

71207

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

ANİ ÇOCUK ÖLÜMLERİNİN ORTA ZİNCİR AÇİLDEHİDROGENAZ
ENZİM BOZUKLUĞU İLE İLİŞKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilüfer BOZKURT

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Turgay İsbir

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM VE KÜLTÜR
BULVARINDA YER ALAN

İstanbul - 1998



Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonu 'na Desteklenmiştir. Proje no : T - 298 / 301096



Tezimin hazırlanmasında ilgisini ve desteğini
esirgemeyen danışmanım Sayın Prof.Dr.Turgay İsbir 'e,
çalışmalarına destek olan Sayın Ass.Prof.Dr.Paolo
Fortina' ya, örneklerin toplanmasına yardımcı olan Sayın
Dr. Zuhale Eren 'e , değerli çalışma arkadaşlarıma ve
fedakar aileme sonsuz teşekkürler...

2. İÇİNDEKİLER

1. **GİRİŞ VE AMAÇ.....1 - 2**
2. **GENEL BİLGİLER.....3 - 20**
 - 2.1. Memeli dokusunda mitokondri metabolizmasının düzenlenmesi
 - 2.2. Mitokondride yağ asitleri oksidasyonu
 - 2.3. Beta Oksidasyon Enzimleri
 - 2.4. Orta Zincirli Açıl KoA Dehidrogenazlar ' ın (MCAD) yapısı ve mutasyonları
 - 2.5. Açıl Ko A bozuklukları.
3. **MATERYAL METOD.....21-30**
 - 3.1. Materyal
 - 3.1.1. Seçilen örneklerin tanımı
 - 3.1.2. Araştırmalarda kullanılan kimyasal maddeler
 - 3.1.3. Araştırmalarda kullanılan gereçler
 - 3.1.4. Araştırmalarda kullanılan çözeltiler
 - 3.1.4.1. DNA İzolasyonunda kullanılan çözeltiler
 - 3.2. Araştırmalarda kullanılan yöntemler
 - 3.2.1. Periferik kanda DNA izolasyonu
 - 3.2.2. Hazırlanan örneklerde DNA saflık tayinleri
 - 3.2.3. DNA düzeylerinin hesaplanması

3.2.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA da MCAD geni Exon 11 bölgesinin çoğaltılması	
3.2.4.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA da MCAD geni Exon 11 bölgesinin çoğaltılması için amplifikasyon koşulu	
3.2.4.2.	Dizileme öncesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin temizlenmesi	
3.2.4.3.	Temizlik sonrası dizilenecek PCR ürünlerin kontrolü	
3.2.4.3.1.	Agaroz jel elektroforezi	
3.2.5.	Örneklerin dizileme yapmak üzere hazırlanması	
3.2.6.	MCAD Exon 11 gen bölgesi Dizileme için Polimeraz Zincir Reaksiyonu	
3.2.6.1.	MCAD Exon 11 gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu amplifikasyon koşulu	
3.2.7.	MCAD Exon 11 gen bölgesi A 985 G bölgesi kesiminde kullanmak üzere Polimeraz Zincir Reaksiyonu	
3.2.7.1.	MCAD Exon 11 gen bölgesi A 985 G bölgesi kesiminde kullanmak üzere Polimeraz Zincir Reaksiyon amplifikasyon koşulu	
3.2.8.	Reastriksiyon enzim kesimi	
3.2.9.	% 2 lik Agaroz jelin hazırlanması	
3.2.10.	Dizileme reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi	
3.2.11.	Bulguların değerlendirilmesi	
4.	BULGULAR.....	31-40
5.	TARTIŞMA.....	41 - 43
6.	ÖZET.....	44
7.	SUMMARY.....	45

8.	ÖZGEÇMİŞ.....	46
9.	KAYNAKLAR.....	47 - 53
10.	EKLER.....	54 - 65



1.GİRİŞ VE AMAC

Amerika Birleşik Devletleri ve bazı Kuzey Avrupa ülkelerinde orta zincir asil Ko A dehidrogenaz (MCAD) bozukluğunun ani bebek ölümlerinin nedenlerinden biri olduğu ve bebeklerde sık rastlanan fenilketonüriye oranla daha yaygın olarak görüldüğü çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir⁴¹ . Özellikle kuzey Avrupa toplumlarında 1 / 6000 ila 1/ 10000 arası değişen sıklıkta , 1/ 68 ila 1/ 150 taşıyıcı frekansı ile gözleendiği rapor edilmiştir⁹.

Söz konusu enzim eksikliği içeren çocuklarda orta zincirli yağ asitleri metabolize olamadıkları ve doğum sırasında ve sonrasında fiziki bir bozukluğa rastlanmamasına karşın özellikle ilk iki yılda gelişme ve davranış bozukluğu , kronik kas zayıflığı gibi bozukluklar ile tanımlanmaktadır^{20,22,41} .

Yapılan arştırmalarda 1. Kromozom üzerinde bulunan 12 ekzonluk gen üzerinde özellikle 3,4,6,8,9 ve 11. ekzonlarda çeşitli mutasyonlara rastlanmıştır^{2,21,45,42} . Araştırmacıların ilgisi en çok mutasyonların gözleendiği 11.Ekzonda yoğunlaşmıştır. Üzerinde 11 sıcak nokta görülen bu exondaki A 985 G mutasyonunun MCAD enzim bozukluklarının % 90 kadarından sorumlu olduğu rapor edilmiş olup enzim bozukluğunun Reye Sendromuna benzer bir klinik tablo¹ ile ani bebek ölümlerinin (SID) muhtemel metabolik sebeplerinin yaklaşık % 80'ini oluşturduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir^{8,13,27,35} . Protein düzeyinde ise ekzon 11, MCAD tetramerinin oluşmasını sağlayan aminoasitlerin kodlanmasını sağladığı ve mutasyonun Lys →Glu değişimine sebep olduğu gösterilmiştir^{20,46} . Bebekleri MCAD bozukluğu yüzünden ölen ailelerin doğacak çocukları içinde bu bozukluğun bir risk faktörü oluşturduğu savı gün geçtikçe taraftar toplamaktadır. Bu nedenle MCAD

bozukluğu taşıyan çocuklara sahip ailelerde doğum öncesi MCAD geni ile ilgili tanı önem kazanmaktadır^{35,47}. Ayrıca böyle bir risk taşıyan bebeklerin izlenmesi, olası bir MCAD bozukluğunda beslenmenin değiştirilmesi , bebekteki açlığın engellenmesi ve böylelikle MCAD bozukluğunun sebep olabileceği ani bebek ölümlerinin görülme oranının azalabileceği görüşü ileri sürülmüştür^{21,41,45}.

Yaptığımız literatür çalışması sonucu konu ile ilgili ülkemiz için yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda random seçilen bebeklerde exon 11 üzerinde MCAD enziminin mutasyon dağılımının gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca gen bölgesinde görülen mutasyonla ani bebek ölümleri arasındaki korelasyonu incelemek ve elde edilen sonuçlar ışığında erken tanı ve tedavi yaklaşımlarının yakalanabilmesine destek olmak, böylesi kolay bir tedavi yolu ile bu kadar ciddi bir problemin üstesinden gelinmesine katkıda bulunabileceği görüşünden hareket edilerek bu çalışma planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİ

Organizmanın enerji metabolizmasını denetleyen ve hücrenin oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarını düzenleyen mitokondriler sitoplazma içerisinde bulunan metabolitlerin kimyasal enerjiye dönüştürülmesinden sorumludur. Söz konusu enerji Adenozin Trifosfat (ATP) şeklinde korunmaktadır. ATP şeklinde korunan bu enerjinin hücre tarafından elektrik, mekanik, ozmotik veya kimyasal bir görev sırasında serbest bırakıldığı kanıtlanmıştır^{14,18}.

Mitokondri yalnız enerji metabolizmasını denetlemekle kalmayıp aşağıda özetlediğimiz görevleri de bünyesinde toplamaktadır^{19,23,25}.

A) Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezleri için gerekli olan pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezlerinden sorumludur.

B) Mitokondriyel ribozomlarda genellikle yapısal amaçla kullanılacak proteinlerin sentezlenmesinden sorumludur.

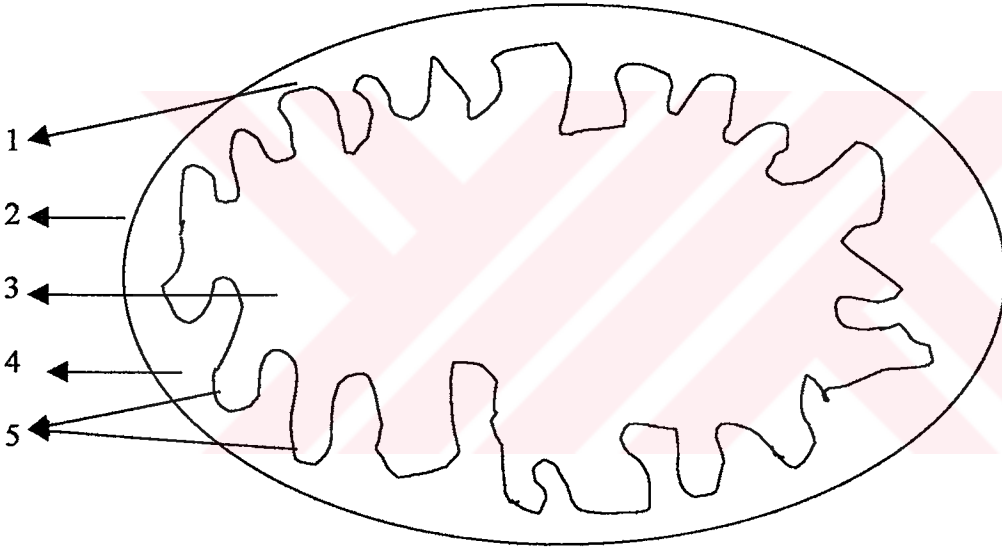
C) Piruvatın oksidatif dekarboksilasyonundan sorumludur.

D) Doymamış yağ asitleri sentezini, yağ asit zincirlerinin uzatılmasını, membran yapısına giren fosfatidlerin sentezinin gerçekleşmesi, yağ asitlerinin β - oksidasyonundan sorumludur.

E) TCA siklusundan sorumludur.

F) Ayrıca yukarıda kısaca özetlediğimiz görevlerin dışında iç membranında bulunan bir dizi taşıyıcı sistem ile hücre içi anyon ve katyon dengesini koruduğu gösterilmiştir

Görevlerini yukarıda kısaca özetlediğimiz mitokondriler, sayıları, büyüklükleri, şekilleri incelemeye alınan doku ve dokunun alındığı canlı türüne bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte tüm canlıların mitokondrileri her biri 6 – 8 nm kalınlığında olan iki zarla çevrili olduğu gösterilmiştir^{14,26}. İç ve dış zarlar arasında 4–8 nm kalınlığında bir boşluk mevcuttur ve iç zarın çevrelediği bölüm ise matriks olarak tanımlanmıştır^{34,4}. Dış zarın düz olmasına karşılık iç zar matrikse doğru krista olarak isimlendirilen uzantılar gösterir. Kristalar mitokondri iç zar yüzeyinin dışa oranla 4 kat daha fazla geniş olmasına neden olmaktadır.



Şekil(1): Mitokondri kesiti

1. İç zar , 2. Dış zar , 3.Matriks , 4.Zarlar arası boşluk, 5.Krista

Dış ve iç zarlar hem görünüm hem de yapıları bakımında farklılık göstermektedir. Örneğin her zar tabakasında protein ve lipid oranı birbirinden farklıdır. İç zarda biyolojik aktiviteye sahip yaklaşık 60 protein tanımı yapılmıştır. Bunlara örnek olarak elektron transfer proteinleri, enzimler, anyon-katyonu tanıyan proteinleri verebiliriz. Bu proteinler mitokondri

iç zarında asimetrik bir şekilde yerleşmiş olduğu gösterilmiştir. Ayrıca solunum zincirine ait elektron taşıyıcılar ve bazı sitokromlar belirli bir sıra ile ve birbirini takip eden vektöryel şekilde matriksin içerisinde veya sistole yakın olarak dizilmişlerdir.

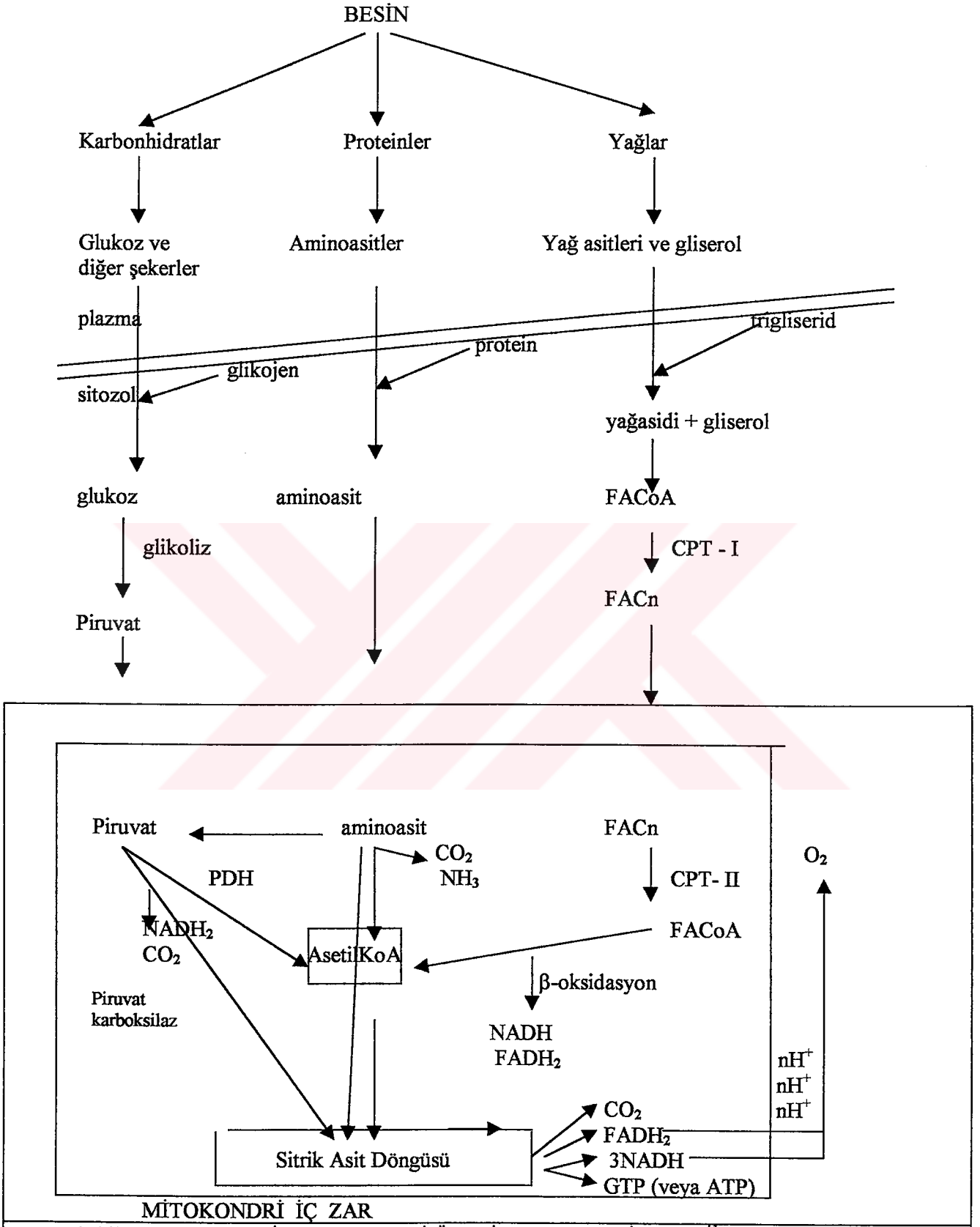
Mitokondri matriksinde dehidrogenazlar, DNA, mitokondriyel RNA, nükleotidler ve inorganik iyonlar mevcuttur³⁴.

İç mitokondri zarının bir diğer özelliği ise baş, sap, ve bazal kısım olmak üzere üç ayrı bölümden oluşan elemanter partiküller içermesidir. Söz konusu elemanter partiküller ATP molekülünün sentezi ve hidrolizinden sorumludur¹². Lipoprotein yapısında olan ve Adenozin S Trifosfaz (ATPaz) diye isimlendirilen kompleksin 12 alt birimi birbirinden ayrılabilmiştir. Kompleksin baş kısmını oluşturan ve F₁-ATPaz diye tanımlanan kısım molekül ağırlıkları 7000–60000 Dalton arası değişen beş ayrı polipeptid zincirinden meydana gelmiştir^{4,32}. Adenozin difosfat (ADP) ve Adenozin Trifosfat (ATP) molekülleri α , β , γ , δ ve Σ olarak tanımlanan bu zincirlerden alfa veya beta alt birimlerine bağlandığı düşünülmektedir^{33,37}. Bir mol F₁-ATPaz'ın 3 mol ATP ve 2 mol ADP ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir⁴¹.

Kardiomiyosit gibi yüksek enerji gereksinimli aktif hücrelerde gereken ATP'nin çoğunu mitokondri sağlar. Kardiyak dokuya oksijenin az gittiği dönemlerde kontraktıl fonksiyon kaybının hayati tehlike yarattığı, daha az enerji gereksinimli hücrelerde genetik bir bozukluk veya ksenebiotiklere maruz kalmak gibi dış etkenler sebebiyle mitokondriyel aerobik ATP üretimi azaldığında zarar görebildikleri belirtilmiştir⁴¹.

2.1. MEMELİ DOKUSUNDA MİTOKONDİRİ METABOLİZMASININ DÜZENLENMESİ:

Memeli hücrelerinde ATP üretimi için gerekli enerji yiyeceklerin oksidasyonu ile gerçekleşir. Üretim özellikle mitokondri matriksinde gerçekleşir. Hücrelerde gerçekleşen üç basamaklı enerji üretim mekanizması şekil 2 ile gösterilmiştir.



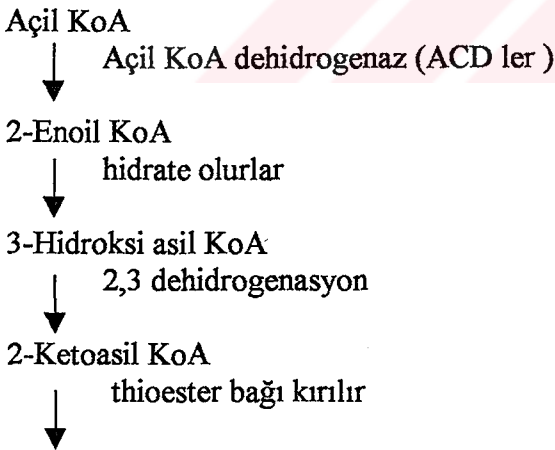
Şekil (2) MEMELİLERDE ENERJİ ÜRETİM METABOLİZMASI⁴¹

Enerji üretiminin ilk basamağında moleküller, Asetil KoA ya kadar yıkılırlar. İkinci basamakta ise Asetil KoA Sitrik asit döngüsünde dehidrogenazların elektronları ayırması ile okside olmaktadır. Üçüncü basamakta ise elektronlardaki redoks enerji protonları mitokondriyel iç zardan atmak için kullanılır. Bu sistem ATP üretimi için kullanılmaktadır. Bu yüzden enerjinin çoğu üçüncü basamakta üretilmektedir^{41,13}.

Organizmalar devamlı değişen miktarlarda enerjiye gereksinim duymaktadırlar. Organların gereksinimleri olan enerji miktarında farklılıkgöstermektedir, ve canlılar bu değişen isteğe homeostas ile depo enerjiiyi doğru kullanma ve mitokondrilerin sayı , büyüklük ve hücre içi dağılımları buldukları organa bağlı olması sayesinde karşı koyabilmektedirler. Memeli organizmaların bir tek hücresinde hücreye gereken enerji ile orantılı olarak birkaç yüz ile birkaç bin arasında mitakondri olduğu bildirilmiştir⁴¹.

Egzersiz yapan bir bireyin kalbi dinlenme anının yaklaşık altı katı çalışır ve normalde üretilen yaklaşık 50 g ATP yerine 200 kg ATP üretilir. Canlılar böyle durumlarda triasilgliserol, glikojen gibi enerji depolarını kullanarak gerekli enerjiiyi sağlamaktadır. Böylesi değişken enerji miktarına sahip olduğu için memeliler yakıt oksidasyonunu ve dolayısı ile ATP üretimini kontrol eden zor fakat verimli bir olay geliştirmişlerdir. β - Oksidasyon mekanizmasının kontrolü substrat miktarına , Ko faktörlerin tekrarlı kullanımına , ve Asetil KoA'ların atılımına bağlıdır. Bu faktörler bireyin metabolik durumuna ve diğer metabolitleri miktarına göre değişiklik gösterir. Açıl gurplarının mitokondriye girişi bu enzim malonil KoA ile engellendiğinden CPT1 ile düzenlenir. Mitokondriyel matriks içinde Açıl KoA dehidrogenazlar ürün inhibisyonu ve mitakondrinin redoks durumu ile düzenlenir. Açıl KoA dehidrogenazlar 2-enoil KoA, 3-hidroksi KoA ve 3-okso Asil KoA esterleri ile inhibe edilirler^{1,7,41}.

2.2. MİTOKONDRİDE YAĞ ASİTLERİ OKSİDASYONU :Yağ asitleri egzersiz ve açlık dönemlerinde adipoz dokudan serum albumine bağlı olarak veya triaçilgliserollere bağlı lipoproteinler şeklinde mobilize olur. Mitokondri matriksinde β -oksidasyonun her döngüsünde yağ asit molekülünün β -karbonundan iki karbonlu asetil KoA ünitesi , bir molekül NADH , bir molekül FADH₂ nin ayrılması ve arka arkaya gerçekleşen FAD a bağlı oksidasyon, hidrasyon, NAD⁺ a bağlı oksidasyon ve son olarak KoA ile tioliz(thiolysis) ile gerçekleşmektedir ^{1,7,40}. Mitokondriyel β - Oksidasyon reaksiyonunun ilk basamağında Açıl KoA trans 2-enoil KoA oluşturmak üzere açıl KoA dehidrogenaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla dehidrogenasyona uğrar^{40,41,44}. Bu enzim katalizlediği asid zincirinin uzunluğuna göre kısa, orta , veya uzun zincir açıl Ko A dehidrogenaz ismini almaktadır. İkinci reaksiyon 2-enoil KoA esterlerinin 3-hidroksiasil KoA esterleri vermek üzere hidrasyonu olup bunu takipte üçüncü basamakta bu esterler 3-oksoasil KoA esterleri oluşturmak üzere dehidrasyona uğramaktadır. Dördüncü ve son basamakta ise 3-oksoasil KoA esterleri 2 karbon kısa asetil KoA ve asil KoA üretmek üzere tiolotik kesime uğrarlar (Şekil 3)⁴¹.



Şekil 3: Beta oksidasyon döngüsü

β -Oksidasyon açlık ve metabolik stres dönemlerinde vücut için önemli bir enerji kaynağıdır.Yağ depolarının yıkımı veya besin kaynaklarından kana aktarılan serbest yağ asitleri iki iç bölümde, mitokondri ve peroksizomda metabolize olurlar. Mitokondriyel

oksidasyon 20 ve daha az karbon sayısına sahip yağ asitlerinden peroksizom ise daha uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumludur.

Mitokondriyel β -oksidasyon aktive olan açil Ko A parçalarını transfer eden ve sırayla 2 karbonlu asetil Ko A parçalarını ayıran bir sistemdir. Bu parçacıklar daha sonra trikarboksilik asit döngüsünde keton cisimcikleri oluşturmak üzere yakıt olarak kullanılırlar. Daha sonra elektron transport zincirine aktarılarak indirgenler oluşturur ve adenosin trifosfat üretimi sağlanır^{40,41}.

Hepatik yağ metabolizması sonucu oluşan keton cisimcikleri beyin dahil birçok doku tarafından yardımcı enerji olarak kullanılmaktadır. En az 25 enzim ve bazıları yeni tanımlanan birçok özel transport proteinleri mitokondriyel yağ asit metabolizmasından sorumludur. Bu enzimler arasından en azından 15 tanesindeki bozukluğun insanlarda hastalık oluşturduğu anlaşılmıştır. Bunlardan ilki 20 yıl evvel ve çoğunluğu son 10 yıl içinde belirlenmiştir⁴¹.

Kanda bulunan yağ asitleri ya bağırsak emiliminden sonra veya endojen depolardan albumin veya taşıyıcı proteinleri kullanarak mobilize olduktan sonra veya lipoprotein yapılarında triaçilgliserol şeklinde taşınırlar. İntraselüler veya sitoplazma içinde serbest yağ asit taşınımı henüz tam olarak karakterize edilemeyen bir transport sistemi ile gerçekleştirilmektedir^{7,40,41}.

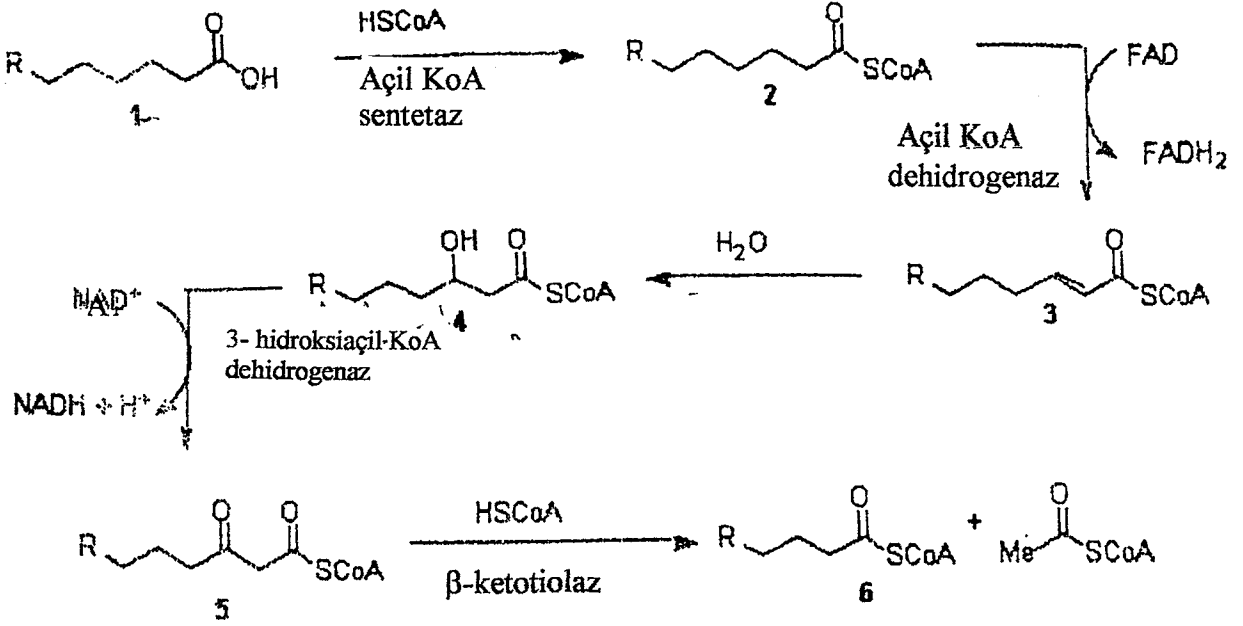
2.3. β -OKSİDASYON ENZİMLERİ

β -oksidasyona girmeden önce serbest yağ asitleri açil Ko A sentetaz enzimi yardımı ile onların açil Ko A tiyoesterlerine aktive olurlar⁴¹.

Kısa ve orta zincirli yağ asitleri aktive oldukları mitokondriyel matrikse direkt olarak geçerler, uzun zincirli asitler ise sitoplazmada aktive olurlar ve mitakondriye aktif taşıma

yolu ile girmektedirler. Uzun zincirli açıl Ko A taşınması en azından iki enzim ve bir taşıyıcı protein, ayrıca ara taşıyıcı olarak karnitin kullanılmaktadır. Karnitin kendisi hücre içine özel bir taşıyıcı protein ile taşınmaktadır. Söz konusu taşıyıcı sistemlerden birisi özel olarak karaciğerde diğeri böbrekler, kaslar ve fibroblastta çalışan iki farklı karnitin taşıyıcısı olarak belirlenmiştir. Uzun zincirli açıl KoA lar karnitine karnitin palmitoil transferaz (CPT) I ile bağlanmıştır. Bu enzim dış mitokondriyel matriksin iç kısmında bulunur ve dokuya özel izoformları olduğu düşünülmektedir. Uzun zincir açıl karnitinler daha sonra translokaz sistemi ile iç mitokondriyel matriksine, CPT II'ye transfer olurlar^{40,41,44}.

Mitokondri matriksine ulaşan tüm uzunluktaki yağ asitlerinin açıl KoA ları bir dizi enzimatik reaksiyon sonrası iki karbonlu açıl KoA birimlerine dönüşürler. Bu reaksiyonlar açıl KoA dehidrogenaz ailesinden enzimler tarafından katalize edilirler (ACD'ler). Bu enzimatik ailede sırasıyla katalizledikleri zincir uzunluğuna bağlı olarak çok uzun, uzun, orta ve kısa zincir açıl Ko A dehidrogenazlar (VLCAD, LCAD, MCAD, SCAD) olmak üzere dört enzim mevcuttur^{40,41,42}. Enzimler son elektron alıcısı olarak elektron transfer flavoprotein kullanmaları ve elektronları direk ETF dehidrogenazla elektron transport mekanizmasının havuzuna akıtılabilmeleri açısından diğer dehidrogenazlardan farklılık göstermektedir. Enzimler sitoplazmada uzun ilk proteinler olarak kodlanan ve mitokondriye transfer olan homotetramer yapısında olan moleküllerdir. Mitokondri matriksinde ilk peptid özel bir proteaz tarafından kesilir ve olgun alt üniteler aktif homotetrameri oluşturmak için birleşirler. Herbir enzim alt ünitesine bir molekül Flavin adenin dinukleotid(FAD) non kovalent olarak bağlanmaktadır. VLCAD harici tüm enzimlerin komplementer DNA larının klonlanmış olması sayesinde dizilerde % 30 -35 oranında bir korunma mevcuttur. Bu enzimlerin ortak bir genden evrimleşmiş olduğu düşünülmektedir^{40,41,42,7}.



Şema 3: Yağ asidi zincirinin kısalma döngüsü

Kaynak:MCAD defcieny

Oksidasyon reaksiyon basamakları yağ asitleri zincir uzunluğuna göre değişmektedir. Son yıllarda daha uzun açil KoA subtratları için 2-Enoil KoA hidrataz, 3-Hidroksil KoA dehidrogenaz, ve 3 Açil KoA Kethotilaz aktivitelere sahip üç fonksiyonlu bir protein belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitler için ise tek aktiviteli enzimler kullanılmaktadır. Enzimlerin bazı basamakları katalizleyecek özel substrat tanıma bölgelerine sahip oldukları gösterilmiştir^{14,41,44}.

β -oksidasyon zayıf olduğu durumlarda bazı alternatif metabolik yollar önem kazanır.

Sitzoldeki ω -oksidasyon karakteristik dikarboksilik asit üretimini sağlar ve peroksizamol β oksidasyon daha uzun zincirli asitlerin metabolizmalarını gerçekleştirir. Buna ek olarak açil Ko A'nın sitozolik tiyoesterler tarafından deaçilasyonu ve açil KoA'nın glisin ve karnitin ile bileşimi sırasıyla KoA'nın ortadan kalkması ve detoksifikasyon için önemli mekanizmadır^{40,41}.

2.4.ORTA ZİNCİR AÇIL KOA DEHİDROGENAZ (MCAD) ENZİMİNİN YAPISI VE

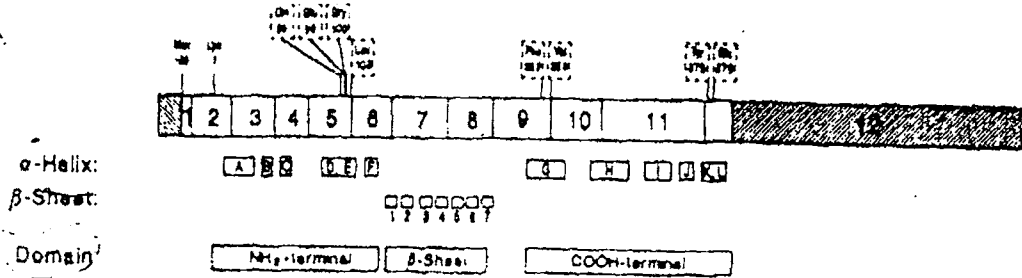
MUTASYONLARI :

MCAD enzimini kodlamakla görevli gen bölgesi 1. Kromozom 1 p 31 bölgesinde 12 ekzonluk 44 kb lik bir bölgedir^{21,29,42,45}. Gen bölgesi 2.4 kb lik mRNA'yı kodlar, önce 25 aminoasitlik birincil protein oluşur. Mitokondriye ilk girişte birincil peptid kırılır ve 42 -43 kD'luk olgun MCAD monomeri oluşur. Mitokondri içinde bu monomerler birleşip fonksiyonel 4 identik alt üniteden oluşan MCAD tetramer proteinini oluşturur ve her birime 1 molekül FAD tutunur. MCAD molekülünün primer amino asit düzeni Şekil 4 ile gösterilmiştir⁴².

LY PHE SER PHE GLU LEU THR GLU GLN GLN LYS GLU PHE GLN ALA THR ALA ARG LYS PHE ALA ARG GLU GLU İLE İLE PRO VAL ALA ALA GLU
YR ASP ARG THR GLY GLU TYR PRO VAL PRO LEU LEU LYS ARG ALA TRP GLU LEU GLY LEU MET ASN THR HIS İLE PRO GLU SER PHE GLY GLY
SU GLY LEU GLY İLE İLE ASP SER CYS LEU İLE THR GLU GLU LEU ALA TYR GLY CYS THR GLY VAL GLN THR ALA İLE GLU ALA ASN THR LEU
LY GLN VAL PRO LEU İLE İLE GLY GLY ASN TYR GLN GLN GLN LYS LYS TYR LEU GLY ARG MET THR GLU GLU PRO LEU MET CYS ALA TYR
YS VAL THR GLU PRO GLY ALA GLY SER ASP VAL ALA GLY İLE LYS THR LYS ALA GLU LYS LYS GLY ASP GLU TYR İLE İLE ASN GLY GLN LYS
ET TRP İLE THR ASN GLY GLY LYS ALA ASN TRP TYR PHE LEU LEU ALA ARG SER ASP PRO ASP PRO LYS ALA PRO ALA SER LYS ALA PHE THR
LY PHE İLE VAL GLU ALA ASP THR PRO GLY VAL GLN İLE GLY ARG LYS GLU İLE ASN MET GLY GLN ARG CYS SER ASP THR ARG GLY İLE VAL
IE GLU ASP VAL ARG VAL PRO LYS GLU ASN VAL LEU THR GLY GLU GLY ALA GLY PHE LYS İLE ALA MET GLY THR PHE ASP LYS THR ARG PRO
IO VAL ALA ALA GLY ALA VAL GLY LEU ALA GLN ARG ALA LEU ASP GLU ALA THR LYS TYR ALA LEU GLU ARG LYS THR PHE GLY LYS LEU
EU ALA GLU HIS GLN GLY İLE SER PHE LEU LEU ALA ASP MET ALA MET LYS VAL GLU LEU ALA ARG LEU SER TYR GLN ARG ALA ALA TRP GLU
E ASP SER GLY ARG ARG ASN THR TYR TYR ALA SER İLE ALA LYS ALA TYR ALA ALA ASP İLE ALA ASN GLN LEU ALA THR ASP ALA VAL GLN
AL PHE GLY GLY ASN GLY PHE ASN THR GLU TYR PRO VAL GLU LYS LEU MET ARG ASP ALA LYS İLE TYR GLN İLE TYR GLU GLY THR ALA GLN
E GLN ARG İLE İLE İLE ALA ARG GLU HIS İLE GLY ARG TYR LYS GLY PHE SER PHE GLU LEU THR GLU GLN GLN LYS GLU PHE GLN ALA THR
A ARG LYS PHE ALA ARG GLU GLU İLE İLE PRO VAL ALA ALA GLU TYR ASP ARG THR GLY GLU TYR PRO VAL PRO LEU LEU LYS ARG ALA TRP
U LEU GLY LEU MET ASN THR HIS İLE PRO GLU SER PHE GLY GLY LEU GLY LEU GLY İLE İLE ASP SER CYS LEU İLE THR GLU GLU LEU ALA
R GLY CYS THR GLY VAL GLN THR ALA İLE GLU ALA ASN THR LEU GLY GLN VAL PRO LEU İLE İLE GLY GLY ASN TYR GLN GLN GLN LYS LYS
R LEU GLY ARG MET THR GLU GLU PRO LEU MET CYS ALA TYR CYS VAL THR GLU PRO GLY ALA GLY SER ASP VAL ALA GLY İLE LYS THR
S ALA GLU LYS LYS GLY ASP GLU TYR İLE İLE ASN GLY GLN LYS MET TRP İLE THR ASN GLY GLY LYS ALA ASN TRP TYR PHE LEU LEU ALA
G SER ASP PRO ASP PRO LYS ALA PRO ALA SER LYS ALA PHE THR GLY PHE İLE VAL GLU ALA ASP THR PRO GLY VAL GLN İLE GLY ARG LYS
U İLE ASN MET GLY GLN ARG CYS SER ASP THR ARG GLY İLE VAL PHE GLU ASP VAL ARG VAL PRO LYS GLU ASN VAL LEU THR GLY GLU GLY
A GLY PHE LYS İLE ALA MET GLY THR PHE ASP LYS THR ARG PRO PRO VAL ALA ALA GLY ALA VAL GLY LEU ALA GLN ARG ALA LEU ASP GLU
A THR LYS TYR ALA LEU GLU ARG LYS THR PHE GLY LYS LEU LEU ALA GLU HIS GLN GLY İLE SER PHE LEU LEU ALA ASP MET ALA MET LYS
IL GLU LEU ALA ARG LEU SER TYR GLN ARG ALA ALA TRP GLU İLE ASP SER GLY ARG ARG ASN THR TYR TYR ALA SER İLE ALA LYS ALA TYR
A ALA ASP İLE ALA ASN GLN LEU ALA THR ASP ALA VAL GLN VAL PHE GLY GLY ASN GLY PHE ASN THR GLU TYR PRO VAL GLU LYS LEU MET
G ASP ALA LYS İLE TYR GLN İLE TYR GLU GLY THR ALA GLN İLE GLN ARG İLE İLE İLE ALA

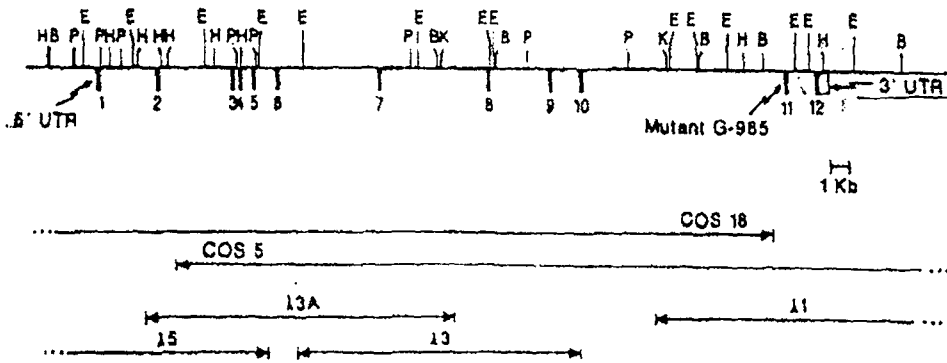
Şekil 4 : MCAD proteininin primer aminoasit düzeni²⁰.

MCAD molekülü N terminali, orta terminal ve C terminali olmak üzere 3 bölümden meydana gelmektedir. N ve C terminali çoğunlukla sıkıca paketlenmiş α - helikslerden, orta terminal ise üst üste gelen iki anti paralel β -tabakadan meydana gelmiştir⁴⁵(Şekil 5).



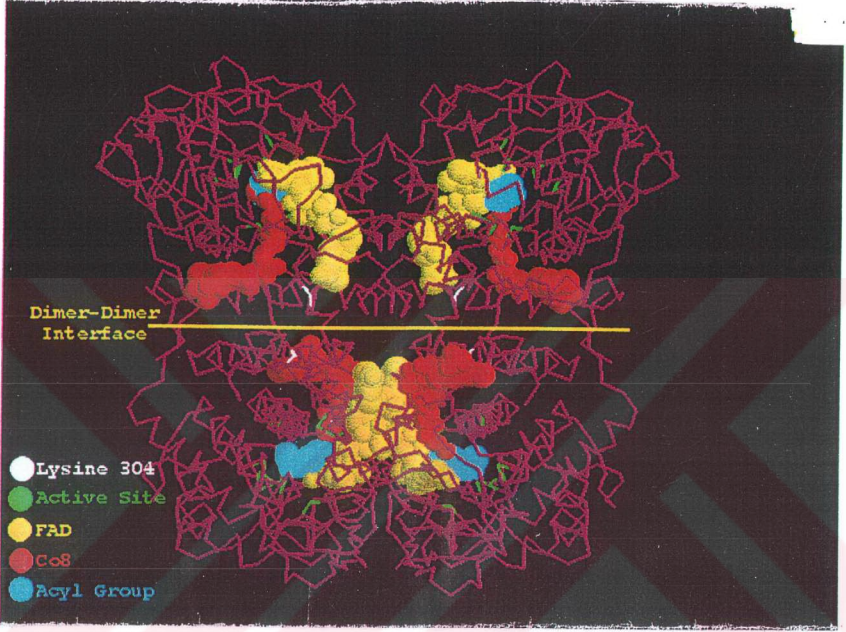
Şekil 5 :MCAD protein yapısı ile gen organizasyonunun karşılaştırılması.Şekildeki kutular ekzonları, en alt satır ise protein bölümlerini göstermektedir⁴⁵.

Enzimi kodlamakla görevli genin 1-10 arası ekzonları 70 -140 bp uzunluğunda, exon 11 249bp, exon 12 ise 807 bp uzunluğundadır. İntronlar ise 71 ile 10500 bp uzunluğundadır⁴⁵(şekil6).



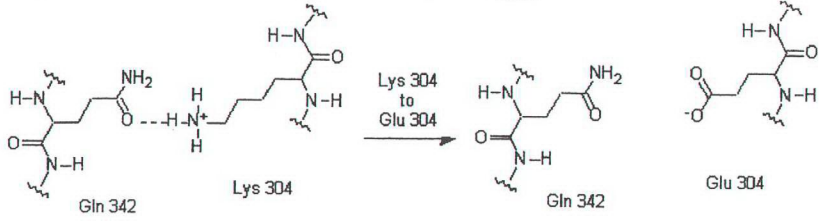
Şekil 6:MCAD enzimi gen yapısı.Đikey çizgiler gende bulunan ekzonları aradaki açık bölge ise intronları göstermektedir⁴⁵.

Moleküler yapısı Jung Ja Kim ve arkadaşları tarafından X-ışını kristalografisi ile tesbit edilen MCAD enziminin yapısı Şekil 7 de gösterilmiştir²⁰.



Şekil 7 : MCAD enzimi tetramer yapısının gösterilmesi²⁰.

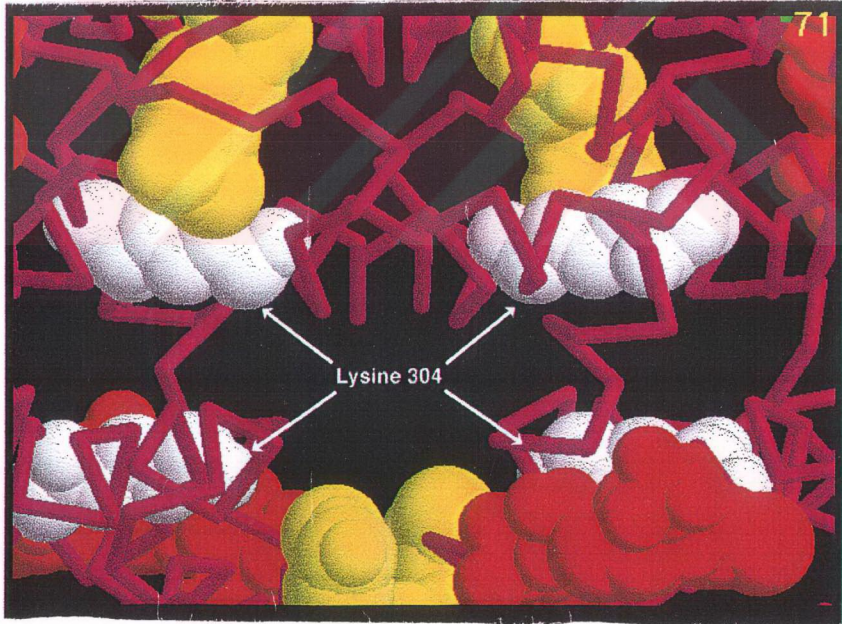
Enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi için gerekli tetramer yapı bazı mutasyonlardan dolayı bozulabilir. Bu mutasyonlardan en sık rastlanılan olan A985G, proteinin 304 numaralı aminoasidinin şekil 8 de görüldüğü gibi değişimine sebep olur^{12,46,45,20}. MCAD proteininin tetramer yapısının 304 pozisyonunda pozitif yüklü Lys bulunmaktadır. Sahip olduğu bu yük sayesinde yan alt ünitesindeki eksi yüklü Gln 342 ile etkileşip stabil yapı oluşturur.



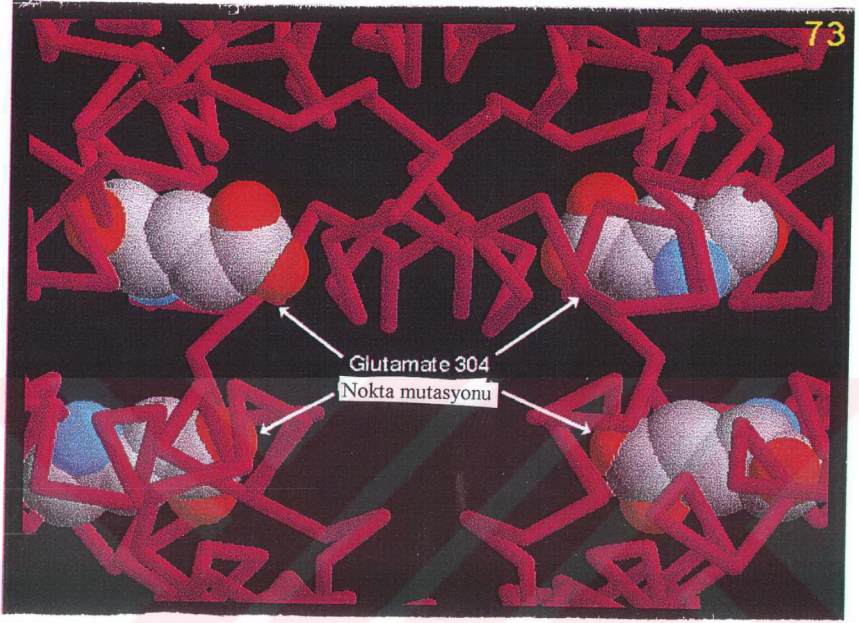
Şekil 8:304 pozisyonundaki Lys → Glu değişikliğinin protein stabilizasyonunu etkilediğinin gösterilmesi ²⁰.

Mutasyona uğramış halde ise 304 numaralı pozisyona eksi yüklü Glu gelir ve negatif yükü sebebiyle Gln 342 ile itici etki oluşturur. Dolayısıyla stabil tetramer yapı bozulur ve proteinin katalitik aktivitesi azalması sebebiyle orta zincirli yağ asitleri oksidize edilemez ²⁰.

(Şekil 9,10).



Şekil 9: MCAD protein tetramer yapısı .Mutasyon görülmediği durumda Lys 304 sahip hali.



Şekil 10 : MCAD enzimin tetramer yapısında mutasyon somrası Glu 304 sahip hali

En sık mutasyon görülen exon 11 üzerinde T 977 C ile Met (301) → Thr, T 1008 A ile Ser (311) → Arg , C 1045 T ile Arg (324) → Stop , C 1150 T ile Glu (359) → Premature Stop , T 1124 C (hastaların hiçbirinde rastlanmamıştır) , C 994 T Sessiz mutasyon , A 985 G ile Lys (304) → Glu , A 1161 G mutasyonları, RFLP bölgeleri ise exon 10 üzerinde T 727 C (Pst I polimorfizmi) , G 931 A (Bam H I polimorfizmi) , exon 8 üzerinde C 392 A (Taq I polimorfizmi), exon 6 üzerinde ise G 447 A mutasyonuna rastlandığı çalışmalarda

bildirilmiştir². Ayrıca ekzon 11 öncesi bulunan 10.5 kb lik intronunda genin kodladığı mRNA'daki kesim bozukluklarında sebebi olabileceği belirtilmiştir.⁴⁵ (Şekil 11,12)

3'-INTRON SPLICE SITE	EXON	5'-INTRON SPLICE SITE
..#1	...92 BP...ATGCTGCAGG	gtagag ..~3400 BP..

..#2	GTCCTGAGAA...88 BP...TTTAGTTTGG	gtatag ..~3800 BP..

..#3	AGTTCACCGG...98 BP...AACTGGTGAA	gtaggta71 BP..

..#4	TATCCAGTCC...70 BP...GAGAAGTGTG	gtaagct468 BP..

..#5	GAGGTCTGG...101 BP...TTCTTTGGGG	gtaagt ..~900 BP..

..#6	CAATGCCTA...81 BP...ATTGATGTGT	gtgagta ..~6000 BP..

..#7	GCTTATTGTG...131 BP...AAGCTAATTG	gtatgtg ..~5600 BP..

..#8	GTATTTTTTA...109 BP...TGGGAGAAAG	gtaaagt ..~3500 BP..

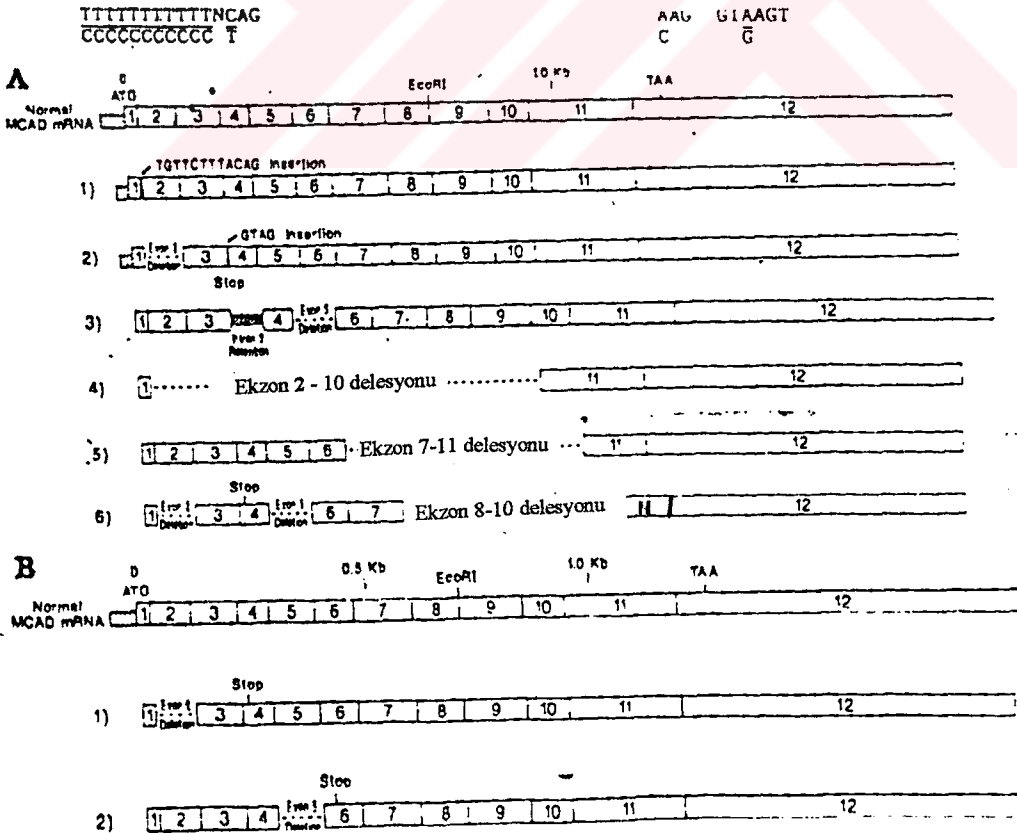
..#9	GAATTAACA...141 BP...CAGACCTGTA	g'aagta883 BP..

..#10	GTAGCTGCTG...96 BP...ACTGTAGAG	gtaattt ..~10500 BP..

..#11	CACCAAGCAA...249 BP...AATCTATCAG	gtaaggt ...1550 BP..

..#12	ATTTATGAAG...807 BP...TATTATCATA	Poli A ekleme bölgesi e

Şekil 11: MCAD genine ait ekzon - intron sınırlarının ve farklı uzunlukta intronların gösterilmesi. En uzun intron ekzon 11 öncesi bulunur⁴⁵.



Şekil 12: MCAD mRNA'nın anormal kesiminin gösterilmesi. En üstte bulunan mRNA normaldir, diğerlerinde ise anormal kesimler görülüyor⁴⁵.

MCAD bozukluğunun fenotipik göstergesi, ataklar arası asemptomatik olan, Reye Sendromuna benzeyen bir tablodur. Semptomlar ateş, enfeksiyon, aşılama gibi olaylarla baskılanabilir ve özellikle ilk iki yılda görülür. MCAD bozukluğunun klasik tablosunda açlığa dayanıksızlık, kusma, tekrarlı hipoglisemik koma, hipoketotik dikarboksilik asidüri, doku ve plazma karnitin miktarında düşüş ve karaciğer yağlanması görülür. Bunun yanında heterozigot patern gösteren bireylerin enzim aktivitelerinin normal olduğu bulunmuştur^{42,20,39,38}. Direk mutasyon analizi MCAD , SCAD , ve CPT II bozukluklarının tesbiti için yeterlidir. Enzim eksikliği olanların her birinde, ilgili gende iki mutant alel bulunur. Bozukluğun otozomal resesiv olarak seyrettiği ve soylardaki oluşma yüzdesinin % 25 olduğu belirlenmiştir^{41,40,35}.

2.5. ACİL KoA BOZUKLUKLARI

LCAD , SCAD bozuklukları tanımlanan hasta sayısı fazla olmadığı gözlenmiştir. VLCAD bozukluğu ise yeni tanımlanmıştır. Söz konusu hastalığın tanımlandığı iki günlük çocukta ventriküler fibrilasyon, solunum tutukluğu ve ileri derecede dikarboksilik asidüri tablosu gözlenmektedir^{35,41}. Doğum sırasındaki kötü tabloya rağmen hastanın iyileştiği ve iki yaşında hiçbir kas ve kalp problemi kalmadığı rapor edilmiştir. Bebeğin kendinden büyük kardeşi 2 günlük iken hiçbir belirti göstermeden öldüğü ve otopside hepatik steatozis belirlendiği bildirilmiştir. Her iki olguda da hastalığın ilk belirtisi hipoketotik hipoglisemi, hepatoselüler yetmezlik ve kardiomyopatidir⁴¹.

LCAD bozukluğundaki belirtiler ise VLCAD'a göre daha değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Bulgular arasında hipatoni, kardiomyopati, tekrarlayan miyoglobinuri bulunur. Hipoglisemi, hiperamonyemi ve laktik asidemi hastalık episodlarında sıklıkla görülür. LCAD bozukluğu bulunduğu sanılan bazı hastalarda VLCAD bozukluğu olduğu belirlenmiştir⁴¹.

SCAD bozukluğuna sahip olan 3 hasta belirlenmiştir. Birisinde aralıklı metabolik asidosis ve diğerinde neonatal hiperammonemik koma görülmüştür.  c nc sunde ise infantil başlangıçlı yağ depo hastalığı, miyopati ve hipotoni ile ortaya ıkmıştır^{7,40,41}.

Geçen 5 yılda MCAD bozukluğu bazı toplumlarda en sık görülen doğumsal metabolik bozukluk olduğu bildirilmiştir. En sık ortaya çıkış şekli ise ilk 2 yaştaki aralıklı hipoketotik hipoglisemidir. Orta düzeyde hiperamonemi ve koma görülebilir veya görülmeyebilir. Bu bulgular Reye sendromdakine benzer, episodlar arası belirti göstermez hastalığın atağı sırasında dikarboksilik asiduri ortayaıkar. Hastalığın ara dönemlerinde rutin metodlarla bozukluk tesbiti mümkün değildir. Benzer şekilde mikrovasküler ve makrovasküler steatoz, hastalığın akut döneminde görülmesine karşın akut dönemler arası ortadan kaybolmaktadır⁴¹. MCAD sebebiyle ölen hastaların çoğu birden fazla episod yaşamıştır, bu yüzden tekrarlı Reye sendromu benzer bulgular genelde bu bozukluğu tahmin ettirmelidir. Bir çok ani bebek ölümünde MCAD bozukluğu olduğu gösterilmiştir. Belirli bir yaş aralığında bu ölümler ani bebek ölümü sendromu olarak tanımlanmıştır. Yapılan otopsilerde genelde karakteristik mikrovaskular ve makrovaskular steatoz görülmüştür ve diagnozu ön plana ıkarılmıřtır⁴⁷. Sonuçta hastaların aile çalışmalarında MCAD bozukluğu asemptomatik kişilerde de gösterilmiştir. Geçen 7 yıl içinde MCAD bozukluğu tesbiti çeşitli vücut sıvılarındaki bazı metabolitlerin birikiminin labaratuvar tetkikleri ile ölçülebilmesi, asemptomatik kişilerde dahi MCAD bozukluğunun tesbitini mümkün kılmıştır. Son yıllarda MCAD bozukluğunun moleküler metabolizması anlaşılmaya başlanmıştır. MCAD cDNAsı klonlandıktan sonra bu bozukluğa sahip bireylerin % 90 nında homozigot tek bir çeşit mutant alel olduğu görülmüştür. A985 Pozisyonunda Adenin → Guanin yer değiştirimi Glutamik asidin Lizinin yerine geçmesi ile unstabil bir protein oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir. A985 G mutasyon aralığı kuzey Avrupa topluluğunda 1/ 40 iken Asyada ve Güney Avrupa toplumlarında 1 /100 oranındadır. Asya dışındaki beyaz toplumda ise alel taşıma frekansı

1/60, ve tahmin edilen hasta birey frekansı 1/ 15000 dir. MCAD bozukluk frekansı siyah Amerikalılarda belirtilmemiştir.Bu çalışmalar sonrası tesbit edilen alel frekansı 50 ülkede tesbit edilen fenilketüniri alel frekansından fazladır ^{40,41,38}.



3 .MATERYAL METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1. SECİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada Sosyal Sigortalar Kurumu Ankara Doğumevinde 1996–1998 seneleri arasında doğum yapmış 27–41 yaş arasındaki 35 kadın ve doğan bebeklerin doğum sırasında alınan kordon kanları kullanılmıştır .Alınan anne ve bebeğe ait örneklerde doğum sırası ve öncesi hiçbir anomali göstermemesi şartı aranmıştır.

3.1.2. ARASTIRMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorid (Sigma A-5666), Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol blue (Sigma B-6896), dNTP seti (MBI Fermentas), EDTA (dihidrat) (Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidium bromid (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merk K-22035097), Mineral yağ (Sigma M-5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodium doedocyl (lauryl) sulfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Kalium dihidrojen fosfat (A 741071 Merck), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taq polimeraz (Promega), Metaphor agaroz (FMC 50182), Xylene cyanol (Sigma X-4126), Ficoll 400 (Sigma F-9378), DNA marker (ϕ x 174 RF DNA / Hea III GIBCO BRL C 151611-015) , Proteinaz K (Stratagene 300-141), Potasyum hidroksit (Sigma P 176), Nco 1 (109 New England Biolab) , Amonyum sülfat (Sigma A 5132), Centriflex Gel Filtration Cartridge(Advanced Genetics Tech.Corp. C 42453),OIA Quick DNA Purification Kit.(Qiagen C 28104).

Exon 11 MCAD bölgesi primer dizileri (dizileme için kullanılacak örnekler için):

5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAC CAA GCA ATA TCA TTT ATG 3'

3' CTG ATA GAT TTT GGC ATC CCT 5'

Exon 11 MCAD bölgesi primer dizileri (kesim için kullanılacak örnekler için):

5' TTT ATG CTG GCT GAA ATG GCC ATG 3'

3' CAG GAT ATT CTG TAT TAA ATC CAT GGC CTC 3'

3.1.3.KULLANILAN GEREÇLER

Eppendorf tüp, Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrowave fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis).

3.1.4. ARASTIRMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.4.1.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

a. Eritrosit Parçalama Tamponu

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat , 200 µl 0.5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 ml ddH₂O eklendi ve çözeltinin pH'sı 1 normal NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlanarak çözeltiler 120⁰C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4⁰C'de saklandı.

b.0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH 8.0)

Etilen diamin tetra asetat (EDTA) dan 186.1 gram tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü ve pH'sı sodyum hidroksid çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

c. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl)

Sodyum klorürden 233.6 gram tartıldı. Üzerine 800 ml ddH₂O ilave edildi ve 1 litreye tamamlandıktan sonra çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

d. Lökositleri Parçalama Tamponu

Dört molar Sodyum klorür çözeltisinden 25 ml alınıp 50 ml 0,5 molar Etilen diamin tetra asetat (EDTA) direk balon jøjeye konularak 1 litreye tamamlandıktan sonra çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

e. 1 Molar Tris tamponu (stok)

121.1 gram Tris baz 42 mikrolitre hidroklorik asit ile yaklaşık 800 ml ddH₂O ile çözüldükten sonra 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

f. 9,5 Molar Amonyum asetat

Amonyum asetatdan 73.22 gram tartılarak 80 ml ddH₂O su içinde çözüldü. Daha sonra ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra +4⁰C'de saklandı.

g. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

sodyum dodesil sülfattan 10 gr tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 ml ddH₂O eklendikten sonra pH'sı 7.2'ye ayarlandı.. Çözelti 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

h. Proteinaz K (20 mg/ml)

Proteinaz K dan 20 miligram tartılarak ddH₂O ile 1 militreye tamamlandıktan sonra -20 °C'de saklandı.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER :

l.10X LN TAMPONU

1M (NH₄)₂SO₄ tan 4.15 ml , 2 M TRİS den 8.375 ml , 1M MgCl₂ 1.675 ml, βME den 87.41 µl, EDTA dan 3.4 ml karıştırıldı ve 7.313 ml dH₂O ile 25 ml ye tamamlandı.

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

i. Etidyum Bromür(10 mg/ml)

Etidyum bromürden 10 gram tartılarak steril ddH₂O ile 10 militreye tamamlandı.

j. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

Ficoll 400 den 20 gram , SDS den 1 gram, 0.5 molarlık Etilen diamin tetra asetatdan 0.2 ml, 1 molarlık Tris (pH 8.0)den 1 ml, Brom fenol blue dan 200 miligram, Xylen cyanoldan 200 miligram tartılarak steril ddH₂O ile 100 ml ye tamamlandıktan sonra oda ısısında saklandı.

k. 50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

Tris baz dan 242 gram tartılarak üzerine 57,1 ml Glasiyal asetik asit ve 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetatdan 100 ml konularak 800 ml ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı .

Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

1. 5x Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE)

Tris bazdan 54 gram ve Borik asit den 27,5 gram tartılarak üzerine 20 ml 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) eklendi ve 800 ml ddH₂O ile çözündürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı ve 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Çözelti oda ısısında saklandı.

3.2 . ARAŞTIRMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik kandan DNA İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldıktan üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 bekletildi. Daha sonra örnekler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspansiyon edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra süspansiyon şeklinde olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkon üzerine aktarılarak üzerine 1:2 oranında %99'luk mutlak alkol eklendi ve böylece DNA'nın çökmesi sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alınarak bu şekilde alınan DNA %70'lik alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürüldü. DNA örnekleri +4°C'de saklandı ³¹.

3.2.2.Hazırlanan örneklerde DNA Saflık Tayinleri

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra spektrofotometrede 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbansın değeri okundu.

260 nm'de okunan absorbans /280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı.O.D.₂₆₀ /O.D.₂₈₀ oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi.Bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

3.2.3. DNA Düzeylerinin Hesaplanması

Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbans 50 µg/ml (50ng/µl) olarak kabul edildi³⁶. Bu temel bilgiden yararlanarak DNA miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A₂₆₀ x 50

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA'da MCAD EXON 11 Bölgesinin Coğaltılması

MCAD EXON 11 gen bölgesinin çoğaltılması için 100 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 71.2 µl ddH₂O , 0.8µl Taq polimeraz enzimi, 10µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi (LN çözeltisi),MCAD gen bölgesine özgü 3µl primer çifti, 2 mM deoksinükleotid trifosfat karışımından (dNTP) 10 µl kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri 0.1µg//µl olacak şekilde hazırlanıp 5µl si PCR karışımlarına eklendi.

Buharlaştırmanın engellenmesi için 95°C deki 5 dakikalık ilk denatürasyondan sonra örnekler buz içine alındı ve karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Polimer Zincir Reaksiyonu belirtilen koşullara göre gerçekleştirildi ¹³.

3.2.4.1.MCAD EXON 11 gen bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan

amplifikasyon koşulu:

95⁰C'de 5 dakika denatürasyon

örnekler buzla taşınarak Taq polimeraz eklenir, vorteks ve sentrifujden sonra mineral yağ eklendi.

Daha sonra;

94⁰C'de 2dakika denatürasyon

56⁰C'de 1.3 dakika bağlanma

72⁰C'de 3 dakika uzama

olmak üzere 30 döngü yapıldı ve 72⁰C'de 5 dakika son uzama eklendi.

3.2.4.2.Dizileme Polimeraz Zincir Reaksiyonu öncesi ürünlerin temizlenmesi :

Bu protokol 100 bp - 10 kb arası DNA ları primer, nükleotid polimeraz ve tuzlardan arındırmak için kullanıldı .Uygulanan protokolün basamakları aşağıda belirtilmiştir.

1 Hacim PCR ürünü üzerine 5 hacim Buffer PB eklenip karıştırıldı.Daha sonra QIA santrifuj kolonu kit içindeki 2 ml lik toplama tüpü içine yerleştirildi ve DNAYı bağlayacak olan madde QIA quick kolonu üzerine yüklenerek 30 - 60 saniye santrifuj yapıldı.

Santrifuj sonrası kolon çöküntüsünü atıldı ve QIA quick kolonunu yine aynı tüp içine yerleştirildi. Yıkamak için kolona 0.75 ml Buffer PE eklendi ve 30-60 saniye santrifuj yapıldı.Tekrar santrifuj çökeltisi atıldı ve kolon yine aynı tüp içine yerleştirildi.Kolon maksimum hızda 1 dakika daha santrifuj yapıldı.QIA quick kolonu temiz 1.5 ml lik mikrofuj tübüne kondu ve DNA nın geri alınması için 50 µl 10mM lık Tsis-HCl (PH 8.5) QIAquick kolonunun üzerine eklenerek 1 dakika bekletildi ve santrifuj yapıldı.Gode dibinde temiz DNA elde edildi ¹³.

3.2.4.3. Temizlik sonrası dizilenecek PCR ürünlerinin kontrolü :

3.2.4.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin temizlik sonrası incelenmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örneklerden 1 µl PCR ürünü hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 volt'luk elektrik akımında yürütüldü. Bantların 260 bp lık ve çok temiz olmasına dikkat edildi.

3.2.5. Örneklerin Dizileme Yapmak Üzere Hazırlanması:

Bu amaç için AGTC Centriflex jel filtrasyon kiti kullanıldı. Kit dizilenecek meteryali primer ve boya kalıntılarından, fazlalık nükleotidlerden temizleyebilmek için geliştirilmiş 0.7 ml lik matriks bir kolonudur. Kolon 1mMlık EDTA ile nemlendirilmiştir. 1.5 ml lik microtüper içinde devamlı nemli olarak tutulmaktadır.

İlk olarak 1.5 ml lik içinde kolon bulunan tüp 4000 RPM de 4 dakika santrifuj edilerek kolon nemlendiren sıvıdan ayrıldı. Kolon başka bir tübe aktarıldı ve eldeki materyal ortadaki resin üzerine eklendi. Sistem tekrar 8 dakika 4000 RPM de santrifuj edildi ve dıştaki tüpte 4 µl kadar kayıpla ilk meteryal toplandı. Toplanan materyal kurutuldu ve dizileme için hazır duruma geldi¹³.

3.2.6. MCAD EXON 11 gen bölgesi dizileme reaksiyonu için yapılan Polimeraz Zincir

Reaksiyonu :

5 µl lik MCAD PCR ürünü 8 µl premix çözeltisi karıştırılıp alındıktan sonra 4 µl 3'-5' primeri {M13 (-21)} eklendi, 3 µl su ile 20 µl ye tamamlandı.

5 µl lik MCAD PCR ürünü 9 µl premiks çözeltisi karıştırılıp alındıktan sonra 1 µl 5'-3' primeri (MDER) eklendi, 5 µl su ile 20 µl ye tamamlandı¹³.

3.2.6.1.MCAD EXON 11 gen bölgesi dizileme reaksiyonu için Polimeraz Zincir

Reaksiyon koşulu :

Polimeraz Zincir Reaksiyon ürünleri kullanılarak

96⁰C'de 10 saniye

50⁰C'de 5 saniye

60⁰C'de 4 saniye

olmak üzere 25 döngü yapıldı¹³.

3.2.7. MCAD EXON 11 gen bölgesi A 985 G bölgesi kesiminde kullanmak için Polimeraz

Zincir Reaksiyon :

5µl 5X standart buffer(1.5 mM Mg) ve dNTP, 0.125µl 5'-3' ve 3'-5' primerleri, 250 mg/mL hazırlanmış DNA stoklarından 1µl, 0.3µl Taq polimeraz karışımı 18.5µl su ile 2 µl'ye tamamlandı²⁸.

3.2.7.1. MCAD EXON 11 gen bölgesi A 985 G bölgesi kesiminde kullanmak için PCR

koşulu;

94⁰Cde 30 saniye

60⁰C de 30 saniye

72⁰C de 30 saniye

olmak üzere 30 döngü yapıldı ve 72⁰C'de 10 dakika son uzama eklendi²⁸.

3.2.8 .Restriksiyon Enzim Kesimi :

7µl steril 10 X su , 2µl Buffer, 1µl Nco1, 10µl PRC ürünü karıştırılıp 37⁰ C de en az 2 saat kesim yapıldı. Kesim ürünleri % 2 lik agaroz jelde incelendi²⁸.

3.2.9. %2'lük Agaroz Jelin Hazırlanması :

1g agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 50 ml 1xTAE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra üzerine 1µl 10 mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Yaklaşık 70°C'ye soğutularak küvete döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tank 1xTAE çözeltisi ile dolduruldu. Alınan 15µl PCR ürünleri son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklenen 5x'lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine φX DNA size marker yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek örnekler 80-100 V'ta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Polaroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi³⁶.

3.2.10. Dizileme Reaksiyonu Sonuçlarının Değerlendirilmesi :

Dizileme Reaksiyonu MCAD genine ait ileri ve geri dizi haritası kullanılarak değerlendirilmiştir. (Bkz.Ek. 6,7)

3.3.Bulguların Değerlendirilmesi :

Bulguların değerlendirilmesinde "SPSS for Windows" istatistik paket programı ile κ^2 testi kullanılmıştır.

4 .BULGULAR

Çalışmamızda annelerden alınan 35 örnek ve 35 bebekten alınan kordon kanı kullanılmıştır. Çalışmamızda yer alan 35 annenin yaş ortalaması 32.4 olarak saptanmıştır.

4.1.EKZON 11 ÜZERİNDE A985G MUTASYONUNUN GÖSTERİLMESİ:

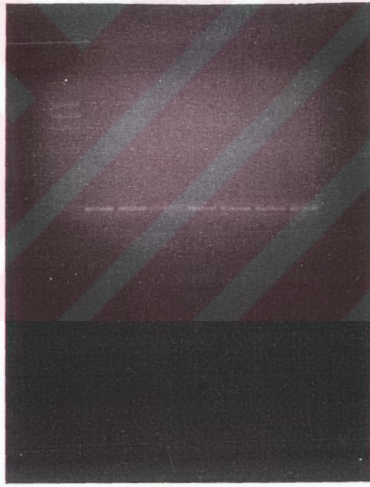
Tüm örneklerin ekzon 11 gen bölgesi en sık rastlanan A985 G mutasyonunun incelenebilmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile çoğaltılmış ve NcoI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucu %2 lik Agaroz jel elektroforezindeki görünüm şekil 1 de gösterilmiştir. Anne ve bebeklere ait DNA örneklerinin 199 bp lik bantlar verdiği saptanmıştır. Sonuç olarak anne ve bebeklere ait DNA'lerde istenilen gen bölgesinin çoğaltıldığı gözlenmiştir(Şekil13).



1 2 3 4 5 6 7 8

Şekil13: Örnekler üzerinde MCAD geninin bulunduğu 1p31 bölgesi ekzon 11 bölgesine ait amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra % 2 lik agaroz jelde incelenmesi. Bant 1 : Marker, Bant 2 – 8 : Anne ve bebeklere ait DNA örneklerinden 199 bp lik bantlar.

A 985 G transisyonunun MCAD bozukluğu görölen hücreler için belirleyici olduğu gösterilmiştir. Sözkonusu bozukluğun tesbiti için anne ve bebeklere ait amplifiye edilen 199 bp lik genomik DNA , Nco 1 Restriksiyon enzim ile kesildikten sonra sonuç %2 lik Agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmiştir. Örneklerin hiçbirisinde A985G mutasyonu görölmediği, dolayısı ile kesimin gerçekteşmediği, kesim sonrası bantların yine 199 bp lik olduğu saptanmıştır(Şekil 14).

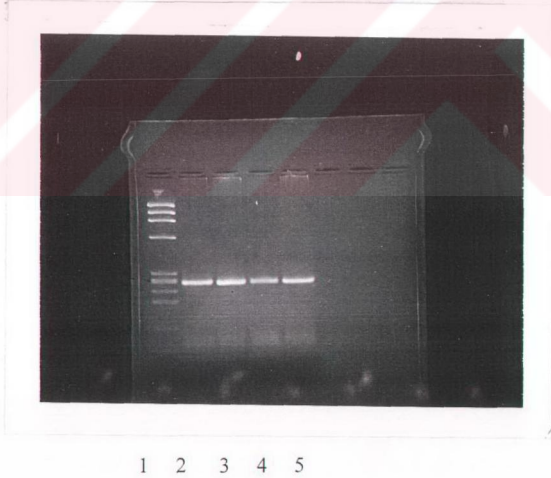


1 2 3 4 5 6 7 8

Şekil 14 : Amplifiye edilen 1p31 exon 11 bölgesi 985 pozisyonu Nco1 ile kesildikten sonra % 2 lik Agaroz jelde incelenmesi. Bant 1 : Marker , Bant 2-8 : Kesim sonrası anne ve bebek DNA örnekleri.

4.2.DİZİLEME REAKSİYONU İLE MCAD GENİ EKZON 11 BÖLGESİNİN İNCELENMESİ :

Exon 11 gen bölgesine ait tüm mutasyonların değerlendirilmesi ve Nco I kesimi ile incelenen A985G mutasyonunun tekrar kontrolü için dizileme reaksiyonu gerçekleştirmek gerekmektedir. Dizileme Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli PCR ürünü elde etmek için gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır, ve % 2 lik Agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir(Şekil15).



Şekil 15 : Amplifikasyon sonucu oluşan, dizilemede kullanılacak 250 bp lik DNA bantlarının % 2 lik agaroz jelde incelenmesi. Bant 1 : Marker , Bant 2-5 : anne ve bebeklere ait 250 bp lik DNA bantları.

Dizileme Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılmak üzere bu PCR örnekleri temizlenmiş ve % 2 lik Agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. Aynı örneklerin temizlenme sonrası durumu şekil 16 ile verilmiştir. Örneklerin temizlenme öncesine göre daha soluk fakat bantların temiz olduğu gözlenmiştir.



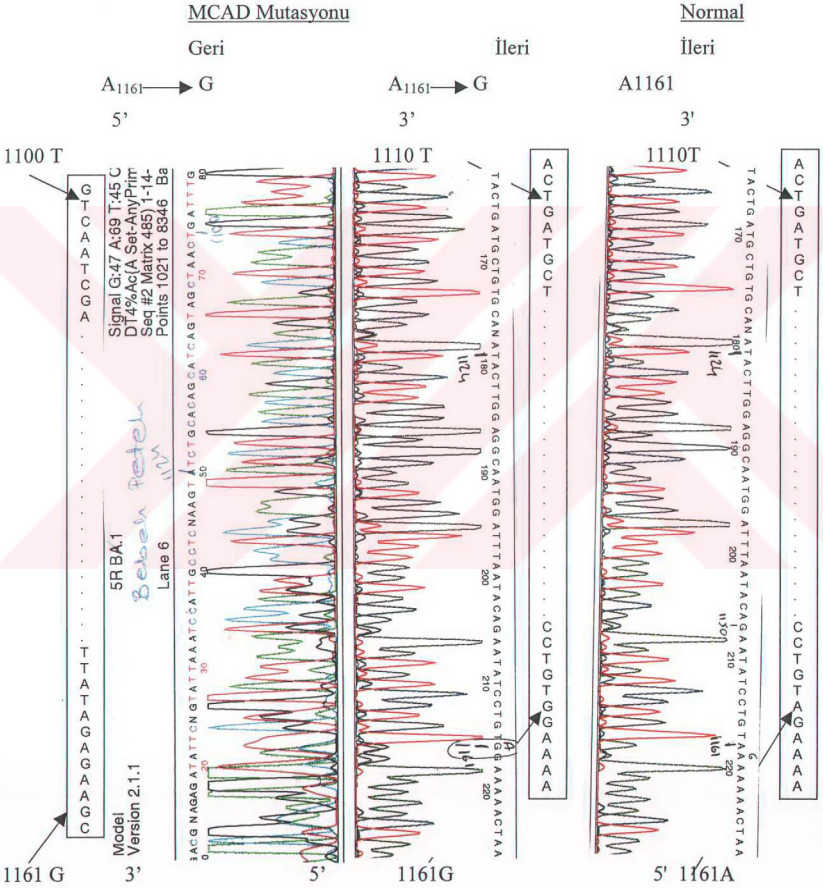
1 2 3 4 5

Şekil 16 : Dizileme reaksiyonu için gerçekleştirilen amplifikasyon ürünlerinin temizlik sonrası % 2 lik agaroz jelde incelenmesi.

Temizlenmiş PCR ürünü ile dizileme PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Dizileme PCR reaksiyonunda kullanılacak madde miktarına karar verilirken temizlik sonrası bant parlaklığı göz önüne alınarak en fazla 9 µl PCR ürünü madde kullanılır. Kullanılan ürünün miktarındaki hata otomatik dizilemenin gerçekleşmemesine sebep olmaktadır.

Dizileme PCR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra PCR ürünleri tekrar temizlendi, kalan temiz ürün vakumla kurutularak dizilemesi gerçekleştirildi.

Dizileme reaksiyonu ile genin ekzon 11 bölgesine ait tüm olası mutasyonlar incelenmiştir ve sonuçlar şekil (18,19,20,21 Bkz. Ek 1A-1B,2A-2B,3A-3B,4A-4B, 5A-5B) de gösterilmiştir. Dizileme sonucu bebeklerden alınan örneklerin dört tanesinde Val 362 aminoasidi ile sorumlu bölgede A 1161 G mutasyonu olduğu , örneklerin hiçbirisinde Nco 1 kesiminin agaroz jelde incelenmesi ile de gösterildiği gibi A985G mutasyonu bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 18 : Ekzon 11 bölgesine ait dizileme reaksiyonu ile A 1161 G mutasyonunun gösterilmesi

MCAD Mutasyonu

Normal

Geri

İleri

İleri

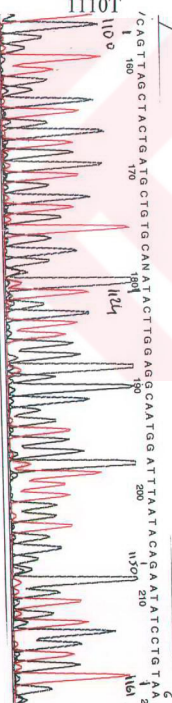
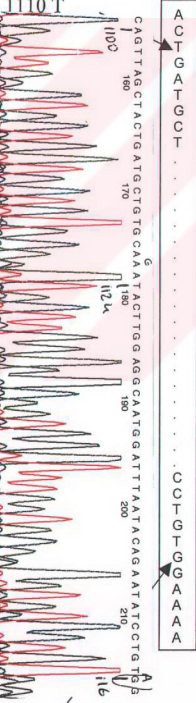
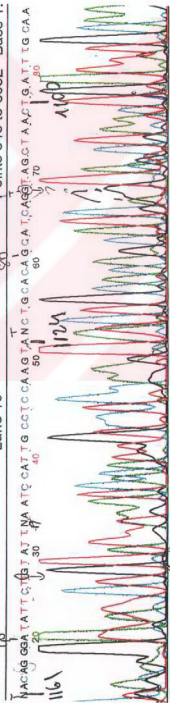
A₁₁₆₁ → G
5'

A₁₁₆₁ → G
3'

A₁₁₆₁
3'

1100 T
G T C A A T C G A

Signal G:136 A:270 T:176 C
D14%Ac(A Ser-AnyPrimer)
Seq #2 Matrix 485) 1-4-96
Points 845 to 8052 Base 1:
Lane 19
MCAD EXON 11.8 R.S.O..1
Soyul Oray
del
rsion 2.1.1
T T A T A G A G A A A G C



1110 T
A C T G A T G C C T
C C T G T G G A A A A

1161 G

1161 G

1161 A

Şekil 21 : Ekzon 11 bölgesine ait dizileme reaksiyonu ile A 1161 G mutasyonunun gösterilmesi

Örneklere ait MCAD geni ekzon 11 985 ve 1161 bölgeleri alel dağılımı toplu tablosu Tablo 1 'de belirtilmiştir. Bu tabloya göre A 985 G mutasyonu görülen birey olmadığı ancak 4 bebeğin A 1161 G mutasyonu taşıdığı saptanmıştır.

Tablo 1 : BEBEKLERDE VE ANNELERDE ORTA ZİNCİRLİ YAĞ ASİDİ DEHİDROGENAZ (MCAD) ENZİMİ EXON 11 MUTASYON DAĞILIMI

ANNE (n: 35)			BEBEK (n:35)		
A985G			A1161G		
A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G
35	0	0	35	0	0
A985G			A1161G		
A/A	A/G	G/A	A/A	A/G	G/G
35	0	0	31	4	0

Anne ve bebek arasındaki A1161G aleli açısından farklılığın istatistiksel değeri χ^2 testi ile incelendiğinde farkın tablo 2 'de belirtildiği gibi anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.5$)

Page 1 of 1

	Count	GRUP		Row Total
		ANNE	BEBEK	
A1161G		1,00	2,00	
AA	1,00	35	31	66
		100,0	88,6	94,3
AG	2,00		4	4
			11,4	5,7
Column Total		35	35	70
		50,0	50,0	100,0

Chi-Square	Value	DF	Significance
Pearson	4,24242	1	,03943
Continuity Correction	2,38636	1	,12240
Likelihood Ratio	5,78775	1	,01614
Mantel-Haenszel test for linear association	4,18182	1	,04086
Fisher's Exact Test:			
One-Tail			,05711
Two-Tail			,11421

Minimum Expected Frequency = 2,000
Cells with Expected Frequency < 5 = 2 of 4 (50,0%)

Statistic	Value	95% Confidence Bounds	
Relative Risk Estimate (A1161G 1,0 / A1161G 2,0) : cohort (GRUP 2,0 Risk)	,46970	,36349	,60694

Number of Missing Observations: 0

Tablo 2: χ^2 testi ile anne-bebek arası A1161G mutasyonu karşılaştırılması

5. TARTISMA

Son yıllarda β -Oksidasyonun ani bebek ölümlerindeki rolü araştırmacıların ilgi duydukları bir konu olmaktadır. Ani bebek ölümlerinin tanımında otopsi bulgularının normal olması gerektiği, bu neden ile kas, kalp ve karaciğer üzerinde dikkatli mikroskopik çalışmalar yapılması ve β -oksidasyon bozukluklarını Ani Bebek Ölümlerinin sebeplerinden ayrılabilmesi gerektiği ancak bazı durumlarda β - oksidasyon bozukluklarının çok az bir hücre hasarı oluşturması sebebiyle postmortem bulgusunun mümkün olamadığı da belirtilmiřtir⁴¹. Semptomların açlık ve enfeksiyon dönemlerinde ortaya çıktığı, ortaya çıktığı yaşın ortalama 15 aylık olduğu, ve ilk semptom görülen bireylerden %25 inin öldüğu bildirilmiştir(11). MCAD bozukluğu tesbit edilen bireylerde açlık önlendiği ve yüksek karbonhidrat alımı gerçekteştiğinde ölümün önlenebileceği bildirilmiřtir¹¹. Daha önceleri ani bebek ölümlerinin % 15-17 si β - oksidasyon bozukluklarına bağlanırken bugün yeni tetkiklerin gelişimi ile bu değerin yüzde 1 -3 arasına düşdüğu bildirilmiřtir⁴¹. Güvenilir otopsi bulgularının bulunmaması sebebiyle aniden , açıklanamayan sebepten ölen tüm çocuklarda β -oksidasyon metabolizması bozukluklarının araştırılması yanında postmortem incelemelerde kan , idrar, açilglisin ve açilkarnitin incelemeleride yapılmalıdır.Karaciğer , kas ve kalp dokuları gelecekteki çalışmalar için anında -70 derecede dondurmak ve mümkünse deri fibroblast kültürü hazırlamak, çalışmalar sonucu çocuklarda ve asemptomatik bireyler ile ilgili risk derecesinden söz edilebileceği görüşü günümüzde yaaygın taraftar toplamaktadır⁴¹.

Bu tez çalışmasında β - oksidasyon reaksiyonunda katalizörlük yapa orta zincirli yağ açil KoA dehidrogenaz (MCAD) enzim genindeki olası mutasyonlarla ani bebek ölümleri arasındaki bağlantı araştırılmıştır.

MCAD proteininin dört identik alt ünitenin birleşmesi ile meydana gelmiş kararlı bir tetramer yapı olduğu ve orta zincirli yağ asitlerinin β - oksidasyonu basamağında görev aldığı, Merkezinde bulunan + yüklü Lys ile 304 pozisyonundaki - yüklü 342Gln ile oluşturduğu kararlı yapı bozulduğunda enzimin etkisiz hale geleceği bildirilmiştir^{41,15,20}. Araştırdığımız gen 12 ekzona sahip 44kb lık büyük bir gendir. 12 ekzon arasından ekzon 11 üzerinde mutasyona açık 11 bölge bulunduğu ve üzerinde görülen mutasyon oranının diğer ekzonlardakine göre çok yüksek olduğu çalışmalarla gösterilmiştir^{22,28,45,46,5}.

Ekzon 11 incelendiğinde sekiz tane mutasyona açık nokta belirtmiştir(Bkz:Ek 6,7).Bu noktalar arasında genin çalışıldığı toplumlarda en sık görülen mutasyon hastalığı tesbit edilen bireylerin % 90 nında görülen ve dikkat çeken nokta 985 pozisyonu olarak bildirilmiştir¹⁶.Homozigot A985G mutasyonun görüldüğü bireylerde MCAD bozukluğu görüldüğü ve bu bozukluğun ani bebek ölümlerine sebebiyet veren metabolik sebepleri arasında en önemli ve sık rastlanana olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'de gerçekleştirilmiş, ekzon 11 üzerindeki tüm mutasyonları tarayan böyle bir araştırmanın daha önce yapılmamış olması sebebiyle çalışma gurubumuz gelişi güzel seçilmiştir.

Özellikle A985 noktasını incelemek için yaptığımız Polimeraz Zincir Reaksiyonu

(PCR), noktaya ait NcoI restriksiyon enzim kesimi ve sonucu %2 lik agfaroze jelde incelenmiş, sahip olduğumuz hiçbir örnekte bu noktaya ait mutasyona rastlamamıştır. Bunun sebebinin seçtiğimiz örneklerin gelişi güzel seçilmiş olması , MCAD enzim genine ait hiçbir ailesel bozukluk hikayesi aranmamış olması ve çalışılan örnek sayısının çok fazla olmaması olarak düşünmekteyiz.

Enzim kesiminden sonra olası tüm mutasyonları incelemek üzere dizileme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.Bu reaksiyon ile MCAD geni ekzon 11 bölgesine ait olası tüm mutasyona açık noktaları incelenmiştir.

Sonuç olarak bebeklere ait sahip olduğumuz 35 örnekten dört tanesinde A1161G heterozigot mutasyonuna rastlanmıştır, annelere ait örneklerde ise bu noktaya ait mutasyonda rastlanılmamıştır. Sahip olduğumuz bebeklerde görülen 4/ 35 oranındaki mutasyon χ^2 testi ile anneler ile karşılaştırıldığında bebeklerde görülen mutasyon frekansı annelere göre anlamlı derecede yüksektir ancak heterozigot olarak bulunan bu mutasyon çekinik olması sebebiyle fenotipik olarak MCAD 'ın tetramer yapısını etkilememekte dolayısı ile bebeklerde klinik açıdan enzim eksikliğine bağlı bir sendrom olmadığı düşünülmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında 1161 noktasında bulunan mutasyona ait fazla veri bulunamamıştır. Bazı yayınlarda G1161 noktasının sadece polimorfik bir nokta olduğu bildirilsede dizileme çalışması yapılan ülkelerde bu alele fazla rastlanmamış olması bu noktayı sadece mutasyona açık bir nokta olarak bırakmakta ani bebek ölümleri ile bağlantısı açıklanamamaktadır sadece sessiz mutasyon noktası diyede düşünülen bu noktanın ani bebek ölümlerinde etkin olmadığıda ispatlanmamıştır⁴⁸.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile diğer ülkelerde ender görülen G1161 alelinin Türk toplumunda oldukça yüksek olduğunu saptamış bulunmaktayız.

Türk toplumunda yapılan bu çalışma ile G1161 alel frekansının üzerinde araştırma yapılan diğer toplumlara göre böylesi yüksek olması ileride örnek sayısı çoğaltılarak yapılacak çalışmalarda homozigot bireylerinde bulunabileceğini dolayısı ile bu bireylerde MCAD protein yapısında oluşabilecek değişikliklerin incelenebileceğini ve ani bebek ölümleri ile bağlantısını araştırabileceğimizi düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Çalışmamızda ani bebek ölümleri ile orta zincirli yağ asitleri dehidrogenaz (MCAD) enzim genindeki mutasyonlar arasındaki olası bağlantıyı incelemek amaçlı olarak annelerden alınan 35 örnek ve 35 bebekten alınan kordon kanı kullanılarak MCAD enzim geni incelenmiştir.

Toplam 70 örnekten elde edilen DNA'lardan MCAD geni yapısındaki olası mutasyonları inceleyebilmek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), restriksiyon enzim kesimi , agaroz jel elektroforezi ve dizileme reaksiyonu teknikleri kullanılmıştır.

Çalışmamız sonucunda bebeklerde 4 / 35 oranında 11. Ekzondaki 11 sıcak noktadan biri olan 1161 noktasında heterozigot A1161G mutasyonuna rastlanmış, diğer hiçbir mutasyon gözlenmemiştir. Annelerde ise herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir. Bebeklerde görülen bu mutasyon miktarı istatistiksel olarak annelere göre anlamlı derecede yüksek olmakla beraber çekinik etkiye sahip bu alelin heterozigot durumda beklendiği şekilde herhangi bir metabolik etkisi görülmemiştir.

Bu sonuçlara göre Türk toplumunda diğer incelenilen toplumlara göre A1161G mutasyonunun beligin derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Random seçilen bebeklerdeki bu yüksek alel oranı daha büyük bir grup ile yapılan çalışmalarda homozigot mutasyonun bulunabileceğini ve homozigot gen yapısı ile ani bebek ölümleri arasındaki bağlantının incelenebileceğini akla getirmektedir.

7. SUMMARY

The relationship between Medium Chain Acyl CoA (MCAD) deficiency and sudden infant death syndrome (SID) were studied in 70 samples, 35 from mother, and 35 from chord blood of newborns.

Polymerase Chain Reaction (PCR), restriction enzyme digestion, sequencing and agarose gel electrophoresis techniques were used to identify the probable mutations that may occur on exon 11.

We ended up with A 1161G mutation in 4 / 35 newborns, and no A985G mutation in newborn groups.No mutation were detected in mothers.

When A1161G mutation was compared between newborns and mothers, mutation in newborn group was found to be statistically significant ($p < 0.05$) but as the mutation was heterozygous and the gene was recessive , the effect of the mutation at protein level couldn't be observed.

As a result, we found that G1161 allele frequency is much more higher in Turkish population than in any other populations .We think that if we increase the amount of the samples from the newborns, we may end up with homogeneous mutations and by that way we can check the effect of the mutation on enzyme activity.

8.ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında İstanbul 'da doğdum. İlköğrenimimi Fenerbahçe Nurettin Teksan İlkokulu'nda , orta ve lise öğrenimimi Kadıköy Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılı haziran döneminde Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 'nden mezun oldum.1994 -1995 yılları arasında Marmara Üniversitesi Pedagojik Formasyon programını tamamladım.1994 -1995 seneleri arasında İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Genetik Bölümü'nde gönüllü öğrenci statüsünde çalıştım. 1995- 1996 seneleri arasında Kadıköy Anadolu Lisesinde ve Kadıköy Hedef Dershanesinde öğretmenlik yaptım. 1995 yılı Eylül ayında Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım. Halen İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda lisansüstü çalışmalarımı sürdürmekteyim.

Nilüfer Bozkurt

9. KAYNAKLAR

1. Andersen Brage Storstein, Bross Peter , Jensen Thomas , Winter Vibeke, Knudsen Inga, Kolvraa Steen, Jensen Uffe Birk, Bolud Lars, Kim Jung-Ja , Curtis Diana , Gregersen Niels. A rare disease -associated mutation in the Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) gene changes a conserved Arginine , Previously shown to be functionally essential in short Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (SCAD) Am. J. Hum. Genet. 53:730 - 739, (1993).
2. Andersen Storstein Brage, Jensen Thomas, Bross Peter , Knudsen Inga, Winter Vibeke , Gregersen Niels, Bolund Lars, Ding Jia- Huan , Chen Yuan -Tsong , Van Hove Johan, Curtis Diana , Yokota Ichiro, Tanaka Kay, Kim Jung-Ja , Gregersen Niels. Disease causing mutations in exon 11 of the of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene. Am. J. Hum. Genet. 54:975-988 (1994).
3. Baird, B. A and Hammeo, G.G. : Structure of oxidative and photophosphorylation coupling factor complexes. Biochem., Biophys. Acta. 549, 31-53 (1979).
4. Bitter, E.E.: Cell biology in medicine . John Willey and sons. New York, London, Sydney, Toronto (1973), S 107-150 .
5. Blakemore Alexandra I . F., Kolvraa Steen , Gregersen Niels, Engel Paul C., and Curtis Diana. Localisation of RFLPs of the Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase gene. Hum. Genet. (1991) 86 : 537-538.

6. Blakemore Alexandra I.F., Singelton Helen, Pollitt Rodney, Engel Paul C, Kolvraa Steen, Gregersen Niels, Curtis Diana. Frequency of the G985 MCAD mutation in the general population. *The Lancet* 337: 299 (1991).
7. Champe Pamela C., Harvey Richard A. *Lipincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 2 nd edition 171-190 (1994).
8. Conne B., Zufferey R., Belin D. The A985G mutation in the Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene : high prevalence in the Swiss population resident in Geneva. *J. Inher. Metab. Dis.* 18 , 577-583 (1995).
9. Ding Jia- Huan , Yang Bing- Zhi, Bao Yong, Roe Charles R. , Chen Yuan - Tsong. Identification of a new mutation in Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 229-233 , 1992.
10. Editorial Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene determined from Guthrie cards. *The Lancet* 338: 552 (1991).
11. Editorial, Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) deficiency. *Lancet* 338: 544-545 (1991).
12. Fernander- Moran H., Oda T., Blair P. V. and Green D.E.: A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function. *J. Cell Biol.* 22, 63-100. (1964).
13. Fortina Paolo. The Children' Hospital of Philadelphia . Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency Exon 11 DNA Sequence Analysis Protocol (1998).
14. Giese , A.C. : *Cell Physiology*, 3 rd edition W.B. Saunder Comp. Philadelphia-London-Toronto (1969) : 119-123.
15. Gregersen Niels , Andersen Brage Storstein , Bross Peter, Winter Vibeke , Rüdiger Niels, Engst Stefan, Christensen Ernst, Kelly Daniel, Strauss Arnold W,

- Kolvraa Steen , Bolund Lars, and Ghisla Sandro. Molecular characterization of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) deficiency : identification of a lys³²⁹ to glu mutation in the MCAD gene, and identification of inactive mutant enzyme protein in Ecoli. Hum. Genet. 86: 545-551 (1991).
16. Gregersen Niels , Winter Vibeke ,Jensen Peter K., Holmskov Anni, Kolvraa Steen , Andersen Brage, Christensen Ernst, Bross Peter, Lundemose JytteB., Gregersen Markil. Prenatal Diagnosis of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) deficiency in a family with a previous fatal case of sudden unexpected death in childhood. Prenatal Diagnosis. Vol. 15 : 82-86 (1995).
17. Gregersen Niels ,Blakemore Alexandra, Winter Vibeke , Andersen Brage , Kolvraa Steen , Bolund Lars, Curtis Diana , Engel Paul C. Specific diagnosis of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) deficiency in dried blood spots by a polymerase chain reaction (PCR) assay detecting a point mutation (G985) in the MCAD gene. Chimica Acta , 203: 23-24 (1991).
18. Guyton, A.C.: Textbook of Medical Physiology, 5 th edition, W.B.Saunders Comp.,(1976) : 22-24.
19. Harris, E.S. , Berrent,, C.: The applicability of the Donnan relation to the distribution of certain anions between mitochondria and medium. Febs Letts., 10, 6-12 (1970).
20. Harvey Daniel F. Department of Chemistry & Biochemistry. Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency (1994).
21. Iolascon Achille, Parella Teresa , Perrotta Silverio, Guardamagna Ornella, Coates Paul M., Sartore Maria, Fortina Paolo. Rapid detection of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene mutations by non radioactive , single strand conformation polymorphism minigels. J.Med. Genet. 31 : 551-554 (1994).

22. Kelly Daniel P., Kim Jung-Ja , Billadello Joseph J., Hainline Bryan E., Chu Thomas W. and Strauss Arnold W. Nucleotide sequence of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase m RNA and its expression in enzyme deficient human tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4068-4072, June 1987 Biochem.
23. Klingenberg, M.: Metabolite transport in mitochondria : An example for intracellular function. Essays in Biochem., 6, 119-154 (1970).
24. Kolvraa Steen , Gregersen Niels , Blakemore Alexandra I . F., Schneidermann Anne K., Winter Vibeke , Andersen Brage Storstein , Curtis Diana, Engel Paul C., Pricille Divry, Rhead William and Bolund Lars. The most common mutation causing Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase Deficiency is strongly associated with a particular haplotype in the region of the gene. Hum. Genet. 87: 425 - 428 (1991).
25. La Nove, F. K. and Schoolwert, A.C.: Metabolite transport in mitochondria : Ann. Rev. Biochem., 48, 871-922 (1979).
26. Leeson, S.T. and Leason, C.R.: Histologie, Masson et Cie ed. Paris. S.28-31(1971).
27. Lundemose Jytte B., Gregersen Niels, Kolvraa Steen, Pedersen Bent Nogaard, Gregersen Markil, Helweg- Larsen Karin and Simonsen Jorn. The frequency of a disease - causing mutation in the gene coding for Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase in sudden infant death syndrome. Acta Peditr. 82:544- 6 ,1993.
28. Mayo Lab Genetics. Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency procedure (1998).
29. Mayo Medical Laboratories. . Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency (1997).

30. Miller E. Marvin, Brooks John G., Forbes Nicholas, Insel Richard. Frequency of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency G985 Mutation in sudden infant death syndrom. *Pediatric Research*, 31 .No: 4, (1992).
31. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.S.: Simple salt out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16 / 3 : 1215(1988).
32. Morris A.A.M., Taylor R.W., Lightowers R.N., Aynsley-Green A., Bartlett K., Turnbull D.M. Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency caused by a deletion of exons 11 and 12. *Hum.Molec.Genet.* 4: 747-749 (1995).
33. Penefsky , H. S.: Mitochondrial ATPase , *Adv.Enzymat.*, 49. 233-280, (1979).
34. Rocker, E.: The two faces of the inner mitochondrial membranes. *Essays inBiochem.*, 6,1-23 (1970).
35. Rozen Rima, Vockley Jerry, Zhou Lubing, Milos Renate, Willard Jan, Fu Katherine, Torban Elena ., Isolation and expression of a c DNA encoding the precursor for a novel member (ACADSB) of the Acyl - CoA Dehydrogenase gene family. *Genomics* 24, 280-287 (1994) .
36. Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual* , 2nd edition , New York Cold Spring Harbor Laboratory Press 9. 19, (1989).
37. Slatter, E.C. , Kemp.A., Von der Kroon I., Muller, J. L. M. , Rover ,O.A.et al. The ATP and ADP binding sites in mitochondrial coupling factor F₁ and their possible role in oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.s.*, 103, 7-11, (1979).
38. Tanaka Kay, M.D., Gregersen Niels, Ribes Antonia, Kim Julie, Kolvraa Steen, Winter Vibeke, Eiberg Hans, Martinez Gemma, Deufel Thomas, Leifert Barbara, Santer Rene, François Baudoin et al.A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the incidence of G985 variant allele, with with a compilation of

- published data, and a study of the haplotypes at the Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene locus: Clinical significance and consideration for the evolutionary origin of the variant allele. (1996).
39. Tanaka Kay, Yokota Ichiro, Coates P.M., Strauss A.W., Kelly Daniel, Zhang Zhifang, Gregersen Niels, Andersen B.S., Matsubara Y, Curtis Diana, Chen Y.T. Mutations in the Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene. *Human Mutation* 1:271-279 (1992).
40. V. Darley - Usmar A.H.V. Schapira. *Mitochondria: DNA, Proteins and Disease* (1994).
41. Vockley Jerry, M. D., Ph.D. The changing face of disorders of fatty acid oxidation. *Mayo Clinic Proc.* 1994 Vol : 69, 249-257.
42. Yokota Ichiro, Coates Paul M., Hale Daniel E., Rinaldo Piero and Tanaka Kay. The molecular basis of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency : Survey and evolution of A985G transition and identification of five rare types of mutation within the Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) gene. *New Development in Fatty Acid Oxidation*, pages 425-440, 1992.
43. Yokota Ichiro, Indo Yasuhiro, Coates Paul M., Tanaka Kay. Molecular basis of Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) deficiency. *J. Clin. Invest.* 86: 1000-1003 (1990).
44. Yokota Ichiro, Saijo Takahiko, Vockley Jerry, Tanaka Kay. Impaired tetramer assembly of variant Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) with a Glutamate or Aspartate Substitution for Lysin 304 causing of the protein. *J. Biol. Chem.* 267: 26004-26010 (1992).
45. Zhang Zhifang, Kelly Daniel, Kim Jung-Ja, Zhou Yeqing, Ogden Moira, Whelan Alison, Strauss Arnold W. Structural organization and regulatory regions of the

human Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene. *Biochemistry*. 31: 81-89, (1992).

46. Zhifang Zhang, Kolvraa Steen, Zhou Yeqing, Kelly Daniel P., Gregersen Niels , Strauss Arnold W., Three RFLP s defining a haplotype associated with the common mutation in human MCAD deficiency occur in alu repeats. *Am.J.Hum.Genet.*52: 1111-1121, (1993).
47. Ziadeh Rana, Hoffman Eric, Finegold David , Hoop Rita, Brackett Jeffrey, Strauss Arnold, Naylor Edwin W. Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) in Pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies.(Original copy) (1994).
48. Zhang Zhifang , Andersen Brage, Kolvraa Steen, Bross Peter, Bolund Lars, Curtis Diana, Eiberg Hans, Kelly Daniel, Strauss Arnold, Gregersen Niels. A Silent A to G mutation in exon 11 of the Medium Chain Acyl - CoA Dehydrogenase (MCAD) gene. *Human Molecular Genetics*. Vol 2, No: 4 488, (1993).

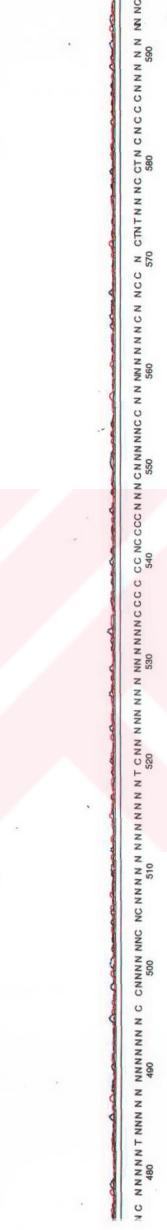
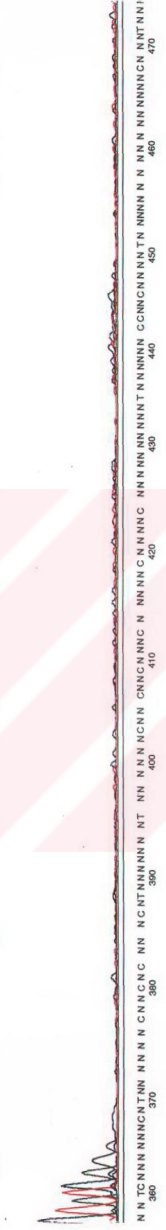
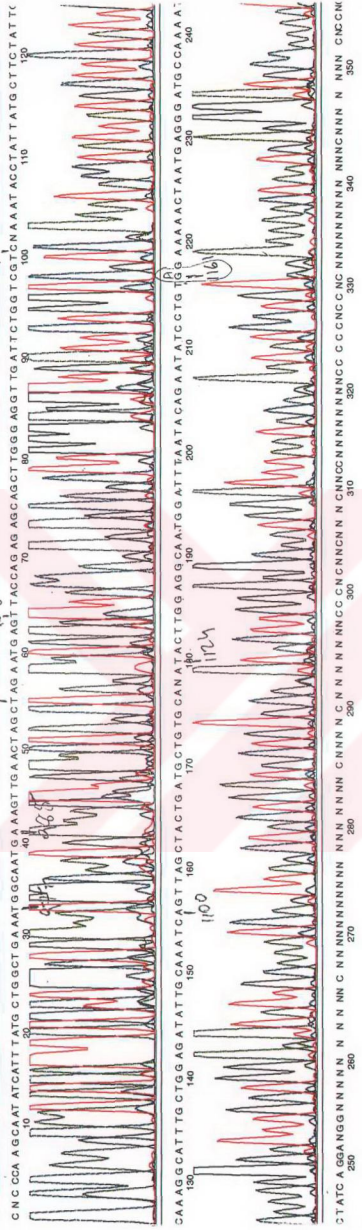
10.EKLER



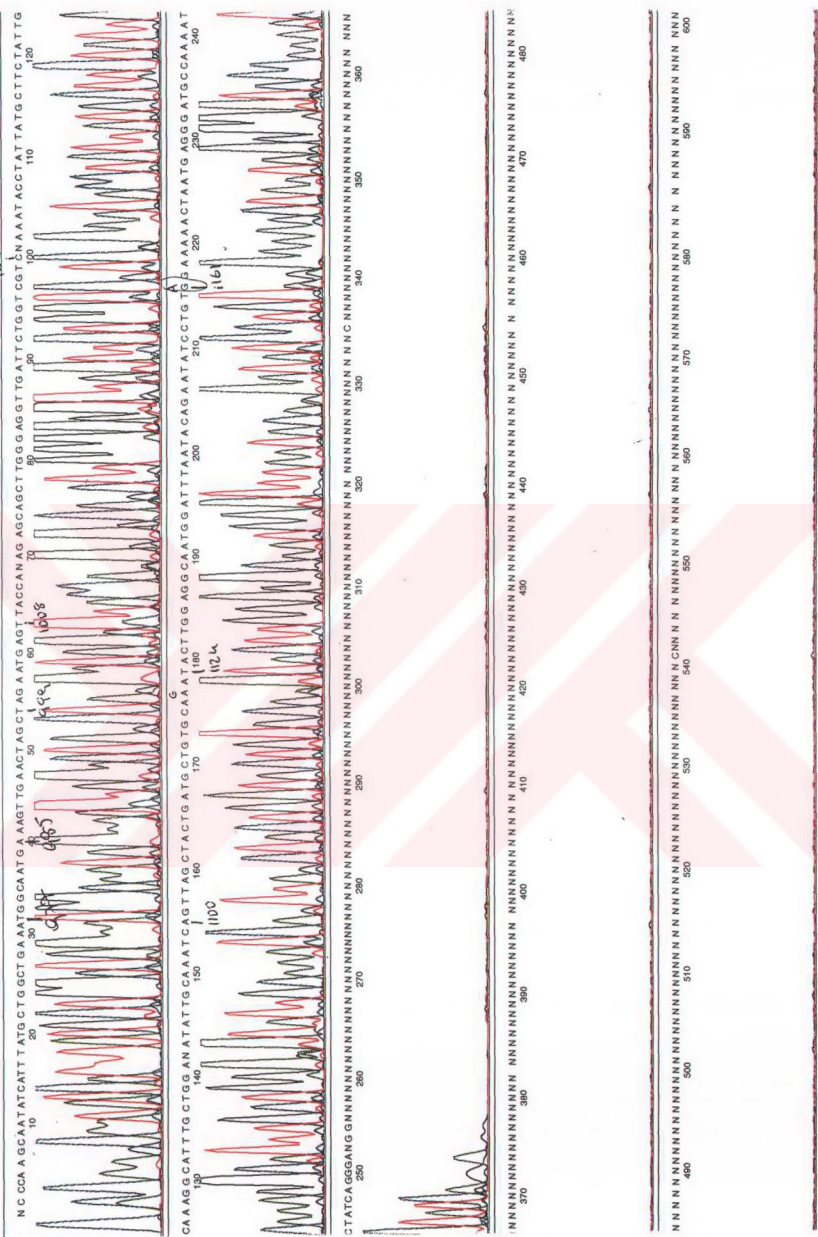
Fri, Aug 16, 1996 9:09 AM
 Thu, Aug 15, 1996 5:35 PM
 102 Spacing: 8.59 AB1100

Dye Terminator (AnyPrimer)
 Seq 1 Matrix 4-3-96
 Points 951 to 8350 Base 1: 951

Lane 10
 SAGE
 ofa



Ek 2-A : MCAD geni ekzon 11 dizileme ileri (3'-5') reaksiyon sonucunun A1161G sahip bireyde gösterilmesi



Ek 4-A : MCAD geni ekzon 11 dizileme ileri (3'-5') reaksiyon sonucunun A1161G sahip bireyde gösterilmesi

