin→Valin aminoasit değişikliğiyle sonlanan, A>G transisyonu tanımlanmıştır (The International FMF Consortium 1997). *MEFV* geni cDNA dizisinde 1170. nükleotidde A>G değişimi gösterilmiştir (The French FMF Consortium 1997). Askenazi olmayan Yahudilerde yaygın görülmekle birlikte, Türklerde %43.5 oranındadır (Akar vd 2000).

### **M680I**

*MEFV* geni 2040. nükleotidde, G>C transisyonu, ilk olarak Ermeni bir FMF hastada tanımlanmıştır (The International FMF Consortium 1997). Proteinde Metiyonin→İzolösin aminoasit değişikliğiyle dizisinde nükleotid 1130'da G>C değişimini göstermiştir (The French FMF Consortium 1997). Ermenilerde yaygın olan M680I mutasyonunun, Türklerde görülme sıklığı %12 bulunmuştur (Akar vd 2000).

### **V726A**

Proteinde Valin→Alanin aminoasit değişikliğine neden olan, *MEFV* geni nükleotid 2177'de saptanan C>T transisyonu, ilk olarak Dürzi bir ailede tanımlanmıştır (The International FMF Consortium 1997). Genin cDNA dizisinin 1267. nükleotidinde Fransız FMF Konsorsiyumu tarafından T>C değişimi gösterilmiştir (The French FMF Consortium 1997). Türklerde %11.1 oranında görülen mutasyon daha çok Askenazi ve Irak Yahudilerinde yaygındır (Akar vd 2000).

1998'de M694V, V726A ve M680I mutasyonlarına ek olarak, 2. ekzonda (E148Q, E167D ve T267I) (Bernot vd 1998, Samuels vd 1998), 5. ekzonda (F479L) (Bernot vd 1998) ve 10. ekzonda (M694I, K695R, A744S, R761H, T681I, I692del ve M694del) (The French

FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997, Bernot vd 1998, Booth vd 1998, Samuels vd 1998) yeni mutasyonlar tanımlanmıştır.

2008 yılı FMF veri tabanında 180 gen değişimi bildirilmiştir (Çizelge 1.2) (Şekil 1.2) (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>). Mutasyonların çoğu yanlış anlamlı mutasyon şeklinde olup, proteinin yapısını ve fonksiyonunu değiştirmektedir.

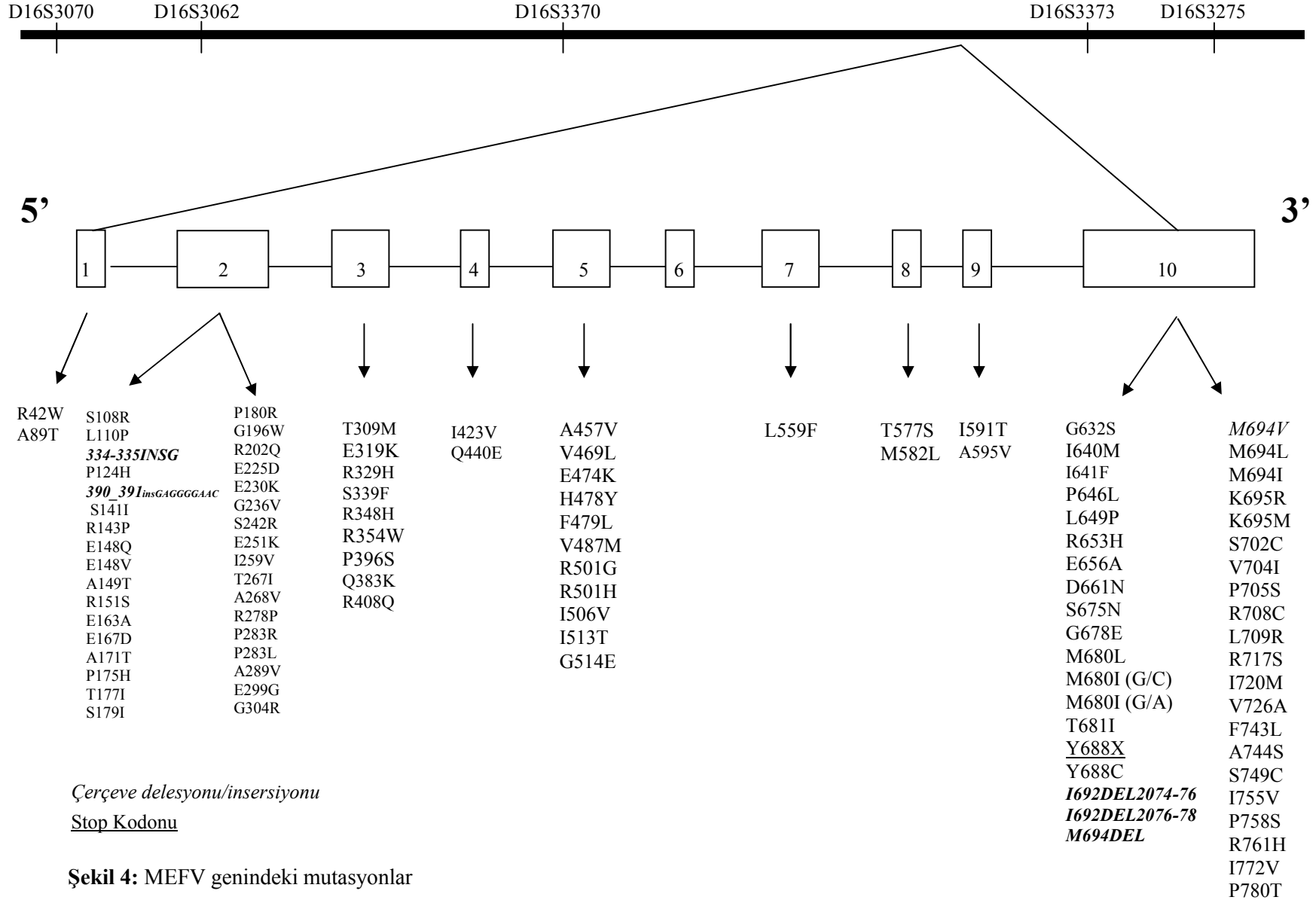
**Çizelge 1.2.** *MEFV* geninde nükleotid-aminoasit değişimleriyle beraber Türklerde tanımlanmış olanlar (\*) işaretli olarak gösterilmiştir.

| EKZON | KODON (AMİNOASİT DEĞİŞİMİ)               | NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ | TÜRKLERDE BELİRLENENLER |
|-------|------------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 1     | R42W (p.Arg42Trp)                        | c.124C>T           |                         |
| 1     | A89T (p.Ala89Thr)                        | c.265G>A           |                         |
| 2     | S108R (p.Ser108Arg)                      | c.322A>C           |                         |
| 2     | L110P (p.Leu110Pro)                      | c.329T>C           |                         |
| 2     | 334_335insG (p.Glu112fsX130)             | c.334_335insG      |                         |
| 2     | P124H (p.Pro124His)                      | c.371C>A           |                         |
| 2     | 390_391insGAGGGGAAC (p.Glu128_Asn130dup) | c.382_390dup       |                         |
| 2     | S141I (p.Ser141Ile)                      | c.422G>T           | *                       |
| 2     | R143P (p.Arg143Pro)                      | c.428G>C           |                         |
| 2     | E148Q (p.Glu148Gln)                      | c.442G>C           |                         |
| 2     | E148V (p.Glu148Val)                      | c.443A>T           | *                       |
| 2     | A149T (p.Ala149Thr)                      | c.445G>A           |                         |
| 2     | R151S (p.Arg151Ser)                      | c.453G>C           | *                       |
| 2     | E163A (p.Glu163Ala)                      | c.488A>C           |                         |
| 2     | E167D (p.Glu167Asp)                      | c.501G>C           |                         |
| 2     | A171T (p.Ala171Thr)                      | c.511G>A           |                         |
| 2     | P175H (p.Pro175His)                      | c.524C>A           |                         |
| 2     | T177I (p.Thr177Ile)                      | c.530C>T           |                         |
| 2     | S179I (p.Ser179Ile)                      | c.536G>T           | *                       |
| 2     | P180R (p.Pro180Arg)                      | c.539 C>G          |                         |
| 2     | G196W (p.Glu196Trp)                      | c.586G>T           |                         |
| 2     | R202Q (p.Arg202Gln)                      | c.605G>A           |                         |
| 2     | 606_621dup (p.Ser208AlafsX39)            | c.606_621dup       |                         |
| 2     | E225D (p.Glu225Asp)                      | c.675G>C           |                         |
| 2     | E230K (p.Glu230Lys)                      | c.688G>A           |                         |
| 2     | G236V (p.Gly236Val)                      | c.707G>T           |                         |
| 2     | S242R C>G (p.Ser242Arg)                  | c.726C>G           |                         |
| 2     | S242R C>A (p.Ser242Arg)                  | c.726C>A           |                         |
| 2     | E251K (p.Glu251Lys)                      | c.751G>A           |                         |

| EKZON | KODON (AMİNOASİT DEĞİŞİMİ)    | NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ | TÜRKLERDE BELİRLENENLER |
|-------|-------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 2     | 761_764dup (p.Asn256ArgfsX70) | c.761_764dupCCGC   | *                       |
| 2     | I259V (p.Ile259Val)           | c.775A>G           | *                       |
| 2     | T267I (p.Thr267Ile)           | c.800C>T           |                         |
| 2     | A268V (p.Ala268Val)           | c.803C>T           |                         |
| 2     | R278P (p.Arg278Pro)           | c.833G>C           |                         |
| 2     | P283R (p.Pro283Arg)           | c.848C>G           | *                       |
| 2     | P283L (p.Pro283Leu)           | c.848C>T           |                         |
| 2     | A289V (p.Ala289Val)           | c.866C>T           |                         |
| 2     | E299G (p.Glu299Gly)           | c.896A>G           |                         |
| 2     | G304R (p.Gly304Arg)           | c.910G>A           | *                       |
| 3     | T309M (p.Thr309Met)           | c.926 C>T          |                         |
| 3     | R314H (p.Arg314His)           | c.941G>A           | *                       |
| 3     | E319K (p.Glu319Lys)           | c.955G>A           |                         |
| 3     | V328A (p.Val328Ala)           | c.983T>C           |                         |
| 3     | R329H (p.Arg329His)           | c.986G>A           |                         |
| 3     | S339F (p.Ser339Phe)           | c.1016C>T          | *                       |
| 3     | R348H (p.Arg348His)           | c.1043G>A          |                         |
| 3     | R354W (p.Arg354Trp)           | c.1060C>T          |                         |
| 3     | P369S (p.Pro369Ser)           | c.1105C>T          |                         |
| 3     | Q383K (p.Gln383Lys)           | c.1147C>A          |                         |
| 3     | R408Q (p.Arg408Gln)           | c.1223G>A          |                         |
| 4     | I423V (p.Ile423Val)           | c.1267A>G          |                         |
| 4     | Q440E (p.Gln440Glu)           | c.1318C>G          |                         |
| 5     | A457V (p.Ala457Val)           | c.1370C>T          | *                       |
| 5     | V469L (p.Val469Leu)           | c.1405G>T          |                         |
| 5     | E474K (p.Glu474Lys)           | c.1420G>A          |                         |
| 5     | H478Y (p.His478Tyr)           | c.1432C>T          |                         |
| 5     | F479L (p.Phe479Leu)           | c.1437C>G          |                         |
| 5     | V487M (p.Val487Met)           | c.1459G>A          |                         |
| 5     | R501G (p.Arg501Gly)           | c.1501C>G          |                         |
| 5     | R501H (p.Arg501His)           | c.1502G>A          |                         |
| 5     | I506V (p.Ile506Val)           | c.1516A>G          | *                       |
| 5     | I513T (p.Ile513Thr)           | c.1538T>C          |                         |
| 5     | G514E (p.Gly514Glu)           | c.1541G>A          |                         |
| 7     | L559F (p.Leu559Phe)           | c.1675C>T          |                         |
| 8     | T577S (p.Thr577Ser)           | c.1729A>T          |                         |
| 8     | M582L (p.Met582Leu)           | c.1744A>C          |                         |
| 9     | I591T (p.Ile591Thr)           | c.1772T>C          |                         |
| 9     | A595V (p.Ala595Val)           | c.1784C>T          |                         |
| 10    | G632S (p.Gly632Ser)           | c.1894G>A          |                         |

| EKZON | KODON (AMİNOASİT DEĞİŞİMİ) | NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ | TÜRKLERDE BELİRLenenLER |
|-------|----------------------------|--------------------|-------------------------|
| 10    | I640M (p.Ile640Met)        | c.1920C>G          |                         |
| 10    | I641F (p.Ile641Phe)        | c.1921A>T          | *                       |
| 10    | P646L (p.Pro646Leu)        | c.1937C>T          |                         |
| 10    | L649P (p.Leu649Pro)        | c.1946T>C          |                         |
| 10    | R653H (p.Arg653His)        | c.1958G>A          |                         |
| 10    | E656A (p.Glu656Ala)        | c.1967A>C          |                         |
| 10    | D661N (p.Asp661Asn)        | c.1981G>A          | *                       |
| 10    | S675N (p.Ser675Asn)        | c.2024G>A          |                         |
| 10    | G678E (p.Gly678Glu)        | c.2033G>T          |                         |
| 10    | M680L (p.Met680Leu)        | c.2038A>C          |                         |
| 10    | M680IGC (p.Met680Ile)      | c.2040G>C          |                         |
| 10    | M680IGA (p.Met680Ile)      | c.2040G>A          |                         |
| 10    | T681I (p.Thr681Ile)        | c.2042C>T          |                         |
| 10    | Y688C (p.Tyr688Cys)        | c.2063A>G          |                         |
| 10    | Y688X (p.Tyr688X)          | c.2064C>G          |                         |
| 10    | I692DEL (p.Ile692del)      | c.2076_2078del     |                         |
| 10    | M694V (p.Met694Val)        | c.2080A>G          |                         |
| 10    | M694L (p.Met694Leu)        | c.2080A>T          | *                       |
| 10    | M694DEL (p.Met694del)      | c.2081_2083del     |                         |
| 10    | M694I (p.Met694Ile)        | c.2082G>A          |                         |
| 10    | K695R (p.Lys695Arg)        | c.2084A>G          |                         |
| 10    | K695M (p.Lys695Met)        | c.2084A>T          | *                       |
| 10    | S702C (p.Ser702Cys)        | c.2105C>G          |                         |
| 10    | V704I (p.Val704Ile)        | c.2110G>A          |                         |
| 10    | P705S (p.Pro705Ser)        | c.2113C>T          |                         |
| 10    | R708C (p.Arg708Cys)        | c.2122C>T          |                         |
| 10    | L709R (p.Leu709Arg)        | c.2126T>G          | *                       |
| 10    | R717S (p.Arg717Ser)        | c.2149C>A          |                         |
| 10    | I720M (p.Ile720Met)        | c.2160C>G          |                         |
| 10    | V726A (p.Val726Ala)        | c.2177T>C          |                         |
| 10    | F743L (p.Phe743Leu)        | c.2229C>G          |                         |
| 10    | A744S (p.Ala744Ser)        | c.2230G>T          |                         |
| 10    | S749C (p.Ser749Cys)        | c.2246C>G          |                         |
| 10    | I755V (p.Ile755Val)        | c.2263A>G          |                         |
| 10    | P758S (p.Pro758Ser)        | c.2272C>T          |                         |
| 10    | R761H (p.Arg761His)        | c.2282G>A          | *                       |
| 10    | I772V (p.Ile772Val)        | c.2314A>G          |                         |
| 10    | P780T (p.Pro780Thr)        | c.2338C>A          |                         |

# MEFV GENİ



### 1. 1. 7. 1 GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

FMF’de genotip-fenotip ilişkisi tam olarak ortaya konmamıştır. Yaygın olarak görülen dört *MEFV* mutasyonunun, Fenotip I (M694V %38, M680I %8, V726A %4, E148Q %4) ve Fenotip II (M694V %51.5, M680I %9, V726A %2.9, E148Q %3.5) hastalarındaki dağılımları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Yılmaz vd 2001, Balcı vd 2002).

M694V homozigot genotipini, düzenli kolşisin tedavisi görmeyen hastalarda, hastalığın erken yaşta ortaya çıkması, plörezinin daha yaygın olması, artrit daha sık görülmesi ve yüksek sıklıkta amiloidoz oluşumu şeklinde hastalığın daha şiddetli formuyla (Shohat vd 1999, Cazeneuve vd 1999), diğer yandan, E148Q mutasyonu ise hastalığın daha hafif formuyla ilişkilendirilmiştir (Aksentijevich vd 1999, Livneh vd 1999).

M694V homozigotluğunun Yahudiler, Ermeniler ve Araplarda amiloid gelişimi açısından önemli bir risk faktörü olduğu belirtilse de, M694V dışında mutasyon taşıyan amiloidozlu hastalar da bildirilmiştir (Booth vd 1998, Samuels vd 1998, Yalçınkaya vd 1998). İlginçtir ki, daha önce Türk FMF hastalarıyla yapılan iki önemli çalışmada, M694V homozigotluğuyla amiloid gelişimi arasında bir ilişki olmadığı gösterilmesine rağmen (Tekin vd 2000, Yalçınkaya vd 2000), son yıllarda yapılan bir çalışmada ise bu tür bir ilişkiden söz edilmektedir (Yılmaz vd 2003).

FMF inflamatuvar bir hastalık olup, bazı hastalarda teşhisi zor olabilmektedir. Genetik analizler ise tanıyı kesinleştirmede yardımcı olmaktadır.

### 1. 1. 8. PYRİN / MARENOSTRİN

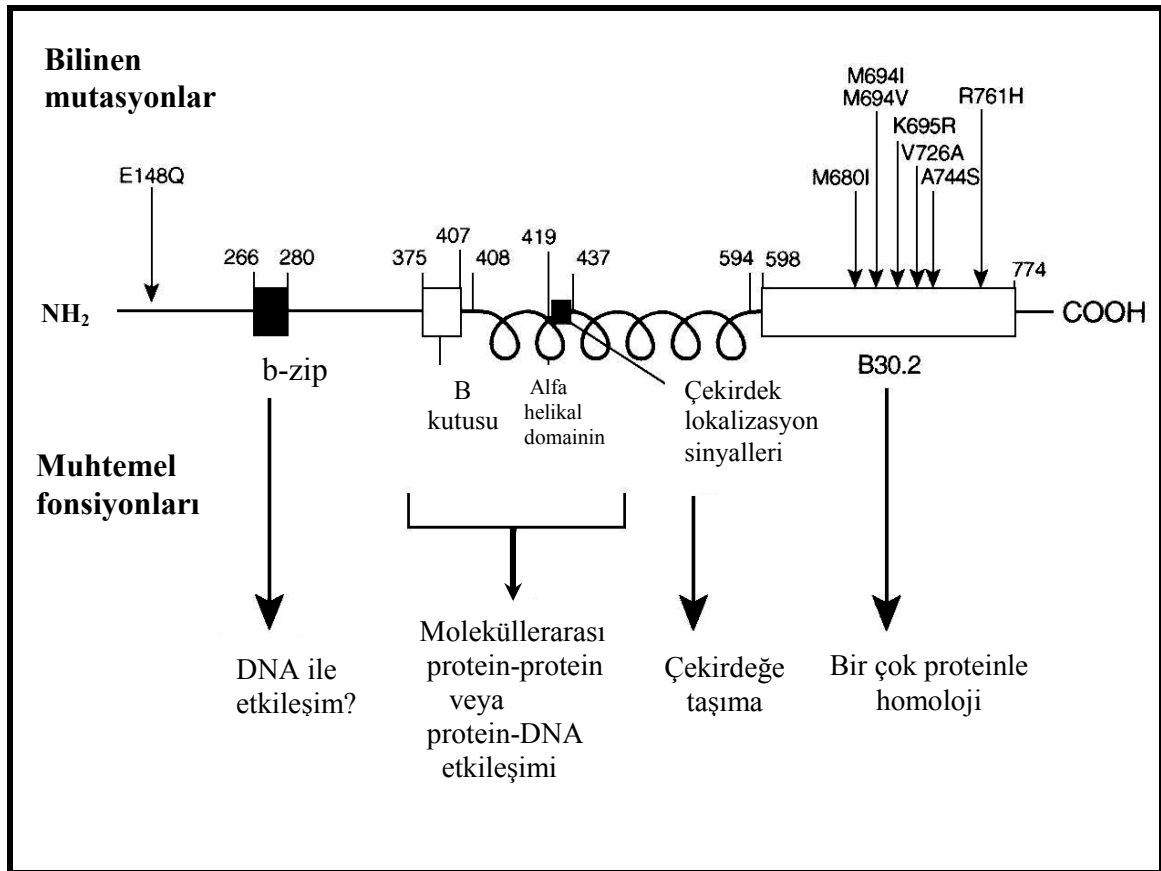
*MEFV*, çoğunlukla granülosit, monosit, dendritik hücrelerde ve deri, periton ve sinovyumdaki fibroblastlarda ifade olmaktadır (Diaz vd 2004). Genin 3.7 kb uzunluğundaki transkripti, 781 a.a.’lık, 86 kDa moleküler ağırlığında, arjinin ve lizin aminoasitlerince zengin, pozitif yüklü bir protein kodlamaktadır (The International FMF Consortium 1997). *MEFV* geninin kodladığı protein, Uluslararası FMF Konsorsiyumu (1997) tarafından ateş regülasyonundaki rolünden dolayı “pyrin”, Fransız FMF

Konsorsiyumu (1997) tarafından ise Akdeniz'in latince adı, Mare Nostrum'dan yola çıkılarak "marenostrin" olarak adlanmıştır.

FMF'in klinik tablosuna göre gen ekspresyonunun, nötrofillerde, serözal veya sinoviyal hücrelerde meydana geldiği düşünülse de yapılan çalışmalarda, sadece periferik kan lökositlerinde tespit edilmiştir. Lenf düğümleri, dalak, kemik iliği veya timusta ekspresyon gerçekleşmemektedir. Böylece gen ekspresyonunun olgun granülositlerle yani nötrofillerle sınırlı olduğu gösterilmiştir (Kastner 1998).

Pyrin proteini, dört fonksiyonel domain içermektedir (Samuels vd 1998) (Şekil 1.3):

1. Amino (N) ucu PYRIN domaini (PAD, PyD veya DAPIN)
2. B box zinc finger domain (BB-ZF)
3. Coiled coil domain (CC),
4. Karboksi (C) ucu B30.2 domaini



Şekil 1.3. Pyrin proteininin yapısı ve mutasyon bölgeleri

Pyrin, apoptoz ve inflamasyonun regülasyonunda yer alan proteinlerin sınıfına aittir. Pyrin proteininin FMF'deki fonksiyonu henüz iyi anlaşılamamış olmasına rağmen inflamasyonu direkt veya indirekt baskılayıcı işlevi olduğu düşünülmektedir. Proteinin N-ucunda yer alan pyrin domaini, ASC adaptör proteini ile etkileşime girerek, kaspaz-1 aktivasyonunu ve sonuç olarak IL-1 $\beta$  üretimini regüle eder. Mutasyonlar pyrin domainin işlevini engelleyerek, sürekli devam eden bir inflamasyon sürecine neden olur (Chae vd 2006).

## **1. 2. MOLEKÜLER TEKNİKLER**

### **1. 2. 1. DNA EKSTRAKSİYONU**

DNA'lar, kan örneklerinden fenol/kloroform yöntemiyle ekstrakte edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

### **1. 2. 2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)**

PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda, konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. Yani, bir çeşit *in vitro* klonlamadır (Klug vd 2000).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için yok denecek kadar DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz, deoksिनүkleotid trifosfatları (dNTP) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl) ayrıca önemli bir kofaktör olan Mg<sup>+2</sup> iyonları gereklidir (Klug vd 2000).

PCR reaksiyonu, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (**denatürasyon**), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (**hibridizasyon**), daha da sonra zincirin uzamasına (**polimerizasyon**) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur ve çoğaltılmış ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrarlanma sayısına bağlıdır. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve çok kez tekrar edilir. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar 1999, Klug vd 2000).

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu genomik DNA, kurumuş kan ya da semen gibi adli tıp örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler ve tek bir saç teli gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar 90-95°C'de yaklaşık 5 dakika süreyle tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır. Sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA polimeraz reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug vd 2000).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'nın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8,4 tepkime karışımında son değişimi 10 mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde K<sup>+</sup> bulunmasının çoğaltılmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100 µg/ml jelatin bulunmasının benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl<sub>2</sub>) konsantrasyonunun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu arttırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg<sup>+2</sup> iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolünde Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu ampirik olarak

ayarlanmalıdır. Fazla  $Mg^{+2}$ , enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999).

PCR ile yapılan klonlama işlemi konakçı hücre ile yapılan klonlamadan daha avantajlıdır. PCR reaksiyonu hızlıdır ve konakçı ile yapılan klonlama işlemleri haftalar alırken, PCR ile yapılan klonlama birkaç saat içinde tamamlanır. Ayrıca oldukça hassastır ve çok küçük miktarlardaki DNA örneği reaksiyonda kullanılabilir. PCR primerleri bilgisayar program destekli aletlerde yapılabildiği gibi, ticari olarak sentezlettirilmesiyle de ucuz ve ekonomiktir (Klug vd 2000).

### 1. 2. 3. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMLERİYLE KESİM

Restriksiyon endonükleazlar (RE), bakterilerden izole edilen, çift sarmal DNA moleküllerini spesifik parçalara kesen ve bu şekilde DNA'yı manipule etmeyi mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği ya da kısıtladığı için bu ismi almışlardır. Esas görevleri, dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markörleri taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları engellemek ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır (Akar 1999, Klug vd 2000).

RE'ler özgün DNA dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini şeker ve fosfat omurgasından kırarlar. Klonlama için çok önemli araçlar olmalarının nedeni, DNA'yı her zaman özgün bölgelerden parçalayabilmelerinden ileri gelmektedir. Tanıma dizileri çoğu restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçisinde de aynıdır, bunlar "palindromik diziler" olarak adlandırılır (Akar 1999, Klug vd 2000).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken izole edilen prokaryotun cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır (Kaynak: *Desulfolobus desulfiricans*, RE enzimi: Dde I). İzosizomerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar 1999, Klug vd 2000).

#### 1. 2. 4. DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi, DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Akar 1999, Klug vd 2000).

**a)Maxam-Gilbert yöntemi:** Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif P<sup>32</sup> ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adımda ise, dört ayrı tüpteki DNA örneğine, zinciri belirli nükleotidlerden kıran dört ayrı kimyasal reaksiyon uygulanır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Bunlar da elektroforezden sonra otradyografi ile görüntülenir (Akar 1999, Klug vd 2000).

**b) Sanger DNA dizi analizi yöntemi:** Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. ddNTP'nin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmaz. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleosid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleosid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak, bir dizi DNA parçacığı meydana gelir. Elektroforez sonrası DNA bantları otradyografi ile görüntülenir (Akar 1999, Klug vd 2000).

Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazların geliştirilmesiyle PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiştir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid primer, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur. PCR’da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar 1999, Klug vd 2000).

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılarak dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Akar 1999, Klug vd 2000).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı ve Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı'nda klinik olarak Tel-Hashomer kriterlerine (Livneh vd 1997) göre FMF tanısı almış, tek kromozomunda mutasyon taşıdığı laboratuvarımızda belirlenen, pediatrik yaş grubundaki 80 olgu tez çalışmasına dahil edilmiştir. Hastaların mutasyon dağılımları Çizelge 2.1'de verilmiştir. DNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair izin kağıtları kendilerinden ve/veya ebeveynlerinden alınmıştır.

**Çizelge 2.1.** Tez çalışmasına dahil edilen 80 FMF hastasının 10. ekzon ve 2. ekzondaki E148Q mutasyon dağılımları

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON E148Q |
|----|-----------|-----------|----------------|
| 1  | C. Ç      | N         | E148Q/-        |
| 2  | H. S. Ş   | V726A/-   | N              |
| 3  | B. D      | M694V/-   | N              |
| 4  | U. D      | M694V/-   | N              |
| 5  | Z. K      | M694V/-   | N              |
| 6  | T. D      | M694V/-   | N              |
| 7  | O. B. D   | M694V/-   | N              |
| 8  | S. Ç      | M680I/-   | N              |
| 9  | H. B. A   | N         | E148Q/-        |
| 10 | E. A      | M694V/-   | N              |
| 11 | O. G      | N         | E148Q/-        |
| 12 | H. S.     | M694V/-   | N              |
| 13 | E. E      | N         | E148Q/-        |
| 14 | M. Ç      | M694V/-   | N              |
| 15 | B. Y      | M694V/-   | N              |
| 16 | S. Y      | N         | E148Q/-        |
| 17 | H. Ç      | N         | E148Q/-        |
| 18 | N. E. U   | M694V/-   | N              |
| 19 | M. Ö      | M694V/-   | N              |
| 20 | M. G. K   | M694V/-   | N              |
| 21 | F. Ç      | M694V/-   | N              |
| 22 | M. Y      | V726A/-   | N              |
| 23 | M. K      | N         | E148Q/-        |

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON E148Q |
|----|-----------|-----------|----------------|
| 24 | E. Ç      | M694V/-   | N              |
| 25 | R. C      | M694V/-   | N              |
| 26 | M. Ş      | N         | E148Q/-        |
| 27 | N. A      | M694V/-   | N              |
| 28 | S. B      | M694V/-   | N              |
| 29 | E. F. E   | V726A/-   | N              |
| 30 | E. B      | V726A/-   | N              |
| 31 | H. A      | V726A/-   | N              |
| 32 | F. K      | M694V/-   | N              |
| 33 | H. Ö      | M694V/-   | N              |
| 34 | M. B      | M694V/-   | N              |
| 35 | M. Ş      | N         | E148Q/-        |
| 36 | L. Ç      | M694V/-   | N              |
| 37 | Ö. F. A   | M680I/-   | N              |
| 38 | R. B. Y   | N         | E148Q/-        |
| 39 | K. K      | M694V/-   | N              |
| 40 | S. İ      | M694V/-   | N              |
| 41 | E. A      | N         | E148Q/-        |
| 42 | F. D      | V726A/-   | N              |
| 43 | C. Y      | V726A/-   | N              |
| 44 | Y. M      | M694V/-   | N              |
| 45 | B. K      | M680I/-   | N              |
| 46 | G. K      | M680I/-   | N              |
| 47 | A. A. Y   | V726A/-   | N              |
| 48 | B. U      | M680I/-   | N              |
| 49 | N. Y      | M694V/-   | N              |
| 50 | S. T      | M694V/-   | N              |
| 51 | H. K. K   | V726A/-   | N              |
| 52 | M. B. K   | M694V/-   | N              |
| 53 | H. T      | M694V/-   | N              |
| 54 | M. U      | M680I/-   | N              |
| 55 | S. R. S   | M694V/-   | N              |
| 56 | O. K      | M694V/-   | N              |
| 57 | B. S. K   | M694V/-   | N              |
| 58 | E. Y      | M694V/-   | N              |
| 59 | B. D      | V726A/-   | N              |
| 60 | B. Ç      | N         | E148Q/-        |
| 61 | Ç. A      | M680I/-   | N              |
| 62 | O. S      | V726A/-   | N              |
| 63 | S. S      | K695R/-   | N              |
| 64 | D. K      | N         | E148Q/-        |
| 65 | B. V      | M694V/-   | N              |
| 66 | A. Ç. K   | M680I/-   | N              |

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON E148Q |
|----|-----------|-----------|----------------|
| 67 | M. Ç      | M694V/-   | N              |
| 68 | E. K      | N         | E148Q/-        |
| 69 | M. N. T   | V726A/-   | N              |
| 70 | Z. P. B   | M694V/-   | N              |
| 71 | V. M      | N         | E148Q/-        |
| 72 | S. K      | V726A/-   | N              |
| 73 | M. G. Ç   | M694V/-   | N              |
| 74 | M. B. Y   | N         | E148Q/-        |
| 75 | E. Y      | M694V/-   | N              |
| 76 | N. Ö      | V726A/-   | N              |
| 77 | S. G      | N         | E148Q/-        |
| 78 | E. A      | N         | E148Q/-        |
| 79 | F. S      | N         | E148Q/-        |
| 80 | A. E      | M694V/-   | N              |

## 2. 2. YÖNTEMLER

### 2. 2. 1. DNA Ekstraksiyonu:

Hastaların kanları 1 cc 0,5 M EDTA'lı (Etilendiamintetraasetik asit, Sigma, ABD) tüpler içerisine 9 cc olarak alınır. 50 cc'lik falkon tüpe konularak üzerine 1/2,5 oranında yani 25 cc RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorür (NH<sub>4</sub>Cl) (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 mM Potasyum Bikarbonat (KHCO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,5 M EDTA] ilave edilerek 15 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. RBC lizis solüsyonu ile yıkama işlemine tüm eritrositler lize oluncaya kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra geriye çekirdekli hücreler olan lökositler kalır. Geriye kalan bu lökositler üzerine beyaz küre hacminin 2,5 katı kadar Nükleaz Tamponu [10 mM Tris-HCl pH: 7,5 (Tris Base, Owl Scientific, ABD-HCl, Merck, Almanya), 400 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), 2 mM EDTA] eklenir. Bunun üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Quantum, Montreuil, Fransa), son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde de %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat, Sigma, ABD) ilave edilerek 37°C'lik su banyosunda (Kottermann, Almanya) bir gece bekletilir. Ertesi gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform 25:24:1 oranlarıyla sırasıyla; Fenol (Merck, Almanya): Kloroform (Merck, Almanya):

İzoamilalkol (Merck, Almanya) ilave edilerek 10 dk boyunca elde iyice çalkalanır. 10 dk çalkaladıktan sonra 15 dk buza gömülü bekletilir. Daha sonra +4°C, 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edildiğinde belirgin iki faz ayrılır. Üstteki faz yani süpernatant dikkatlice başka bir tüpe alınır ve üzerine miktarın 1/10’u oranında 2 M Sodyum Asetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na) (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95’lik alkol (Tekel, Türkiye) ilave edilir. Tüp nazikçe çalkalanır, DNA görünür hale getirildikten sonra –20°C’de bir gece bekletilir. Ertesi gün +4°C, 4000 rpm’de 15 dk santrifüj edilir. Dikkatli bir şekilde süpernatant dökülür, DNA dipte pellet halindedir. Tüp ağzı açık 10 dk kurutulur. Kurutulan DNA 500 ml %70’lik etanol ile tekrar santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve DNA kurutulur. Etanol kokusu tümüyle gittikten sonra DNA üzerine TE solüsyonu (10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA) eklenerek bir gece 37°C’lik su banyosunda bekletilerek çözülür. TE içerisinde çözünen DNA +4°C’de saklanır.

## **2. 2. 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):**

PCR reaksiyonu ile hedeflenen bölge çoğaltılmaktadır. Bu çalışmada *MEFV* geninin 2, 3, 5, 9-10. ekzonlarıyla birlikte 3’UTR (UnTranslated Region, kodlanmayan bölge) amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

### **2. 2. 2. 1. *MEFV* Geni Ekzon 2 PCR**

*MEFV* geninin 2. ekzonu için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı:

Forward: 5’- ATCTTGGGCCCTAAACGTGG - 3’

Reverse : 5’- TCCTTCAGGTCCGCAGATGC - 3’ (Metabion, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 50 µl’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*MEFV* geni 2. ekzon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C’de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklуста; 95°C’de 1 dakika, 58°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika, son siklуста 72°C’de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Techne, İngiltere). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 658 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 2.1). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %1’lik agaroz jele 5 µl PCR ürünü yüklenerek jelde görüntülenmiştir (Şekil 2.1).

```
aatcttggccctaaacgtggacagcttcacatttgcacatcgtgtgtccttcagaatattccacacagaaaacggcacagatga  
ttccgcagcgtccagctccctgggggagaacaagcccaggagcctgaagactccagaccaccccgagggggaacgaggggaa  
cgccctcgccgtacgggggaggagctccagcctcgggtgcagccagcccaggccgggagggggtgtcgcaggaagcc  
cctgagcaaacgcagagagaaggcctcggaggcctggacgcgcagggcaagcctcggaccggagccggcctgcgggg  
cgggagaagccccggccctgcagggcgctagagggggggccaggccgaggtcggctgcgcagaaacgcagctccgcggg  
gaggctgcaggggctggcggggggcgccccggggcagaaggagtgcaggccctcgaagtgtacctgccctcgggaaagatg  
cgacctagaagccttgaggtcaccatttctacaggggagaaggcgcccgcaaatccagaaattctctgactctagagaaaa  
gacagctgcgaatctggactcggcaacagaacccccgggcaaggcccaactcggatggaggggcatctgcggacctgaaggaa  
ggccctggaaatccagaacattcggtcaccggtaaattgtgttcttctactttatatcggtgcagagaaagaatggctggccgggca
```

**Dizi 2.1.** *MEFV* geni 2. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 658 bp’lik bölümü. 2. ekzon bölgesi kalın, primerler ise italik ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

#### 2. 2. 2. 2. *MEFV* Geni Ekzon 3 PCR

*MEFV* geninin 10. ekzonu için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı:

Forward: 5’- TCTGTGTAAGCAACTTGGGTTTG - 3’

Reverse : 5’- TTGGGAAAATGAAGTAAGGCCC - 3’ (Metabion, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 100 µl’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*MEFV* geni 3. ekzon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C’de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklusa; 94°C’de 1 dakika, 55°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika, 72°C’de 10 dakika, olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 480 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 2.2). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %1’lik agaroz jele 18 µl PCR ürünü yüklenerek jelde görüntülenmiştir (Şekil 2.2).

```
agtctaactgagaactcgacatctcaggcaagggtgtgtccgctgtgctttgtgatacctctgtgtaagcaactgggtttgccattcag
gggggttttccactgcatgtccccaggaaggccaccagacacggctgcgagtccecgctgccacgccaggaaggagaccagtt
gacggtagctgtgtgcgtgattcctgcagcttccccgaggcagtttctgggcacccccaggcctcaggcagccgctcactggct
gcccccggtgccaggactcccatgaaaggaagagcccggaagcctaagccccagccctgccacagtgtaaagcccaact
gaagcaggccagctgcttctgtgaggatcacgatgagcccatctgctcatctgcagtctgagtcaggagcaccaggccac
cgggtgcgccccattgaggaggtgcacctggaacacaaggtaggcactccctgcctgtgggctcttctctgccaggcactggacac
actgggccttacttcattttccaacaactctgggtgtgtggtgcattaaccagcattcttgggctggaaatggcaagaacacaataaac
```

**Dizi 2.2.** *MEFV* geni 3. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 480 bp’lik bölümü. 3. ekzon bölgesi kalın, primerler ise italik ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

### 2. 2. 2. 3. *MEFV* Geni Ekzon 5 PCR

*MEFV* geninin 5. ekzonu için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı:

Forward: 5’- TATCGCCTCCTGCTCTGGAATC - 3’

Reverse : 5’- CACTGTGGGTCACCAAGACCAAG - 3’ (Metabion, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 100 µl’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*MEFV* geni 5. ekzon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C’de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklusa; 94°C’de 30 saniye, 60°C’de 60 saniye, 72°C’de 60 saniye, son siklusa 72°C’de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Techne, İngiltere). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 526 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 2.3). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %1’lik agaroz jele 18 µl PCR ürünü yüklenerek jelde görüntülenmiştir (Şekil 2.3).

```
gccccagccatgctcagctctttctggaaggtccagacaatatgcctcctgctctggaatctaggccttgaagaggcagcataagccc  
acctcttatccacctccaggaggtgggcttctgggggttctggacatccacgtccaccacagcacagacccccatacctccctgtct  
ctgctccccagaaacaaactgaagcgtgaagcagcgggtgcagaggaagctggagcaggtgtactacttctggagcagcaa  
gagcatttctttgtggcctcactggaggacgtgggccagatggttgggcagatcaggaaggcatatgacacccgcgtatccag  
gacatgcacctgctcgatgcgctgattggggaactggaggccaaggagtgcagtcagaatgggaacttctgcaggtgggtgtg  
cctggggcccgcttcttgggtccctgtgcctatcaggatgcctcaggtcccagctctgccatcagccgtgctggaacaagtgggtga  
agccccaaaggcctaggataggacttggcttgggtgaccacagtgcctcttgtgccagaccccttggatgaggtctctcaggagccca
```

**Dizi 2.3.** *MEFV* geni 5. ekzonunun PCR ile çoğaltılan 526 bp’lik bölümü. 5. ekzon bölgesi kalın, primerler ise italik ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

#### 2. 2. 2. 4. *MEFV* Geni Ekzon 9-10 PCR

*MEFV* geninin 9-10. ekzonları için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı:

Forward: 5’- GGTTCCCTTGTCCTTTCCTTGTTG - 3’

Reverse : 5’- GATCCATGCTGTCTTGCTCTCC - 3’ (Metabion, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton®, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 100 µl’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*MEFV* geni ekzon 9-10 için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C’de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklusa; 94°C’de 1 dakika, 55°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika, 72°C’de 10 dakika, olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 500 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 2.4). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %1’lik agaroz jele 18 µl PCR ürünü yüklenerek jelde görüntülenmiştir (Şekil 2.4).

acatggcctgggttcctgggaggaacgggattatacccaacatagcatgcagggccctaagcagggg**gttccttgtctttccttgtgtca**  
ggacagtgtaatcttagccctcttaagtctaatgctcaggattttttccctatctgatttttctccgtag**ttccggagctgattggcgctcagg**  
**cacatgctg**taagtcccagatcaaggcaagtggccctggcctgctggatccctgtgctctcccctaccacgttcagaagaactacc  
ctgtccctgttctctgcaggtggggagaaccctgtaggatgttgccatggaccctacctaggtattcaaattttcttgcag**ttaattgtg**  
**attctggatgcagaaaccgctt**accccaacctcatctctctgatgatctgaagagtgttagacttgaaacaagtgaggagagge  
**tgcctgatggcccgcaaagatttgacagctgtatcattgttctgggctctccgagtttctctctggccgcggttactgggaggtgg**  
**aggttggagacaagacagcatggatcctgggagcctgcaagacatccataagcaggaaaggaacatgactctgtcgccaga**

**Dizi 2.4.** *MEFV* geni ekzon 9-10 PCR ile çoğaltılan 500 bp’lik bölümü. 9 ile 10. ekzon bölgeleri kalın, primerler ise italik ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

#### 2. 2. 2. 5. *MEFV* Geni 3’UTR PCR

*MEFV* geninin 3’UTR için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı:

Forward: 5’- GTGGGCATCTTCGTGGACTA - 3’

Reverse : 5’- GGGCCACAGAGCAAGATTT - 3’ (Metabion, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton<sup>®</sup>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>’dir. Son hacim 100 µl’ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

*MEFV* geni 3'UTR için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C'de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklusa; 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika, 72°C'de 10 dakika, olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 688 bp uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 2.5). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %1'lik agaroz jeli 18 µl PCR ürünü yüklenerek jelde görüntülenmiştir (Şekil 2.5).

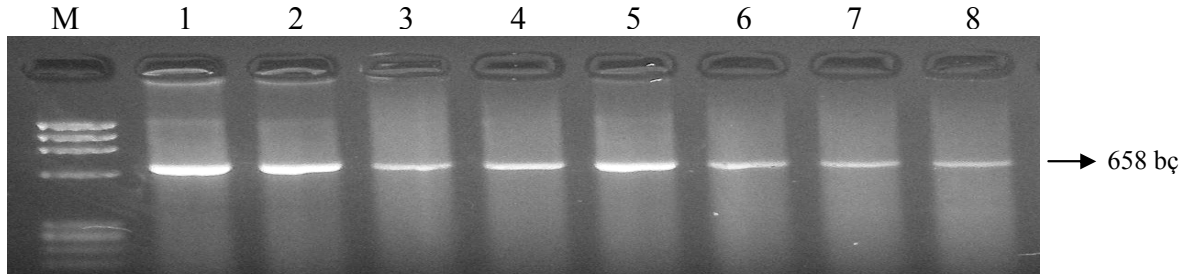
```
ggcggtccagcgttccccgacccgctgctaataaaggagcctcccaagcgtgtgggcatcttcgtggactacagagttggaagc  
atctccttttacaatgtgacagccagatccacatctatacatctgccagctgctctttcttggggcccttcaacctatcttcagccc  
tgggacacgtgatggaggggaagaacacagctcctctgactatctgtccagtggttggtcaggggctgactgaatgccaacac  
tgcattctcttctctgcttctggccttgatcttgcattcacactcaatagtcacggaatgccgactaggtgctagctgctatgggaa  
atgcaaaaataacaaaatagttactgtgccccaggagcctaccgattatagcagaggtaagttaggaacgaacatgttagtca  
atccgggtgaagacatgtactgatgacacaccatggatttcagaggaggaagtaacggagtcgttgcataatccgcccctggtgg  
gtggcactctcaggtgctcctgaacagaagatttggccctcattttccctcagaacccacggcaaggatatgtcccttcttct  
ctctgcttctgtcttgaggatatgggaagcctagagaaacgaagcagactggattgggatagaagtattgtgtacctggatta  
atgaactatgattttttttttttttttttttttgagaccaatctctgtctgtggcccagctggagtgcagtggcagatctcagctcactgc
```

**Dizi 2.5.** *MEFV* geni 3'UTR PCR ile çoğaltılan 688 bp'lik bölümü. Koyu boyanmış bölge 10. ekzon dizisini, diğer bölüm ise 3'UTR bölgesini göstermektedir. Primerler italik ve altı çizili olarak belirtilmiştir.

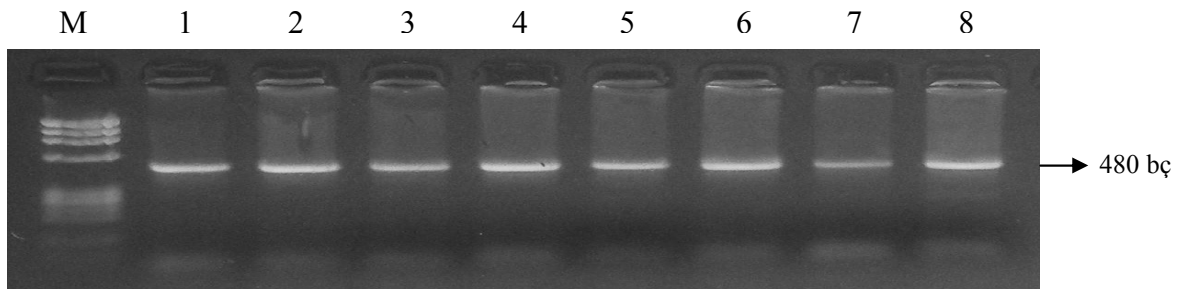
### 2. 2. 3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda PCR ürünlerini %1'lik agaroz jelde değerlendirdik. %1'lik agaroz jel için 0,75 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 75 ml'ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Trizma® (Sigma, ABD), 27,5 g Borik asit (Carlo Erba, İtalya), 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ABD) ve deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) ile 1 l'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 2'şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel

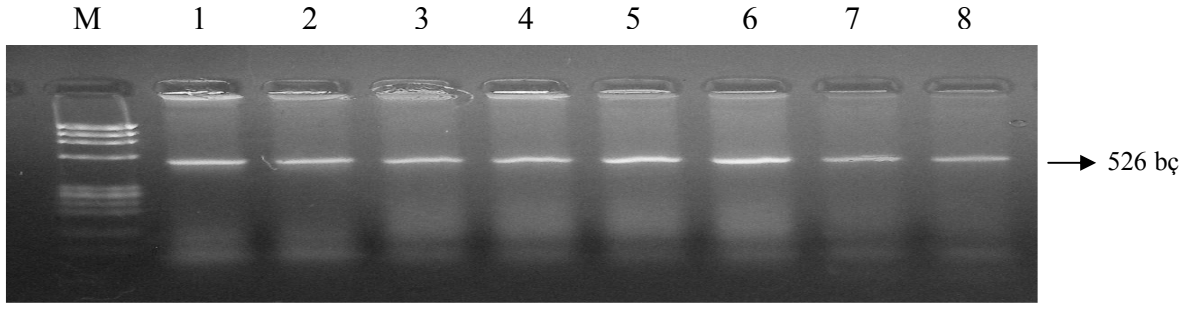
tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 18 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 2 µg kadar yüklenir. 90-100 V akımda 20 dk kadar yürütülür (Wealtec, Tayvan). Ultraviyole ışıktaki (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanır (Şekil 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5).



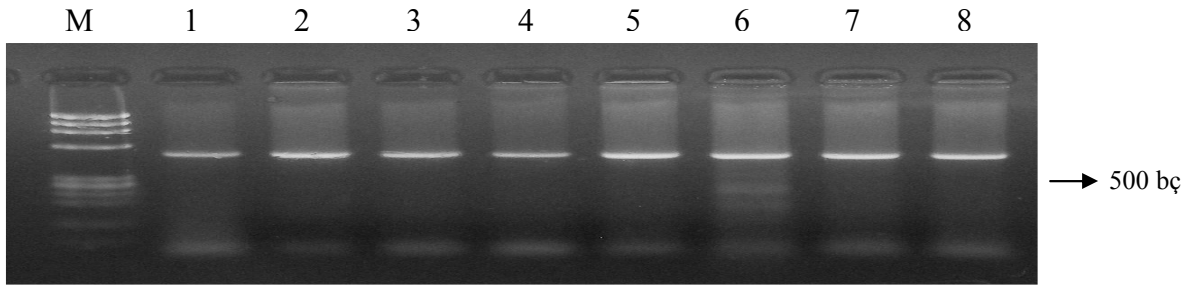
**Şekil 2.1.** 2. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker (ΦX174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 658 bç'lik PCR ürünlerini göstermektedir.



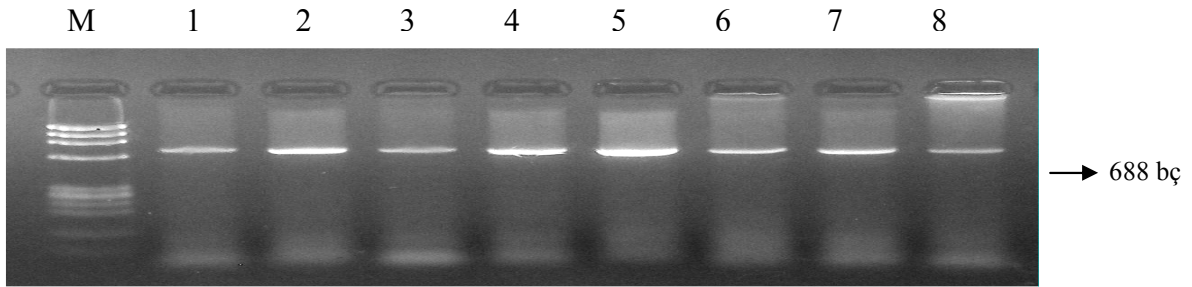
**Şekil 2.2.** 3. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker (ΦX174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 480 bç'lik PCR ürünlerini göstermektedir.



**Şekil 2.3.** 5. ekzon PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 526 bp'lik PCR ürünlerini göstermektedir.



**Şekil 2.4.** Ekzon 9-10 PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 500 bp'lik PCR ürünlerini göstermektedir.

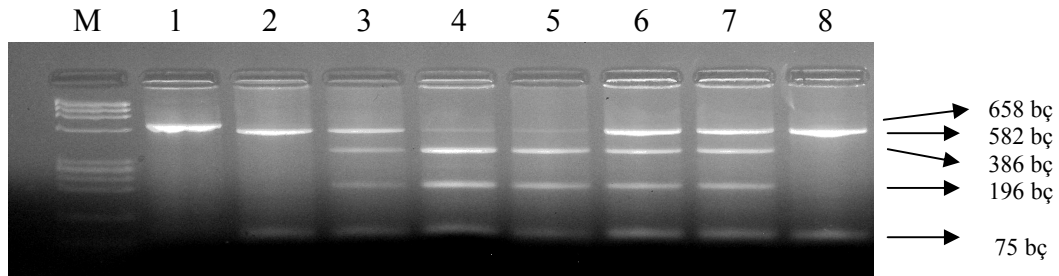


**Şekil 2.5.** 3'UTR PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 688 bp'lik PCR ürünlerini göstermektedir.

## 2. 2. 4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Muamelesi

### 2. 2. 4. 1. *MEFV* 2. Ekzon R202Q (c. 605 G>A) Gen Değişiminin PvuII ile İncelenmesi

*MEFV* geni 2. ekzonun PCR'ı ile elde edilen 658 bp'lik ürünler R202Q gen değişimini belirlemek amacıyla PvuII (5'-CAG↓CTG-3') restriksiyon endonükleaz enzimi (Fermantas, Litvanya) ile kesime tabi tutuldu. 10mM Tris-HCl (37°C'de pH: 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl ve 0.1 mg/ml BSA'dan oluşan restriksiyon endonükleaz tamponu ve 10 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi PCR ürünleriyle muamele edilerek enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 16 saat inkübe edildi. Kesilen örnekler %3'lük agaroz jelde oluşan bant profillerine göre incelenmiştir. Enzimle kesim sonucunda homozigot normal örnekler (G/G) 582 ve 196, heterozigot örnekler (G/A) 582, 386, 196 ve 75, homozigot mutant örnekler ise (A/A) 386, 196 ve 75 bp uzunluğunda bantlar oluşturmaktadır (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6:** *MEFV* 2. ekzon R202Q (c. 605 G>A) gen değişiminin PvuII ile kesimi

**M:**  $\phi$ X174 DNA-HaeIII Marker

**1:** Kesilmemiş PCR ürünü (uncut)

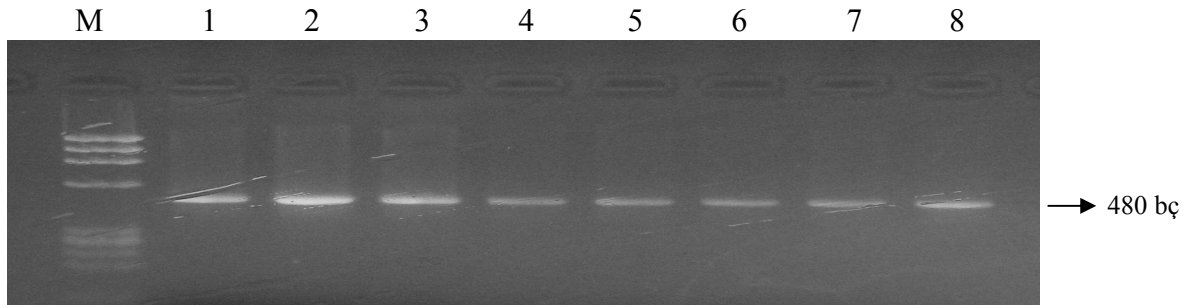
**2, 8:** Homozigot normal (G/G)

**3,6,7:** Heterozigot (G/A)

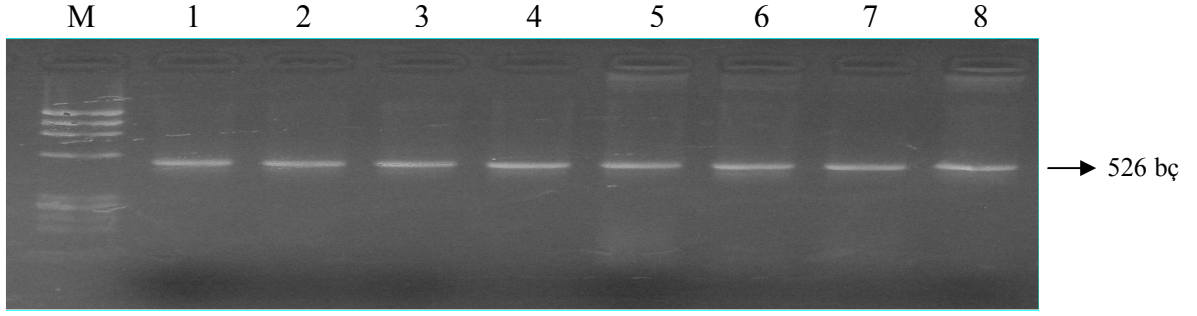
**4, 5:** Homozigot mutant (A/A)

### 2. 2. 5. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

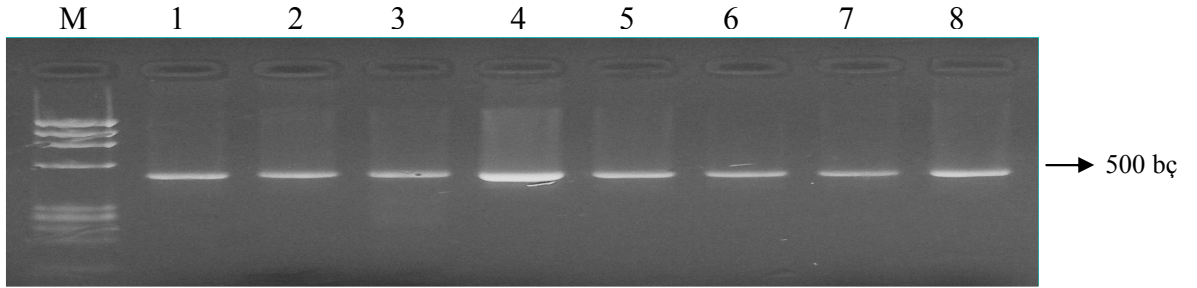
PCR ürünleri, PCR pürifikasyon kiti (Agencourt® AMPure®, ABD) kullanılarak temizlendi. 50 µl PCR ürünü, 90 µl manyetik boncuklar içeren solüsyonla homojenize olana kadar pipetle plakada karıştırılır. Bu adımda 100 bç'den uzun olan PCR ürünleri manyetik boncuklara bağlanır. 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra magnetin üzerine yerleştirilerek 10 dk bekletilir. DNA'yı bağlayan boncuklar kuyucukların etrafında halka oluşturarak bulanık olmayan temiz bir görüntü oluşur. Manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant ortamdaki uzaklaştırılır. Plaka magnetin dışına alındıktan sonra 200 µl %70'lik etanol ilave edilir ve tekrar magnetin üzerine yerleştirilerek 30 s bekletilir. Boncuklar yapışınca etanol ortamdaki uzaklaştırılır ve bu işlem bir kere daha tekrarlanır. Süpernatant pipetle uzaklaştırılarak örnekler 20 dk kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 40 µl ddH<sub>2</sub>O ile sulandırılarak homojenize bir görüntü oluşana kadar pipetle karıştırılır. Pürifiye edilen PCR ürünleri hazırlanan %1'lik agaroz jele 5'er µl yüklenerek, dizi analizi için reaksiyona ne kadar konulacağı belirlenir. Jelde 3, 5, 9-10. ekzonlarla 3'UTR pürifikasyonları görüntülendi (Şekil 2.7, 2.8, 2.9, 2.10).



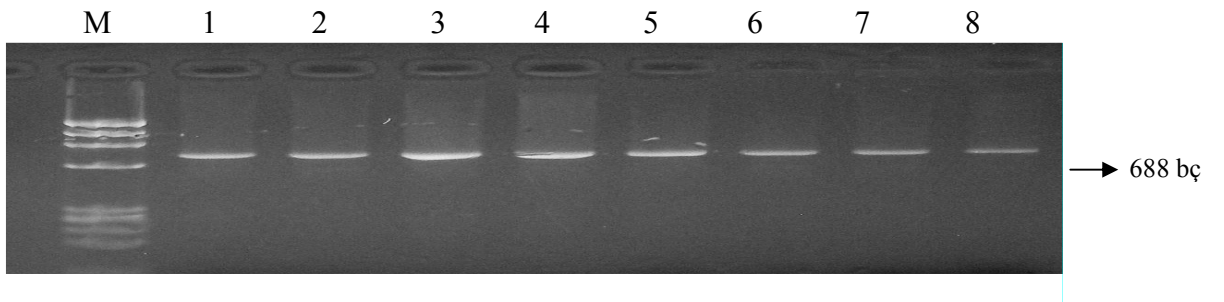
**Şekil 2.7.** 3. ekzonun pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker (ΦX174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 480 bç'lik temizlenmiş PCR ürünlerini göstermektedir.



**Şekil 2. 8.** 5. ekzonun pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 526 bp'lik temizlenmiş PCR ürünlerini göstermektedir.



**Şekil 2. 9.** Ekzon 9-10 pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 500 bp'lik temizlenmiş PCR ürünlerini göstermektedir.



**Şekil 2. 10.** 3'UTR pürifiye PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. **M:** Marker ( $\Phi$ X174 DNA-HaeIII), diğer örnekler ise (1-8) amplifiye edilen gen bölgesine ait 688 bp'lik temizlenmiş PCR ürünlerini göstermektedir.

## 2. 2. 6. DNA Dizi Analizi

*MEFV* geninin 3, 5, 9-10. ekzonlarıyla 3'UTR nükleotid dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ8000XL, Beckman Coulter, ABD) kullanılmıştır. Bunun için 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 8 µl DTCS Quick Start Master Mix, 0,5-10 µl pürifiye edilmiş PCR ürünü, 20 pmol primer konularak son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 20 µl'ye tamamlanarak "cycle sequencing", 94°C'de 5 dakika, bunu izleyen 30 siklusa 96°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) pipetlenmiştir. Örneklerin üzerine 60 µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µl eklenmiş, +4°C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek üstteki kısım dökülmüştür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenerek fazla etanol uzaklaştırılmıştır. Plak, liyofilizatör cihazına (Thermo, ABD) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında örnekler kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanmıştır. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş (CEQ8000XL, Beckman Coulter, ABD) ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçlar pikler şeklinde görüntülenmiştir.

### 3. BULGULAR

*MEFV* geninde tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının mutasyon dağılımı Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. M694V %47.5, E148Q %23.8, V726A %17.5, M680I %10.0, ve K695R %1.3 şeklinde belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** 80 FMF hastasının mutasyon dağılımı

| MUTASYON     | Hasta Sayısı: 80 |      |       |
|--------------|------------------|------|-------|
|              | n                | %    | f     |
| <b>M694V</b> | 38               | 47.5 | 0.24  |
| <b>E148Q</b> | 19               | 23.8 | 0.12  |
| <b>V726A</b> | 14               | 17.5 | 0.09  |
| <b>M680I</b> | 8                | 10.0 | 0.05  |
| <b>K694R</b> | 1                | 1.3  | 0.006 |

n: hasta sayısı, %: hastalarda görülme yüzdesi, f: hastalarda görülme frekansı

### 3. 1. *MEFV* 2. EKZON R202Q (c. 605G>A p.Arg202Gln) GEN DEĞİŞİMİ:

Çalışma kapsamında yer alan 80 FMF hastasında, *MEFV* geni 2. ekzonda bulunan R202Q (c.605G>A) gen değişiminin genotip dağılımı Çizelge 3.2’de verilmiştir.

80 FMF hastasının 40’ı GG (%50.0), 30’u GA (%37.5) ve 10’u AA (%12.5) genotipini taşımaktadır. Daha önceden belirlenen mutasyonlara göre R202Q dağılımına bakıldığında, M694V/- olan 38 hastanın 4’ü GG (%10.5), 24’ü GA (%63.2), 10’u AA (%26.3), E148Q/- olan 19 hastanın 17’si GG (%89.5), 2’si GA (%10.5), V726A/- olan 14 hastanın 11’i GG (%78.6), 3’ü GA (%21.4), M680I/- olan 8 hastanın 7’si GG (%87.5), 1’i GA (%12.5) ve K695R/- olan 1 hasta ise GG (%100.0) genotipini taşımaktadır. E148Q/-, V726A/-, M680I/- ve K695R/- mutasyonlarını taşıyanlarda AA genotipi bulunmamıştır.

**Çizelge 3.2.** 2. ekzon R202Q (c.605G>A p.Arg202Gln) gen değişiminin FMF hastalarındaki genotip dağılımı

|                           | 2. Ekzon R202Q (c.605 G>A p.Arg202Gln) |            |            |
|---------------------------|----------------------------------------|------------|------------|
|                           | GG                                     | GA         | AA         |
| <b>FMF Hastası (n:80)</b> | 40 (%50.0)                             | 30 (%37.5) | 10 (%12.5) |
| <b>M694V/- (n:38)</b>     | 4 (%10.5)                              | 24 (%63.2) | 10 (%26.3) |
| <b>E148Q/- (n:19)</b>     | 17 (%89.5)                             | 2 (%10.5)  | -          |
| <b>V726A/- (n:14)</b>     | 11 (%78.6)                             | 3 (%21.4)  | -          |
| <b>M680I/- (n:8)</b>      | 7 (%87.5)                              | 1 (%12.5)  | -          |
| <b>K695R/- (n:1)</b>      | 1 (%100.0)                             | -          | -          |

FMF veri tabanında R202Q gen değişiminin M694V mutasyonu ile *cis* konumunda bulunduğu ve birlikte kalıtıldığı bildirilmektedir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>). Ancak bizim sonuçlarımız farklı haplotiplerin de olabileceğini gösterdiğinden bu gen değişiminin M694V mutasyonu ile birlikteliğine bakılmıştır. M694V mutasyonunu homozigot olarak taşıyan 76 hasta ve

M694V/- olan hasta sayısı 83'e çıkartılarak R202Q genotip dağılımına bakılmıştır. Ayrıca 122 sağlıklı birey bu gen değişimi açısından incelenmiş ve buna ek olarak 10. ekzonları DNA dizi analizi yöntemiyle taranmıştır.

M694V mutasyonunu homozigot taşıyan 76 hastanın 71'i AA (%93.4) genotipini taşıırken, 5 hastada farklı bir haplotip ortaya çıkmakta, G allelini taşınmaktadır. M694V/- olan 83 hastanın 23'ü A allelini (%27.7), 12'si ise G allelini (%14.5) homozigot olarak taşımakta ve ikinci bir haplotip ortaya çıkmaktadır. 122 sağlıklı kontrolde ise A allelini homozigot olarak taşıyan birey bulunmazken, 81'i GG (%66.4), 41'i ise GA (%33.6) genotipini taşımaktadır. GG genotipini taşıyan 81 kontrolün 3'ü M694V için, 2'si ise M680I için heterozigot, GA genotipini taşıyan 41 kontrolün ise 5'i M694V için heterozigot bulunmuştur (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** 2. ekzon R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin M694V/M694V, M694V/- ve kontrol grubundaki genotip dağılımı

|                           | 2. Ekzon R202Q (c.605 G>A p.Arg202Gln)       |                             |            |
|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|------------|
|                           | GG                                           | GA                          | AA         |
| <b>M694V/M694V</b> (n:76) | 1 (%1.3)                                     | 4 (%5.3)                    | 71 (%93.4) |
| <b>M694V/-</b> (n:83)     | 12 (%14.5)                                   | 48 (%57.8)                  | 23 (%27.7) |
| <b>Kontrol</b> (n:122)    | 81 (%66.4)<br>(n:3 M694V/-)<br>(n:2 M680I/-) | 41 (%33.6)<br>(n:5 M694V/-) | -          |

Çalışmaya, amiloid hastaları da dahil edilerek, R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin bu gruptaki genotip dağılımına bakılmıştır. 60 FMF/amiloid birlikteliği olan hastalardan mutasyon saptanamayanların 2'sinde (%14.3) R202Q gen değişimi homozigot olarak bulunmuştur. M694V mutasyonu homozigot olan 12 hastada (%85.7) ve M694V heterozigot olan 8 hastada (%61.5) R202Q homozigot olarak saptanmıştır. Bir hastada ise M680I ve R202Q birleşik heterozigot konumundadır (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** 2. ekzon R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin FMF/Amiloid hastalarındaki genotip dağılımı

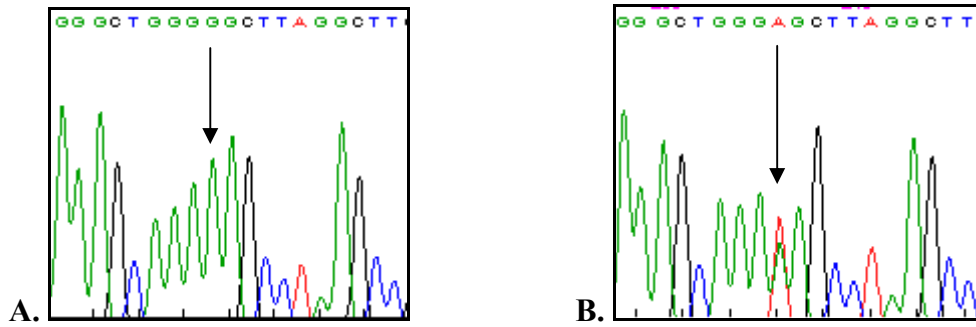
|                                       | <b>2. Ekzon R202Q (c.605 G&gt;A p.Arg202Gln)</b> |            |            |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|------------|
|                                       | <b>GG</b>                                        | <b>GA</b>  | <b>AA</b>  |
| <b>FMF + Amiloid (n:60)</b>           | 18 (%30.0)                                       | 18 (%30.0) | 24 (%40.0) |
| <b>Mutasyon saptanmayanlar (n:14)</b> | 8 (%57.1)                                        | 4 (%28.6)  | 2 (%14.3)  |
| <b>M694V/- (n:13)</b>                 | 1 (%7.7)                                         | 4 (%30.8)  | 8 (%61.5)  |
| <b>M680I/- (n:2)</b>                  | 1 (%50.0)                                        | 1 (%50.0)  | -          |
| <b>V726A/- (n:2)</b>                  | 2 (%100.0)                                       | -          | -          |
| <b>M694I/- (n:1)</b>                  | 1 (%100.0)                                       | -          | -          |
| <b>M694V/M694V (n:14)</b>             | 1 (%7.1)                                         | 1 (%7.1)   | 12 (%85.7) |
| <b>M680I/M694V (n:4)</b>              | -                                                | 3 (%75.0)  | 1 (%25.0)  |
| <b>M680I/M680I (n:3)</b>              | 3 (%100.0)                                       | -          | -          |
| <b>M694V/V726A (n:2)</b>              | -                                                | 1 (%50.0)  | 1 (%50.0)  |
| <b>M680I/V726A (n:1)</b>              | 1 (%100.0)                                       | -          | -          |
| <b>(G/A) M680I/M694V (n:1)</b>        | -                                                | 1 (%100.0) | -          |
| <b>M694V/K694R (n:1)</b>              | -                                                | 1 (%100.0) | -          |
| <b>M680I/E148Q (n:1)</b>              | -                                                | 1 (%100.0) | -          |
| <b>M694V/E148Q (n:1)</b>              | -                                                | 1 (%100.0) | -          |

Çalışma kapsamında ayrıca P706P/- olan 4 FMF ve 1 pseudoxantoma elasticum (PXE)'li hasta R202Q için incelenmiştir. E148Q/- olan 2 hastada ve 10. ekzondaki mutasyonlar ve E148Q için normal olan 1 hastada R202Q GG genotipinde bulunurken, yine 10. ekzondaki mutasyonlar ve E148Q için normal olan 1 hastada ise GA genotipinde olduğu saptanmıştır. FMF mutasyonları açısından normal olan PXE'li hastada R202Q'nun GG genotipi tespit edilmiştir.

### 3. 2. *MEFV* 3. EKZON:

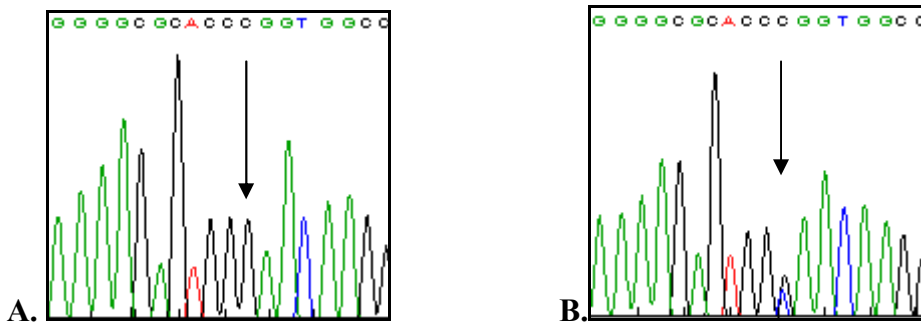
3. ekzonun DNA dizi analizi sonucunda, P369S mutasyonu ile birlikte R408Q ve R314R gen değişimleri saptanmıştır. Daha önce tanımlanmış olan diğer mutasyonlar gözlenmemiştir.

Kodon 369’da meydana gelen C>T mutasyonu diziyi CCC→TCC şeklinde değiştirmiş ve Prolin → Serin aminoasit değişimi meydana gelmiştir (Şekil 3.1). Bu yanlış anlamlı mutasyon 2 hastada heterozigot olarak bulunmuştur.



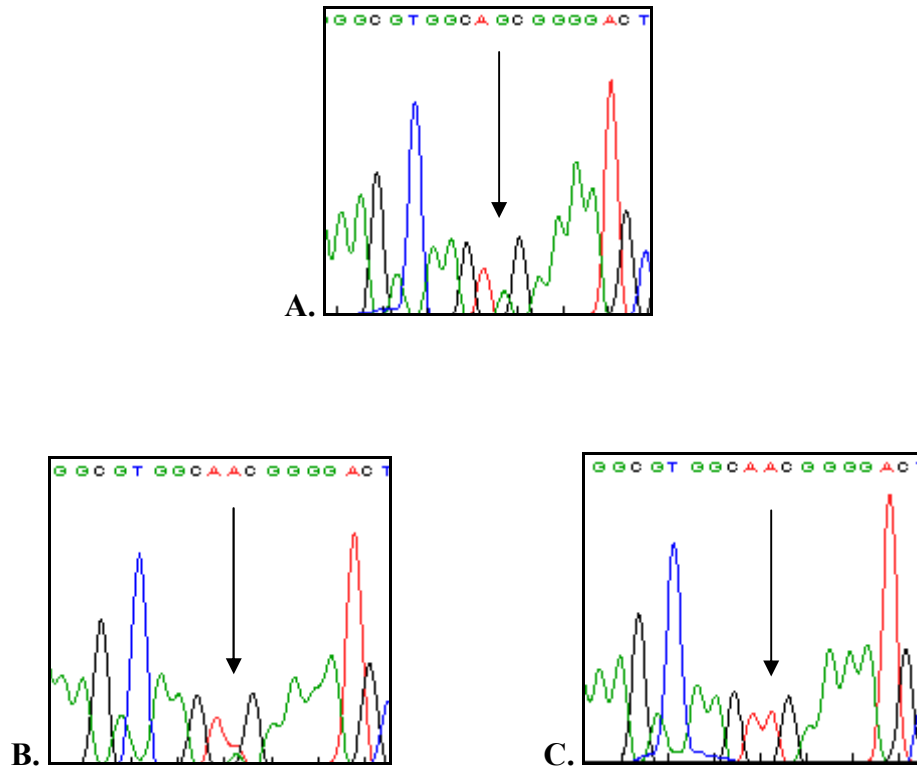
**Şekil 3.1.** A. 369. kodon homozigot normal B. 1105. nükleotidde heterozigot C>T değişimi (Reverse dizi)

408. kodonda, 1223. nükleotidde G>A değişimi ile Arjinin → Glisin aminoasit değişikliği meydana gelmektedir (Şekil 3.2). 1 hastada R408Q gen değişimi heterozigot olarak saptanmıştır.



**Şekil 3.2.** A. 408. kodon homozigot normal B. 1223. nükleotidde heterozigot G>A değişimi (Reverse dizi)

314. kodon dizisi, 942. nükleotidde C>T değişimi sonucu CGC→CGT'ye dönüşmekte, aminoasit değişikliği meydana getirmemektedir (Şekil 3.3). Hastalardaki R314R polimorfizm dağılımına bakıldığında 18'sinde homozigot normal, 44'ünde heterozigot, 18'sinde ise homozigot mutant olarak saptanmıştır (Çizelge 3.6).



**Şekil 3.3.** A. 314. kodon homozigot normal B. 942. nükleotidde heterozigot C>T değişimi C. 942. nükleotidde homozigot C>T değişimi (Reverse dizi)

**Çizelge 3.6.** 3. ekzon R314R (c.942 C>T p.Arg314Arg) gen değişiminin FMF hastalarındaki genotip dağılımı

| <b>3. Ekzon R314R<br/>(c.942 C&gt;T p.Arg314Arg)</b> | <b>FMF Hastası (n:80)</b> | <b>%</b> |
|------------------------------------------------------|---------------------------|----------|
| <b>CC</b>                                            | 18                        | (%22.5)  |
| <b>CT</b>                                            | 44                        | (%55.0)  |
| <b>TT</b>                                            | 18                        | (%22.5)  |

P369S mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan 2 hastada da R314R, 1'inde ise ayrıca R408Q polimorfizmleri bulunmaktadır. Aynı zamanda 2 hastanın mutasyon dağılımına bakıldığında E148Q için heterozigot olduğu görülmüştür (Çizelge 3.7).

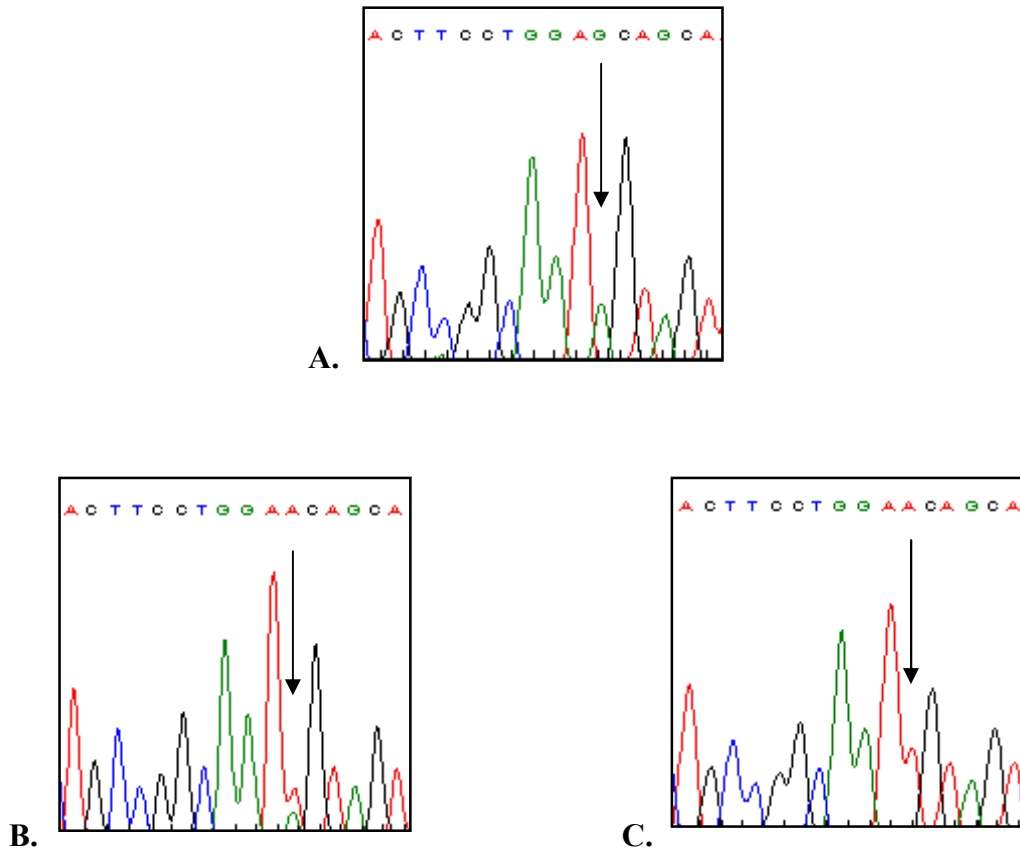
**Çizelge 3.7.** 3. ekzonda yer alan P369S mutasyonunun 2 FMF hastasındaki sıralanımı

| <b>10. Ekzon</b> | <b>2. Ekzon<br/>E148Q</b> | <b>2. Ekzon<br/>R202Q</b> | <b>3. Ekzon</b>   |
|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| N                | GC                        | GG                        | R314R/P369S/R408Q |
| N                | GC                        | GG                        | R314R/P369S       |

### 3. 3. *MEFV* 5. EKZON:

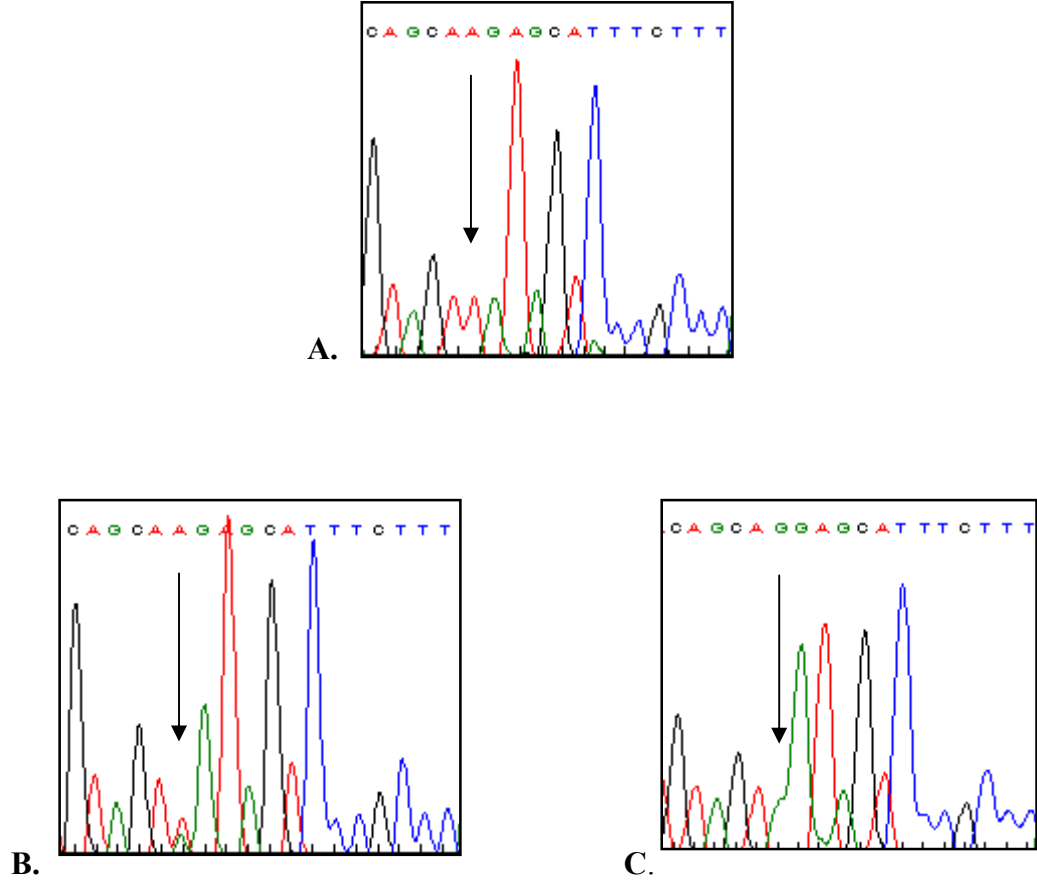
*MEFV* geni 5. ekzonda DNA dizi analizi ile E474E, Q476Q, D510D ve R501R polimorfizmleri dışında daha önce tanımlanmış mutasyonlar saptanmamıştır.

Nükleotid 1422G>A değişimi sonucu 474. kodon dizisi GAG'den GAA şekline dönüşmüştür (Şekil 3.4). Bu polimorfizm 44 hastada heterozigot, 17 hastada ise homozigot mutant olarak saptanmıştır (Çizelge 3.8).



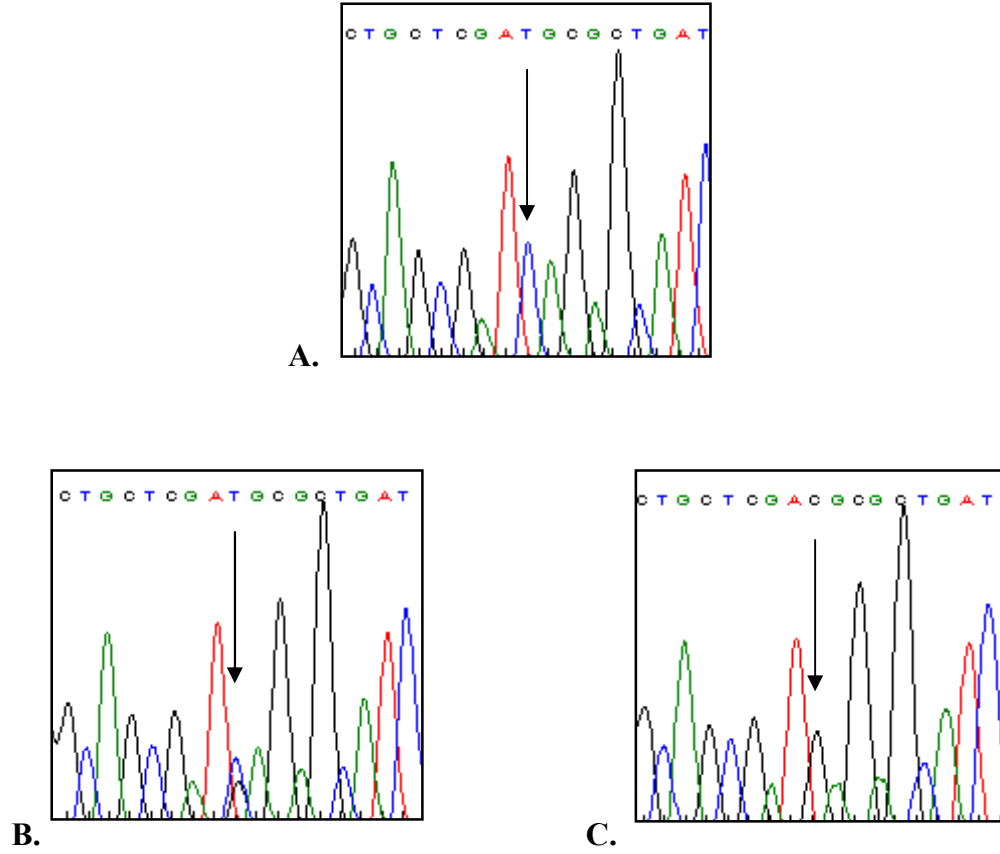
**Şekil 3.4.** A. 474. kodon homozigot normal B. Nükleotid heterozigot 1422G>A değişimi C. Nükleotid homozigot 1422G>A değişimi

476. kodonda, 1428. nükleotidde A>G değişimi ile dizi CAA'dan CAG şeklinde değişmektedir (Şekil 3.5). Bu polimorfizm 44 hastada heterozigot, 17 hastada ise homozigot mutant olarak saptanmıştır (Çizelge 3.8).



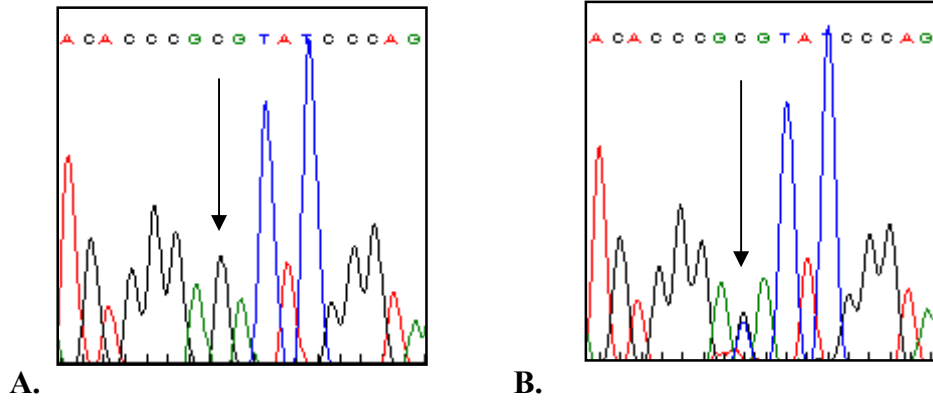
**Şekil 3.5.** A. 476. kodon homozigot normal B. Heterozigot 1428A>G değişimi C. Homozigot 1428A>G değişimi

1530. nükleotidde meydana gelen T>C polimorfizmi 510. kodon dizisini GAT→GAC şeklinde değiştirmektedir (Şekil 3.6). Bu polimorfizm, 44 hastada heterozigot, 17 hastada ise homozigot mutant olarak saptanmıştır (Çizelge 3.8).



**Şekil 3.6.** A. 510. kodon homozigot normal B. Heterozigot 1530T>C değişimi C. Homozigot 1530T>C değişimi

1503. nükleotiddeki C>T değişimi 501. kodon dizisini GCG→GTG şeklinde değiştirmektedir. Bu polimorfizm sadece 1 hastada (%1.3) heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7. A.** 501. kodon homozigot normal **B.** Nükleotid heterozigot 1503C>T değişimi

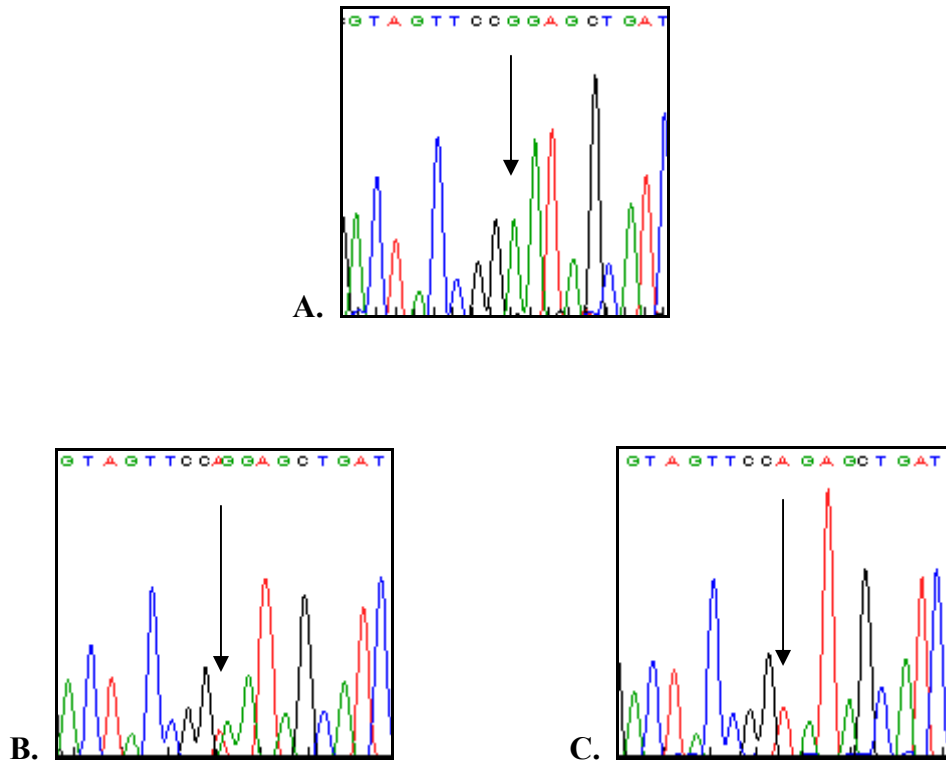
**Çizelge 3.8.** 5. ekzonda yer alan E474E (1422GA), Q476Q (1428AG) ve D510D (1530TC) polimorfizmlerinin FMF hastalarındaki dağılımı

| 5. Ekzon             | FMF Hastası (n:80) | %       |
|----------------------|--------------------|---------|
| 1422GG/1428AA/1530CC | 19                 | (%23.8) |
| 1422GA/1428AG/1530CT | 44                 | (%55.0) |
| 1422AA/1428GG/1530TT | 17                 | (%21.3) |

### 3. 4. *MEFV* 9. EKZON:

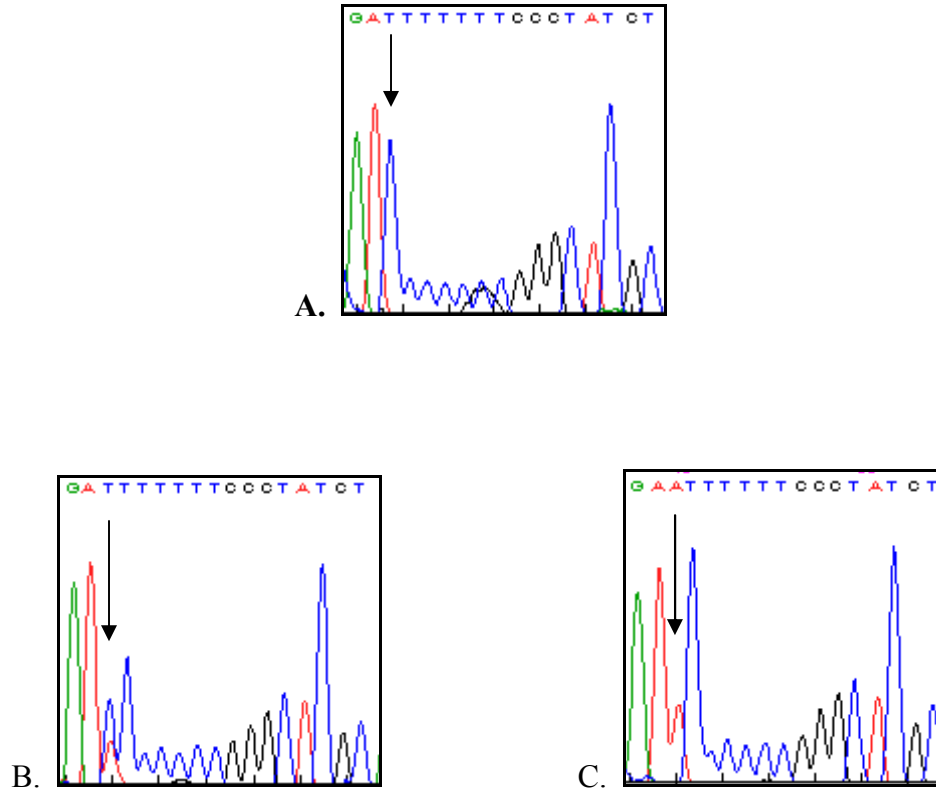
Ekzon 9'un DNA dizi analizi sonucunda, 9. ekzonda P588P, intron 8'de c.1760-30 T>A ve intron 9'da c.1792+39 G>A gen değişimleri saptanmıştır.

9. ekzon 588. kodonda, 1764. nükleotidde G>A değişimi ile dizi CCG'den CCA şeklinde değişmektedir (Şekil 3.8). Bu polimorfizm 45 hastada heterozigot, 16 hastada ise homozigot mutant olarak saptanmıştır.



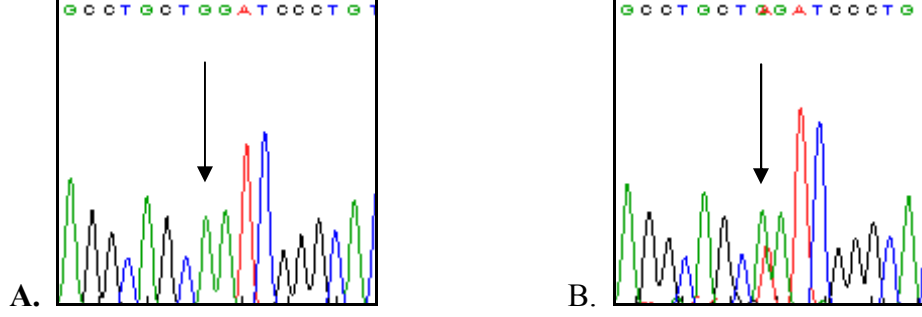
**Şekil 3.8.** A. 588. kodon homozigot normal B. Heterozigot 1764 G>A değişimi C. Homozigot 1764 G>A değişimi

İntron 8’de nükleotid 1760-30’da T>A değişimi (Şekil 3.9) 45 hastada heterozigot, 16 hastada ise homozigot mutant olarak saptanmıştır.



**Şekil 3.9.** A. İntron 8 c.1760-30T>A homozigot normal B. Heterozigot c.1760-30T>A değişimi C. Homozigot c.1760-30T>A değişimi

İntron 9'da nükleotid 1792+39'da G>A değişimi 1 (%1.3) hastada heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** A. İntron 9 c.1792+39G>A homozigot normal B. Heterozigot c.1792+39G>A değişimi

9. ekzonda yer alan P588P polimorfizmi ile intron 8'deki c.1760-30 T>A değişimi birlikte kalıtım göstermektedir. İki gen değişiminin hastalardaki dağılımı Çizelge 3.9'da gösterilmektedir.

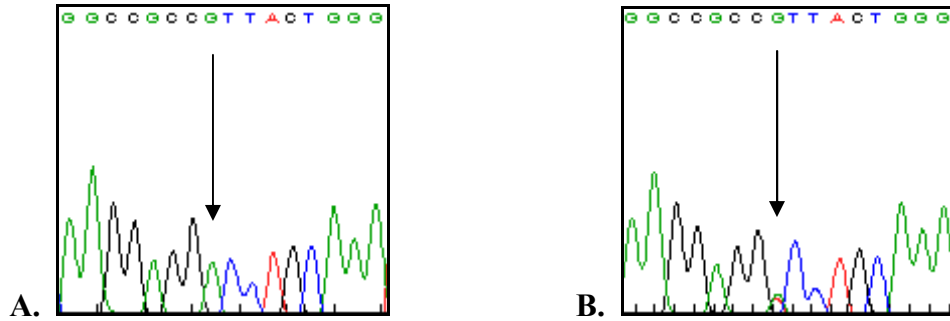
**Çizelge 3.9.** 9. ekzonda yer alan P588P (c.1764G>A p.Pro588Pro) polimorfizmi ile intron 8'de yer alan c.1760-30 T>A gen değişiminin FMF hastalarındaki dağılımı

| 9. Ekzon P588P<br>(c.1764G>A p.Pro588Pro) | İntron 8<br>c.1760-30 T>A | FMF Hastası (n:80) | %       |
|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| GG                                        | TT                        | 19                 | (%23.8) |
| GA                                        | TA                        | 45                 | (%56.3) |
| AA                                        | AA                        | 16                 | (%20.0) |

### 3. 5. *MEFV* 10. EKZON:

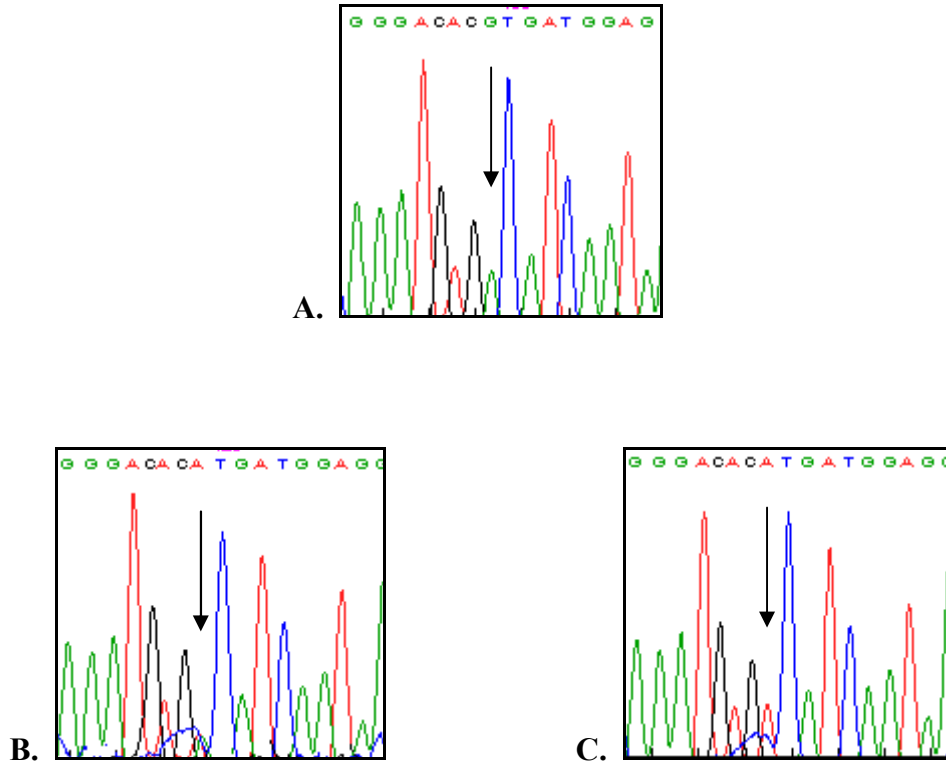
10. ekzonda DNA dizi analizi sonucunda, R653H ve R761H gen değişimleri saptanmıştır.

10. ekzon kodon 653’de meydana gelen G>A mutasyonu diziyi CGT→CAT şeklinde değiştirmiş ve Arjinin → Histidin aminoasit değişimi meydana gelmiştir (Şekil 3.11). Bu yanlış anlamlı mutasyon 1 hastada heterozigot olarak bulunmuştur (Çizelge 3.10).



**Şekil 3.11.** A. 653. kodon homozigot normal B. 1958. nükleotidde heterozigot G>A değişimi

10. ekzon kodon 761’de meydana gelen G>A mutasyonu diziye CGT→CAT şeklinde değiştirmiş ve Arjinin → Histidin aminoasit değişimi meydana gelmiştir (Şekil 3.12). Bu yanlış anlamlı mutasyon 1 hastada heterozigot, 1 hastada ise homozigot mutant olarak bulunmuştur (Çizelge 3.10).



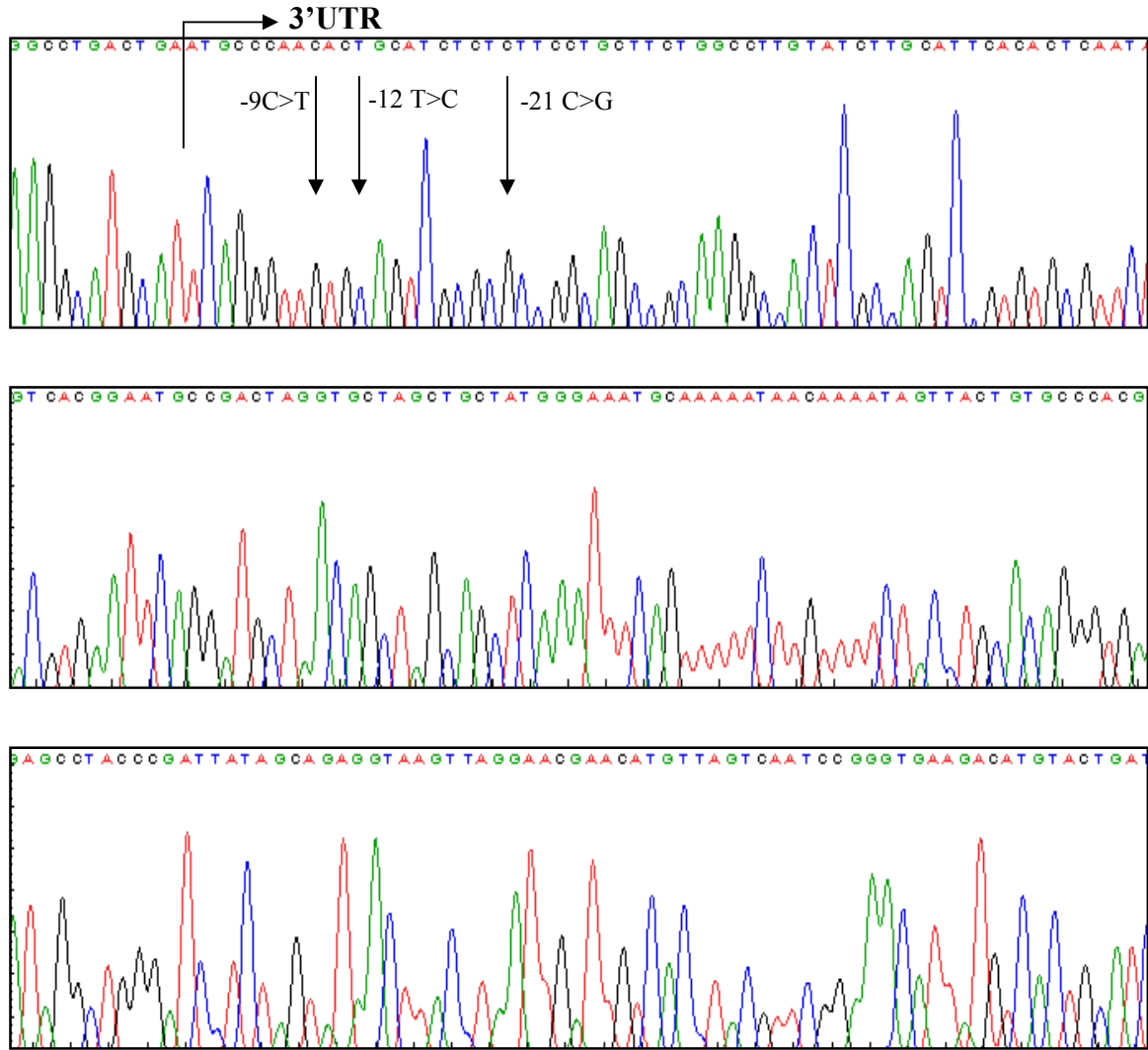
**Şekil 3.12.** A. 761. kodon homozigot normal B. 2282. nükleotidde heterozigot G>A değişimi C. Homozigot mutant 2282G>A değişimi

**Çizelge 3.10.** 10. ekzonda yer alan R653H ve R761H mutasyonlarının FMF hastalarındaki dağılımı

| 10. Ekzon | FMF Hastası (n:80) | %      |
|-----------|--------------------|--------|
| R653H     | 1                  | (%1.3) |
| R761H     | 2                  | (%2.5) |

### 3. 6. *MEFV* 3'UTR:

3'UTR DNA dizi analizi sonucunda, taranan bölgede herhangi bir gen değişimi saptanmamıştır. Dizinin bir bölümü Şekil 3.13'de gösterilmektedir. FMF veri tabanında, 3'UTR'da tanımlanmış -9 C>T, -12 T>C ve -21 C>G gen değişimleri de dizi üzerinde gösterilmektedir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>).



**Şekil 3.13.** 3'UTR normal dizisi. 3'UTR başlangıç ve tanımlanmış -9 C>T, -12 T>C, -21 C>G gen değişimlerinin yeri

Tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının diğer ekzon incelemeleri sonucunda, 2. ekzonda R202Q, 3. ekzonda P369S mutasyonu ile birlikte R314R ve R408Q gen değişimleri, 5. ekzonda E474E, Q476Q, D510D ve R501R gen değişimleri, 9. ekzonda P588P, 10. ekzonda ise R653H ve R761H mutasyonları saptanmıştır. Bu gen değişimlerinin allellerdeki dağılımları Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Buna göre, 2. ekzonda yer alan R202Q allellerin %31.3’ünde, 3. ekzonda yer alan P369S %1.3’ünde, 10. ekzonda yer alan R653H ve R761H mutasyonları ise sırayla allellerin %1 ve %3’ünde bulunmuştur. Allellerin %46.3’ünde ise mutasyon saptanamamıştır.

**Çizelge 3.11.** Tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının 2. ekzondaki R202Q, ekzon 3, 5, 9 ve 10’da saptanan gen değişimlerinin allellere göre dağılımı

| AMİNOASİT DEĞİŞİMİ              | NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ | ALLEL SAYISI<br>n:160 | %    |
|---------------------------------|--------------------|-----------------------|------|
| R202Q                           | 605G>A             | 50                    | 31.3 |
| R314R*                          | 942C>T             | 79                    | 49.4 |
| P369S                           | 1089C>T            | 2                     | 1.3  |
| R408Q*                          | 1223G>A            | 1                     | 0.6  |
| E474E*                          | 1422G>A            | 78                    | 48.8 |
| Q476Q*                          | 1428A>G            | 78                    | 48.8 |
| R501R*                          | 1503C>T            | 1                     | 0.6  |
| D510D*                          | 1530T>C            | 78                    | 48.8 |
| P588P*                          | 1764G>A            | 77                    | 48.1 |
| R653H                           | 1958G>A            | 1                     | 0.6  |
| R761H                           | 2282G>A            | 3                     | 1.9  |
| <b>Mutasyon Saptanamayanlar</b> |                    | 74                    | 46.3 |

\* Polimorfizm olarak bildirilenler

Tek kromozomunda mutasyon taşıyan hastalarda, saptanan diğer mutasyonlarla birlikteliklerine bakıldığında, M694V/R202Q 23 hastada (%28.8), M694V/R202Q/R202Q 10 hastada (%12.5), E148Q/P369S 2 hastada (%2.5), V726A/R202Q/R653H 1 hastada (%1.3), M694V/R202Q/R761H 1 hastada (%1.3) ve E148Q/R761H/R761H yine 1 hastada (%1.3) bulunmuştur. Böylece birleşik heterozigotlukların tespiti yapılmış olmaktadır. Diğer kromozomlarında mutasyon saptanamayan 37 hasta (%46.3) bulunmaktadır (Çizelge 3.12).

**Çizelge 3.12.** Tek kromozomunda mutasyon taşıyan 80 FMF hastasının mutasyon dağılımları

| MUTASYON                 | Hasta Sayısı: 80 |      |
|--------------------------|------------------|------|
|                          | n                | %    |
| M694V/R202Q              | 23               | 28.8 |
| M694V/R202Q/R202Q        | 10               | 12.5 |
| M680I/R202Q              | 1                | 1.3  |
| V726A/R202Q              | 2                | 2.5  |
| E148Q/R202Q              | 2                | 2.5  |
| E148Q/P369S              | 2                | 2.5  |
| V726A/R202Q/R653H        | 1                | 1.3  |
| M694V/R202Q/R761H        | 1                | 1.3  |
| E148Q/R761H/R761H        | 1                | 1.3  |
| Mutasyon Saptanamayanlar | 37               | 46.3 |

80 FMF hastasının mutasyon sonuçları Çizelge 3.13’de verilmiştir.

**Çizelge 3.13.** 80 hastanın 2. ekzondaki R202Q, 3. ekzon, 5. ekzon, 9. ekzon, 10. ekzon ve 3'UTR sonuçları

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON |                    | 5. EKZON |        |        |        | 3. EKZON                 | 9. EKZON            | 10. EKZON          | 3' UTR |
|----|-----------|-----------|----------|--------------------|----------|--------|--------|--------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------|
|    |           |           | E148Q    | R202Q              | 1422GA   | 1428AG | 1530TC | 1503CT |                          | P588P / 1760-30 T>A |                    |        |
| 1  | C. Ç      | N         | E148Q/-  | -/-                | GG       | AA     | TT     | CC     | N                        | (+/-) / (+/+)       | N                  | N      |
| 2  | H. S. Ş   | V726A/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | TC     | CC     | R313R/-                  | N                   | N                  | N      |
| 3  | B. D      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 4  | U. D      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 5  | Z. K      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N                        | (+/-) / (+/+)       | N                  | N      |
| 6  | T. D      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 7  | O. B. D   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 8  | S. Ç      | M680I/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 9  | H. B. A   | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | <b>R761H/R761H</b> | N      |
| 10 | E. A      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GG       | AA     | TT     | CC     | N                        | (+/-) / (+/+)       | N                  | N      |
| 11 | O. G      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 12 | H. S.     | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 13 | E. E      | N         | E148Q/-  | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 14 | M. Ç      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N                        | (+/-) / (+/+)       | N                  | N      |
| 15 | B. Y      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 16 | S. Y      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | <b>R313R/P369S/R408Q</b> | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 17 | H. Ç      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 18 | N. E. U   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N                        | (+/-) / (+/+)       | N                  | N      |
| 19 | M. Ö      | M694V/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |
| 20 | M. G. K   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-                  | (+/-) / (+/-)       | N                  | N      |

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON |                    | 5. EKZON |        |        |        | 3. EKZON    | 9. EKZON                 | 10. EKZON      | 3' UTR |
|----|-----------|-----------|----------|--------------------|----------|--------|--------|--------|-------------|--------------------------|----------------|--------|
|    |           |           | E148Q    | R202Q              | 1422GA   | 1428AG | 1530TC | 1503CT |             | P588P / 1760-30 T>A      |                |        |
| 21 | F. Ç      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)        | N              | N      |
| 22 | M. Y      | V726A/-   | N        | - / -              | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 23 | M. K      | N         | E148Q/-  | <b>R202Q/-</b>     | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                        | N              | N      |
| 24 | E. Ç      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 25 | R. C      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 26 | M. Ş      | N         | E148Q/-  | - / -              | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 27 | N. A      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)        | N              | N      |
| 28 | S. B      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 29 | E. F. E   | V726A/-   | N        | - / -              | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/-     | N                        | N              | N      |
| 30 | E. B      | V726A/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                        | N              | N      |
| 31 | H. A      | V726A/-   | N        | - / -              | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                        | N              | N      |
| 32 | F. K      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)        | <b>R761H/-</b> | N      |
| 33 | H. Ö      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 34 | M. B      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 35 | M. Ş      | N         | E148Q/-  | - / -              | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                        | N              | N      |
| 36 | L. Ç      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)        | N              | N      |
| 37 | Ö. F. A   | M680I/-   | N        | - / -              | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | <b>intron9 1792+39GA</b> | N              | N      |
| 38 | R. B. Y   | N         | E148Q/-  | - / -              | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |
| 39 | K. K      | M694V/-   | N        | - / -              | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                        | N              | N      |
| 40 | S. İ      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+ / -) / (+ / -)        | N              | N      |

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON |                    | 5. EKZON |        |        |        | 3. EKZON    | 9. EKZON            | 10. EKZON | 3' UTR |
|----|-----------|-----------|----------|--------------------|----------|--------|--------|--------|-------------|---------------------|-----------|--------|
|    |           |           | E148Q    | R202Q              | 1422GA   | 1428AG | 1530TC | 1503CT |             | P588P / 1760-30 T>A |           |        |
| 41 | E. A      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 42 | F. D      | V726A/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 43 | C. Y      | V726A/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 44 | Y. M      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)   | N         | N      |
| 45 | B. K      | M680I/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 46 | G. K      | M680I/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 47 | A. A. Y   | V726A/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 48 | B. U      | M680I/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 49 | N. Y      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 50 | S. T      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/R314R | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 51 | H. K. K   | V726A/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 52 | M. B. K   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 53 | H. T      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 54 | M. U      | M680I/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/R314R | N                   | N         | N      |
| 55 | S. R. S   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)   | N         | N      |
| 56 | O. K      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 57 | B. S. K   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GG       | AA     | TT     | CC     | N           | (+ / +) / (+ / +)   | N         | N      |
| 58 | E. Y      | M694V/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 59 | B. D      | V726A/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 60 | B. Ç      | N         | E148Q/-  | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |
| 61 | Ç. A      | M680I/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC     | R313R/-     | (+/-) / (+/-)       | N         | N      |

| NO | HASTA ADI | 10. EKZON | 2. EKZON |                    | 5. EKZON |        |        |           | 3. EKZON           | 9. EKZON            | 10. EKZON      | 3' UTR |
|----|-----------|-----------|----------|--------------------|----------|--------|--------|-----------|--------------------|---------------------|----------------|--------|
|    |           |           | E148Q    | R202Q              | 1422GA   | 1428AG | 1530TC | 1503CT    |                    | P588P / 1760-30 T>A |                |        |
| 62 | O. S      | V726A/-   | N        | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC        | R313R/R314R        | N                   | N              | N      |
| 63 | S. S      | K695R/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 64 | D. K      | N         | E148Q/-  | -/-                | AA       | GG     | CC     | CC        | R313R/R314R        | N                   | N              | N      |
| 65 | B. V      | M694V/-   | N        | -/-                | GG       | AA     | TT     | CC        | N                  | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 66 | A. Ç. K   | M680I/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 67 | M. Ç      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 68 | E. K      | N         | E148Q/-  | -/-                | GG       | AA     | TT     | CC        | <b>314CT/P369S</b> | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 69 | M. N. T   | V726A/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 70 | Z. P. B   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GG       | AA     | TT     | <b>CT</b> | N                  | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 71 | V. M      | N         | E148Q/-  | -/-                | GG       | AA     | TT     | CC        | N                  | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 72 | S. K      | V726A/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | <b>R653H/-</b> | N      |
| 73 | M. G. Ç   | M694V/-   | N        | <b>R202Q/R202Q</b> | GA       | AG     | TC     | CC        | N                  | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 74 | M. B. Y   | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 75 | E. Y      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 76 | N. Ö      | V726A/-   | N        | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 77 | S. G      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 78 | E. A      | N         | E148Q/-  | -/-                | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/R314R        | (+/-) / (+/-)       | N              | N      |
| 79 | F. S      | N         | E148Q/-  | -/-                | GG       | AA     | TT     | CC        | R313R/-            | (+ / +) / (+ / +)   | N              | N      |
| 80 | A. E      | M694V/-   | N        | <b>R202Q/-</b>     | GA       | AG     | TC     | CC        | R313R/-            | N                   | N              | N      |

#### 4. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz ateşi (FMF), ateş ve seröz zarların inflamasyonu ile karakterize, daha çok Yahudiler, Araplar, Türkler ve Ermeniler başta olmak üzere Akdeniz kökenli toplumları etkileyen, otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. 1992 yılında FMF'den sorumlu gen, *MEFV*, 16. kromozomun kısa kolunda haritalandıktan sonra (Pras vd 1992), 1997'de Uluslararası FMF Konsorsiyumu ve Fransız FMF Konsorsiyumu tarafından birbirinden bağımsız olarak klonlanmış ve öncelikli olarak yanlış anlamalı üç mutasyon, M694V, V726A ve M680I tanımlanmıştır. Bu mutasyonları takiben 1998'de 2. ekzonda (E148Q, E167D ve T267I) (Bernot vd 1998, Samuels vd 1998), 5. ekzonda (F479L) (Bernot vd 1998) ve 10. ekzonda (M694I, K695R, A744S, R761H, T681I, I692del ve M694del) (The French FMF Consortium 1997, The International FMF Consortium 1997, Bernot vd 1998, Booth vd 1998, Samuels vd 1998) yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. Günümüze kadar 180 gen değişimi FMF veri tabanında sunulmaktadır (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>).

Akar vd (2000), Türk FMF hastalarıyla yaptıkları çalışmada, Askenazi olmayan Yahudilerde yaygın görülen M694V mutasyonunun, allellerin %43.5'inde, daha çok Ermenilerde görülen M680I mutasyonunun allellerin %12'sinde, Askenazi, Irak ve Fas Yahudilerinde yaygın görülen V726A mutasyonunun ise allellerin %11.1'inde görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca M694I, K695R ve R761H gibi mutasyonların nadir olduğu ve homozigotluklarının saptanmadığı da belirtilmiştir. Bizim çalışma grubumuzda ise M694V, E148Q, V726A, M680I ve K695R mutasyonları sırasıyla 38 (%47.5), 19 (%23.8), 14 (%17.5), 8 (%10.0), ve 1 (%1.3) hastada heterozigot olarak bulunmaktadır.

*MEFV* geni 2. ekzonda yer alan R202Q gen değişimi ilk olarak Bernot vd (1998) tarafından tanımlanmıştır. Sağlıklı kontrol kromozomlarında %20, FMF'li ailelerde mutasyon taşımayan kromozomlarda %15 ve 10. ekzon haricinde mutasyon bulunan kromozomlarda %16 olarak bildirilmiş ve bundan yola çıkılarak R202Q'nun yaygın görülen bir polimorfizm olabileceği ileri sürülmüştür.

FMF veri tabanında ise R202Q (c. 605G>A) gen değişiminin M694V mutasyonu ile birlikte kalıtılan yaygın bir polimorfizm olduğu belirtilmektedir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>).

Yirmi altı Yunan FMF hastası ile yapılan bir çalışmada, R202Q homozigotluğu 4 hastada gösterilmiş ancak 60 sağlıklı kontrolde saptanmamış ve iki grup arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir fark gözlenmiştir. R202Q gen değişiminin polimorfizmden daha çok mutasyon olabileceği ve kontrollerdeki heterozigotluktan da yola çıkılarak, homozigot FMF hastalarında doza bağlı bir etki oluşabileceği bildirilmiştir (Ritis vd 2004). Yine aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada, R202Q'yu homozigot olarak taşıyan 14 FMF hastasından 12'sinde başka bir mutasyon bulunmadığı ve 8'inin kolşisin tedavisine cevap verdiği gösterilmiştir. Sonuç olarak da, R202Q homozigotluğunun hastalıkla ilişkili olduğu ifade edilmiş ancak M694V mutasyonu ile ilişkisinden bahsedilmemiştir (Giaglis vd 2007).

Miyoshi ve arkadaşları tarafından, Tel-Hashomer kriterlerine göre FMF tanısı almış, mutasyon analizinde 2. ekzonda E148Q/R202Q birleşik heterozigotluğu olan, ancak 10. ekzonda mutasyon taşımayan bir vak'adan yola çıkarak, bu heterozigotluğun hastalıktan sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Miyoshi vd 2008).

Yamaguchi ve arkadaşları ise, 170 sağlıklı kontrol n 163'ünde R202Q heterozigotluğunu gösterirken, homozigotluğu saptanmamıştır (Yamaguchi vd 2008).

FMF hastaları ile yapmış olduğumuz çalışmada, M694V mutasyonu ile birlikte kalıtım göstermeyen, birden fazla haplotipin olduğu grlmştir. Bu da R202Q'nun en azından bazı FMF hastalarında hastalıkla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Amiloidli 2 olguda R202Q'nun homozigot olarak saptamış olmamız da bu hipotezi desteklemektedir. Buna ilaveten kontrol grubunda, homozigot R202Q'nun beklenen değeri %3 olarak hesaplanmıştır. Ancak ilginçtir ki, kontrol grubumuzda R202Q homozigotluğu bulunamamıştır. Ayrıca 4 aylıkken klinik bulgular ile FMF n tanısı olan bir hastanın mutasyon taramasında M694V heterozigotluğuyla birlikte R202Q'nun homozigotluğu birleşik olarak saptanmıştır. Dikkat edilmesi gereken nokta şudur ki, kontrol grubumuzda R202Q'nun sıklığı yüksektir. Bu da heterozigotluk durumunda etkisinin olmadığını göstermektedir. Buna rağmen, hastalıkla ilişkili bir mutasyonla beraberliği durumunda hastalıkla ilgili klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Bu da tanı için R202Q gen değişiminin

önemli olduğunu vurgulamaktadır (Öztürk vd 2008). Konu ile ilgili yayınlamış olduğumuz “Is *MEFV* Gene Arg202Gln (605G>A) A Disease-Causing Mutation?” adlı makale ekte de sunulmaktadır.

Bunlara ek olarak, Touitou vd (2000)’nin Behçet hastalarında P706 gen değişimi ile ilgili yaptıkları çalışmayı destekler nitelikte, Akar ve arkadaşları tarafından, Türk FMF hastalarında 0.27 frekansında görüldüğünü saptadıkları bu gen değişiminin, *MEFV* geninin kritik bölgesinde yer aldığı için inflamasyonda etkili olabileceğini ileri sürdükleri çalışmalar da bulunmaktadır (Akar vd 2006). Akar vd (2006) ayrıca FMF/amiloid ve PXE’li bir hastada M694I mutasyonunun gösterilmesinden (Cattan vd 2002) yola çıkarak PXE’li bir hasta *MEFV* gen mutasyonları açısından taranmış ve P706 heterozigot olarak saptanmıştır. P706’nın inflamasyondaki muhtemel rolünün tartışılması gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, P706 heterozigot olan 4 FMF’li hasta R202Q gen değişimi açısından incelendiğinde bir hastada P706 ve R202Q için birleşik heterozigot olduğu saptanmıştır. P706/- olan PXE’li hastayı R202Q açısından incelediğimizde ise birleşik heterozigotluk bulunamamıştır.

Aksentijevich vd (1999) tarafından, 2. ekzonda E148Q ve 3. ekzonda P369S gibi nadir görülen mutasyonların Avrupa’dan göç ile Askenazi Yahudileri tarafından kalıtılabileceği ileri sürülmüş ve ilk olarak E148Q/P369S birlikteliği saptanmış, ancak semptomsuz bireylerde E148Q ve P369S homozigotluklarının tespiti, Askenazi toplumunda bu mutasyonların hastalık üzerine tam olarak etkili olmadıklarını göstermiştir.

E148Q gen değişiminin klinik üzerine etkileri tartışmalıdır. İlk olarak Bernot vd (1998) tarafından farklı orijinli FMF hastalarında E148Q gen değişimi, 10. ekzonda mutasyon bulunmayan kromozomların %24’ünde, sağlıklı kontrol kromozomlarının ise %2.3’ünde saptanmış ve hastalığa yol açan bir mutasyon olduğu, Aksentijevich vd (1999) tarafından da, E148Q’nun düşük penetraslı, ılımlı bir mutasyon olduğu bildirilmiştir. E148Q allel frekansı sağlıklı bireylerde ve hastalarda benzer oranlarda bulunmasına rağmen (Ben-Chetrit vd 2000, Stoffman vd 2000), birleşik heterozigotluk durumlarında fenotipik etkileri ortaya çıkan fonksiyonel bir polimorfizm olduğu ileri sürülmektedir (Ben-Chetrit vd 2000). E148Q, Türk FMF hastalarının %3.5’inde, sağlıklı toplumun ise %12’sinde saptanmış ve bu mutasyonun düşük bir penetransa sahip olduğu bildirilmiştir (Yılmaz vd 2001). Akar ve arkadaşlarının FMF/amiloid hastalarıyla yaptıkları bir çalışmada ise E148Q mutasyonunu

taşıyan amiloidli olgular bildirilmiş ve hastalıkla ilişkili bir mutasyon olarak, kolşisin tedavisi önerilmiştir (Akar vd 2001). Yine Topaloğlu ve arkadaşları tarafından da, E148Q için homozigot olan hastaların semptomatik olduğu ve kolşisin tedavisine gerek olduğu bildirilmiştir (Topaloğlu vd 2005). Bunların aksine, E148Q allelinin polimorfik bir varyant olduğu ve hastalık üzerine etkisinin bulunmadığı da literatürde sunulmaktadır (Tchernitchko vd 2003, Tchernitchko vd 2006).

Cazeneuve vd (1999) Ermenilerle yaptıkları bir çalışmada, R408Q gen değişimini tanımlamış ve FMF allelerinde ilk kez *cis* konumunda üç farklı mutasyon E148Q/P369S/R408Q gösterilmiştir. Teoriye göre, bunun gibi alleller, bağımsız mutasyonların oluşumu veya alleler arasında meydana gelen intragenik rekombinasyonlar ile oluşmaktadır, *MEFV* haplotip analizleri de bu hipotezi desteklemektedir (Bernot vd 1998, Aksentijevich vd 1999). Tunca ve arkadaşlarının *MEFV* gen mutasyonlarının sağlıklı Türk kontrollerdeki dağılımını göstermeye yönelik yaptıkları çalışmada, E148Q 4 bireyde ve P369S ise 1 bireyde heterozigot olarak bulunmuş ancak birliktelikleri saptanmamıştır (Tunca vd 2002). Günel-Özcan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, E148Q/P369S birlikteliği 1 hastada tanımlanmış ve pediatrik yaş grubundaki allel frekansı 0.009 olarak bildirilmiştir (Günel-Özcan vd 2008). Bir Japon FMF hastasında P369S ve R408Q'nun allel frekansları 0.057 ve 0.054 olarak hesaplanmış ve birlikte kalıtım gösterdikleri bildirilmiştir. Sağlıklı 500 kontrolde ise 2 bireyin bu alleler için homozigot olduğu ancak semptomsuz oldukları görülmüştür (Sugiura vd 2008). Ayrıca Behçet hastalarıyla yapılan bir çalışmada da ilk defa E148Q/P369S/R408Q birlikteliği 1 hastada gösterilmiştir (Ayesh vd 2008).

3. ekzonda yer alan R314R polimorfizmi ise ilk olarak Bernot vd (1998) tarafından tanımlanmış olup çeşitli haplotip analizlerinde kullanılmıştır (Bernot vd 1998, Aksentijevich vd 1999).

Çalışma grubumuzda, E148Q/P369S ve E148Q/P369S/R408Q birlikteliği 2 hastada saptanmıştır. Literatürle uyumlu olarak, iki gen değişimi birleşik heterozigot durumunda olup, hastalığın ortaya çıkmasında etkilidir.

5. ekzonda yer alan E474E (1422GA), Q476Q (1428AG) ve D510D (1530TC) polimorfizimleri ilk olarak Bernot vd (1998) tarafından tanımlanmış ve haplotip

analizlerinde markör olarak kullanılmıştır. Cazeneuve vd (1999) ise bu üç polimorfizmin *cis* konumunda kalıtıldığına ek olarak R501R (1503CT) polimorfizmini de göstermiştir. Aldea ve arkadaşları tarafından 5. ekzonda H478Y (1432CT) mutasyonu tanımlanmış, ayrıca 1422GA, 1428AG ve 1530TC polimorfizmlerinin de içinde yer aldığı haplotipler oluşturulmuştur (Aldea vd 2004). Bizim sonuçlarımız da 1422GA, 1428AG ve 1530TC polimorfizmlerinin *cis* kalıtım gösterdiğini işaret etmektedir. Ancak 5. ekzonda yer alan tanımlanmış mutasyonlar hasta grubumuzda tespit edilememiştir. Dode ve arkadaşlarının 36 Türk FMF'li hasta ile yaptıkları çalışmada da 5. ekzon taranmış, ancak mutasyon saptanmamıştır (Dode vd 2000).

Bernot vd (1998) tarafından, 9. ekzonda yer alan P588P polimorfizmi ilk olarak tanımlanmış, 8. intronda yer alan c.1760-30 T>A ve *MEFV* geninde yer alan diğer polimorfizmlerle birlikte haplotip analizlerinde incelenmiştir (Bernot vd 1998, Cazeneuve vd 1999, Aldea vd 2004).

Timmann ve arkadaşları, klinik olarak karakteristik FMF bulguları bulunan bir hastada, 10. ekzonda yer alan R653H gen değişimi ile M694V mutasyonu birleşik heterozigot olarak tanımlamışlardır. Klinik tablo ve hastalıkla ilişkili mutasyonların daha çok 2. ve 10. ekzonlarda yer almasından yola çıkarak, R653H gen değişimini hastalığın ortaya çıkmasına neden olan bir mutasyon olarak bildirilmiştir (Timmann vd 2001).

Çalışma grubumuzda 1 hastada R653H, V726A mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak saptanmıştır. Hastanın diğer ekzon araştırmalarında mutasyon tespit edilmemiş olması V726A ile birlikte hastalığın ortaya çıkmasına neden olduklarını göstermektedir.

10. ekzonda yer alan R761H mutasyonu ilk olarak 1998 yılında Samuels ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve aynı yıllarda Bernot ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir. Aksentijevich vd (1999), Askenazi Yahudileriyle yaptıkları çalışmada bu mutasyonu saptayamamışken, Cazeneuve vd (1999) bu mutasyonun Ermenilerde M680I mutasyonu ile birleşik heterozigotluğunu ve allellerin %0.6'sında olduğunu göstermiştir. Akar vd (2000) tarafından Türk FMF hastalarıyla yapılan bir çalışmada, R761H mutasyonu M694V, M694I ve K695R mutasyonlarıyla birleşik heterozigotluğunun yanı sıra tek heterozigot olarak da saptanmış ve hastaların %3'ünde görüldüğü bildirilmiştir. Medlej-Hashim ve arkadaşları, Ürdünlü FMF hastalarında R761H mutasyonunun bulunmadığını

bildirmişlerdir (Medlej-Hashim vd 2000, Medlej-Hashim vd 2005). Toutiou ve arkadaşları tarafından, R761H mutasyonu Akdeniz toplumlarında sık görülen mutasyonlar arasına dahil edilmemiş ancak Türklerde yaygın görüldüğü belirtilmiştir (Toutiou 2001). Oberkanins ve arkadaşları da, 199 Avusturyalı FMF hastalarıyla yaptıkları çalışmada 9 R761H mutasyonu saptanmıştır (Oberkanins vd 2003). Tchernitchko ve arkadaşları, hastaların %7.5'inin Türk olduğu çalışma grubunda allelerin %2.2'sinde bu mutasyonu saptamıştır (Tchernitchko vd 2003). Ancak, Cazeneuve ve arkadaşları Karabağ'dan oluşturdukları hasta grubunda bu mutasyonu göstermişler ve 45 hastanın 2'sinde ise M694V mutasyonu ile birleşik heterozigot olduğunu saptamışlardır (Cazeneuve vd 2003). Medlej-Hashim vd (2005) Lübnanlı FMF hastalarında R761H allel frekansını %3.1 olarak bulmuşlardır. Mattit ve arkadaşları, Suriyeli bir hasta M694V/R761H birleşik heterozigotluğu saptamış ve R761H için hastaların %0.6'sında bulunduğu bildirilmiştir (Mattit vd 2006). Demirkaya ve arkadaşlarının Türk FMF hastalarıyla yaptıkları çalışmada ise, R761H mutasyonu M694V ve E148Q mutasyonlarıyla birleşik heterozigot olarak hastaların sırasıyla %5.15 ve %0.6'sında gösterilmiş, R761H mutant hasta oranının %6.96 olduğu ve bu oranın bir toplum için oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Demirkaya vd 2008).

R761H mutasyonu bu güne kadar heterozigot veya birleşik heterozigot olarak gösterilmesine karşılık homozigot mutantlığı literatürde bildirilmemiştir. Bizim hasta grubumuzda 2 hastada saptanmış olup hastaların birinde E148Q/R761H/R761H, diğerinde ise M694V/R761H şeklinde bulunmuştur. Allel frekansı 0.02 olarak saptanmıştır.

*MEFV* geninin ekspresyonu üzerinde etkili olabileceğini düşünerek DNA dizi analizi yöntemiyle 3'UTR bölgesinin analizi çalışmaya dahil edilmiş, ancak 80 hastada herhangi bir değişim saptanmamıştır. Üstek ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma ise, 3'UTR bölgesinde *MEFV* gen ekspresyonunun regülasyonunda muhtemel rolü olan nükleotid değişimlerinin tanımlanmasına yönelik olup, 3'UTR sekansı ile 2 haplotip oluşturan çok sayıda SNP saptanmıştır. Genin kodlayan bölgesinde polimorfizm içermeyen FMF hastalarıyla sağlıklı kontroller, 3'UTR'daki 2 SNP (rs2741918 ve rs450021) açısından karşılaştırıldığında, hastalarda heterozigotlukların daha yüksek oranda olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Mutasyon taşımayan FMF hastalarıyla 3'UTR polimorfizmleri arasında genetik bir ilişkinin gözlemlendiği bildirilmiştir. *MEFV* gen ekspresyonunun düzenlenmesinde 3'UTR dizisinin önemli olabileceği ileri sürülmektedir (Üstek vd 2008).

## 5. SONUÇLAR

*MEFV* geninin 2. ekzonunda yer alan R202Q gen değişimi için sonuçlarımız heterozigotluk durumunda hastalık üzerine etkisinin olmadığını, buna rağmen, hastalıkla ilişkili bir mutasyonla beraberliği durumunda hastalıkla ilgili klinik belirtiler ortaya çıktığını göstermekte ve tanı için R202Q gen değişiminin önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışma grubumuzda, E148Q/P369S ve E148Q/P369S/R408Q birlikteliği 2 hastada saptanmıştır. Literatürle uyumlu olarak, iki gen değişimi birleşik heterozigot durumunda olup, hastalığın ortaya çıkmasında etkilidir.

Bir hastada R653H, V726A mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak saptanmıştır. Hastanın diğer ekzon araştırmalarında mutasyon tespit edilmemiş olması V726A ile birlikte hastalığın ortaya çıkmasına neden olduklarını göstermektedir.

R761H mutasyonu bu güne kadar heterozigot veya birleşik heterozigot olarak gösterilmesine karşılık homozigot mutanlığı literatürde bildirilmemiştir. Bizim hasta grubumuzda 2 hastada saptanmış olup hastaların birinde E148Q/R761H/R761H, diğerinde ise M694V/R761H şeklinde bulunmuştur.

*MEFV* geni 5. ekzonda E474E, Q476Q, D510D ve R501R, 9. ekzonda ise P588P polimorfizmleri dışında daha önce tanımlanmış mutasyonlar saptanmamıştır. İntron 8'de c.1760-30 T>A ve intron 9'da c.1792+39 G>A gen değişimleri gösterilmiştir. 3'UTR DNA dizi analizi sonucunda da taranan bölgede herhangi bir gen değişimi saptanmamıştır.

Sonuçlarımız, Türk toplumunda R202Q gen değişiminin rutin FMF analizlerine dahil edilmesi gerektiğini ayrıca P369S, R653H ve R761H mutasyonlarının görülme sıklığının nadir olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Abedat, S., S. Urieli-Shoval, E. Shapira, S. Calko, E. Ben-Chetrit and Y. Matzner. 2002. "Effect of colchicine and cytokines on MEFV expression and C5a inhibitor activity in human primary fibroblast cultures." *Isr Med Assoc J*, 4(1); 7-12.
- Akar, N. (1999). *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Ankara, AÜTF Antıp AŞ Yayınları.
- Akar, N., E. Akar and F. Yalçinkaya. 2001. "E148Q of the MEFV gene causes amyloidosis in familial Mediterranean fever patients." *Pediatrics*, 108(1); 215.
- Akar, N., M. Hasipek, E. Akar, M. Ekim, F. Yalçinkaya and N. Çakar. 2003. "Serum amyloid A1 and tumor necrosis factor-alpha alleles in Turkish familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis." *Amyloid*, 10(1); 12-6.
- Akar, N., M. Hasipek, A. Öztürk, E. Akar and M. Tekin. 2006. "Serum amyloid A1 -13 T/C alleles in Turkish familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis." *J Nephrol*, 19(3); 318-21.
- Akar, N., M. Mısıroğlu, F. Yalçinkaya, E. Akar, N. Çakar, N. Tümer, M. Akçakuş, H. Taştan and Y. Matzner. 2000. "MEFV mutations in Turkish patients suffering from Familial Mediterranean Fever." *Hum Mutat*, 15(1); 118-9.
- Akar, N., A. Öztürk, D. Özel, E. Akar and M. Ekim. 2006. "Is MEFV P706 polymorphism important in familial Mediterranean fever patients?" *J Nephrol*, 19(1); 119-20.
- Aksentijevich, I., Y. Torosyan, J. Samuels, M. Centola, E. Pras, J. J. Chae, C. Oddoux, G. Wood, M. P. Azzaro, G. Palumbo, R. Giustolisi, M. Pras, H. Ostrer and D. L. Kastner. 1999. "Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population." *Am J Hum Genet*, 64(4); 949-62.
- Aldea, A., J. M. Campistol, J. I. Arostegui, J. Rius, M. Maso, J. Vives and J. Yague. 2004. "A severe autosomal-dominant periodic inflammatory disorder with renal AA amyloidosis and colchicine resistance associated to the MEFV H478Y variant in a Spanish kindred: an unusual familial Mediterranean fever phenotype or another MEFV-associated periodic inflammatory disorder?" *Am J Med Genet A*, 124A(1); 67-73.
- Anton, P. A., S. R. Targan, S. R. Vigna, M. Durham, A. D. Schwabe and F. Shanahan. 1988. "Enhanced neutrophil chemiluminescence in familial Mediterranean fever." *J Clin Immunol*, 8(2); 148-56.
- Ayesh, S., H. Abu-Rmaileh, S. Nassar, W. Al-Shareef, B. Abu-Libdeh, A. Muhanna and F. Al-Kafri. 2008. "Molecular analysis of MEFV gene mutations among Palestinian patients with Behcet's disease." *Scand J Rheumatol*, 37(5); 370-4.

- Ayesh, S. K., Y. Azar, Barghouti, II, J. M. Ruedi, B. M. Babior and Y. Matzner. 1995. "Purification and characterization of a C5a-inactivating enzyme from human peritoneal fluid." *Blood*, 85(12); 3503-9.
- Bakkaloğlu, A. 2003. "Familial Mediterranean fever." *Pediatr Nephrol*, 18(9); 853-9.
- Bakkaloğlu, A., A. Düzova, B. B., Beşbaş N, T. R. and O. S. 2002. "The effect of SAA1, SAA2 polymorphisms on renal amyloidosis and A-SAA levels in patients with FMF." *Clin Exp Rheumatol* 20(Suppl 26); S80.
- Bakkaloğlu, A., S. Özen, R. Topaloğlu, R. Düşünsel, H. Şimşek and o. b. o. t. T. F. S. Group. 2002. "Associated diseases in Turkish FMF patients: are patients predisposed to develop vasculitides." *Clin Exp Rheumatol*, 20(Suppl 26); S90.
- Balcı, B., K. Tınaztepe, E. Yılmaz, S. Gücer, S. Özen, R. Topaloğlu, N. Beşbaş, M. Özgüç and A. Bakkaloğlu. 2002. "MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever phenotype II patients with renal amyloidosis in childhood: a retrospective clinicopathological and molecular study." *Nephrol Dial Transplant*, 17(11); 1921-3.
- Barakat, M. H., A. O. El-Khawad, K. A. Guma, N. I. El-Sobki and F. F. Fenech. 1984. "Metaraminol provocative test: a specific diagnostic test for familial Mediterranean fever." *Lancet*, 1(8378); 656-7.
- Barakat, M. H., A. M. Karnik, H. W. Majeed, N. I. el-Sobki and F. F. Fenech. 1986. "Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs--a study of 175 patients and review of the literature." *Q J Med*, 60(233); 837-47.
- Ben-Chetrit, E. 2003. "Familial Mediterranean fever (FMF) and renal AA amyloidosis--phenotype-genotype correlation, treatment and prognosis." *J Nephrol*, 16(3); 431-4.
- Ben-Chetrit, E., I. Lerer, E. Malamud, C. Domingo and D. Abeliovich. 2000. "The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a disease-causing mutation or a sequence variant?" *Hum Mutat*, 15(4); 385-6.
- Ben-Chetrit, E. and M. Levy. 1998. "Familial Mediterranean fever." *Lancet*, 351(9103); 659-64.
- Benson, M. D. and A. S. Cohen. 1979. "Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic, and neoplastic diseases." *Arthritis Rheum*, 22(1); 36-42.
- Bernot, A., C. da Silva, J. L. Petit, C. Cruaud, C. Caloustian, V. Castet, M. Ahmed-Arab, C. Dross, M. Dupont, D. Cattani, N. Smaoui, C. Dode, C. Pecheux, B. Nedelec, J. Medaxian, M. Rozenbaum, I. Rosner, M. Delpech, G. Grateau, J. Demaille, J. Weissenbach and I. Touitou. 1998. "Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF)." *Hum Mol Genet*, 7(8); 1317-25.
- Booth, D. R., J. D. Gillmore, S. E. Booth, M. B. Pepys and P. N. Hawkins. 1998. "Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever." *QJM*, 91(9); 603-6.

- Cattan, D., Bouali, B., Dode, C., Dupont, JM., Dubertret, L., Grateau, G. 2002. "Familial Mediterranean Fever and Pseudoxanthoma Elasticum." *Clin Exp Rheumatol Suppl* 26:20;100.
- Cazeneuve, C., H. Ajrapetyan, S. Papin, F. Roudot-Thoraval, D. Genevieve, E. Mndjoyan, M. Papazian, A. Sarkisian, A. Babloyan, B. Boissier, P. Duquesnoy, J. C. Kouyoumdjian, E. Girodon-Boulandet, G. Grateau, T. Sarkisian and S. Amselem. 2000. "Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever." *Am J Hum Genet*, 67(5); 1136-43.
- Cazeneuve, C., Z. Hovannesian, D. Genevieve, H. Hayrapetyan, S. Papin, E. Girodon-Boulandet, B. Boissier, J. Feingold, K. Atayan, T. Sarkisian and S. Amselem. 2003. "Familial Mediterranean fever among patients from Karabakh and the diagnostic value of MEFV gene analysis in all classically affected populations." *Arthritis Rheum*, 48(8); 2324-31.
- Cazeneuve, C., T. Sarkisian, C. Pecheux, M. Dervichian, B. Nedelec, P. Reinert, A. Ayvazyan, J. C. Kouyoumdjian, H. Ajrapetyan, M. Delpech, M. Goossens, C. Dode, G. Grateau and S. Amselem. 1999. "MEFV-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications." *Am J Hum Genet*, 65(1); 88-97.
- Centola, M., G. Wood, D. M. Frucht, J. Galon, M. Aringer, C. Farrell, D. W. Kingma, M. E. Horwitz, E. Mansfield, S. M. Holland, J. J. O'Shea, H. F. Rosenberg, H. L. Malech and D. L. Kastner. 2000. "The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators." *Blood*, 95(10); 3223-31.
- Chae, J. J., H. D. Komarow, J. Cheng, G. Wood, N. Raben, P. P. Liu and D. L. Kastner. 2003. "Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis." *Mol Cell*, 11(3); 591-604.
- Chae, J. J., G. Wood, S. L. Masters, K. Richard, G. Park, B. J. Smith and D. L. Kastner. 2006. "The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 beta production." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26); 9982-7.
- Daniels, M., T. Shohat, A. Brenner-Ullman and M. Shohat. 1995. "Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel." *Am J Med Genet*, 55(3); 311-4.
- Demirkaya, E., Y. Tunca, F. Gök, S. Özen and D. Gül. 2008. "A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish familial Mediterranean fever patients." *Clin Rheumatol*, 27(6); 729-32.
- Dewalle, M., C. Domingo, M. Rozenbaum, E. Ben-Chetrit, D. Cattan, A. Bernot, C. Dross, M. Dupont, C. Notarnicola, M. Levy, I. Rosner, J. Demaille and I. Toubitou. 1998.

- "Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF)." *Eur J Hum Genet*, 6(1); 95-7.
- Diaz, A., C. Hu, D. L. Kastner, P. Schaner, A. M. Reginato, N. Richards and D. L. Gumucio. 2004. "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 Rheum*, 50(11); 3679-89.
- Dinareello, C. A., S. M. Wolff, S. E. Goldfinger, D. C. Dale and D. W. Alling. 1974. "Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial." *N Engl J Med*, 291(18); 934-7.
- Dode, C., C. Pecheux, C. Cazeneuve, D. Cattan, M. Dervichian, M. Goossens, M. Delpech, S. Amselem and G. Grateau. 2000. "Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever." *Am J Med Genet*, 92(4); 241-6.
- Domingo, C., I. Touitou, A. Bayou, S. Ozen, C. Notarnicola, M. Dewalle, J. Demaille, R. Buades, C. Sayadat, M. Levy and E. Ben-Chetrit. 2000. "Familial Mediterranean fever in the 'Chuetas' of Mallorca: a question of Jewish origin or genetic heterogeneity." *Eur J Hum Genet*, 8(4); 242-6.
- Drenth, J. P. and J. W. van der Meer. 2001. "Hereditary periodic fever." *N Engl J Med*, 345(24); 1748-57.
- Ehrenfeld, E., M. Eliakim and M. Rachmilewitz. 1961. "Recurrent polyseositis (Familial Mediterranean Fever; periodic disease). A report of fifty-five cases." *Am. J. Med*, 31; 107- 123.
- Eliakim, M., M. Levy and M. Ehrenfeld (1981). Laboratory examinations. In: Recurrent polyserositis (Familial Mediterranean Fever, periodic disease). AMSTERDAM, ELSEVIER.
- Giaglis, S., V. Papadopoulos, K. Kambas, M. Doumas, V. Tsironidou, S. Rafail, G. Kartalis, M. Speletas and K. Ritis. 2007. "MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever." *Clin Genet*, 71(5); 458-67.
- Goldfinger, S. E. 1972. "Colchicine for familial Mediterranean fever." *N Engl J Med*, 287(25); 1302.
- Gumucio, D. L., A. Diaz, P. Schaner, N. Richards, C. Babcock, M. Schaller and T. Cesena. 2002. "Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis." *Clin Exp Rheumatol*, 20(4 Suppl 26); S45-53.
- Günel-Özcan, A., D. B. Sayın, E. D. Mısırlıoğlu, S. Guliter, F. Yakaryılmaz and C. Ensarı. 2008. "The spectrum of FMF mutations and genotypes in the referrals to molecular genetic laboratory at Kirikkale University in Turkey." *Mol Biol Rep*.
- Heller, H., E. Sohar and L. Sherf. 1958. "Familial Mediterranean fever." *AMA Arch Intern Med*, 102(1); 50-71.

- Henckes, M., T. Roskams, S. Vanneste, B. Van Damme and Y. Vanrenterghem. 1994. "Polyarteritis nodosa type vasculitis in a patient with familial Mediterranean fever treated with cyclosporin A." *Transpl Int*, 7(4); 292-6.
- Højberg, A. S. and H. Mertz. 1995. "[Nephrotic syndrome in familial Mediterranean fever-effect of colchicine therapy]." *Ugeskr Laeger*, 157(28); 4035-7.
- <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>.
- Janeway, T. C. and H. O. Mosenthal. 1908. "An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of nitrogen metabolism." *Trans Assoc Am Physicians*, 23; 504-18.
- Kastner, D. L. 1998. "Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation." *Hosp Pract (Minneapolis)*, 33(4); 131-4, 139-40, 143-6 passim.
- Klug, W. and M. Cummings (2000). *Genetik Kavramlar*.
- Knecht, A., F. C. de Beer and M. Pras. 1985. "Serum amyloid A protein in familial Mediterranean fever." *Ann Intern Med*, 102(1); 71-2.
- Langevitz, P., D. Zemer, A. Livneh, J. Shemer and M. Pras. 1994. "Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever." *J Rheumatol*, 21(9); 1708-9.
- Livneh, A., P. Langevitz, Y. Shinar, N. Zaks, D. L. Kastner, M. Pras and E. Pras. 1999. "MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever." *Amyloid*, 6(1); 1-6.
- Livneh, A., P. Langevitz, D. Zemer, S. Padeh, A. Migdal, E. Sohar and M. Pras. 1996. "The changing face of familial Mediterranean fever." *Semin Arthritis Rheum*, 26(3); 612-27.
- Livneh, A., P. Langevitz, D. Zemer, N. Zaks, S. Kees, T. Lidar, A. Migdal, S. Padeh and M. Pras. 1997. "Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever." *Arthritis Rheum*, 40(10); 1879-85.
- Majeed, H. A. and M. Barakat. 1989. "Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in children: analysis of 88 cases." *Eur J Pediatr*, 148(7); 636-41.
- Majeed, H. A. and M. Rawashdeh. 1997. "The clinical patterns of arthritis in children with familial Mediterranean fever." *QJM*, 90(1); 37-43.
- Mamou, H. and R. Cattani. 1952. "[The periodic disease.]" *Sem Hop*, 28(25); 1062-70.
- Marmaralı, A. 1946. "Garip bir karın sendromu." *Türk Tıp Cemy Mecm*, 12; 436-43.
- Mattit, H., M. Joma, S. Al-Cheikh, M. El-Khateeb, M. Medlej-Hashim, N. Salem, V. Delague and A. Megarbane. 2006. "Familial Mediterranean fever in the Syrian

- population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation." *Eur J Med Genet*, 49(6); 481-6.
- Medlej-Hashim, M., M. Rawashdeh, E. Chouery, I. Mansour, V. Delague, G. Lefranc, R. Naman, J. Loiselet and A. Megarbane. 2000. "Genetic screening of fourteen mutations in Jordanian familial Mediterranean fever patients." *Hum Mutat*, 15(4); 384.
- Medlej-Hashim, M., J. L. Serre, S. Corbani, O. Saab, N. Jalkh, V. Delague, E. Chouery, N. Salem, J. Loiselet, G. Lefranc and A. Megarbane. 2005. "Familial Mediterranean fever (FMF) in Lebanon and Jordan: a population genetics study and report of three novel mutations." *Eur J Med Genet*, 48(4); 412-20.
- Miyoshi, T., K. Yamashita, T. Ohno, T. Izumi, A. Takaori-Kondo, M. Sasada and T. Uchiyama. 2008. "Familial Mediterranean fever gene as a possible modifier of Sweet syndrome with chronic myelogenous leukemia." *Acta Haematol*, 120(1); 57-62.
- Oberkanins, C., A. Weinhausel, G. Kriegshauser, A. Moritz, F. Kury and O. A. Haas. 2003. "Genetic testing for familial Mediterranean fever in Austria by means of reverse-hybridization teststrips." *Clin Chem*, 49(11); 1948-50.
- Önen, F., H. Sümer, S. Türkay, O. Akyürek, M. Tunca and H. Özdoğan. 2004. "Increased frequency of familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey." *Clin Exp Rheumatol*, 22(4 Suppl 34); S31-3.
- Özdemir, A. I. and C. Sökmen. 1969. "Familial Mediterranean fever among the Turkish people." *Am J Gastroenterol*, 51(4); 311-6.
- Özdemir, B. H., B. Akman and F. N. Özdemir. 2001. "Amyloid goiter in Familial Mediterranean Fever (FMF): a clinicopathologic study of 10 cases." *Ren Fail*, 23(5); 659-67.
- Özen, S., Y. Karaaslan, O. Özdemir, U. Saatçi, A. Bakkaloğlu, E. Köroğlu and S. Tezcan. 1998. "Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study." *J Rheumatol*, 25(12); 2445-9.
- Özen, S., D. Uçkan, E. Baskın, N. Beşbaş, H. Okur, U. Saatçi and A. Bakkaloğlu. 2001. "Increased neutrophil apoptosis during attacks of familial Mediterranean fever." *Clin Exp Rheumatol*, 19(5 Suppl 24); S68-71.
- Özer, F. L., E. Kaplaman and S. Zileli. 1971. "Familial Mediterranean fever in Turkey. A report of twenty cases." *Am J Med*, 50(3); 336-9.
- Özkan, E., O. Okur, A. Ekmekçi, R. Özcan and T. Tag. 1972. "A new approach to the treatment of periodic fever." *Med Bull İstanbul*, 1(1); 44-49.
- Öztürk, A., E. Elsobky, S. Elsayed, M. Alhodhod and N. Akar. 2009. "Mutational Analysis of Mefv Gene in Egyptian Patients with Familial Mediterranean Fever." *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, in press.

- Öztürk, A., B. Özçakar, M. Ekim and N. Akar. 2008. "Is MEFV Gene Arg202Gln (605G>A) A Disease-Causing Mutation?" *Türk J Med Sci*, 38(3); 205-208.
- Pras, E., I. Aksentijevich, L. Gruberg, J. E. Balow, Jr., L. Prosen, M. Dean, A. D. Steinberg, M. Pras and D. L. Kastner. 1992. "Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16." *N Engl J Med*, 326(23); 1509-13.
- Pras, M. 1998. "Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene." *Scand J Rheumatol*, 27(2); 92-7.
- Pras, M., N. Bronshtig, D. Zemer and J. Gafni. 1982. "Variable incidence of amyloidosis in familial Mediterranean fever among different ethnic groups." *Johns Hopkins Med J*, 150(1); 22-6.
- Reimann, H. A. 1948. "Periodic disease; a probable syndrome including periodic fever, benign paroxysmal peritonitis, cyclic neutropenia and intermittent arthralgia." *J Am Med Assoc*, 136(4); 239-44.
- Ritis, K., S. Giaglis, N. Spathari, A. Micheli, D. Zonios, D. Tzoanopoulos, C. C. Deltas, S. Rafail, R. Mean, V. Papadopoulos, A. G. Tzioufas, H. M. Moutsopoulos and G. Kartalis. 2004. "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*, 63(4); 438-43.
- Rogers, D. B., M. Shohat, G. M. Petersen, J. Bickal, J. Congleton, A. D. Schwabe and J. I. Rotter. 1989. "Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency." *Am J Med Genet*, 34(2); 168-72.
- Rozenbaum, M., R. Katz, I. Rozner and S. Pollack. 1992. "Decreased interleukin 1 activity released from circulating monocytes of patients with familial Mediterranean fever during in vitro stimulation by lipopolysaccharide." *J Rheumatol*, 19(3); 416-8.
- Saatçi, U., S. Özen, S. Özdemir, A. Bakkaloğlu, N. Beşbaş, R. Topaloğlu and S. Arslan. 1997. "Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis." *Eur J Pediatr*, 156(8); 619-23.
- Samuels, J., I. Aksentijevich, Y. Torosyan, M. Centola, Z. Deng, R. Sood and D. L. Kastner. 1998. "Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health." *Medicine (Baltimore)*, 77(4); 268-97.
- Schwabe, A. D. and R. S. Peters. 1974. "Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases." *Medicine (Baltimore)*, 53(6); 453-62.
- Schwartz, J. 1960. "Periodic peritonitis, onset simultaneously with menstruation." *Ann Intern Med*, 53; 407-11.

- Schwartz, T., P. Langevitz, D. Zemer, E. Gazit, M. Pras and A. Livneh. 2000. "Behcet's disease in Familial Mediterranean fever: characterization of the association between the two diseases." *Semin Arthritis Rheum*, 29(5); 286-95.
- Seidman, L. J., R. K. Schutt, B. Caplan, G. S. Tolomiczenko, W. M. Turner and S. M. Goldfinger. 2003. "The effect of housing interventions on neuropsychological functioning among homeless persons with mental illness." *Psychiatr Serv*, 54(6); 905-8.
- Shohat, M., N. Magal, T. Shohat, X. Chen, T. Dagan, A. Mimouni, Y. Danon, R. Lotan, G. Ogur, A. Sirin, M. Schlezinger, G. J. Halpern, A. Schwabe, D. Kastner, J. I. Rotter and N. Fischel-Ghodsian. 1999. "Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis." *Eur J Hum Genet*, 7(3); 287-92.
- Siegal, S. 1945. "Benign paroxysmal peritonitis." *Ann Intern Med*, 23; 1-21.
- Sohar, E., J. Gafni, M. Pras and H. Heller. 1967. "Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature." *Am J Med*, 43(2); 227-53.
- Sohar, E., M. Pras and J. Heller. 1961. "Genetics of familial Mediterranean fever (FMF)." *Arch Int Med*, 107; 109-118.
- Stoffman, N., N. Magal, T. Shohat, R. Lotan, S. Koman, A. Oron, Y. Danon, G. J. Halpern, Y. Lifshitz and M. Shohat. 2000. "Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups." *Eur J Hum Genet*, 8(4); 307-10.
- Sugiura, T., Y. Kawaguchi, S. Fujikawa, Y. Hirano, T. Igarashi, M. Kawamoto, K. Takagi, M. Hara and N. Kamatani. 2008. "Familial Mediterranean fever in three Japanese patients, and a comparison of the frequency of MEFV gene mutations in Japanese and Mediterranean populations." *Mod Rheumatol*, 18(1); 57-9.
- Tchernitchko, D., M. Legendre, C. Cazeneuve, A. Delahaye, F. Niel and S. Amselem. 2003. "The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of familial Mediterranean fever." *Hum Mutat*, 22(4); 339-40.
- Tchernitchko, D., M. Legendre, A. Delahaye, C. Cazeneuve, F. Niel, M. Goossens, S. Amselem and E. Girodon. 2003. "Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve MEFV gene mutations." *Clin Chem*, 49(11); 1942-5.
- Tchernitchko, D. O., M. Gerard-Blanluet, M. Legendre, C. Cazeneuve, G. Grateau and S. Amselem. 2006. "Intrafamilial segregation analysis of the p.E148Q MEFV allele in familial Mediterranean fever." *Ann Rheum Dis*, 65(9); 1154-7.
- Tekin, M., F. Yalçınkaya, N. Çakar, N. Akar, M. Mısırlıoğlu, H. Taştan and N. Tümer. 2000. "MEFV mutations in multiplex families with familial Mediterranean fever: is a particular genotype necessary for amyloidosis?" *Clin Genet*, 57(6); 430-4.

- Territo, M. C., R. S. Peters and M. J. Cline. 1976. "Leukocyte function in familial Mediterranean fever." *Am J Hematol*, 1(3); 307-11.
- The French FMF Consortium. 1997. "A candidate gene for familial Mediterranean fever." *Nat Genet*, 17(1); 25-31.
- The International FMF Consortium. 1997. "Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium." *Cell*, 90(4); 797-807.
- Timmann, C., B. Muntau, K. Kuhne, A. Gelhaus and R. D. Horstmann. 2001. "Two novel mutations R653H and E230K in the Mediterranean fever gene associated with disease." *Mutat Res*, 479(1-2); 235-9.
- Topaloğlu, R., F. Özaltın, E. Yılmaz, S. Özen, B. Balcı, N. Beşbaş and A. Bakkaloğlu. 2005. "E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever." *Ann Rheum Dis*, 64(5); 750-2.
- Touitou, I. 2001. "The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations." *Eur J Hum Genet*, 9(7); 473-83.
- Touitou, I., X. Magne, N. Molinari, A. Navarro, A. L. Quéllec, P. Picco, M. Seri, S. Ozen, A. Bakkaloglu, A. Karaduman, J. M. Garnier, J. Demaille and I. Kone-Paut. 2000. "MEFV mutations in Behcet's disease." *Hum Mutat*, 16(3); 271-2.
- Tunca, M., S. Akar, P. N. Hawkins, S. E. Booth, B. Şengül, T. U. Yavuzsen, S. Öktem, M. Soytürk, N. Akkoç and D. R. Booth. 2002. "The significance of paired MEFV mutations in individuals without symptoms of familial Mediterranean fever." *Eur J Hum Genet*, 10(12); 786-9.
- Tunca, M., S. Akar, F. Önen, H. Özdoğan, O. Kasapçopur, F. Yalçınkaya, E. Tutar, S. Özen, R. Topaloğlu, E. Yılmaz, M. Arıcı, A. Bakkaloğlu, N. Beşbaş, T. Akpolat, A. Dinç and E. Erken. 2005. "Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study." *Medicine (Baltimore)*, 84(1); 1-11.
- Tunca, M., A. S., S. A., O. F., C. V. and o. b. o. t. T. F. S. Group. 2002. "The results of a nationwide, multicenter analysis of the clinical and genetic characteristics of the Turkish FMF patients." *Clin Exp Rheumatol*, 20 (Suppl 26); S92.
- Üstek, D., C. Ekmekçi, B. Oku, F. Coşan, A. Çakırış, N. Abacı, S. Çelik, S. Kamalı, G. Hatemi, O. Kasapçopur, H. Özdoğan and A. Gul. 2008. "MEFV gene 3'-UTR Alu repeat polymorphisms in patients with familial Mediterranean fever." *Clin Exp Rheumatol*, 26(4 Suppl 50); S72-6.
- www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Yalçınkaya, F., N. Akar and M. Mısırlıoğlu. 1998. "Familial Mediterranean fever--amyloidosis and the Val726Ala mutation." *N Engl J Med*, 338(14); 993-4.

- Yalçınkaya, F., N. Çakar, M. Mısırlıoğlu, N. Tümer, N. Akar, M. Tekin, H. Taştan, H. Koçak, N. Özkaya and A. H. Elhan. 2000. "Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis." *Rheumatology (Oxford)*, 39(1); 67-72.
- Yamaguchi, K., K. Ikeda, K. Ihara, H. Takada, K. Kusuvara and T. Hara. 2008. "Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease." *Hum Immunol*.
- Yılmaz, E., B. Balçı, S. Kutlay, S. Özen, S. Ertürk, A. Öner, N. Beşbaşı and A. Bakkaloğlu. 2003. "Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients." *Turk J Pediatr*, 45(3); 198-202.
- Yılmaz, E., S. Özen, B. Balçı, A. Düzova, R. Topaloğlu, N. Beşbaşı, U. Saatçi, A. Bakkaloğlu and M. Özgüç. 2001. "Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population." *Eur J Hum Genet*, 9(7); 553-5.
- Zemer, D., M. Pras, E. Sohar, M. Modan, S. Cabili and J. Gafni. 1986. "Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever." *N Engl J Med*, 314(16); 1001-5.
- Zemer, D., M. Revach, M. Pras, B. Modan, S. Schor, E. Sohar and J. Gafni. 1974. "A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever." *N Engl J Med*, 291(18); 932-4.

## Is *MEFV* Gene Arg202Gln (605 G>A) A Disease-Causing Mutation?

Ayşenur ÖZTÜRK<sup>1</sup>

Birsin ÖZÇAKAR<sup>2</sup>

Mesiha EKİM<sup>2</sup>

Nejat AKAR<sup>1</sup>

**Aim:** Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive disease. Arg202Gln was reported as a frequent polymorphism, and G allele of the mutation was in linkage disequilibrium with M694V. Thus, the aim of this study was to determine the distribution of the R202Q (605G>A) mutation in exon 2 of the *MEFV* gene in Turkish FMF patients and controls.

**Materials and Methods:** The study included 160 FMF and 41 FMF/amyloid patients and 121 controls. Sequencing of exon 10 and exon 5 and PCR/RFLP analysis of E148Q and R202Q mutations of exon 2 of the *MEFV* gene were performed for all patients according to previously described techniques.

**Results:** We found that 5 out of 76 M694V homozygote FMF patients carry a different haplotype from the one expected. Eleven of the patients had homozygous GG allele indicating the second haplotype. None of the 121 controls was homozygous for R202Q (605G>A), but 8 controls were heterozygous for M694V mutation and 5 (4.1%) of them were in linkage disequilibrium with R202Q.

**Conclusions:** It seems that R202Q has no effect when it is in heterozygous state; however, when combined with another disease-causing mutation, the clinical spectrum appears. Thus, R202Q might be a disease-causing mutation at least in some of the FMF patients.

**Key Words:** Familial Mediterranean fever (FMF), amyloidosis, *MEFV* gene, R202Q

<sup>1</sup> Department of Pediatric Molecular Genetics, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara - TURKEY

<sup>2</sup> Department of Pediatric Nephrology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara - TURKEY

### *MEFV* Arg202Gln (605 G>A) Taşıma Hastalık Oluşturan Bir Mutasyon mu?

**Amaç:** Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. Arg202Gln sık görülen bir polimorfizm olmakla birlikte G allelinin M694V ile birlikte kalıtıldığı bildirilmiştir. Bundan dolayı bu çalışmanın amacı, *MEFV* geni 2. ekzonda yer alan R202Q (605 G>A) mutasyonunun Türk FMF hastalarında ve kontrollerdeki dağılımını göstermektir.

**Yöntem ve Gereç:** Çalışma, 160 FMF, 41 FMF/amiloid hastalarını ve 121 kontrolü kapsamaktadır. 10 ve 5. ekzonlar dizi analizi yöntemi ile, 2. ekzon E148Q ve R202Q mutasyonları için PCR/RFLP yöntemi ile daha önce tanımlanan tekniklere göre tüm bireyler taranmıştır.

**Bulgular:** M694V homozigot olan 76 FMF hastasının 5'i beklenenden farklı bir haplotip taşımaktadır. 11 hastada homozigot GG alleli bulunmakta ve ikinci bir haplotipe işaret etmektedir. 121 kontrolde homozigot R202Q (605 G>A) bulunmamakta fakat 8 kontrolden 5'i (% 4,1) M694V mutasyonu için heterozigot ve R202Q ile birleşik heterozigottur.

**Sonuç:** R202Q heterozigotluğu durumunda hastalık yapıcı etkisi görülmektedir. Fakat hastalıkla ilişkili başka bir mutasyonla birlikteliğinde kliniğe etkisi görülmektedir. Bundan dolayı R202Q, en azından bazı FMF hastalarında, hastalığa neden olan bir mutasyon olabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), Amiloid, *MEFV* geni, R202Q

Received: February 20, 2008  
Accepted: May 13, 2008

#### Correspondence

Nejat AKAR

Koru Mah. 606. Sokak  
Uyum Sitesi 19,  
Çayyolu, Ankara - TURKEY

akar@medicine.ankara.edu.tr

#### Introduction

Familial Mediterranean fever (FMF, OMIM 249100) is characterized by recurrent acute attacks of fever accompanied by abdominal pain, arthritis and pleurisy. The most severe complication is the development of systemic amyloidosis, ultimately leading to renal failure, but it can be prevented by the daily and life-long administration of colchicine therapy (1-2). FMF primarily affects populations surrounding the Mediterranean basin: Sephardic Jews, Armenians, Turks, Arabs, Greeks, Druze and Ashkenazi Jews. Several mutations in the gene responsible for FMF have been reported (3). Most of the previous reports are confined to exon 2 and exon 10 of the *MEFV* gene,

as most of the mutations are clustered in these two exons (1,4). More than 150 gene alterations (polymorphisms/mutations) located in the *MEFV* gene have been identified (5).

During our *MEFV* gene mutation screening among Turkish FMF patients for molecular diagnosis, we detected R202Q (605 G>A) at exon 2 of the *MEFV* gene in some of our patients. R202Q was reported as a frequent polymorphism, and G allele of the mutation was in linkage disequilibrium with M694V (5). During our study, in some of our patients, we found that G allele was not linked to M694V.

We thus aimed to study the distribution of the R202Q (605 G>A) mutation in Turkish FMF patients and controls.

## Materials and Methods

### Patients

All patients were of Turkish origin, and diagnosis of FMF was based upon the published criteria (6). The patient group included 201 unrelated Turkish FMF patients, of whom 76 were homozygous M694V without amyloidosis and 84 were heterozygous for one *MEFV* mutation (M694V [n=58]; E148Q [n=14]; V726A [n=6]; M680I [n=6]). Forty-one biopsy-proven FMF-amyloidosis patients were also included. A written consent was obtained from the parents of the children.

### Methods

Mutation analysis of exon 10 and exon 5 of the *MEFV* gene was performed for all patients according to previously described sequencing technique by using automatic DNA sequencer (Beckman Coulter, USA). E148Q mutation of exon 2 was analyzed with previously described polymerase chain reaction (PCR)/restriction endonuclease analysis (7,8). R202Q mutation of exon 2 was analyzed using primers F:5'-ATCTTGGGCCCTAAACGTGG-3' and R:5'-TCCCTCAGGTCGCAGATGC-3' with an annealing temperature of 58°C. 658 bp PCR product was restricted with Pvu II, which recognizes the mutation. One-hundred twenty-one individuals without any symptoms of FMF were also included in the study as controls.

## Results

Distribution of R202Q mutation among Turkish FMF patients is given in Table 1, and Table 2 shows the distribution of R202Q mutation among FMF patients with amyloidosis. We found that 5 of 76 M694V homozygote FMF patients without amyloidosis carry a different haplotype from the one expected. These patients carry G allele instead of A allele at R202Q. In screening of the patient group with only one mutation detected, 15 of these patients had homozygous AA allele. Eleven of them had homozygous GG allele indicating the second haplotype. Three heterozygous patients with

Table 1. Distribution of exon 2 R202Q mutation among Turkish FMF patients.

| R202Q              | GG | GA | AA |
|--------------------|----|----|----|
| M694V/M694V (n=76) | 1  | 4  | 71 |
| M694V/- (n=58)     | 11 | 32 | 15 |
| Control (n=107)    | 71 | 36 | -  |
| E148Q/- (n=14)     | 11 | 3  | -  |
| V726A/- (n=6)      | 6  | -  | -  |
| M680I/- (n=6)      | 6  | -  | -  |

Table 2. Distribution of exon 2 R202Q mutation among FMF amyloidosis patients.

|                      | Exon 2 R202Q |            |            |
|----------------------|--------------|------------|------------|
|                      | GG           | GA         | AA         |
| FMF+Amyloid (n=41)   | 14 (34.1%)   | 13 (31.7%) | 14 (34.1%) |
| No mutation detected | 7            | 2          | 2          |
| M694V/-              | 1            | 3          | 4          |
| M694V/M694V          | 1            | -          | 8          |
| M680I/M694V          | -            | 3          | -          |
| M680I/-              | 1            | 1          | -          |
| (G/A) M680I/M694V    | -            | 1          | -          |
| M694I/-              | 1            | -          | -          |
| M694V/K695R          | -            | 1          | -          |
| M694V/V726A          | -            | 1          | -          |
| M694V/E148Q          | -            | 1          | -          |
| M680I/M680I          | 1            | -          | -          |
| M680I/V726A          | 1            | -          | -          |
| V726A/-              | 1            | -          | -          |

E148Q had heterozygous R202Q. Analysis of the amyloidosis patients revealed two patients with homozygous R202Q (AA allele) mutation. One patient with homozygous M694V mutation had homozygous GG allele. Four heterozygous patients with M694V had homozygous R202Q. One patient was in compound state for M680I and R202Q.

When we screened 121 individuals without any symptoms of FMF, none was homozygous for R202Q (605 G>A) but 41 (33.8%) were heterozygous for this mutation. It was found that 8 controls (6.6%) had *MEFV* mutations at exon 10 in heterozygous state. Seven controls (5.8%) were heterozygous for M694V mutation, consistent with the study in which M694V mutation frequency was found as 3% (9). Five controls (4.1%) were compound heterozygous with R202Q. A control with M680I heterozygosity (0.8%) was also determined.

### Discussion

Debate still continues on phenotype-genotype relationship in FMF since the cloning of the *MEFV* gene (10,11). The main debate centers on the relation between the mutation type and amyloidosis. M694V, V726A and E148Q were subjects of the debates (1,12,13).

Recently, during routine mutation analysis of our FMF patients, we observed that R202Q mutation exists at exon 2 of the *MEFV* gene, which was reported as a prevalent polymorphism with linkage disequilibrium with M694V mutation (5). However, when we analyzed our

patient groups, we found that there is one more haplotype, which was not in linkage disequilibrium with M694V, indicating that this might be a disease-causing mutation at least in some FMF patients. As we found homozygous R202Q in two cases with amyloidosis, this may also confirm our hypothesis. Furthermore, when we analyzed this mutation in the control group, the expected value for R202Q homozygosity was estimated as 3%, but interestingly, R202Q in homozygote state was not found in our control group.

Recently, Giaglis et al. (14) reported *MEFV* mutation distribution in Greek FMF patients. They also stated that R202Q is common in the Greek population. In conclusion, they stated that R202Q is a disease-causing mutation; however, they did not mention the previously reported linkage disequilibrium information concerning R202Q.

One important point should be taken into account. R202Q mutation was also common in our control population. It seems that it has no effect when it is in heterozygous state. However, when combined with another disease-causing mutation, the clinical spectrum appears. Further, it is also important from the diagnostic point of view. If it is a disease-causing mutation, it will be included in the routine mutation screening. Evaluation of this mutation in different ethnic patient groups should be performed as soon as possible.

### Acknowledgement

This study was supported by a grant from Ankara University Research Fund.

### References

1. El-Shanti H, Majeed HA, El-Khateeb M. Familial Mediterranean fever in Arabs. *Lancet* 2006; 367(9515): 1016-24.
2. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1986; 314(16): 1001-5.
3. Turkish FMF study group. Familial Mediterranean fever in Turkey: results of a nationwide study. *Medicine* 2005; 84: 1-11.
4. Centola M, Aksentjevich I, Kastner DL. The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1581-8.
5. <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>
6. Livneh A, Langevita P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1879-85.
7. Akar N, Akar E, Özel D, Tekin M, Ekim M, Yalçinkaya F. A note on mutation analysis in familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 196-7.
8. Akar N, Misirlioglu M, Yalçinkaya F, Akar E, Cakar N, Turner N et al. *MEFV* mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mutat* 2000; 15: 118-9.
9. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(7): 553-5.

10. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 1997; 17: 25-31.
11. International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the Roret gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90: 797-807.
12. Ben-Cherit E. Familial Mediterranean fever (FMF) and renal AA amyloidosis-phenotype genotype correlation, treatment and prognosis. *J Nephrol* 2003; 16(3): 431-4.
13. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 473-83.
14. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doulas 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(5): 458-67.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ayşenur Öztürk  
Doğum Tarihi : 14.08.1979  
Doğum Yeri : Samsun  
Adres : 73. Sok. 29/4 Emek / ANKARA  
E-mail : ozturkaysenur@yahoo.com.tr

### EĞİTİM:

2002-2004 Yüksek Lisans  
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı

1998-2002 Lisans  
Ankara Üniversitesi  
Fen Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

1994-1997 Lise  
Samsun Atatürk Lisesi

### YAYINLAR

1. **Öztürk A**, Elsobky E, Elsayed S, Alhodhod M, Akar N. 2009. "Mutational Analysis of Mefv Gene in Egyptian Patients with Familial Mediterranean Fever." Turk J Med Sci, in press.
2. Sipahi T, Kuybulu A, **Öztürk A**, Akar N. 2009. "Protein Z G79A Polymorphism in Patients With Severe Sepsis." Clin Appl Thromb Hemost. Jan 4. [Epub ahead of print]
3. Eroğlu A, **Öztürk A**, Cam R, Akar N. 2008. "Intron F G79A polymorphism of the protein Z gene in cancer patients with and without thrombosis." J Thromb Thrombolysis Feb 5. [Epub ahead of print]
4. **Öztürk A**, Özçakar B, Ekim M, Akar N. 2008. "Is MEFV Gene Arg202Gln (605G>A) A Disease-Causing Mutation?" Türk J Med Sci. 38(3); 205-208.

5. **Öztürk A**, Eğin Y, Deda G, Teber S, Akar N. 2008. "Protein Z G79A polymorphism in Turkish pediatric cerebral infarct patients." Turk J Hematol. 25 (3): 133-135.
6. Eroğlu A, **Öztürk A**, Cam R, Akar N. 2008. "Vascular endothelial growth factor gene 936 C/T polymorphism in breast cancer patients." Med Oncol. 25 (1): 54-55.
7. Yalçinkaya F, Özçakar B, Kasapçopur Ö, **Öztürk A**, Akar N, Bakkaloğlu A, Arısoy N, Ekim M, Özen S. 2007. "Prevalence of the MEFV Gene Mutations in Childhood Polyarteritis Nodosa." J Pediatr. 151 (6): 675-678.
8. Akar N, Hasipek M, **Öztürk A**, Akar E, Tekin M. 2006. "Serum amyloid A1 -13 T/C alleles in Turkish familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis." J Nephrol. 19 (3): 318-321.
9. Akar N, **Öztürk A**, Ozel D, Akar E, Ekim M. 2006. "Is MEFV P706 polymorphism important in familial Mediterranean fever patients?" J Nephrol. 19 (1): 119-120.
10. Karahan ZC, **Öztürk A**, Akar E, Akar N. 2005. "Interleukin-6 (IL-6)-174 G/C polymorphism in familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. J Nephrol. 18 (5): 582-584.
11. Akar E, Tunc Ş, Arcasoy A, **Öztürk A**, Akar N. 2004. "Further observation of Hemoglobin Beograd (B121 Glu-Val) In Turkish population." Turk J Haematol. 21(3): 149-151.

## POSTERLER / SÖZLÜ SUNUMLAR

- 08-11 Ekim 2008 34. Ulusal Hematoloji Kongresi  
İzmir  
“FVII Promoter Bölge Gen Değişimlerinin Haplotip  
Gruplandırmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması”  
Poster / Genç Katılımcı Ödülü
- 04-06 Mayıs 2007 Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi  
Adana  
“İskemik İnfarktüsli Türk Pediatrik Hastalarda G79A Polimorfizmi”  
Poster
- 24-26 Mart 2007 II. Moleküler Tıp Kongresi  
İstanbul  
“Distribution Of MEFV Mutations In Egyptian FMF Patients” Poster
- 8-12 Kasım 2006 32. Ulusal Hematoloji Kongresi  
Antalya  
“İskemik İnfarktüsli Türk Pediatrik Hastalarda Protein Z G79A  
Polimorfizmi” Sözlü Bildiri / Poster
- 14-18 Mayıs 2006 19<sup>th</sup> International Congress on Thrombosis  
Tel-Aviv / İsrail  
“G79A Polymorphism in Turkish Pediatric Patients with Ischemic  
Infarct” Poster
- 05-07 Mayıs 2006 Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi  
İzmir  
“İskemik İnfarktüsli Türk Pediatrik Hastalarda G79A Polimorfizmi”  
Poster
- 06-10 Kasım 2005 The Fourth International Congress on Systemic Autoinflammatory  
Diseases  
Bethesda, Maryland / ABD  
“Prevalence of MEFV mutations in children with PAN not-  
associated with FMF” Poster
- 22-25 Haziran 2005 41. Türk Pediatri Kongresi  
Ankara Üniversitesi  
Ankara  
“Türk Toplumunda Nadir Görülen FMF Mutasyonları ve P706  
Polimorfizminin Önemi” Sözlü Bildirilerde 2.’lik Ödülü
- 21-24 Nisan 2004 VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi  
GATA  
Antalya