

Diyarbakır yöresi Ailevi Akdeniz Ateşli çocuklarda MEFV gen mutasyon sıklıkları Common MEFV gene mutations in children with FMF in Diyarbakır, Turkey

Osman Evliyaoğlu¹,
Salim Bilici², İlyas Yolbaş³,
Selvi Kelekçi⁴, Velat Şen⁵

Diyarbakır Çocuk Hastanesi¹ Klinik
Biyokimya ve² Çocuk Cerrahisi,
^{3,4,5}Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
DİYARBAKIR

E-posta: oevliya@hotmail.com

Geliş Tarihi/Received: 23.11.2008,
Kabul Tarihi/Accepted: 25.12.2008,
Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2009

ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi otozomal resesif bir hastalık olup, periyodik karın ağrısı, ateş ve eklem ağrısı ile karakterizedir. Ailevi Akdeniz Ateşinden sorumlu tutulan MEFV geninde bir çok mutasyon belirlenmiştir.

Bu çalışmamızda klinik olarak Ailevi Akdeniz Ateşi şüphesi taşıyan toplam 332 çocuktan DNA örnekleri alındı ve 12 MEFV mutasyonu [E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H] ters hibridizasyon yöntemi ile yapıldı.

Toplam 113 çocuktan (ortalama yaş: 11.5 yıl) mutasyon tespit edildi. E148Q mutasyonu 60 çocuktan (4 tanesi homozigot), M694V mutasyonu (4 tanesi homozigot) 19 çocuktan, P369S mutasyonu (homozigot mutasyon yoktu) 16 hastada ve V726A mutasyonu (homozigot mutasyon yoktu) 13 çocuktan tespit edildi. Ancak Ailevi Akdeniz Ateşi şüphesi ile mutasyon analizi istenen 332 çocuktan toplam olarak 104'ünde tanı kriterlerine göre hastalığın tanısı klinik olarak doğrulandı. Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı alan hastalarda gen mutasyonları sıklık sırasına göre; 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). Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı konan hastaların 15'inde (%14.4) hiçbir mutasyon saptanmazken, 13'ünde (%12.5) iki farklı mutasyon aynı anda belirlenerek bileşik heterozigot olarak tanımlandı.

Sonuç olarak hastalarımızda E148Q mutasyonuna, normalde en sık görülen M694V mutasyonundan daha sık rastlandı. Bu farklılık demografik yapı veya metod ile ilişkili olabilir.

Anahtar kelimeler: Ailevi Akdeniz ateşi, MEFV geni, mutasyon analizi, sıklık, tanı

ABSTRACT

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive disease that clinically characterized by periodic abdominal pain, fever and arthralgia. Wide variety of mutations have been described in MEFV gene which is known to be responsible from FMF.

In present study, 12 MEFV mutations [E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H] have been screened. DNA samples were obtained from a total of 332 children, who were clinically suspected as FMF. Mutation analyses of MEFV gene were carried out with reverse hybridization method.

In 113 children (mean age 11.5 years), mutations have been detected. In 60 children E148Q (4 homozygous), in 19 M694V (4 homozygous), in 16 P369S (none), and in 13 children V726A (none homozygous) mutations were detected. Among Familial Mediterranean Fever -suspected 332 children 104 fulfilled diagnostic criteria for FMF and detected MEFV gene mutations with decreasing frequency were; E148Q (30.8%), M694V (18.3%), P369S (10.6%), V726A (8.6%), A744S (2.9%), R761H (2.9%), M694I (1.9%), K695R (1.9%) and I692del (1.0%), respectively. No mutation was detected in 15 (14.4%) FMF children while, two different MEFV mutations were detected together in 13 (12.5%) patients and these patients were accepted as a compound heterozygous.

In conclusion, in our patients E148Q mutation was found higher than M694V mutation that has been detected commonly in patients with FMF. The difference may result from demographic features or used methods.

Key Words: Familial Mediterranean fever, MEFV gene, mutation analysis, frequency, diagnosis.

GİRİŞ

Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), ateş, peritonit, plörit, serozit, sinoviti içeren kısa ve tekrarlayan inflamasyon epizotlarıyla karakterize bir hastalıktır¹. FMF Ortadoğu coğrafyasında sıklıkla görülür. Özellikle Yahudiler, Türkler, Araplar, Ermeniler, Kürtler ve daha az sıklıkta doğu Avrupa orijinli Yahudilerde görülür²⁻⁵. İki farklı grup, 1997 de pozisyonel kopyalama yöntemiyle FMF genini (MEFV) klonlamışlardı. Kromozom 16p de bulunan gen 10 ekzondan oluşmakta olup, 781 amino asitlik proteini kodlar⁶. Bu protein uluslar arası FMF topluluğu tarafından pirin olarak adlandırılmıştır⁷ ve yalnızca polimorfonükleer hücre ve aktive makrofajlar tarafından üretilir. Fakat henüz pirinin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Pirinin içerdiği SPRY parçası inflamasyon ve apoptoziste rol alır⁸. Semptomatik FMF hastalarının tanısında bile moleküler analizin rolü tam olarak belirlenememiştir. Genetik testin gelecekte FMF tanısında önemli rol oynayacağı, MEFV genindeki iki mutasyonun FMF tanısını desteklemesinden anlayabiliriz⁹. Patognomonik klinik semptomların ve spesifik biyokimyasal anormalliklerin yoksunluğu durumlarında bile retrospektif olarak tanı klinik olarak konulabilir¹⁰.

Diyarbakır Türkiye'nin güneydoğusunda bulunan, çok göç veren ve alan büyük bir şehirdir. Bu retrospektif çalışmada karın ağrısıyla gelip klinik olarak FMF şüphesi taşıyan 332 çocukta sık görülen 12 MEFV mutasyonu taranmıştır. Böylece FMF mutasyonlarının diğer ülke ve bölgelerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışmaya bir buçuk yıllık sürede hastaneye başvuran 332 çocuk dahil edildi (Şubat 2007 - Ağustos 2008). FMF ön tanısından sonra kesin tanı Tel Hashomer kriterlerine göre klinik olarak 104 hastada konuldu¹⁰. FMF hastaları Sağlık Bakanlığı Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi polikliniklerine başvuran vuran olgulardan seçildi.

Olgulardan alınan 3 ml kan EDTA'lı tüplere konuldu. Periferik kandan Invisorb Spin Blood Mini Kiti ile DNA ekstrakte edildi. Mutasyonlar ters-hibridizasyon yöntemi ile (FMF StripAssay, Viennalab

Labordiagnostika GmbH) araştırıldı. Üretici firmanın önerdiği yöntem doğrultusunda ilk olarak ekzon 2, 3, 5 ve 10 amplifikasyonu için biyotinillenmiş primerler kullanılarak multipleks PCR yapıldı. PCR ürünleri allel spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridize edildi. Buproblar 12MEFV mutasyonunu içermektedir [E148Q, P369S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H]. Hibridizasyonlar streptavidin alkalın fosfataz ve renk substratı reaksiyonu ile görünür hale getirildi.

İstatistiksel analiz

Pozitif olarak saptanan mutasyonlar sayısı ve yüzde olarak verildi. Hastaların yaş ortalamaları ortalama artı/eksi standart sapma olarak sunuldu.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen ve FMF şüphesiyle MEFV gene mutasyonu istenen, 332 çocuğun yaşları 5 ile 15 yıl arasında idi (11.5 ± 3.9 yıl). Bunların, 192'si (58%) kız, 140'ı (42%) erkekti.

Çalışmamızda, 332 çocuk arasında en sık görülen mutasyon E148Q idi (Şekil 1, Tablo 2). Toplam 113 çocukta (ortalama yaş: 11.5 yıl) mutasyon tespit edildi. Her iki alelde mutasyon 332 çocukta 22'sinde (%7) pozitif bulundu: 9 (%3) tanesi aynı mutasyon için homozigot iken, 13 (%4) tanesi bileşik heterozigot olarak bulundu (Tablo 1). Tekli olarak 91 (%27) çocukta heterozigot mutasyon saptandı. Toplam olarak 219 (%66) çocukta ise herhangi bir mutasyona rastlanmadı (Wt). Her iki alelde mutasyonu olan 22 olgunun 17 tanesinde aile öyküsü pozitif bulundu. E148Q mutasyonu 60 çocukta (4 tanesi homozigot), M694V mutasyonu (4 tanesi homozigot) 19 çocukta, P369S mutasyonu (homozigot mutasyon yoktu) 16 hastada ve V726A mutasyonu (homozigot mutasyon yoktu) 13 çocukta tespit edildi. Ancak FMF şüphesi ile mutasyon analizi istenen 332 çocukta toplam olarak 104'ünde tanı kriterlerine göre FMF tanısı klinik olarak doğrulandı. FMF tanısı alan hastalarda gen mutasyonları sıklık sırasına göre; 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) (Tablo 2). FMF tanısı konan hastaların 15'inde (%14.4) hiçbir mutasyon saptanmadı.

Tablo 1. Ailesel Akdeniz Ateşi şüphesiyle analiz edilen 332 çocukta saptanan değişik MEFV gen mutasyonları

Bir alelde mutasyon bulunan bireyler			Her iki alelde mutasyon bulunan bireyler		
Genotip	Hasta sayısı		Genotip	Hasta sayısı	
E148Q	Wt	45	E148Q	E148Q	4
V726A	Wt	12	E148Q	M694V	5
P369S	Wt	10	E148Q	P369S	6
M694V	Wt	8	M680I (G/C)	M680I (G/C)	1
M680I (G/C)	Wt	6	M680I (G/C)	M694V	1
R761H	Wt	4	M694V	M694V	3
A744S	Wt	3	M694V	V726A	1
K695R	Wt	2	M694I	M694I	1
I692del	Wt	1			
Toplam	91		Toplam	22	

Tablo 2. Klinik olarak FMF tanısı alan çocuklarda MEFV genindeki değişik mutasyon sıklıkları

Mutasyon	n	%
E148Q	32	30.8
M694V	19	18.3
P369S	11	10.6
V726A	9	8.6
M680I (G/C)	7	6.7
A744S	3	2.9
R761H	3	2.9
M694I	2	1.9
K695R	2	1.9
I692del	1	1.0
Mutasyon saptanamayan	15	14.4
Toplam	104	100.0

TARTIŞMA

Pirini kodlayan gendeki mutasyonların FMF'e neden olabilecek en önemli etken olduğu ileri sürülmüş,⁷ ancak aynı zamanda MEFV deki mutasyonların otuz farklı hastalıkla da ilişkili olduğu bulunmuştur¹¹. Bizim kullandığımız kitte 12 MEFV varyantı bulunmaktadır. Bu çalışma yöntemi FMF mutasyonlarını taramada ilk basamak yöntem olarak

kabul görmüştür¹². Bu kitte yer alan F479L, M680I (G/A) mutasyonları diğer Akdeniz havzası topluluklarında görülmesine¹³ rağmen Türklerde pek görülmemektedir ve bizim çalışmamızda da hiçbir çocukta rastlanmamıştır.

Çalışmamızda ki FMF ön tanıli hastalarda mutasyon görülme oranı düşük görülürken (%36), bu oran Özcan ve arkadaşlarının¹⁴ yaptığı çalışmadan

daha yüksek bulunmuştur (%26). Bu sonuçlara göre bilhassa güneydoğu bölgesinde FMF şüphesi olan olgularda laboratuvar kullanımının daha da arttığını söyleyebiliriz. Çünkü başka çalışmalarda sağlıklı bireylerde bu mutasyon oranı %26 bulunmuştur¹⁵. Türkiye genelinde yapılan çalışmalarda ise FMF tanısı alan hastalarda mutasyon sıklığı % 74 bulunarak bu tezimizi kuvvetlendirmektedir¹⁶. Biz FMF tanı kriterlerine uygun olarak FMF tanısı alan 104 hastamızın 88'inde (%84.6) mutasyon saptadık. Bu oran Türkiye geneli çalışmalarında elde edilen FMF şüpheli olgularda mutasyon saptanma oranına yakın bir orandır.

M694V mutasyonu farklı popülasyonlarda %40-90%¹⁷ görülürken Türk FMF hastalarında %51 oranında bulunmuştur¹⁸ ve M694V mutasyonu Türkiye'de de en sık görülen mutasyondur¹⁵. Ancak M694V mutasyonu çalışmamızda FMF'li çocukların sadece %18.3'ünde pozitif bulunmuştur. M680I mutasyonu Ermenilerde yaygın bir mutasyon iken bizim olgularımızda %6.7 oranında pozitif bulunmuştur

Türkiye'de görülen E148Q mutasyonu Akdeniz havzasından uzak yerden geldiği düşünülerek¹⁹ Türk halkındaki mozaik yapının da kanıtıdır. Türkiye'de ve dünyada yapılan çalışmalarda en sık görülen mutasyon M694V olmasına rağmen bizim çalışmamızda bu mutasyonun bir buçuk katı sıklıkta E148Q bulunmuştur. Gerçi her ne kadar geniş saha taraması olmasa da ufak çaplı bazı çalışmalarda Japonya²⁰ ve Avrupa toplumunda²¹ da E148Q'nin en sık mutasyon olarak gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu yüzden E148Q mutasyonunu FMF tanısı açısından değeri tartışılabilir. Çünkü Hastalık şüphesiyle taranan çocuklarda pozitif saptanan heterozigot E148Q mutasyonlu 45 çocuktan 28'inde (%62.2) FMF tanı kriterlerinin bulunmadığı ve hastalık tanısı almadığı görüldü. Bölgemizde yapılan başka bir çalışmada E148Q mutasyonu²² değerleri genel bulgularla ve Türkiye çapındaki diğer çalışmalarla paralellik göstermekte idi. Hatta bazı çalışmalarda R761H mutasyon frekansı E148Q mutasyonundan daha yüksek bulunması¹⁹, E148Q mutasyonunun FMF tanısı için güvenilir bir parametre olmayabileceğini düşündürmektedir. Bazı gözlemciler de yöntem seçimine göre E148Q ile E148V arasında yanlış tanı konduğu belirtilmesine rağmen²³ biz kullandığımız

yöntemin başka yayınlarla desteklendiğini görüyoruz²⁴. Hatta E148Q'nin FMF tanısında değerli bir parametre olmadığı da belirtilmiştir²⁵. Bu konuda bir çalışmada E148Q'nin hastalığa neden olan bir mutasyon olmadığı bir dizi varyantı olduğu da söylenmiştir²⁶ ki bizim çalışmamız da bu sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak hastalarımızda E148Q mutasyonu normalde en sık görülen M694V mutasyonundan daha fazlaydı. Bu farklılık demografik yapı veya metot ile ilişkili olabileceği gibi, E148Q mutasyonunun FMF tanısındaki özgünlüğü ile de ilişkili olabilir. Bu yüzden sağlıklı bireylerde ve FMF klinik tanılı hastalarda daha geniş boyutlu çalışmalara gereksinim vardır.

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. Pras M, Bronshpigel N, Zemer D, Gafni J. Variable incidence of amyloidosis in familial Mediterranean fever among different ethnic groups. *Johns Hopkins Med J* 1982;150:22-6.
3. Ozdemir AL, Sokmen C. Familial Mediterranean fever among the Turkish people. *Am J Gastroenterol* 1969;51:311-16.
4. Barakat MH, Karnick AM, Majeed HWA, El-Sobki NI, Fenech FF. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs: a study of 175 patients and review of the literature. *Q Med* 1986;60:837-47.
5. Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 1995;57:455-7.
6. 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.
7. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997;90:797-807.
8. Papin S, Cuenin S, Agostini L, et al. The SPYR domain of pyrin, mutated in Familial Mediterranean Fever patients, interacts with inflammasome components and

- inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ* 2007;14:1457-66.
9. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Bailliere's Clin Rheumatol* 2000;14:477-98.
 10. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40:1879-85.
 11. Sabbagh AS, Ghasham M, Abdel Khalek R, et al. MEFV gene mutations spectrum among Lebanese patients referred for Familial, Mediterranean Fever work-up: experience of a major tertiary care center. *Mol Biol Rep* 2008;35:447-51.
 12. Pasa S, Altintas A, Devencioglu B, et al. Familial Mediterranean fever gene mutations in the Southeastern region of Turkey and their phenotypical features. *Amyloid* 2008;15:49-53.
 13. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, Ozdamar K, Cengiz K, Akpolat T. MEFV mutations in patients with Familial Mediterranean Fever in the Black Sea region of Turkey. *J Rheumatol* 2008;35:106-13.
 14. Gunel-Ozcan A, Sayin DB, Mısırlıoğlu ED, Güliter S, Yakaryılmaz F, Ensari C. The spectrum of FMF mutations and genotypes in the referrals to molecular genetic laboratory at Kırıkkale University in Turkey. *Mol Biol Rep* 2008;11033-008-9240-5
 15. Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, et al. Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000;92:241-6.
 16. Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey. Results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005;84:1-11.
 17. Yalcinkaya F, Cakar N, Misirlioglu M et al. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology* 2000;39:67-72.
 18. Duşunsel R, Dursun I, Gündüz Z, Poyrazoğlu MH, Gürgöze MK, Dundar M. Genotype-phenotype correlation in children with Familial Mediterranean fever in a Turkish population. *Pediatr Int* 2008;50:208-12.
 19. Yepiskoposyan L, Harutyunyan A. Population genetics of familial Mediterranean fever: a review. *Eur J Human Genet* 2007;15:911-6.
 20. 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.
 21. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003;18:853-9.
 22. Demirkaya E, Tunca Y, Gok F, Ozen S, Gul D. A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:729-32.
 23. 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.
 24. Tchernitchko D, Legendre M, Delahaye A, Cazeneuve C. Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve MEFV gene mutations. *Clin Chem* 2003;49:1942-5.
 25. Tchernitchko D, Gérard-Blanluet M, Legendre M, Cazeneuve C, Grateau G, Amselem S. The E148Q MEFV allele does not segregate with susceptibility to familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2006; 26: 25-31.
 26. Ben-Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D. The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat* 2000;15:385-6.