

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DUCHENNE/BECKER KAS DİSTROFİSİ HASTALARINDA
MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
DELESYON ANALİZİ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

PERVİN DİNÇER

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. ŞÜKRÜYE AYTER

ANKARA

1994

DOKTORA TEZ SAVUNMA JÜRİSİ



PROF. DR. ŞÜKRÜYE AYTER

DANIŞMAN ÜYE



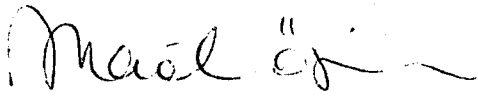
PROF. DR. IŞIK BÖKESOY

ÜYE



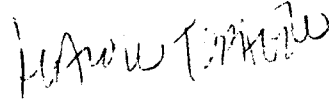
PROF. DR. AHMET KART

ÜYE



DOÇ. DR. MERAL ÖZGÜÇ

ÜYE



DOÇ. DR. HALUK TOPALOĞLU

ÜYE

ÖZET

DUCHENNE/BECKER KAS DİSTROFİSİ HASTALARINDA MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE DELESYON ANALİZİ

Pervin DİNÇER

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat 1994

Bu çalışmada klinik olarak DMD tanısı alan 56 hasta, BMD tanısı alan 7 hasta ve intermediyer kas distrofisi tanısı alan bir hasta, distrofin genindeki delesyonlar yönünden incelenmiştir.

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılarak akrabalık ilişkisi olmayan 33 DMD, 3 BMD ve bir intermediyer kas distrofisi hastasında hastalığın delesyondan kaynaklandığı saptanmıştır. Genel delesyon oranı %58 olarak bulunmuştur. 37 hastanın 25'inde delesyonlar genin merkezinde (43-52. ekzonlar), 12'sinde genin 5' ucuna yakın bölgede (4-19. ekzonlar) toplanmıştır.

Delesyon görülen ekzonlar içerisinde 48. ekzonun en çok delesyona uğrayan, 44. ekzonun ise en az delesyona uğrayan ekzon olduğu tespit edilmiştir. Hastalarda delesyon görülen ekzon sayısı incelendiğinde, toplumumuzda tek ekzon delesyonlarının sık görüldüğü (%43) saptanmıştır.

Genin merkezinde bulunan 42, 46, 49 ve 53. ekzonlara ait primerlerin kullanılmasıyla 21 hastada delesyonların başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonu saptanmıştır. Toplam 25 adet 5' kırılma noktasının ve 22 adet 3' kırılma noktasının lokalize olduğu intronlar incelendiğinde, genin merkezindeki delesyon bölgelerinde, 5' kırılma noktalarının %32'si 44. intronda, 3' kırılma noktalarının %37'si 50 ve 52. intronlarda toplanmıştır.

19 DMD hastasında mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini değiştiren "out of frame" delesyonlar, 2 BMD hastasında ise mRNA'nın okuma çerçevesini değiştirmeyen "in-frame" delesyonlar oluşmuştur. 21 hastada delesyonun tipi ile klinik fenotip arasında gösterilen korelasyon, "reading frame" teorisi ile uyumlu bulunmuştur.

ABSTRACT

DELETION ANALYSIS OF DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY PATIENTS BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

Pervin DİNÇER
Ph D Thesis, Medical Biology Department
Şubat 1994

A total of 56 Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients, 7 Becker muscular dystrophy (BMD) patients and 1 Intermediate muscular dystrophy patient were analyzed by multiplex amplification of selected exons for intragenic deletions of the dystrophin gene. Deletions were observed in 58% (37 cases) of the patients. The majority of these deletions (25/37) were found to be localized within the central region of the gene (Exons 43-52). The remaining deletions (12/37) were mapped to proximal hot spot (Exons 4-19).

It was found that, exon 48 was most frequently affected, while exon 44 was least frequently affected. The number of deleted exons is variable, but single exon deletions are more frequent (43%) than larger deletions in our population.

Using the primers specific to 42, 46, 49 and 53. exons which are located in the central region of the gene, starting and ending breakpoint regions of deletions were detected in 21 patients. When 25 starting breakpoint regions and 22 ending breakpoint regions were analyzed, intron 44 was involved mostly as a starting breakpoint region whereas intron 50 and intron 52 appeared to be involved as the ending breakpoint region.

All of the deletions described for BMD patients were in-frame deletions, and all DMD patients had deletions leading to a frameshift of the dystrophin transcript. Therefore, the conservation of the dystrophin and the severity of the clinical phenotype were concordant in 100% of the DMD/BMD deletions documented in this work.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.DUCHENNE KAS DİSTROFİSİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	3
2.2.DMD GENİNİN LOKALİZASYONU	5
2.3.DMD GENİNİN İZOLASYONU.....	6
2.4.DMD GENİNDE DELESYON ANALİZİ ÇALIŞMALARI.....	10
2.4.1.Southern Hibridizasyon Tekniği	10
2.4.2.Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği	10
2.4.3.Multipleks PCR Tekniği İle Southern Hibridizasyon Tekniğinin Karşılaştırılması	12
2.4.4.Delesyon Taşıyıcılarının Saptanması	13
2.4.5.Delesyonların Oluş Mekanizmaları	14

Sayfa No

2.5.DMD GENİNDE LİNKAJ ANALİZİ ÇALIŞMALARI.....	15
2.6.DİSTROFİN.....	17
2.7."READING FRAME" TEORİSİ.....	19
2.8.GEN TEDAVİSİ ÇALIŞMALARI.....	21
2.8.1.Miyoblast Transferi.....	21
2.8.2.Gen Tedavisi.....	21
3.MATERYAL VE METOD.....	22
3.1.MATERYAL.....	22
3.1.1.DNA İzolasyonu	22
3.1.2.Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	23
3.1.3.Jel Elektrofezi	24
3.2.METOD	24
3.2.1.DNA İzolasyonu	24
3.2.2.İzole Edilen DNA'nın Miktarının ve Saflığının Saptanması.....	25
3.2.3.Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
3.2.4.Jel Elektroforezi.....	27
4.BULGULAR	28
5.TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR.....	46
EK.....	55

KISALTMALAR

DMD	Duchenne Muscular Dystrophy (Duchenne Kas Distrofisi)
BMD	Becker Muscular Dystrophy (Becker Kas Distrofisi)
Mb	Megabase (Megabaz)
kb	Kilobase (Kilobaz)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi)
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pb	Brain Promotor (Beyin Promotörü)
Pm	Muscle Promotor (Kas Promotörü)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (Tek Zincirli DNA'nın Yapı Poliformizmi)
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Ardarda Tekrarlanan Sekanslar)
SCARMD	Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy (DMD Benzeri Otozomal Resesif Kas Distrofisi)
mdx	X-linked Murine Muscular Dystrophy Mutation (Sıçangillerde Görülen Kas Distrofisi Mutasyonu)
YAC	Yeast Artificial Chromosome (Yapay Maya Kromozomu)
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acide (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)
STE	Sodium Tris EDTA (Sodyum Tris EDTA)
TE	Tris EDTA (Tris EDTA)
TAE	Tris Acetate EDTA (Tris Asetat EDTA)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Sodyum Dodesil Sülfat)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
dNTP	Deoxynucleotides (Deoksinükleotidler)
F	Forward (5'---)
R	Reverse (3'---)
bp (bç)	Base pair (Baz çifti)

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. X Kromozomuna Bağlı Resesif Kalıtım Gösteren Aile Ağacı	3
2.2. DMD Geninin İzolasyonu ve Distrofinin Tanımlanması	8
2.3. DMD Gen Haritası	9
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	11
2.5. Distrofin-Glikoprotein Kompleksinin Şematik Modeli	17
4.1. 9 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu	29
4.2. 5 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu	29
4.3. 47. Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.....	31
4.4.a. Delesyon Görülen 14 Ekzonun Hastalara Göre Dağılımının Histogram ile Gösterilmesi	32
4.4.b. Delesyon Görülen 14 Ekzonun Hastalara Göre % Dağılımının Gösterilmesi	32
4.5. 9 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyonu	33
4.6. 4 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyonu	33
4.7. 42.Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyon.....	34
4.8. 46. Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyonu.....	35

4.9.a. 49 ve 53. Ekzonların Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyonu	35
4.9.b. 49 ve 53. Ekzonların Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Amplifikasyonu	36
4.10. DMD Geninde Delesyon Görülen 37 Hastaya Ait Delesyon Bölgeleri.....	37
4.11. DMD Genindeki Delesyonların 5' Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İtronların Dağılımı.....	38
4.12. DMD Genindeki Delesyonların 3' Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İtronların Dağılımı.....	39
4.13. DMD Genindeki Delesyonların Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İtronların Dağılımı.....	39
4.14. DMD Genindeki Delesyon Bölgelerinde Ekzon Sayılarının Dağılımı.....	40

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. DMD Geninde Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gösterilen Markerlar	16
2.2. DMD Geninde "Out of Frame" ve "In-Frame" Delesyonların Dağılımı.....	20
4.1. 14 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu Sonucunda Distrofin Geninde Delesyon Görülen Ekzonların Hastalara Göre Dağılım	30
4.2. Delesyon Boyutu Bilinen 21 Hastada Klinik Fenotip-Genotip İlişkisi.....	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak DNA seviyesinde kalıtsal hastalıkların tanısının yapılabilmesi sonucunda, insan genomunun moleküler yapısı hakkındaki bilgilerimiz gittikçe artmaktadır.

Mendel kalıtımına göre geçiş gösteren X kromozomuna bağlı kalıtsal hastalıklardan biri olan Duchenne kas distrofisi (DMD), yeni doğan her 3500 erkek çocuğun birinde görülen ölümcül dejeneratif nöromusküler bir hastalıktır. Hastalığın daha hafif formu olan Becker kas distrofisi (BMD) ise her 30000 erkek çocuktan birinde görülmektedir¹. DMD hastalarında gende görülen mutasyonlar sonucunda non fonksiyonel bir polipeptid oluşurken, BMD hastalarında yarı fonksiyonel olan distrofin proteini sentezlenir².

Toplumdaki DMD insidansının çok yüksek olması ve henüz hastalığın tedavisinin mümkün olmaması, DMD geninin moleküler tekniklerle analizini gerektirmektedir. Bundan dolayı, hastaların %65'inde hastalığa neden olan delesyonların gösterilmesi, delesyon gösterilen hasta ailelerine %100 doğru bir genetik danışmanlık verilebilmesini ve prenatal tanı yapılabilmesini sağlar^{3,4}.

Çalışmamızın amacı, Türk DMD ve BMD hastalarında görülen delesyon sıklığının ve gen üzerindeki dağılımının, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile gösterilmesidir. Ayrıca, gen üzerinde en çok delesyon görülen ekzonların, delesyon görülen ekzon sayılarının ve delesyonların 5' ve 3' kırılma noktalarının lokalize olduğu intronların toplumumuzda gösterdiği farklılıkların belirlenmesi ve delesyon tipi ile klinik fenotip arasındaki ilişkinin gösterilmesi de amaçlanmış olup, çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

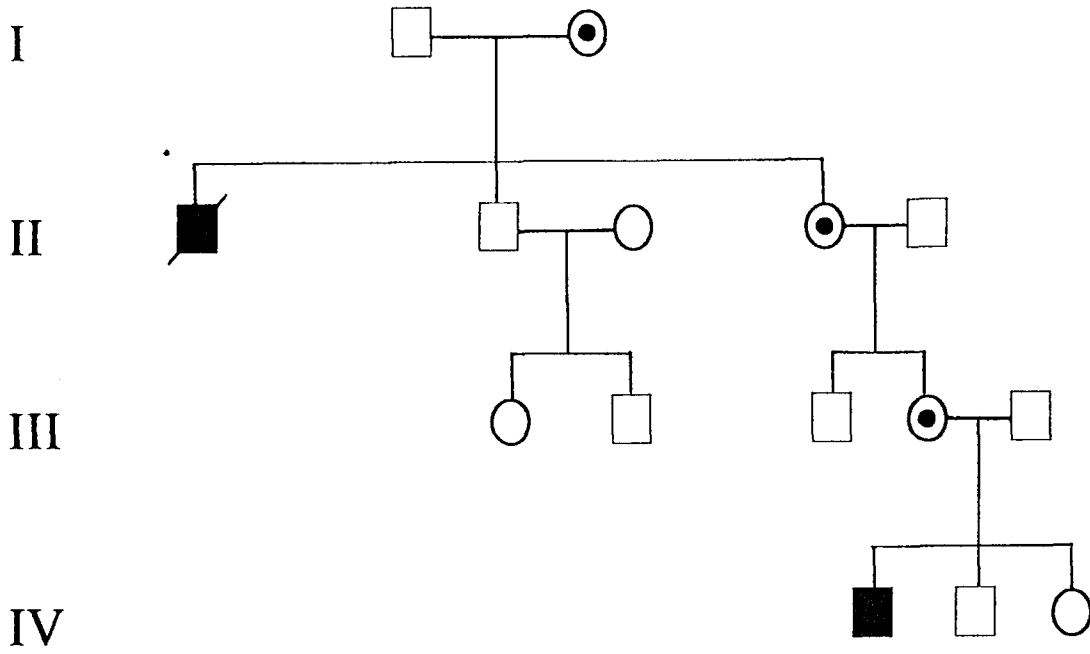
Son yıllarda kalıtsal hastalıkların tanısı için DNA'ya dayalı teknikler tercih edilmektedir. Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak yapılan insan genetiği çalışmalarıyla, bazı kalıtsal hastalıkların moleküler patolojilerinin belirlenmesi ve bunun sonucunda tanısının yapılmasında çok büyük aşamalar kaydedilmiştir.

Kalıtsal hastalıklar; Mendel kalıtımına göre geçiş gösteren hastalıklar, kromozomal hastalıklar ve multifaktoriyel hastalıklar olarak üç grupta toplanmaktadır. Mendel kalıtımına göre geçiş gösteren hastalıklar olarak sınıflandırılan otozomal dominant, otozomal resesif ve X'e bağlı hastalıklar, yeni doğan çocukların %1.25'inde görülmektedir⁵.

X kromozomu üzerinde taşınan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan hastalıklar, X'e bağlı hastalıklar olarak bilinmektedir. X'e bağlı hastalıklar tek bir gendeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır, fakat hastalarda aynı gen üzerinde farklı tip mutasyonlar görülebilir.

İki X kromozomu taşıyan dişi, X'e bağlı genlerin her iki alelini de içerir. Bir normal aleli ve bir mutant aleli taşıyan dişi heterozigot - taşıyıcıdır. Homozigot dişi her ikisi de normal veya her ikisi de mutant olan aleli taşır. Erkek, sadece tek bir X kromozomu taşıdığı için X üzerinde taşınan genler ekspres olarak bireyin fenotipinde belirleyici rol oynamaktadır.

X'e bağlı kalıtım gösteren hastalıkların karakteristik özelliği, mutasyonun babadan erkek çocuğa geçişinin kesinlikle olmaması ve babanın X kromozomunu sadece kız çocuklarına aktarmasıdır. Hastalığın taşıyıcısı olan asemptomatik dişilerin erkek çocuklarının yarısının hasta, kızlarının yarısının taşıyıcı olma olasılığı vardır (Şekil 2.1)^{6,7}. Ailedeki dişilerin taşıyıcılığının saptanması X'e bağlı hastalıklarda genetik danışmanlığın önemli bir kısmını oluşturmaktadır.



Şekil 2.1. X Kromozomuna Bağlı Resesif Kalıtım Gösteren Aile Ağacı.



Duchenne kas distrofisi, erkek çocuk doğumlarında 1/3500 olan insidansı ile en sık görülen X' e bağlı resesif geçiş gösteren kalıtsal hastalıklardan birisidir¹. Populasyonda, doğal seleksiyonla elimine edilen hastalık geni ile mutasyonla oluşan hastalık geni arasında bir denge olduğu için, DMD insidansı değişmemektedir. DMD hastalarının çoğunluğu 20 yaş civarında ölmektedir. Bundan dolayı üreme kat sayısı sıfırdır. Hastaların 1/3'ünde hastalık nedeni, yeni mutasyonlardır⁶.

2.1. DUCHENNE KAS DİSTROFİSİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Duchenne Kas Distrofisi ilerleyici kas hastalığı ve iskelet kası dejenerasyonu ile karakterizedir. Hastalığın ilk semptomları genellikle 3 yaş civarında gözlenir. Hasta çocukların bir kısmında motor gelişim geriliğine bağlı olarak 18. aya kadar yürümenin geciktiği görülür. Sarsak yürüyüş, parmak uçlarında yürüme, merdiven çıkarken zorlanma hastalığın diğer erken

belirtileridir. Hastalar sık sık düşerler ve yerden kalkarlarken Gowers işareti olarak isimlendirilen tipik bir kalkış özelliği gösterirler. Ayrıca hastalığın erken devrelerinde, kas dokusunun yağ ve fibröz bağlayıcı doku ile yer değiştirmesine bağlı olarak baldır kasında genişleme (pseudohypertrophy) görülmektedir.

Kas zayıflığı üst ekstremitelerden önce alt ekstremiteleri, distal kasdan önce proksimal kası etkilemekte, böylece ilerleyen kas zayıflığı sonucunda hasta genellikle 12 yaş civarında yürüme yeteneğini kaybetmektedir.

Hastalık ilerledikçe, asimetric omurilik deformasyonları görülür. Kas zayıflığının artmasına bağlı olarak hastaların çoğunluğu 20 yaşından önce kronik solunum yetersizliği, zatürre veya kalp yetersizliğinden ölürlür^{1,8}. Hasta çocukların %20 - %30'unda çeşitli derecelerde mental gerilik görülmektedir. Genetik yapı ile mental gerilik arasında henüz bir korelasyon gösterilememiştir. Distrofinin beyin hücrelerinde de sentezlenmesi ile ilgili olarak kas promotörünün 5' ucunda lokalize olan 2. bir promotörün (beyin promotörü) gösterilmesi, mental gerilik görülen DMD hastalarında distrofin yokluğuna bağlı olarak görüldüğü düşünülen mental geriliğin, klinik fenotiple genotip ilişkisinin kurulmasında çok yardımcı olacağını göstermektedir⁹.

Hastalığın tedavisi mümkün olmadığından, ancak deformasyonları engelleyerek ve solunum fonksiyonunu düzenleyerek hastanın yaşamı biraz daha kolaylaştırılır.

Becker kas distrofisi (BMD), DMD'nin allelik formudur¹⁰. Hastalık 30000 erkek çocuktan birini etkiler. Hastalığın gelişimi DMD'ye göre daha yavaş olmaktadır. BMD'li hastalar 16 veya daha ileri yaşlara kadar yürüeyebilirler.

Klinik olarak DMD/BMD ayırımının yapılmasında, 12. yaş çok önemlidir. 12 yaşın sonunda yürüme yeteneğini kaybetmiş olan hasta DMD hastası, 12 yaşında hala yürüeyebilen hasta ise BMD hastası olarak tanımlanmaktadır.

Klinik fenotipi DMD ile BMD arasında kalan hastalar ise İntermediyer hastalar olarak isimlendirilir. Bu hastalar 14-15 yaşlarına kadar DMD'nin klinik özelliklerini gösterirken, bunu izleyen dönemde hastalığın daha yavaş

ilerlemesi nedeniyle BMD'nin klinik özelliklerini taşırlar ve 12-16 yaşları arasında yürüme yeteneklerini kaybederler^{11,12}.

DMD'nin tanısı çok küçük çocuklarda veya hastalığın belirtilerinin geç çıktığı durumlarda kesin olmayabilir. Bu durumlarda serum kreatin kinaz aktivitesinin ölçülmesi ve kas biyopsisi, tanının kesinleşmesine yardımcı olmaktadır. Doğumdan hemen sonra ve hastalığın klinik belirtileri görülmeden önce, artan kreatin kinaz seviyesi tespit edilebilir ve tanı amaçlı kullanılabilir. Ayrıca kas biyopsisinde, kasda görülen patolojik değişimler (farklı boyutlarda kas lifleri, bağ doku proliferasyonu, dejenerasyon vb.) klinik semptomlardan önce görülmektedir. Diğer önemli bir tanı kriteri ise kas biyopsi örneklerinde DMD geninin ürünü olan distrofinin gösterilmesidir. DMD'li hastalarda distrofinin gösterilememesi, BMD'li hastalarda boyutu veya miktarı değişmiş distrofin görülmesi, tanının doğruluğunu artırır^{13,14}.

Bazen taşıyıcı bireyler de hastalığın semptomlarını gösterirler. Manifest heterozigot olarak isimlendirilen bu dişilerde hücrelerin çoğunda normal X kromozomu inaktive olmuştur. X:otozom translokasyonu görülen bu taşıyıcı dişilerde translokasyonun kırılma noktasının geni etkilemesi durumunda, taşıyıcı dişi de hasta olur⁶.

2.2. DMD GENİNİN LOKALİZASYONU

Duchenne ve Becker kas distrofilerinin X'e bağlı resesif kalıtım modeline uymaları, genetik hatanın X kromozomunda olduğunu düşündürmüştür.

Dengeli X: otozomal translokasyon görülen kız hastalarda, translokasyonun kırılma noktasının her zaman X kromozomunun p kolunun 21. bandında olması¹⁵, DMD'nin yanısıra X'e bağlı kalıtım gösteren bir kaç kalıtsal hastalığı da taşıyan erkek hastalarda aynı bölgede küçük bir delesyon görülmesi¹⁶, hastalık geninin Xp21 bölgesinde lokalize olduğunu göstermiştir. Xp21 bölgesinde bulunan DNA markerları kullanılarak yapılan linkaj analizleri de sitogenetik bulguları desteklemiştir^{17,18}.

Xp21 bölgesinden klonlanmış DNA fragmentlerinin, bireylerin DNA sekanslarındaki farklılıkları göstermesi ve buna bağlı olarak genetik linkaj

analizleri için önemli olan RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism - Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi) alellerini ortaya çıkarması, moleküler biyolojinin getirdiği en önemli gelişmedir. BMD mutasyonlarının da DMD mutasyonları gibi Xp21'de lokalize olması, Duchenne ve Becker kas distrofilerinin aynı hastalığın alelik formları olduğunu göstermiştir¹⁷.

DMD lokusunun Xp21'de lokalizasyonu, araştırmaları bu bölgede yer alan DNA sekanslarının izolasyonuna ve klonlanmasına yöneltmiştir. DMD genine yakın olarak yerleşen DNA problemlerini elde etmek için, X kromozom kütüphanelerinden izole edilen klonların hiç birisi, mutant geni direk olarak çalışmak için gen lokusuna yeterince yakın olmadığından, gene yakın bir marker bulma şansını artırmak için farklı yaklaşımlar denenmesi gerekmiştir.

2.3. DMD GENİNİN İZOLASYONU

DMD geninin izolasyonu iki ayrı grubun yaptığı çalışmalar sonucunda başarılmıştır.

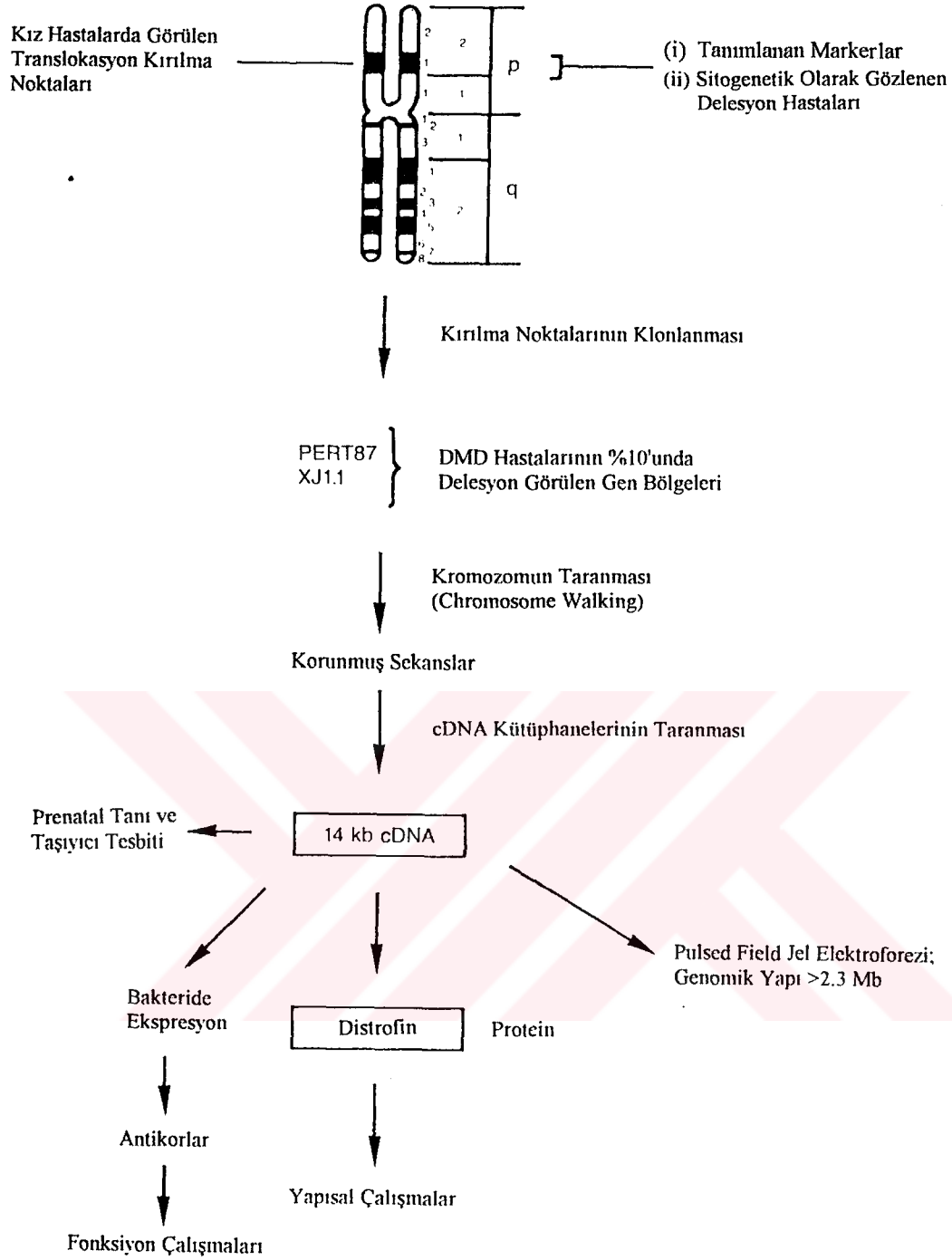
Worton ve grubu¹⁹, dengeli X: 21 translokasyonu görülen dişilerden kromozomal kırılma noktalarını izole ettiklerinde, otozomal kırılma noktasının 28S ribozomal RNA'nın kodlandığı DNA bölgesinde olduğunu göstermişlerdir. Translokasyon sonucunda DMD geninin yakınına yerleşen ribozomal gen sekansları marker olarak kullanıldığında, hastalardaki kromozomal kırılma noktaları klonlanmış ve X kromozomunun translokasyona uğrayan DNA fragmentinin, DMD geni içinde olduğu gösterilmiştir²⁰.

Kunkel ve grubu²¹ ise, X 'e bağlı kalıtım gösteren bir çok hastalığı birlikte taşıyan DMD'li bir hastada Xp 21 'de görülen delesyon bölgesinden DNA fragmentlerini izole ettiklerinde, delesyonun görüldüğü DNA fragmentinin DMD geni içinde olduğunu göstermişlerdir²².

DNA fragmentlerinin her ikisi de, DMD gen bölgesine yakın olan RFLP'leri bulmak için kullanılmıştır. Genin içinde lokalize olan RFLP markerları kullanılmasına rağmen, bazı DMD ailelerinde marker ile mutant gen arasında rekombinasyon görülmesi²³, DMD geninin çok büyük olduğunu düşündürmüştü ve ekzonlara karşı gelen cDNA'nın (komplementer DNA) DMD geninin analizi için gerekliliğini göstermiştir.

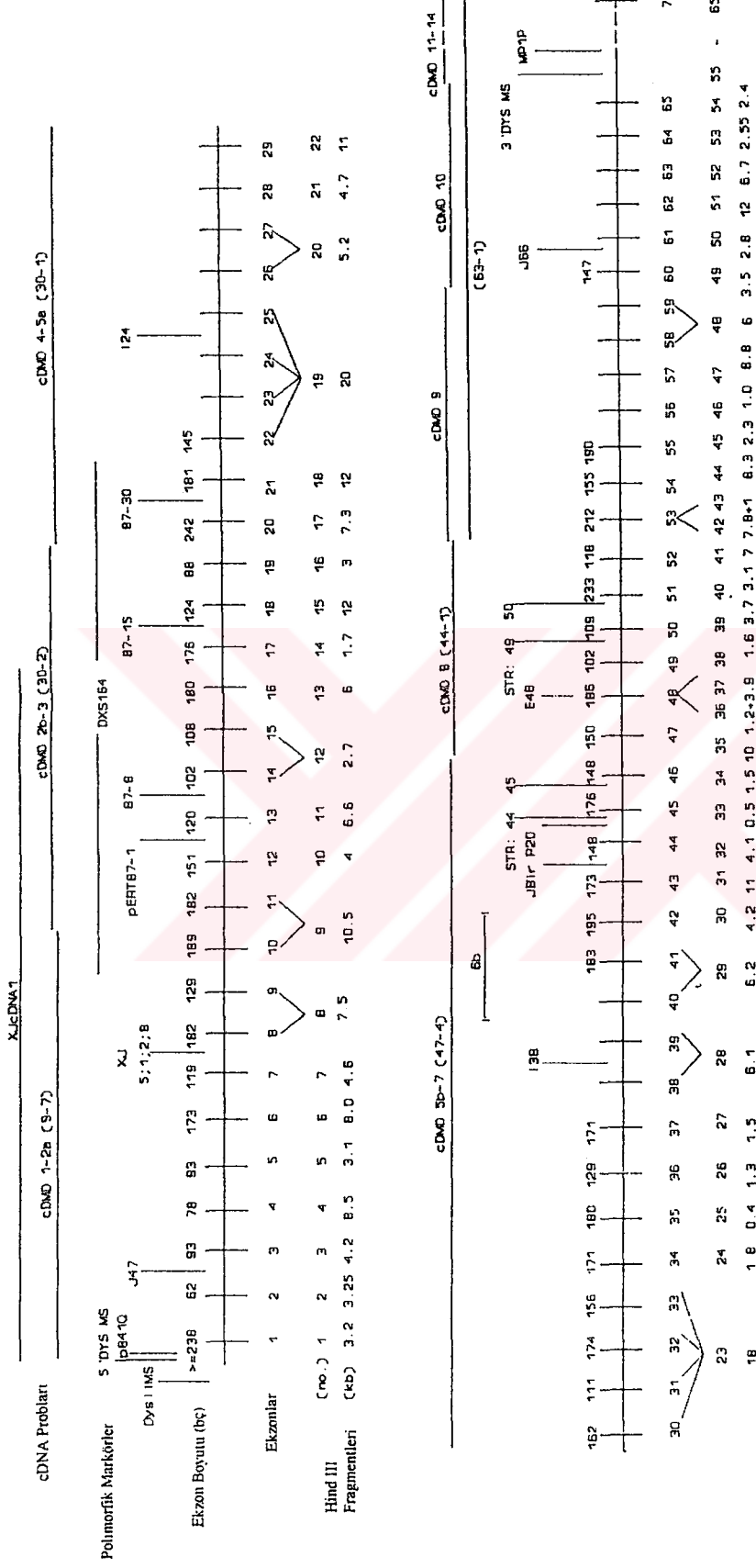
cDNA'nın oluşturulması, mRNA'nın tanımlanmasına bağlıdır. Genin büyüklüğü, distrofin mRNA'sının kasda düşük miktarda bulunması ve ekzonların intronlara göre daha az sayıda olması, mRNA'nın tanımlanmasını zorlaştırmıştır. Kunkel ve grubu²⁴, proteini kodlayan gen bölgelerinin belirlenmesi için, türler boyu korunmuş sekanslar ve bu sekansların memeli türleri arasındaki homolojisinden yararlanmışlardır. Daha sonra DMD geninde bulunan evrim boyunca korunmuş DNA dizilerinin, insan fetal iskelet kasından izole edilen RNA transkriptleri ile hibridizasyona sokulması sonucunda RNA transkriptinin tamamını kapsayan 14 kb (kilobaz) uzunluğunda cDNA izole edilmiřtir²⁵.

Biyokimyasal çalışmalar sonucunda, DMD geninin hatalı ürünü gösterilememiştir. Gen ürünü hakkında hiç bir bilgi olmaksızın genin izole edilmesinde, genin kromozomal lokalizasyonunun bilinmesi şarttır. Xp21 bölgesinden izole edilen DNA sekansları prob olarak kullanılarak genin yeri bulunmuştur. Gen izole edildikten sonra sekansı belirlenerek, genin ürünü olan distrofin proteini gösterilmiştir. İlk olarak "Reverse Genetics" olarak isimlendirilen bu yaklaşım son zamanlarda "Positional Cloning" olarak kullanılmaktadır (şekil 2.2)^{6,7,26}.



Şekil 2.2. DMD Geninin İzolasyonu ve Distrofinin Tanımlanması.

cDNA'nın prob olarak kullanılmasıyla, DMD geninin yaklaşık 2,5 milyon nükleotid içeren en az 75 ekzondan oluşmuş, bilinen en büyük insan geni olduğu bulunmuştur. 2,3 Mb (megabaz) uzunluğundaki bu gende, her ekzon ortalama 200 baz çifti, her intron ortalama 35000 baz çifti içerir (Şekil 2.3)^{25,27}.



Şekil 2.3. DMD Gen Haritası.

DMD genindeki ekzonlar, Hind III fragmentleri ve polimorfik marker bölgeleri.

2.4. DMD GENİNDE DELESYON ANALİZİ ÇALIŞMALARI

DMD genine ait cDNA problemleri kullanılarak yapılan çalışmalar, hastaların %65'inde hastalığa neden olan mutasyonun genomik delesyonlar olduğunu göstermiştir. Delesyonlar gen üzerinde iki ayrı bölgede yoğunlaşmıştır. %70'i genin 5' ucundan 1200 kb uzaklıkta bir bölgede, %30'u ise 500 kb uzaklıkta ikinci bir bölgede yerleşmiştir^{2,28}. Delesyon analizi çalışmaları, Southern Hibridizasyon veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknikleri kullanılarak yapılmaktadır.

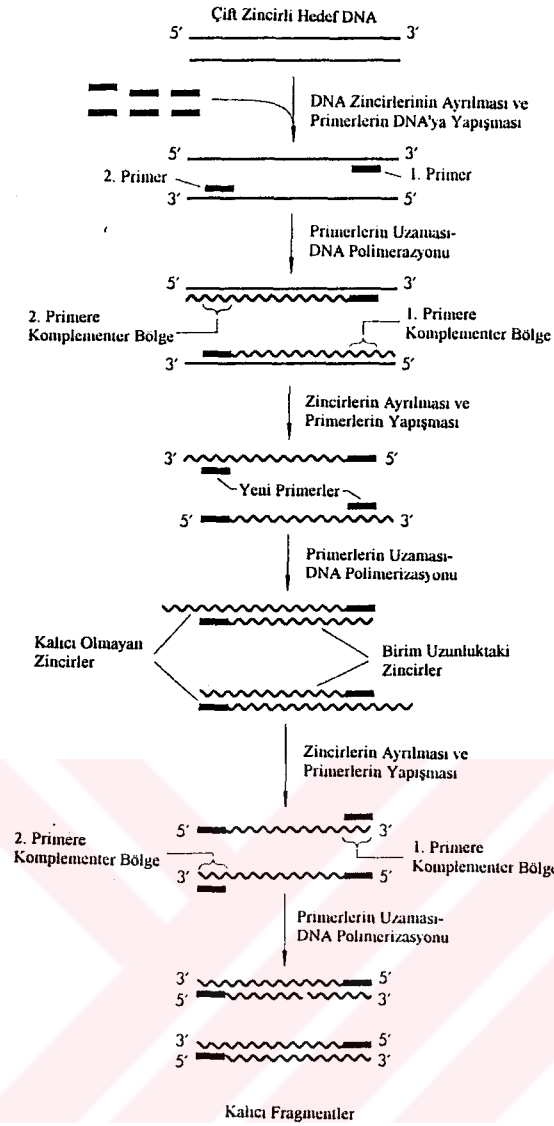
2.4.1. Southern Hibridizasyon Tekniği

DMD tanısı için ekzonları gösteren cDNA problemleri kullanılarak delesyonların direk analizi yapılmıştır. Uygun restriksiyon enzimleri ile küçük fragmentlere ayrılan genomik DNA'nın Southern blot tekniği ile filtrelere geçirilmesi ve radyoaktif işaretli cDNA problemleri (9-7, 30-2, 30-1, 47-4, 44-1, 63-1) ile hibridizasyonu sonucunda otoradyografi sinyalinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak, gendeki ekzonlar delesyon yönünden taranmaktadır²⁹. cDNA problemlerinin kullanılmasıyla hastaların %65'inde delesyonlar, %5'inde duplikasyonlar³⁰ gösterilmiştir.

2.4.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği

cDNA problemleri ile delesyon analizinin yanısıra, son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu tekniği (PCR) kullanılarak (Şekil 2.4) yapılan delesyon analizi, çok az miktar DNA ile çalışmaya olanak sağlaması, değerlendirme kolaylığı, radyoaktivite gerektirmemesi, kısa sürede sonuçlanması ve maliyetinin daha düşük olmasından dolayı tercih edilmektedir³¹.

Hastalığa neden olan delesyonların büyük bir kısmının genin merkezinde (Ekzon 43-52) geri kalanının ise genin 5' ucuna yakın bir bölgede (1-19) toplandığının saptanması ve delesyona uğrama olasılığı yüksek bölgeleri çoğaltmaya yarayacak nükleotid dizilerinin belirlenmesi multipleks gen amplifikasyonu adı verilen bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. İlk olarak Chamberlain³² tarafından DMD tanısında kullanılan bu yöntemde, 6 ayrı primer çifti kullanılarak DMD geninin en fazla delesyon gösteren sıcak bölgelerine ait 6 ekzon (8, 17, 19, 44, 45, 48. ekzonlar) aynı reaksiyon tübünde çoğaltılarak, PCR ürünü jel elektroforezi ile doğrudan analiz edilmiştir. Sağlıklı kişilerde görülen 6 ekzona ait PCR ürünlerinin bir veya birkaçının hastalarda görülmemesi, DMD geninde delesyonların varlığını göstermiştir.



Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu yöntemle hastaların %37'sinde delesyon mutasyonu görülmüştür. Chamberlain tarafından kullanılan multipleks PCR testine 4, 12 ve 51. ekzonlara ait primer çiftlerinin ilavesi ile cDNA problemleri ile gösterilen delesyonların %78'i³³, 9 ekzona (Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60) ait primer çiftlerini ilave ederek toplam 18 ekzonun iki ayrı multipleks PCR reaksiyonu içinde kullanılması ile delesyonların %95'i³⁴ gösterilmiştir. Daha sonra Abbs³⁵, delesyonların görüldüğü genin sıcak bölgelerine ait ekzonları, gendeki lokalizasyonlarına göre bir araya toplamıştır. Böylece genin 5' ucuna ait 7 ekzonu (Pm, 3, 4, 6, 8, 13, 19) ve 3' ucuna (merkez) ait 11 ekzonu (42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60) içeren 5' ve 3' multipleks reaksiyonları ile

delesyonların %98'i saptanmıştır. Romeo ve grubu³⁶ ise Pb (beyin promotörü), 16, 21, 22, 29, 32, 34, 41, 42, 46 ve 49. ekzonlara ait primerleri de içeren toplam 30 ekzonu 3 ayrı multipleks PCR reaksiyonu halinde amplifiye etmişler ve cDNA problemleri ile delesyon gösterilen 96 hastanın 95'inde delesyonları göstermişlerdir. Bu primerler kullanıldığında, delesyonların en sık görüldüğü 2 sıcak bölge arasındaki ekzon delesyonlarının da gösterilmesi sağlanmaktadır.

DMD mutasyonları arasında hastaların %65'inde görülen gen içi delesyonlar çok önemli bir yer tutar. Delesyon analizi çalışmaları ile hastalığa neden olan mutasyonun direk olarak gösterilmesi, hem mutasyonun saptanması açısından hem de prenatal tanı yönünden %100 doğru sonuç sağlayacaktır. Hasta çocuğun DMD geninde delesyon taşıdığı gösterilmişse, bu, annenin ileriki gebelikleri için çok önemli bir bulgu oluşturur. Fötüste delesyon taraması yapılarak fötüsün genetik statüsü belirlenebilir^{3,4,37}.

2.4.3. Multipleks PCR Tekniği İle Southern Hibridizasyon Tekniğinin Karşılaştırılması

Multipleks PCR sistemi ve cDNA problemleri ile yapılan delesyon analizleri sonuçları karşılaştırıldığında, DMD genindeki delesyonların her iki metodla da saptanabildiği görülmüştür. Southern hibridizasyon tekniği kullanıldığında, cDNA problemleri ile genomik DNA'nın hibridizasyonunun otoradyografide bazen zayıf sinyal vermesi, multipleks PCR sistemi ile delesyon görülmeyen ekzonlarda delesyon olduğu şeklinde hatalı sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir. Buna karşılık, cDNA problemleri ile yapılan delesyon analizinde delesyon görülmeyen ekzonda multipleks PCR sisteminde delesyon görülmesi, primerlere komplementer olan DNA sekansları içerisinde nadiren görülen polimorfizmlerin yüksek derecelerde primerin genomik DNA'ya bağlanmasını engellediğini düşündürmüştür^{34,35,38}.

Delesyon taramasında kullanılan multipleks PCR sisteminin tek dezavantajı, duplikasyonların ve tanı açısından önemli olan "junction fragmentlerin" (farklı boyutlarda DNA fragmentleri) gösterilememesidir. Buna karşılık, DMD genindeki delesyonların lokalizasyonlarının ve delesyon boyutunun gösterilebilmesi için en azından 6 ayrı cDNA probunun kullanılmasını gerektiren Southern hibridizasyon tekniği ile karşılaştırıldığında delesyonların %98'ini gösteren multipleks PCR sistemi her zaman tercih edilmektedir. Ayrıca çok az miktarda DNA ile çalışılabilmesi ve bir gün gibi

kısa bir sürede sonucun alınabilmesi multipleks PCR tekniğini özellikle prenatal tanı için ideal bir teknik haline getirmiştir^{35,39}.

2.4.4. Delesyon Taşıyıcılarının Saptanması

X kromozomlarından birinde delesyonu taşıyan dişinin normal X kromozomu, mutant X kromozomu üzerindeki delesyonun görülmesini engeller. Standard PCR ve Southern hibridizasyon analizleri ile taşıyıcı ve normal birey arasındaki dozaj farklılığı ayırt edilemez. Delesyon mutasyonları için dişilerin taşıyıcılığının belirlenmesinde, pratikte karşılaşılan zorluklardan dolayı çok sayıda teknik geliştirilmiştir. cDNA problemleri ile Southern hibridizasyon tekniği kullanılarak taşıyıcı ile normal birey arasındaki otoradyografi sinyalinin dozaj farklılıklarını gösteren dozaj analizleri^{40,41}; pulse field jel elektroforezi sistemi ve cDNA problemleri ile Southern hibridizasyon tekniği kullanılarak delesyon ve duplikasyon taşıyıcılarında "junction fragmentlerin" gösterilmesi^{42,43}; delesyonun görüldüğü bölgede polimorfik mikrosatellit markerların kullanılması^{44,45,46}; nonradyoaktif⁴⁷ veya radyoaktif^{48,49} işaretli primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile dozaj analizi; etidyum bromür ile boyanan PCR ürünlerinin jelde analizi⁴⁷, mRNA amplifikasyonu⁵⁰ ve delesyon görülen gen bölgesinin SSCP (Single strand conformation polymorphism - Tek zincirli DNA'nın yapı polimorfizmi) ile analizi⁵¹ bu tekniklerden bazılarıdır. Her birinin çeşitli avantajları ve dezavantajları olmasına rağmen, en güvenilir ve basit olanı delesyon bölgelerinde bulunan polimorfik mikrosatellit markerların kullanılmasıdır. Delesyon yönünden genin birinci sıcak bölgesinde (44, 45, 49 ve 50. intronlarda) lokalize olan ardarda tekrarlanan kısa sekanslar (Short Tandem Repeat-STR), yüksek polimorfizm kapasitelerinden dolayı delesyon görülen ailelerde dişilerin taşıyıcı tanısında kullanılan mikrosatellit markerlarıdır^{46,52}. Tüm delesyon bölgelerinin gösterilememesinden dolayı, bu markerlara ilave olarak, kantitatif tekniklerden herhangi birinin kullanılması dişilerin taşıyıcılığının saptanmasında yeterli olacaktır. PCR'a dayalı bir kantitatif tekniğin seçilmesi ile tekniğin uygulanabilme kolaylığı artacaktır⁵².

Hastalarının 1/3'ünde görülen sporadik vakalarda annenin mutasyonu taşımamasına rağmen hasta çocuklarının olması, tanıda karışıklığa neden olmaktadır. Bu durumda hasta çocuklar annenin germinal mozaik olmasından dolayı mutasyonu taşıyabilirler. Germinal mozaizmde primitif germ hücrelerinde mitotik proliferasyonlar sırasında oluşan delesyonun bir sonraki

jenerasyonda birden fazla bireyi etkileyebileceği görülmüştür. Hastalığın tekrarlama riski düşünülerek annenin ileriki gebeliklerinde prenatal tanı yapılması ve hastanın kız kardeşlerinin delesyon taşıyıcılığının test edilmesi gereklidir^{53,54,55}.

2.4.5. Delesyonların Oluş Mekanizmaları

DMD geninin çok büyük olması mutasyonlar için önemli bir hedef oluşturur. Genin mutasyona uğrama olasılığı çok yüksek olmakla birlikte, bu mutasyonların çoğunluğunu delesyonların oluşturması ilginçtir. Diğer X'e bağlı kalıtım gösteren hastalıklarda, hastaların %10'unda görülen delesyon DMD hastalarında %70'e kadar çıkmaktadır. Bu bulgu, Xp21 bölgesi içerisinde delesyonu başlatan sekansların varlığını düşündürmektedir. DMD geninde delesyonların yaklaşık %70'sinin genin merkezinde toplanması, bu düşünceyi desteklemektedir. Genin merkezindeki delesyonların 3' sonlanma noktalarının heterojen olması, delesyonlardan sorumlu olduğu düşünülen DNA sekanslarının delesyonların 5' kırılma noktalarının lokalize olduğu ortak geniş bir intron içerisinde bulduklarını düşündürür. Bundan dolayı, gende bu kadar yüksek oranda görülen delesyonun temeli, yalnızca mayoz sırasında kromatidler arasında eşit miktarda olmayan parça değişimi ile açıklanamaz⁵⁶. Duplikasyonların oluş mekanizmasının da aynı şekilde açıklanması, buna karşılık DMD vakalarının sadece %5'inde duplikasyon görülmesi²⁷ bu sonucu desteklemektedir.

DMD genindeki gen içi rekombinasyon oranının beklenilenden daha yüksek (%12) olması⁵⁷, gen içindeki mayotik rekombinasyonların belirli bölgelerde yoğunlaşmış olduğunu düşündürmüştür. Sağlıklı bireylerle yapılan çalışmalar, rekombinasyonların gen üzerindeki dağılımı ile DMD/BMD hastalarında görülen delesyon kırılma noktalarının aynı bölgelerde lokalize olduğunu göstermiştir⁴⁵. Rekombinasyon yönünden sıcak bölgelerin 44. ve 50. intronlar arasında yer alması ve delesyonların kırılma noktalarının da aynı intronlarda lokalize olması, rekombinasyon yönünden sıcak bölgeler ile delesyon yönünden sıcak bölgeler arasında kesinlikle bir korelasyon olduğunu göstermektedir^{45,58}.

Yapılan çalışmalarda delesyon taşıyan bazı DMD hastalarında 44.ekzonun yakınında bir transpozon elementinin bulunması, DMD genindeki delesyonların oluşumunda transpozonların da etken olabileceğini düşündürmektedir^{43,59}.

2.5. DMD GENİNDE LINKAJ ANALİZİ ÇALIŞMALARI

Hastaların %30-35'inde gendeki mutasyon tipi ve mutasyonun yeri bilinmemektedir. Genetik hatanın delesyon olmadığı bu hasta ailelerinde, ailede hastalık ile birlikte kalıtılan genetik markerların analizine dayanan dolaylı bir yaklaşım kullanılır. Farklı uzunlukta restriksiyon fragmentlerinin oluşumuna neden olan DNA polimorfizmleri (RFLP), DMD mutasyonunu taşıyan ve taşımayan X kromozomunun saptanmasında çok önemli olmuştur. RFLP analizinin temeli, annenin iki X kromozomunun birbirinden ayırdedilebilmesine dayanır^{4,60,61}.

DMD geninin çok büyük ve gen içi rekombinasyon olasılığının yüksek olması (%12) nedeni ile kullanılan polimorfik markerların mutant gen bölgesinin çok yakınında bulunmaları ve aile bireylerinin bu markerlar için heterozigot olmaları gerekmektedir. Son yıllarda ökaryotik genomda bulunan mikrosatellitler de linkaj analizlerinde marker olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mikrosatellitler alel uzunluklarındaki çeşitlilik ve yüksek polimorfizm göstermelerinden dolayı linkaj analizleri için çok uygun markerlardır. Ailelerin çoğu mikrosatellit lokusunda heterozigottur ve alellerin segregasyonu aile ağacında izlenebilir. DMD geninin 5' ve 3' ucunda bulunan (CA)_n tekrarları ile delesyon yönünden birinci sıcak bölgede yerleşen STR'ler, linkaj analizleri için kullanılan mikrosatellit markerlarından en informatif olanlarıdır^{44,45,46}.

DMD geninde delesyon görülmeyen hasta ailelerinde prenatal tanı yapılmadan önce ailelerin hangi polimorfik marker için heterozigot olduklarının saptanması ve annenin taşıyıcı riskinin değerlendirilmesi gerekir. Prenatal tanıda gen içi markerlara ilaveten annenin, genin 5' ve 3' ucundaki markerlar için de heterozigot olması daha doğru genetik danışmanlık verilmesini sağlar^{4,61}.

Southern hibridizasyon teknikleri ile linkaj analizleri yapılmasına rağmen bugün PCR'a dayalı tekniklerle gösterilen polimorfik marker sayısının artışı Southern hibridizasyon tekniğinin bu amaçla kullanılabilirliğini daha da azaltmıştır (Tablo 2.1).

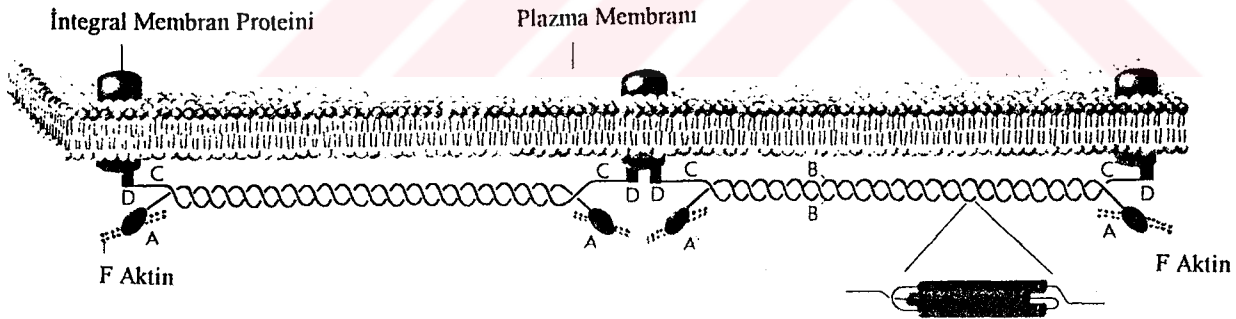
Tablo 2.1. DMD Geninde Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gösterilen Markerlar.

PROB	ENZİM	LOKALİZASYON
5' DYS I	-	Beyin Promotörü
5' DYS II	-	Beyin Promotörü
5' DYS III	-	Beyin Promotörü
841Q	Mac III	Kas Promotörü
NM 72/73	-	Intron 1
OA 34/35	-	Intron 1
pERT 87-1	BstN I	Intron 12
pERT 87-8	Taq I	Intron 13
pERT 87-15	Taq I	Intron 17
pERT 87-15	Xmn I	Intron 17
pERT 87-15	Bam H I	Intron 17
Ca1a	Pst I	Ekzon 26+27
Cf23a	Taq I	Ekzon 39+40
STR44	-	Intron 44
EKZON 45 (SSCP)	-	Ekzon 45
STR45	-	Intron 45
EKZON 48	Mse I	Ekzon 48
STR49	-	Intron 49
STR50	-	Intron 50
DMD1	-	Intron 56
J66	Pst I	Intron 60
MP1P	-	Proteine çevrilmeyen bölge
3' CA TEKRARI	-	Proteine çevrilmeyen bölge

2.6. DİSTROFİN

DMD geninin tamamını gösteren cDNA fragmentleri klonlandığında, genin ürünü olan 3685 aminoasitten oluşan 427000 dalton ağırlığında distrofin proteini tanımlanmıştır¹³. Protein, aktin bağlayıcı proteinlerin aktin bağlayan bölgeleri ile yüksek homoloji gösteren amino ucu, 109 aminoasitten oluşmuş bir motifin 24 kez tekrarlandığı üçlü heliks yapısı, alfa aktin proteininin kalsiyum bağlayıcı bölgesine homolog olan sisteinden zengin bölge ve hiç bir protein sekansı ile homoloji göstermeyen karboksil ucu olmak üzere 4 kısım içerir⁶².

Distrofin, iskelet kası proteinlerinin minör bir komponenti olmasına rağmen, sarkolemmal proteinlerin %2'sini ve sarkolemmal hücre iskeleti proteinlerinin %5'ini oluşturması, distrofinin subsarkolemmal hücre iskeletinin majör yapısal proteini olduğunu gösterir^{62,63}. İskelet ve kalp sarkolemmasının sitoplazmik yüzeyinde lokalize olan distrofin, sarkolemmal glikoproteinlerin oluşturduğu oligomerik kompleks ile ilişki kurar (Şekil 2.5)^{7,64}.



Şekil 2.5. Distrofin-Glikoprotein Kompleksinin Şematik Modeli.

- A. Aktin bağlayan amino ucu
- B. Üçlü heliks şeklinde tekrar bölgesi
- C. Sisteinden zengin bölge
- D. Karboksil ucu.

Distrofin-glikoprotein kompleksi, subsarkolemmal hücre iskeletinin hücre dışı matriksle bağlantısını sağlar. Ayrıca, kasın kontraksiyonu ve gerilmesi sırasında sarkolemmaya yapısal destek sağlama, sinyal iletimi ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun regülasyonu gibi biyolojik fonksiyonları vardır^{65,66}. DMD hastalarında distrofinle birlikte glikoproteinlerin, DMD'ye benzeyen fenotip gösteren otozomal resesif distrofi (SCARMD-Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy) hastalarında yalnızca glikoproteinlerin bulunmaması, hücre dışı matriks ile subsarkolemmal hücre iskeleti arasındaki bağlantının bozulmasına ve bunun sonucunda kas hücresinin nekrozuna neden olur^{66,67,68}.

Western blot analizleri sonucunda kas biyopsilerinde, BMD hastaları değişik boyutlarda veya miktarlarda, İntermediyer hastalar çok düşük miktarlarda distrofin taşırlarken, DMD hastalarında genellikle distrofin bulunmadığı gösterilmiştir¹⁴. DMD/BMD hastalarının %65'inde gösterilen delesyonların çoğunluğunun proteinin üçlü heliks şeklindeki tekrar bölgesinin 3' ucuna yakın kısmında, geri kalanının ise amino ucunda toplanmasına rağmen, delesyonun boyutu ve lokalizasyonu ile hastalığın klinik tanısı arasında bir korelasyon yoktur⁶⁹.

Değişik miktarlarda ve farklı moleküler ağırlıklarda distrofin sentezlenmesine bağlı olarak klinik varyasyonlar gösteren BMD hastalarında yapılan çalışmalarda, distrofinin aktine bağlandığı amino ucundaki delesyonların proteinin stabilitesini azalttığı ve çok düşük ağırlıkta bir proteinin sentezlenmesiyle ağır BMD fenotipine neden olduğu gösterilmiştir. Üçlü heliks şeklindeki tekrar bölgesindeki geniş delesyonların BMD'ye neden olması, bu bölgenin sadece proteinin boyutunu sağladığı ve proteinin fonksiyonunda minimal etkisi olduğunu düşündürmüştür. Kısmen doğru olmasına rağmen, bu bölgenin de distrofinin bazı proteinlere bağlanmasında önemli olduğu düşünülmektedir⁷⁰. Sisteinden zengin bölgedeki ve karboksil ucunun 5' kısmındaki küçük "out of frame" delesyonların yalnızca bu bölgenin kaybına rağmen DMD fenotipine neden olması ve hastalarda distrofinin sentezlenememesi ayrıca BMD hastalarının yaklaşık tamamında proteinin karboksil ucunun her zaman bulunması, DMD hastalarında ise delesyona uğraması bu bölgelerin proteinin fonksiyonu için önemli olduğunu göstermektedir^{2,71}. Distrofinin karboksil ucunun 3' kısmındaki delesyonların ise ilerleyici olmayan hafif BMD fenotipine neden olması bu bölgenin proteinin fonksiyonunda önemli olmadığını ispatlamaktadır⁷².

2.7. "READING FRAME" TEORİSİ

DMD gen lokusunda görülen çeşitli genomik ekzon delesyonlarının sonucunda, hastaların farklı klinik fenotipler (DMD ve BMD) göstermelerinin nedeni, Monaco'nun^{69,73} "Reading Frame" teorisi ile açıklığa kavuşmuştur. DNA sekanslarında meydana gelen delesyonlar, mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini bozuyorsa DMD fenotipi görülmekte ve bu hastaların kas hücrelerinde gen ürünü olan distrofin yapılmamaktadır. BMD hastalarında ise, delesyonlar proteinin okuma çerçevesini bozmadığı için kas hücrelerinde yarı fonksiyonel olan düşük moleküler ağırlıkta distrofin sentezi görülmektedir. Kırılma noktaları kodonların içinde olan delesyonlar (out of frame) mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini bozarlar. Kırılma noktaları kodonlar arasında olan delesyonlar (in-frame) ise mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini bozmazlar. DMD geninde görülen delesyonların 5' ve 3' kırılma noktalarının gen üzerindeki lokalizasyonlarına bağlı olarak distrofin mRNA'sının translasyonel okuma çerçevesinin nasıl etkilendiği Koenig² ve Gillard⁷⁴ tarafından tarif edilmiştir (Tablo 2.2). Ayrıca DMD geninde görülen nokta mutasyonları, tek ekzon delesyonlarına veya "intron-ekzon splicing" mekanizmasında hatalara neden olur. Bundan dolayı, intronların çıkarılması sırasında intron kesim bölgelerinde görülen mutasyonlar da translasyonun okuma çerçevesini değiştirerek daha ağır bir DMD fenotipine neden olurlar^{69,73}.

Tablo 2.2. DMD Geninde "Out of Frame" ve "In-Frame" Delesyonların Dağılımı.

		EKZON NUMARALARI																		
		42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	60						
-																				
42	IN	OUT	IN	OUT	IN	IN	IN	IN	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
43	-	OUT	IN	OUT	IN	IN	IN	IN	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
44	-	-	OUT	IN	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	?						
45	-	-	-	OUT	IN	IN	IN	IN	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
46	-	-	-	-	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	?						
47	-	-	-	-	-	IN	IN	IN	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
48	-	-	-	-	-	-	-	IN	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
49	-	-	-	-	-	-	-	-	IN	OUT	IN	OUT	IN	?						
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OUT	IN	OUT	IN	?						
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OUT	IN	OUT	?						
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OUT	IN	?						
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OUT	?						
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?						
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?						

EKZON NUMARALARI

2.8. GEN TEDAVİSİ ÇALIŞMALARI

DMD'li ailelere genetik danışmanlık verilebilmesi ve prenatal tanı yapılması çok önemli olmasına rağmen, hastalığın tedavisi yönünde çalışmalar da hızla devam etmektedir.

2.8.1. Miyoblast Transferi

İskelet kasının stem hücreleri olan miyoblastlar genlerin kas liflerine iletilmeleri için ideal hücre vektörleridir. Distrofin geninde mutasyon görülen mdx (X-linked murine muscular dystrophy mutation - Sıçangillerde görülen kas distrofisi mutasyonu) fareler kullanılarak yapılan hayvan deneyleri, normal miyoblastların mdx farelerin kaslarına enjeksiyonunun ardından az miktarda distrofin sentezi olduğunu göstermiştir^{75,76}. Ancak, kişiye transplante edilen kas hücrelerinin immünolojik olarak red edilmesi olasılığı olduğundan, DMD'li hastaların tedavisinde etkili bir metod olacağını söylemek hatalı olur.

2.8.2. Gen Tedavisi

Memeli hücrelerine sağlam genin iletilmesi olan gen tedavisi çalışmalarında genin tamamını yapısında taşıyan vektörler tercih edilmektedir. Bu amaçla yapılan son çalışmalarda, yapay maya kromozom (YAC-Yeast Artificial Chromosome) klonları memeli hücrelerinin transfeksiyonunda başarıyla kullanılmıştır^{77,78}.

DMD geninin çok büyük olması gen tedavisi çalışmalarını zorlaştırmaktadır. YAC'lar en fazla 1 Mb büyüklüğünde bir geni yapılarına alabildikleri için, genin büyüklüğü tek YAC klonu oluşturulmasını engellemiştir. Bu nedenle, önce DMD geninin tamamını taşıyan 36 YAC fragmenti, daha sonra tek bir rekombinant YAC klonu oluşturulmuştur. DMD geninin ekzonlarını, intronlarını ve regülatör sekanslarının tümünü içeren bir YAC klonu, genin ekspresyonu ve gen tedavisi çalışmaları için çok önemli olacaktır^{79,80}.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

Çalışmada kullanılan tamponlar ve kimyasal maddeler:

3.1.1. DNA İzolasyonu

Liziz Tampon

155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0.1 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)

Otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

STE (Sodyum Tris EDTA) Tampon

0.1 mM NaCl
1 mM EDTA
50 mM Tris HCl
pH 7.5

Otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

TE (Tris EDTA) Tampon

10 mM Tris HCl pH 7.4
1 mM EDTA pH 8

Otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklanır.

Proteinaz K (10mg/ml) "Sigma"

10 mM Tris HCl (pH 7.5) de çözülür ve küçük hacimler halinde -20°C'de saklanır.

%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

Hazırlandıktan sonra 65°C'lık su banyosunda eritilir, filtre edildikten sonra oda ısısında saklanır.

Fenol "Merck"

250 gr fenol 70°C'de eritildikten sonra üzerine 150 ml 20mM Tris HCl (pH 8.1) ilave edilir ve oluşan 2 fazdan üst faz atılıp aynı işlem tekrarlanır. 250 mg 8-Hydroxychinolin eklenir ve solusyon bir gece +4°C'de bırakılır. Ertesi gün üst faz atılır ve alt faz olan fenol fazı -20°C'de saklanır.

Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (25:24:1 v/v/v) +4°C'de saklanır.

Kloroform-izoamil alkol (24:1 v/v)

3 M Sodyum asetat pH 5.2

Otoklavda steril edildikten sonra +4°C de saklanır.

3.1.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1 x Taq polimeraz tamponu

6.7 mM Tris HCl pH 8.8

16.6 mM (NH₄)₂SO₄

6.7 mM MgCl₂

170 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumin)

10 mM β merkaptotanol

Tris HCl , (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ ve BSA 10 kez konsantre olarak hazırlanıp -20°C'de saklanır. β merkaptotanol uçucu olduğu için çalışma sırasında ilave edilmelidir.

Taq polimeraz enzimi "Promega" -20°C' de saklanır.

dNTP "Promega" (Deoksinükleotidler-100mM stok)

dATP

dGTP

dCTP

dTTP

-20°C de saklanır.

Primer çiftleri (Ek 1).

3.1.3. Jel Elektroforezi

50 x TAE (Tris Asetat EDTA) tamponu

0.2 M Tris

0.5 M EDTA pH 8

pH 7.8 (pH ayarlaması asetik asit ile yapılır). Filtre edilir ve +4°C de saklanır ve 1 x TAE olarak kullanılır.

Agaroz "Sigma" +4°C de saklanır.

NuSieve Agaroz "FMC" Oda ısısında saklanır.

Yükleme solüsyonu

55 ml gliserol

45 ml 1 x TAE

0.1 gr orange G

+4°C de saklanır.

Etidyum Bromür

10 mg/ml Koyu renk bir şişede ve +4°C de saklanır.

MW "Promega" (Moleküler ağırlık markerı)

ΦX174 Hae III DNA yükleme solusyonu ile sulandırılıp (1:4 v/v) küçük hacimlere bölünerek -20°C de saklanır.

3.2. METOD

3.2.1. DNA İzolasyonu

Kan örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Nöroloji Bölümünün DMD, BMD ve İntermediyer Kas Distrofisi tanısı almış hastalarına aittir.

EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kan, 50 ml'lik plastik tüplere aktarıldıktan sonra üzerine 30 ml soğuk liziz tampon eklenerek 2-3' karıştırılıp, kırmızı kan hücreleri patlatıldı. 1500 rpm'de 10' santrifüj edilerek çöktürülen beyaz kan hücreleri bir kez daha 15 ml liziz tamponla yıkandı ve 1500 rpm'de 10' santrifüj edilerek kırmızı kan hücreleri tamamen uzaklaştırıldı. Beyaz kan hücrelerinin üzerine 15 ml STE, 150 µl proteinaz K (10 mg/ml) ve 375 µl SDS (%10) eklendi ve karıştırıldı. 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün,

tüplere 15 ml fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) karışımından eklenip 5-10' karıştırıldıktan sonra, tüpler 5000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz (DNA'nın bulunduğu faz) ayrı bir tüpe alınarak bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Daha sonra 15 ml kloroform-izoamilalkol (24:1) karışımından ilave edilerek aynı devirde ve sürede santrifüj yapıldı. Üst faz başka bir tüpe alındıktan sonra, üzerine 1-1.5 ml 3M sodyum asetat ve 30 ml %99'luk soğuk etanol ilave edilerek DNA çöktürüldü. Çöken DNA pipet ucu ile toplanarak %70'lik alkolde yıkandı ve etanol uçuruldu. Daha sonra DNA içinde 500 µl TE bulunan ependorf tüpe alındı. 37°C de bir gece bırakılarak DNA'nın tekrar solusyon haline geçmesi sağlandı. Bir günlük bekleme sonrasında DNA'nın erimemesi durumunda 500 µl daha TE ilave edilerek DNA oda ısısında 1-2 gün bekletildi⁸¹.

3.2.2. İzole Edilen DNA'nın Miktarının ve Saflığının Saptanması

İzole edilen DNA'lardan 1/50 dilüsyonlar hazırlandı ve 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu. 1 OD'nin 50 µg/ml DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunan örneklerdeki DNA miktarları saptandı.

OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı, DNA'nın saflık derecesini gösterir. Bu oranın 1.8 olması DNA'nın tamamen saf olduğunu, 1.8'den düşük olması protein kontaminasyonunu, 1.8'den yüksek olması ise RNA kontaminasyonunu belirtir⁸¹.

3.2.3. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Klinik olarak DMD tanısı almış 56, BMD tanısı almış 7 ve İntermediyer Kas Distrofisi tanısı almış 1 hasta erkek çocuğa ait DNA'lar multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edildi. Delesyon analizi, delesyon yönünden sıcak bölge olan genin 5' ucuna ve merkezine ait 14 ekzonun primerlerini içeren iki ayrı multipleks PCR seti ile yapıldı. 14 ekzona ait primerleri içeren 9 Ekzon ve 5 Ekzon Multipleks PCR setleri, 9 ekzonu ve 5 ekzonu içeren iki ayrı tüp içerisinde dir. 9 Ekzon Multipleks PCR Seti 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 ve 51. ekzonları, 5 Ekzon Multipleks PCR Seti Promoter bölge (Pm), 13, 43, 50 ve 52. ekzonları içerir.

Ayrıca laboratuvarımızda, delesyon yönünden sıcak bölgede bulunan 19 farklı ekzona (Pm, 3, 4, 6, 8, 13, 19, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 ve 53. ekzonlar) ait 38 primer de delesyon analizi için kullanıldı (Ek 1).

Elimizdeki primerlerle değişik kombinasyonlar yapılarak, ilgilendiğimiz ekzonlardaki delesyonlar analiz edildi⁸³.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Primer 1 F (Forward 5'---	50 pm
1 R (Reverse 3'---	50 pm
Primer 2 F	50 pm
2 R	50 pm
.	.
.	.
dATP (100 mM)	0.5 mM
dGTP (100 mM)	0.5 mM
dCTP (100 mM)	0.5 mM
dTTP (100 mM)	0.5 mM
Taq Polimeraz Tamponu (10 x)	1 x
Taq Polimeraz (5 ü)	3 ünite
DNA	250 ng
H ₂ O	
	50.00 µl

PCR koşulları

94°C	7'	1 kez	
94°C	30"		
52°C	30"	25 kez	9 Ekzonun Multipleks PCR ile Amplifikasyonu
65°C	4'		
65°C	7'	1 kez	
94°C	6'	1 kez	
94°C	30"		
54°C	30"	25 kez	5 Ekzonun Multipleks PCR ile Amplifikasyonu
65°C	4'		
65°C	7'	1 kez	

94°C 5' 1 kez

94°C 48"

60°C 48" 25 kez Set Dışındaki Ekzonların Amplifikasyonu

72°C 3'

72°C 5' 1 kez

Örnekler, jelde analiz edilene kadar +4°C de saklandı^{32,33,82}.

Çalışmalarımızda delesyon görülmeyen sağlıklı bir bireyin DNA'sı kontrol grubu olarak kullanıldı. Ayrıca herhangi bir DNA kontaminasyonu olup olmadığını anlamak için içerisinde DNA'nın bulunmadığı bir PCR reaksiyonu hazırlanarak kontaminasyonlar test edildi. Çalışmalarda hiçbir DNA kontaminasyonuna rastlanmadı.

3.2.4. Jel Elektroforezi

9 Ekzon multipleks PCR reaksiyon ürününün 10 µl'si %3 NuSieve + %1 Agaroz içeren jelde 1 x TAE tamponu içerisinde 120 volt'da 1,5 saat, 5 Ekzon multipleks PCR reaksiyon ürününün 10 µl'si ise %1.5'lük agaroz jelde 1 x TAE tamponu içerisinde 120 volt'da, 1 saat yürütüldü. Jel içerisine, 0.5 µg/ml Etidyum Bromür ilave edildi. Jel ultraviyole ışığı altında incelendi ve delesyona uğrayan ekzonlar tanımlandı.

Diğer PCR reaksiyon ürünleri ise %1.5'lük Agaroz jelde veya %3 NuSieve + %1 Agaroz jelde analiz edildi.

Yüzdeler hesaplanırken ± standard hatalarıyla birlikte verildi. 10 bireyin altındaki örneklerde ve populasyona maledilmeyecek sonuçlar için standard hata verilmedi.

Standard Hata, $SH(p) = \sqrt{p(1-p)/n}$ formülüne göre hesaplandı⁸⁴.

SH: Standard Hata

p : Örnek Sayısı/Toplam Örnek Sayısı

n : Toplam Örnek Sayısı

4. BULGULAR

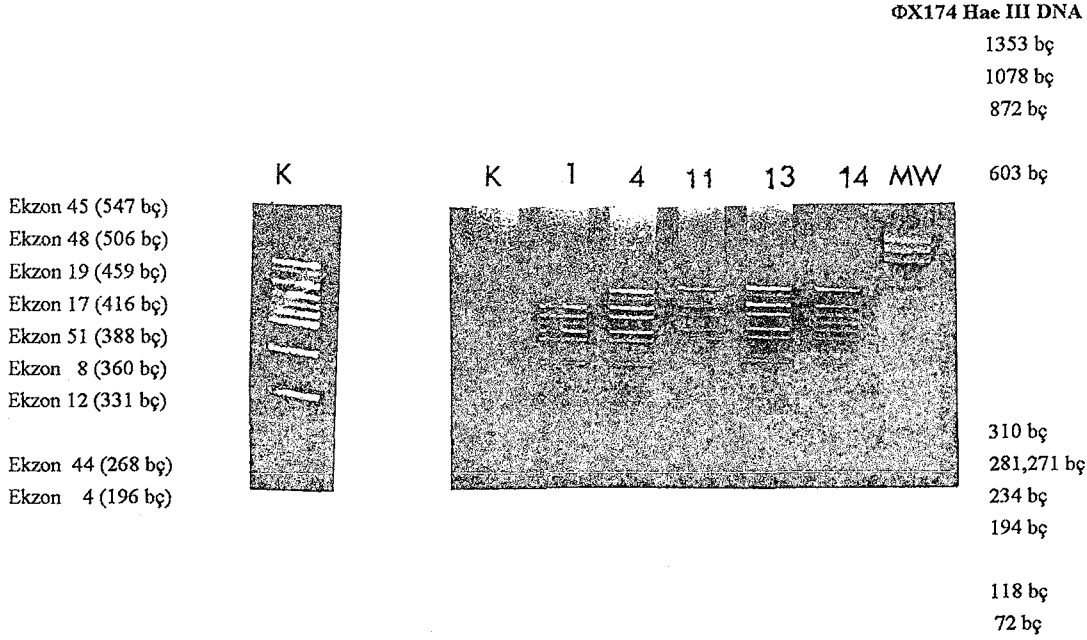
Klinik ve laboratuvar bulguları sonucu Duchenne, Becker veya İntermediyer kas distrofisi tanısı almış, birbirleriyle akrabalığı olmayan farklı ailelere ait 64 hasta erkek çocuk çalışmaya alınmıştır. Hasta çocukların 56'sı DMD, 7'si BMD ve 1'i İntermediyer kas distrofisi hastasıdır.

Tüm hastalar için 10 ml kandan elde edilen DNA miktarı 500 ng/µl civarındadır. Çalışmamızda, Polimeraz zincir reaksiyonu için 250 ng DNA kullanılması amplifikasyon ürününün jelde değerlendirilmesi için yeterli olmuştur.

DNA'nın saflık derecesinin belirlenmesi için kullanılan OD260/OD280 oranı hasta DNA'larında 1.3 - 1,8 arasında bulunmuştur. Bazı DNA örneklerinde saptanan protein kontaminasyonu DNA amplifikasyonunu etkilememiştir.

Hastalarda distrofin genindeki delesyonların sıklığını ve gen üzerindeki dağılımlarını göstermek amacıyla yapılan bu çalışmada multipleks PCR tekniği kullanılmıştır. Genin delesyon yönünden sıcak bölgelerinde bulunan 9 ekzona ait 18 primeri içeren "9 Ekzon Multipleks PCR Seti" ve 5 ekzona ait 10 primeri içeren "5 Ekzon Multipleks PCR Seti" kullanılarak 14 ekzon birlikte amplifiye edilmiştir.

Hastalarda, "9 Ekzon Multipleks PCR Seti" kullanıldığında 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51. ekzonlardaki delesyonlar, "5 Ekzon Multipleks PCR Seti" kullanıldığında promotör + 1. ekzon, 13, 43, 50, 52. ekzonlardaki delesyonlar saptanmıştır. (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Her iki multipleks PCR setinde de genin delesyon yönünden sıcak bölgeleri olan 5' ucuna yakın kısmı ve merkezindeki ekzonlar taranmaktadır.



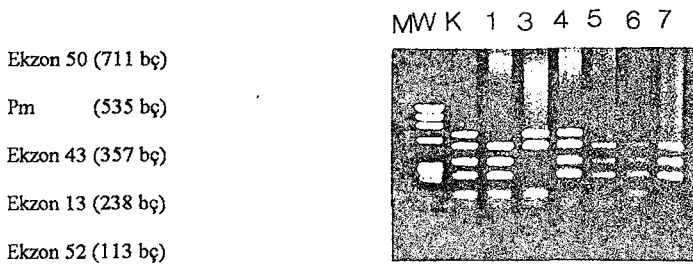
Şekil 4.1. 9 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

1 numaralı hastada 45 ve 48. ekzonlarda, 4 ve 13 numaralı hastalarda 51.ekzonda, 11 numaralı hastada 48 ve 51. ekzonlarda, 14 numaralı hastada 48. ekzonda delesyon görülmektedir.

MW ΦX 174 Hae III DNA

K (Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%3 NuSieve + %1 Agaroz Jel (0.5 µg/ml Etidyum bromür), 120 V, 1.5 saat.



Şekil 4.2. 5 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

1 ve 6 numaralı hastalarda 50. ekzonda, 3 numaralı hastada 13 ve 43. ekzonlarda, 4 numaralı hastada 52. ekzonda, 5 ve 7 numaralı hastalarda 50 ve 52. ekzonlarda delesyon görülmektedir.

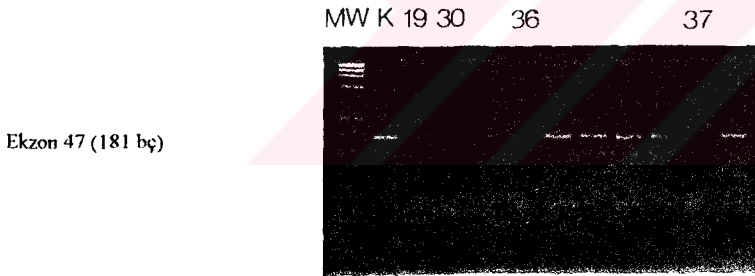
MW ΦX 174 Hae III DNA

K (Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%1,5 Agaroz Jel (0.5 µg/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

9 Ekzon Multipleks PCR Seti tek başına kullanıldığında 64 hastanın 31'inde (%48), 5 Ekzon Multipleks PCR Seti tek başına kullanıldığında 64 hastanın 21'inde (%33) delesyon saptanırken, 2 setin birlikte kullanımı ile hastalarda delesyon görme olasılığı %55'e yükselmiştir. Hastaların hiç birinde promotör bölge delesyonu görülmemiştir.

Laboratuvarımızda daha önce cDNA problemleri ile delesyon taraması çalışmasında incelemeye alınan 15 hastanın 7'sinde distrofin geni içinde 44-1 + 47-4 ve 9-7 problemlerinin tanıdığı bölgelerde delesyonlar tesbit edilmiştir. 7 hastanın 6'sında 44-1 (7+8) probu ile yapılan hibridizasyon çalışmasında 10kb büyüklüğündeki Hind III fragmentinde delesyon gösterilmiştir. Bu fragmentin görülmemesi, 47. ekzonun delesyona uğradığını göstermiştir⁸⁵. Bu çalışma gözönüne alınarak delesyon görülmeyen 29 hastanın DNA'sı 47. ekzona ait primerler kullanılarak amplifiye edilmiş ve 2 hastada (36 ve 37 numaralı hastalar) 47. ekzonda delesyon gösterilmiştir. 47. ekzonda delesyon görülen ve görülmeyen hastalara örnekler şekil 4.3'de görülmektedir.

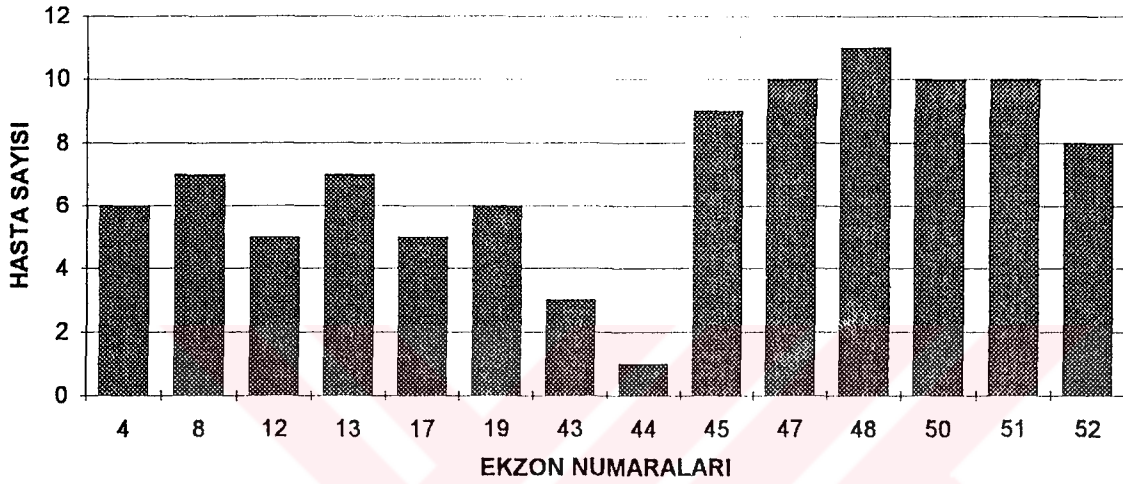


Şekil 4.3. 47. Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

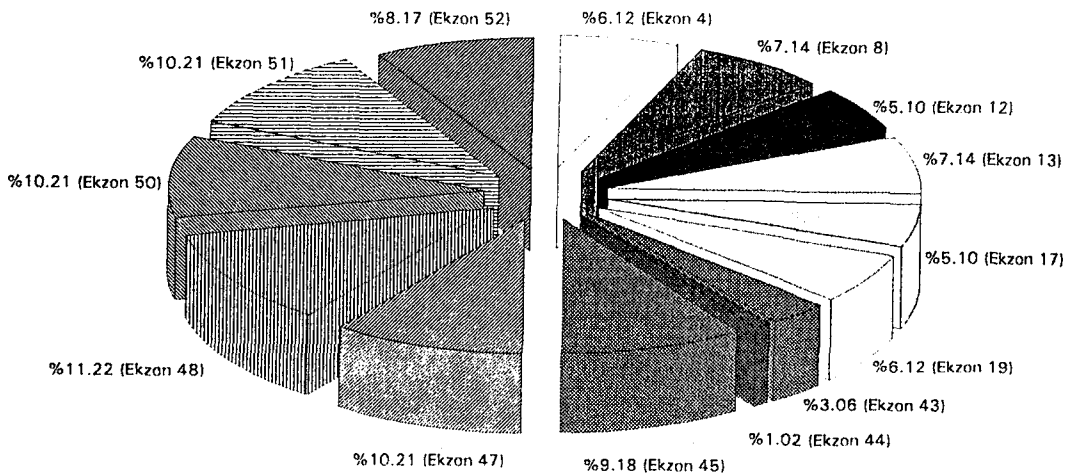
MW Φ X 174 Hae III DNA
K (Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı
%1,5 Agaroz Jel (0.5µg/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

47. ekzonda delesyon görülen 2 DMD hastasının ilavesi ile delesyon yüzdesi %55'den %58'e (0.58 ± 0.06) çıkmıştır. Buna göre, 56 DMD hastasının 33'ünde (0.59 ± 0.07), 7 BMD hastasının 3'ünde (%43) ve 1 intermediyer hastada delesyon gösterilmiştir.

Distrofin genindeki delesyonların dağılımına bakılacak olursa 37 hastanın 25'inde (0.68 ± 0.08) delesyonlar genin merkezinde, 12'sinde (0.32 ± 0.08) genin 5' ucuna yakın bölgede toplanmıştır. 3 no'lu hastada gendeki delesyon bölgesi 12. ekzondan 45. ekzona kadar uzanmaktadır. Bu hasta, delesyon bölgesi genin 5' ucuna yakın bölgede başladığı için genin 5' ucunda delesyon görülen hastalar grubuna alınmıştır. Delesyonlar en fazla 47-51. ekzonlar arasında toplanmıştır (Şekil 4.4.a, 4.4.b).

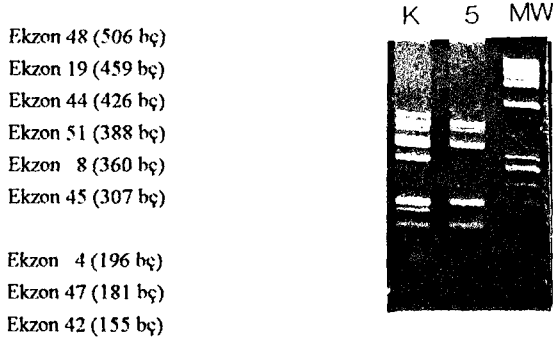


Şekil 4.4.a. Delesyon Görülen 14 Ekzonun Hastalara Göre Dağılımının Histogram ile Gösterilmesi.



Şekil 4.4.b. Delesyon Görülen 14 Ekzonun Hastalara Göre % Dağılımının Gösterilmesi.

Materyal ve metod bölümünde açıklandığı üzere, primerler multipleks PCR seti halinde kullanıldığı gibi araştırmacının arzu ettiği şekilde karışım hazırlanarak da kullanılabilir. Bu şekilde belli ekzonlar için ön tarama yapılabilmesinin yanısıra, ilgilendiğimiz ekzonların delesyon yönünden incelenmesi de mümkün olmaktadır (Şekil 4.5, 4.6).



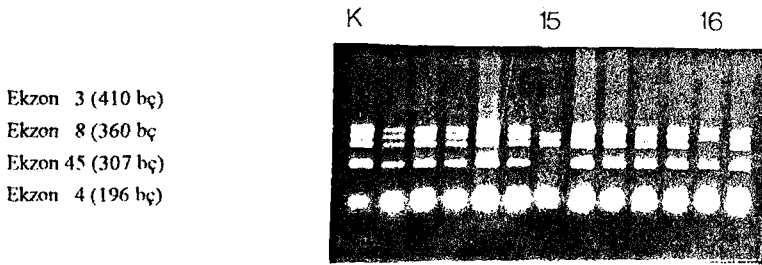
Şekil 4.5. 9 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

5 numaralı hastada 45, 47, 48 ve 51. ekzonlarda delesyon görülmektedir.

MW Φ X 174 Hae III DNA

K (Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%3 NuSieve + %1 Agaroz (0.5 μ g/ml Etidyum bromür), 120 V, 1.5 saat.



Şekil 4.6. 4 Ekzonun Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

15 numaralı hastada 3. ve 4. ekzonlarda, 16 numaralı hastada 45. ekzonda delesyon görülmektedir.

MW Φ X 174 Hae III DNA

K (Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

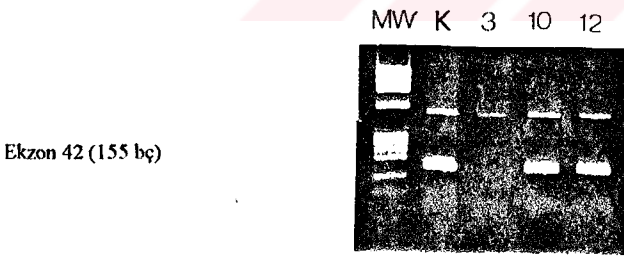
%1.5 Agaroz Jel (0.5 μ g/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

Hastada distrofin geninde görülen delesyonun proksimal kırılma (5') ve distal sonlanma (3') noktalarının lokalizasyonunun bilinmesi, klinik fenotip-genotip ilişkisinin kurulmasında çok önem taşımaktadır. Multipleks PCR metodu ile delesyonun başladığı ekzondan bir önceki ekzonda ve delesyonun en son görüldüğü ekzondan bir sonraki ekzonda delesyonun görülmemesine bağlı olarak delesyonun boyutu gösterilebilir.

1, 6, 13, 26, 33, 35 numaralı hastalarda delesyonun başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonu bilindiğine göre bu hastalarda delesyonun boyutu bellidir (Tablo 4.1).

Çalışmamızda delesyonların %68'inin genin merkezinde (Ekzon 43-52) görülmesi üzerine hastalarda DMD geninin bu bölgesindeki 42, 46, 49, 53. ekzonlar delesyon boyutunu göstermek amacıyla amplifiye edilmiştir (Şekil 4.7, 4.8, 4.9.a, 4.9.b).

10, 12 numaralı hastalarda 42. ekzon, 2, 3, 16, 19, 30, 36, 37 numaralı hastalarda 46. ekzon, 14, 17, 19, 24, 25, 29, 30 numaralı hastalarda 49. ekzon ve 4, 5, 7, 11, 17, 21, 23, 25 numaralı hastalarda 53. ekzon delesyon yönünden değerlendirilmiş ve bu ekzonlarda delesyonun görülüp görülmemesine göre hastalarda delesyonun başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonu hakkında bilgi alınmıştır.



Şekil 4.7. 42. Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

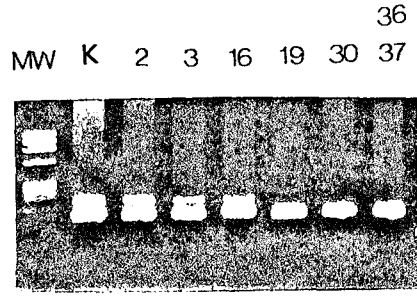
10 ve 12 numaralı hastalarda 42. ekzonda delesyon görülmemiştir. 42. ekzonda delesyon görülen 3 numaralı hasta kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bireylerde MW markerının 4. bandıyla yaklaşık aynı hizada görülen band, non spesifik bir amplifikasyon ürünüdür.

MW Φ X 174 Hae III DNA

K(Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%1.5 Agaroz Jel (0.5 μ g/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

Ekzon 46 (139 bp)



Şekil 4.8. 46. Ekzonun Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu

19, 30, 36, 37 numaralı hastalarda 46. ekzonda delesyon görülürken, 2, 3 ve 16 numaralı hastalarda aynı ekzonda delesyon görülmemiştir.

MW Φ X 174 Hae III DNA

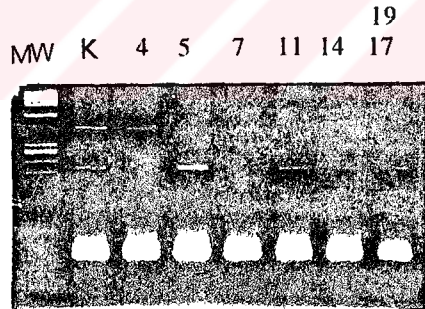
K(Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%1.5 Agaroz Jel (0.5 μ g/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

49 ve 53.ekzonlar birlikte amplifiye edildi. 14, 17, 19, 24, 25, 29 ve 30 numaralı hastalar 49. ekzon, 4, 5, 7, 11, 17, 21, 23 ve 25 numaralı hastalar 53. ekzon delesyonu yönünden değerlendirildi (Şekil 4.9.a, 4.9.b).

Ekzon 49 (439 bp)

Ekzon 53 (212 bp)



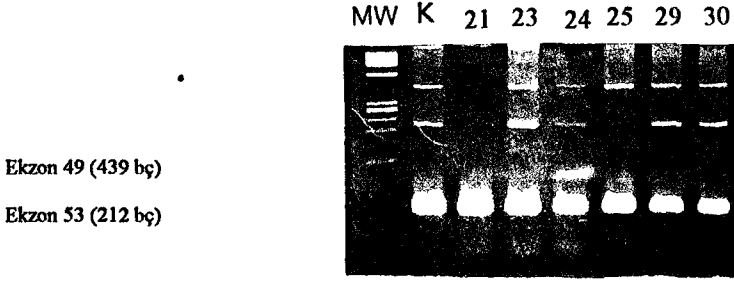
Şekil 4.9.a. 49 ve 53. Ekzonların Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

14 numaralı hastada 49. ekzonda, 4 ve 7 numaralı hastalarda 53. ekzonda delesyon görülmektedir. 17 ve 19 numaralı hastalarda 49. ekzonda; 5, 11 ve 17 numaralı hastalarda 53. ekzonda delesyon görülmemiştir.

MW Φ X 174 Hae III DNA

K(Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%3 NuSieve + %1 Agaroz Jel (0.5 μ g/ml Etidyumbromür), 120 V, 1 saat.



Şekil 4.9.b. 49 ve 53. Ekzonların Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu.

24, 25, 29 ve 30 numaralı hastaların hiç birinde 49. ekzonda delesyon görülmektedir. 21 ve 25 numaralı hastalarda 53. ekzonda delesyon görülürken, 24 numaralı hastada aynı ekzonda delesyon tespit edilmemiştir.

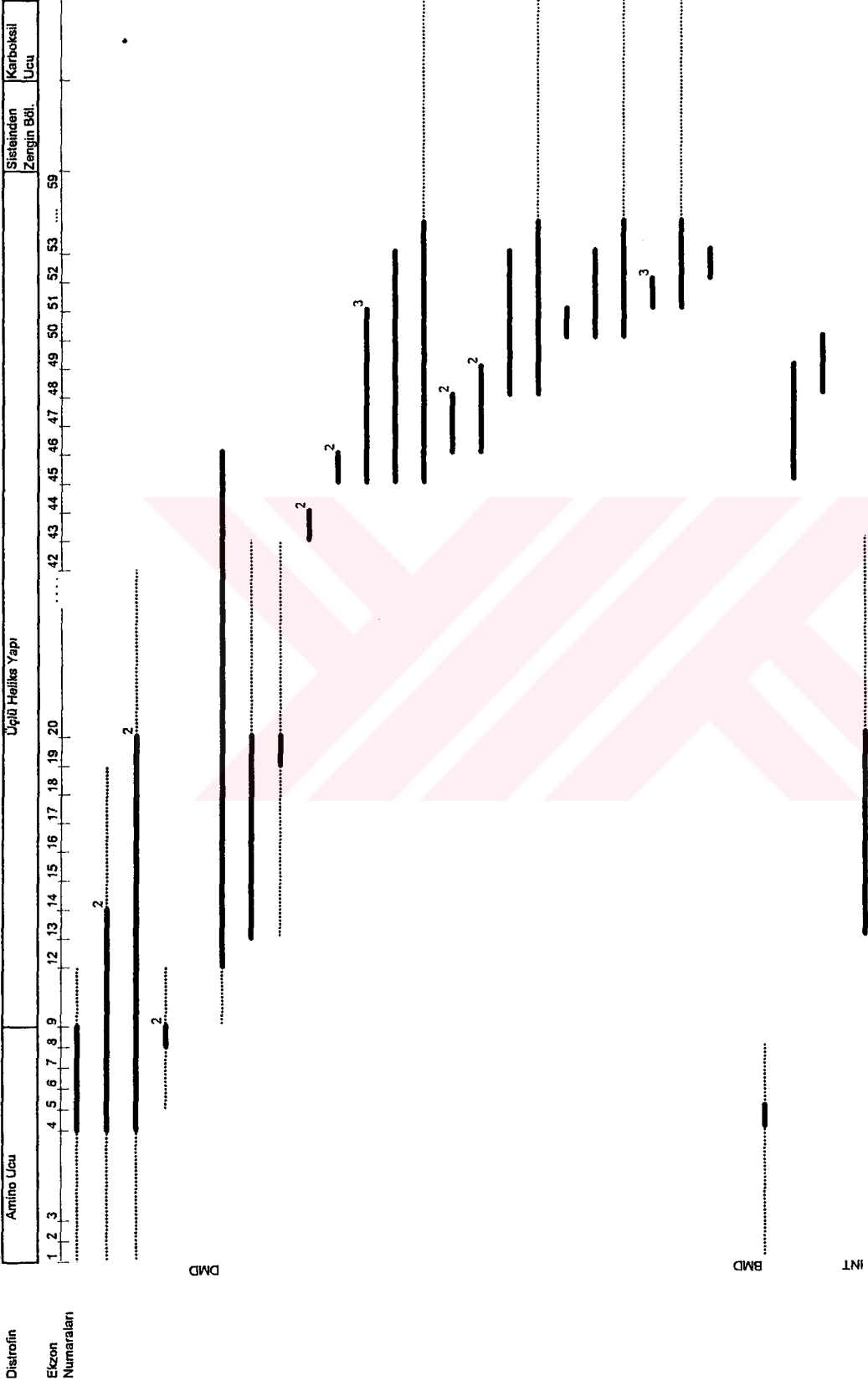
MW Φ X 174 Hae III DNA

K(Kontrol) Sağlıklı Birey DNA'sı

%3 NuSieve + %1 Agaroz Jel (0.5 μ g/ml Etidyum bromür), 120 V, 1 saat.

42, 46, 49, 53. ekzon amplifikasyonları sonucunda 15 hastada (2, 5, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 23, 24, 29, 30, 36, 37 numaralı hastalar) delesyonların başlama ve sonlanma noktalarının, 1 hastada (25 numaralı hasta) delesyonun başlama noktasının ve 1 hastada (3 numaralı hasta) delesyonun sonlanma noktasının lokalizasyonu belirlenmiştir. 4, 7 ve 21 numaralı hastalarda ise delesyonun başlama noktasının lokalizasyonu bilinmesine rağmen delesyonun sonlanma noktasının lokalizasyonu belirlenememiştir.

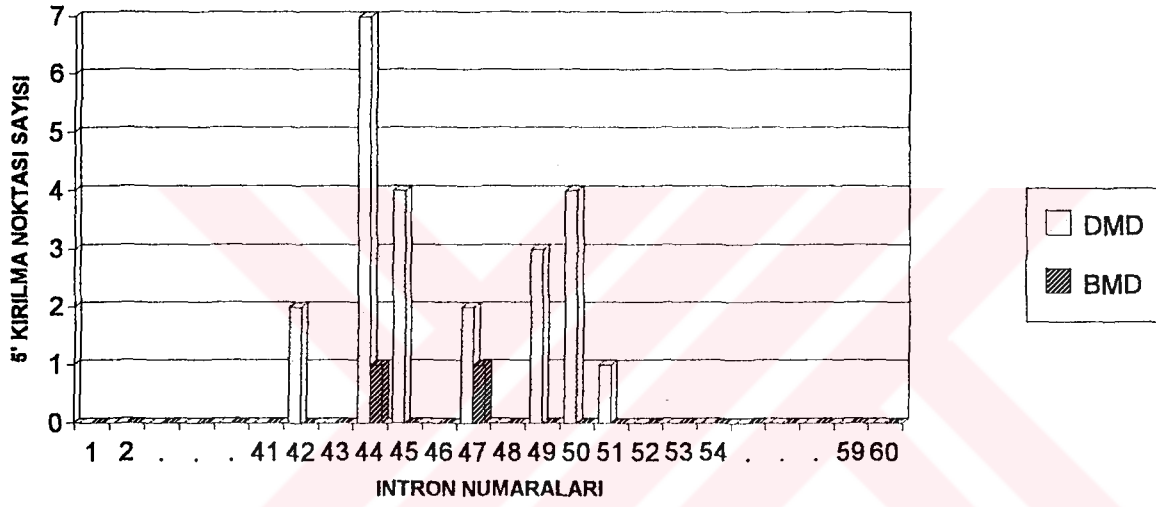
DMD geninde delesyon görülen 37 hastadaki delesyon bölgeleri Şekil 4.10'da şematik olarak gösterilmiştir. 37 hastanın 36'sında (0.97 ± 0.03), delesyonlar distrofin proteininin üçlü heliks şeklindeki tekrar bölgesinin tamamının sentezlenmemesine neden olmuştur. Bir BMD hastasında (15 numaralı hasta) proteinin amino ucunda (aktin bağlama bölgesi) delesyon görülmüştür. 3, 8, 18, 20, 27, 28, 32, 34 numaralı hastalarda delesyon bölgesi proteinin amino ucunun bir kısmını da içermektedir.



Şekil 4.10. DMD Geninde Delesyon Görülen 37 Hastaya Ait Delesyon Bölgeleri

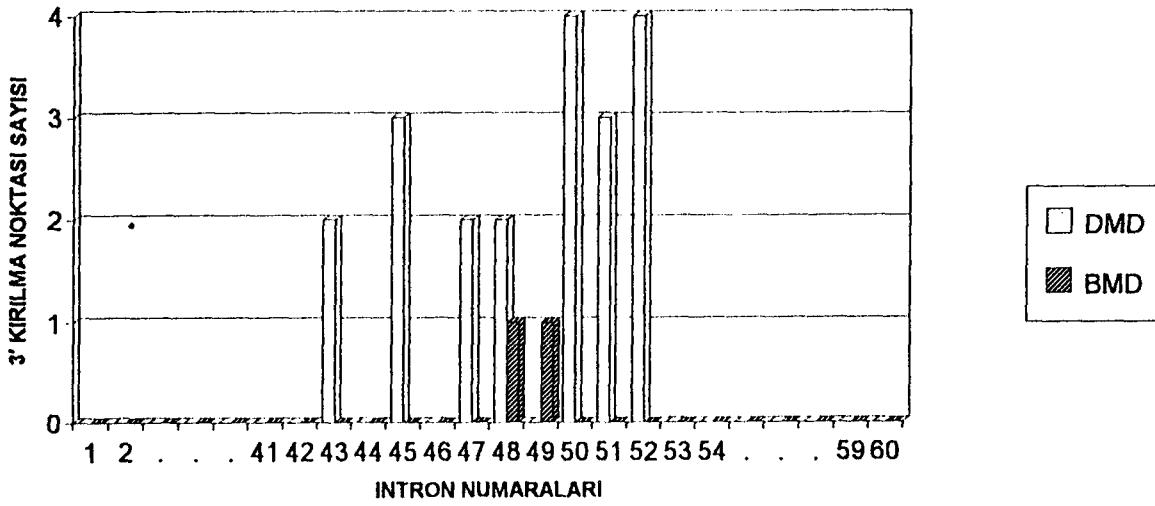
- Boyutu bilinen delesyonlar
- Boyutu bilinmeyen delesyonlar

21 hastada delesyonların başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonu çalışmanın sonucunda gösterilmiştir. Delesyonun boyutu bilinmemesine rağmen delesyonun proksimal kırılma noktasının lokalizasyonu bilinen 4 hasta (4, 7, 21 ve 25 numaralı hastalar) ve distal kırılma noktasının lokalizasyonu bilinen bir hastanın da (3 numaralı hasta) ilave edilmesiyle toplam 25 adet 5' kırılma noktasının ve 22 adet 3' kırılma noktasının lokalize olduğu intronlar belirlenmiştir (Şekil 4.11, 4.12).



Şekil 4.11. DMD Genindeki Delesyonların 5' Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İtronların Dağılımı.

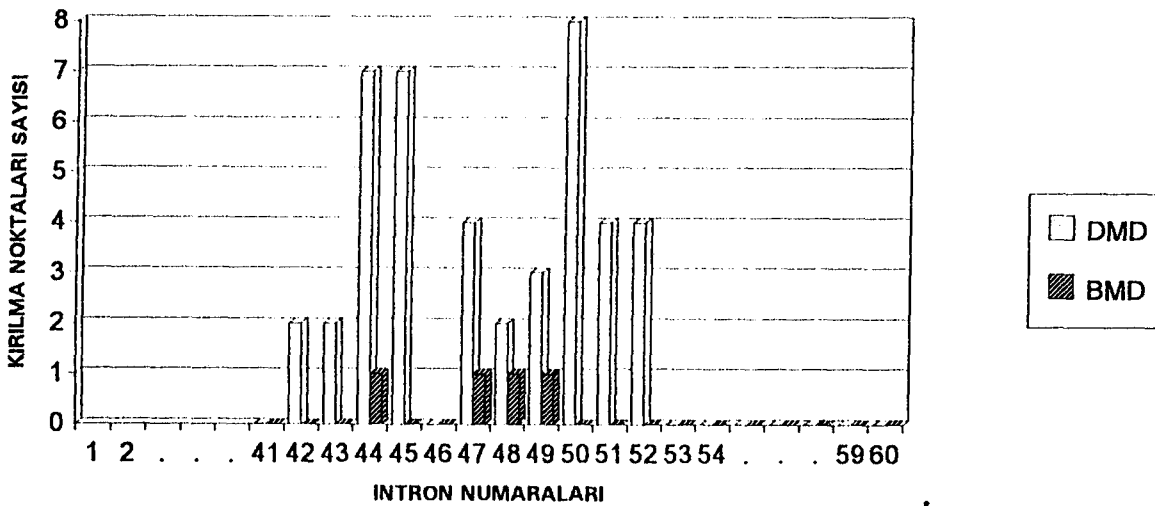
DMD hastalarında 5' kırılma noktalarının %32'si (0.32 ± 0.09) 44. intronda, %16'sı 45. intronda ve %16'sı da 50. intronda yerleşmiştir. Daha sonra sırasıyla 49, 47, 42, 51. intronlar 5' kırılma noktalarının yerleştiği intronlar olarak dağılım göstermektedir. 2 BMD hastasının 5' kırılma noktaları 44 ve 47. intronlarda yerleşmiştir.



Şekil 4.12. DMD Genindeki Delesyonların 3' Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İntronların Dağılımı.

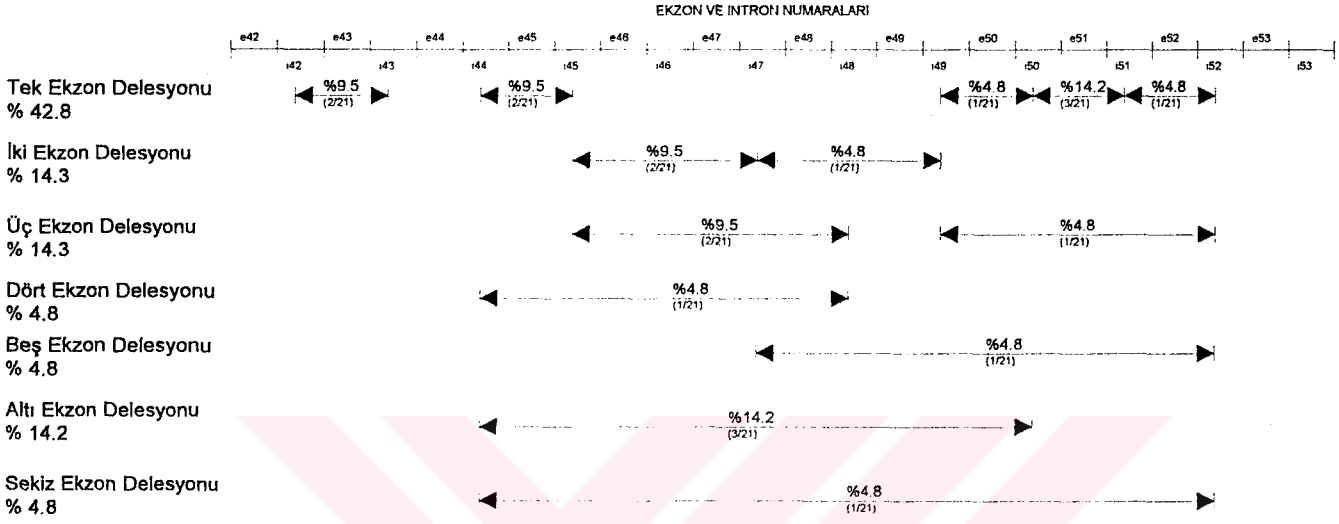
DMD hastalarında 3' kırılma noktalarının %37'si (0.37 ± 0.1) 50 ve 52. intronlarda, %27'si 45 ve 51. intronlarda, %13.5'i 48. intronda, %18'i 43 ve 47. intronlarda %4.5'i ise 49. intronda yerleşmiştir. 2 BMD hastasının 3' kırılma noktaları, 48 ve 49. intronlarda görülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda genin merkezindeki delesyon bölgesinde yer alan 2 intron (44 ve 50. intronlar) 47 adet delesyon kırılma noktasının 16'sının (0.34 ± 0.07) yerleşim yeri olarak görülmektedir. Hastaların çoğunluğunda 42. intron ile 53. intron arasındaki delesyonlar, 44. veya 50. intronda mutlaka bir kırılma noktasına sahiptir. Delesyon kırılma noktalarının 3. yerleşim yeri ise 45. İntrondur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. DMD Genindeki Delesyonların Kırılma Noktalarının Lokalize Olduğu İntronların Dağılımı.

Delesyonların başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonunun bilindiği 21 hastada delesyon görülen ekzon sayısı heterojen dağılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. DMD Genindeki Delesyon Bölgelerinde Ekzon Sayılarının Dağılımı.

21 hastanın %42.8'inde (0.43 ± 0.1) tek ekzon delesyonları görülmektedir. Tek ekzon delesyonlarının %33'ünü (0.33 ± 0.16) 51. ekzondaki delesyonlar oluşturmaktadır. 21 hastanın 15'inde üç ekzona kadar görülen delesyonlar tüm delesyonların %71'ini (0.71 ± 0.1) kapsamaktadır. 21 hastanın %14'ünde ise 45-50. ekzonlarda delesyon görülmüştür.

Çalışmamızda, delesyonların %97'si proteinin üçlü heliks şeklindeki tekrar bölgesinin eksik sentezlenmesine neden olmuştur. (Şekil 4.10). Proteinin aynı bölgesinin eksik sentezlenmesine neden olan delesyon mutasyonları DMD hastalarında ağır bir klinik tablo gösterirken BMD hastalarında hastalığın daha hafif seyrine neden olur. Bu ise delesyonun, mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini değiştirip değiştirmemesine bağlıdır. Eğer delesyon mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini değiştiriyorsa DMD, translasyonel okuma çerçevesinin devamlılığı korunuyorsa BMD fenotipi ortaya çıkar (Tablo 2.2).

DMD geninde, delesyonun başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonunun bilindiği 21 hastamızda klinik fenotip ile genotip arasındaki ilişki aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Delesyon Boyutu Bilinen 21 Hastada Klinik Fenotip-Genotip İlişkisi (Bkz. Tablo 2.2).

Klinik olarak DMD tanısı alan 19 hastada görülen delesyon mutasyonu, mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini değiştirmiştir. Klinik olarak BMD tanısı alan 2 hastada ise mRNA'nın okuma çerçevesini değiştirmeyen delesyonlar oluşmuştur.

Hasta Numaraları	Fenotip	Delesyon Boyutu	Genotip
1	DMD	45-50	Out of FRAME
2	DMD	45	Out of FRAME
5	DMD	45-52	Out of FRAME
6	DMD	45-50	Out of FRAME
10	DMD	43	Out of FRAME
11	DMD	48-52	Out of FRAME
12	DMD	43	Out of FRAME
13	DMD	51	Out of FRAME
14	BMD	48-49	IN FRAME
16	DMD	45	Out of FRAME
17	DMD	50-52	Out of FRAME
19	DMD	46-48	Out of FRAME
23	DMD	52	Out of FRAME
24	DMD	50	Out of FRAME
26	DMD	51	Out of FRAME
29	BMD	45-48	IN FRAME
30	DMD	46-48	Out of FRAME
33	DMD	51	Out of FRAME
35	DMD	45-50	Out of FRAME
36	DMD	46-47	Out of FRAME
37	DMD	46-47	Out of FRAME

21 hastanın tamamında delesyonun mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesi üzerine etkisi, klinik fenotiple uyumlu bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

DMD, Mendel kalıtımına göre geçiş gösteren X'e bağlı resesif bir hastalıktır. Hastalığın toplumdaki insidansının çok yüksek olması ve henüz uygun bir tedavi yönteminin olmaması, DMD geninin moleküler tekniklerle analizini gerektirmektedir.

DMD geninin çok büyük bir gen olması ve buna bağlı olarak mutasyona uğrama ve gen içi rekombinasyon olasılığının yüksekliği, genle ilgili mutasyonun tipini ve gen üzerindeki lokalizasyonunu saptamanın hastalığın tanısında izlenecek yolun belirlenmesinde çok önemli olacağını göstermektedir.

DMD geninin mutasyonlarını karakterize etmek mümkündür. Bunların %65'ini delesyonlar oluşturmakta ve delesyonlar direk yöntemlerle gösterilebilmektedir. Ailede hastalığa neden olan genetik hatanın delesyon olduğunun saptanması ailelere %100 doğrulukla genetik danışmanlık verilebilmesini ve prenatal yapılabilmesini sağlar. Bu nedenle, tanı almış DMD/BMD hastalarında delesyon taraması yapılarak toplumumuzda görülen delesyon oranı saptanmış ve metod standardizasyonuna gidilmiştir.

Delesyon analizi çalışmaları, Southern hibridizasyon veya polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılarak yapılmaktadır. Laboratuvarımızda prenatal tanı için ideal bir teknik olan PCR tekniği kullanılmıştır. 64 hastada genin delesyon yönünden sıcak bölgelerinde bulunan 14 ekzon iki ayrı multipleks PCR reaksiyonu halinde amplifiye edilmiş ve hastaların %55'inde DMD geninde ekzon delesyonları gösterilmiştir (Tablo 4.1).

Bölümümüzde cDNA problemleri ile yapılan delesyon taraması sonucunda 7 hastanın 6'sında 47. ekzonda delesyon görülmüştür⁸⁵. Bundan hareket ederek, multipleks PCR seti ile delesyon görülmeyen 29 hasta DNA'sı 47. ekzon delesyonu yönünden incelenmiş ve 2 DMD hastasında 47. ekzonda delesyon görülmüştür (Şekil 4.3). 2 hastanın ilavesi ile delesyon oranı %58'e çıkmıştır. 47. ekzonda delesyon görülmesi sonucunda delesyon oranının artması delesyon bilgisinin prenatal amaçlı kullanımı için çok önemli olmuştur.

Kuzey Amerika ve Avrupa popülasyonlarında yapılan çalışmalarda DMD genindeki delesyon oranı %50 ile %62 arasında değişmektedir^{27,86,87,88}.

Yaptığımız çalışmada %58 oranında bulduğumuz delesyon sıklığı literatürde bildirilen oranlarla karşılaştırıldığında, bu oranın diğer ülkelerin sonuçlarına uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç delesyonun ortak bir mekanizmayla ortaya çıktığının kanıtıdır. Çalışmamızda analize aldığımız DMD hastalarının %59'unda BMD hastalarının %43'ünde delesyon gösterilmiştir.

Delesyonların başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonunun bilindiği 21 hastada delesyona uğrayan ekzon sayısı çok heterojen dağılmasına rağmen 21 hastanın 9'unda tek ekzon delesyonları görülmüştür (Şekil 4.14). Toplumumuzda küçük bir populasyonla çalışmamıza rağmen tek ekzon delesyonları %43 oranında bulunmuştur. Bu sonuç, delesyonların sıcak bölgelerine ait ekzonların tamamının delesyon yönünden incelenmesinin delesyon yüzdesini ve buna bağlı olarak tanının hassasiyetini arttıracaklarını düşündürmektedir.

Delesyon görülen ekzonların 37 hastadaki dağılımı incelendiğinde en çok delesyon görülen ekzonların 47, 48, 50 ve 51. ekzonlar olması toplumumuz için sıcak bölgeyi özellikle 47-51. ekzonların oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4.4.a, 4.4.b). Dolayısıyla öncelikle bu sıcak bölgenin delesyon yönünden incelenmesi ve bunu takiben diğer ekzonların delesyon analizine alınması delesyon taramalarımızda izlenecek yolun belirlenmesi açısından önemli olmuştur.

Multiplik PCR setlerinin dışında elimizde primer çiftlerinin tek tek bulunması belli ekzonlar için ön tarama yapabilme imkanını sağladığı gibi, ilgilendiğimiz ekzonların delesyon yönünden incelenmesini de mümkün kılmıştır. Çalışmamızda tüm ekzonları istediğimiz kombinasyonlar halinde çalışabilmek için gerekli olan metod standardizasyonu da yapılmıştır (Şekil 4.5, 4.6).

Çalıştığımız hastaların 37'sinde gende görülen hata delesyon olmasına rağmen, hastaların DMD ve BMD olarak farklı fenotipler göstermeleri, delesyonun 5' ve 3' kırılma noktalarının intronlar üzerindeki lokalizasyonunun mRNA'nın translasyonel okuma çerçevesini ne şekilde etkilediğine bağlıdır. Bundan dolayı, delesyonların 5' ve 3' kırılma noktalarının gen üzerindeki lokalizasyonu hastalığın klinik fenotipinin belirlenmesinde çok önemli olmaktadır. Bu amaçla delesyonların birinci sıklıkla görüldüğü genin merkezinde bulunan 42, 46, 49 ve 53 ekzonlara ait primerleri kullanarak

toplam 21 hastada delesyon boyutu ve delesyonların 5' - 3' kırılma noktalarının lokalizasyonu belirlenmiştir (Şekil 4.11, 4.12). Çalışmamızda genin merkezindeki delesyon bölgelerinde 5' kırılma noktalarının %32'si 44. intronda (Şekil 4.11), 3' kırılma noktalarının %37'si ise 50 ve 52. intronlarda toplanmıştır (Şekil 4.12). 47 delesyon kırılma noktasının 16'sının (%34) 44. ve 50. intronlarda lokalize olması, bu intronların delesyonların çoğunluğunun başlama veya sonlanma noktalarını içerdiklerini göstermektedir (Şekil 4.13). DMD genindeki delesyonların kırılma noktalarının gen üzerindeki dağılımını göstermek amacıyla farklı Avrupa popülasyonlarında yapılan çalışmalarda da kırılma noktalarının %76'sı 41-60. intronlarda lokalize olduğu ve bu delesyonların 5' kırılma noktalarının çoğunlukla 44. intronda, 3' kırılma noktalarının ise 50, 51, 52. intronlarda lokalize olduğu gösterilmiştir.⁸⁹.

Çalışmamızda delesyonun başlama ve sonlanma noktalarının lokalizasyonunun bilindiği 21 hastada klinik fenotip-genotip ilişkisi incelendiğinde 19 DMD hastasında "out of frame", 2 BMD hastasında "in-frame" delesyonlar olduğu görülmüştür. Bu sonuç, klinik fenotip ile genotip arasındaki korelasyonu göstermektedir (Tablo 4.2). Delesyonun tipine göre klinik fenotipin belirlenmesi özellikle hastalığın DMD veya BMD olarak ayrımının yapılamadığı vakalarda önemli olacaktır.

Distrofin geninde "in-frame" delesyonlar görülen BMD hastalarıyla yapılan çalışmalar sonucunda hastaların 12'sinde 45-47., 10'unda 45-48., 4'ünde 45-49., 2'sinde 45-53., 1'inde 48., 2'sinde 48-49. ve 1'inde ise 48-51. ekzonlarda delesyon gösterilmiştir⁷⁰. Yaptığımız çalışmada da BMD hastalarında aynı ekzon gruplarında delesyon görülmesi, BMD delesyonlarının çok homojen dağıldığını, belirtilen ekzon bölgelerinde "in-frame" delesyonlar olduğunu ve fenotipe BMD olarak yansıdığını göstermektedir (Tablo 4.2)^{70,87,88,90}.

Beggs'in⁷⁰ BMD hastaları üzerinde yaptığı çalışmasını göz önüne alarak, aynı gen bölgesinde delesyon gösterdiğimiz 2 BMD hastasında (14 ve 29 numaralı hastalar) delesyonların proteinin tekrar bölgesinin 3' ucuna yakın bir kısmının yapılamamasına neden olması sonucunda düşük ağırlıkta veya düşük oranda protein sentezlenmiş olduğunu düşünebiliriz. Gende "in-frame" tip delesyon oluşması, mRNA'nın translasyonunun erken sonlanmasına neden olmayacağı için delesyon proteinin fonksiyon görmesini engellememiştir. 15 numaralı BMD hastasında ise delesyon boyutu bilinmemesine rağmen delesyonun distrofinin aktine bağlandığı amino ucunun sentezlenmesine engel

olması sonucunda proteinin fonksiyon görmemesi ağır bir BMD vakası olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.10).

Vainzof⁹¹, yaptığı çalışmada DMD tanısı konulan hastaların %8-%12'sinin SCARMD (Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy - DMD Benzeri Otozomal Resesif Kas Distrofisi) hastaları olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, DMD fenotipine benzer fenotip gösteren SCARMD hastalarında delesyon ayırıcı bir tanı olmaktadır. Hastalarda delesyon gösterilmesi DMD lehine bir tanı kriteri oluşturur.

Sonuç olarak, çalışmamızda 64 hasta multipleks PCR tekniği ile delesyon yönünden incelenmiş ve hastaların %58'inde delesyon gösterilmiştir. Delesyon bilgisinin prenatal ve hastalık tanısında çok önemli olduğu göz önüne alınarak, delesyon oranını arttırmak için metod standardizasyonu yapılmıştır. DMD geninde delesyon analizi için 47. ekzonun da multipleks PCR setine katılması delesyon oranını %55'den %58'e yükseltmiştir. Bunun yanısıra toplumumuz için 47-51. ekzonların birinci sıcak bölge olarak belirlenmesi, ilk olarak bu ekzonlarda delesyon taraması yapılmasının gerekliliğini göstermiştir. Tek ekzon delesyonlarının %50'ye yakın bir oranda görülmesi üzerine diğer sıcak bölgelerdeki tüm ekzonlarda delesyon analizi yapılmasının da delesyon oranının artışına etki edeceği düşünülmüştür. Bunlara ilaveten 21 hastada genin merkezindeki delesyonların başlama ve sonlanma noktaları belirlenerek klinik fenotip ile delesyon tipi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, klinik olarak DMD veya BMD ayırımının yapılamadığı hastalarda tanının kesinleşmesi için önemli olacaktır. Ayrıca çalışmamızda DMD geninin delesyon yüzdesinin artırılmasında, toplumumuzdaki DMD allel özelliklerinin karakterize edilmiş ve değerlendirilmiş olması nedeniyle, analiz edilecek ekzonları içeren multipleks PCR seti geliştirilebileceği de gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Emery AH (1987) Duchenne Muscular Dystrophy. Oxford Monographs on Medical Genetics. Oxford University Press, New York
2. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletions. *Am. J. Hum. Genet.*, 45:498-506
3. Darras BT, Koenig M, et al (1988) Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in D/BMD using the entire dystrophin cDNA. *Am. J. Med. Genet.*, 29:713-726
4. Hodgson SV, Bobrow M (1989) Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Brit. Med. Bull.*, 45:719-744
5. Sankaranarayanan K (1993) Ionizing radiation, genetic risk estimation and molecular biology: impact and inferences. *TIG*, 9:79-84
6. Davies KE, Read AP (1990) Recognizing genes. Richwood D, Male D. ed. in *Molecular Basis of Inherited Disease*. IRL Press, Oxford
7. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) Mapping and cloning human disease genes in Recombinant DNA. 2nd ed. Scientific American Books, New York
8. Moser H (1984) Duchenne Muscular Dystrophy: pathogenic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* 66: 17-40
9. Boyce FM, Beggs AH, et al (1991) Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1276-1280
10. Kingston HM, Sarfarazi M, et al (1984) Localization of the BMD gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum. Genet.*, 67: 6-17

11. Jennekens FGI, Kate LP, et al (1991) Diagnostic criteria for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy and Myotonic Dystrophy. *Neuro. Musc. Disord.*, 1: 389-391
12. Nicholson LVB, Johnson M, et al (1993) Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical and histopathological data. Part I. Trends across the clinical groups. *J. Med Genet.*, 30: 729-736
13. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel M (1987) Dystrophin: The protein product of DMD locus. *Cell*, 51:919-928
14. Hoffman EP, Fishbeck KH, Brown RH, et al (1989) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patient with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *N. Eng. J. Med.*, 318:1363-1368
15. Verellen-Dumoulin C, Freund M, et al (1984) Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non random inactivation of the normal X chromosome. *Hum. Genet.*, 67:115-119
16. Francke U, Ochs HD, et al (1985) Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of DMD, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 37:250-267
17. Davies KE, Pearson PL, et al (1983) Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the DMD locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acid. Res.*, 11:2303-2312
18. Lindlöf M, Sistonen P, De la Chapelle (1987) Linked polymorphic DNA markers in the prediction of X-linked muscular dystrophy. *Ann. Hum. Genet.*, 51:317-328
19. Worton R, Duff C, et al (1984) Duchenne muscular dystrophy involving translocations of the DMD gene next to ribosomal RNA gene. *Science*, 224: 1447-1449

- 20.**Ray PN, Bellfall B, Duff C, et al (1985) Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 318:672-675
- 21.**Kunkel M, Monaco A, et al (1985) Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of male patients with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:4778
- 22.**Monaco A, Kunkel M (1987) A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. *Trends in Genetics*, 3:33-37
- 23.**Fischbeck KH, Ritter AW, et al (1986) Recombination with pERT 87 in families with X-linked muscular dystrophy. *Lancet*, 2:104
- 24.**Monaco AP, Neve RA, et al (1986) Isolations of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323:646-650
- 25.**Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al (1987) Complete cloning of the DMD cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50:509-517
- 26.**Parrish JE, Nelson DL (1993) Methods for finding genes a major rate-limiting step in positional cloning. *GATA* 10:29-41
- 27.**Den Dunnen JT, Grootsholten PM, et al (1989) Topography of the DMD gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am. J. Hum. Genet.*, 45:835-847
- 28.**Darras BT, Blatter P, et al (1988) Intragenic deletions in 21 DMD/BMD families studied with the dystrophin cDNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 43:620-629
- 29.**Darras BT, Franke U (1988) Normal human genomic restriction patterns and polymorphisms revealed by hybridization with the entire dystrophin cDNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 43:612-619
- 30.**Hu X, Ray P (1990) Duplicational mutation at the DMD locus: its frequency, distribution, origin and phenotype/genotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.*, 46:682-695

- 31.**Saiki RK, Gelfand DH, et al (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
- 32.**Chamberlain JS, Gibbs RA, et al (1988) Deletion screening of the DMD locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*, 16:11141-11156
- 33.**Chamberlain JS, Gibbs RA, et al (1990) Multiplex PCR for the diagnosis of DMD. Innis MA, Gelford DH (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York 272-281
- 34.**Beggs AH, Koenig M, et al (1990) Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86:45-48
- 35.**Abbs S, Yau S, et al (1991) A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridization shows mistyping by both methods. *J. Med. Genet.*, 28:304-311
- 36.**Covone AE, Caroli F, Romeo G (1992) Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR. *Am. J. Hum. Genet.*, 51:675-677
- 37.**Sheffield LJ (1993) DNA diagnosis tests: presymptomatic and prenatal. *Med. J. Australia*, 158:349-352
- 38.**Chamberlain JS, Dimnik LS, Covone AE, et al (Multicenter Study Group) (1992) Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. *JAMA* 267:2609-2615
- 39.**Prior WT (1991) Genetic analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 115:984-990
- 40.**Mao Y, Cremer M (1989) Detection of DMD carriers by dosage analysis using the DMD cDNA clone 8. *Hum. Genet.*, 81:193-195.
- 41.**Bejjani B, Finn P (1991) The value of deletion analysis for carrier detection in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Clin. Genet.*,39:245-252

42. Kodaira M, Hiyama K, Karakawa T, et al (1993) Duplication detection in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients and identification of carriers with partial gene deletions using pulsed-field gel electrophoresis. *Hum. Genet.*, 92:237-243
43. Love DR (1991) Sequence of function fragments in the deletion prone region of the dystrophin gene. *Genomics*, 10:56-67
44. Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM (1991) Rapid detection of CA polymorphisms in clone DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 48:621-627
45. Oudet C, Hanaver A, et al (1992) Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum. Mol. Genet.*, 1:599-603
46. Clemens PR, Fenwick RG, et al (1991) Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 49:951-960
47. Abbs S, Bobrow M (1992) Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J. Med. Genet.*, 29:191-196
48. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, et al (1990) Determination of carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies by quantitative polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotides. *Clin. Chem.*, 36:2113-2117
49. Ioannov P, Christopoulos G, et al (1992) Detection of Duchenne and Becker muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex polymerase chain reaction analysis. *Neurology*, 42:1783-1790
50. Roberts RG, Bentley DR, et al (1990) Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet*, 336:1523-1526

51. Richards R, Friend K (1991) Determination of Duchenne muscular dystrophy carrier status by single strand conformation polymorphism analysis of deleted regions of the dystrophin locus. *J. Med. Genet.*, 28:856-859
52. Abbs S, Bobrow M (1993) Report on the 16th ENMC workshop-carrier diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc. Disord.*, 3:241-241
53. Anthonie J van Essen, Abbs S, Baiget M, et al (1992) Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum. Genet.*, 88:249-257
54. Covone AE, Lerone M, Romeo G (1991) Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. *Hum. Genet.*, 7:353-360
55. Zatz M, Passos-Bueno MR, Rapaport D, et al (1991) Familial occurrence of Duchenne dystrophy through paternal lines in four families. *Am. J. Med. Genet.* 38:80-84
56. Davies KE, Read AP (1990) The Molecular basis of human inherited disease. Richwood D, Male D. ed. in *Molecular Basis of Inherited Disease*. IRL Press, Oxford
57. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, et al (1990) Accurate Assessment of Intragenic Recombination Frequency within the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Genomics* 7:602-606
58. Blonden LAJ, Grootsholten PM, Dunnen JT, et al (1991) 242 breakpoints in the 200-kb deletion-prone P20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics*, 10:631-639
59. Pizzuti A, Pieretti M, Fenwick RG, et al (1992) A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics*, 13:594-600
60. Roberts RG, Cole CG, Hart KA, et al (1989) Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acid Res.*, 17:811

61. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) DNA-based diagnosis of genetic diseases in Recombinant DNA. 2nd ed. Scientific American Books, New York
62. Koenig M, Monaco S, Kunkel LM (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53:219-228
63. Ohlendieck K, Campbell KP (1991) Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 283:230-234
64. Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66:1121-1131
65. Luna EJ, Hitt AL (1992) Cytoskeleton-Plasma Membrane Interactions. *Science*, 258:955-964
66. Matsumura K, Campbell KP (1993) Deficiency of dystrophin-associated proteins: a common mechanism leading to muscle cell necrosis in severe childhood muscular dystrophies. *Neuromusc. Disord.*, 3:109-118
67. Matsumura K, Tome F, Collin H, et al (1992) Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature*, 359:320-322
68. Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, et al (1993) Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43:795-800
69. Monaco AP, Bertelson CJ, et al (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 2:90-95
70. Beggs AH, Hoffman EP, et al (1991) Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.* 49:54-67

71. Arahata K, Beggs AH, et al (1991) Preservation of C terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 101:148-156.
72. Darras BT, Francke V (1988) Myopathy in complex glycerol kinase deficiency patients is due to 3' deletions of the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 43:126-130
73. Monaco A, Kunkel M (1988) Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Adv. Hum. Genet.*, 17:61-98
74. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, et al (1989) Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions with deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 45:507-520
75. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, et al (1989) Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 337:176-179
76. Law PK, Bertorini TE, Goodwin TG, et al (1990) Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*, 336:114-115
77. D'Urso M, Zucchi I (1990) Human glucose 6 phosphate de hydrogenase gene carried on a yeast artificial chromosome encodes active enzyme in monkey cells. *Genomics*, 7:531-534
78. Huxley C, Hagino Y, Srivastava A, et al (1991) The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is a functional when transferred to mouse cells by cell fusion. *Genomics*, 9:742-750
79. Monaco PA, Walker AP, Millwood I, et al (1992) A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*, 12: 465-473
80. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, et al (1992) Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum. Mol. Genet.*, 1:19-28

- 81.**Maniatis T, Fritsch EF, et al (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 82.**Gibbs RA, Chamberlain JS, Caskey CT (1989) Principles and applications for DNA amplification. Erlich H.A. ed. in *PCR Technology*, Stocktan Press, New York
- 83.**Topaloğlu H, Dinçer P, Ayter Ő, et al (1993) An unusual case of Duchenne muscular dystrophy. *Brain and Development*, 15:313-315
- 84.**Saraçbaşı O, Karaađaođlu E, Saka O (1986) *Basic programlama ve istatistiksel yöntemler, Ünalın ofset, Ankara*
- 85.**Erdem H, Ayter Ő, Özgüç M, et al (1993) Deletion analysis of Duchenne Muscular Dystrophy. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 35:15-21
- 86.**Upadhyaya M, Smith RA, et al (1990) Intragenic deletions in 164 boys with DMD studied with dystrophin cDNA. *Clin. Genet.*, 37:456-462
- 87.**Simard LR, Gingras F, Delvoye N, et al (1992) Deletions in the dystrophin gene: analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in Quebec. *Hum. Genet.*, 89:419-424
- 88.**Claustres M, Tuffery S, et al (1991) Molecular deletion patterns in families from Southern France with Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Hum. Genet.* 88:179-184
- 89.**Danieli GA, Mioni F, Müller CR, et al (1993) Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum. Genet.*, 91:342-346
- 90.**Seyde SN, Slomski R, Rininsland F, et al (1992) Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Genet.*, 90:65-70
- 91.**Vainzof M, Pavanello RCM, et al (1991) Screening of male patients with autosomal recessive Duchenne dystrophy through dystrophin and DNA studies. *Am. J. Med. Genet.*,39:38-41

EK

PRİMER DİZİLERİ

<u>EKZON</u>	<u>DİZİ (5' - 3')</u>
PmF	GAA GAT CTA GAC AGT GGA TAC ATA ACA AAT GCA TG
PmR	TTC TCC GAA GGT AAT TGC CTC CCA GAT CTG AGT CC
3F	TCA TCC ATC ATC TTC GGC AGA TTA A
3R	CAG GCG GTA GAG TAT GCC AAA TGA AAA TCA
4F	TTG TCG GTC TCC TGC TGG TCA GTG
4R	CAA AGC CCT CAC TCA AAC ATG AAG C
6F	CCA CAT GTA GGT CAA AAA TGT AAT GAA
6R	GTC TCA GTA ATC TTC TTA CCT ATG ACT ATG G
8F	GTC CTT TAC ACA CTT TAC CTG TTG AG
8R	GGC CTC ATT CTC ATG TTC TAA TTA G
12F	GAT AGT GGG CTT TAC TTA CAT CCT TC
12R	GAA AGC ACG CAA CAT AAG ATA CAC CT
13F	AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA AT
13R	CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G
17F	GAC TTT CGA TGT TGA GAT TAC TTT CCC
17R	AAG CTT GAG ATG CTC TCA CCT TTT CC
19F	TTC TAC CAC ATC CCA TTT TCT TCC A
19R	GAT GGC AAA AGT GTT GAG AAA AAG TC
42F	CAC ACT GTC CGT GAA GAA ACG ATG ATG
42R	TTA GCA CAG AGG TCA GGA GCA TTG AG
43F	GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG
43R	ATA TAT GTG TTA CCT ACC CTT GTC GGT CC
44F	GTT GTG TGT ACA TCG TAG GTG TGT A
44R	TCC ATC ACC CTT CAG AAC CTG ATC T
45F	CTT TCT TTG CCA GTA CAA CTG CAT GTG
45R	CAT TCC TAT TAG ATC TGT CGC CCT AC
46F	AAG AAC AAA AGA ATA TCT TGT CAG
46R	GAC TTG CTC AAG CTT TTC TTT TA
47F	CGT TGT TGC ATT TGT CTG CAG TTA C
47R	GTC TAA CCT TTA TCC ACT GGA GAT TTG
48F	TTG AAT ACA TTG GTT AAA TCC CAA CAT G

48R CCT GAA TAA AGT CTT GCT TAC CAC AC
49F GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG
49R GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C
50F CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T
50R TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G
51F GAA ATT GGC TCT TTA GCT TGT GTT TC
51R GGA GAG TAA AGT GAT TGG TGG AAA ATC
52F AAT GCA GGA TTT GGA ACA GAG GCG TCC
52R TTC GAT CCG TAA TGA TTG TTC TAG CCT C
53F TTG AAA GAA TTC AGA ATC AGT GGG ATG
53R CCT GGT TTC TGT GAT TTT CTT TTG GAT TG

Referans: 32, 34, 35, 62.

Primerlerin bir kısmı aşağıda isimleri verilen laboratuvarlar tarafından hediye edilmiştir.

Dr.Gabriella Fisher, Clinical Resource Centre, London, United Kingdom.

Dr. Stephen Abbs, Pediatric Research Unit, Division of Medical and Molecular Genetics, Guy's Hospital, London, United Kingdom.

Diğer primerler ise Microsynth-İsviçre, Baylor College/Texas-U.S.A. laboratuvarlarından satın alınmıştır.