

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİ
FMF (AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ) HASTALIĞI
MEFV GEN MUTASYONLARI
DAĞILIMLARININ İNCELENMESİ**

Numan TAŞPINAR
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Hasan DOĞAN
Yüksek Lisans Tezi-2011

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞU ANADOLU BÖLGESİ FMF (AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ)
HASTALIĞI *MEFV* GEN MUTASYONLARI DAĞILIMLARININ
İNCELENMESİ

Numan TAŞPINAR

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Hasan DOĞAN

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM- 2011

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞU ANADOLU BÖLGESİ FMF (AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ) HASTALIĞI
***MEFV* GEN MUTASYONLARI DAĞILIMLARININ İNCELENMESİ**

Numan TAŞPINAR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :02.05.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :01.06.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Hasan DOĞAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bünyami ÜNAL

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN



2011

ERZURUM

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yürütölmek üzere ‘Doğu Anadolu Bölgesi FMF(Ailesel Akdeniz Ateşı) Hastalığı *MEFV* Gen Mutasyonları Dağılımlarının incelenmesi’ adlı Yüksek Lisans tez konusu Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulunun 26.10.2010 tarih ve ‘’2010.5.1/26’’ numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY	I
İÇİNDEKİLER	II
TEŞEKKÜR	IV
KISALTMA ve SİMGELER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ÖZGEÇMİŞ	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA, FMF)	2
2.2. Tarihçe	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Patogenez	5
2.5. FMF 'de Klinik Bulgular	8
2.5.1. Ateş	9
2.5.2. Karın ağrısı	9
2.5.3. Eklem bulguları	10
2.5.4. Göğüs ağrısı	10
2.5.5. Cilt bulguları	11
2.5.6. Kas bulguları	11
2.5.7. Vaskülit	11
2.5.8. Diğer sistem tutulumları	12
2.5.9. Amiloidoz	12
2.6. FMF Laboratuvar Bulguları	13
2.7. Kolşisin	13
2.8. PYRİN/Marenostrin	15
2.9. FMF Genetiği	17
2.10. FMF 'de genotip ve fenotip ilişkisi	24
2.11. Moleküler Teknikler	25

2.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR/PZR)	25
2.11.2. DNA dizi analizi	25
3. MATERYAL ve METOD	27
3.1. İncelenecek Örneklerin Toplanması	27
3.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	27
3.3. DNA Dizi Analizi Çalışması.....	28
3.3.1. DNA dizi analizi ve hazırlık aşamaları.....	28
3.3.1.1. MEFV genin için PCR reaksiyonunun hazırlanması	28
3.3.1.2. PCR şartları	29
3.3.1.3. Ekzon 2 için PCR'ın hazırlanışı	30
3.3.1.4. PCR ürünlerinin temizlenmesi	32
3.3.1.5. Agaroz jelin hazırlanışı.....	32
3.3.1.6. PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi	33
3.3.1.7. Sekans PCR şartları.....	35
3.3.1.8. DNA dizi analiz reaksiyonu	36
3.3.1.9. DNA dizi analizinin değerlendirilmesi	37
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA	45
SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR.....	56

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. İbrahim PİRİM hocama ve anabilim dalı öğretim üyemiz ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hasan DOĞAN 'a samimi duygularıyla yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Vermiş oldukları desteklerden dolayı çalışma arkadaşlarım Uzman Dr. Nilnur EYERCİ, Arş. Gör. G. Zişan ŞAHİN, Bio. Eda DİYARBAKIR, Bio. Atilla TOPÇU, Bio. Mehmet EZER, Bio. Nuriye GİNİŞ ve Lab.Tek. Melek SEVCİ 'ye yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu güne kadar hiçbir şeyi esirgemeyen ve hep yanımda dayanak olan babam Mahir TAŞPINAR 'a çok sevgili anneme ve kardeşlerime ayrıca manevi desteğinden dolayı Neslihan DİLER 'e teşekkürü borç bilirim.

ERZURUM, 2011

Numan TAŞPINAR

KISALTMA ve SİMGELER

A	: Adenin bazı
AA	: Amiloid A
AAA	: Ailesel Akdeniz Ateşi
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System
ASC	: Apoptosis associated speck like protein with CARD
ATP	: Adenozin Trifosfat
C	: Sitozin bazı
CTP	: Sitozin Trifosfat
CARD	: Caspase Recruitment Domain (Kaspaz toplanma bölgesi)
CRP	: C-Reaktif Protein
C5a	: Kompleman 5a
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dH₂O	: Deiyonize su
ddNTP	: Dideoksinükleotidler
FMF	: Familial Mediterranean Fever
G	: Guanin bazı
GTP	: Guanozin Trifosfat
HSP	: Henoch-Schönlein Purpurası
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
Kb	: Kilobaz
MEFV	: Ailesel Akdeniz Ateşi geni
mRNA	: Mesanger Ribonükleik asit

NF-KB	: Nüklear Faktör Kappa Beta
PAN	: Poliarteritis nodosa
PZR (PCR)	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri
SAA	: Serum Amiloid A
T	: Timin bazı
Taq	: Thermus aquaticus
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TRAPS	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom
TTP	: Timidin Trifosfat
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Pryn Proteininin alt birimlerinin şematik gösterimi.	16
Şekil 2. 16.Kromozomda <i>MEFV</i> Lokalizasyonu NCBI	17
Şekil 3. <i>MEFV</i> Geninin Ekzonlarında Tesbit Edilen Polimorfizmler ve Mutasyonlar ..	18
Şekil 4. Dizi Analizi İçin Kullanılan Exon2 Bölgesi ve Primer Oturma Bölgeleri. (Küçük Harfli Sıralanmış Bölge İntronu Göstermektedir.....)	30
Şekil 5. Ekzon10 PCR Ürünlerinin Agaro Jelde Görüntüsü.....	33
Şekil 6. <i>MEFV</i> geni ne ait normal (wild) tip de DNA dizi analiz görüntüsü.	38
Şekil 7. <i>MEFV</i> genine ait Heterozigot tip de DNA dizi analiz görüntüsü.....	38
Şekil 8. <i>MEFV</i> genine ait homozigot tip de DNA dizi analiz görüntüsü.....	39

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	<i>MEFV</i> Geninde Görülen Mutasyonlar, Polimorfizmler ve Aminoasit Değişimler	19
Tablo 2.	Ekzon 10 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (İleri) ve Revers (Geri) Primer Dizileri	28
Tablo 3.	<i>MEFV</i> Geninin Ekzon 10 Bölgesinin Çoğaltılmasında PCR nin Bileşenleri ve Miktarları.....	29
Tablo 4.	<i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesi PCR Isı Değişiklikleri	29
Tablo 5.	Ekzon 2 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (ileri) ve Revers (geri) Primer Dizileri	30
Tablo 6.	<i>MEFV</i> Ekzon 2 İçin 30 µl'lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	31
Tablo 7.	<i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesi PCR Isıl Değişiklikleri.....	31
Tablo 8.	<i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 µl'lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	34
Tablo 9.	<i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PCR Isıl Değişkenleri	34
Tablo 10.	<i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 µl'lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	35
Tablo 11.	<i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PCR ısı Değişkenleri.....	35
Tablo 12.	Cinsiyete göre Genotip dağılımı	40
Tablo 13.	<i>MEFV</i> geni Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgeleri mutasyonlarının sadece mutasyon taşıyan bireyler arasındaki dağılımları.	41
Tablo 14.	<i>MEFV</i> geni Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgeleri mutasyonları genel çalışma grubundaki dağılımları.	42
Tablo 15.	Çalışılan hasta grubuna ait <i>MEFV</i> geni genotip sonuçları.	43

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Erzurum Pasinler de doğdum. İlk öğrenimi Pasinler de tamamladıktan sonra Fen Lisesi sınavlarını kazanarak 1992-1995 yılları arasında Erzurum Fen Lisesine devam ettim. 1996 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölüme kayıt yaptırdım ve 2001 yılında mezun oldum. 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisansa başladım ve halen yüksek lisans öğrenimine devam etmekteyim.

ÖZET

DOĞU ANADOLU BÖLGESİ FMF (AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ) HASTALIĞI MEFV GEN MUTASYONLARI DAĞILIMLARININ İNCELENMESİ

Ailesel Akdeniz ateşi(AAA, FMF (Familial Meditarian Fever)) aralıklı olarak tekrar eden ateş, peritonit, plevrit ve artrit ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. FMF geni *MEFV*; 16. Kromozomda 16p13.3 bölgelenmiştir. Gen 10 ekzondan oluşmuş olup pozisyonel klonlama yoluyla tanımlanmıştır. Şuana kadar dünya genelinde 200 mutasyon ve polimorfizm tespit edilmiştir. Mutasyonların çoğu ekzon 10 ve ekzon 2 bölgesindedir. Doğu Akdeniz popülasyonunda en yaygın 4 mutasyon; M694V, V726A, M680I ve R761H dir.

Bu çalışma 2530 FMF ön tanılı vakayı içermektedir ve DNA Dizi Analizi tekniğiyle *MEFV* geninin ekzon10 ve ekzon2 bölgeleri çalışılmıştır. DNA periferik kandan izole edildi. PCR ekzon10 ve ekzon2 primerleriyle yapıldı ve ekzon analizleri Dizi Analizi yöntemiyle yapıldı.

Yapılan analizler sonucunda biz normal genotipi %58.58 ve mutasyonlu genotipi ise %41.42 olarak tespit ettik. Doğu Anadolu bölgesinde FMF ön tanılı 1048 hastada *MEFV* gen mutasyonlarının frekansları sırasıyla ekzon10 da M694V %57,16 (n=599), V726A %27.19 (n=285), M680I %20.80 (n=218), R761H %8,87 (n=93) ve ekzon2 de ise E148Q %6,68 tespit edildi. Tespit edilen nadir mutasyonlar ise A744S (n=15) ve M694I (n=3), E148V (n=3), T267I (n=3), E167D (n=2) ve L110P (n=1) olarak belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda FMF hastalarında yaygın olarak tespit edilen M694V mutasyonu diğer mutasyonlardan daha yüksek olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: Ailesel Akdeniz Ateşi, *MEFV*, Dizi Analizi

ABSTRACT

DETERMINATIONS OF MEFV GENE MUTATIONS PREVALENCE IN THE FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER (FMF) AT THE REGION OF EAST ANATOLIA

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal inflammatory recessive disease characterized by recurrent episodes of fever accompanied by peritonitis, pleuritis, or arthritis. The FMF gene, MEFV, is located on chromosome 16p13.3. It has been identified by positional cloning and comprises 10 exons. Until now with 200 mutations and polymorphisms having been identified in the world. Exon 2 and 10 carry most mutations. The 4 mutations; M694V, V726A, M680I and R761H are the most common mutations in East Mediterranean populations.

The study involved in 2530 cases who were clinically pre-diagnosed as FMF and studied exon 2 and exon 10 of MEFV gene by DNA sequencing techniques. Peripheral blood taken and DNA was isolated. The PCR was performed with exon 2 and exon 10 primers and exons analysis were made by the gene alignment sequence.

As the result of the analysis, we established %58.58 wild genotype and %41.42 mutant genotype. In FMF pre-diagnosed 1048 patient with mutations MEFV gene mutations frequency were M694V %57,16 (n=599), V726A %27.19 (n=285), M680I %20.80 (n=218), R761H %8,87 (n=93) on exon 10 and 2 E148Q %6,68 (n=70) on exon 2 respectively. The rare mutations were detected as A744S (n=15), M694I (n=3), E148V (n=3), T267I (n=3), E167D (n=2) and L110P (n=1) in the East Anatolian region.

In conclusion, in our patients M694V mutation was found higher than the other mutations that has been detected commonly in patients with FMF.

Key Words: Familial Mediterranean fever, MEFV, sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ailesel Akdeniz ateşi (AAA) veya FMF (Familial Meditarian Fever) olarak adlandırılan hastalık, aralıklı olarak tekrar eden ateş, peritonit, plevrit ve artrit ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır.¹ Hastalığın en ağır komplikasyonu ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan amiliodoz ve böbrek yetmezliğidir.² Türk FMF hastalarında amiloid gelişiminin diğer etnik gruplara oranla daha sık görüldüğü belirtilmiştir.³ Hastalık sıklıkla Askenazi olmayan Yahudiler, Araplar, Ermeniler, Türkler de görülmekte olup¹ diğer Akdeniz kökenli toplumlarda⁴ ve Kürt, Yahudi olmayan Kafkaslılar, Hintliler ve Çinlilerde görülmektedir.⁴ Hastalık belirtileri çoğunlukla 20 yaş öncesinde ortaya çıkar ve atak süresi 12 ile 72 saat arasında değişir. Ataklar arası semptomsozdur fakat enflamasyon devam edebilir.⁵

Şimdiye kadar FMF 'le ilgili olarak 200 mutasyon ve polimorfizm belirlenmiştir.⁶ Doğu Akdeniz toplumlarında mutant allel sıklığı çok yoğun olup exon10 bölgesinde en sık rastlanan mutasyonlar M694V, V726A, M680I ve R761H dır.⁷

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma hastanelerine başvuran FMF ön tanılı hastalarda *MEFV* geninin exon10 ve exon2 bölgelerinde DNA dizi analizi yapılarak Erzurum ve çevresindeki FMF mutasyonları ve sıklıkları tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA, FMF)

FMF Doğu Akdeniz toplumlarında özellikle Türk, Yahudi, Ermeni ve Arap populasyonların da sık görülen, bununla birlikte Yunan, İtalyan, İspanyol ve Japon gibi diğer populasyonlarda da gözlenmiş otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır.^{8, 9} FMF hastalığının prevalansı yüksek olan ülkelerden biri Türkiye'dir. Anadolu'da FMF dağılım oranı yaklaşık olarak 1:400 dür. Türklerde en sık rastlanan mutasyonlar M694V, M680I, V726A, R761H ve E148Q dur.⁴

Prevalansı, Askenazi olmayan Yahudilerde¹⁰ 1/256-1/500, Türklerde 1/1073 olarak bildirilmiştir.¹¹ Taşıyıcı sıklığı Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/5, Askenazi Yahudilerinde¹⁰ 1/11, Ermenilerde¹² 1/7 ve Türklerde¹³ ise 1/5 olarak bulunmuştur.

FMF hastalığı kliniği aralıklı olarak tekrar eden 38-40 dereceye varan ateş, peritonit, plevrit ve özellikle diz bilek ve dirsekleri tutan akut sinovit ile 1 ila 3 gün arası devam eden ve semptomsuz dönemler içeren bir hastalıktır. Ataklar arası dönemde hastaların genel durumları oldukça normaldir. Bununla birlikte çocuklarda baş ağrısı ve yorgunluk şikayetleri gözlenmiştir. Ataklar her hafta tekrarlayabileceği gibi bazen haftalarca hatta aylarca tekrarlamayabilir. Klinik semptomlar genellikle hastaların yaklaşık % 25' inde yaşamın ilk 4 yılında, % 80'inde ise ilk 10 yılında ortaya çıkar. Hastalığın en ağır komplikasyonu amiloid A (AA) tipi amiloidozdur ve bu durum böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir.¹⁴

2.2. TARİHÇE

Ailesel Akdeniz Ateşi 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. "Unusual paroxysmal syndrome" olarak tanımlanan hastalık sonraları "Recurrent polyserositis", Recurrent hereditary polyserositis" gibi çeşitli adlarla tanımlanmıştır.¹⁵ İlk olgudan sonra 1945 yılında Amerikalı araştırmacı Siegal, 10 vakada “Benign Paroksizmal Peritonitis”¹⁶ adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları şeklinde görülen hastalığı klinik bir antite olarak tanımlamıştır. Öztürk’ün³ çalışmasında belirtildiği gibi 1948 yılında Reimann “Periyodik hastalık” tanımlamasını, 1952 yılında Catton ve Mamou ilk kez hastalığın ailevi olduğuna dikkat çekmiş ve FMF’li hastalarda amiloid gelişebileceğini bildirmişlerdir. Yine Öztürk’ün³ çalışmasında belirtildiği gibi 1958 yılında Heller ve Sohar ilk kez “Ailevi Akdeniz Ateşi” tanımını kullanmış³ ve 1961 yılında hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir.¹⁷ “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”¹⁸, “Tekrarlayan Poliserözit”¹⁹ ve “Tekrarlayan Kalıtsal Poliserözit”²⁰ 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.²¹

İlk defa 1972 yılında Goldfinger tarafından kolşisinin FMF üzerindeki etkisi gösterilmiştir ve FMF tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.⁹

FMF den sorumlu gen (**M**editarian **F**ever,MEFV) 1992 yılında 16. kromozum kısa kolunda (16p 13.3) bulunduğu saptanmış²², 1997 yılında da Uluslar arası FMF konsorsiyumu ve Fransız FMF konsorsiyumu tarafından birbirinden bağımsız olarak klonlanmıştır. MEFV geni 15kb uzunluğunda, 3505 nükleotid ve 10 exon bölgesine sahip 781 amino asitten oluşmuş olup pyrin veya marenostin adı verilen bir proteini kodlamaktadır.^{23, 24} Pyrinin nötrofillerde eksprese olduğu ve enflamasyonda görev aldığı gösterilmiştir.²⁵

2.3. EPİDEMİYOLOJİ

FMF daha çok Doğu Akdeniz toplumlarından özellikle Askenazi olmayan Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplarda yaygın olarak görülmektedir.¹ Ayrıca azda olsa görülmekte olup Yunanlılar, İtalyanlar, Almanlar, Polonyalılar, Avustralyalılar, Kübalılar, Belçikalılar, Brezilyalılar²⁶ ve Mısırlılarda²⁷ da tanımlanmıştır. FMF dünya genelinde 100.000 den fazla insanı etkileyen en yaygın kalıtsal periyodik hastalıktır.²⁸ Ülkemizde ise hastalık Akdeniz kıyılarından çok, aile kökenleri Kastamonu, Sinop, Tokat, Sivas, Kayseri, Malatya, Kars, Erzurum, Erzincan ve Ağrı'ya dayanan bireylerde daha sık görülmektedir.²⁹

Askenazi olmayan Yahudilerde FMF prevalansının 1/250 ile 1/500 arasında olduğu, Kuzey Afrika Yahudilerinde ise 1/256'dan fazla olabileceği bildirilmiştir.¹⁰ Lübnan'da yaşayan Ermenilerde prevalans 1/500 olarak hesaplanmıştır.^{12, 30} Öztürk³ çalışmasında belirttiği gibi Türklerde FMF prevalansı, 1969 yılında Özdemir ve Sökmen'in yaptıkları bir çalışmada %0.3 olarak bulunmuştur. 1998 yılında Özen ve

arkadaşlarının¹¹ 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. Bununla birlikte Orta Anadolu'daki hastalık prevalansı 1/395 olarak bildirilmiştir.³¹

Taşıyıcı sıklıkları Türklerde¹³ ve Kuzey Afrika Yahudilerinde¹⁰ 1/5, Ermenilerde¹² 1/7, Askenazi Yahudilerinde¹⁰ ise 1/11 olarak bildirilmiştir.

Bazı çalışmalarda hastalığın erkek ve kadınlardaki oranı 1.5-2.0/1.0 olarak¹⁸, erkeklerde daha çok görüldüğü şeklinde bildirilse de¹, hastalıktan iki cinsiyetin de benzer oranlarda etkilendiği gösterilmiştir.³²

2.4. PATOGENEZ

FMF hastalığının etyopatogenezi henüz tam olarak kesinleşmemiş olup patogenezi hakkında birçok görüş mevcuttur. Güncel olarak etyopatogenezi açıklayan görüş enflamasyon yanıtta bir bozukluk olduğu düşünülen görüştür. Buradaki ilk bozukluk, defektif nötrofil lizozom fonksiyonuna bağlı olarak oluşan yalancı inflamatuvar uyarılardır.²⁹

İnflamasyon Pyrin proteinin karboksil ucunda bulunan CARD (Caspase Recruitment Domain) apoptoza giden hücrelerde zerre (speck like) denilen oluşumları bir araya getiren ASC (Apoptosis associated speck like protein with CARD) proteini ile ilişkilidir. IL- β 1'in fonksiyonel hale gelmesinde görev yapan prokaspaz-1'in meydana gelmesinde önemlidir. IL- β 1 oluştuğunda reseptörüne bağlanır ve inflamasyon olaylarının meydana gelmesine neden olur. Pyrin proteini ise ASC ye bağlanarak ASC-prokaspaz-1 ilişkisini engeller ve inflamasyonun oluşumunu durdurur. Mutant pyrin proteini bu görevi yerine getirememekte ve kontrol edilemeyen inflamasyona neden

olmaktadır.³³ Mutant *MEFV* gen ürünü olan pyrinin bozulmuş fonksiyonu, azalmış *MEFV* gen ekspresyonu C5a inhibitörünün yetersizliği ve enfeksiyonların rolü üzerinde de durulmaktadır. Mutant olmayan *MEFV* geninden sentezlenen pyrin proteini C5a inhibitör seviyesini yüksek tutarak bazı inflamatuvar yanıtları baskılamaktadır, aksi takdirde mutasyonlara bağlı olarak C5a seviyesi aktivitesinin düşük kalmasından dolayı atakların oluşmasına neden olmaktadır.

Pyrin kaspaz-I aktivasyonunu da düzenler, pyrin kaspaz-I ile parçalanır ve parçalanan N terminal fragment çekirdeğe gider ve p65 NF-KB ve IKB-alfa ile ilişki kurarak ASC bağımsız NF-KB aktivasyonunu artırır. Pyrinin kaspaz-I için düzenleyici rolüne ek olarak pyrinin parçalanması hem FMF'in moleküler patogenezi anlamada hem de FMF için yeni tedavilerin geliştirilebilmesinde önemli bir ipucu sağlar.

FMF hastalarının serozal ve sinoviyal yüzeylerde polimorf nüveli lökositlerinin baskın olduğu ve migrasyonunun arttığı ve ataksız dönemde de bazı sitokin (IFN-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-8) mRNAlarının üretiminin arttığı gösterilmiştir.³⁴ Atak dönemlerinde ise TNF-alfa CRP, IL-6, soluble TNF reseptör süper ailesi IA ve IB, sIL-2R'nün arttığı gösterilmiştir.³⁵

Lökositler dışında diğer dokularda yapılan *MEFV* gen ekspresyon analiz çalışmalarında pyrin geninin mRNA'sı bulunamamıştır.²³ Pyrin proteinin nötrofillerde ifade edilmesi bu proteinin inflamasyonlarda regülatör olarak görev aldığı hipotezini güçlendirmektedir.^{23, 24}

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.³⁶ 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.³⁷ Son çalışmalar, amiloidogenezin genetik zeminini ortaya çıkarmak için SAA polimorfizmleri üzerine yoğunlaşmıştır. Cazeneuve ve arkadaşları³⁸, Ermeni FMF hastalarında SAA1 α/α genotipinin renal amiloidozu 7 kat artırdığını göstermiştir. Benzer sonuçlar Türk FMF hastalarında da bulunmuştur.⁵ Akar ve arkadaşlarının, Türk FMF hastalarıyla yaptıkları çalışmalarda, SAA1 α/α genotipinin amiloidoz gelişimi açısından 2,5 kat risk getirdiğini³⁹, ayrıca SAA1 -13T/C gen değişiminin amiloidoz oluşumunda etkisi olduğunu göstermiştir.⁴⁰

2.5. KLİNİK BULGULAR

FMF hastalarının çoğunda (yaklaşık %90) klinik bulgular 20 yaşın altında ortaya çıkar. Kısa süreli tekrarlayan ataklarda bulunan klinik bulgular çeşitli şekillerde olabilmesine karşın, en sık görülen nöbet kombinasyonu ateş, karın ağrısı, ve eklem bulgularıdır. İleri aşamalarda amiloidoz ve böbrek yetmezliğinin geliştiği otozomal resesif bir hastalıktır. Hastalarda ateş 38,5 ile 40 dereceye kadar çıkabilmektedir. Ataklar genelde 1-3 gün sürer ve ataklar arasında semptomsuz dönem gözlenir. Bu dönemde hastaların genel durumu çoğunlukla normaldir. Saatlerden günlere kadar sürebilen atakların başlangıcını, stres ve alt klinik enfeksiyonlar oluşturabilir. Atakların sıklığı ve şiddeti yaş ile azalır.⁴¹ Çocuklarda bazen yorgunluk ve baş ağrısı görülebilir. Tekrarlayan ağız yaraları ve yorgunluk hissi gibi nadir semptomlar atak dışı dönemlerde de oluşabilir. Ataklar arası dönem 1-2 hafta sürebileceği gibi haftalarca hatta aylarca da sürebilir. 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.^{25, 42}

FMF' e yönelik tedaviler 1973 yılına kadar ağrıyı hafifletmek veya kesmek yönünde yapılan girişimlerden ibaretti. 1972 yılında Goldfinger⁹ tarafından kolşisinle tedavi önerilmiş ve 1974 yılında Zemer ve arkadaşlarının⁴³ çalışmalarıyla bu tedavi günümüze kadar en yaygın kullanılan yöntem olmuştur.

Hastalık klinik olarak 2 fenotipe ayrılır Fenotip I de yukarıdaki bulgular gözlenirken Fenotip II diye adlandırılan bazı hastalarda da ataklar olmadan amiloidoz birikimi gözlenir.^{13, 44}

FMF, klinik tanı kriterlerine ve moleküler yöntemlere bakılarak tedaviye başlanan bir genetik hastalıktır. Klinik tanıyı koyma yönünde geliştirilmiş olan üç farklı

kriterler grubu vardır. Bunlardan en geçerli ve kullanışlı olan Tel-Hashomer tanı kriterleridir.⁴³ Hastalık tanısında Tel-Hashomer kriterleri kullanılarak kesin tanı için iki majör yada bir majör ve iki minör kriter gerekirken muhtemel tanı içinse bir majör ve bir minör kriter seçicidir.¹⁴

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 derece akrabada FMF varlığı

2.5.1. Ateş

FMF'in en sık görülen klinik bulgusudur. Yalnız ateş ile birlikte süren nadir ataklar olabilmesine karşın, çoğunlukla diğer klinik bulgular ile birlikte görülür. Ateş, atak boyunca yüksek kalır. Vücut ısı 40°C düzeyine kadar yükselebilir. Hatta ateşli dönemlerde febril konvülsiyon dahi görülebilir. Bazı hastalarda ateş çok yükselmediği için gözden kaçabilir. Aynı hastanın bazı nöbetlerinde yüksek, bazılarında düşük ölçülebilir.²⁹

2.5.2. Karın ağrısı

FMF'in ateşten sonra en sık görülen klinik bulgusudur. Hastaların ortalama %95'inde görülür. Karın ağrısı klinikte çoğunlukla kronik karın ağrısı tablosu ile karıştırılabilir. Bu nedenle hastaların ortalama %30-40'ında tanı atlanmakta ve

apendektomi uygulanmaktadır. Bu yüzden FMF hastalarına elektif apendektomi yapılmasını öneren araştırmacılar da vardır. Karın ağrısını çoğunlukla bulantı, kusma ve kabızlık eşlik eder. Atak sonrasında belirginleşen ishal, hastalığın önemli klinik bulgularından birisidir ve bu bulguların yarısında bu dönemde dışkıda gizli kan bulunmaktadır.²⁹

2.5.3. Eklem Bulguları

Ateş ve karın ağrısından sonra, FMF' in en sık görülen klinik bulgusudur (%60-70) ateş ve karın ağrısı olmaksızın da ortaya çıkabilir. Eklem tutulması %70 olguda artrit, %30 olguda ise atralji şeklinde görülür. FMF'deki artrit, çoğunlukla alt ekstremitelere yerleşen, sekel bırakmayan, gezici olmayan, nonerozif, akut mono artritlerdir. Genellikle birkaç gün veya 1-2 hafta içerisinde kendiliğinden kaybolur. Ailesel Akdeniz Ateşindeki eklem tutulumunda, en çok ayak bileği ve dizler etkilenir. Daha sonra ise sırası ile kalça, el bileği, omuz ve dirsekler hastalığa katılabilir. Ayak bileğinde oluşan artritlerin %50'sinde ayak sırtında eritem gözlemlenebilir. Çok nadiren oligo veya poliartiküler tipde eklem tutulumu ve uzamış artritler görülebilir. Birkaç ay ya da yılı bulan, ancak yine spontan kaybolan bu kronik seyirli artritlerin %3-5 kadarında geriye dönüşümsüz değişiklikler ortaya çıkabilir. Ailesel Akdeniz Ateşindeki artrit, başlangıçta sıklıkla yanlış tanı alabilmektedir. Başta gelen yanlış tanımlar ise akut romatizmal ateş ve juvenil kronik artritlerdir.²⁹

2.5.4. Göğüs ağrısı

Ailesel Akdeniz Ateşindeki göğüs ağrısı oluşan plörite ve perikardite bağlı olarak ortaya çıkar. Oluşan ağrı çoğunlukla tek taraflıdır, göğüs alt tarafına ve dış yana yerleşir. Atak sırasında çekilen grafite plevral sıvı saptanabilir. Göğüs ağrısı ateş ile

gözlenir. Perikard tutulumu daha çok akut perikardiyal tamponat şeklinde olur ve çok nadirdir.²⁹

2.5.5. Cilt bulguları

Hastaların yaklaşık %20-25'inde cilt bulgularına rastlanır. En sık rastlanan cilt bulgusu erizipeli andıran tipte görülen eritemdir. Bu lezyon çoğunlukla ayak sırtında ve tibia alt yüzünde yer alan kızarık, şiş ve ağrılı bir lezyondur. Döküntü ağrılı dönemlerde ve artritle birlikte çıkar. En önemli olan diğer bir cilt bulgusu ise vaskülitlerdir. Ayakta uzun süre durmakta ya da gebelikte ortaya çıkabilen non-spesifik purpuradan başka, nodüler eritem, makülopapular döküntü ve ürtiker ile görülebilir.²⁹

2.5.6. Kas bulguları

FMF' de çeşitli sebeplere bağlı olarak adale tutulumu ortaya çıkabilir. Kısa veya uzamış febril adale atakları, egzersize bağlı baldır ağrısı, fibromiyaloji, kolşisin mitopatisi başlıca sebeplerdir. Ateş bulunmaz ve hastanın subjektif şikâyetlerini destekleyecek fiziksel veya laboratuvar bulgusu yoktur. Kas tutulumuna ait bulgular hastaların % 30-40'ında ortaya çıkabilir.⁴⁵

2.5.7. Vaskülit

Ailesel Akdeniz Ateşinin seyri sırasında belirgin olarak artmış sıklıkla vaskülitlere rastlandığı, yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. FMF 'de en sık görülen vaskülit, Henoch-Schönlein Pururasıdır (HSP) .Burada ilginç olan noktalardan birisi, hastaların çoğuna önce HSP daha sonra FMF tanısının konulmasıdır. Normal popülasyona göre artmış sıklıkla görülen diğer bir vaskülit tablosu poliarteritis nodozadır. Çoğunlukla hastalığın seyri sırasında ortaya çıkmaktadır ve FMF 'e özgü

olan en önemli bulgusu, perirenal hematomdur. Çocukluk ve gençlik çağlarında ortaya çıkan polyarteritis nodosa (PAN) 'da FMF mutlaka sorgulanmalıdır. Diğer bir vaskülitik tabloda uzamış febril miyaljidir. Yüksek sedimentasyon hızı ve kortikostereoidlere belirgin yanıtla karakterizedir.²⁹

2.5.8. Diğer sistem tutulumları

FMF'nin seyri sırasında, skrotal, tiroid ve nörolojik sistem tutulumu gözlenebilir. Skrotal tutulum çoğunlukla çocuklarda, ateşli atağın bir komponenti olarak akut skrotum şeklinde olur. Nörolojik tutumda ise en sık görülen bulgu baş ağrısıdır. Nadiren de hastalığın seyri sırasında aseptik menenjit görülebilir.²⁹

2.5.9. Amiloidoz

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.⁴⁶

Albüminüri, renal amiloidoz oluşumunun erken evrelerinde görülmektedir. Bu yüzden rutin idrar analizleri FMF hastaları için zorunludur. Teşhisin doğrulanması ise renal veya rektal biyopsiyi gerektirmektedir.⁴²

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.¹

- Amiloidoz sıklığı çeşitli etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. Askenazi olmayan Yahudilerde %80 ve Anadolu Türklerinde %60 olarak bildirilmiştir.^{1,3}

Yapılan son çalışmalar ise, Türk FMF hastalarında amiloidoz gelişiminin %7-13 oranında olduğunu göstermektedir.⁴⁷ Amiloidoz, Iraklılar, Askenazi Yahudileri ve Araplarda daha az görülmektedir.²⁰

- Ailesinde amiloidoz öyküsü bulunan hastalar bulunmayanlarla karşılaştırıldığında ise, amiloidoz gelişimi açısından 6 katlık bir riske sahip oldukları bulunmuştur.⁴⁷

- 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.¹²

2.6. FMF LABORATUAR BULGULARI

FMF 'li hastalar için kesin tanı koydurucu bir laboratuvar testi yoktur. FMF atakları esnasında nonspesifik bir akut faz yanıtı olur ve CRP, fibrinojen, serum amiloid A, α 2-globulin, β -globulin düzeyleri ve eritrosit sedimentasyon hızı artar. Lökositoz olur. Bu testlerin tümü genel olarak nöbetler arasında normaldir. Bazı hastalardaki akut faz yanıtı daha silik olarak ataklar arasında da görülebilir. Ataklar sırasında geçici albuminüri ve mikroskopik hematüri görülebilmektedir.²⁶

2.7. KOLŞİSİN

Kolşisin yüksek konsantrasyonda bulunduğu nötrofil mikrotübüllerini tespit ederek yeni mikrotübüllere polimerizasyonu, hücre içi taşınımı, mitozu, yangı aracı salınımını ve kemotaksisi önler. İnflamasyon bölgesine lökosit transferini engeller. Ayrıca membran üzerindeki adezyon moleküllerinin (endotel hücrelerinde E-selektin, nötrofillerde L-selektin) ifadesini azaltarak nötrofillerin hedef serozal dokulara bağlanmasını engeller.^{22, 48}

Kolşisin tedavisine yanıtta bireysel farklılıkların genetik yatkınlık ve çevresel faktörlere bağlı olduğu bildirilmiştir.⁴⁷ Ancak temel olarak kolşisinin etkinliği 3 faktöre bağlıdır. Bunlardan ilki tedaviye başlanma anındaki böbrek hastalığının düzeyidir. İkinci faktör uygulanan ilaç dozudur. Üçüncü faktör ise tedaviye başlanıldığı andaki histopatolojik bulgulardır.^{47, 49}

Kolşisin, 1972 yılından bu yana FMF tedavisinde kullanılmaktadır.^{9, 50, 51} FMF ataklarının sıklığı ve şiddetini azalttığı gibi^{43, 52}, çeşitli dokularda amiloid fiberlerinin düzenlenmesi ve birikimini engelleyerek amiloidoz gelişimini de önlediği gösterilmiştir.⁵³ Kolşisin, renal fonksiyon gerilemesini hafifleterek, amiloidozdan kaynaklı böbrek yetmezliği olan hastalarda proteinüriyi azaltabilir.⁵⁴

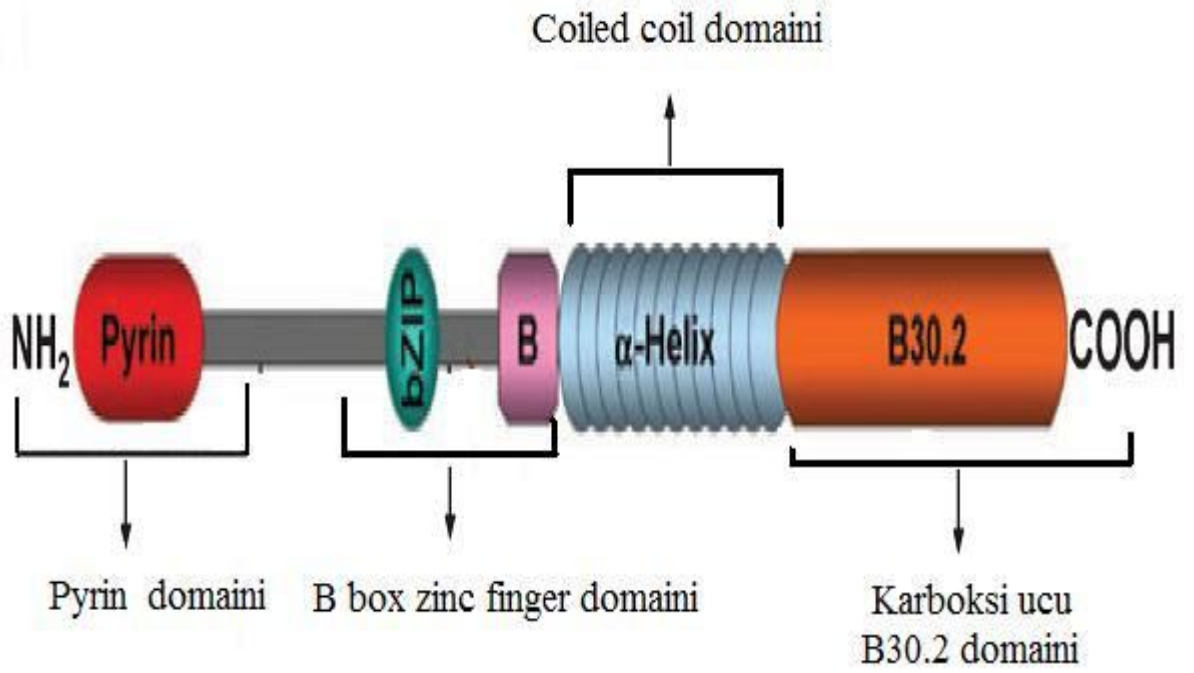
Kolşisinin, kanda SAA düzeyini azaltmak suretiyle FMF ataklarının kontrolünde dolaylı, amiloid fiberlerinin organizasyonu ve birikimi üzerindeki direkt etki ile amiloidoz gelişimini önlediği ileri sürülmektedir.⁵⁵ Kolşisin, lökosit kemotaksisini doğrudan inhibe eder. Ayrıca, beyaz kan hücreleri ve endotelial hücreler üzerinde adezyon moleküllerini azaltmak suretiyle, inflamasyon bölgesine lökosit transferini engeller.⁵⁶ Bunlara ek olarak, kolşisinin serozal hücrelerde C5a aktivitesini artırabildiği ve böylece akut FMF ataklarını ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir.⁵⁷

2.8. PYRİN/Marenostrin

FMF geninin kodladığı proteini Fransız grup Akdeniz'in Latince isminden gelen Marenostrin olarak isimlendirmektedirler. Uluslararası Konsorsiyum ise Yunanca'da ateş anlamına gelen Pyrin olarak isimlendirmektedir.⁵⁸

Pyrin proteini özellikle monosit, granülosit ve dentrik hücreler gibi inflamasyonda görev alan hücrelerde daha çok eksprese olmaktadır. FMF hastalığındaki görevi daha tam olarak anlaşılamamasına rağmen inflamatik reaksiyonlarda direkt ve ya indirekt olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Marenostrin/Pyrin bir transkrip faktörü olduğuda tahmin edilmektedir. Çünkü Çinko-Parmak DNA Bağlama protein grubu proteinleri ile benzer güçlü bir homolojiye sahiptir. Ancak yapılan imminofloresans çalışmalarında beklenmedik bir şekilde bu proteinin sitoplazmada ve mikrotübüllerde lokalize olduğu görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda bir transkrip faktörü olabileceği bilgisini değiştirmektedir.⁵⁸

Pyrin/Marenostrin 86 kd molekül ağırlığında olan ve 781 aminoasitten meydana gelen bir proteindir (Şekil 1). Pyrin proteininin ilk 92 aminoasitlik kısmı pyrin bölgesi olarak adlandırılmaktadır, mutasyonlar bu kısmın görev yapamaması sonucu oluşan inflamasyonun devam etmesine sebep olurlar.⁵⁹

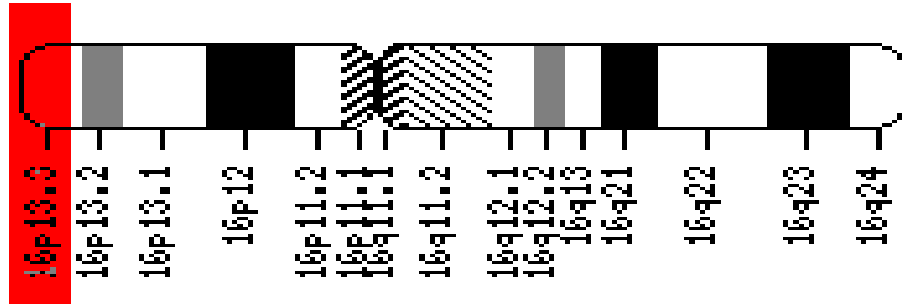


Şekil 1 . Pyrin Proteininin alt birimlerinin şematik gösterimi.

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 domain

2.9. FMF GENETİĞİ

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığına yol açan *MEFV* geni 16. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır (Şekil.2). *MEFV* geni 10 ekzondan oluşmakta ve Pýrin denilen proteini kodlamaktadır.



Şekil 2. 16. Kromozomda *MEFV* Lokalizasyonu NCBI

FMF hastalığı otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalık olmasına rağmen dominant geçişi de gösterilmiştir. Bu özel durum daha çok yalancı dominant geçiş olarak adlandırılır özellikle ciddi mutasyonları taşıyan eşler akraba ve aile içi evliliklerde yüksek oranda meydana geldiği açıklanmıştır.⁵⁸ *MEFV* geni 10 ekzonluk bir gen olup 781 aminoasitlik bir pýrin/marenostrin adı verilen proteini kodlamaktadır. *MEFV* de tespit edilen mutasyonlar ekzon 1, 2, 3, 5, 9 ve 10'da bulunmaktadır. Bu gende özellikle ikinci ekzon ve onuncu ekzon mutasyonların en çok görüldüğü kısımlar olmaktadır. *MEFV* genindeki mutasyonların çoğu bu proteinin aminoasit dizilimini değiştirmekte ve hastalığa yol açan ataklara neden olmaktadır.⁶

2011 yılı itibariyle FMF veri tabanında 200 gen değişimi bildirilmiştir⁶ (Şekil 3). Mutasyonların çoğu yanlış anlamlı mutasyon olup, proteinin (Pýrin/Marenostrin) yapısı ve fonksiyonunu değiştirmektedir. Şimdiye kadar tespit edilmiş mutasyon ve polimorfizmler ve aminoasit değişiklikleri Tablo.1'de verilmiştir. Bu 200 gen değişimi

Tablo 1. *MEFV* Geninde Görülen Mutasyonlar, Polimorfizmler ve Aminoasit Değişimleri.

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
1	R42W	c.124 C>T	42. Kodon Arg→Trp
1	A89T	c.265 G>A	89. Kodon Ala→Thr
2	S108R	c.322A>C	108. Kodon Ser→Arg
2	L110P	c.329T>C	110. Kodon Leu→Pro
2	334_335insG	c.334_335insG	334_335. Kodon Glu→fsX130
2	P124H	c.371C>A	124. Kodon Pro→His
2	390_391insGAGG GGAC	c.382_390dup	390_391. Kodon Glu→Asn
2	S141I	c.422G>T	141. Kodon Ser →Ile
2	R143P	c.428G>C	143. Kodon Arg→ Pro
2	E148Q	c.442G>C	148. Kodon Glu →Gln
2	E148V	c.443A>T	148. Kodon Glu→Val
2	A149T	c.445G>A	149. Kodon Glu→Val
2	R151S	c.453G>C	151. Kodon Arg→Ser
2	E163A	c.488A>C	163. Kodon Glu→Ala
2	E167D	c.501G>C	167. Kodon Glu→Asp
2	A171T	c.511G>A	171. Kodon Ala→Thr
2	P175H	c.524C>A	175. Kodon Pro→His
2	T177I	c.530C>T	177. Kodon Thr→Ile
2	S179I	c.536G>T	179. Kodon Ser→Ile
2	P180R	c.539 C>G	180. Kodon Pro→Arg

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
2	G196W	c.586G>T	196. Kodon Glu→Trp
2	R202Q	c.605G>A	202. Kodon Arg→Gln
2	606_621dup	c.606_621dup	606_621. Kodon Ser→AlafsX39
2	E225D	c.675G>C	225. Kodon Glu→Asp
2	E230K	c.688G>A	230. Kodon Glu→Lys
2	G236V	c.707G>T	236. Kodon Gly→Val
2	S242R C>G	c.726C>G	242. Kodon Ser→Arg
2	S242R C>A	c.726C>A	242. Kodon Ser→Arg
2	E251K	c.751G>A	251. Kodon Glu→Lys
2	761_764dup	761_764dupCG>A	761_764. Kodon sn→ArgfsX70
2	T267I	c.800C>T	267. Kodon Thr→Ile
2	A268V	c.803C>T	268. Kodon Ala→Val
2	R278P	c.833G>C	278. Kodon Arg→Pro
2	P283R	c.848C>G	283. Kodon Pro→Arg
2	P283L	c.848C>T	283. Kodon Pro→Leu
2	A289V	c.866C>T	289. Kodon Ala→Val
2	E299G	c.896A>G	299. Kodon Glu→Gly
3	G304R	c.910G>A	304. Kodon Gly→Arg
3	T309M	c.926 C>T	309. Kodon Thr→Met
3	R314H	c.941G>A	314. Kodon Arg→His
3	E319K	c.955G>A	319. Kodon Glu→Lys
3	V328A	c.983T>C	328. Kodon Val→Ala

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
3	R329H	c.986G>A	329. Kodon Arg→His
3	S339F	c.1016C>T	339. Kodon Ser→Phe
3	R348H	c.1043G>A	346. Kodon Arg→His
3	R354W	c.1060C>T	354. Kodon Arg→Trp
3	P369S	c.1105C>T	369. Kodon Pro→Ser
3	Q383K	c.1147C>A	383. Kodon Gln→Lys
3	R408Q	c.1223G>A	408. Kodon Arg→Gln
4	I423V	c.1267A>G	423. KodonIle→Val
4	Q440E	c.1318C>G	440. Kodon Gln→Glu
5	A457V	c.1370C>T	457. Kodon Ala→Val
5	V469L	c.1405G>T	469. KodonVal→Leu
5	E474K	c.1420G>A	474. Kodon Glu→Lys
5	H478Y	c.1432C>T	478. Kodon His→Tyr
5	F479L	c.1437C>G	479. Kodon Phe→Leu
5	V487M	c.1459G>A	487. Kodon Val→Met
5	R501G	c.1501C>G	501. Kodon Arg→Gly
5	R501H	c.1502G>A	501. Kodon Arg→His
5	I506V	c.1516A>G	506. Kodon Ile→Val
5	I513T	c.1538T>C	513. Kodon Ile→Thr
5	G514E	c.1541G>A	514. Kodon Gly→Glu
7	L559F	c.1675C>T	559. Kodon Leu→Phe
8	T577S	c.1729A>T	577. Kodon Thr→Ser

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
8	M582L	c.1744A>C	582. Kodon Met→Leu
9	I591T	c.1772T>C	591. Kodon Ile→Thr
9	A595V	c.1784C>T	595. Kodon Ala→Val
10	G632S	c.1894G>A	632. Kodon Gly→Ser
10	I640M	c.1920C>G	640. Kodon Ile→Met
10	I641F	c.1921A>T	641. Kodon Ile→Phe
10	P646L	c.1937C>T	646. Kodon Pro→Leu
10	L649P	c.1946T>C	649. Kodon. Leu→Pro
10	R653H	c.1958G>A	653. Kodon Arg→His
10	E656A	c.1967A>C	656. Kodon Glu→Ala
10	D661N	c.1981G>A	661. Kodon Asp→Asn
10	S675N	c.2024G>A	675. Kodon Ser→Asn
10	G678E	c.2033G>T	678. Kodon Gly→Glu
10	M680L	c.2038A>C	680. Kodon Met→Leu
10	M680IGC	c.2040G>C	680. Kodon Met→Ile
10	M680IGA	c.2040G>A	680. Kodon Met→Ile
10	T681I	c.2042C>T	681. Kodon Thr→Ile
10	Y688C	c.2063A>G	688. Kodon Tyr→Cys
10	Y688X	c.2064C>G	688. Kodon Tyr→X
10	I692DEL	c.2076_2078del	692. Kodon Ile→del
10	M694V	c.2080A>G	694. Kodon Met→Val
10	M694L	c.2080A>T	694. Kodon Met→Leu

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
10	M694DEL	c.2081_2083del	694. Kodon Met→del
10	M694I	c.2082G>A	694. Kodon Met→Ile
10	K695R	c.2084A>G	695. Kodon Lys→Arg
10	K695M	c.2084A>T	695. Kodon Lys→Met
10	S702C	c.2105C>G	702. Kodon Ser→Cys
10	V704I	c.2110G>A	704. Kodon Val→Ile
10	P705S	c.2113C>T	705. Kodon Pro→Ser
10	R708C	c.2122C>T	708. Kodon Arg→Cys
10	L709R	c.2126T>G	709. Kodon Leu→Arg
10	R717S	c.2149C>A	717. Kodon Arg→Ser
10	I720M	c.2160C>G	720. Kodon Ile→Met
10	V726A	c.2177T>C	726. Kodon Val→Ala
10	F743L	c.2229C>G	743. Kodon Phe→Leu
10	A744S	c.2230G>T	744. Kodon Ala→Ser
10	S749C	c.2246C>G	749. Kodon Ser→Cys
10	I755V	c.2263A>G	755. Kodon Ile→Val
10	P758S	c.2272C>T	758. Kodon Pro→Ser
10	R761H	c.2282G>A	761. Kodon Arg→His
10	I772V	c.2314A>G	772. Kodon Ile→Val
10	P780T	c.2338C>A	780. Kodon Pro→Thr

2.10. FMF 'de genotip ve fenotip ilişkisi

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığının nedeni olan *MEFV* geninin tespit edilmesinden sonra moleküler düzeyde analizlerin gelişmesiyle birlikte bu hastalığa ait fenotip-genotip ilişkileri araştırılması hız kazanmıştır. DNA dizi analizlerinden önceki dönemlerde FMF neden olan mutasyonlar tam olarak tespit edilemiyordu. DNA dizi analizleri yapılmasından sonra bu genetiksel değişimlerin kesin olarak belirlenmesi mümkün olmaya başlandı.²⁴ 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.^{13, 44}

Düzenli olarak kolşisin tedavisi görmeyen M694V homozigot genotipine sahip hastalarda, hastalığın erken yaşta ortaya çıkması, plörezinin daha yaygın olması, artritin daha sık görülmesi ve yüksek sıklıkta amiloidoz oluşumu şeklinde hastalığın daha şiddetli formuyla ilişkilendirilmiştir.^{60, 61} E148Q mutasyonu ise hastalığın daha hafif formuyla ilişkilendirilmiştir.^{62, 63}

Ayrıca amiloidoz birikimi ile diğer genetiksel ve çevresel faktörlerin olabileceği tartışılmıştır.^{5, 38} Bunlardan SAA1, SAA2 ve Apo E üzerine yapılan bir çalışmada SAA1 allelik varyasyonları ile amiloidoz arasında ilişki saptanmıştır.^{38, 64}

2.11. Moleküler Teknikler

2.11.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR/PZR)

PCR, DNA'nın spesifik hedef dizilerinin bölgeye spesifik primerler kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasıdır. PCR işlemi

1-denatürasyon denilen yüksek sıcaklıklarda çift zincirli DNA molekülünün ayrılması,

2-hibridizasyon denilen çoğaltılmak istenen bölgeye uygun sıcaklıklarda primer denilen sentetik oligonükleitidlerin bağlanması ve

3-polimerizasyon denilen DNA zincirinin oluşturularak uzamasıdır. Bu işlem belirli miktarda tekrardan oluşur.

2.11.2. DNA dizi analizi

DNA'nın sahip olduğu nükleotidlerin sırasıyla belirlenmesine DNA dizi analizi denir. Klug ve arkadaşlarının⁶⁴ çalışmalarında belirttiği gibi Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanırken Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem belirli bir bazda sonlanan DNA zincir sentezidir.

a) Maxam-Gilbert yöntemi:

DNA'nın tek bir zinciri kullanılarak dizi analizi yapılır. Bu tek zincirli DNA parçasının 5'ucu polinükleotid kinaz enzimi kullanılması yoluyla radyoaktif olarak işaretlenir. Daha sonra dört ayrı tüpte bulunan DNA'ya nükleotid zincirlerini belirli yerlerden kıran kimyasallar eklenir ve DNA lar kırılır her bir DNA parçası farklı

boyuttur ve 5' uçlarından radyoaktif olarak işaretlidir. Ürünler elektroforez sonrası otoradyografi ile görüntülenir.⁶⁴

b) Sanger DNA dizi analizi yöntemi: Çok sık kullanılan DNA dizi analiz yöntemidir. Dizisi belirlenecek DNA öncelikle tek zincir haline dönüştürülür. Tek zincirli DNA 3' ucuyla birleşecek olan primer ile karıştırılır. Primer bağlı tek zincirli DNA dört ayrı tüpe paylaştırılır. Daha sonra tüplere DNA polimeraz ve dört tip deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) eklenir. Ayrıca her tüpe dideoksinükleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) denilen yapısı değiştirilmiş deoksiribonükleotidlerden bir tanesi eklenir. Dideoksinükleotidler 3'-OH grubu yerine 3'-H içerirler. Deoksiribonükleotidlerden biri daha sonra dizi analizi yapılabilmesi için radyoaktivite ile işaretlenir. Her tüpe DNA Polimeraz konarak primer kalıp zincirin tamamlayıcısını oluşturacak biçimde 5'-3' yönünde zincir uzatılır. DNA sentezi gerçekleşirken DNA polimeraz zincir yerine deoksiribonükleotid yerine ara sıra dideoksinükleotid takar. Dideoksinükleotid yapısında 3'-OH bulunmadığı için diğer nükleotid ile 3' bağı yapamaz ve DNA sentezi durur. Dört ayrı nükleotidi içeren tüplerde reaksiyon A, G, C ve T ile sonlanacaktır. Her bir reaksiyon ürünü jel elektroforezinde yan yana yüklenerek ayrıştırılır. Aşağıdan yukarı doğru okunan nükleotid dizisi, kalıba komplementer olan DNA zincirinin 5'-3' yönündeki dizisine karşılık gelir.⁶⁴

DNA dizi analizi otomatik hale getirilmiştir ve bu sistemde günde yüz binlerce nükleotid dizisini belirleyebilen makineler kullanılmaktadır. Bu işlemde, dört dideoksinükleotid analoglarından her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiştir ve böylece, örneğin, adenosin ile sonlanan zincirler bir renkte iken, sitosin ile sonlanan zincirler başka bir renktedir ve böylece her bir baz için ayrı renkler mevcuttur.⁶⁴

3. MATERYAL ve METOD

3.1. İncelenecek Örneklerin Toplanması

Bu çalışma 2008-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Laboratuvarımıza çeşitli kliniklerden rutin FMF mutasyon analizi için gönderilen FMF ön tanısı almış 2530 hastada Ekzon 10, bu hastalar içerisinde Heterozigot mutasyon bulunan hastalar da ise ayrıca Ekzon 2 bölgesinde de dizi analizi yapıldı. Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgelerinde yaygın olarak görülen mutasyonlar tespit edildi. Hastaların çalışmamıza alınabilirliğine dair etik kurul kararı Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul komitesinden alındı.

Bu hastalar için protokol numarası, ad-soyad, yaş, memleket bilgileri, laboratuvarımıza geliş tarihi, testi isteyen klinik bilgisi, hastalık belirtileri, ilaç kullanıp kullanmadığı bilgisi ve aile öyküsü gibi bilgiler kaydedildi.

Moleküler test için her bir hastadan EDTA'lı tüpe 2 ml kan alındı.

3.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu otomatik DNA izolasyon cihazında yapıldı. MagNA Pure Compact-Roche ve EZ 1 Advanced Blood Kit-Qiagen kullanıldı. 200-300 µl kan örneğinden 100 µl DNA elde edildi.

3.3. DNA Dizi Analizi Çalışması

3.3.1. DNA dizi analizi ve hazırlık aşamaları

Çalışmamızda Sanger DNA dizi analizi yöntemine dayalı olan CEQ/8000 SEQUENCE (Beckman Coulter-ABD) cihazı kullanıldı.

3.3.1.1. MEFV genin için PCR reaksiyonunun hazırlanması

Toplam reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde Tablo 3'deki bileşenler sırasıyla 0.2 µl steril tüplere eklendi. Kullanılan master mix (Promega, M7502) nukleazlardan arındırılmış dH₂O, 50 U/ml *Taq* DNA polimeraz ve enzimin tamponu, 400 µM dNTP ve 3 mM MgCl₂ içermektedir. Karışım iyice homojenize edildi. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan cihazda (Bio-Rad MyCycle) yapıldı (Tablo 4) .

Tablo 2 . Ekzon 10 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (İleri) ve Revers (Geri) Primer Dizileri

Primer adı	Primer Dizileri
F	5'-GAC TTG GAA ACA AGT GGG AGA G-3'
R	5'-CAG GAA GAG AGA TGC AGT GTT G-3'

Tablo 3 . *MEFV* Geninin Ekzon 10 Bölgesinin Çoğaltılmasında PCR nin Bileşenleri ve Miktarları

MEFV Ekzon 10	Miktar
PCR içeriği	[μ l]
Master mix	14
Primer Forward	1.5
Primer Reverse	1.5
dH ₂ O	10
DNA (50 ng/ μ l)	3
Toplam	30

3.3.1.2. PCR şartları**Tablo 4 .** *MEFV* Ekzon10 Bölgesi PCR Isıl Değişiklikleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	7 dk	1
2	94 °C	45 sn	} 30
	54 °C	30 sn	
	72 °C	30 sn	
3	72 °C	7 dk	1
	4 °C	∞	

MEFV geninin ekzon 10 bölgesinde heterozigot mutasyon olan örnekler için 2.ekzonda DNA dizi analizi yapılmıştır (Şekil 4). Altı çizili olan dizi primerleri göstermektedir. Bu bölge 10. Ekzondan farklı primerler kullanılarak çoğaltılmıştır (Tablo 5) .

```

tccaaggggattctctctctctgcccgaatctgggcccctaaacgtgggaagcttcacatcttgcacatctgggtgtcttcagAATATTC
CACACAAGAAAACGGCACAGATGATTCCGCAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAA
GCCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACCACCCCGAGGGGAACGAGGGGAACGGCCCTCG
GCCGTACGGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCCGAGGCCGGGAGGGG
GCTGTCGAGGAAGCCCCTGAGCAAACGCAGAGAGAAGGCCTCGGAGGGCCTGGACGC
GCAGGGCAAGCCTCGGACCCGGAGCCCGGCCCTGCCGGGCGGGAGAAGCCCCGGCCC
CTGCAGGGCGCTAGAGGGGGGCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTC
CGCGGGGAGGCTGCAGGGGCTGGCGGGGGGCGCCCCGGGGCAGAAGGAGTGCAGGC
CTTCGAAGTGTACCTGCCCTCGGAAAGATGCGACCTAGAAGCCTTGAGGTACCATTT
TCTACAGGGGAGAAGGCGCCCGCAAATCCAGAAATTCTCCTGACTCTAGAGGAAAAG
ACAGCTGCGAATCTGGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCCACTCCGGATGGA
GGGGCATCTGCGGACCTGAAGGAAGGCCCTGGAAA TCCAGAACAATTCCGGTCACCG

```

Şekil 4. Dizi Analizi İçin Kullanılan Exon 2 Bölgesi ve Primer Oturma Bölgeleri. (Küçük Harfli Sıralanmış Bölge İntronu Göstermektedir. (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/>) .

Tablo 5. Ekzon 2 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (ileri) ve Revers (geri) Primer Dizileri

Primer adı	Primer Dizileri
F	5'-CTA AAC GTG GGA CAG CTT CAT C-3'
R	5'- CTT CCT TCA GGT CCG CAG AT-3'

3.3.1.3. Ekzon2 için PCR 'ın hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde Tablo 6'daki bileşenler sırasıyla 0.2 µl steril tüplere eklendi. Kullanılan master mix (Promega, M7502) nukleazlardan arındırılmış dH₂O, 50 U/ml *Taq* DNA polimeraz ve enzimin tamponu, 400 µM dNTP ve 3 mM MgCl₂ içermektedir. Ayrıca GC bölgelerinin sebep olduğu ikincil yapıların azalmasını sağlayan sıvı betaine 5 M (Sigma, B 0300-5 VL) kullanıldı. Karışım iyice

homojenize edildi. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan cihazda (Bio-Rad MyCycle) yapıldı (Tablo 7) .

Tablo 6. *MEFV* Ekzon 2 İçin 30 µl’lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

MEFV Ekzon 2	Miktar
PCR içeriği	[µl]
Master mix	14
Betaine	4
Primer Forward	1.5
Primer Revers	1.5
dH ₂ O	6
DNA	3
Toplam	30

Tablo 7. *MEFV* Ekzon 2 Bölgesi PCR Isı Değişiklikleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	7 dk	1
2	94 °C	45 sn	30
	54 °C	30 sn	
	72 °C	30 sn	
3	72 °C	7 dk	1
	4 °C	∞	

3.3.1.4. PCR ürünlerinin temizlenmesi

MEFV geni ilk PZR işlemi ile çoğaltıldıktan sonra dizi analizi yapılacak ürünlerin temiz olması reaksiyon sonunda oluşacak arka plandaki bantların önlenmesinde önemlidir.

1.PCR'dan sonra elde ettiğimiz amplikonlar PCR pürifikasyon kiti (Agencourt AMPure, ABD) kullanılarak temizlendi. 30 µl PCR ürününün üzerine 84 µl Agencourt AMPure konularak iyice pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. Süre sonunda örnek plağı manyetik alana konuldu ve 10 dakika inkübe edildi. İşlem sonunda amplikonlar örnek plağının duvarına yapışmış şekilde bulunur, süpernatant pipet ile plak duvarına değdirilmeden alınarak atıldı. Üzerine %70'lik 200 µl etanol ile iki kez yıkama yapıldı ve 30-40 saniye beklendi. Manyetik alandan kaldırılarak etanol ortamdan uzaklaştırıldı, gerektiğinde 3-5 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Kurutulduktan sonra 40 µl dH₂O konuldu, homojenize olana kadar pipetaj yapıldı. Örnek plağı tekrar miknatısa konuldu manyetik boncuklar plak duvarına yapışırken PCR ürünleri su içinde kalır. PCR ürünleri jele yüklenerek amplikon kalitesine bakılarak sekans PCR 'ına girecek amplikon miktarı tayin edildi.

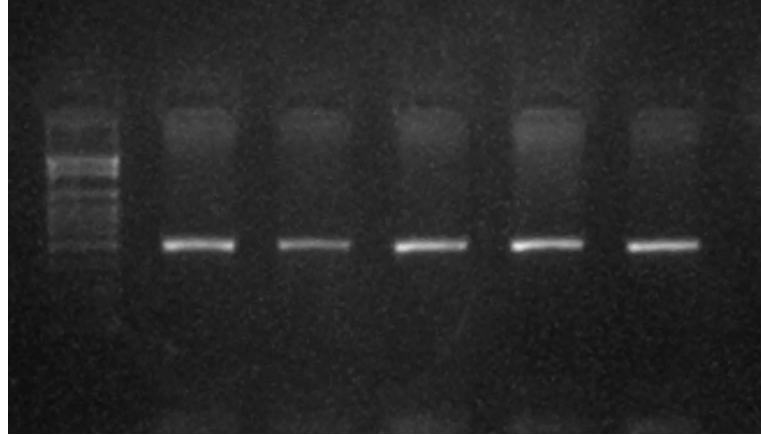
3.3.1.5. Agaroz jelin hazırlanışı

PCR ürünün boyutuna göre %2,5'luk jel için 1,25 g agaroz (Sigma, A5093-5006) tartılarak 200 ml 'lik erlen içerisine eklendi. Üzerine son hacim 50 ml olacak şekilde 1X TBE (Dr. Zeydanlı, 090557) tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında (Beko, Md 1500) kaynatılarak çözüldü. 3 µl ethidium bromide ilave edilerek karıştırıldı.

Hazırlanan jel, mini jel yatağı içerisine döküldü ve içine yükleme kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkartılarak örnek yüklenmesi için elektroforez tankına (Protrans, 001) yerleştirildi.

3.3.1.6. PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

Jel tankına yerleştirilen jelin üzerine 1X TBE tamponu eklendi. PCR ürününden 5µl, yükleme boyasından (Amresco, E190) ise 1µl alınarak ayrı bir yerde karıştırıldı. Karışım jelde oluşturulan kuyulara sırasıyla yüklendi. Jele yüklenen PCR ürünleri 80 V sabit gerilim ve 30 mA akım (Biometra, PP3000) ortamında 100 bp DNA belirteci ile birlikte yürütüldü (Şekil 5).



Şekil 5 . Ekzon 10 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntüsü

MEFV Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılması için 20'şer μ l'lik PCR reaksiyonu karışımı hazırlanmasına geçilir bu reaksiyon için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 8 ve Tablo 10'daki gibi sırası ile eklenir.

Tablo 8 . *MEFV* geni Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 μ l'lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

<i>MEFV</i> Ekzon 10	Miktar
PCR içeriği	[μ l]
DTCS Quick st.mix	10
Primer (Forward)	0,7
dH ₂ O	6,3
PCR ürünü (amplikon)	3
Toplam	20

Tablo 9. *MEFV* geni Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP 'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PCR Isıl Değişkenleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	2 dk	1
2	96 °C	20 sn	} 30
	55 °C	30 sn	
	60 °C	4 dk	
3	4 °C	∞	

Tablo 10 *MEFV* geni Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 µl'lik PCR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

<i>MEFV</i> Ekzon 2	Miktar
PCR içeriği	[µl]
DTCS Quick st.mix	10
Primer (Forward)	0.7
dH ₂ O	6.3
PCR ürünü(amplikon)	3
Toplam	20

3.3.1.7. Sekans PCR şartları

Tablo 11. *MEFV* geni Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PCR ısı Değişkenleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	2 dk	1
2	96 °C	20 sn	} 30
	56 °C	30 sn	
	62 °C	4 dk	
3	4 °C	∞	

Bu işlem tamamlandıktan sonra ürünler tekrar bir temizleme işleminden geçirildi.

2. PCR olan sekans PCR'ından (Tablo 9 ve 11) sonraki pürifikasyon şu şekilde yapıldı. PCR tüplerindeki amplikonlar spin edildi. Herbir sekans amplikonlarının üzerine 5 µl DSS (Dilate Stop Solution) konuldu. DSS 300 µl dH₂O, 120 µl 3M P_H= 5,2 Sodyum Asette, 120 µl 100mM Na₂EDTA P_H= 8, 60 µl 20mg/ml Glikojen koyularak hazırlandı. Sekans amplikonları yeni bir örnek plağına aktarıldı. 25 µl Agencourt CleanSEQ (ABD) her bir kuyuya konularak pipetaj yapıldı. Üzerine 110 µl %73'lük izoprapanol konuldu ve iyice pipetaj yapıldı. 13-15 dakika oda ısısında bekletilerek amplikonların magnetik boncuklara yapışması sağlandı. Örnek plağı mıknatıslı alana alındı ve magnetik boncukların kuyucukların duvarına yapışması sağlandı süpernatant dikkatlice kuyucuktan çıkartılarak atıldı. Üzerine 200 µl %73'lük izopropanol konup 3 dakika inkübe edildi. İzopropanolun tamamen uzaklaşması sağlandı. Sonrasında örnek plağının her bir kuyucuğuna 40 µl formamide konuldu ve PCR ürünleri tekrar kullanılır hale getirildi. 10-12 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve homojen olacak şekilde iyice çözüldü. Plak magnetik alana alındı ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Amplikonlar magnetik boncuklara dokunulmadan alınarak temiz örnek plağına yerleştirildi üzerlerine 1'er µl mineral yağ damlatılarak cihaza yüklendi.

3.3.1.8. DNA dizi analiz reaksiyonu

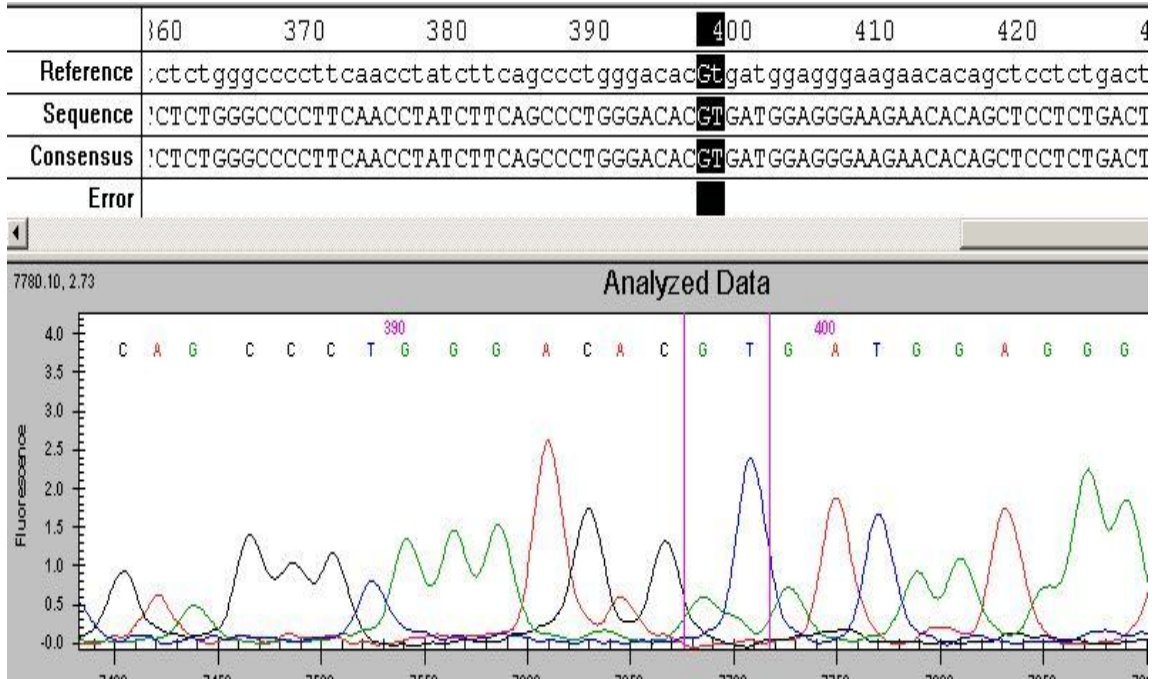
DNA dizi reaksiyonu daha önce elde edilen PCR ürünlerinin floresan işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesine dayanır. Bu amaçla ürünler "cycle sequencing" denilen yeni bir PCR döngüsüne sokulur. Cycle sequencing işleminde PCR ürünleri kalıp DNA işlevini görür. DNA polimeraz varlığında tek bir primer yardımı ile floresan işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire girer ve reaksiyon normal PCR döngüsü gibi devam eder. Aradaki fark primerin uzaması sırasında işaretli ddNTP'lerin

bağlanması ile zincirin sonlanmasıdır. Reaksiyon sonucunda oluşan renkli DNA fragmentleri, kapiller tüp içine doldurulan polimerde ayrıştırılır. Yürüme sonucunda ortaya çıkan renkli pikler, lazer okuyucu tarafından saptanarak analiz programına aktarılır.

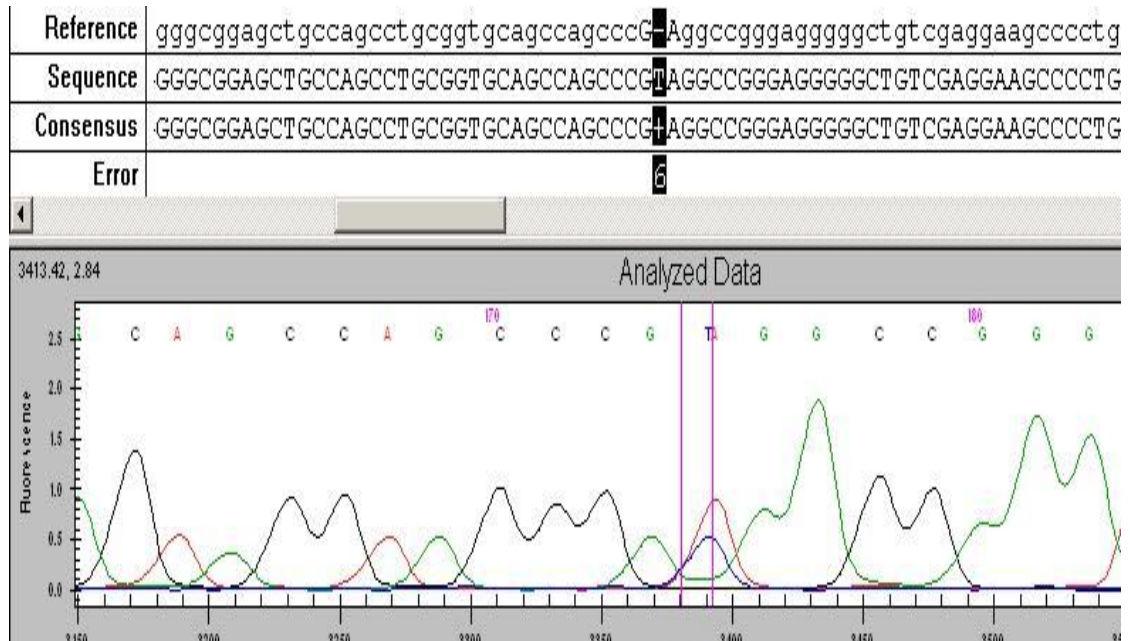
3.3.1.9. DNA dizi analizinin değerlendirilmesi

DNA dizi analizlerinde değişimler, *MEFV* geninin referans dizisi ile karşılaştırılarak tespit edildi. CEQ8000 dizi analiz cihazından elde edilen ham dizi verileri CEQ8000 Genetic Analysis System adlı genotipleme yazılım programına aktarılarak karşılaştırma (Alignment) yapıldı. Sonrasında Heterozigot ve homozigot baz değişimleri, bu yazılım aracılığı ile analiz değerlendirmeleri yapıldı. Aminoasid değişimleri [http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/disease_menu.php?n=1\(27.03.2011\)](http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/disease_menu.php?n=1(27.03.2011)) internet adresi kullanılarak tespit edildi.

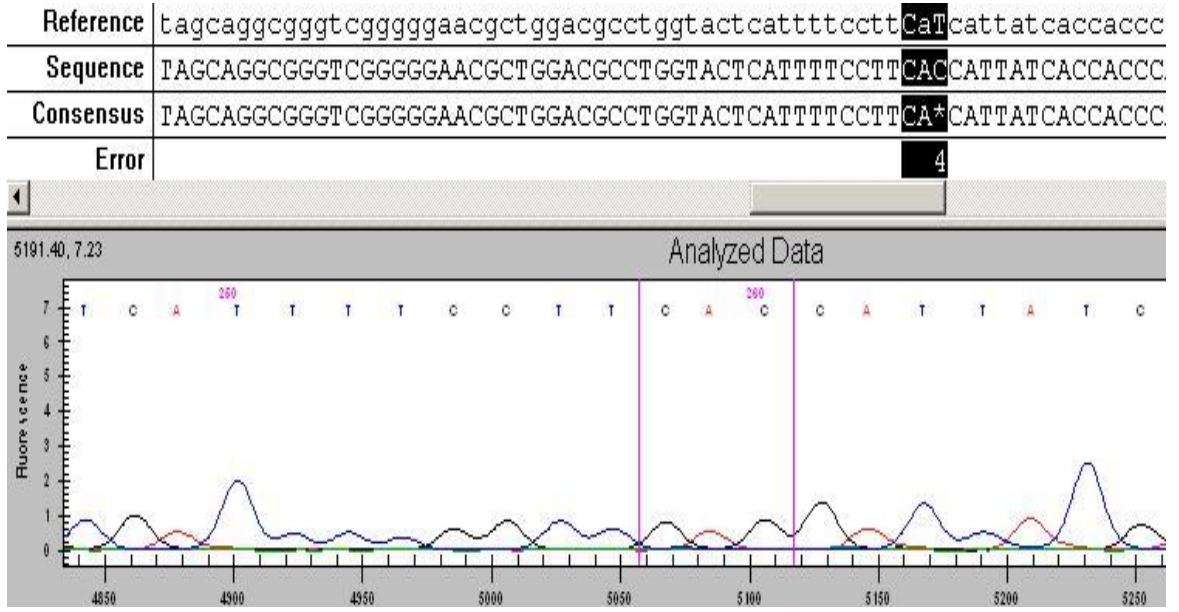
Yapmış olduğumuz DNA dizi analizlerine ait normal mutasyon bulunmayan analiz görüntüsü, heterozigot mutasyon bulunan çalışma örneği ve homozigot sonuç elde edilen analizlere ait birer örnek verilmektedir (Şekil 6, 7, 8).



Şekil 6. *MEFV* geni ne ait normal (wild) tip de DNA dizi analiz görüntüsü.



Şekil 7. *MEFV* genine ait Heterozigot tip de DNA dizi analiz görüntüsü.



Şekil 8. *MEFV* genine ait homozigot tip de DNA dizi analiz görüntüsü.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 2008-2011 yılları arası laboratuvarımıza rutin FMF analizi için gelen 2530 FMF ön tanılı hasta alınmıştır. Çalışma grubumuzu oluşturan hastalar Doğu Anadolu Bölgesinde yaşayan ya da nüfus kütüğü bu bölgedeki illerde olan kişilerden oluşmaktadır. Hastaların nüfus kütükleri başta Erzurum olmak üzere Ağrı, Kars, Erzincan, Iğdır, Ardahan, Bingöl, Muş, Van ve Erzurum'un sınır komşusu olan Bayburt ve Artvin illerini kapsamaktadır. Çalışmamızda 2530 hastada *MEFV* geninin ekzon10 ve ekzon2 bölgelerinde DNA dizi analizi yapılmıştır. Hasta grubumuzda normal genotibe sahip kişilerin oranı %58.58 (n=1482) iken mutasyon bulunan hastaların oranı da % 41.42 (n=1048) olarak hesap edilmiştir.

Çalışılan hasta grubuna bakıldığında hastalarda erkeklerin oranı %47,80 (n=1210) iken kadınların oranı da % 52.20 (n=1320) olarak görülmüştür (Tablo 12).

Tablo 12. Cinsiyete göre Genotip dağılımı Wild :Normal mutasyon bulunmayan genotip, Heterozigot: Tek bir mutasyon değişim görülmesi, Homozigot: Aynı mutasyonun iki allelde görülmesi, Birleşik heterozigot: İki farklı mutasyonun bulunması, Kompleks heterozigot: Üç mutasyonun bulunması şeklinde ifade edebiliriz.

Mutasyon	Erkek		Kadın		Toplam
	Sayı	Yüzde(%)	Sayı	Yüzde(%)	Sayı
Wild	716	59.2	766	58	1482
Heterozigot	327	27	337	25.5	664
Homozigot	67	5.5	72	5.5	139
Birleşik heterozigot	99	8.2	143	10.8	242
Kompleks	1		2		3
Heterozigot		0.1		0.2	
Toplam	1210	47.8	1320	52.2	2530

Ayrıca laboratuvarımıza FMF analizleri için başvuruda bulunan hastaların başvuru tarihi itibarıyla 1-20 yaş arası oran %62,7 iken 21 ve üzeri hastaların oranı da %37,3 olarak görülmektedir.

Çalışma grubumuzdaki mutasyon dağılımına baktığımızda ise heterozigot, homozigot, birleşik (kompant) heterozigot ve kompleks heterozigot mutasyon görülen 1048 FMF ön tanıli hasta arasında mutasyonlardan; M694V'nin %57,16 (n=599) oranı ile ilk sırada olduğunu, ve onu sırasıyla %27.19 (n=285) oranı ile V726A , %20.80 (n=218) oranı ile M680I, %8,87 (n=93) oranı ile R761H, ekzon10 mutasyonları ve %6,68 (n=70) oranı ile E148Q ekzon2 bölgesi mutasyonunun bulunduğunu görmekteyiz. Hasta grubumuzda nadir görülen mutasyonlar ise ekzon10 bölgesinde A744S (n=15) ve M694I (n=3) görülürken, ekzon2 bölgesinde de E148V (n=3), T267I (n=3), E167D (n=2) ve L110P (n=1) görülmüştür. (Tablo 13)

Tablo 13. *MEFV* geni Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgeleri mutasyonların sadece mutasyon taşıyan bireyler arasındaki dağılımları.

Mutasyonlar (n:1048)	Heterozigot		Homozigot		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
M694V	494	47,14	105	10,02	599	57,25
V726A	275	26,24	10	0,95	285	27,29
M680I	196	18,70	22	2,10	218	20,99
R761H	92	9,06	2	0,19	94	9,25
E148Q	68	6,49	2	0,19	70	6,77
A744S	15	1,43	0	0	15	1,43
M694I	3	0,29	0	0	3	0,29
E148V	3	0,29	0	0	3	0,29
T267I	3	0,29	0	0	3	0,29
E167D	2	0,19	0	0	2	0,19
L110P	1	0,10	0	0	1	0,10

Çalışmış olduğumuz 2530 kişilik FMF ön tanılı hasta grubunda, nokta mutasyonların dağılımlarına baktığımızda; mutasyonların görülme sıklığı sırasıyla M694V %23.68, V726A %11.74, M680I %8.15, R761H %3.68, E148Q %2.73, A744S %0.59, M694I, E148V, T267I mutasyonlarını %0.12, E167D %0.08 ve L110P mutasyonunu da %0.04 olarak görülmüştür.

Tablo 14. *MEFV* geni Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgeleri mutasyonların genel çalışma grubundaki dağılımları.

Mutasyonlar (n:2530)	Heterozigot		Homozigot		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
M694V	494	19,53	105	4,15	599	23,68
V726A	275	10,87	10	0,87	285	11,74
M680I	196	7,75	22	0,40	218	8,15
R761H	92	3,64	2	0,04	94	3,68
E148Q	68	2,69	2	0,04	70	2,73
A744S	15	0,59	0	0	15	0,59
M694I	3	0,12	0	0	3	0,12
E148V	3	0,12	0	0	3	0,12
T267I	3	0,12	0	0	3	0,12
E167D	2	0,08	0	0	2	0,08
L110P	1	0,04	0	0	1	0,04

Yaptığımız analizler sonucunda 1048 hastada heterozigot genotip oranı %63.33 (n=665), homozigot genotip oranı %13.14 (n=138), birleşik heterozigot genotip oranı %23.24 (n=244) ve kompleks genotip oranı da %0.30 (n=3) olarak görülmektedir (Tablo 15).

Tablo 15. Çalışılan hasta grubuna ait *MEFV* geni genotip sonuçları.

Mutasyon (n=1048)	Genotip	Sayı	%
Heterozigot (n=665) %63,33	M694V	309	29,43
	V726A	164	15,62
	M680I (G/C)	97	9,24
	R761H	53	5,06
	E148Q	27	2,57
	A744S	10	0,95
	M694I	3	0,29
	T267I	1	0,10
Homozigot (n=138) %13,14	M694V	105	10,00
	M680I (G/C)	22	2,10
	V726A	9	0,86
	R761H	1	0,10
	E148Q	1	0,10
Birleşik (kompant) heterozigot (n=242) %23,24	M694V/M680I (G/C)	58	5,52
	M694V/V726A	68	6,48
	M694V/R761H	28	2,67
	M694V/E148Q	26	2,48
	M694V/A744S	2	0,19
	M694V/E167D	2	0,19
	M694V/T267I	2	0,19
	M680I (G/C)/V726A	29	2,76

	M680I (G/C)/R761H	4	0,38
	M680I (G/C)/E148Q	5	0,48
	M680I (G/C)/A744S	2	0,19
	M680I (G/C)/E148V	2	0,19
	V726A/R761H	6	0,57
	V726A/E148Q	7	0,67
	V726A/A744S	1	0,10
	V726A/E148V	1	0,10
	E148Q/E148V	1	0,10
	E148Q/L110P	1	0,10
Kompleks Heterozigot (n=3) %0.30	E148Q/R761H/R761H	1	0,10
	M694V/V726A/E148Q	1	0,10
	M694V/E148Q/E148Q	1	0,10

FMF hastalığının otozomal resesif geçişli olması nedeniyle; çalışmamızda birleşik heterozigot, kompleks heterozigot ve homozigot genotipler hasta, heterozigotlar taşıyıcı olarak değerlendirildiği zaman 2530 kişi içinde hastalık oranının %15.14, taşıyıcılık oranının ise %26.28 olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz çalışmada 2008-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesine ait Araştırma hastanelerinin, pediatri, dahiliye, fizik tedavi servisleri başta olmak üzere çeşitli kliniklerinden, FMF ön tanılı olarak Tıbbi Biyoloji A.D Moleküler tanı ve Doku Tiplendirme laboratuvarımıza gönderilen ve aile kökeni Doğu Anadolu Bölgesi (çoğunluğu Erzurum) olan 2530 hastaya ait *MEFV* geninin ekzon10 ve ekzon2 bölgelerine ait DNA dizi analiz sonuçları yapılarak değerlendirilmiştir.

Moleküler analizlerin gelişimine kadar FMF hastalığı tanısı; klinik bulgular, aile kökeni ve FMF hastalığının tedavisinde kullanılan kolsişin isimli ilaca hastanın vermiş olduğu yanıtı göre tanı konulup tedavi uygulanmaktaydı.

Ailesel Akdeniz Ateşi özellikle karın ağrısı, ateş ve eklem ağrıları gibi belirtileri göstermektedir. Ağırlıklı olarak Doğu Akdeniz ve çevresindeki ülkelerde yaygın olarak görülen inflamatuvar bir hastalıktır.

MEFV geniyle ilgili yapılan dizi analizleri sonucunda 2011 yılı itibariyle FMF hastalığının nedeni olan 200 farklı mutasyon ve polimorfizm tespit edilmiştir.¹⁰ Bu değişimler *MEFV* geninin eksprese ettiği protein üzerinde, protein yapısını değiştirerek fonksiyonunu bozacak şekilde oluşumlara neden olmaktadır. 1997’de bu proteini oluşturan DNA’nın 10. ekzonunda değişimler incelenerek ilk olarak M694V, V726A ve M680I missens mutasyonları tanımlanmıştır. Bu çalışmaların ardından ise 1998’de 2. ekzondaki missens mutasyonlar tanımlanmıştır.

FMF; başta Doğu Akdeniz ülkeleri olmak üzere Akdeniz çevresinde yaygın olan bir hastalıktır. Ülkemizde de ciddi oranda taşıyıcılığa sahiptir. En ciddi komplikasyonu

böbrek yetmezliğine neden amiloidozdur. Karın ağrısı, ateş, eklem ağrıları gibi bulgularla genç yaşta kendini gösteren fenotip I veya ilerleyen yaşlarla amiloidozla kendini gösteren Fenotip II de çok ciddi durumlar ortaya çıkabilir. FMF hastalığı diğer periyodik ateş sendromları ile karıştırılabilmektedir. Bundan dolayı FMF hastalığının tanısında moleküler çalışmalar daha önemli olmaktadır. Moleküler çalışmalar birçok yöntemle yapılabilir ama bunların içerisinde en sağlıklı sonuçların alındığı sekans DNA dizi analiz yöntemidir ve moleküler analiz teknikleri arasında altın standart olarak kabul edilmektedir.

Ülkemizde farklı bölgelerde *MEFV* geni FMF hastalığı ile ilgili olarak yapılmış olan çalışmalara baktığımızda bizim çalışmamızdaki bilgilerle örtüşen ve örtüşmeyen bulguları farklılıkları çok rahat olarak görebilmekteyiz. Yapılan çalışmaların değerlendirmelerini yaptığımızda ise;

Özalkaya ve arkadaşları⁶⁵ İzmir’de yapmış oldukları çalışmada 308 kişiden oluşan hasta ve 164 sağlıklı bireyden oluşan çalışma gruplarında *MEFV* gen mutasyonlarının dağılım oranları sırasıyla; M694V % 46, M680I %15.6, E148Q %12.8 ve V726A %1 olarak görülmüştür. M694V bizim çalışmamızda da en sık görülen mutasyonken M680I 3. sırada ve E148Q nokta mutasyonu da 5. sırada görülen mutasyon olmaktaydı.

Akın ve arkadaşlarının⁶⁶ Ege bölgesinde 1201 hastadan oluşan çalışmalarında mutasyon oranları M694V %47.60, E148Q %10.76, M680I %11.94, V726A %12.95 olarak görülmüştür. Bu grubun çalışmasında en sık görülen ilk üç mutasyon bizim çalışmamızdaki mutasyon sıralamasıyla aynı olarak görülmektedir. R761H sıralamada görülmezken E148Q da bizim çalışmamızdan farklı olarak daha yüksek bir sıklıkta görülmektedir.

Özdemir ve arkadaşlarının⁶⁷ Sivas civarında 3340 hastadan oluşan çalışmalarında mutasyon oranları sırasıyla M694V %43.12, E148Q %20.18, M680I %15, V726A %11.32 olarak görülmüştür. Bu çalışma da ön plana çıkan mutasyon ise diğer bölgelere göre E148Q nokta mutasyon oranının çok daha fazla sıklıkla görülmesidir. Bu çalışma Doğu Anadolu bölgesinde yapılan bir çalışma olmasına rağmen bizim çalışmamızdaki bulgular arasında farklılıklar görülmektedir.

Özcan ve arkadaşları⁶⁸ Kırıkkale civarında 126 hastadan oluşan çalışmalarında ise nokta mutasyon prevalansları; M694V %31.80, E148Q %13.60, M680I %13.60, V726A %9.10 olarak görülmüştür. Bu çalışma Özdemir ve arkadaşlarının çalışmasıyla örtüşmektedir. Fakat bizim çalışmamıza göre farklılıklar vardır. E148Q nokta mutasyonu bizim çalışmamızda 5. sıradayken Kırıkkale civarındaki çalışmada en sık rastlanan 2. mutasyon olduğu görülmektedir. Ve yine diğer bir farklılık ise V726A nokta mutasyonunda görülmektedir bizim çalışmamızda en sık görülen ikinci mutasyonken Özcan ve grubunun yaptığı çalışmada 4. sırada görülmektedir.

Tunca ve arkadaşlarının³¹ 1090 hastadan oluşan çalışmalarında M694V %51.40, M680I %14.40 ve V726A nokta mutasyonu %8.60 olarak görülmüştür. Bu çalışmada yine çalışmamızdan farklılığı M680I ile V726A mutasyonlarının dağılım sıklıklarında görmekteyiz.

Demirkaya ve arkadaşlarının⁶⁹ 330 hastadan oluşan çalışmalarında M694V %50, M680I %14.10, V726A %9.70 ve E148Q nokta mutasyonu da %1.37 olarak görülmüştür. Yine bu çalışmada da mutasyonların prevalans sıralaması bizim çalışmamızdakinden farklı çıktığı görülmektedir.

Yiğit ve arkadaşlarının⁷⁰ Karadeniz bölgesinde 625 hastadan oluşan çalışmalarında mutasyon prevalansları sırasıyla M694V %33.90, M680I %15.80, V726A %4.90, E148Q %3.50 olarak görülmüştür. Bu çalışmada, çalışmamızdan farklı olarak R761H nokta mutasyonu sık görülen mutasyonlar arasında görülmemektedir. V726A nokta mutasyonu bizim çalışmamızda ikinci sırada görülürken bu çalışmada üçüncü sırada ve görülme sıklığı da %4.90 olarak bizim bulduğumuz sonuçlardan düşük oranda bulunmuştur.

Evliyaoğlu ve arkadaşları⁷¹ Diyarbakır da FMF şüphesi taşıyan 332 çocuk hastada yapmış oldukları analizler sonucunda sırasıyla mutasyonları E148Q %30.8, M694V %18.3, P369S %10.6, V726A %8.6, A744S %2.9, R761H %2.9, M694I %1.9, K695R %1.9 ve I692del %1.0 sıklıkta gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada E148Q en sık görülen nokta mutasyonuyken bizim çalışmamızda bu mutasyonun beşinci sırada olduğu görülmektedir.

Dündar ve arkadaşları⁷² Kayseri civarında 2067 hastadan oluşan çalışmalarında bulgular sırasıyla M694V %50.50, M680I %21.26 , E148Q %19.86 , V726A %15.34 , R761H %4.4 olarak görülmüştür. Bizim çalışmamızın Dündar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan farkı M680I mutasyonunun bizim çalışmamızda üçüncü en sık görülen mutasyon E148Q değişiminin ise beşinci sıklıkta görülen mutasyon olmasıdır.

Etem'in⁷³ Elazığ da 1100 hastadan oluşan çalışma grubunda ise M694V %21.6, E148Q %19.1, V726A %9.7 ve M680I %9.5 oranında görülmektedir. Yine bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak E48Q prevalansı en sık görülen ikinci mutasyon M680I da dördüncü mutasyon olarak görülmektedir.

Yine Doğu Anadolu bölgesinde yapılan diğer bir çalışmada, Yeşilada ve arkadaşlarının⁷⁴ Malatya da FMF ön tanılı 197 hastada yaptıkları çalışmada ki bulgular sırasıyla; M694V %31, M680I %12, E148Q %9, A744S %4 ve V726A %3 olarak saptanmıştır. Bölgemizde yapılan bir çalışma olmasına rağmen bizim çalışmamızda ikinci sıklıkta görülen V726A mutasyonu Malatya ve civarını kapsayan bu çalışmada beşinci sıklıkta görülen bir mutasyon olarak görülmektedir. Bu farklılığın nedeni ise bizim çalışma grubundaki ön tanılı hastaların çoğunluğunun Erzurum ve civarında yaşayan hastalardan oluşmasından kaynaklanmaktadır.

Bonyadi ve arkadaşları⁷⁵ İran'da 524 hastada yapmış oldukları çalışmada görülme sıklığı en çok olan mutasyon M694V %42,4 oranında iken bu mutasyonu sırasıyla V726A %17, E148Q %16.2 , M680I %15,2 ve R761H %4.7 takip etmektedir. İran da yapılan bu çalışma grubundaki hastaların tamamını Azeri Türkleri oluşturmaktadır. Bu çalışmayla bizim çalışma arasında ki farklılık E148Q mutasyonun üçüncü sıklık da olması bizim çalışmamızda ise beşinci sık görülen mutasyondur.

Sarkisian ve arkadaşları⁷⁶ Ermenistan Erivan da 3000 hastada yapmış oldukları çalışmada nokta mutasyonları sırasıyla M694V %50.6, V726A %22.3, M680I %18.7, R761H %3.2, M694I %0.4, E148Q %2.2, F479L %1.3 mutasyonları görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada 250 kişiden oluşan sağlıklı bireyler de kontrol grubu için kullanılmış ve mutasyonların sıklığı sırasıyla; *MEFV* geni ekzon 10 da M694V %4.7, V726A %4.6, M680I %1.8, R761H %0.2; ekzon5 de F479L %0.4; ekzon3 de P369S %4.9 ve ekzon2 bölgesinde de E148Q %3.4 olarak görülmüştür. Bu yaptıkları çalışmada hasta ve sağlıklı bireyler arasında mutasyonların görülme sıklıkları sıralandığında E148Q mutasyonunda farklılık görülmektedir. Hastalar da beşinci sırada ve %2.2 olarak görülürken, sağlıklı bireylerde üçüncü sırada ve % 3.4 olarak hasta

bireylerden daha fazla oranda görülmektedir. Ermenistan da yapılan bu çalışmayla bizim doğu Anadolu bölgesinde yaptığımız çalışma ekzon10 ve ekzon2 deki mutasyon sıralaması yönünden birbirine benzemektedir.

El Gezery ve arkadaşları⁷⁷ Mısır İskenderiye de 316 hasta üzerinde yapmış oldukları araştırmada ki bulgular ise M694I %34, E148Q %22.7, V726A %15.6, M680I %12.1, ve M694V %7.8 olarak gösterilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz analizlerde M694I sadece 3 hastada %0.12 sıklıkta görülürken Mısırdaki bu çalışmada en sık görülen mutasyon olarak görülmektedir. Bizim çalışmamızda ve ülkemizde yapılan tüm çalışmalarda M694V mutasyonu en sık görülen mutasyonken Mısırdaki yapılan bu çalışma da en az sıklıkta görülen mutasyon olarak görülmektedir.

Jalkh ve arkadaşlarının⁷⁸ Lübnan Beyrut da 376 hastadan oluşan çalışma grubunda yapmış oldukları analizler sonucunda; M694V %28.98, M694I %12.10, V726A %19.28, M680I %5.72 ve E148Q %10.10 olarak görülmektedir. Bizim çalışmalarımızda %0.12 oranında görülen M694I mutasyonu Lübnan toplumunda en sık görülen üçüncü mutasyon olarak görülmekte bizim çalışmamızda üçüncü en çok görülen ve ülkemizdeki yapılan diğer çalışmalarda genellikle ikinci en sık görülen M680I mutasyonu beşinci sırada görülmektedir. R761H mutasyonu da en sık görülen beş mutasyon arasında gösterilmemektedir.

Mattit ve arkadaşlarının⁷⁹ Suriye de 83 hasta ve 246 sağlıklı bireyden oluşan çalışmalarında bulgular şöyledir. Hasta bireylerdeki mutasyon dağılımı sırasıyla; M694V %45.8, V726A %13.9, M680I %9.6, E148Q %6, M694I % 4.8, A744S %1.2 ve R761H %0.6 olarak görülmektedir. Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol gruplarında ise dağılım yüzdeleri sırasıyla; E148Q %6.6 , V726A %2.3, M694V %0.83 olarak görülmüştür. Bizim çalışmamızla karşılaştırdığımızda görülme sıklığı yüksek olan ilk

üç mutasyon sıralama olarak bizim bulgularımızla örtüşmektedir. Bizim çalışmamızda R761H mutasyonu görülme sıralamasında 4. E148Q mutasyonu da 5 sıklıkta görülen mutasyondur. Ayrıca M694I mutasyonunun bizim çalışmamızda görülme sıklığı düşükken Suriye de yapılan çalışmada 5. sırada görülen mutasyondur.

Giaglis ve arkadaşlarının⁸⁰ Yunanistan da 156 hastadan oluşan çalışmalarında ki bulgular şu şekildedir; M694V %38.1, M680I %19.7, V726A %12.2, E148Q %10.9 ve E230K %6.1. Bu çalışmadaki bulguları değerlendirdiğimizde M694V mutasyonu hem ülkemizde yapılan hem de bizim çalışmamızdaki bulgularla örtüşmekte en sık görülen mutasyon olmaktadır. Bizim çalışmamızda R761H mutasyonu en sık görülen 5 mutasyon arasındayken bu çalışmada görülmemekte ve yunanlıların çalışmalarındaki E230K bizim çalışma grubunda hiç görülmemiştir.

Filistin de Ayesh ve arkadaşlarının⁸¹ 511 hastadan oluşan çalışmalarında ise mutasyon dağılımları M694V 49%, V726A 16.7%, M694I 11.9% ve E148Q 8.5%, M680I 4.4% olarak belirlenmiş olup bu çalışmada en sık görülen ilk iki mutasyon çalışmamızla aynı olup bizim çalışmamızda M694I görülme sıklığı düşükken M680I mutasyonu ise bizim çalışmamızda en sık görülen üçüncü mutasyon olmuştur. Ayrıca bu çalışma da bizim çalışmamızda 2 hastada görülen ekzon2 mutasyonlarından E167D 1 hastada görülmüştür.

Çalışmamızda 3 hasta da gözlemlemiş olduğumuz E148V mutasyonu da Medlej-Hashim ve arkadaşlarının⁸² RFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada 1 Lübnanlı hastada belirlemişlerdir.

Çalışmamızda 2 FMF ön tanılı hasta da M694V mutasyonu ile birleşik heterozigot olarak görülen E167D mutasyonu ise ilk olarak Bernot ve arkadaşlarının⁸³

yaptıkları çalışmada tek bir ermeni asıllı bireyde göstermişlerdir. Ayrıca çalışmamızda 3 hastanın ikisinde M694V ile birleşik heterozigot diğerinde heterozigot olarak analiz ettiğimiz T267I mutasyonu da ilk olarak yine Bernot ve arkadaşlarının⁸³ bu çalışmasında tespit edilmiştir. 1299 FMF ön tanılı hastadan oluşan başka bir çalışma grubunda ise ciddi kliniğe sahip tek bir hastada T267I heterozigot olarak görüldüğü belirtilmiştir.⁸⁴

Çalışmamızda 15 hastada heterozigot yada birleşik heterozigot olarak gözlemlediğimiz A744S ise daha çok arap toplumlarında görülmektedir.^{79, 85} İlk olarak da Bernot ve arkadaşlarının⁸³ çalışmasında söz edilmektedir. Ülkemizde de Ankara, Malatya ve Diyarbakır da yapılan çalışmalarda görülme sıklıkları hakkında bilgiler verilmiştir.^{71, 74, 86}

Yaptığımız analizler sonucunda tek bir hastada gözlemlediğimiz L110P ilk olarak 2000 de İspanya Mallarko adalarında yaşayan Yahudi kökenli olan Chuetas'lar da çalışılan ve 26 kişiden oluşan çalışmada belirlenmiştir.⁸⁷ Japonların yapmış olduğu birkaç çalışmada da bu mutasyondan bahsedilmektedir. Migita ve arkadaşlarının⁸⁸ rheumatoid arthritisli 126 hastada ve 86 hasta olmayan kontrol grubundan oluşan çalışmalarında L110P mutasyon dağılımını hasta grubunda %9.5 kontrol grubunda ise %9.2 olarak göstermişlerdir. Yine diğer bir çalışma grubu olan Tsuchiya-Suzuki ve arkadaşları⁸⁹ 80 kişilik FMF hasta gruplarında L110P mutasyonunu L110P/E148Q/M694I kompleks heterozigot olarak %17.5 olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada ülkemizde en sık görülen 5 mutasyon M694V, M680I, V726A, R761H ve E148Q mutasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca A744S ve ülkemizde yapılan çalışmalarda az veya hiç rastlanmayan M694I, E148V, T267I,

E167D ve L110P mutasyonlarına da rastlanmıştır. Ülke genelinde yapılan çalışmalara baktığımızda en sık görülen mutasyon M694V olmaktadır. Ardından en sık görülen M680I iken bizim çalışmamızda V726A ikinci sırada yer almaktadır. Ülke genelinde yapılan çalışmalara baktığımız da M694V mutasyonu haricinde diğer mutasyonlar için genel bir sıralama yapmamız mümkün görülmemektedir. Bölgelere hatta şehirlere göre bile bu mutasyonların sıralaması değişiklik göstermektedir. Sadece şu genellemeyi yapabiliriz ülkemizde en sık görülen mutasyonlar M694V, M680I, V726A ve E148Q mutasyonlarıdır diyebiliriz.

Çalışmamızda FMF ön tanılı olarak laboratuvarımıza 2008-2011 yılları arasında müracaat eden 2530 hastaya ait *MEFV* geni ekzon10 ve ekzon2 bölgelerine ait analiz sonuçları kullanılmıştır. Biz çalışmamızı klinik olarak mutasyonların FMF hastalığının fenotipe etkisinden ziyade genotipteki değişimlerin ve bölgemizde *MEFV* geninde görülen mutasyonlarla bu mutasyonların görülme sıklıklarının istatistiksel değerlendirmesidir.

Günümüze kadar Türkiye’de FMF mutasyonları PCR/RFLP, ARMS, FMF StripAssay, Mikroarray, Real-Time PCR ve son yıllarda oldukça güvenli bir yöntem olan DNA Dizi Analizi yöntemleri ile tespit edilmiştir. DNA Dizi Analizi sadece tespit edilen ve sık görülen mutasyonları değil bunların haricinde *MEFV* geninde daha geniş olarak ekzonlarda var olan tüm değişimlerin tespitini sağlamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız ve son yıllarda gelişen DNA Dizi Analizi (sekans) teknolojisinin otomasyona adapte edilmesiyle rutin analizlerde kullanma imkanı doğmuştur. Bu teknolojinin modifiye edilebilir olmasından dolayı yeni uygulamalarda da kolaylıkla kullanılabilirilmektedir.

Çalışmamızda yapılan DNA dizi analizleri sonucunda M694V %57.25 mutasyonlar arası %23,72 sıklıkla da genel hasta grubunda görülmüştür. V726A mutasyonlar bazında %27,29 olarak görülürken genel gruptaki dağılımı da %11,3 olarak tespit edilmiştir. M680I mutasyonlar bazında %20,99 iken genel gruptaki sıklığı %8,66 olarak görülmüştür. R761H %8,68 ve genel dağılımda %3.60 olarak belirlenmiştir. E148Q ise %6.77 ve genel dağılımda da %2.77 sıklıkta görülmüştür. A744S %1.43 ve genel dağılımda %0.59 olarak görülmüştür. Ayrıca ülkemizde ender görülen veya hiç görülmeyen ekzon10 mutasyonlarından M694I ekzon2 mutasyonlarından ise L110P, E148V, E167D ve T267I mutasyonlarına rastlanmıştır.

Bizim çalışmamız Hasta sayısının çokluğu ile birçok çalışmaya göre oldukça genelleyici bir çalışma olmuştur. İncelemiş olduğumuz yurtiçi ve yurtdışı makalelerle bir genelleme yaparsak dünyada görülen FMF mutasyonlarının yaklaşık %90-95 i çalıştığımız ekzon2 ve ekzon10 bölgelerinde bulunmaktadır. Aynı zamanda birçok çalışmada gösterilen ve tespit edilen ekzon3 ve ekzon5 mutasyonlarına da bakmak gerekir. Bu mutasyonların frekanslarının azlığı ve her bir hasta için ayrı ayrı DNA dizi analizi (sekans çalışması) gerektirdiğinden bizim çalışmamızda uygulanmamıştır.

Çalışılan *MEFV* geni ekzon bölgelerinde mutasyon varlığında %100 e yakın net sonuçlar verilir. Dolayısıyla bakılan ekzonlarda mutasyonun varlığı önemli bir teşhis aracı olarak kullanılmaktadır. Fakat çalışılmayan *MEFV* geni ekzon bölgelerinde mutasyonun olmadığı iddia edilemez. Hastalığın kliniğine ve teşhis kriterlerine göre exon2 ve ekzon10 da mutasyon bulunamadığında daha ileri bir tetkik olarak diğer ekzon bölgelerine de bakılması gerekir.

SONUÇ

FMF ön tanılı olarak laboratuvarımıza müracaat eden tüm hastalarda *MEFV* geni ekzon10 ve ekzon2 bölgeleri DNA Dizi Analizi (sekans) yöntemiyle analiz edilmiştir. Ülkemizde sık görülen mutasyonların yanı sıra diğer baz değişimleri de tespit edilmiştir. Toplanan verilerin (ışığında) istatistiki analizleri yapılarak mutasyonların hem mutasyon taşıyan hastalar hem de mutasyon bulundurmeyen genel FMF ön tanılı hastalar arasındaki dağılımları hesaplanmıştır.

Ayrıca hasta grubundaki bireylerin cinsiyet dağılımları ve hastalığın belirtilerinin genel olarak hangi yaşlar arasında daha sık görüldüğü de belirlenmiştir.

Mutasyon taşıyan ön tanılı hastalar Heterozigot, Homozigot, Birleşik (kompat) heterozigot ve kompleks heterozigot olarak gruplandırılmıştır. Çalışmamızda en sık görülen ilk beş mutasyon sırasıyla M694V %57.25, V726A %27.29, M680I %0.99, R761H %8.68 ve E148Q ise %6.77 olarak görülmüştür. Bu yüzdeler mutasyon bulunan 1048 hasta içerisindeki dağılımı göstermektedir. Genel çalışma grubundaki (2530 FMF ön tanılı hasta) mutasyon sıklıkları da sırasıyla M694V %23.72, V726A %11.30, M680I %8.66, R761H %3.60 ve E148Q %2.77 olarak belirlenmiştir. *MEFV* geni ekzon10 mutasyonlarından A744S 1.43% ve M694I 0.29% olarak tespit edilmiştir. Ayrıca toplumumuzda az veya hiç görülmeyen ekzon2 mutasyonlarından E148V ve T267I %0.29 (n=3) olarak görülürken E167D %0.19 (n=2), L110P ise %0.01 (n=1) sıklıkla tespit edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 1967;43:227-53.
2. Yiğit S. Bölgemizdeki Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalarında Mutasyon Noktalarının ARMS, RFLP VE STRİP Yöntemiyle Taranması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 2006.
3. Öztürk A. Tek Taraflı Mutasyon Taşıyan Türk FMF Hastalarında MEFV Gen Mutasyonlarının Taranması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Tezi 2009.
4. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009;61:1447-53.
5. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003;18:853-9.
6. FMF İnternet sayfası. . <http://fmfighcnsfr/infevers> [cited]; Available from.
7. Onen F. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2006;26:489-96.
8. Ertekin V, Selimoglu MA, Pirim I. Familial Mediterranean fever in a childhood population in eastern Turkey. *Pediatr Int* 2005;47:640-4.
9. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972;287:1302.
10. Daniels M ST, Brenner-Ullman A, Shohat M. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am J Med Genet* 1995;30;55(3):311-4.
11. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, et al. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol* 1998;25:2445-9.

12. Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, et al. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet* 1989;34:168-72.
13. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001;9:553-5.
14. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40:1879-85.
15. Janeway T. An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of nitrogen metabolism. *Trans Assoc Am Physicians* 1908;23; 504-18.
16. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Gastroenterology* 1949;12:234-47.
17. Sohar E, Pras M, Heller J. 1961. Genetics of familial Mediterranean fever (FMF). *Arch Int Med* 1961;107; 109-118.
18. Schwartz J. Periodic peritonitis, onset simultaneously with menstruation. *Ann Intern Med* 1960;53:407-11.
19. Ehrenfeld E, Eliakim M, Rachmilewitz M. Recurrent polyserositis (Familial Mediterranean Fever; periodic disease). A report of fifty-five cases. *Am J Med* 1961;31; 107- 123.
20. Barakat MH, Karnik AM, Majeed HW, et al. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs--a study of 175 patients and review of the literature. *Q J Med* 1986;60:837-47.

21. Tunca M, Tankurt E, Akbaylar Akpınar H, et al. The efficacy of interferon alpha on colchicine-resistant familial Mediterranean fever attacks: a pilot study. *Br J Rheumatol* 1997;36:1005-8.
22. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, et al. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1509-13.
23. FMF2. Fransız FMF Konsorsiyomu.
24. FMF. Uluslararası FMF Konsorsiyomu.
25. Kastner DL. Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation. *Hosp Pract (Minneap)* 1998;33:131-146
26. Eliakim M, Levy M, Ehrenfeld M. Laboratory examinations. In: *Recurrent polyserositis (Familial Mediterranean Fever, periodic disease)*. Amsterdam, Elsevier 1981.
27. Öztürk A, Elsobky E, Elsayed S, et al. Mutational Analysis of Mefv Gene in Egyptian Patients with Familial Mediterranean Fever. *Turk J Med Sci* 2009; 39 (2): 229-234
28. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345:1748-57.
29. Kasapçopur Ö, Özdoğan H. Ailesel Akdeniz Ateşi. *Dirim* 2006;81(2):197-2005.
30. Schwabe AD, Peters RS. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 1974;53:453-62.
31. Onen F, Sumer H, Turkay S, Akyurek O, Tunca M, Ozdogan H. Increased frequency of familial Mediterranean fever in Central Anatolia, Turkey. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22: 31-3.

32. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:1-11.
33. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, et al. Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20: 45-53.
34. Matzner Y, Partridge RE, Levy M, Babior BM. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood* 1984;63:629-33.
35. Musabak U, Sengul A, Oktenli C, et al. Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol* 2004;138:526-33.
36. Knecht A, de Beer FC, Pras M. Serum amyloid A protein in familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med* 1985;102:71-2.
37. Benson MD, Cohen AS. Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic, and neoplastic diseases. *Arthritis Rheum* 1979;22:36-42.
38. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, et al. Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000;67:1136-43.
39. Akar N, Hasipek M, Akar E, Ekim M, Yalcinkaya F, Cakar N. Serum amyloid A1 and tumor necrosis factor- α alleles in Turkish familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. *Amyloid* 2003;10:12-6.
40. Akar S, Soyuturk M, Onen F, Tunca M. The relations between attacks and menstrual periods and pregnancies of familial Mediterranean fever patients. *Rheumatol Int* 2006;26:676-9.

41. Pras M. Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 1998;27:92-7.
42. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. 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)* 1998;77:268-97.
43. Zemer D, Revach M, Pras M, et al. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. *N Engl J Med* 1974;291:932-4.
44. Balci B, Tinaztepe K, Yilmaz E, et al. MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever phenotype II patients with renal amyloidosis in childhood: a retrospective clinicopathological and molecular study. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1921-3.
45. Koşan C. Ailevi Akdeniz Ateşi'ne Tanısal Yaklaşım. *Atatürk Üniversitesi Tıp Derg* 2003;35:1-6.
46. Ozdemir BH, Akman B, Ozdemir FN. Amyloid goiter in Familial Mediterranean Fever (FMF): a clinicopathologic study of 10 cases. *Ren Fail* 2001;23:659-67.
47. Saatci U, Ozen S, Ozdemir S, et al. Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *Eur J Pediatr* 1997;156:619-23.
48. Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223-31.
49. Livneh A, Zemer D, Langevitz P, et al. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. An analysis of factors affecting outcome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1804-11.

50. Özkan E, Okur O, Ekmekçi A, et al. A new approach to the treatment of periodic fever. *Med Bull İstanbul* 1972;1(1); 44-49.
51. Seidman LJ, Schutt RK, Caplan B, Tolomiczenko GS, Turner WM, Goldfinger SM. The effect of housing interventions on neuropsychological functioning among homeless persons with mental illness. *Psychiatr Serv* 2003;54:905-8.
52. Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, et al. Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial. *N Engl J Med* 1974;291:934-7.
53. Zemer D, Pras M, Sohar E, et al. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1986;314:1001-5.
54. Hojberg AS, Mertz H. [Nephrotic syndrome in familial Mediterranean fever--effect of colchicine therapy]. *Ugeskr Laeger* 1995;157:4035-7.
55. Ben-Chetrit E. Familial Mediterranean fever (FMF) and renal AA amyloidosis--phenotype-genotype correlation, treatment and prognosis. *J Nephrol* 2003;16:431-4.
56. Centola GM, Herko R, Andolina E, Abbott S. Tracking of insemination outcomes: a novel approach. *Fertil Steril* 2000;74:607-8.
57. Abedat S, Urieli-Shoval S, Shapira E, et al. Effect of colchicine and cytokines on MEFV expression and C5a inhibitor activity in human primary fibroblast cultures. *Isr Med Assoc J* 2002;4:7-12.
58. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9:473-83.
59. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol* 2009;146:467-78.

60. Shohat M, Magal N, Shohat T, et al. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 1999;7:287-92.
61. Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, et al. 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* 1999;65:88-97.
62. Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, et al. 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* 1999;64:949-62.
63. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, et al. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 1999;6:1-6.
64. Klug WS, Spencer CA, Cummings MR, Palladino MA. Concepts of Genetic. Prentice Hall Pearson Education Inc 2006.
65. Ozalkaya E, Mir S, Sozeri B, Berdeli A, Mutlubas F, Cura A. Familial Mediterranean fever gene mutation frequencies and genotype-phenotype correlations in the Aegean region of Turkey. *Rheumatol Int* 2010.
66. Akin H, Onay H, Turker E, Cogulu O, Ozkinay F. MEFV mutations in patients with Familial Mediterranean Fever from the Aegean region of Turkey. *Mol Biol Rep* 2010;37:93-8.
67. Ozdemir O, Sezgin I, Kurtulgan HK, et al. Prevalence of known mutations in the MEFV gene in a population screening with high rate of carriers. *Mol Biol Rep* 2011;38:3195-200.

68. Gunel-Ozcan A, Sayin DB, Misirlioglu ED, et al. The spectrum of FMF mutations and genotypes in the referrals to molecular genetic laboratory at Kirikkale University in Turkey. *Mol Biol Rep* 2009;36:757-60.
69. Demirkaya E, Tunca Y, Gok F, et al. A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:729-32.
70. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, et al. MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever in the Black Sea region of Turkey: Samsun experience [corrected]. *J Rheumatol* 2008;35:106-13.
71. Evliyaoglu O, Bilici S, Yolbas I, et al. Diyarbakır yöresi Ailevi Akdeniz Atesli çocuklarda MEFV gen mutasyon sıklıkları. *Dicle Tıp Dergi* 2009;36(2):80-84.
72. Dundar M, Emirogullari EF, Kiraz A, et al. Common Familial Mediterranean Fever gene mutations in a Turkish cohort. *Mol Biol Rep* 2010.
73. Etem E. Familial mediterranean Fever: a retrospective clinical and molecular study in the East of anatolia region of Turkey. *Open Rheumatol J* 2010;4:1-6.
74. Yeşilada E, Yüksel Ş, Gülbay G, et al. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fak Derg* 2005;12(4)235-238.
75. Bonyadi M, Esmaeili M, Jalali H, et al. MEFV mutations in Iranian Azeri Turkish patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2009;76:477-80.
76. Sarkisian T, Ajrapetyan H, Shahsuvaryan G. Molecular study of FMF patients in Armenia. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:113-6.

77. El Gezery DA, Abou-Zeid AA, Hashad DI, El-Sayegh HK. MEFV gene mutations in Egyptian patients with familial Mediterranean fever. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14:263-8.
78. Jalkh N, Genin E, Chouery E, et al. Familial Mediterranean Fever in Lebanon: founder effects for different MEFV mutations. *Ann Hum Genet* 2008;72:41-7.
79. Mattit H, Joma M, Al-Cheikh S, et al. Familial Mediterranean fever in the Syrian population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation. *Eur J Med Genet* 2006;49:481-6.
80. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007;71:458-67.
81. Ayesh SK, Nassar SM, Al-Sharef WA, Abu-Libdeh BY, Darwish HM. Genetic screening of familial Mediterranean fever mutations in the Palestinian population. *Saudi Med J* 2005;26:732-7.
82. Medlej-Hashim M, Salem N, Chouery E, et al. Familial Mediterranean fever: the potential for misdiagnosis of E148V using the E148Q usual RFLP detection method. *Clin Genet* 2002;61:71-3.
83. Bernot A, da Silva C, Petit JL, et al. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998;7:1317-25.
84. Moradian MM, Sarkisian T, Ajrapetyan H, Avanesian N. Genotype-phenotype studies in a large cohort of Armenian patients with familial Mediterranean fever suggest clinical disease with heterozygous MEFV mutations. *J Hum Genet* 2010;55:389-93.

85. Belmahi L, Cherkaoui IJ, Hama I, Sefiani A. MEFV mutations in Moroccan patients suffering from familial Mediterranean Fever. *Rheumatol Int* 2011.
86. Sahin FI, Yilmaz Z, Yurtcu E, Baskin E. Comparison of the results of PCR-RFLP and reverse hybridization methods used in molecular diagnosis of FMF. *Genet Test* 2008;12:171-4.
87. Domingo C, Touitou I, Bayou A, et al. Familial Mediterranean fever in the 'Chuetas' of Mallorca: a question of Jewish origin or genetic heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 2000;8:242-6.
88. Migita K, Nakamura T, Maeda Y, et al. MEFV mutations in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:1091-4.
89. Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Nakamura A, et al. Clinical and genetic features of familial Mediterranean fever in Japan. *J Rheumatol* 2009;36:1671-6.