







## Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2022;15(2):311-319

doi:10.26559/mersinsbd.1095819

### Mersin ilinde yaşayan çocuklarda MASP-2 Geni Asp105Gly polimorfizmi ile romatizmal kalp hastalığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

 Nazan Eras<sup>1</sup>,  Etem Akbaş<sup>2</sup>,  Olgu Hallıoğlu<sup>3</sup>,  Öznur Bucak<sup>2</sup>,  
 Derya Karpuz<sup>3</sup>,  Sibel Balcı<sup>4</sup>,  Badel Arslan<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Mersin, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Mersin, Türkiye

<sup>3</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Kardiyoloji BD, Mersin, Türkiye

<sup>4</sup>Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatrik Romatoloji Kliniği, Kayseri, Türkiye

<sup>5</sup>Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp AD, Mersin, Türkiye

#### Öz

**Amaç:** Mannoza bağlayıcı lektinler ile ilişkili serin proteaz (MASP) lektin yolu ile kompleman aktivasyonunda rol oynayan bir proteazdır. MASP-2'nin fonksiyonel aktivasyonunun enfeksiyon hastalıklarının gelişim sürecine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. MASP-2 geninin 3. ekzonundaki adenin ile guaninin yer değiştirmesi, 105. pozisyonda aspartik asidin glisin amino asid (Asp105Gly) ile değişimine neden olur. Bu aminoasit değişikliği lektin yolunun aktivasyonunu durdurabilir ve ortaya çıkan MASP-2 eksikliği, enfeksiyon ve otoimmün hastalıklara yatkınlığı artırabilir. Çalışmamızda MASP2 geni Asp105Gly mutasyonunun insidansını ve romatizmal kalp hastalığı ile ilişkisini araştırmayı hedefledik. **Yöntem:** Çalışmamız yaş ortalaması 12.48±2.59 olan 82 romatizmal kalp hastası ve yaş ortalaması 11.99±2.66 olan 108 sağlıklı çocuk içerdi. Bireylerin genotipleri polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemiyle belirlendi. Elde edilen veriler Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. **Bulgular:** Romatizmal kalp hastaları ve kontrol grubunda G allelinin sıklığı sırasıyla %15.9 ve %20.4 idi (p=0.35). AA, AG ve GG genotiplerinin frekansları vakalarda sırasıyla %70.7, %26.8 ve %2.5 iken, kontrol grubunda sırasıyla %62, %35.2 ve %2.8 idi. GG genotipinin frekansı mitral yetersizlikli hastalarda %5.3, aort yetersizliği olanlarda %0 ve çoklu kapak tutulumu olanlarda %2.1 olarak saptandı (p=0.506, OR:2.636, %95GA:0.151-45.914). **Sonuç:** Bu çalışma ile Mersin ilinde MASP-2 Asp105Gly mutasyonunun genotip frekansları belirlenmiştir. Ayrıca MASP2 Asp105Gly mutasyonu ile romatizmal kalp hastalığı arasında ilişki olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** ARA, çocuk, MASP, PCR, romatizmal kalp hastalığı

**Yazının geliş tarihi:** 30.03.2022

**Yazının kabul tarihi:** 21.06.2022

**Sorumlu Yazar:** Nazan Eras, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Mersin, Tel: 0324 2410000, E-posta: nazaneras@gmail.com

**Not:** Çalışmamızın ön bulguları 16-19 Nisan 2014 tarihinde Diyarbakır'da '13. Ulusal Pediatrik Kardiyoloji ve Kalp Damar Cerrahi Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuş ve Pediatrik Heart Journal'de poster olarak yayınlanmıştır.

## Evaluation of the relationship between MASP-2 Gene Asp105Gly polymorphism and rheumatic heart disease in children living in Mersin province

### Abstract

**Aim:** MBL-associated serine protease (MASP) is a protease that plays a role in complement activation via the lectin pathway. Functional activation of MASP-2 is thought to contribute to the development process of infectious diseases. Substitution of adenine to guanine in exon 3 of the *MASP2* gene causes the exchange of aspartic acid with glycine amino acid at position 105 (Asp105Gly). This amino acid change can cause abrogate the activation of the lectin pathway, and the resulting MASP-2 deficiency could increase susceptibility to infections and autoimmune diseases. In our study, we aimed to investigate the incidence of the *MASP2* Asp105Gly mutation and its relationship with rheumatic heart disease. **Method:** Our study included 82 patients with rheumatic heart disease (mean age 12.48±2.59 years) and 108 healthy children (mean age 11.99±2.66 years). Genotypes of individuals were determined by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. The data were evaluated with the Kruskal Wallis test. **Results:** The frequency of the *G* allele was 15.9% and 20.4% in patients with rheumatic heart disease and control groups, respectively ( $p=0.35$ ). The frequencies of genotypes *AA*, *AG*, and *GG* in the cases were 70.7%, 26.8%, and 2.5%, respectively, while in the control group they were 62%, 35.2%, and 2.8%, respectively. The frequency of the *GG* genotype was 5.3% in patients with mitral regurgitation, 0% in patients with aortic regurgitation, and 2.1% in patients with multiple valve involvement ( $p=0.506$ ; OR:2.636; %95CI:0.151–45.914). **Conclusion:** In this study, genotype frequencies of *MASP2* Asp105Gly mutation were determined in Mersin Province. In addition, no relation was found between *MASP2* Asp105Gly mutation and RHD.

**Keywords:** ARA, child, MASP, PCR, rheumatic heart disease

### Giriş

Akut romatizmal ateş (ARA) A grubu  $\beta$  hemolitik streptokokların neden olduğu faranjit sonrası meydana gelen süpüratif olmayan inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalık sürecinde artrit, kardit, deri bulguları, kore ve sonradan edinilmiş kapak hastalığı gözlenebilmektedir.<sup>1</sup> ARA'nın ciddi bir komplikasyonu olan romatizmal kalp hastalığı (RKH), hastaların %30-45'inde görülür.<sup>2</sup> Streptokokal glikoprotein ile insan kardiyak miyozini ve laminin arasındaki antijenik benzerlik sonucu gelişen kardiyak tutulum, tamamen düzelebilir veya kronik RKH'na ilerleyebilir.<sup>3</sup> Kronik RKH gelişiminin; ilk ARA atağının genç yaşta geçirilmesi, ilk atakta şiddetli kardit olması, sık ve çok sayıda atakların geçirilmesine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.<sup>4</sup>

Enfeksiyon hastalıklarına karşı savunmada önemli bir rol oynayan kompleman sistemi klasik, alternatif ve

lektin yolu olmak üzere üç ana yolla aktive edilir.<sup>5</sup> Patojen mikroorganizmanın konakçıya saldırması sonrası, mannoz bağlayıcı lektinler (MBL) veya fikolinlerin, mikroorganizmaların yüzeyindeki mannoz içeren polisakkaritlere veya asetillenmiş kalıntılara bağlanması ile lektin yolu aktive olur. MBL veya fikolinin bir patojen mikroorganizmaya bağlanması sonrası MBL ile ilişkili serin proteaz (MASP) ailesinden olan MASP-2 aracılığıyla kompleman (C) aktivasyonu tetiklenir. Özellikle MASP-2 olmak üzere MASP'lar C1r ve C1s ile benzer yapısal özelliklere sahiptir ve C4 ve C2'yi parçalayıp, klasik yoldaki gibi C3 konvertaz oluşumuna yol açarlar.<sup>6-8</sup> C3'ün aktivasyonu, alternatif yolun başlamasına ve membran atak kompleksinin oluşumuna yol açar.<sup>7</sup>

Kromozom 1p36.3-p36.2'de lokalize olan *MASP2* geni, lektin yolu aktivasyon kompleksinin bileşenleri olan, 76 kilodalton (kDa) MASP-2 serin proteaz ve MBL Associated Protein 19 (MAP19) olarak adlandırılan 19 kDa'lık plazma proteini

kodlamaktadır.<sup>9,10</sup> MASP-2 proteaz, N-terminal katalitik olmayan domainler (CUB1(C1r/C1s, Uegf, kemik morfogenetik protein 1), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve CUB2 (C1r/C1s, Uegf, kemik morfogenetik protein 2)) ve katalitik domainlerden (CCP1 (Kompleman Kontrol Proteini 1), CCP2 (Kompleman Kontrol Proteini 2) ve SP (Serin Proteaz)) oluşur. MASP19 ise, CUB1 domain, EGF-benzeri domain ve bir C-terminal dizisine sahiptir. MASP19'un işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak MBL ve fikolinlere bağlanma yeteneği nedeniyle lektin yolunun aktivasyonunu önlemek için MASP'larla rekabet ettiği tahmin edilmektedir.<sup>11</sup> MASP19/MASP-2'de bulunan CUB1 modülü, MBL ve L-fikolin'e birincil bağlanma bölgesi iken, CUB2 modülü MBL ve fikolinlerle etkileşim üzerinde stabilize edici bir etkiye sahiptir.<sup>12</sup> N-terminal CUB1 domain ve Ca<sup>2+</sup>-bağlayıcı EGF-benzeri domainler, matür MASP monomerlerinin Ca<sup>2+</sup>-bağımlı opozit dimerizasyonunu gerçekleştirirler.<sup>13</sup> CUB1 domaininde adeninin guanine değişiminin, pozisyon 120'de bir asp120-gly (D120G) veya matür proteinde asp105-gly (D105G) substitüsyonuna neden olduğu saptanmıştır.<sup>7</sup> MASP2 Asp105Gly (rs72550870) mutasyonunun, MASP19/MASP-2'nin MBL ve L-fikolinden ayrılmasına yol açtığı saptanmıştır.<sup>14</sup> Ayrıca bu mutasyonun, serumdaki MASP-2 ve MASP19 konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.<sup>15</sup> MASP2'nin EGF domainindeki tandem duplikasyonunun (p.156\_159dupCHNH) protein dimerizasyonunu etkileyerek düşük MASP-2 seviyelerine neden olabileceği ileri sürülmüştür.<sup>16</sup> 2004 yılından bu yana, MASP-2 eksikliği, piyogenik enfeksiyonlar, inflammatuar akciğer hastalığı ve otoimmünite ile ilişkili bir kompleman eksikliği olarak primer immün yetmezliklerin sınıflandırmasına dahil edilmiştir.<sup>17</sup> Diğer yandan intron 9'daki g.1961795T varyantı (rs17409276), yüksek MASP-2 ve düşük MASP19 seviyeleri ile ilişkilendirilmiş ve yüksek MASP-2 seviyelerinin inflammatuar bozukluk riskini artırdığı ileri sürülmüştür.<sup>18</sup>

MASP-2 eksikliğinin, A grubu streptokoklarda olduğu gibi, patojenik mikroorganizmalara karşı immün yanıtta

önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmüş ve MASP2 geni rs72550870 varyantı ile ARA ve RKH arasındaki ilişki araştırılmıştır.<sup>19-21</sup> Ramasawmy (2008) ve ark.<sup>19</sup> Brezilya'da yaptıkları çalışmada MASP2 Asp120Gly mutasyonu ile romatizmal ateş sonucunda gelişen kronik aort yetmezliği arasındaki ilişkiyi incelemişler ve GG genotip frekansının sıfır olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Brezilya'da yapılan diğer bir çalışmada MASP2 D105G mutasyonunun RA ve RKH patogenezindeki rolü araştırılmış ve GG genotip frekansı sıfır olarak saptanmıştır.<sup>20</sup> MASP2 rs72550870 varyantının, ARA ve RKH patofizyolojisindeki rolünün tam olarak anlaşılması için başka popülasyonlarda yapılacak benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, Mersin ilinde MASP2 Asp105Gly (A→G) mutasyonunun allel ve genotip frekanslarını tespit etmek ve MASP2 Asp105Gly mutasyonu ile RKH arasındaki ilişkiyi araştırmayı hedefledik.

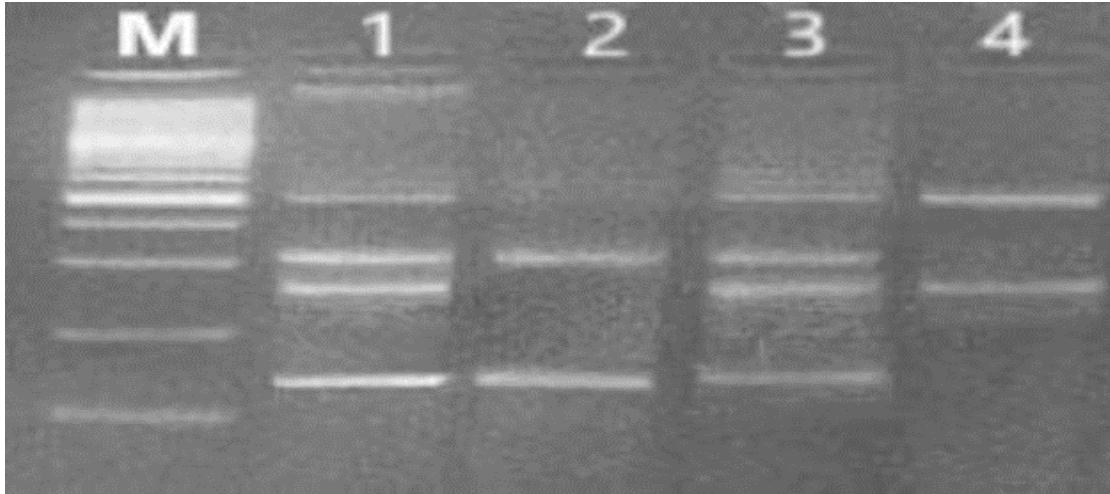
## Yöntem

Bu çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Polikliniğinde tanı konulmuş 82 RKH'lı çocuk hasta ve yaş ve cinsiyet özellikleri açısından benzer özelliklere sahip 108 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. Vaka grubu modifiye Jones kriterlerine<sup>22</sup> göre ARA tanısı alan hastalardan oluşturuldu. RKH tanıları çocuk kardiyoloji hekimi tarafından ekokardiyografi ile doğrulandı. Enfeksiyon, enfektif endokardit veya başka herhangi bir inflammatuar bozukluğu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubu, kardiyak üfürüm açısından çocuk kardiyoloji polikliniğimizde araştırılan ve ekokardiyografisi normal olarak değerlendirilen ve ARA öyküsü olmayan sağlıklı çocuklardan oluşturuldu. Bu çalışma için etik kurul onayı 17.04.2009 tarihli ve 2009/ sayılı karar ile Mersin Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan alındı. Çalışma Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapıldı. Çalışmaya katılan bireylerin ebeveynlerinden "bilgilendirilmiş onam" alındı.

Çocuklardan alınan periferik kan

örnekleri 50 mmol/L disodyum-EDTA içeren tüplere aktarıldı ve standart fenol/kloroform bazlı yöntemle DNA ekstrakte edildi.<sup>23</sup> *MASP2* Asp105Gly mutasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile analiz edildi. PCR işlemi esnasında potansiyel kontaminasyonu önlemek için en az bir bilinen örnek pozitif kontrol ve DNA içermeyen bir örnek negatif kontrol olarak kullanıldı. Çalışmamızda *MASP2* genini amplifiye etmek için ileri yönlü primer olarak 5' CAGGTCCTGGACAAACAGATCA3' ve geri yönlü primer olarak 5' CTGCCTGGCCTAAGACAGAG 3' primerleri kullanıldı.<sup>20</sup> DNA numunelerinin kalite ve miktar tayini Nanodrop spektrofotometre cihazında yapıldı. Stok DNA örneklerinin bir kısmı başka bir tüpe alınarak, 30 ng/μl

konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Total hacmi 25 μl olan PCR karışımı, 30 ng DNA, ileri ve geri yönlü primerlerden 0.8 μl, 2 ünite Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1.5 μl MgCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 1XPCR buffer, dNTP karışımı 125 mM ve 17 μl steril distile su içerdi. Amplifiye ürünler HpaII restriksiyon endonükleaz enzimi (Promega, Southampton, UK) ile 37°C'de bir gece inkübe edilerek kesildi. Kesilen DNA fragmanları %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonrası gözlenen polimeraz zincir reaksiyonu bant uzunlukları üç fragman (487 bp, 260 bp ve 60 bp) içeriyordu. Mutasyonun varlığı, 487 bp'lik amplifikasyon ürünün, 355 bp ve 133 bp olan iki fragmana bölünmesiyle sonuçlandı (Resim 1).



**Resim 1.** *MASP2* Asp105Gly mutasyonuna ait genotiplerin RFLP sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas). Kolon 1 ve 3: AG Heterozigot (487 bç + 355 bç + 260 bç + 135 bç); Kolon 2: GG Homozigot (355 bç + 135 bç); Kolon 4: AA homozigot (487 bç + 260 bç)(60 bç'lik ürün %3'lük agaroz jel elektroforezinde görülememektedir).

#### İstatistiksel analiz

Değişkenler arasındaki farklılıkları belirlemek için Kruskal Wallis testi kullanıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Varyantın in silico analizi için VarSome<sup>24</sup> veritabanı kullanıldı.

#### Bulgular

Çalışma popülasyonumuz 82 RKH olan

çocuk hasta ve 108 sağlıklı çocuk olmak üzere 190 kişiden oluşmuştur. Vaka grubunun yaş ortalaması  $12.48 \pm 2.59$  iken kontrol grubunun yaş ortalaması  $11.99 \pm 2.66$  olarak bulunmuştur. Vaka ve kontrol gruplarının yaş verileri arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p=0.327$ ). Vaka grubunda kapak tutulumları incelendiğinde; 19 çocukta mitral yetersizlik, 15 çocukta aort yetersizliği ve 48 çocukta aort ve mitral kapak yetersizliğinin birlikte olduğu tespit edilmiştir.

MASP2 Asp105Gly varyantının hastalıkla ilişkisinin değerlendirilmesi için Varsome veri tabanı kullanılmıştır. Varsome veri tabanında Asp105Gly varyantının popülasyon frekansı 0.0214 olarak hesaplanmıştır.<sup>24</sup> ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics)<sup>25</sup> kriterlerinden BS1, BS2, PP3 ve PP5'i sağlayan Asp105Gly varyantı, benign olarak sınıflandırılmıştır. Asp105Gly varyantı ClinVar veritabanında farklı merkezler tarafından 2 kez olasılıkla patojenik, 1 kez önemi bilinmeyen varyant ve 1 kez benign varyant olarak sınıflandırılmış olup patojenisitesi çelişkili olarak tanımlanmıştır. In silico protein modelleme programları ile yapılan patojenisite değerlendirmesinde DANN skoru: 0.9984 olan Asp105Gly varyantı, patojenik olarak skorlanmaktadır. Bu sebeple Asp105Gly varyantı çalışmamızda mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdaki MASP2 Asp105Gly mutasyonuna ait A ve G allellerinin frekansları sırasıyla RHK olan grupta %84.1

ve % 15.9 iken, kontrol grubunda %79.6 ve %20.4 olarak saptandı (P=0.35). Çalışmamızdaki AA, AG ve GG genotiplerinin frekansları ise sırasıyla; RHK olan grupta %70.7, % 26.8 ve % 2.5 iken kontrol grubunda % 62, %35.2 ve %2.8'dir. Hasta ve kontrol grupları arasında MASP2 Asp105Gly genotip dağılımları ve allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmemiştir (p>0.05) (Tablo 1).

Kalp kapakçık defekt tiplerine göre MASP2 Asp105Gly mutasyonunun allel ve genotip dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. GG genotipi mitral yetersizliğinde %5.3, aort yetersizliğinde %0, çoklu kapak tutulumu olanlarda %2.1'dir (p=0.506, OR:2.636, %95GA:0.151-45.914). GG genotipi tek kapak tutulumu olanlarda çoklu kapak tutulumu olanlara göre daha sık gözlenmekle beraber hasta sayısının düşüklüğü nedeniyle istatistiksel değerlendirmeye yansımamıştır. Kalp kapakçık defekt tipleri ile MASP2 Asp105Gly mutasyonu arasında ilişki bulunmamıştır.

**Tablo 1.** Romatizmal kalp hastaları ve kontrol grubunda allel ve genotip oranlarının dağılımı

	Mitral Kapak (n=19) (%)	Aort Kapak (n=15) (%)	Multipl Kapak (n=48) (%)	Mitral/Aort Kapak (n=34) (%)	
Genotip					
AA	13 (68.4)	13 (86.7)	32 (66.7)	26 (76.4)	
AG	5 (26.3)	2 (13.3)	15 (31.2)	7 (20.6)	
GG	1 (5.3)	0 (0)	1 (2.1)	1 (3)	
Allel					
A	31 (81.6)	28 (93.3)	79 (82.3)	59 (86.7)	
G	7 (18.4)	2 (6.7)	17 (17.7)	9 (13.3)	
	Hasta Grubu n=82 (%)	Kontrol Grubu n=108 (%)	p	OR	%95 GA
Genotip					
AA	58 (70.7)	67 (62)	Referans	-	-
AG	22 (26.8)	38 (35.2)	0.307	0.706	0.362-1.376
GG	2 (2.5)	3 (2.8)	0.828	0.232	0.232-6.209
Allel					
A	138 (84.1)	172 (79.6)	Referans	-	-
G	26 (15.9)	44 (20.4)	0.35	0.75	0.432-1.324

OR: Odds oranı, GA: Güven aralığı

## Tartışma

Kompleman sistemi, enfeksiyonlara karşı konak savunmasına aracılık ederek, inflamasyonu düzenleyerek, immün komplekslerin ve apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmasını etkileyerek doğuştan gelen immün yanıtta önemli bir rol oynar. Kompleman sistemi, düzenleyici mekanizmalar ile hassas bir şekilde dengelenmiştir.<sup>20</sup> Bu mekanizmalar bozulduğunda, kronik inflamatuvar hastalıkların gelişme potansiyeli artar.<sup>16</sup> Hücresel düzeyde hipoksi geliştiğinde, hücre yüzeyleri glikolize olur, bu da MBL bağlanmasını destekleyerek kompleman aktivasyonuna ve doku hasarına yol açar.<sup>26</sup> MBL'nin farklı kronik hastalıklarda aktif bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yüksek MBL seviyeleri veya *MBL2* genotipi, romatoid artritte persistan inflamasyonla<sup>27</sup> ve diabetes mellitusta mikro ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir.<sup>28</sup> Ayrıca MBL'nin gastrointestinal ve miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında önemli bir rolünün olduğu da bildirilmiştir.<sup>29</sup> Ancak bir yandan MBL eksikliğinin otoimmün ve enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık yarattığı, diğer yandan hücre içi patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara ve inflamatuvar hastalıklara karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür. Bu nedenle MBL'nin immün yanıtta dual rol oynadığı kabul edilmektedir.<sup>20</sup>

Lektin yolu ile kompleman kaskadının aktivasyonu, MBL ve MASP-2'nin etkileşimine bağlıdır.<sup>20</sup> Lektin yoluyla MASP'ların (özellikle MASP-2) aktivasyonu, patojen enfeksiyona karşı bir bağışıklık tepkisinin oluşturulmasında önemli bir adımdır ancak Asp105Gly (*A→G*) substitüsyonu, fonksiyonel olmayan MASP-2 serum seviyelerinin düşük konsantrasyonuna neden olabilir. Ayrıca bu substitüsyon varlığında MASP-2, MBL'ye bağlanma kabiliyetini kaybeder ve kompleman aktivasyonunu iptal eder.<sup>7</sup> *MASP2* Asp105Gly (*A→G*) substitüsyonu bu klinik rolü nedeniyle, bazı araştırmacıların ilgisini çekmiştir ve yapılan çalışmalarla Asp105Gly varyantına ait allel frekansı ortaya çıkarılmıştır. Asp105Gly varyantının farklı popülasyonlara ait allel frekansları Afrika orijinlilerde %0.6, Aşkenazi

Yahudileri'nde %0.7, Avrupalılarda (Finlandiyalı) %4.4 ve diğer Avrupalılarda %3.5 olarak tespit edilmiştir.<sup>24</sup> Ancak Asp105Gly varyantına ait allel frekanslarının toplumlar arasında farklılıklar gösterdiği gözlenmektedir. Bu da Asp105Gly varyantını polimorfizm olarak mı değerlendirmeliyiz, yoksa mutasyon olarak değerlendirmeliyiz sorusunun cevabını güçleştirmektedir. Çünkü mutasyonlar ile polimorfizmler arasındaki farklardan biri görülme sıklığıdır. DNA dizisindeki baz değişiklikleri popülasyon genelinde %1'den fazla görülüyorsa polimorfizm olarak isimlendirilmektedir.<sup>30</sup> Çalışmamızda bu sebeple Asp105Gly varyantının bir polimorfizm mi, yoksa hastalıktan sorumlu mutasyon mu olduğunu değerlendirmek için *in silico* analiz yapılmıştır. *In silico* protein modelleme programları ile yapılan patojenisite değerlendirmesinde DANN skoru: 0.9984 olan Asp105Gly varyantı patojenik olarak skorlanmaktadır.<sup>24</sup> Bu sebeple Asp105Gly varyantı çalışmamızda mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

Birçok çalışmada *MASP2* D120G varyantı ile çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.<sup>5,7,17,19-21</sup> García-Laorden ve ark. (2020)<sup>17</sup> İspanya'da 1784 kişilik hasta grubu (1495 toplum kökenli pnömonili erişkin, 186 sistemik lupus eritematozuslu erişkin ve 103 invaziv pnömokoklu çocuk) ve 1950 kişilik kontrol grubu (311 çocuk ve 1639 erişkin) ile yaptıkları çalışmada *MASP2* p.D120G mutasyonunun varlığını araştırmışlardır. *AA* genotipinin frekansını toplum kökenli pnömonili hastalarda %94.58, invaziv pnömokoklu çocuk hastalarda %97.09 ve SLE'li hastalarda %93.55 olarak saptarken *GG* genotipli hasta tespit etmemişlerdir. *GG* genotipini sadece kontrol grubundaki 4 sağlıklı bireyde saptamışlardır.<sup>17</sup> İtalya'da hepatoselüler karsinomlu 215 hasta ile 164 sağlıklı bireyin karşılaştırıldığı çalışmada *MASP2* D120G'nin *AA*, *AG* ve *GG* genotipleri sırasıyla hasta grubunda %97, %2 ve %1, kontrol grubunda %93, %6 ve %1 olarak tespit edilmiştir. Hepatoselüler karsinom ile *MASP2* D120G polimorfizmi arasında ilişki olmadığı saptanmıştır.<sup>31</sup> Dokuz araştırmayı içeren metaanaliz çalışmada *MASP2* geni

p.D120G polimorfizmi ile enfeksiyon hastalıkları riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (OR=0.88, 95% GA:0.65-20) (p=0.428).<sup>5</sup>

ARA ile *MASP2* (Asp105Gly) varyantı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma sayısı çok azdır. Brezilya'da 148 ARA'lı hasta ve 129 sağlıklı bireyle yapılan bir çalışmada D105G AA, AG ve GG genotiplerinin sırasıyla hasta grubunda %97.3, %2.7 ve %0, kontrol grubunda %96.1, %3.9 ve %0 olduğu ve *MASP2* genindeki D105G mutasyonunun RF patogenezinde rol oynamadığı raporlanmıştır.<sup>20</sup> Brezilya'dan yapılan diğer bir çalışmada ise 290 ARA'lı hasta ile 684 sağlıklı gönüllü karşılaştırılmıştır. Catarino ve ark.'nın<sup>21</sup> (2014) yaptığı bu çalışmada *MASP2* Asp105Gly G mutant alleli, sadece 5 hastada (%1.7) ve 8 sağlıklı gönüllüde (%1.2) tespit edilmiştir. *MASP2* genindeki 11 adet polimorfizm/mutasyonun araştırıldığı çalışmada ayrıca *MASP-2* seviyesi ölçülmüştür ve *MASP-2* seviyesi kontrol grubunda 313.9 ng/ml ve hasta grubunda 252.8 ng/ml (P<0.0001, OR=0.20, %95GA=0.09-0.47) olarak saptanmıştır. Hastalardaki *MASP-2* düzey düşüklüğünün nedeninin *MASP2* Asp105Gly mutasyonundan kaynaklı olmadığı ileri sürülmüştür.<sup>21</sup> ARA'ya bağlı kronik ciddi aort yetersizliği gelişen 90 hasta ve 281 sağlıklı kontrolü içeren kesitsel bir çalışmada, *MASP2* geni D120G GG genotipinin her iki grupta da %0 frekansta olduğu, *MASP2* gen varyantı ile kronik ciddi aort yetersizliği gelişimi arasında ilişki bulunmadığı gösterilmiştir.<sup>19</sup>

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *MASP2* geni Asp105Gly varyantı ile enfeksiyon hastalıkları arasında ilişki tespit edilmemiştir.<sup>5,17</sup> Benzer olarak *MASP2* geni Asp105Gly varyantı ARA riski ile de ilişkilendirilmemiştir. Yapılan çalışmalarda GG varyantına sahip bireye rastlanılmamış ya da GG varyant frekansı çok düşük oranlarda saptanmıştır.<sup>19-21</sup> Benzer olarak çalışmamızda da GG genotipinin hastalardaki frekansı %2.5 ve kontrol grubunda %2.8 olup, ARA ve *MASP2* Asp105Gly mutasyonu arasında ilişki tespit edilmemiştir. Ayrıca kalp kapakçık defekt tipleri de bu mutasyonla ilişkili bulunmamıştır.

## Sonuç

Sonuç olarak, bildiğimiz kadarıyla, bu *MASP2* Asp105Gly mutasyonu ile RKH arasındaki ilişkiyi araştıran Türk popülasyonundaki ilk vaka kontrol çalışmasıdır. Çalışmamızda sağlıklı kontroller ile RKH'na sahip hastalar arasında hem *MASP2* Asp105Gly genotip dağılımları hem de allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bunun nedeni, GG genotipli hastaların örneklem büyüklüğünün küçük olması olabilir. Bu nedenle *MASP2* geni Asp105Gly polimorfizmi ile ARA arasındaki ilişkiyi değerlendiren daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Yazar Katkıları:** Araştırma ile ilgili fikir oluşturma: NE, EA, OH; çalışma dizaynı: NE, OH; araştırmanın yürütülmesini organize etmek: NE, EA; deneyin yapılması: NE, ÖB, BA; verilerin toplanması ve analizi: NE, EA, DK, SB, ÖB, BA; literatür taraması: NE; makale yazımı: NE, EA, OH, DK, SB, ÖB, BA.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

**Mali destek:** Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (BAP-TF TTB (EA)2010-5 A) desteklenmiştir.

**Teşekkür:** Çalışmamıza mali destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışmanın istatistiksel analizini yapan Prof. Dr. Seval KUL'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Düzgün N, Duman T, Haydardedeoğlu FE, Tutkak H. The lack of genetic association of the Toll-like receptor 2 (TLR2) Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms with rheumatic heart disease. *Clin Rheumatol.* 2007; 26(6): 915-919. doi: 10.1007/s10067-006-0432-x.
2. Chou HT, Tsai CH, Chen WC, Tsai FJ. Lack of association of genetic polymorphisms in the interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 genes with risk of rheumatic heart disease in Taiwan

- Chinese. *Int Heart J.* 2005; 46(3): 397-406. doi: 10.1536/ihj.46.397.
3. Arvind B, Ramakrishnan S. Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease in Children. *Indian J Pediatr.* 2020; 87(4): 305-311. doi: 10.1007/s12098-019-03128-7.
  4. Sika-Paotonu D, Beaton A, Raghu A, Steer A, Carapetis J. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. İçinde: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, eds. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations.* Oklahoma City: University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
  5. Fu J, Wang J, Luo Y, et al. Association between MASP-2 gene polymorphism and risk of infection diseases: A meta-analysis. *Microb Pathog.* 2016; 100: 221-228. doi: 10.1016/j.micpath.2016.10.004.
  6. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003; 40(7):423-429. doi: 10.1016/s0161-5890(03)00155-x.
  7. Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med.* 2003; 349(6): 554-560. doi: 10.1056/NEJMoa022836.
  8. Matsushita M, Fujita T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* 2001; 180(1):78-85. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1800107.x.
  9. Stover CM, Schwaeble WJ, Lynch NJ, Thiel S, Speicher MR. Assignment of the gene encoding mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP2) to human chromosome 1p36.3-->p36.2 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;84(3-4):148-149. doi: 10.1159/000015243.
  10. Stover C, Endo Y, Takahashi M, et al. The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2-3. *Genes Immun.* 2001; 2(3):119-127. doi: 10.1038/sj.gene.6363745.
  11. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: Two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824(1):253-262. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.021.
  12. Stover C, Barrett S, Lynch NJ, et al. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005; 152(6):1313-1315. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06547.x.
  13. Kjaer TR, Le le TM, Pedersen JS, et al. Structural insights into the initiating complex of the lectin pathway of complement activation. *Structure.* 2015; 23(2): 342-351. doi: 10.1016/j.str.2014.10.024.
  14. Beltrame MH, Catarino SJ, Goeldner I, et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front Pediatr.* 2015;2: 148. doi: 10.3389/fped.2014.00148.
  15. Sørensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 27(3): 299-319. doi: 10.1007/s00281-005-0006-z.
  16. Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.* 2007; 8(2):154-163. doi: 10.1038/sj.gene.6364373.
  17. García-Laorden MI, Hernández-Brito E, Muñoz-Almagro C, et al. Should MASP-2 Deficiency Be Considered a Primary Immunodeficiency? Relevance of the Lectin Pathway. *J Clin Immunol.* 2020; 40(1):203-210. doi: 10.1007/s10875-019-00714-4.
  18. Boldt AB, Grisbach C, Steffensen R, et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. *Hum Immunol.*



- 2011; 72(9):753-760. doi: 10.1016/j.humimm.2011.05.015.
19. Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(6): 932-936. doi: 10.1128/CVI.00324-07.
  20. Schafranski MD, Pereira Ferrari L, Scherner D, Torres R, de Messias-Reason IJ. Functional MASP2 gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever. *Hum Immunol.* 2008;69(1):41-44. doi: 10.1016/j.humimm.2007.11.003.
  21. Catarino SJ, Boldt AB, Beltrame MH, Nisihara RM, Schafranski MD, de Messias-Reason IJ. Association of MASP2 polymorphisms and protein levels with rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Hum Immunol.* 2014;75(12):1197-1202. doi: 10.1016/j.humimm.2014.10.003.
  22. Gewitz MH, Baltimore RS, Tani LY, et al. American Heart Association Committee on rheumatic fever, endocarditis, and kawasaki disease of the council on cardiovascular disease in the young. revision of the jones criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever in the era of doppler echocardiography: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2015; 131(20): 1806-1818. doi: 10.1161/CIR.0000000000000205.
  23. Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K, Babaie A, Suthar RS, Kazemi E. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2016; 62(3):120-124.
  24. The Human Genomics Community. <https://varsome.com/17> Haziran 2022'de erişildi.
  25. Richards S, Aziz N, Bale S et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405-24.
  26. Collard C, Vakeva A, Morrissey MA, et al. Complement activation after oxidative stress. Role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol.* 2000;156:1549-1556. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65026-2.
  27. Garred P, Madsen HO, Marquart H, et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *J Rheumatol.* 2000; 27(1):26-34.
  28. Hansen TK. Mannose-binding lectin (MBL) and vascular complications in diabetes. *Horm Metab Res.* 2005;37(S1):95-98. doi: 10.1055/s-2005-861372.
  29. McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 2006;211(10):759-766. doi: 10.1016/j.imbio.2006.06.011.
  30. Özden A, Emir F. Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji.* 2006; 10(1): 24-28.
  31. Segat L, Fabris A, Padovan L, et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2008; 15(5):387-391. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00965.x.