

**MEFV GENİNİN EXON 2 BÖLGESİNDEKİ
Arg202Gln POLİMORFİZMİNİN BÖLGEMİZDEKİ
SIKLIĞI VE EXON 10'DAKİ
MUTASYONLAR İLE İLİŞKİSİ**

Atilla TOPÇU
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İbrahim PİRİM
Yüksek Lisans Tezi-2011

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

***MEFV* GENİNİN EXON 2 BÖLGESİNDEKİ Arg202Gln
POLİMORFİZMİNİN BÖLGEMİZDEKİ SIKLIĞI VE
EXON 10'DAKİ MUTASYONLAR İLE İLİŞKİSİ**

Atilla TOPÇU

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İbrahim PİRİM**

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM- 2011**

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MEFV GENİNİN EXON 2 BÖLGESİNDEKİ Arg202Gln POLİMORFİZMİNİN
BÖLGEMİZDEKİ SIKLIĞI VE EXON 10'DAKİ MUTASYONLAR İLE
İLİŞKİSİ

Atilla TOPÇU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.02.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 07.03.2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL

Jüri Üyesi : Yard. Doç. Dr. Hasan DOĞAN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Mart 2011

ERZURUM

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yürütölmek üzere ‘*MEFV* Geninin Ekzon 2 Bölgesindeki Arg202Gln Polimorfizminin Bölgemizdeki Sıklığı ve Ekzon 10’daki Mutasyonlar İle İlişkisi’adlı Yüksek Lisans tez konusu Erzurum Valiliğı İl Sağlık Müdürlüğü Erzurum Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı’nın 17.12.2009 tarih ve 27’ nolu kararı ile kabul edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY	II
TEŞEKKÜR	VI
KISALTMA ve SİMGELER	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
TABLolar LİSTESİ	X
ÖZGEÇMİŞ	XI
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji ve Patogenez.....	4
2.3. FMF Genetiği.....	6
2.4. Polimorfizmler (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).....	8
2.5. FMF’de genotip ve fenotip ilişkisi.....	13
2.6. FMF’de Klinik Bulgular.....	15
2.6.1. Ateş.....	17
2.6.2. Karın ağrısı.....	17
2.6.3. Eklem bulguları	17
2.6.4. Göğüs ağrısı	18
2.6.5. Cilt bulguları	18
2.6.6. Vaskülit	19
2.6.7. Diğer sistem tutulumları	19
2.6.8. Amiloidoz.....	19
2.7. FMF Laboratuvar Bulguları	20
2.8. Tedavi.....	20
2.9. PYRIN/Marenostrin	21
2.10. Moleküler Teknikler.....	22
2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR/PCR).....	22
2.10.2. DNA dizi analizi.....	23

3. MATERYAL ve METOD	25
3.1. İncelenecek Örneklerin Toplanması	25
3.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	25
3.3. DNA Dizi Analizi Çalışması	26
3.3.1. DNA dizi analizi ve hazırlık aşamaları.....	26
3.3.1.1. <i>MEFV</i> genin için PZR reaksiyonunun hazırlanması.....	26
3.3.1.2. PZR şartları.....	27
3.3.1.3. Ekzon 2 için PZR'ın hazırlanışı.....	28
3.3.1.4. PZR şartları.....	29
3.3.1.5. Agaroz jelin hazırlanışı	30
3.3.1.6. PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi	30
3.3.1.7. PZR ürünlerinin temizlenmesi.....	31
3.3.1.8. <i>MEFV</i> Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılması	31
3.3.1.9. Dizi analizi yapılacak PZR ürünlerinin Temizlenmesi	34
3.3.1.10. DNA dizi analiz reaksiyonu.....	34
3.3.1.11. DNA dizi analizinin değerlendirilmesi.....	35
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA	42
SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR.....	49

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı Doku Tiplendirme ve Moleküler Tanı Laboratuvarında yapılmıştır.

Yüksek Lisans süresince ve bu çalışmada hertürlü yardım ve desteği esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. İbrahim PİRİM ve Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Hasan DOĞAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Katkılarından dolayı Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Hamit ACEMOĞLU ve Ziraat Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yard. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR'e çalışma esnasında her türlü yardım ve destek gördüğüm Uzman Dr.Nilnur EYERCİ'ye laboratuvarında çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. G.Zişan ŞAHİN, Bio. Eda DİYARBAKIR, Bio. Numan TAŞPINAR, Bio. Mehmet EZER, Bio. Nuriye GİNİŞ ve Lab. Tek. Melek SEVCİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca Yüksek Lisans ve çalışmalarım esnasında destek ve teşviklerini esirgemeyen beni bu günlere getiren çok kıymetli aileme ve Canan YELYURT'a teşekkür ederim.

KISALTMA ve SİMGELER

AAA	: Ailesel Akdeniz Ateşi
Arg	: Arjinin aminoasiti
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System
ASC	: Apoptosis associated speck like protein with CARD
ATP	: Adenozin Trifosfat
CTP	: Sitozin Trifosfat
CARD	: Caspase Recruitment Domain (Kaspaz toplanma bölgesi)
CRP	: C-Reaktif Protein
CINCA	: Kronik Çocukluk Çağı Nörolojik Deri ve Eklem Sendromu
C5a	: Kompleman 5a
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dH₂O	: Deiyonize su
ddNTP	: Dideoksinükleotidler
FMF	: Familial Mediterranean Fever
FCUS	: Ailesel Soğukta Uyarılan Ürtiker Sendrom
Gln	: Glutamin aminoasiti
GTP	: Guanozin Trifosfat
HIDS	: Hiper Ig D Sendrom
HSP	: Henoch-Schönlein Purpurası
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
Kb	: Kilobaz
MEFV	: Ailesel Akdeniz Ateşi geni

mRNA	: Masanger Ribonükleikasit
MICA	: Major Histocompatibility Complex Class-I chain-related gene-A
MWS	: Muckle-Wells Sendrom
NF-KB	: Nüklear Faktör Kappa Beta
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri
PFAPA	: Periyodik Ateş-Aftöz Sometik – Farenjit Adenopati Sendrom
Q	: Glutamin Aminoasiti
R	: Arjinin Aminoasiti
SAA	: Serum Amiloid A
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. 16.Kromozomda <i>MEFV</i> Lokalizasyonu (NCBI).....	6
Şekil 2. <i>MEFV</i> Geninin Ekzonlarında Tesbit Edilen Polimorfizmler ve Mutasyonlar.....	9
Şekil 3. Pysin Proteininin alt birimlerinin şematik gösterimi.	22
Şekil 4. Dizi Analizi İçin Kullanılan Exon 2 Bölgesi ve Primer Oturma Bölgeleri. (Küçük Harfli Sıralanmış Bölge İtronu Göstermektedir.(http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/)	28
Şekil 5. Ekzon 2 PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntüsü	30
Şekil 6. <i>MEFV</i> Geninin 2. Ekzonda R202Q'nun Dizi Analizi	36
Şekil 7. <i>MEFV</i> Geninin 2. Ekzonunda R202Q'nun Heterozigot Dizi Analizi.....	36
Şekil 8. <i>MEFV</i> Geninin 2. Ekzonunda R202Q'nun Homozigot Dizi Analizi	37

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>MEFV</i> Geninde Görülen Mutasyonlar, Polimorfizmler ve Aminoasit Değişimler	10
Tablo 2. Ekzon 10 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (İleri) ve Revers (Geri) Primer Dizileri	26
Tablo 3. <i>MEFV</i> Geninin Ekzon 10 Bölgesinin Çoğaltılmasında PZR nin Bileşenleri ve Miktarları.....	27
Tablo 4. <i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesi PZR Isıl Değişiklikleri	27
Tablo 5. Ekzon 2 Dizi Analizi İçin Kullanılan Forward (ileri) ve Revers (geri) Primer Dizileri	28
Tablo 6. <i>MEFV</i> Ekzon 2 İçin 30 µl'lik PZR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	29
Tablo 7. <i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesi PZR Isıl Değişiklikleri.....	29
Tablo 8. <i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 21,7 µl'lik PZR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları....	32
Tablo 9. <i>MEFV</i> Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PZR Isıl Değişkenleri.....	32
Tablo 10. <i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 µl'lik PZR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	33
Tablo 11. <i>MEFV</i> Ekzon 2 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılmasında Kullanılan PZR ısı Değişkenleri.....	33
Tablo 12. <i>MEFV</i> Geninde Ekzon 2 Bölgesinde Mutasyon Taşıyan Hasta Sayısı.....	38
Tablo 13. Ekzon 2 R202Q (c.605G>A) Gen Değişimi Ekzon 10 daki Mutasyonlar ile Beraberliği.....	39
Tablo 14. <i>MEFV</i> Ekzon 2'de R202Q (c.605G>A p.Arg202Gln) Gen Değişimi ile Ekzon 10 Mutasyonlarının Genotip Dağılımı	40
Tablo 15. Ekzon 2'de R202Q değişimi ve Ekzon 10'da Birden Fazla Mutasyonu Olan Hastalar Değerleri	40
Tablo 16. Ekzon 2 R202Q (C.605G>A) nin Diğer Mutasyonlar ile İstatistiksel Değerleri.....	41

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Üsküdar'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2006 yılında bitirdi. 2007-2011 yılları arasında girdiği Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.

ÖZET***MEFV* GENİNİN EXON 2 BÖLGESİNDEKİ Arg202Gln POLİMORFİZMİNİN
BÖLGEMİZDEKİ SIKLIĞI VE EXON 10'DAKİ MUTASYONLAR İLE
İLİŞKİSİ**

FMF (Familial Mediterranean Fever) veya Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA), tekrarlayan ateş, serozal, sinovyal ya da kutanöz inflamasyon şikayetleri ile tesbit edilen otozomal resesif kalıtılan sistemik otoinflamatuvar bir hastalıktır.

FMF hastalığına neden olan gen 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) haritalanmıştır. *MEFV* geni 15 kb uzunluğunda 3505 nükleotidden oluşmaktadır. FMF genin kodladığı proteine Pýrin/Marenostrin denilmektedir. Pýrin 781 aminoasitten oluşan bir proteindir ve bu proteinin inflamasyonda regülatör olarak görev yaptığı düşünülmektedir.

Pýrin granulosit, monosit, dendritik hücre ve sinovyal fibroblastlarda eksprese olur. Ayrıca dalak, akciğer ve kasta da eksprese edilir.

FMF'in nedeni pýrin proteinini kodlayan *MEFV* geninde resesif kalıtılan mutasyonlardır. FMF taşıyıcı frekansı Doğu Akdeniz popülasyonunda çok yaygındır. Hastalık genel olarak Türk, Arap, Askenazi olmayan Yahudi ve Ermenilerde yaygındır ve taşıyıcı oranı yüksektir. Hastalığın en ciddi sorunu renal amiloidozdur.

Olgu grubu belirlenirken *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde R202Q değişiminin olduğu 186 hasta çalışmaya alındı. Ekzon 2 bölgesinde R202Q gen değişimi bulunan hastalarda bu değişimin Ekzon 10 bölgesindeki mutasyonlar ile ilişkisi araştırıldı. Tüm örneklerle DNA Dizi Analizi yapıldı. Çalışma sonucunda R202Q değişimi olan 186 hastada Ekzon 10 bölgesinde yer alan M694V (%71) ile önemli bir ilişki gösterdiği,

M680I (%8,6) , V726A (%8,1) , R761H (%4,3) , A744S (%0,5) mutasyonları ile ilişki göstermediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: FMF, Arg202Gln Polimorfizmi, *MEFV* gen mutasyonları.

ABSTRACT**FREQUENCIES OF Arg202Gln POLYMORPHISM AT THE REGION OF
EXON 2 in *MEFV* GENE AND ITS ASSOCIATION WITH EXON 10
MUTATIONS**

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive disease characterized by recurrent attacks of inflammation of serosal membranes.

The gene, which is related to the FMF, is localised on short arm of chr16 (16p 13.3). It consists of 3505 nucleotid with 15 kb length. The product of FMF gene is called Pyrin/Marenostrin. Pyrin involves 781 aminoacid and plays a role for inflammation.

Pyrin protein is expressed in granulocyte, monocytes, dendritic cells and fibroblasts. Moreover, spleen, lung and muscle cell are also expressed the protein.

The frequency of FMF carriage is high at the population of Eastern Mediterranean region. The prevalence of the disease is frequently high among Turkish, Arabs, Jews and Armenians populations.

The study plan was made according to presence of R202Q polymorphism in patients 186 subjects. In these subjects, exon 2, R202Q polymorphism was compared to existance of exon 10 mutation. All DNA samples were analyzed by DNA sequence. The results of the study represented that M694V (%71) mutation was significantly associated with R202Q polymorphism, less significant other mutations were found as follow; M680I (%8,6), V726A (%8,1), R761H (%4,3) and A744S (%0,5).

Key Words: FMF, Arg202Gln polymorphism, *MEFV* gene mutations

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) resesif kalıtım gösteren özellikle Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap'larda yaygın görülen otoimflamatuvar bir hastalıktır. FMF kısa süreli ateş ve periton, plevra, eklemler ve deriyi içine alan bölgesel enflamasyon belirtileri gösterir. FMF enflamasyonun da etkilenen dokuya çok sayıda polimorf lokosit, nötrofil ve hızlı akut faz yanıt elemanı gönderilir. FMF, bazı hastalarda ilerleyici sistemik AA amiloidoz, böbrek yetmezliği ve ölüme yol açabilir. Çoğu hastada, hastalık 20 yaşından önce başlar. Atipik ataklar her birkaç hafta ya da ay, 12-72 saat arasında sürer. Atakların arası semptomsuzdur fakat enflamasyon devam edebilir.^{1,2}

FMF den sorumlu gen 1992 yılında pozisyonel klonlama yöntemi kullanılarak 16p13.3 bölgesinde tanımlanmıştır. *MEFV*, 781 amino asit kodlayan 10 ekzona sahiptir. Protein ürünü pyrin ya da marenostrin olarak adlandırılır. Şu ana kadar 186'dan fazla FMF ile ilişkili mutasyon belirlenmiştir. Doğu Akdeniz populasyonlarında mutant allel taşıyıcı sıklığı çok yüksektir. Ekzon 10 daki 3 mutasyon M680I, M694V ve V726A yaygındır. Populasyondaki yüksek taşıyıcı frekansı heterozigot seçilimi ile açıklanabilir. Henüz tanımlanmamış enfeksiyon ajanlarına karşı artan direncin buna neden olduğu düşünülmektedir.³

Son çalışmalar göstermiştir ki FMF mutasyonları İspanyol, İtalyan, Yunan, Kürd, Yahudi olmayan Kafkaslılar, Hindliler ve Çinlilerde görülmektedir.⁴

Çoğu FMF ilişkili mutasyonun tek aminoasit değişimi ve birkaç aminoasit duplikasyon/delesyon mutasyonları olduğu görülmüştür. Sadece iki mutasyon ekzon 2 de çerçeve kayması ve ekzon 10 da nonsense mutasyon olarak bildirilmiştir.

Populasyona bağlı olarak FMF hastalarının %30'u protein kodlanan dizi içerisinde mutasyon taşır. FMF'in dominant olarak kalıtıldığı birkaç durum rapor edilmiştir.⁵

Bizim alışmamızda FMF n tanısı ile laboratuvarımıza gelmiş olan hastalarda *MEFV* geninde 2.Ekzonda R202Q değişimi incelenmiş ve bu genin 10.Ekzonundaki mutasyonlar ile sıklığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu alışma; klinik olarak R202Q'nun FMF hastalığının fenotipi üzerine etkisinden ziyade, R202Q değişimini heterozigot veya homozigot taşıyan bireyler arasında bu genin 10. ekzondaki mutasyonlar ile sıklığını gösteren istatistiksel bir analiz çalışmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

FMF karın zarı, eklem iltihabı, ateş ve erizipel benzeri eritem ile tanımlanabilinen otozomal resesif bir hastalıktır. FMF in en önemli tahrip edici etkilerinden biri böbrek ve böbreğin dışında diğer organlarda da oluşabilen amiloidozdur. Hastalık Akdeniz çevresi ülkelerde yaygın olmakla beraber Akdeniz çevresinde olmayan Birleşik Devletler ve Japonya'da da rapor edilmiştir. FMF hastalığının büyük olasılıkla prevalansı en yüksek olan ülke Türkiye'dir. Anadolu'da FMF dağılım oranı yaklaşık olarak 1:400 dür. Türklere en sık rastlanan mutasyonlar M694V, M680I, V726A, E148Q dur. FMF'de cinsiyet, SAA (Serum Amiloid A) polimorfizmi ve çevresel faktörler prognozunda etkili olmaktadır.⁴

2.1. Tarihçe

Ailesel Akdeniz Ateşi ilk olarak 1900 yıllarda rapor edilmiştir. Hastalık ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından "değişik bir proksimal sendrom" adı ile tanımlanmıştır.⁶ Bundan sonra hastalığın ayrıntılı tanımlanması 1945 yılından itibaren başlamıştır.⁷ FMF'in ölümcül sonuçlara neden olan komplikasyonu olan amiloidoz 1952 yılında tanımlanmıştır.⁸ Heller ve ark.² 1958 yılında ilk kez Ailesel Akdeniz Ateşi tanımını kullanmış ve hastalığın otozomal resesif geçtiğini göstermiştir. Türklere ilk kez 1946'da rapor edilmiş ve 1955'de hastalık olarak Yarkın ve ark. tarafından bildirilmiştir.⁶

İlk defa 1972'de Goldfinger⁹ tarafından kolşisinin FMF üzerine etkisi gösterilmiştir.

1992'de Ailesel Akdeniz Ateşinden sorumlu olan gen *MEFV* 16. Kromozomun kısa kolunda haritalandıktan sonra birbirinden bağımsız Uluslararası FMF

Konsorsiyomu ve Fransız FMF Konsorsiyomu tarafından bu gen klonlanmış ve bu genden kodlanan proteine pyrin veya marenostin adını vermişlerdir.¹⁰

MEFV geni ve taşıdığı mutasyonların ortaya çıkması üzerine FMF'in yaygın olduğu pek çok ülkede *MEFV* mutasyonları ve bu mutasyonların fenotipe etkisi araştırılmıştır. Hastalığı meydana getiren moleküler mekanizma halen tam anlamıyla çözülebilmemiş değildir.¹¹

2.2. Epidemiyoloji ve Patogenez

FMF, otozomal resesif kalıtım gösteren, dünya çapında 100000'den fazla insanı etkileyen, kalıtsal periyodik hastalıklar arasında en yaygın olanıdır.¹² Ailesel Akdeniz Ateşi daha çok Doğu Akdeniz, toplumlarda özellikle Askenazi olmayan Yahudiler, Ermeniler, Türkler ve Araplar arasında yaygındır. Hastalık diğer toplumlarda da nadir olarak görülmektedir. 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.⁶

Türkiye'de FMF görülme sıklığı %0,1 ve mutasyonu taşıyıcılık oranı %20 olarak saptanmıştır.¹³

Bazı çalışmalarda hastalığın erkek ve kadınlardaki oranı 1,5-2.0:1.0 olarak¹⁴, erkeklerde daha çok görüldüğü bildirilmiş ise de, hastalıktan her iki cinsiyetinde aynı oranlarda etkilendiği gösterilmiştir.¹³

Günümüzde FMF hastalığının etyopatogenezi tam olarak kesinleşmemiştir. FMF patogenezi hakkında birçok görüş mevcuttur. Etyopatogenezi güncel olarak açıklayan görüş, inflamasyon yanıtında bir bozukluğa dayanan görüştür. Buradaki ilk bozukluk,

defektif nötrofil lizozom fonksiyonuna bağı olarak ortaya çıkan yalancı inflamatuvar uyarılardır.⁶

İnflamasyon Pysin proteinin karboksil ucunda bulunan CARD (Caspase Recruitment Domain) apoptoza giden hücrelerde zerre (speck like) denen 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. Pysin 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.¹⁵ 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 bağı olarak C5a seviyesi aktivitesinin düşük olmasını sağlayarak atakların oluşmasına neden olmaktadır.

Pysin 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. Pysin kaspaz-I için düzenleyici rolüne ek olarak pyrinin parçalanması hem FMF'in moleküler patogenezini anlamada hem de FMF için yeni tedavilerin geliştirilebilmesinde önemli bir ipucu sağlar.

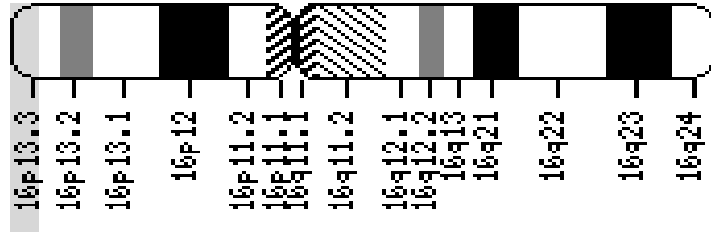
FMF hastalarının serozal ve sinoviyal yüzeylede polimorf nüveli lökositlerinin baskın olduğu ve migrasyonunun artığı ve ataksız dönemde de bazı sitokin (IFN-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-8) mRNAlarının üretimini artığı gösterilmiştir.¹⁶ Atak

dönemlerinde ise TNF-alfa CRP, IL-6, soluble TNF reseptör süper ailesi IA ve IB, sIL-2R'nün arttığı gösterilmiştir.¹⁷

Lökositler dışında diğer dokularda yapılan *MEFV* gen ekspresyon analiz çalışmalarında FMF geninin mRNAsı bulunamamıştır.¹⁸ Pysin proteinin nötrofillerde ifade edilmesi bu proteinin inflamasyonlarda regülatör olarak görev aldığı hipotezini güçlendirmektedir.¹⁹

2.3. FMF Genetiği

FMF hastalığına yol açan *MEFV* geni 16. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır(Şekil.1). *MEFV* geni 10 ekzondan oluşmakta ve Pysin denilen proteini kodlamaktadır.



Şekil 1. 16. Kromozomda *MEFV* Lokalizasyonu NCBI

FMF hastalığı otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalık olmasına rağmen dominant geçişide 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.⁵ *MEFV* geni 10 ekzonluk bir gen olup 781 aminoasitlik bir pysin veya marenostrin adı verilen proteini kodlamaktadır. *MEFV* de tesbit 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.²⁰

2009 yılı itibariyle FMF veri tabanında 186 gen değişimi bildirilmiştir²⁰ (Şekil 2). Mutasyonların çoğu yanlış anlamlı mutasyon şeklinde olup, proteinin (Pyrin/Marenostrin) yapısı ve fonksiyonunu değiştirmektedir, şimdiye kadar tesbit edilmiş mutasyon ve polimorfizmler ve aminoasit değişiklikleri Tablo.1’de verilmiştir. Bu 186 gen değişimi içerisinde özellikle 5 mutasyon tipi M694V, M680I, V726A, R761H, E148Q FMF hastalığında en sık rastlanılan mutasyonlardır. Bu mutasyonlarından M694V, M680I, V726A, R761H ekzon 10’da E148Q ise ekzon 2’de yer almaktadır. Farklı sıklıklarla olmakla beraber M694V mutasyonu daha ağır klinik seyir izlemekte ve amiloidoz gelişimi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.⁶

Giaglis ve ark.²¹ Ortadoğu ve Akdeniz çevresindeki ülkelerde yapmış oldukları çalışmada FMF hastalığını oluşturan *MEFV* gen mutasyon sıklığını sırası ile Ekzon 10’da M694V, V726A, M680I Ekzon 2’de E148Q ve yine Ekzon 10’da M694I olarak bildirmişlerdir.

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise Yılmaz ve ark.²²’ları Türk populasyonundaki FMF yüzdesini 1:1075 olarak göstermişlerdir.

Yılmaz ve ark.²² yine Türk populasyonunda yapmış oldukları çalışmada ise FMF hastalığını oluşturan bu gende (*MEFV*) meydana gelen mutasyon sıklığını sırası ile M694V, M680I, E148Q, V726A olarak tesbit etmişler ve diğer yapılan çalışmalar gibi M694V mutasyon sıklığının benzer olduğunu göstermişlerdir.

Bernot ve ark,²³ yapmış oldukları bir çalışmada R202Q değişiminin pyrin proteinin N-terminalinde meydana gelen bir polimorfizm olduğunu söylemektedirler.

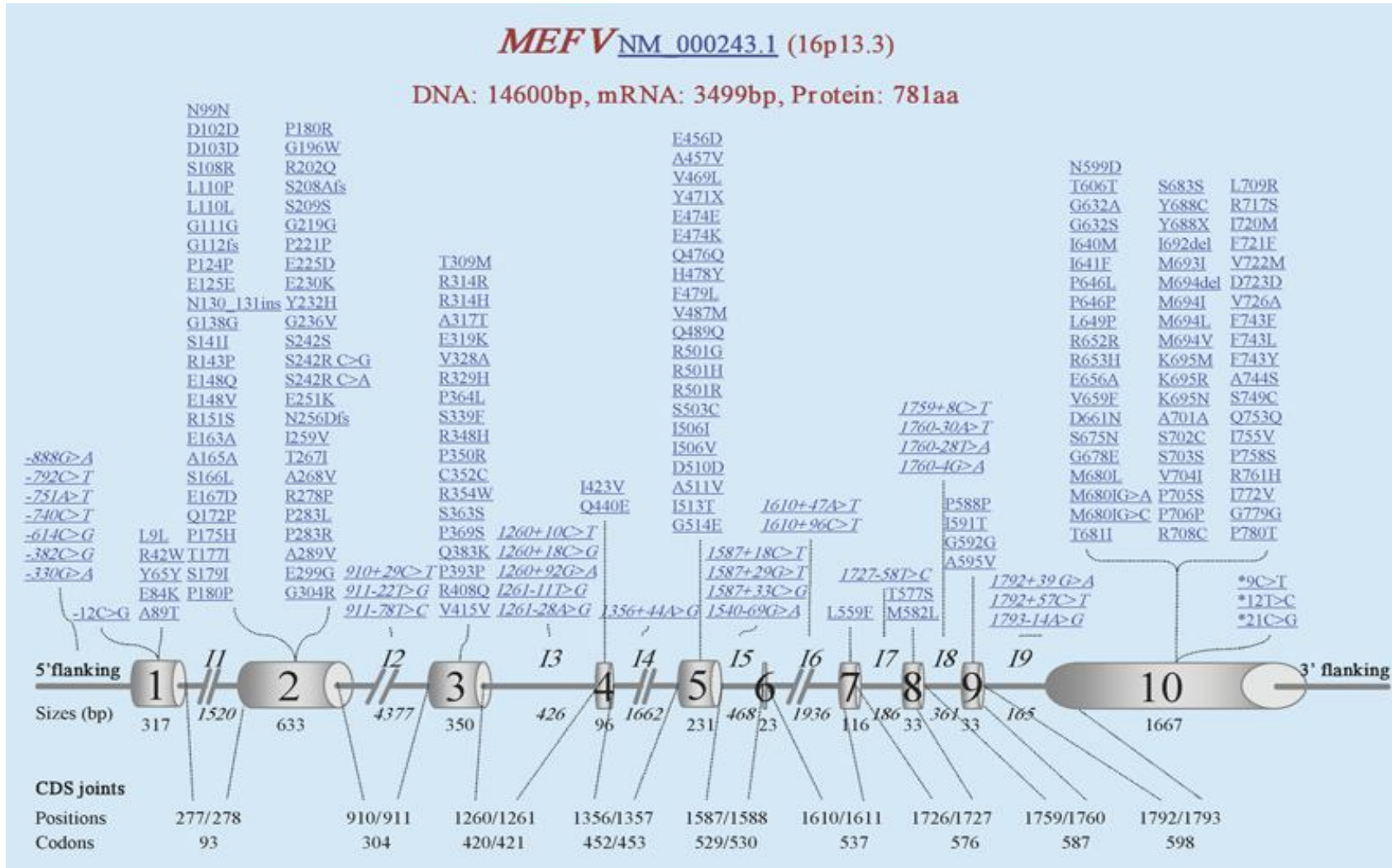
Yunanistanlı bir grup araştırmacının Yunanistan'da Yunan popülasyonu arasında yapmış oldukları bir çalışmada R202Q gen değişimine rastladıklarını ve sağlıklı kişiler arasında R202Q heterozigotluğunun (%25) yaygın olduğunu göstermişlerdir.²¹

Ayrıca Uluslararası FMF Konsorsiyomu da R202Q'nın sıklıkla rastlanılan bir polimorfizm olduğunu bildirmektedir.²⁰ Ülkemizde ve bölgemizde R202Q gen değişimi ile ilgili epidemiyolojik bir araştırma yapılmamıştır.

2.4. Polimorfizmler (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

Diğer genomlar gibi, insan genom DNA'sı da statik değildir, aksine, değişik tiplerde kalıtsal değişikliklere maruz kalmaktadır. Yeni mutasyonlar bir bireyin germinal veya somatik hücrelerinde oluşur. Eğer germinal hücrelerde gerçekleşen bir mutasyon bireyin üremesine engel olmuyorsa gelecek nesillere aktarılabilir ve popülasyondaki frekansı artabilir. Allelik dizilerdeki varyasyon, (eğer bir varyantın frekansı 0,01'den büyükse) DNA polimorfizmi olarak tanımlanır. İnsan genomik DNA'sının ortalama heterozigotluk oranı 0,0037 olarak hesaplanmıştır. Allelik dizilerdeki varyasyon, mutasyon oranı relatif olarak düşük olduğundan nadiren yeni mutasyonların bir sonucu olarak meydana gelir. Bu nedenle, bir bireydeki farklı allelik diziler *de novo* mutasyonlarla ortaya çıkmaz, kalıtlanır.²⁴

Genomik DNA üzerinde gözlenen polimorfizmler; popülasyon genetiği, ilaç çalışmaları, adli tıp çalışmaları, organ nakli, kanser ve genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bakış açıları oluşturmaktadır.



Şekil 2. MEFV Geninin Ekzonlarında Tesbit Edilen Polimorfizmler ve Mutasyonlar

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

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_391insGAGGGGAC	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
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 Asn→ArgfsX70
2	T267I	c.800C>T	267.Kodon Thr→Ile
2	A268V	c.803C>T	268.Kodon Ala→Val

Tablo 1. (devam)

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
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
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
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

Tablo 1. (devam)

EKZON	MUTASYON	NÜKLEOTİD DEĞİŞİMİ	KODON DEĞİŞİMİ ve ETKİSİ
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
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

2.5. FMF’de genotip ve fenotip ilişkisi

FMF’de neden olan genin tanımlanmasından sonra devam eden moleküler çalışmalar ve klinik bulgular ile bu hastalığın genotip ve fenotip ilişkisi ortaya konmaya başlanmış ve moleküler tekniklerin gelişmesi ile bu çalışmalar hız kazanmıştır. DNA dizi analizi öncesi dönemde FMF’de neden olan mutasyonların tam olarak belirlenmesi sağlanamamış, DNA dizi analizleri ile bu mutasyonlar kesin olarak belirlenebilmiştir.¹⁸ FMF hastalığına neden olan gen *MEFV*’de en sık rastlanılan mutasyonlardan biri olan M694V, bu hastalığın en öte komplikasyonunu oluşturan amiloidoz gelişimi arasında bağlantının olduğu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır.^{4, 25-28}

Halihazırda en fazla fenotip-genotip ilişkisi M694V’ye aittir. M694V’nin homozigot yüzdesi fazla olmakla birlikte bazı hastalıklarla ve FMF hastalığı atakları ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. M694V homozigot hastalarda amiloidoz daha erken meydana gelmekte, eklem iltihabı oluşmakta, ayrıca göğüs ağrısı, eritem gibi bir seri hastalık da oluşmaktadır.⁵

FMF hastalığında *MEFV* geninde meydana gelen mutasyonlar dışında bazı modifiye edici faktörlerde vardır. Modifiye edici faktör, bir hastalığın ortaya çıkmasında zorunlu olmayan ve daha hafif etki edebilecek özellik kazandırabilen genetik faktörlerdir. Bu modifiye edici faktörlerden biri MICA (Major Histocompatibility Complex Class-I chain-related gene A) dır. M694V’nin homozigot olması durumunda bu modifiye edici etkilerden olan MICA A9 hastalığın etkisini erken yaşlarda gösterir. Ayrıca MICA A4’ün bulunması durumunda hastalık daha hafif şiddette olduğu gösterilmiştir. Yine M694V mutasyonunu homozigot taşıyan MICA A5 alleleline sahip olanlarda amiloidoz gelişiminde azalma olduğu bildirilmiştir.⁵

FMF hastalığına etki eden *MEFV* geni dışında modifiye edici moleküllerden biri de Serum Amiloid A1 α/α lokuslarıdır. Akut faz proteinlerinden biri olan SAA 1 proteinin yıkılması ile amiloidozu oluşturan Amiloid A1 ve A2 yi meydana getirir. Bu nedenle SAA 1 geninin α/α genotipi renal amiloidoz oranını arttırdığı β/β ve β/α allellerinin ise amiloidoz gelişimine koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir.²⁹

Yapılan bir çalışmada M694V homozigot mutasyonuna sahip olan hastalarda amiloidoz oluşma olasılığı yüksek bulunurken bundan sonra ise ikinci en yüksek oran R202Q mutasyonunda saptanmıştır.³⁰

İkinci ekzonda yer alan R202Q mutasyonunun Yunanlılarda homozigot bulunması FMF hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve hastalığın atak sıklığı ve oluşturacağı komplikasyonlarla da bağlantılı olabileceği bildirilmiştir.²¹

FMF mutasyonları içinde en çok rastlanılan M694V, M694I, M680I, E148Q gibi mutasyonları belirlemek için birçok moleküler genetik yöntem kullanılmaktadır. Bu genetik analizler, FMF hastalarına tanının konmasını kolaylaştırmış ve tanı sonrası kullanılacak ilaç dozajının ayarlanmasında bir fikir oluşturulmasına yardımcı olmuştur.⁹

Amiloidoz oluşumunda bu mutasyonların dışında çevresel faktörlerinde etkili olabileceği konusunda çalışmalar yapılmıştır.^{1,31}

FMF hastalığında üç farklı fenotipin görüldüğü bildirilmiştir. Bunlardan fenotip I olan karın ağrıları oluşturan kısa süreli fibril ataklarla kendini gösteren form; fenotip II amiloidoz ile ilişkili formdur.³² Üçüncü form ise mutasyon olmayan tipik FMF hastalığı bulguları taşıyan formdur.³³

2.6. FMF’de Klinik Bulgular

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalarının %90’ında klinik bulgular, çocukluk çağında ya da ergenlik döneminde ortaya çıkar. İlk AAA atağı ise %75 hastada yaşamın ilk on yılı içerisinde görülür. Hastalığın daha çok erkeklerde görülebileceğinin bildirilmesine rağmen ülkemizde kız ve erkek hasta sayıları birbirine eşittir. Hastalığın klasik klinik tablosunu, yenileyen ateş ve poliserozit atakları oluşturur. Atağın süresi çoğunlukla 3-4 gün arasında değişmesine karşın daha uzun ya da daha kısa süren nöbet şekilleride olabilir. Ataklar, çoğunlukla herhangi bir ön bulgu vermeksizin ani olarak ortaya çıkar ve daha sonra kendiliğinden kaybolur. Ataklarda bulunan klinik bulgular çeşitli şekillerde olabilmesine karşın, en sık görülen nöbet kombinasyonu ateş, karın ağrısı, ve eklem bulgularıdır. Çocuklarda yorgunluk, baş ağrısı, ağız içi yaralar oluşabilir ve bu belirtiler atak dışında da görülebilir.

FMF hastalığının başlangıç yaşı da farklılık göstermektedir. Özellikle erken dönemlerde ortaya çıkmaktadır.³⁴

Fenotip I’de erken yaşlarda yukarıda da belirttiğimiz semptomlar atak süresinde görünürken, fenotip II ise bu ataklar olmadan amiloidozun gözlenmesidir.^{22, 26}

FMF hastalığı PFAPA, TRAPS ve HIDS gibi periyodik ateş sendromları ile benzer belirti göstermektedir. PFAPA (Periyodik Ateş-Aftöz somatik-farenjit Adenopati Sendrom)’yu FMF den ayıran en önemli bulgusu boğazda tekrarlayıcı tarzda görülmesi, kolşisine cevap vermeme ve immün süpresör olan steroide cevap vermesine dayanır. TRAPS (Tümör Nekrozis Faktör Reseptör İlişkili Periyodik Sendrom) ise otozomal dominant kalıtılan bir hastalık olup FMF’e benzer özellikler göstermekte, kas tutulması, şiddetli ağrı, gezici eritem gibi bulgular ile FMF’den ayrılır. HIDS (Hiper IgD

Sendrom) tekrarlayan ateş atakları ile FMF'e benzer fakat IgD düzeyinin devamlı yüksek olması ve servikal lenf nodlarının tutulması ile FMF hastalığından ayrılır.³⁵ CINCA (Kronik Çocukluk Çağı Nörolojik Deri ve Eklem Sendromu) otozomal dominant olarak kalıtılır. Kronik menenjit, eklem tutulması, ateş oluşturur, amiloidoz görülmektedir. Glukokortisteroidler tedavide kullanılır ve cevap alınır. MWS (Muckle-Wells Sendrom) ve FCUS (Ailesel Soğukla Uyarılan Ürtiker Sendrom) ateş, halsizlik, kas, eklem ağrısı ve periyodik ateş oluşturması yönünden FMF hastalığına benzer, amiloidoz gelişimi vardır, anakirna gibi ilaçlara karşı cevap oluşturur.³⁶

FMF tanısında Tel-Hoshomer kriterleri uygulanmakta ve iki majör veya bir majör, iki minör kriter; muhtemel tanı içinde bir majör ve bir minör kriter seçici olmaktadır.³²

Tel-Hoshomer Kriterleri

Majör Kriterler

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

Minör Kriterler

- Yenileyen ateşli ataklar
- Erizipel benzeri döküntü
- Birinci derece akrabada FMF hastalığı

2.6.1. Ateş

FMF'nin en sık görülen klinik bulgularıdır. Yalnız ateş ile birlikte süren nadir ataklar olabilmesine karşın, çoğunlukla diğer klinik bulgular ile birlikte görülür. Ateş, atak boyunca yüksek kalır. Vucut ısı 40°C düzeyine kadar yükselebilir. Hatta ateşli dönemlerde febril konvülziyon dahi görülebilir. Bazı hastalarda ateş çok yükselmediği için gözden kaçabilir. Aynı hastanın bazı nöbetlerinde yüksek, bazılarında düşük ölçülebilir.⁶

2.6.2. Karın ağrısı

FMF'in ateşden sonra en sık görülen klinik bulgusudur. Hastaların ortalama %95'inde bulunur. Karın ağrısı çoğunlukla orta karın bölgesine yerleşir. 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 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.⁶

2.6.3. Eklem bulguları

Ateş ve karın ağrısından sonra, FMF'in en sık görülen 3. klinik bulgusudur (%60-70) ve ateş ve karın ağrısı olmaksızın da ortaya çıkabilir. Eklem tutulması %70 olguda artrit, %30 olguda ise artralji şeklinde görülür. FMF'deki artrit, çoğunlukla alt ekstremitelere yerleşen, sekel bırakmayan, gezici olmayan, nonerozif, akut mono artrittir. 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. Tutulan eklem tipik olarak oldukça şiş ve kızarıklık görünümündedir. Ayak bileğinde oluşan artritlerin %50'sinde ayak sırtında eritem gözlenir. 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. En çok konulan yanlış tanımlar ise akut romatizmal ateş ve juvenil kronik artritdir.⁶

2.6.4. 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 grafide plevral sıvı saptanabilir. Göğüs ağrısı ateş ile gözlenir. Perikard tutulumu daha çok akut perikardiyal tamponat şeklinde olur ve çok nadirdir.⁶

2.6.5. Cilt bulguları

Hastaların yaklaşık %20-25'inde cilt bulgularına rastlanır. En sık rastlanan cilt bulgusu erizipeli andıran tipde görülen eritemdir. Bu lezyon çoğunlukla ayak sırtında ve tibia alt yüzünde yer alan kızarıklık, şiş ve ağrılı bir lezyondur. Döküntü ağrılı dönemlerde ve artritlerle birlikte çıkar. En önemli olan diğer bir cilt bulgusu ise vaskulitlerdir. Ayakta uzun süre durmakta ya da gebelikte ortaya çıkabilen nonspesifik purpuradan başka, nodüler eritem, makülopapular döküntü ve ürtiker ile görülebilir.⁶

2.6.6. Vaskülit

Ailesel Akdeniz Ateşinin seyri sırasında belirgin olarak artmış sıklıkla vaskülitlere rastlandığı, yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. FMF’de en sık görülen vaskülit, Henoch-Schönlein Purpurasıdır (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 PAN’da FMF mutlaka sorgulanmalıdır. Diğer bir vaskülitik tabloda uzamış febril miyaljidir. Yüksek sedimantasyon hızı ve kortikostreoidlere belirgin yanıtla karakterizedir.⁶

2.6.7. Diğer sistem tutulumları

FMF’nin gidişi 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 hastalığın gidişi sırasında aseptik menenjit görülebilir.⁶

2.6.8. Amiloidoz

Ailesel Akdeniz Ateşinin en önemli ve prognozu en çok etkileyen komplikasyonudur. Ailesel Akdeniz Ateşinde oluşan sekonder amiloidoz AA tipindedir. AA tipi amiloidoza yol açan ise, aktif dönemde serum içinde uzun süreli yüksek olarak kalan akut faz reaktantlarından serum amiloid A (SAA)’dır. Bu proteinin karaciğer tarafından sentezlenen akut faz reaktanı, serum amiloid A’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.³⁷ FMF hastalarında amiloidozun oluşumu hastalığın atak sırasından ve şiddetinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Amiloidozun oluşma sıklığı farklı etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. Askenazi olmayan Yahudilerde %80, Anadolu Türklerinde %60 olarak bulunmuştur. Yapılan son çalışmalar ise, Türk FMF hastalarında amiloidoz gelişiminin %7-13 oranında olduğunu göstermektedir.³⁸

Akar ve ark.³⁹ yaptığı bir çalışmada ise SAA α/α genotipinin amiloidoz gelişimi açısından 2,5 kat risk getirdiği gösterilmiştir.

2.7. FMF Laboratuvar Bulguları

FMF hastalığının laboratuvarda incelenecek özel bir belirteci yoktur. FMF hastalarında C5a inhibitörünü inaktive eden enzimin yetersiz oluşundan bu enzimin laboratuvar şartlarında belirlenmesi zordur. Bunun dışında laboratuvar bulgularına baktığımızda bunlar içinde Serum Amiloid A, fibrinojen ve C-reaktif protein gibi inflamasyonda görülen reaktantların artışı söz konusudur.¹² Ayrıca IL-2, IL-10, IL-17 ve IL-18 gibi sitokin miktarlarının değişimide FMF 'in tanısında bir nebze etkili olmaktadır.⁴⁰ Yine IFN- γ düzeyide FMF hastalarında atak sürecinde değişmektedir.⁴¹

2.8. Tedavi

FMF tedavisinde 1972 yılından beri kolşisin kullanılmaktadır.⁹ Kolsişin FMF ataklarını azaltır, dokularda amiloid birikimini engelleyerek amiloidoz gelişimini önler. Ayrıca lökositlerin hareketini engeller, lökositler ve endotel hücreleri üzerinde adhezyon molekülünün ekspresyonunu azaltarak inflamasyon bölgesine lökositlerin

göçünü engeller⁴², polimorfonükleer hücrelerde stokin üretimini modüle edebilir.⁴³ Yine kolsişin serozal hücrelerde C5a arttırdığı ve FMF ataklarını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir.⁴⁴ Uygun dozda kullanılmadığında ishal, geri dönüşümlü miyopati ve lökopeniye neden olmaktadır.

Ayrıca amiloidoz gelişen ve amiloidozun sonucu olarak meydana gelen nefrotik sendromlar ve renal transplantasyon yapılmış sekonder amiloidozlu hastalarında tedavisinde kullanılmalıdır.

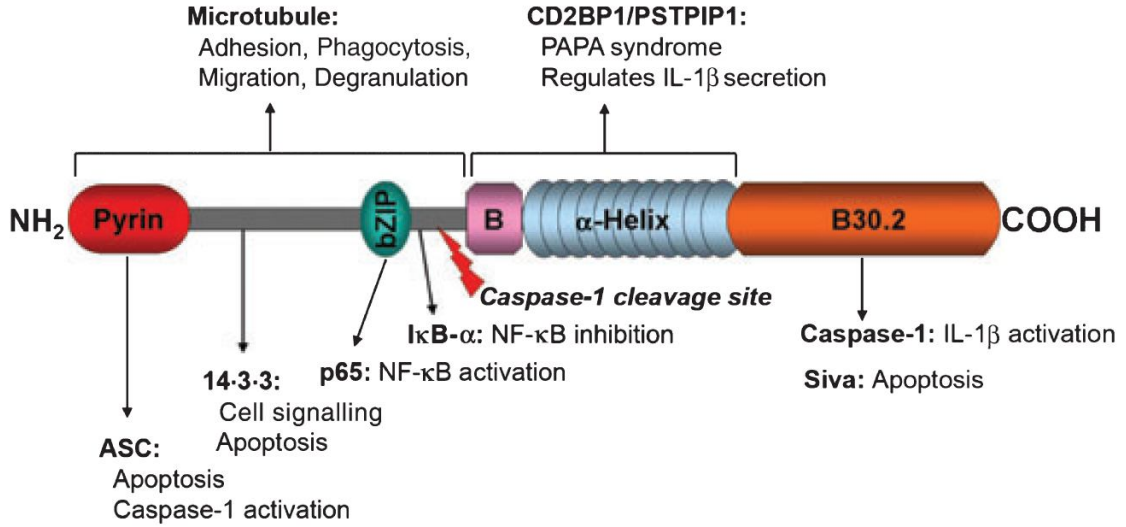
2.9. PYRİN/Marenostrin

FMF geninin kodladığı proteini Fransız grup Akdeniz'in Latince isminden gelen Marenostrin olarak isimlendirmektedirler. Uluslararası Konsorsiyum ise Yunanca'da ateş anlamına gelen Pysin olarak isimlendirmektedir.⁵

Pysin proteini özellikle monosit, granülosit ve dentritik hücreler gibi inflamasyonda görev alan hücrelerde daha çok eksprese olmaktadır. FMF hastalığındaki görevi daha tam olarak anlaşılmasına rağmen inflamasyon reaksiyonlarında indirekt olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Marenostrin/Pysin bir transkrip faktörü olduğunda 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.⁵

Pysin/Marenostrin 86 kd molekül ağırlığında olan ve 781 aminoasitten meydana gelen bir proteindir (Şekil 2). Pysin proteininin ilk 92 aminoasitlik kısmı pyrin bölgesi

olarak adlandırılmaktadır, mutasyonlar bu kısmın görev yapamaması sonucu oluşan inflamasyonun devam etmesine sebep olurlar. Şekil 3. Pyrin Proteininin alt birimlerinin şematik gösterimi.⁴⁵



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 domai

2.10. Moleküler Teknikler

2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR/PCR)

PZR, DNA'nın özgül hedef dizilerinin bölgeye özgü primerler kullanılarak in vitro çoğaltılmasıdır. PZR işlemi denatürasyon denilen yüksek sıcaklıklarda çift zincirli DNA molekülünün ayrılması, hibridizasyon denilen çoğaltılmak istenen bölgeye uygun

sıcaklıklarda primer denilen sentetik oligonükleotidlerin bağlanması ve polimerizasyon denilen DNA zincirinin oluşarak uzamasıdır. Bu işlem belirli miktarda tekrardan oluşur.

2.10.2. DNA dizi analizi

DNA'nın sahip olduğu nükleotidlerin belirlenmesine DNA dizi analizi denir. 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.⁴⁶

a) Maxam-Gilbert yöntemi: DNA'nın tek bir zinciri kullanılarak dizi analizi yapılır. Bu tek zincirli DNA parçasının 5'ucu polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak 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 boyuttadır ve 5'uclarıdan radyoaktif olarak işaretlidir. Ürünler elektroforez sonrası otoradyografi ile görüntülenir.⁴⁶

b) Sanger DNA dizi analizi yöntemi: En çok kullanılan DNA dizi yöntemidir. Dizisi belirlenecek DNA önce tek zincir haline dönüştürülür. Tek zincirli DNA 3'ucuyla birleşecek olan primer ile karıştırılır. Primer bağlı tek zincirli DNA dört ayrı tüpe paylaşılır. Daha sonra tüplere DNA polimeraz ve dört tip deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) eklenir. Ayrıca her tüpe didoksinükleotid (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 komplementini

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.⁴⁶

DNA dizi analizi otomatik hale getirilmiştir ve bu sistemde günde yüzbinlerce 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, sitozin ile sonlanan zincirler başka bir renktedir ve böylece her bir baz için ayrı renk mevcuttur.⁴⁶

3. MATERYAL ve METOD

3.1. İncelenecek Örneklerin Toplanması

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Laboratuvarımıza çeşitli kliniklerden rutin FMF mutasyon analizi için gönderilen FMF ön tanısı almış 1700 hastada Ekzon 10, bu hastalar içinden 500 hastada da Ekzon 2 bölgesinde dizi analizi yapılmıştır. Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgelerinde yaygın olarak görülen mutasyonlar tesbit edilmiştir.

Olgu grubu belirlenirken önemli bir nokta olarak tüm örneklerde *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde R202Q değişiminin olduğu 186 hasta çalışmaya alınmış olmasıdır. Hastaların çalışmamıza alınabilirliğine dair etik kurul kararı Erzurum Etik Kurul Başkanlığından alındı.

Bu hastalar için FMF protokol numarası, ad-soyad, yaş, memleket bilgileri, laboratuvarımıza geliş tarihi, testi isteyen klinik bilgisi, hastalık belirtileri, ilaç kullanıp kullanmadığı bilgisi ve aile öyküsü 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 EZ1 Advanced Blood Kit-Qiagen kullanıldı. 200-300 µl kan örneğinden 100 µl DNA elde edildi (5-50 ng/µl).

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 SEQUANCE (Beckman Coulter-ABD) cihazı kullanılmıştır.

3.3.1.1. *MEFV* genin için PZR reaksiyonunun hazırlanması

Toplam reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde Tablo 3'deki bileşenler sırasıyla 0,2 ml 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. PZR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan cihazda (Bio-Rad MyCycle) yapıldı (Tablo 4) . PZR sonunda 512 bp uzunluğunda ürün elde edildi.

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 PZR nin Bileşenleri ve Miktarları

MEFV Ekzon 10	Miktar
PZR içeriği	[μl]
Master mix	14
Primer (Forward ve ya Reverse) [herbir primer için 5mM]	3
DNA (50 ng/ μ l)	3
dH ₂ O	10
Toplam	30

3.3.1.2. PZR şartları**Tablo 4.** *MEFV* Ekzon 10 Bölgesi PZR Isıl Değişiklikleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95 °C	7 dk	1
	94 °C	45 sn	
2	54 °C	30 sn	30
	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) .

```
tccaaggggattctctctctctgcccctgaatcttgggcccctaaactggggaagccttcattttgcatctgggtgtcctccagAATATTC
CACACAAGAAAACGGCACAGATGATTCCGCAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAA
GCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACCACCCCGAGGGGAACGAGGGGAACGGCCCTCG
GCCGTACGGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCCGAGGCCGGGAGGGG
GCTGTCGAGGAAGCCCTGAGCAAACGCAGAGAGAAGGCCTCGGAGGGCCTGGACGC
GCAGGGCAAGCCTCGGACCCGGAGCCCGGCCCTGCCGGGCGGGAGAAGCCCCGGCCC
CTGCAGGGCGCTAGAGGGGGGCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTC
CGCGGGGAGGCTGCAGGGGCTGGCGGGGGGCGCCCCGGGGCAGAAGGAGTGCAGGC
CTTCGAAGTGTACCTGCCCTCGGGAAAGATGCGACCTAGAAGCCTTGAGGTCACCATT
TCTACAGGGGAGAAGGCGCCGCAAATCCAGAAATTCTCCTGACTCTAGAGGAAAAG
ACAGCTGCGAATCTGGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCCACTCCGGATGGA
GGGGCATCTGCGGACCTGAAGGAAGGCCCTGGAAA TCCAGAACAATTTCGGTCACCG
```

Şekil 4. Dizi Analizi İçin Kullanılan Exon 2 Bölgesi ve Primer Oturma Bölgeleri. (Küçük Harfli Sıralanmış Bölge İtronu 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. Ekzon 2 için PZR'ın hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde Tablo 6'daki bileşenler sırasıyla 0,2 ml 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. PZR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan cihazda (Bio-Rad MyCycle) yapıldı (Tablo 7) . PZR sonunda 650 bp uzunluğunda ürün elde edildi.

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

MEFV Ekzon 2	Miktar
PZR içeriği	[µl]
Master mix	14
Betaine (0.67 M)	4
Primer	3
[herbir primer için 5mM]	
DNA	3
dH ₂ O	6
Toplam	30

3.3.1.4. PZR şartları

Tablo 7. *MEFV* Ekzon 2 Bölgesi PZR Isıl Değişiklikleri

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

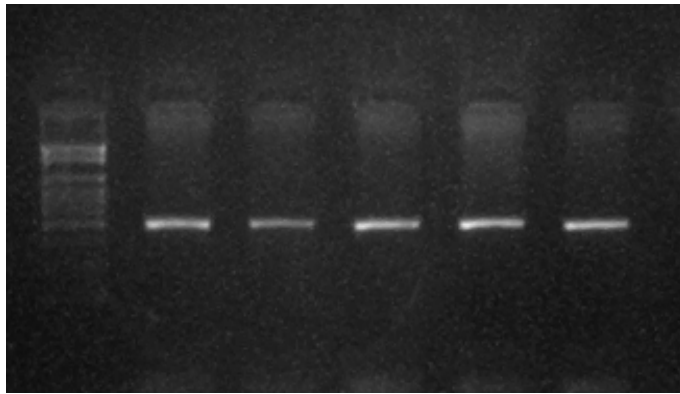
3.3.1.5. Agaroz jelin hazırlanışı

PZR ürünün boyutuna göre %2,5'lük 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 donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak örnek yüklenmesi için elektroforez tankına (Protrans, 001) yerleştirildi.

3.3.1.6. PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

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



Şekil 5. Ekzon 2 PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntüsü

3.3.1.7. PZR ürünlerinin temizlenmesi

MEFV geninin ekzon 2 bölgesi ilk PZR işlemi ile çoğaltıldıktan sonra dizi analizi yapılacak ürünlerin temiz olması reaksiyon sonunda oluşacak arka plandaki bantların önlenmesinde önemlidir.

1.PZR'dan sonra elde ettiğimiz amplikonlar PZR pürifikasyon kiti (Agencourt AMPure, ABD) kullanılarak temizlendi. 30 µl PZR ürününün üzerine 84 µl Agencourt AMPure konur iyice pipetaj yapılarak 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda örnek plağı magnetik 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 d₂H₂O konuldu, homojenize olana kadar pipetaj yapıldı. Örnek plağı tekrar mıknatısa konuldu magnetik boncuklar plak duvarına yapışırken PZR ürünleri su içinde kaldı. PZR ürünleri jele yüklenerek amplikon kalitesine bakılarak sekans PZR'ına girecek amplikon miktarı tayin edildi.

3.3.1.8. *MEFV* Ekzon 10 ve Ekzon 2 bölgesinin işaretli ddNTP'ler ile çoğaltılması

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

Tablo 8. *MEFV* Ekzon 10 Bölgesinin İşaretli ddNTP'ler ile Çoğaltılması İçin 20 µl'lik PZR Reaksiyonunda Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

<i>MEFV</i> Ekzon 10	Miktar
PZR içeriği	[µl]
DTCS Quick st.mix	10
Primer (Forward) [primer için 5mM]	0,7
dH ₂ O	6,3
PZR ürünü	3
Toplam	20

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

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

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

<i>MEFV</i> Ekzon 2	Miktar
PZR içeriği	[µl]
DTCS Quick st.mix	10
Primer (Forward) [primer için 5mM]	0.7
dH ₂ O	6.3
PZR ürünü	3
Toplam	20

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

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

Bu işlem tamamlandıktan sonra ürünler tekrar bir temizleme işleminden geçirildi.

3.3.1.9. Dizi analizi yapılacak PZR ürünlerinin Temizlenmesi

2.PZR olan sekans PZR'ından sonraki pürifikasyon şu şekilde yapıldı. PZR 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 izopropanol 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 PZR ürünleri tekrar kullanılabilir 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 oil damlatılarak cihaza yüklendi.

3.3.1.10. DNA dizi analiz reaksiyonu

DNA dizi reaksiyonu daha önce elde edilen PZR ürünlerinin floresan işaretli dideoksinükleotitler kullanılarak işaretlenmesine dayanır. Bu amaçla ürünler "cycle sequencing" denilen yeni bir PZR döngüsüne sokulur. Cycle sequencing işleminde PZR ürünleri kalıp DNA işlevini görür. DNA polimeraz varlığında tek bir primer yardımı ile floresan işaretli dideoksinükleotitler (ddNTP) zincire girer ve reaksiyon normal PZR

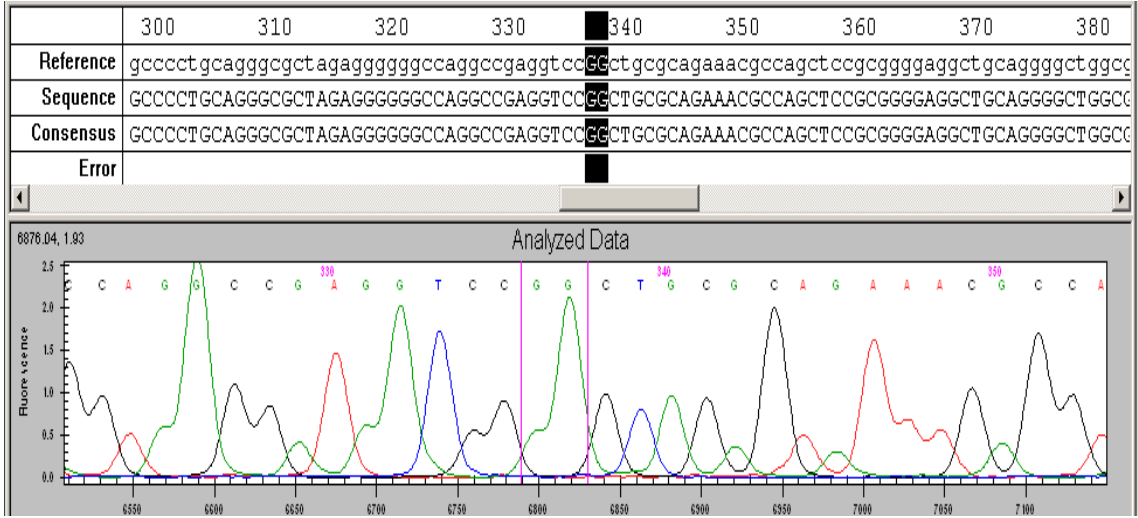
döngüsü gibi devam eder. Aradaki fark primerin uzaması sırasında işaretli ddNTP' lerin bağlanması ile zincirin sonlanmasıdır. Reaksiyon sonucunda oluşan renkli DNA fragmentleri, kapiller tüp içine doldurulan polimerde ayrıştırılır. Yürüme sonucunda ortaya çıkan renkli pikler, lazer okuyucu tarafından saptanarak analiz programına aktarılır.

3.3.1.11. DNA dizi analizinin değerlendirilmesi

DNA dizi değişimleri, *MEFV* geninin referans dizisi ile karşılaştırılarak tanımlandı. CEQ8000 dizi analiz cihazından elde edilen ham veriler CEQ8000 Genetic Analysis System adlı genotipleme yazılım programına aktarılarak karşılaştırma (Alignment) yapıldı. Heterozigot ve homozigot baz değişimleri, bu program aracılığı ile analiz edildi. Aminoasid değişimleri

http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/disease_menu.php?n=1 (15.01.2011) internet adresi kullanılarak tespit edildi.

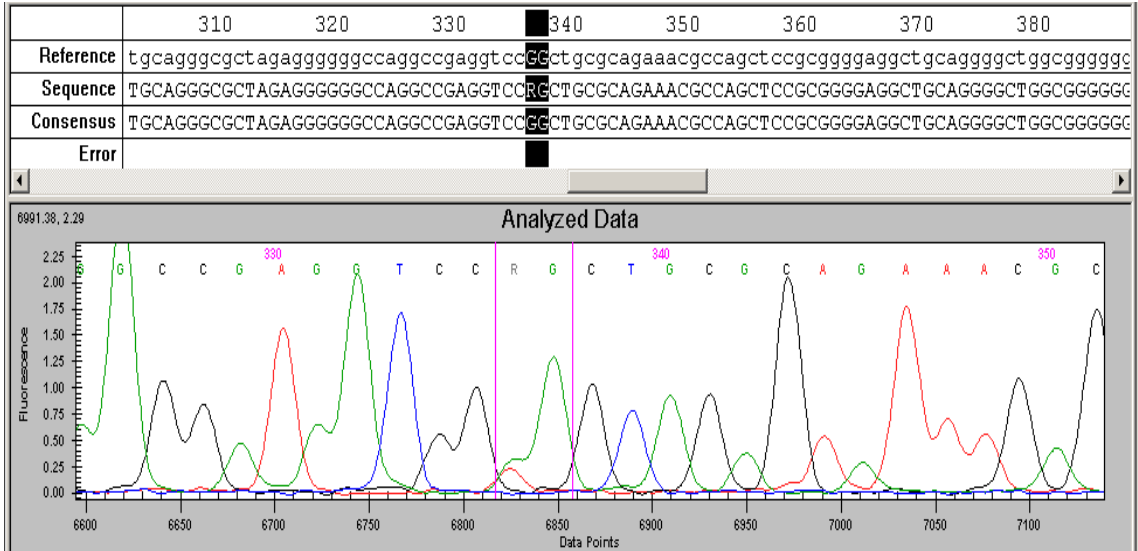
R202Q c.605 G>A nın wild, heterozigot ve homozigot DNA Dizi Analiz görüntüleri Şekil 6, 7, 8'de verilmiştir.



Şekil 6. MEJV Geninin 2. Ekzonda R202Q'nun Dizi Analizi

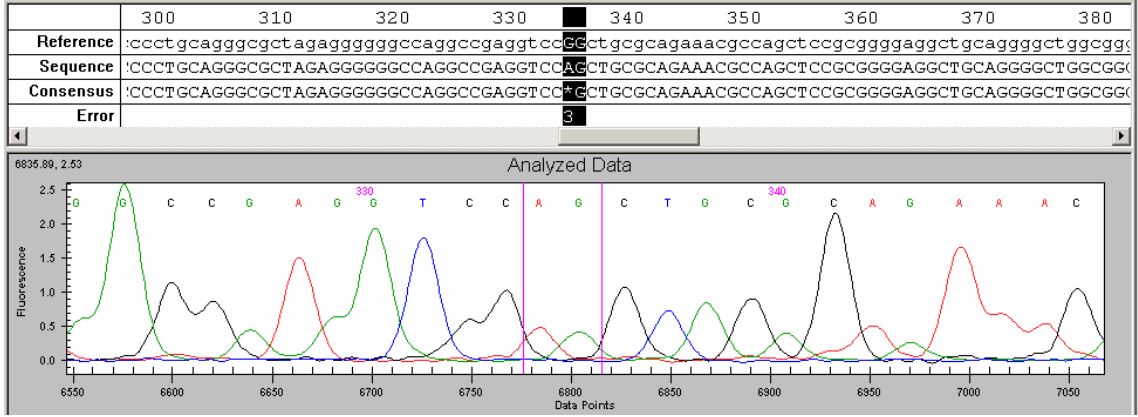
R202Q gen değişiminin olmadığı durum dizi analizi ile gösterilmektedir.(Şekil

6) MEJV Ekzon 2 bölgesinde 605. Nükleotidde (G) Guanin yer almaktadır.



Şekil 7. MEJV Geninin 2. Ekzonunda R202Q'nun Heterozigot Dizi Analizi

MEFV geninin Ekzon 2 bölgesinde bulunan 202. Kodonda Guanin (G) ile birlikte Adenin (A) bazı da bulunmaktadır (Şekil 7) .



Şekil 8. *MEFV* Geninin 2. Ekzonunda R202Q'nun Homozigot Dizi Analizi

Kodon 202'de G>A değişimi diziyi GGC→AGC şeklinde değiştirmiştir (Şekil 8).

4. BULGULAR

Çalışmamızda 2009-2010 yılları içinde laboratuvarımıza rutin FMF analizi için gönderilen FMF ön tanısı almış 1700 hasta arasından, 500 hasta da *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde dizi analizi yapılmış olan ve R202Q (c.605G>A) gen değişimi taşıyan 186 hasta incelendi. Ekzon 2 bölgesinde bulunan R202Q değişimi ile bu genin Ekzon 10 bölgesindeki mutasyonlar ile birlikteliği belirlendi. Olgu grubu belirlenirken önemli bir nokta olarak tüm örneklerde *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde R202Q değişimi olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

Çalışma grubu içerisinde cinsiyet dağılımına bakıldığında erkeklerin oranı %47,6 (n=88) , kadınların oranı %52,4 (n=98) dür.

Bu değişimi taşıyan 186 FMF ön tanı olgunun 18'i R202Q yönünden Homozigot genotip, 168'i Heterozigot genotip olarak bulundu.

MEFV geninin Ekzon 2 bölgesinde R202Q ile birlikte E148Q mutasyonunu taşıyan toplam 13 hasta bulunmaktadır. Bu hastalardan 10'u R202Q yönünden heterozigot genotip olup, 3 hasta da homozigot genotiptir (Tablo 12) .

Tablo 12. *MEFV* Geninde Ekzon 2 Bölgesinde Mutasyon Taşıyan Hasta Sayısı

R202Q	M/W	M/M	TOPLAM
E148Q	10	3	13

M: Mutant, W: Wild

Çalışma grubumuz içinde R202Q ile Ekzon 10 bölgesinde yaygın olarak görülen M680I, M694V, V726A, A744S ve R761H mutasyonları ile dağılımı gösterilmiştir

(Tablo 13) . R202Q'nun homozigot genotip olduğu 13 olgu M694V'yi heterozigot genotip olarak taşımaktadır, her iki mutasyonu homozigot taşıyan ise 3 olgu belirlenmiştir, R202Q'nun heterozigot olduğu durumda ise M694V yi heterozigot taşıyan 112 örnek, yine R202Q'nun heterozigot olduğu ve M694V'yi homozigot taşıyan 4 olgu tesbit edildi.

Tablo 13. Ekzon 2 R202Q (c.605G>A) Gen Değişimi Ekzon 10 daki Mutasyonlar ile Beraberliği

R202Q	M680I		M694V		V726A		A744S		R761H	
	M/W	M/M	M/W	M/M	M/W	M/M	M/W	M/M	M/W	M/M
M/W	16	-	112	4	15	-	1	-	8	-
M/M	-	-	13	3	-	-	-	-	-	-

M: Mutant W: Wild

Yine tablo 13'de görüldüğü üzere R202Q'nun heterozigot olduğu durumda Ekzon 10 bölgesinde 156 olgu heterozigot mutasyon taşıdığı, R202Q'nun homozigot olduğu durumda ise 16 hastanın 3'ünün M694V yi homozigot 13'ünün ise heterozigot genotip olarak taşıdığı görülmektedir. Toplam heterozigot genotip taşıyan ise 16 olgu M680I, 112'si M694V, 15'i V726A, 1'i A744S, 8'i ise R761H genotipi taşıdığı belirlendi.

Tablo 14. *MEFV* Ekzon 2’de R202Q (c.605G>A p.Arg202Gln) Gen Değişimi ile Ekzon 10 Mutasyonlarının Genotip Dağılımı

n=186	EKZON 2 R202Q
M694V	%71
M680I	%8,6
V726A	%8,1
A744S	%0,5
R761H	%4,3
DİĞER	%4,5

Çalışmamızda belirlediğimiz olgu grubumuz içinde ekzon 10 bölgesindeki mutasyon dağılım sonuçları Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 15. Ekzon 2’de R202Q değişimi ve Ekzon 10’da Birden Fazla Mutasyonu Olan Hastalar

R202Q	M694V/R761H	M694V/V726A	M694V/E148Q	M694V/M680I
M/W	%7,44	%16,74	%14,88	%16,74
M/M	0	0	%5,58	0

M: Mutant W: Wild

Ekzon 2’de R202Q gen değişimi taşıyıp, Ekzon 10 bölgesinde de mutasyon taşıyan birleşik heterozigot genotip örnekler gösterilmiştir (Tablo 15) . R202Q’yu homozigot olarak taşıyıp Ekzon 2 bölgesinde E148Q mutasyonu ve Ekzon 10 bölgesindeki M694V yi heterozigot olarak birlikte taşıyan 3 (%5,58) örnek belirlendi.

Bunun dışında R202Q heterozigotken M694V/R761H taşıyan 4 (%7,44) örnek, M694V/V726A taşıyan 9 (%16,74) örnek, M694V/E148Q heterozigot taşıyan 8 (%14.88) örnek ve M694V/M680I yı birlikte heterozigot taşıyan 9 (%16,74) örnek tesbit edildi.

Tablo 16. Ekzon 2 R202Q (C.605G>A) nin Diğer Mutasyonlar ile İstatistiksel Değerleri

R202Q	n	p
E148Q	13	0,090
M680I	16	0,171
M694V	132	0,004
V726A	15	0,186
A744S	1	0,743
R761H	8	0,344

FMF ön tanısı ile merkezimize gelen ve ekzon 2 R202Q (C.605G>A) gen değişiminin olduğu 186 hastanın taşıdığı ekzon 10 bölgesindeki mutasyonlar karşılaştırılmıştır (Tablo 16). Pearson Chi-Kare analizi sonucunda Türk populasyonunda da sık rastlanılan altı mutasyon arasından özellikle M694V (%71;p=0,004) ile önemli bir istatistiksel fark olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA

Çalışmada 2009-2010 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doku Tiplendirme ve Moleküler Tanı Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gelen FMF ön tanılı hastaların DNA dizi analiz sonuçları değerlendirildi.

Bu çalışmada olgu grubumuz belirlenirken özellikle önemli bir nokta olarak *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde R202Q gen değişiminin her bir örnekte bulunması ön planda tutulmuştur.

DNA dizi analizi gibi moleküler tanı teknikleri gelişimine kadar FMF hastalığı tanısı klinik bulgular, ailesel köken ve bu hastalık için yaygın olarak kullanılan Kolsişin olarak isimlendirilen ilaca yanıt olarak tanı konulmakta ve tedavi yapılmaktaydı.

1992’de FMF hastalığına neden olan gen belirlendikten sonra gelişen moleküler teknikler içinde DNA dizi analizi FMF tanısının konulmasında en ileri moleküler teknik olmakta ve teşhisi tam olarak sağlayarak hastalığın tanısını tartışmasız ortaya koymaktadır.

FMF karın ağrısı, ateş ve eklem ağrıları gibi ortaya çıkan belirtileride göstermektedir, Akdeniz çevre ülkeleri özellikle Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan ülkelerde yaygın olarak gözlenen inflamatuvar bir hastalıktır.

FMF ile ilgili yapılan dizi analizleri sonucunda 2009 yılı itibari ile 186’den fazla FMF hastalığını oluşturan *MEFV* geninde mutasyon ve polimorfizm bildirilmiştir.²⁰

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 1998'de 2.Ekzondaki missens mutasyonlar tanımlanmıştır.

Akdeniz çevresi ve özellikle Doğu Akdeniz Bölgesindeki ülkelerde yaygın olan FMF hastalığı Türkiye'de de ciddi taşıyıcılık oranına sahiptir. FMF hastalığının belirtilen en ciddi yanı böbrek yetmezliğine yol açan amiloidozun oluşmasıdır. Amiloidoz, klinikte zor tanı koyulan FMF hastalığının ağır bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın meydana gelmesinde etkin olan genetik değişimlerin belirlenmesi FMF hastalığının teşhisinde ve tedavisinde önem arz etmektedir.

FMF hastalığı ve taşıyıcılığı Türkiye'de sıklıkla görülebilen yaygın bir hastalıktır. Karın ağrısı, ateş, eklem ağrısı gibi genç yaşlarda görülen fenotip I olarak da söylenebilen klinik bulguların yanı sıra, fenotip II denilen daha geç yaşlarda ortaya çıkan amiloidoz; ciddi durumların meydana gelmesine neden olmaktadır. FMF hastalığı diğer periyodik ateş sendromları ile karıştırılmaktadır. Bu nedenden dolayı FMF hastalığının tanısında moleküler çalışmalar önemlidir.

Yalçinkaya ve ark.²⁵ 167 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada *MEFV* gen değişimlerinin dağılımını sırası ile M694V (%41), M694I (%17), M680I (%16), V726A (%4) bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda farklı olarak M694I'ya rastlanmamıştır.

Yılmaz ve ark.²² yapmış oldukları bir çalışmada Türk FMF hastalarında *MEFV* gen değişim oranlarını sırası ile M694V (%51,55), M680I (%9,22), E148Q (3,55), V726A (2,88), M694I (0,44) ve bilinmeyen (%32,33) şeklinde bildirmişlerdir.

Akar ve ark.³⁹ Türk FMF hastaları üzerinde yapmış oldukları çalışmada bu gen değişimlerini M694V(%43,5), M680I(%12), V726A8 (%11,1) olduğunu göstermişlerdir.

Ertekin ve ark.⁴⁷ bölgemizde yaşayan 52 pediatrik olgu arasında yapmış oldukları bir çalışmada *MEFV*'de mutasyon dağılımını sırası ile M694V (%51,3), V726A (%7,3), M680I (%4,9), E148Q (%4,9), R761H (%2,4) şeklinde bildirmişlerdir.

Çalışmaya alınan grup içinde örneklerin %47,6'sını erkek, %52,4'ünü bayan oluşturmakta olup, Ertekin ve ark. yapmış olduğu çalışma ile çalışma grubumuz içinde yer alan örnekler arasında cinsiyet dağılımı uyumlu bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da ekzon 10 bölgesinde tesbit ettiğimiz mutasyonlar içinde en yüksek oranda M694V (%71, n=132) mutasyonu tesbit edilmiştir. Çalışma Türkiye'de yapılan diğer çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

FMF geninde (*MEFV*) 2.Ekzonda yer alan R202Q gen değişimi ilk olarak Bernot ve arkadaşları tarafından tesbit edilmiştir. Yaptıkları çalışmada R202Q nun yaygın bir polimorfizm olabileceğini söylemişlerdir. FMF veri tabanında ise R202Q (C.605G>A) gen değişiminin M694V mutasyonu ile birlikte kalıtılan yaygın bir polimorfizm olduğu belirtilmiştir.²⁰

R202Q gen değişimi üzerine çok olmamakla birlikte yurtdışında ve Türkiye'de bazı çalışmalar yapılmıştır ve birtakım sonuçlara ulaşılmıştır. Daha önce belirttiğimiz gibi Bernot ve ark. bu değişimin bir polimorfizm olabileceğini söylemişlerdir.²³ Ancak Yunanistan'da Ritis ve ark.⁴⁸ yapmış olduğu bir çalışmada R202Q değişiminin polimorfizmden ziyade bir mutasyon olabileceğini göstermişlerdir. R202Q'nun fenotip üzerine etkisi pek fazla çalışılmamıştır, bu çalışmanın ileriki aşamasında düşünülmektedir. R202Q gen değişiminin proteinin hangi bölgesinde olduğu ve hangi fonksiyonda görev aldığı belirlendikten sonra klinik değerlendirmelere geçilmelidir.

Yine Yunanistan'da Giaglis ve ark.²¹ yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise R202Q değişiminin Yunan FMF hastaları içinde yaygın olduğunu bildirmiş ve bazı durumlarda hastalıkla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise R202Q değişiminin taşıyıcılık durumunda FMF hastalığı açısından herhangi bir etkisi olmadığı fakat FMF hastalığına neden olan bu genin ekzon 10 bölgesindeki mutasyonlar ile hastalığın semptomlarını etkilediği belirtilmiştir.⁴⁹ Yine Türkiye'de yapılan bir çalışmada R202Q değişiminin önemli olduğu belirtilmiştir.⁵⁰

Türkiye'de yapılan bir çalışmada amiloidoz olan hastalarda R202Q taşıyıcılığının fazla olduğu tesbit edilmiştir. Diğer gen değişimleri arasında en yüksek ikinci değişim olarak tesbit edilmiştir.³⁰

Miyoshi ve ark.⁵¹ 2008'de yayınlamış oldukları bir çalışmada Ailesel Akdeniz Ateşine neden olan *MEFV* geninin Ekzon 2 bölgesinde yaptıkları genetik analizde E148Q/R202Q mutasyonlarını tesbit etmişler ve bunun FMF hastalığına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Yamaguchi ve ark.⁵² Kawasaki Hastalığı olan bir grup içinde yapmış oldukları *MEFV* gen analizi sonucunda R202Q heterozigotluğunu yüksek miktarda belirlemişlerdir.

Bu çalışmada Türk toplumunda en sık rastlanılan beş mutasyon tipi (M680I, M694V, V726A, A744S, R761H) saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda bu mutasyonların dışında *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde yer alan E148Q mutasyonu ve R202Q polimorfizmine bakılmıştır. Bu gendeki değişimler DNA dizi analizi yapılarak tesbit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda FMF ön tanısı ile laboratuvarımıza gelmiş olan hastalarda *MEFV* geninde 2.Ekzonda R202Q değişimi incelenmiş ve bu genin 10.Ekzonundaki mutasyonlar ile sıklığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma; klinik olarak R202Q'nun FMF hastalığının fenotipi üzerine etkisinden ziyade, R202Q değişimini heterozigot veya homozigot taşıyan bireyler arasında bu genin 10. ekzondaki mutasyonlar ile sıklığını gösteren istatistiksel bir analiz çalışmasıdır.

FMF ön tanısı ile merkezimize gelen ve 2. ekzonda R202Q (C.605G>A) gen değişimi olan 186 hasta ekzon 10 bölgesinde taşıdıkları mutasyonlar ile karşılaştırıldı. Türk populasyonunda da sık rastlanılan beş mutasyon arasından özellikle M694V (%71;p=0,004) ile önemli bir istatistiksel fark olduğu görüldü.

Bazı FMF hastalarında bu hastalığın tanısını kolaylaştıran FMF atakları görülmemekte ancak bu kişilerde amiloidoz oluşumuna rastlanmaktadır. Dolayısı ile FMF tanısında mevcut kullanılan laboratuvar testlerinde FMF ile ilgili olgular gözden kaçabilmektedir. Bunun için hastalara genetik analizler yapılmalı ve FMF mutasyonları tesbit edilmelidir.

Bugüne kadar Türkiye'de FMF mutasyonları PZR/RFLP, ARMS, FMF StripAssay, Mikroarray, Real-Time PZR ve son zamanlarda oldukça güvenli bir yöntem olan DNA Dizi Analizi yöntemleri ile tesbit edilmiştir. DNA Dizi Analizi sadece tesbit edilen ve sık rastlanılan mutasyonlar dışında *MEFV* geninde daha geniş olarak ekzonlarda var olan bütün değişimler tesbit edilebilirliği sağlamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız ve son yıllarda gelişen DNA Dizi Analizi teknolojisinin otomasyona adapte edilmesi ile rutin analizlerde kullanma imkanı

doğmuştur. Bu teknolojinin modifiye edilmeye elverişli olması nedeni ile yeni uygulamalarda da kolaylıkla kullanıma açıktır.

Bizim yaptığımız çalışmada FMF ön tanısı almış olan *MEFV* geninin ekzon 2 bölgesinde R202Q değişimi taşıyan 186 olgunun ekzon 10 bölgesinde yapılan DNA dizi analizi sonucunda, en fazla birlikteliği sırası ile M694V (%71), M680I (%8,6), V726A (%8,1), R761H (%4,3), A744S (%0,5) ve ekzon 2 bölgesinde bulunan E148Q (%7) mutasyonları ile olduğu saptanmıştır.

SONUÇ

FMF ön tanısı ile merkezimize gelmiş olan ve çalışma grubumuza dahil olan tüm örnekler *MEFV* geninin Ekzon 2 bölgesinde R202Q gen değişimi taşımaktadır. R202Q gen değişimi sık görülen Ekzon 10 bölgesi mutasyonları dışında taşıma oranı %16 olarak bildirilmiş yaygın bir polimorfizm olabileceği ileri sürülmüştür.

Bu veri göz önüne alınarak laboratuvarımızda rutin olarak yapılan *MEFV* geninin Ekzon 10 bölgesi haricinde Ekzon 2 bölgesinde R202Q değişimi incelenmiştir ve DNA Dizi Analizi ile taramış olduğumuz sık rastlanılan Ekzon 10 bölgesi mutasyonları ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu verilerden yararlanılarak yaptığımız person Chi-Kare analizi sonucunda Ekzon 10 bölgesindeki mutasyonlar içinde M694V ile önemli bir istatistiksel fark olduğunu diğer mutasyonlar arasında da bir fark olmadığı belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003;18:853-9.
2. Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean fever. *AMA Arch Intern Med* 1958;102:50-71.
3. Onen F. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2006;26 (6) :489-96.
4. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009;61:1447-53.
5. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9 (7) :473-83.
6. Kasapçopur Ö, Özdoğan H. Ailesel Akdeniz Ateşi. *DİRİM* 2006;81:197-205.
7. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Gastroenterol* 1949;12:234-47.
8. Mamou H, Cattan R. [The periodic disease]. *Sem Hop* 1952;28:1062-70.
9. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972;287:1302.
10. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1509-13.
11. Köksal B. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) hastalarında FMF gen mutasyon sıklığı. Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Sivas, 2007
12. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345:1748-57.

13. Tunca M, Akar S, Onen F. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:1-11.
14. Schwartz J. Periodic peritonitis, onset simultaneously with menstruation. *Ann Intern Med* 1960;53:407-11.
15. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, et al. Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Jul-Aug;20 (4 Suppl 26) :S45-53.
16. Matzner Y, Partridge RE, Levy M. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood* 1984;63:629-33.
17. Musabak U, Sengul A, Oktenli C. Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol* 2004;138:526-33.
18. fmf. Uluslararası FMF Konsorsiyomu.
19. fmf2. Fransız FMF Konsorsiyomu, Uluslararası FMF Konsorsiyomu.
20. FMF İnternet sayfası. <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>. [cited]; Available from.
21. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007;71:458-67.
22. Yilmaz E, Ozen S, Balci B. 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.

23. Bernot A, da Silva C, Petit JL. 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.
24. Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics* Wiley-Liss; 1999 [updated 1999; cited]; Available from.
25. Yalcinkaya F, Cakar N, Misirlioglu M. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:67-72.
26. Balci B, Tinaztepe K, Yilmaz E. 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.
27. Mansour I, Delague V, Cazeneuve C. Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9:51-5.
28. Keven K, Sengul S, Kutlay S. Long-term outcome of renal transplantation in patients with familial Mediterranean fever amyloidosis: a single-center experience. *Transplant Proc* 2004;36:2632-4.
29. Gershoni-Baruch R, Kepten I, Shinawi M, Brik R. Direct detection of common mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) using naturally occurring and primer mediated restriction fragment analysis. *Mutation in brief* no. 257. Online. *Hum Mutat* 1999;14 (1) :91.

30. Dirican A. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında MEFV Geninin Tam DNA Sekans Analizi ve Klinik Bulgular İle İlişkisi.. İzmir Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İzmir 2008; 2008.
31. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S. Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000;67:1136-43.
32. Livneh A, Langevitz P, Zemer D. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40:1879-85.
33. Kogan A, Shinar Y, Lidar M. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet* 2001;102:272-6.
34. Padeh S. Periodic fever syndromes. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:577-609.
35. Vinceneux P, Pouchot J. [From familial Mediterranean fever to amyloidosis]. *Presse Med* 2005;34:958-66.
36. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O. MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever in the Black Sea region of Turkey: Samsun experience [corrected]. *J Rheumatol* 2008;35:106-13.
37. Knecht A, de Beer FC, Pras M. Serum amyloid A protein in familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med* 1985;102:71-2.
38. Saatci U, Ozen S, Ozdemir S. 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.

39. Akar N, Hasipek M, Akar E. Serum amyloid A1 and tumor necrosis factor-alpha alleles in Turkish familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. *Amyloid* 2003;10:12-6.
40. Haznedaroglu S, Ozturk MA, Sancak B. Serum interleukin 17 and interleukin 18 levels in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S77-80.
41. Koklu S, Ozturk MA, Balci M. Interferon-gamma levels in familial Mediterranean fever. *Joint Bone Spine* 2005;72:38-40.
42. Centola M, Wood G, Frucht DM. 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.
43. Rigante D, La Torraca I, Avallone L, Pugliese AL, Gaspari S, Stabile A. The pharmacologic basis of treatment with colchicine in children with familial Mediterranean fever. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006 Jul-Aug;10 (4) :173-8.
44. Abedat S, Urieli-Shoval S, Shapira E. 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.
45. 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.
46. Klug S, Cummings M, Spencer A. *Concepts of Genetic* Prentice Hall:Pearson Education Inc; 2006.
47. Ertekin V, Selimoglu MA, Pirim I. Familial Mediterranean fever in a childhood population in eastern Turkey. *Pediatr Int* 2005 Dec;47 (6) :640-4.

48. Ritis K, Giaglis S, Spathari N. Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients. *Ann Rheum Dis* 2004;63:438-43.
49. Öztürk A, Özçakar B, Ekim M, Akar N. Is MEFV Gene Arg202Gln (605 G>A) A Disease-Causing Mutation? *Turk J Med Sci* 2008;38:205-8.
50. Yıldız C. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Taşıyan Bireylerde MEFV geninde R202Q Gen değişiminin taranması. Ankara, Ankara Üniversitesi 2009.
51. Miyoshi T, Yamashita K, Ohno T. Familial Mediterranean fever gene as a possible modifier of Sweet syndrome with chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 2008;120:57-62.
52. Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K. Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. *Hum Immunol* 2009;70:468-71.