

## Ailesel akdeniz ateşi ön tanılı hastalarda *MEFV* mutasyonlarının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve yeni nesil dizileme ile karşılaştırmalı analizi-tek merkez deneyimi

*Comparative analysis of MEFV mutations in patients with familial mediterranean fever by real time polymerase chain reaction and next generation sequencing-single center experience*

Onur Tokgün, Samet Türel, Pervin Elvan Tokgün, Taner Durak, Nedim Karagenc, Aydın Demiray, Hakan Akça

Gönderilme tarihi:30.03.2021

Kabul tarihi:15.04.2021

### Öz

**Amaç:** Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA), Akdeniz kökenli popülasyonlarda sıklıkla görülen otoinflamatuar bir hastalıktır. *MEFV* genindeki mutasyonların, FMF'nin gelişiminin temelini oluşturduğu saptanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada *MEFV* mutasyonlarının tespitinde yeni nesil dizileme ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin olası farklılıklarını araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve yöntem:** Bu çalışma 01.08.2018-12.03.2020 tarihleri arasında toplanan örnekler üzerinde Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. *MEFV* mutasyon analizleri, yeni nesil dizileme ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Yeni nesil dizileme analizleri sonucunda saptanan *MEFV* varyantlarının analizi Sophia DDM 5.2.1® platformu kullanılmıştır.

**Bulgular:** *MEFV* mutasyon analizleri 341 FMF ön tanılı hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre, hastaların 227'sinde (227/341) herhangi bir *MEFV* mutasyonu saptanmamış iken 114 hastada yalnızca bir heterozigot mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. Allel sayıları ve frekansları değerlendirildiğinde, en sık saptanan varyantlar sırasıyla M694V (46/341), E148Q (45/341), M680I (12/341), V726A (6/341) ve P369S (5/341) olmuştur. Ayrıca, 41 hastada polimeraz zincir reaksiyon analizinden farklı olarak yeni nesil dizileme ile yeni mutasyonlar saptanmıştır.

**Sonuç:** Mevcut çalışmanın sonuçları, NGS analizinin nadir *MEFV* varyantlarının yanı sıra FMF hastalarında sıklıkla gözlenen *MEFV* varyantlarının etkin bir şekilde tespit edilmesine olanak sağladığını göstermektedir. Özetle, hekimlere, moleküler tanı ve genetik test sonuçlarının hastalığın ilerlemesi ile ilişkisini belirlemek için yeni nesil dizileme gibi kapsamlı moleküler testler yapmanın gerekliliğini önermekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** FMF, *MEFV*, yeni nesil dizileme, gerçek zamanlı PZR.

Tokgün O, Türel S, Tokgün PE, Durak T, Karagenc N, Demiray A, Akça H. Ailesel akdeniz ateşi ön tanılı hastalarda *MEFV* mutasyonlarının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve yeni nesil dizileme ile karşılaştırmalı analizi-tek merkez deneyimi. Pam Tıp Derg 2021;14:638-644.

### Abstract

**Purpose:** Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autoinflammatory disease which is frequently seen in populations of Mediterranean origin. Mutations in the *MEFV* gene were found to underlie the development of FMF. Therefore, in this study we aimed to investigate the possible differences of next generation sequencing and polymerase chain reaction methods for the detection of *MEFV* mutations.

Onur Tokgün, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: otokgun@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-0537-9032>) (Sorumlu Yazar)

Samet Türel, Biyolog, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: sturel@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-2282-5938>)

Pervin Elvan Tokgün, Biyolog, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: parsian@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0001-9025-4140>)

Taner Durak, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: tdurak@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0001-6143-1670>)

Nedim Karagenc, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: nkaragenc@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-8255-6621>)

Aydın Demiray, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: ademiray@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-3343-0184>)

Hakan Akça, Prof. Dr. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye, e-posta: hakca@pau.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-9477-8571>)

**Materials and methods:** This study was carried out in Pamukkale University Hospital Department of Medical Genetics on samples collected between 01.08.2018-12.03.2020. *MEFV* mutation analysis was performed by using next generation sequencing and polymerase chain reaction methods. Sophia DDM 5.2.1® platform was used for the detection of the *MEFV* variants by next generation sequencing analysis.

**Results:** *MEFV* mutation analyses were performed on 341 FMF pre-diagnosed patients. According to polymerase chain reaction results, two hundred and twenty-seven (227/341) of patients had no detectable *MEFV* mutations and 114 patients had only one heterozygous mutations. When allele numbers and frequencies were evaluated, the most frequently detected variants were M694V(46/341), E148Q(45/341), M680I(12/341), V726A(6/341) and P369S(5/341), respectively. Additionally, new mutations in 41 patients have been observed with next generation sequencing in discordance with polymerase chain reaction analysis.

**Conclusion:** The results of the current study suggest that NGS analysis enable efficient detection of rare *MEFV* variants as well as the *MEFV* gene variants frequently observed in FMF patients. Finally, we recommend the physicians the necessity of running molecular tests to identify the exact genotype, and its correlation with disease progression.

**Key words:** FMF, *MEFV*, next generation sequencing, real time PCR.

Tokgun O, Turel S, Tokgun PE, Durak T, Karagenc N, Demiray A, Akca H. Comparative analysis of *MEFV* mutations in patients with familial mediterranean fever by real time polymerase chain reaction and next generation sequencing-single center experience. Pam Med J 2021;14:638-644.

## Giriş

Ailevi Akdeniz ateşi (FMF), özellikle Türkler, Araplar, Yahudiler ve Ermeniler gibi Akdeniz toplumlarını etkileyen çoğunlukla otozomal resesif kalıtım modeli gösteren bir hastalıktır (MIM 249100) [1, 2]. Bu popülasyonlardaki taşıyıcılık oranları 6'da 1'e kadar çıkabilmektedir. FMF, görünürde sebepsiz ateş atakları, karın veya göğüs ağrısı ve artrit ile karakterize otoinflamatuar bir hastalıktır [3]. Profilaktik kolşisin tedavisi genellikle böbrek yetmezliğine ve diğer organ hasarına yol açabilen amiloidozu önlemek için tercih edilmektedir. Hastalığa, pyrin'i (veya marenostin) kodlayan *MEFV* genindeki mutasyonlar neden olmaktadır [4]. Pyrin'in polimorfonükleer hücrelerde inflamasyonun alt düzenleyicisi olarak rol oynadığı öngörülmektedir. FMF aktivitesi olan hastalarda üretilen çeşitli pyrin formları, nötrofil aktivasyonunun uygunsuz şekilde tetiklenmesine ve kontrolsüz interlökin-1 (IL-1) salınımına neden olarak, periton, plevra ve eklemlerde inflamasyon epizodlarına yol açmaktadır. Klinik görünümdeki varyasyon ve amiloidoz gelişimi, *MEFV* mutasyonlarına bağlı olarak değişebilmektedir [5, 6].

FMF'den sorumlu olan *MEFV* geni 1997'de pozisyonel klonlama yöntemi ile tanımlanmıştır. *MEFV* geni 16p13.3 lokasyonunda yer alır ve 10 ekzon ile 781 kodondan oluşmaktadır [7]. *MEFV* geninde yaklaşık olarak 400 adet tanımlanmış mutasyon bulunmaktadır. Bu, mutasyonların çoğu, 680 ve 761 amino asitleri arasında yer alan ekzon 10'da bulunmaktadır.

Ekzon 10'da görülen M694V, V726A, M694I ve M680I mutasyonları ve ekzon 2'de gözlenen E148Q mutasyonları yaklaşık olarak hastaların %80'inde görülmektedir [8]. FMF'in tipik semptomları homozigot ya da bileşik heterozigot M694V veya M680I mutasyonu görülen olan hastalarda daha şiddetli görülmektedir [9]. E148Q veya V726A mutasyonları daha hafif bir klinik seyir ile ilişkilendirilmiştir.

*MEFV* geninde saptanan mutasyonların sayısı, kullanılan tetkik yönteminin tarihsel gelişimi ile doğru orantılıdır. Geçmiş yıllarda tercih edilen RFLP ve strip bazlı test yöntemleri yeni *MEFV* mutasyonlarını saptayabilmek açısından yeterli olmamaktadır. Öte yandan, *MEFV* mutasyonlarını analiz eden laboratuvarlarda genellikle önceden bahsedilen ve sık gözlemlendiği bilinen 5 mutasyonu taramaya yönelik (pirosekans ve PZR tabanlı) teknolojilerdir. Farklı klinik seyre sahip hastalarda olası farklı mutasyonların tanımlanmasının tanı koyma ve alternatif tedavi stratejileri üretilmesi noktasında katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, sık gözlenen beş *MEFV* mutasyonundan başka olası yeni mutasyonları saptayabilmek amacıyla *MEFV* tüm gen yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisinin kullanılması önemli bir gelişmedir. Bu bilgiler doğrultusunda, gerçekleştirdiğimiz çalışmada gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile sık gözlenen 5 mutasyonun taramasının yapıldığı ve homozigot veya bileşik heterozigot mutasyon taşımayan bireylerde *MEFV* geni NGS ile analiz edilmiştir. PZR yönteminden

elde edilen veriler ile NGS verileri kıyaslanarak mutasyon saptanmasında olası yöntemsel farklılıklar ortaya konması amaçlanmıştır. Öte yandan, *MEFV* genini taradığımız 341 adet hastada gözlenen mutasyonların türleri ve frekansları analiz edilecektir.

### Gereç ve yöntem

Bu çalışma, 2018 Ocak-2020 Mayıs ayları arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesine karın ağrısı, eklem ağrısı ve ateş vb şikâyetlerle başvuran ve FMF ön tanısı ile *MEFV* genetik testi gerçekleştirilen 341 adet hastanın dahil edildiği retrospektif bir çalışmadır. Gerçekleştirilecek genetik test öncesi tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formunu okuyup imzalamaları istenmiş ve çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Kan örnekleri alınan hastalardan ilk olarak PZR yöntemi ile M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S mutasyonları analiz edildi. Bu analiz sonucunda homozigot veya bileşik heterozigot mutasyon taşımayan bireylere NGS analizi ile tüm gen analizi gerçekleştirildi.

### MEFV mutasyon analizi

Hastalardan alınan tam kan (2-5 ml) etilendiamintetraasetik asit içeren tüplerde toplandı. Periferik kan hücrelerinden genomik deoksiribonükleik asit (DNA), üreticinin talimatlarına göre QIAamp Kan Kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak izole edildi. İzole edilen DNA örneklerinden M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S mutasyonlarına ait mutant problemleri içeren miks ile yabancı tip genotipe ait problemleri içeren miksler (Genmark, Türkiye) kullanılarak allel spesifik gerçek zamanlı PZR (ASO) reaksiyonu gerçekleştirildi. Kit içerisinde mutasyon analizleri için FAM işaretli problemler kullanılmıştır. PZR analiz sonuçları, her bir kuyucuktaki amplifikasyon ve erime eğrisi sıcaklıklarına göre analiz edilmiştir.

NGS ile *MEFV* mutasyonu taranması, FMF MASTR Dx Assay (Multiplicom) kiti kullanılarak, Illumina MiSeq® platformunda gerçekleştirildi. Bu yöntem ile ekzon- intron birleşim bölgeleri de dahil olmak üzere *MEFV* genine ait tüm kodlayan diziler analiz edilmiştir. Dizileme işlemi sonrası elde edilen sekans verileri "Sophia DDM 5.2.1®" analiz programı kullanılarak "hg19 insan

genomu" ile karşılaştırılmıştır. In silico analiz, yeni mutasyonlar için Clinvar, PolyPhen-2, SIFT, 1000 Genomes, GnomAD ve Mutation Taster kullanılarak gerçekleştirildi. INFEVERs veritabanına göre *MEFV* varyantları, mutasyon veya polimorfizm olarak tanımlanmıştır.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS sürüm 19.0 yazılımı (SPSS Inc., ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Yaygınlık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir.

### Bulgular

341 adet FMF ön tanılı olguda gerçekleştirilen ve 5 adet *MEFV* (M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S) mutasyonunun tarandığı PZR reaksiyonu sonucunda 229 adet bireyde herhangi bir *MEFV* mutasyonu saptanmamış iken 114 adet bireyde 1 adet heterozigot mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, 341 adet örnekte *MEFV* tüm gen analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ve NGS ile saptanmış olan tüm mutasyon/polimorfizm'ler hakkında detaylı moleküler ve klinik sınıflandırmaya dair bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile Saptanan heterozigot mutasyonlar gözlenme sıklıklarına göre sırasıyla M694V(46/341), E148Q(45/341), M680I(12/341), V726A(6/341) ve P369S(5/341) olarak gözlenmiştir (Tablo 2).

NGS sonuçlarını M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S varyantları açısından değerlendirdiğimizde PZR ile 1 adet heterozigot mutasyon gözlenen 114 bireyin 106'sında aynı heterozigot mutasyon sekanslama ile de okunmuştur. NGS analizi sonucu heterozigot ya da homozigot olarak saptanmış olan mutasyonların sayıları Tablo 3'te verilmiştir. Öte yandan, 8 adet bireyde ise gerçek zamanlı PZR ile herhangi bir mutasyon saptanmamış iken NGS analizi ile 1'er adet heterozigot mutasyon taşıdıkları saptanmıştır. Ayrıca, 1 olguda ise PZR ile gözlenen E148Q heterozigot mutasyonu NGS analizi ile saptanmamıştır. NGS analizi tüm gen dizileme verilerini içerdiği için belirtilen 5 mutasyon dışında farklı mutasyonların varlığı da tespit edebilmektedir. NGS analizi sonucunda 1 hastada E148Q/M694V/P369S üçlü heterozigot mutasyonu saptanmıştır. NGS analizi ile saptanan yeni mutasyonlar arasında en sık gözlenen değişim R202Q varyantıdır.

**Tablo 1.** Saptanan mutasyon/polimorfizm'ler hakkında detaylı moleküler ve klinik sınıflandırmaya dair bilgiler

Varyant	Ekzonik Lokasyon	Nükleotid Değişimi	Protein Değişimi	ACMG Sınıflama
M694V	10	c.2080A>G	p.Met694Val	Patojenik
V726A	10	c.2177T>C	p.Val726Ala)	Patojenik
M680I	10	c.2040G>A	p.Met680Ile	Patojenik
R761H	10	c.2282G>A	p.Arg761His	Patojenik
A744S	10	c.2230G>T	p.Ala744Ser	Patojenik
K695R	10	c.2084A>G	p.Lys695Arg	Klinik önemi belirsiz
K712Q	10	c.2134A>C	p.Lys712Gln	Klinik önemi belirsiz
I591T	9	c.1772T>C	p.Ile591Thr	Klinik önemi belirsiz
S503C	5	c.1508C>G	p.Ser503Cys	Potansiyel Patojenik
P369S	3	c.1105C>T	p.Pro369Ser	Klinik önemi belirsiz
R408Q	3	c.1223G>A	p.Arg408Gln	Klinik önemi belirsiz
G304R	2	c.910G>A	p.Gly304Arg	Potansiyel Patojenik
E148Q	2	c.442G>C	p.Glu148Gln	Klinik önemi belirsiz
L110P	2	c.329T>C	p.Leu110Pro	Klinik önemi belirsiz
S166L	2	c.497C>T	p.Ser166Leu	Klinik önemi belirsiz
S141I	2	c.422G>T	p.Ser141Ile	Klinik önemi belirsiz
Asn256Arg	2	c.761_764dup	p.Asn256Argfs*70	Klinik önemi belirsiz
R157L	2	c.470C>T	p.Pro157Leu	Klinik önemi belirsiz

**Tablo 2.** Gerçek zamanlı PZR ile analiz edilen varyantların frekansları

	M694V	E148Q	V726A	M680I	P369S
Heterozygous	13,49	13,20	1,76	3,52	1,47

R202Q varyantı 97 olguda heterozigot 10 olguda ise homozigot olarak gözlenmiştir. Bu varyant literatürde Türk toplumlarında M694V'den daha fazla sıklıkta gözlenen bir polimorfizm olduğu bilinmektedir. Diğer yeni gözlenen mutasyonlar arasında G304R varyantı ise 9 bireyde heterozigot olarak saptanmıştır. NGS analizi ile yeni saptanan varyantlar Tablo 3'de sayıları ile birlikte verilmiştir. Yöntemsel olarak kıyaslandığında NGS analizlerinin *MEFV* mutasyonlarını saptayabilme açısından istatistiksel anlamda daha güvenli bir test olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). S166L varyantı ise homozigot olarak sadece bir hastada gözlenmiş nadir varyantlar arasındadır. Ayrıca 2'şer olguda nadir gözlenen A744S ve K695R mutasyonları heterozigot olarak gözlenmiştir. Nadir olarak gözlenen varyantlar arasında yer alan S141I, E148Q ile bileşik heterozigot olarak bir hastada saptanmıştır. Bir olguda nadir gözlenen ASN256ARG varyantı, G304R varyantı ile bileşik heterozigot olduğu saptanmıştır. R202Q polimorfizmi gözlenen bireyleri dahil etmezsek NGS analizi sonucunda 37 bireyde PZR ile analiz edilen M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S varyantları dışında bir varyant tespit edilmiştir. Ayrıca, 7 olguda L100P/

E148Q varyantlarının ve 6 olguda ise G304R/M694V varyantlarının bileşik heterozigot olarak buldukları saptanmıştır.

### Tartışma

FMF, otozomal resesif geçişli bir sistemik hastalıktır ve Akdeniz ırklarında özel bir eğilim göstermektedir. *MEFV* geni alel sıklığında etnik farklılıklar olduğu literatürde bilinmektedir. Başta Orta Anadolu olmak üzere bazı coğrafi bölgelerde FMF sıklığının yaklaşık %1 olduğu ve genel yaygınlığının ise %0,1 civarında olduğu bildirilmektedir [10]. *MEFV* geninin FMF hastalığının patogenezinin sorumlu gen olması nedeniyle bu gen üzerinde gerçekleştirilen moleküler analizler tanı açısından oldukça önem arz etmektedir. Moleküler tanı yöntemlerinde gün geçtikçe hızla ilerleyen teknoloji sayesinde ortaya çıkan yenilikler hastalığın patogenezi ile ilişkili olabilecek yeni varyantların tanımlanmasına imkân sağlamaktadır. Moleküler tanı açısından kullanılan yöntemin özgüllüğü ve güvenilirliği elde edilecek verilerin kliniğe yansımalarının yorumlanmasında oldukça önemlidir. Bu nedenle, gerçekleştirilen çalışmada sık

**Tablo 3.** NGS analizi ile saptanan yeni varyantlar

	Homozygous	Heterozygous
<b>M694V</b>		45
<b>E148Q</b>	1	44
<b>V726A</b>		6
<b>M680I</b>		11
<b>P369S</b>		4
<b>K712Q</b>		4
<b>R202Q</b>	10	97
<b>L110P</b>		8
<b>E230K</b>		4
<b>S141I</b>		2
<b>I591T</b>		3
<b>S503C</b>		3
<b>R761H</b>		4
<b>G304R</b>		9
<b>ASN256ARG</b>		1
<b>S166L</b>	1	
<b>R157L</b>		2
<b>R408Q</b>		2
<b>K695R</b>		2
<b>A744S</b>		2

gözlenen 5 mutasyon açısından PZR yöntemi ile homozigot ya da bileşik heterozigotluk saptanmaması durumunda NGS analizi ile *MEFV* tüm gen analizini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen NGS ile PZR verileri kıyaslanması ile varyantları saptamada yöntemsel farklılıkları ortaya koymak amaçlanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla gerçekleştirdiğimiz çalışma bu hasta sayısında PZR ve NGS verilerini kıyaslayan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda, M694V varyantı %28,15 oranında, E148Q varyantı ise %18,5 oranında gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu veriler PZR yönteminde homozigot mutasyon taşıyan bireylerin dahil edilmediğini göz önünde bulundurulursa literatüre benzer niteliktedir. Literatürde farklı çalışmalarla FMF'in de dahil edildiği, sistemik otoinflamatuvar klinik bulgusu olan pek çok hasta üzerinde gerçekleştirilen *MEFV* geni mutasyon analizlerinde NGS analizinin hem yeni varyant tanımlama hem de daha yüksek moleküler tanı özellikleri nedeniyle daha nitelikli veriler sunduğunu rapor etmişlerdir [11, 12]. Ayrıca, Gümüş [13] 2018 yılında gerçekleştirdiği çalışmada NGS analizi ile PCR analizine kıyasla 3 kat daha fazla miktarda *MEFV* değişiminin saptandığını rapor etmiştir. Öte yandan bizim çalışmamızda 1 vaka gözlediğimiz E148Q/M694V/P369S üçlü bileşik heterozigotluk oldukça az sayıda gözlenen bileşik heterozigotluklardan biridir.

*MEFV* geninde gözlenen mutasyonların doz etkisine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, laboratuvarında öncelikle daha düşük maliyetli olan 5 varyantın (M694V, E148Q, V726A, M680I ve P369S) PZR analizi ile kontrol edilmesi ve homozigot ya da bileşik heterozigotluk gözlenmeyen hastalarda NGS analizine geçilmesi stratejisinin moleküler tanı ve hastalığın fenotipinin yorumlanması açısından faydalı olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmada elde ettiğimiz verilere göre 41 olguda PZR ile taranan varyantlar dışında yeni bir varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen bu varyantlar arasında oldukça nadir gözlenen L110P, E230K, K712Q, S141I, I591T, A744S, K695R ve S166L varyantları yer almaktadır. NGS ile saptanan varyantlar arasında en sık gözlenen R202Q değişiminin bazı yayınlarda Türk popülasyonu için bir polimorfizm olarak hastalığın kliniğinde bir rolü olduğu düşünülmese de Yiğit ve ark. [14] gerçekleştirdikleri çalışmada homozigot R202Q değişiminin klinik açıdan önemli olabileceğini göstermişlerdir. Öte yandan, NGS analizi ile saptanan L110P, E230K, K712Q, S141I, I591T, A744S, K695R ve S166L nadir varyantların klinik açıdan önemli olabileceği literatürde gerçekleştirilen çalışmalar ortaya koymuştur [15-20].

FMF tipik olarak otozomal resesif kalıtım yoluyla geçtiği bilinse de önemli sayıda hasta *MEFV* genlerinde 1 ( $\leq$ %30) veya herhangi

bir tanımlanabilir mutasyona ( $\leq$ %20) sahip olmadığı bilinmektedir [21]. Literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda özellikle yaygın olarak bilinen gözleendiği M694V, M680I, M694I, V726A ve E148Q değişimlerinin taranması nedeniyle moleküler tanının verimli olarak konmadığı belirtilmiştir. Bu durumun, gerçekleştirilen genetik testlerin çoğunda yaygın olarak gözlemlenen mutasyonları taramak için tasarlandığı ve bu nedenle nadir gözlenen mutasyonların saptanamamasına ve moleküler tanı da yetersizliklere neden olmaktadır. Bu nedenle literatürde son yıllarda NGS tabanlı genetik testlerin daha sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda çalışmada sık gözlenen 5 mutasyon açısından PZR yöntemi ile homozigot ya da bileşik heterozigotluk saptanamaması durumunda NGS analizi ile *MEFV* tüm gen analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen NGS analizi sonucunda 41 olguda PZR yönteminde saptanandan farklı bir varyant tanımlanmıştır. Tanımlanan yeni varyantların Türk popülasyonu üzerinde olası klinik etkinliklerini tanımlayabilmek için daha fazla hasta örneği üzerinde NGS analizi gerçekleştirmek gerekmektedir. Özetle, gerçekleştirdiğimiz NGS analizi sonucunda tanımlanan yeni mutasyonların, tanı ve hastalığın progresyonunu yorumlayabilme açısından katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

**Çıkar ilişkisi:** Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

## Kaynaklar

- Ben Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998;351:659-664. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)09408-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)09408-7)
- Ben Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the World. *Arthritis Rheum* 2009;61:1447-1453. <https://doi.org/10.1002/art.24458>
- Shoham NG, Centola M, Mansfield E, et al. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13501-13506. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135380100>
- de Jesus AA, Canna SW, Liu Y, Goldbach Mansky R. Molecular mechanisms in genetically defined autoinflammatory diseases: disorders of amplified danger signaling. *Annu Rev Immunol* 2015;33:823-874. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112227>
- Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I, et al. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:741-745. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket400>
- Fietta P. Autoinflammatory diseases: the hereditary periodic fever syndromes. *Acta Biomed* 2004;75:92-99.
- 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;326:1509-1513. <https://doi.org/10.1056/NEJM199206043262301>
- Sarı İ, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: an updated review. *Eur J Rheumatol* 2014;1:21-33. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2014.006>
- Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N, et al. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2015;74:635-641. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206844>
- Kisacik B, Yildirim B, Tasliyurt T, et al. Increased frequency of familial Mediterranean fever in northern Turkey: a population-based study. *Rheumatol Int* 2009;29:1307-1309. <https://doi.org/10.1007/s00296-009-0849-z>
- Bozgeyik E, Mercan R, Arslan A, Tozkir H. Next-generation screening of a panel of genes associated with periodic fever syndromes in patients with Familial Mediterranean Fever and their clinical characteristics. *Genomics* 2020;112:2755-2762. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.03.012>
- Düzkalte Teker N, Öz Ö. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarında *MEFV* geninin NGS ile analizi: tek merkez deneyimi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2020;17:454-459. <https://doi.org/10.35440/hutfd.826687>
- Gumus E. The frequency of *MEFV* gene mutations and genotypes in Sanliurfa province, south-eastern region of Turkey, after the Syrian civil war by using next generation sequencing and report of a novel exon 4 mutation (I423T). *J Clin Med* 2018;7:105. <https://doi.org/10.3390/jcm7050105>
- Yigit S, Karakus N, Tasliyurt T, Kaya SU, Bozkurt N, Kisacik B. Significance of *MEFV* gene R202Q polymorphism in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Gene* 2012;506:43-45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.074>
- Endo Y, Koga T, Hara K, et al. The possession of exon 2 or exon 3 variants in the *MEFV* gene promotes inflammasome activation in Japanese patients with familial Mediterranean fever with a heterozygous exon 10 mutation. *Clin Exp Rheumatol* 2020;127:49-52.
- Fisher BAC, Lachmann HJ, Rowczenio D, Goodman HJB, Bhalara S, Hawkins PN. Colchicine responsive periodic fever syndrome associated with pyrin I591T. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1384-1385. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.030379>

17. Twig G, Livneh A, Vivante A, et al. Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Ann Rheum Dis* 2014;73:704-709. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202932>
18. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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;17:405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
19. Cekin N, Akyurek ME, Pinarbasi E, Ozen F. *MEFV* mutations and their relation to major clinical symptoms of Familial Mediterranean Fever. *Gene* 2017;626:9-13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.05.013>
20. Soylemezoglu O, Kandur Y, Duzova A, et al. Familial Mediterranean fever with a single *MEFV* mutation: comparison of rare and common mutations in a Turkish paediatric cohort. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33:152-155.
21. Marek Yagel D, Berkun Y, Padeh S, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009;60:1862-1866. <https://doi.org/10.1002/art.24570>

**Etik kurul onayı:** Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 19.01.2021 tarih ve 02 sayılı kurul kararı ile onay alınmıştır (E-60116787-020-9706).

#### **Yazarların makaleye olan katkıları**

O.T. çalışmanın ana fikrini ve hipotezini kurgulamıştır. T.D., N.K., A.D. ve H.A. teoriyi geliştirmiş, gereç ve yöntem bölümünü düzenlemişlerdir. Sonuçlar kısmındaki verilerin değerlendirmesini O.T., S.T. ve P.E.T. yapmışlardır. Makalenin tartışma bölümü O.T. tarafından yazılmış, P.E.T. ve S.T. gözden geçirip gerekli düzeltmeleri yapmış ve onaylamışlardır. Ayrıca tüm yazarlar çalışmanın tamamını tartışmış ve son halini onaylamıştır.