

## Οικογενής μεσογειακός πυρετός Μοριακή ανάλυση

Α. Απέσσου,<sup>1</sup> Μ. Μιχαλάτος,<sup>1</sup> Ι. Μπελογιάννη,<sup>1</sup>  
Θ. Ροκκάς,<sup>2</sup> Π. Φιλαλήθης,<sup>3</sup> Ε. Γράψας,<sup>3</sup>  
Γ. Νασσιούλας<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ερευνητικό Κέντρο Μοριακής Βιολογίας, Νοσοκομείο  
«Υγεία»-«Αντώνης Παπαγιάννης», Αθήνα

<sup>2</sup>Γαστρεντερολογική Κλινική, Νοσοκομείο «Ερρίκος  
Ντυνάν», Αθήνα

<sup>3</sup>Α' Παθολογική Κλινική, ΔΘΚΑ «Υγεία», Αθήνα

### Familial mediterranean fever: Molecular analysis

*Abstract at the end of the article*

**Λέξεις ευρετηρίου:** Αλληλούχηση, Μεταλλάξεις,  
Οικογενής μεσογειακός πυρετός, PCR

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (Familial Mediterranean Fever, FMF) είναι κλασικά μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος, ενώ έχουν περιγραφεί μερικές περιπτώσεις επικρατητικής κληρονομικότητας.<sup>1-3</sup> Η νόσος εμφανίζεται κυρίως στους πληθυσμούς της Ανατολικής Μεσογείου και ειδικότερα σε Αρμένιους, Άραβες, Εβραίους και Τούρκους. Η αναλογία των φορέων σε αυτούς τους πληθυσμούς φθάνει έως και 1:5.<sup>4</sup> Τα τελευταία χρόνια η νόσος FMF παρατηρήθηκε και σε άλλους λαούς, όπως Ιταλούς, Ισπανούς και Βρετανούς.<sup>5</sup>

Στους περισσότερους ασθενείς η νόσος εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία, στο 60% πριν από την ηλικία των 10 ετών και στο 90% πριν τα 20.<sup>6</sup> Η κλινική εικόνα ποικίλλει, αλλά γενικά χαρακτηρίζεται από έντονα, αυτοϊάσιμα και επανεμφανιζόμενα επεισόδια πυρετού, σε συνδυασμό με περιτονίτιδα, πλευρίτιδα και αρθρίτιδα. Η πλέον σοβαρή επιπλοκή είναι η αμυλοείδωση, ειδικότερα στους νεφρούς, η οποία επιδεινώνεται με το χρόνο και μπορεί να εξελιχθεί σε μη αναστρέψιμη νεφρική ανεπάρκεια. Χορήγηση κολχικίνης καθόλη τη διάρκεια της ζωής σε νοσούντα άτομα μειώνει τον αριθμό και τη σοβαρότητα

των επεισοδίων στο 95% των ασθενών, ενώ φαίνεται να προλαμβάνει την ανάπτυξη της αμυλοείδωσης.<sup>7,8</sup>

Μέχρι σήμερα, λόγω έλλειψης χαρακτηριστικών συμπτωμάτων και βιοχημικών ανωμαλιών, η διάγνωση της νόσου είναι δυνατή μόνο αναδρομικά βάσει αποκλεισμού άλλων παθήσεων και βασίζεται μόνο σε κλινικά κριτήρια.<sup>9</sup> Για το λόγο αυτό, μοριακή επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης είναι σημαντική για τους εξής λόγους: (α) Η συμπτωματολογία της νόσου μπορεί να παραπέμψει σε άλλη διάγνωση, όπως οξεία περιτονίτιδα, σκωληκοειδίτιδα, χολοκυστίτιδα ή αρθρίτιδα, οδηγώντας σε περιττές χειρουργικές επεμβάσεις.<sup>1</sup> (β) Όπως προαναφέρθηκε, η χορήγηση κολχικίνης αποτελεί αποτελεσματική θεραπεία στην πλειονότητα των ασθενών. (γ) Σε σπάνιες περιπτώσεις, το πρώτο και μοναδικό σύμπτωμα είναι η αμυλοείδωση, υποδηλώνοντας τη δυσκολία στην κλινική διάγνωση της νόσου και την ανάγκη για προσυμπτωματική διάγνωση σε οικογένειες με FMF.

Το γονίδιο “Marenostrin-encoding fever gene” (*MEFV*), που αποτελείται από 10 εξώνια, χαρτογραφήθηκε το 1997 στο χρωμόσωμα 16p13.3.<sup>10,11</sup> Εκφράζεται αποκλειστικά σε πολυμορφοπύρνα λευκά αιμοσφαίρια και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, που ονομάστηκε *ryrin* από το Ελληνικό «πυρετός»<sup>10</sup> ή *marenostrin* από τη λατινική ονομασία της Μεσογείου.<sup>11</sup> Η πρωτεΐνη αποτελείται από 781 αμινοξέα και έχει χαρακτηριστικά μεταγραφικού παράγοντα, ενώ η ακριβής λειτουργία της παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη.

Στα 4 χρόνια από την ανακάλυψη του γονιδίου έχουν χαρακτηριστεί 29 μεταλλάξεις, στα εξώνια 1, 2, 3, 5, 9 και 10 του *MEFV*. Οι περισσότερες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα εξώνια 2 και 10.<sup>12</sup> Στο εξώνιο 10 υπάρχουν δύο «θερμά σημεία» μεταλλάξεων στα κωδικόνια 680 και 694, ενώ και η πλειονότητα των υπολοίπων μεταλλάξεων (18/29) έχουν βρεθεί στο ίδιο εξώνιο. Το εξώνιο 10 φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης, καθώς οι μεταλλάξεις του συνδέονται με βαρύτερο φαινότυπο της νόσου. Στο σύνολο των μεταλλάξεων του γονιδίου, 5 από αυτές, οι V726A, M694V, M694I, M680I (στο εξώνιο 10) και E148Q (στο εξώνιο 2), είναι ευρέως διαδεδομένες και βρίσκονται στο 74% των FMF χρωμοσωμάτων. Από αυτές, η πιο κοινή και πλέον σοβαρή είναι η M694V, ενώ η E148Q είναι η δεύτερη συχνότερη και η πιο ήπια μετάλλαξη. Οι υπό-

λοιπες 24 μεταλλάξεις παρατηρούνται σε λιγότερα από το 1% των FMF χρωμοσωμάτων. Σε μικρό δείγμα του Ελληνικού πληθυσμού έχουν βρεθεί μόνο 4 μεταλλάξεις: M694V (25%), E148Q (13%), V726A (13%) και M694I (6%).<sup>5</sup>

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *MEFV* σε 5 Έλληνες ασθενείς με φαινότυπο συμβατό με τη νόσο FMF.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Περιγραφή των ασθενών

**Ασθενής 1:** Γυναίκα 34 ετών. Προ τριετίας ανέφερε άλγος επιγαστρίου-δεξιού λαγονίου βόθρου, που διήρκεσε επί δίμηνο, ενώ υπήρχε ιστορικό δυσμηνόρροιας, χολοκυστεκτομής και σκωληκοειδεκτομής. Έγινε λαπαροσκοπική καυτηρίαση ενδομητριοειδών κύστεων ωθήκης άμφω και έναρξη αγωγής με Arvecap. Σε επανεισαγωγή της για επιγαστραλγία-εμπύρετο βρέθηκε τρανσαμινασαιμία. Μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP): πεταλοειδής νεφρός. Γαστροσκόπηση: γαστρίτιδα άντρου. Η ασθενής δεν δέχθηκε θεραπεία με κολχικίνη.

**Ασθενής 2:** Άνδρας 35 ετών. Από εφηβικής ηλικίας παρουσίαζε κρίσεις (διάρκειες 24-72 ωρών) πυρετού, εντονότατο κοιλιακό άλγος και αρθραλγιών. Για τα συμπτώματα αυτά υποβλήθηκε επανειλημμένως σε ενδελχική απεικονιστικό έλεγχο (αξονική τομογραφία άνω-κάτω κοιλίας) και ενδοσκοπήσεις ανώτερου και κατώτερου πεπτικού, που δεν ανέδειξαν ιδιαίτερη παθολογία. Έλαβε και κολχικίνη, με αποτέλεσμα την αραίωση των κρίσεων.

**Ασθενής 3:** Άνδρας 32 ετών. Από ετών ανέφερε εντονότατο κοιλιακό άλγος, διάρκειας 24-48 ωρών. Σε μερικά από τα επεισόδια συνηπύχων πυρετός και αρθραλγίες. Ενδελχής απεικονιστικός έλεγχος κοιλίας και ενδοσκοπικός έλεγχος ανώτερου και κατώτερου πεπτικού δεν ανέδειξαν ιδιαίτερα ευρήματα. Η χορήγηση κολχικίνης χαρακτηρίστηκε από επιτυχία, καθόσον επέφερε σχετική αραίωση των κρίσεων.

**Ασθενής 4:** Γυναίκα 23 ετών, με καταγωγή από το Λίβανο. Από διετίας ανέφερε κρίσεις με επανειλημμένα επεισόδια πυρετού και τουλάχιστον 4 επεισόδια οξείας αμυγδαλίτιδας, όλοι πάντα σε συνδυασμό με τις κρίσεις πυρετού. Σε πολλαπλές νοσηλείες με εκτεταμένους ελέγχους δεν τέθηκε διάγνωση και μόνο εξ αποκλεισμού πιθανολογήθηκε η παρουσία άτυπου μεσογειακού πυρετού. Από τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο είχαν βρεθεί αναιμία, ηπατοσπληνομεγαλία, αυξημένη ΤΚΕ και πυουρία. Ιολογικός έλεγχος, PCR για *Mycobacterium tuberculosis* και σπινθηρογράφημα οστών: αρνητικά. Εξήλθε σε δεκατική πυρετική κίνηση. Διάγνωση: αδιευκρίνιστο παρατεινόμονο εμπύρετο.

**Ασθενής 5:** Άνδρας 52 ετών, γεννημένος στην Αίγυπτο. Εισήλθε στο νοσοκομείο με οξύ κοιλιακό άλγος, αδυναμία

βάδισης και καταβολή δυνάμεων. Επιπλέον, εμφάνιζε οξεία διαβρωτική γαστρίτιδα και οξεία κολίτιδα. Μοριακή ανάλυση για οικογενή αμυλοειδίδη πολυνευροπάθεια με έλεγχο του γονιδίου TTR: αρνητική.

### Απομόνωση DNA

Γονιδωματικό DNA απομονώθηκε από ολικό περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας το σύστημα Genomix kit (Talent, srl, Italy).

**Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).** Τα εξώνια 1 και 2, 3 και 4, 5 και 6 και 10 πολλαπλασιάστηκαν χρησιμοποιώντας δημοσιευμένους εκκινητές<sup>12</sup> (πίν. 1). Αντιδράσεις των 50 μL θερμάνθηκαν σε PTC-200 (MJ Research, USA) θερμοκυκλοποιή για 5 min στους 95 °C. Ακολούθησαν 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95 °C για 40 sec, πρόσδεση εκκινητών στην κατάλληλη θερμοκρασία (πίν. 1) για 30 sec και επιμήκυνση στους 72 °C για 30 sec, ακολουθούμενα από τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 min. Οι αντιδράσεις έγιναν σε 50 μL που περιείχαν 20 mM tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM από κάθε dNTP, 1,5 U Taq πολυμεράση (Invitrogen, The Netherlands) και 10 pmol από κάθε εκκινητή.

### Καθορισμός της αλληλουχίας του DNA

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα Concert Rapid PCR purification or gel extraction system kits (Gibco BRL, USA). Αυτόματη αλληλούχηση και των δύο αλύσεων έγινε με το σύστημα Big-Dye DyeDeoxy terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA), χρησιμοποιώντας εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ή εσωτερικούς εκκινητές.<sup>12</sup> Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο φθορίζοντα αναλυτή ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Οι αλληλουχίες στοιχίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Sequencher® PC software (GeneCodes Inc, USA) με φυσιολογικές αλληλουχίες από την Genbank (AF111163) και εξετάστηκαν για μεταλλάξεις.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΟ

Έγινε καθορισμός της αλληλουχίας του DNA σε 5 ασθενείς με φαινότυπο της νόσου. Στους ασθενείς 1 και 4 μελετήθηκαν τα εξώνια 2, 3, 5 και 10 του γονιδίου, καλύπτοντας έτσι το 93% (27/29) των δημοσιευμένων μεταλλάξεων.<sup>5</sup> Στους ασθενείς 2 και 3 μελετήθηκαν τα εξώνια 2, 3 και 10 (26/29 των δημοσιευμένων μεταλλάξεων),<sup>5</sup> ενώ στον ασθενή 5 μελετήθηκαν μόνο τα εξώνια 2 και 10 (24/29 των δημοσιευμένων μεταλλάξεων). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τους 5 ασθενείς συνοψίζονται στον πίνακα 1.

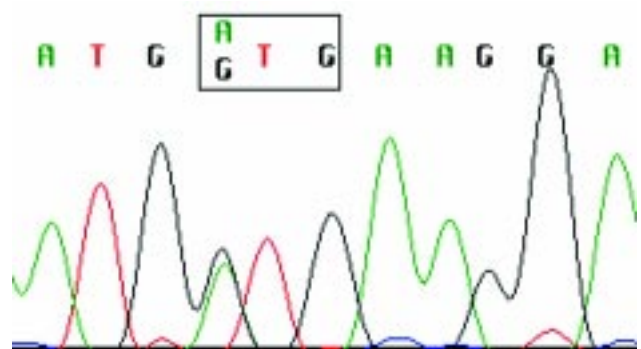
**Πίνακας 1.** Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί με τον καθορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου *MEFV*.

Εξόνιο	Εκκινητές (PCR)*	Θερμοκρασία αναδιάταξης (°C)	Μέγεθος (bp)	Κωδικόνιο	Πολυμορφισμοί	Μεταλλάξεις	Ομόζυγοι	Ετερόζυγοι	Δείγματα που έχουν αναλυθεί
<b>2</b>	2AF: GTGGGACAGCTTCATCATTTTG	TD**	102		T2835C		2	2	7***
	2BR: GTTTATAGAGATGGCGGGG	64/59	138		A2943G	E148Q (G2981C)	2	2	7***
<b>3</b>	3.4F: GCACATCTCAGGCAAGGG	TD	1049		C3024A		0	2	7***
	3.4R: CACAGCAGAATCTCGGGG	58/55	165		G3134A		3	2	7***
	5.6 F: CCACCTTATCCACCTCC	TD	202		A3458T (IVS2)		4	1	7***
	5.6R: GCCCTTCTCCCTATCAAATCC	56/55	314		C7842T		4	1	5
<b>5</b>	10F: ATTGGCGTCAGGCACAT	TD	979		G10412A		1	3	4
	10R: GGAGCACCTGAGAGTGCCACCACC	68/54	474		A10418G		1	1	4
			510		T10520C		1	1	4
<b>10</b>		TD	1011			M694V (A14184G)	0	1	5

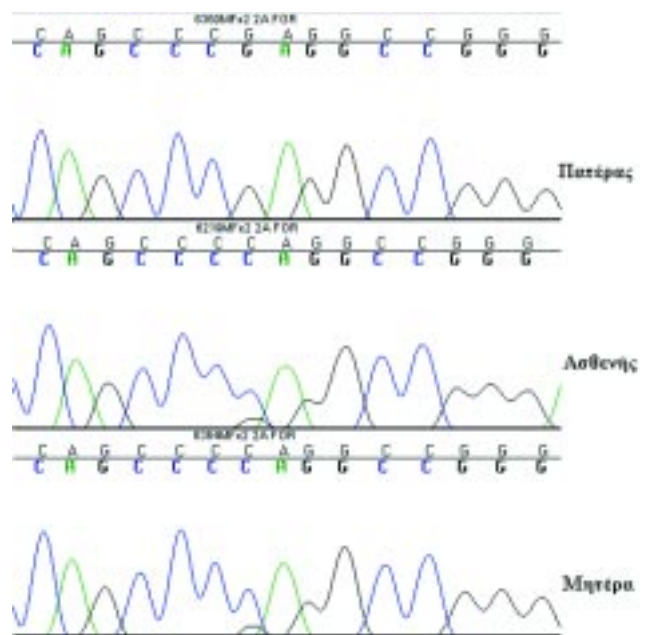
\*Εκκινητές από Beuot et al. 1998.<sup>22</sup> \*\*Touchdown PCR. \*\*\*Οι ασθενείς σε αυτό το εξόνιο είναι 7, επειδή αναλύθηκαν και οι γονείς του ασθενούς με τη μετάλλαξη

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 1, ανιχνεύθηκαν αρκετοί από τους δημοσιευμένους πολυμορφισμούς,<sup>1</sup> καθώς και ένας νέος πολυμορφισμός, ο A3458T (IVS2), ο οποίος όμως βρίσκεται μέσα στο ιντρόνιο 2, αποκλείοντας έτσι την εμπλοκή του στην κλινική εικόνα των ασθενών.

Στον ασθενή 3 βρέθηκε η πιο κοινή μετάλλαξη, M694V, σε ετερόζυγη κατάσταση (εικ. 1). Στην ασθενή 4 ανιχνεύθηκε η δεύτερη πιο κοινή μετάλλαξη, E148Q (εικ. 2). Συνήθως η νόσος κληρονομείται ως υπολειπόμενη. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις στη βιβλιογραφία όπου παρατηρήθηκε επικρατική κληρονομικότητα<sup>1-3</sup> λόγω της



**Εικόνα 1.** Χρωματογράφημα της περιοχής του εξωνίου 10 του γονιδίου *MEFV*. Εντοπίζεται η μετάλλαξη M694V (διπλή κορυφή) σε ετερόζυγη κατάσταση. Στο πλαίσιο φαίνεται η μετάλλαξη του κωδικονίου ATG (μεθειονίνη) σε GTG (βαλίνη).



**Εικόνα 2.** Χρωματογράφημα της περιοχής του εξωνίου 2 του γονιδίου *MEFV*. Εντοπίζεται η μετάλλαξη E148Q (βέλος) στην ετερόζυγη ασθενή και τη μητέρα της, από την οποία την κληρονόμησε.

εξαιρετικής σοβαρότητας της μετάλλαξης.<sup>3</sup> Αυτή θα μπορούσε να είναι η εξήγηση για την κλινική εικόνα του ασθενούς 3, με τη M694V μετάλλαξη, η οποία θεωρείται ως η πλέον σοβαρή μετάλλαξη. Αντίθετα, στην περίπτωση της ασθενούς 4, με τη μετάλλαξη E148Q, η μη ταυτοποίηση και δεύτερης μετάλλαξης υποδηλώνει ότι το εύρημα αυτό δεν σχετίζεται με τη νόσο, αφού η συγκεκριμένη μετάλλαξη θεωρείται ως η ηπιότερη. Μια άλλη πιθανότητα είναι οι ασθενείς να πάσχουν από άλλη νόσο με φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν του FMF (FMF-like diseases).<sup>7</sup> Για το λόγο αυτόν, έχει αρχίσει η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *tumour necrosis factor receptor (TNFRSF1A)*, στο οποίο μεταλλάξεις προκαλούν περιοδικό σύνδρομο με φαινότυπο παρόμοιο με τον αντίστοιχο του FMF.<sup>13,14</sup>

Από την παρούσα μελέτη γίνεται αντιληπτό ότι η κλινική εικόνα του FMF δεν είναι πλήρως ταυτοποιημένη, με αποτέλεσμα να απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

## ABSTRACT

### Familial mediterranean fever: Molecular analysis

A. APESSOS,<sup>1</sup> M. MIHALATOS,<sup>1</sup> I. BELOGIANNI,<sup>1</sup>  
T. ROKKAS,<sup>2</sup> P. FILALITHIS,<sup>3</sup> E. GRAPSAS,<sup>3</sup>  
G. NASIOULAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology Research Center "Hygeia"-  
"Antonis Papayiannis", Athens, <sup>2</sup>Gastroenterology  
Clinic, "Errikos Dinan" Hospital, Athens, <sup>3</sup>1st Pa-  
thology Clinic, DTCA "Hygeia", Athens, Greece  
*Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(1):37-41*

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive genetic disorder, although rare cases of autosomal dominant inheritance have been described. The phenotype is heterogeneous but generally characterized by short recurrent self-resolving attacks of fever and serositis. It is particularly common in populations of Eastern Mediterranean origin. The gene responsible for the syndrome was cloned in 1997 on chromosome 16p13.3 and named *Marenostrinen-coding fever gene (MEFV)*. To date, 29 mutations have been identified, 5 of which are widely distributed in affected populations and are found in 74% of all FMF chromosomes. This paper describes analysis of the *MEFV* gene in five Greek patients suspected of suffering from FMF. Eight of the published polymorphisms were identified, in addition to

a novel A>T substitution located in intron 1. The two most common mutations, M694 and E148Q, were identified in two patients each of which was heterozygous for one of the mutations. A second mutation was not identified in either of the patients. This could be an example of a rare dominant form of FMF. Alternatively the FMF-compatible phenotype in these patients was caused by other factors.

**Key words:** Familial mediterranean fever, Mutations, PCR, Sequencing

## Βιβλιογραφία

1. CAZENEUVE C, SARKISIAN T, PECHEUX C, DERVICHIAN M, NEDELEC B, REINERT P ET AL. *MEFV*-gene analysis in Armenian patients with familial mediterranean fever: Diagnostic value and unfavorable prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1999, 65:88-97
2. AKSENTIJEVICH I, TOROSYAN Y, SAMUELS J, CENTOLA M, PRAS E, CHAE JJ. Mutation and haplotype studies of familial mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 1999, 64:949-962
3. BOOTH DR, GILLMORE JD, LACHMANN HJ, BOOTH SE, BYBEE A, SOYTURK M ET AL. The genetic basis of autosomal dominant familial mediterranean fever. *Q J Med* 2000, 93:217-221
4. CENTOLA M, AKSENTIJEVICH I, KARSTNER DL. The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of diseases. *Hum Mol Genet* 1998, 7:1581-1588
5. TOUITOU I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001, 9:473-483
6. BRIK R, SHINAWI M, KEPTEN I, BERANT M, GERSHONI-BARUCH R. Familial mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics* 1999, 103:e70
7. ZEMER D, PRAS M, SOHAR E, MODAN M, CABILI S, GAFNI J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial mediterranean fever. *N Engl J Med* 1986, 314:1001-1005
8. BABIOR BM. Familial mediterranean fever and the control of inflammation. *Curr Opin Hematol* 1998, 4:1-2
9. OMIM <http://www.nlm.nih.gov/omim/> cat no# 249100
10. THE INTERNATIONAL FMF CONSORTIUM. Ancient mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial mediterranean fever (FMF). *Cell* 1997, 90:797-807
11. THE FRENCH FMF CONSORTIUM. A candidate gene for familial mediterranean fever. *Nat Genet* 1997, 17:25-31
12. BERNOT A, DA SILVA C, PETIT JL, CRUAUD C, CALOUSTIAN C, CASTE V ET AL. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998, 7:1317-1325

13. GALON J, AKSENTIJEVICH I, McDERMOTT MF, O'SHEA JJ, KASTNER DL. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol* 2000, 12:479–486
14. DODE C, ANDRE M, BIENVENU T, HAUSFATER P, PECHEUX C, BIENVENU J ET AL. The enlarging clinical, and population spectrum of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum* 2002, 46:2182–2188

*Corresponding author:*

G. Nasioulas, Molecular Biology Research Center "Hygeia"-"Antonios Papayiannis", 4 Kifissias Ave. & Er. Stavrou street, GR-151 23 Maroussi, Greece  
e-mail: g.nasioul@hygeia.gr