

30244

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİSTİK FİBROZİS VE FENİLKETONÜRİ'DE
MUTASYON-DİZİ ANALİZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENGİN YILMAZ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
DOÇ.DR. MERAL ÖZGÜÇ

ANKARA

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

1993

DOKTORA TEZ SAVUNMA JÜRİSİ



DOÇ.DR. MERAL ÖZGÜÇ
DANIŞMAN ÜYE



PROF.DR. ŞÜKRÜYE AYTER
ÜYE



PROF.DR. AHMET KART
ÜYE



PROF.DR. UFUK GÜNDÜZ
ÜYE



PROF.DR. İMRAN ÖZALP
ÜYE

Amaç.....	1
1.Genel Bilgiler.....	2
1.1.Kromozom Hastalıkları.....	2
1.2.Multifaktoriyel Hastalıklar.....	2
1.2.Tek Gen Hastalıkları.....	3
1.4.Tek Gen Hastalıklarında Biyokimyasal Tanı.....	4
1.5.Tek Gen Hastalıklarının Moleküler (DNA) Analizi.....	5
1.6. Yeni Mutasyonların Saptanması.....	8
1.6.1.Öntarama Metodları.....	8
1.6.2.DNA Dizi Analizi.....	9
1.6.2.1.İndirekt Dizi Analizi.....	10
1.6.2.2.Direkt Dizi Analizi.....	10
1.7.Kistik Fibrozis' in Moleküler Genetiği.....	11
1.8.Fenilketonüri' nin Moleküler Genetiği.....	15
2.Materyal Metod.....	20
2.1.Tamponlar.....	20
2.1.1.DNA İzolasyon Tamponları.....	20
2.1.2.Jel Elektrophorez Tamponları.....	21
2.1.3.DNA Amplifikasyon Tamponları.....	21
2.1.4.Dot Blot Tamponları.....	22
2.1.5.Hibridizasyon Tamponları.....	22
2.1.6.SSCP Tamponları.....	22
2.1.7.DNA Dizi Analiz Tamponları.....	23
2.2.Metodlar.....	25
2.2.1.DNA İzolasyonu.....	25
2.2.2.DNA Konsantrasyonunun hesaplanması.....	25
2.2.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
2.2.4.Amplifiye Olan DNA Örneklerinin Analizi.....	26
2.2.4.1.PCR-RFLP Analizi.....	27
2.2.4.2.Poliakrilamid Jel Elektrophorez Analizi.....	27
2.2.4.3.Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) Analizi.....	27
2.2.4.3.1.Normal ve Mutant Oligonükleotidlerin İşaretlenmesi.....	28

2.2.4.3.2.Hibridizasyon.....28

2.2.5.Yeni Mutasyonların Analizi için DNA Örneklerinin
Hazırlanması.....29

2.2.5.1.SSCP Analizi.....29

2.2.5.2.Asimetrik PCR.....29

2.2.5.3.DNA Dizi Analizi.....29

3.Sonuçlar.....32

4.Tartışma.....41

Ek 1.....45

Özet.....48

Summary.....49

5.Kaynaklar.....50



AMAÇ

Kalıtsal hastalıkların insidansı, popülasyonun bulunduğu coğrafik bölge, etnik orijin ve popülasyon içerisindeki diğer faktörlerden (akraba evliliği ve çevresel faktörler) dolayı popülasyondan popülasyona farklılık göstermektedir.

Doku farklılaşması nedeni ile her protein kan ve fibroblast gibi kolay elde edilebilir dokularda eksprese edilemiyebilir. Bu nedenle, biyokimyasal testler ile defektif proteinin tanımlanamadığı kalıtsal hastalıkların tanısı, her çekirdekli hücrede sabit olan DNA molekülünün, moleküler biyolojik metodlar ile incelenmesiyle konulmaktadır.

Akraba evliliğinin % 21 gibi yüksek değerlerde olduğu ülkemizde (1) kalıtsal hastalıklar önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ülkemizde oldukça yüksek insidansla görülen fenilketonüri (PKU) ve kistik fibrozis (CF) gibi iki önemli kalıtsal hastalıkta, moleküler biyolojik teknikler tanıyı hızlandırdığı gibi, klinik bulgulardaki değişkenliğin tanıyı şüpheye düşürdüğü durumlarda, tanıyı kesinleştirmektedir.

Bu çalışmada, PKU ve CF gen lokusundaki mutasyonların, Türk hastalarındaki insidanslarını saptamak ve toplumumuza özgül yeni mutasyonları tesbit etmek için, bir ön tarama metodu olan SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ve DNA dizi analiz tekniklerini bölümümüz laboratuvarlarında uygulamayı amaçladık.

1. GENEL BİLGİLER

Her ne kadar genler dikkati çekecek kadar kararlı bir yapı gösterebilirler de, zaman zaman doğal veya çevre şartlarına bağlı olarak değişikliklere uğrarlar. Genetik materyalde meydana gelen ve kalıtım ile kuşaktan kuşağa aktarılabilen bu bozukluklara mutasyon denilmektedir (2). Mutasyonlar, kromozom yapısı (delesyon, duplikasyon ve translokasyon) veya kromozom sayısındaki değişiklikler olduğu gibi, bir gende bir veya bir kaç nükleotidin delesyonu veya insersiyonu ya da bir nokta (baz değişimi) mutasyonu şeklinde oluşabilmektedir. Mutasyonlar ile yapısal ve enzimatik görevi olan proteinlerin etkilenmesi sonucu genetik hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Genetik hastalıklar; mutasyona uğrayan gen sayısı ve çevresel faktörlerden etkilenme durumlarına göre üç ana gruba ayrılmaktadır (3).

1.1. Kromozomal Hastalıklar.

Kromozomal hastalıklarda, mutasyonlar genomun büyük bir bölümünü etkilemiştir. Son araştırmalara göre, yeni doğanlarda kromozom hastalıklarının insidansı % 0.60' dır. Bunların % 0.24' ünü cinsiyet kromozomu anomalileri, % 0.36' sını otozomal bozukluklar oluşturmaktadır (4).

1.2. Multifaktöriyel Hastalıklar.

Bu grupta, Hastalığın temelinde hem genetik, hem de çevresel faktörlerin etkileri bulunmaktadır. Bu malformasyonlarda, bireyin içinde bulunduğu etnik, coğrafik ve sosyal farklılıklar önemli rol oynamaktadır. Konjenital kalp hastalığı, hipertansiyon, dudak-damak yarıklığı, mide ülseri ve şizofreni bu grupta yer alan hastalıklardır. Bu hastalıkların bilinen bir kalıtım şekli yoktur. Ancak

aynı aile içersinde görülmeleri kalıtsal temellerine bir ipucu teşkil etmektedir. Genç yaşta ortaya çıkanlar da hesaba katılırsa genetik hastalıklar içersinde, multifaktöriyel hastalıkların insidansı yaklaşık % 60'dır (5).

1.3. Tek Gen Hastalıkları.

Bu grupta tek bir gende bozukluk söz konusudur. Gen ürününün sentezlenememesi ve/veya toksik metabolitlerin birikimi hastalığa neden olmaktadır (6). Günümüzde yaklaşık 4344 tek gen hastalığı saptanmıştır (7) (Tablo I). Tek gen hastalıkları, Mendelyen kalıtım şekillerinden birisi ile (otozomal resesif, otozomal dominant, X' e bağlı resesif ve X' e bağlı dominant) aktarılmaktadır.

Tablo I : Tek gen hastalıklarının dağılımı (McKusick 1988)

	1978	1983	1986	1988
Otozomal Dominant	1489	1827	2201	2557
Otozomal Resesif	1117	1298	1420	1477
X' e Bağlı Hastalıklar	205	243	286	310
Toplam	2811	3368	3907	4344

Dünya genelinde yapılan taramalar sonucunda, tek gen hastalıklarından, otozomal dominantların insidansı yaklaşık 7/1000, otozomal resesiflerin insidansı yaklaşık 2.5/1000 ve X' e bağlı hastalıkların insidansı yaklaşık 0.5/1000 dir (6).

Değişik popülasyonlara bakıldığında, öncelikle bulundukları coğrafik bölge farklılığı ve etnik orijin, daha sonra ise, popülasyon içersindeki diğer faktörlerden dolayı (akraba evliliği oranı, kişilerin çevre ile olan ilişkileri v.b) kalıtsal hastalıkların insidansı farklılık göstermektedir (Tablo II).

Tablo II : Fenilketonürinin farklı ülkelerdeki insidansları.

ÜLKELER	İNSİDANSI	KAYNAK
İsveç	1/30.000	(8)
Türkiye	1/5.524	(9)
Çin	1/16.000	(10)
Japonya	1/119.000	(11)

Bilindiği gibi kalıtsal hastalıklardan korunmanın bir yöntemi yoktur. Bu hastalıkların fenilketonüri ve galaktozemi gibi örneklerinin dışında tedavi edilmeleri mümkün değildir. Önlenebilmeleri, toplumda taşıyıcıların tesbiti, genetik danışma ve doğum öncesi tanı metodları ile hastalığın bir sonraki kuşaklara aktarılmasının engellenmesi ile gerçekleştirilmektedir.

1.4. Tek Gen Hastalıklarında Biyokimyasal Tanı.

Tek gen hastalıklarına neden olan mutasyonların yapısal ve enzimatik görevi olan proteinleri etkilemeleri sonucunda, organizma hücrelerinde metabolik bozukluklar görülmektedir. Bazı kalıtsal hastalıklarda, idrar veya serumdaki metabolitler veya toksik maddeler gösterilerek tanı konulabilmesine karşın, biyokimyasal testler ile en pratik tanı yaklaşımı enzim tayinidir (Tablo III).

Tablo III : Biyokimyasal testler ile bazı kalıtsal hastalıkların tanısı.

KAN	İDRAR	DOKU (fibroblast)
Sistinüri		sistin,ornitin, arjinin,lizin artışı
İzovalerik asidemi	izovaloril-CoA dehidrogenaz	izovaloril-CoA dehidrogenaz
Zellweger send.	uzun zincirli yağ asitlerinin ve fitanik asit artışı	
Homosistinüri		sistationin sentetaz

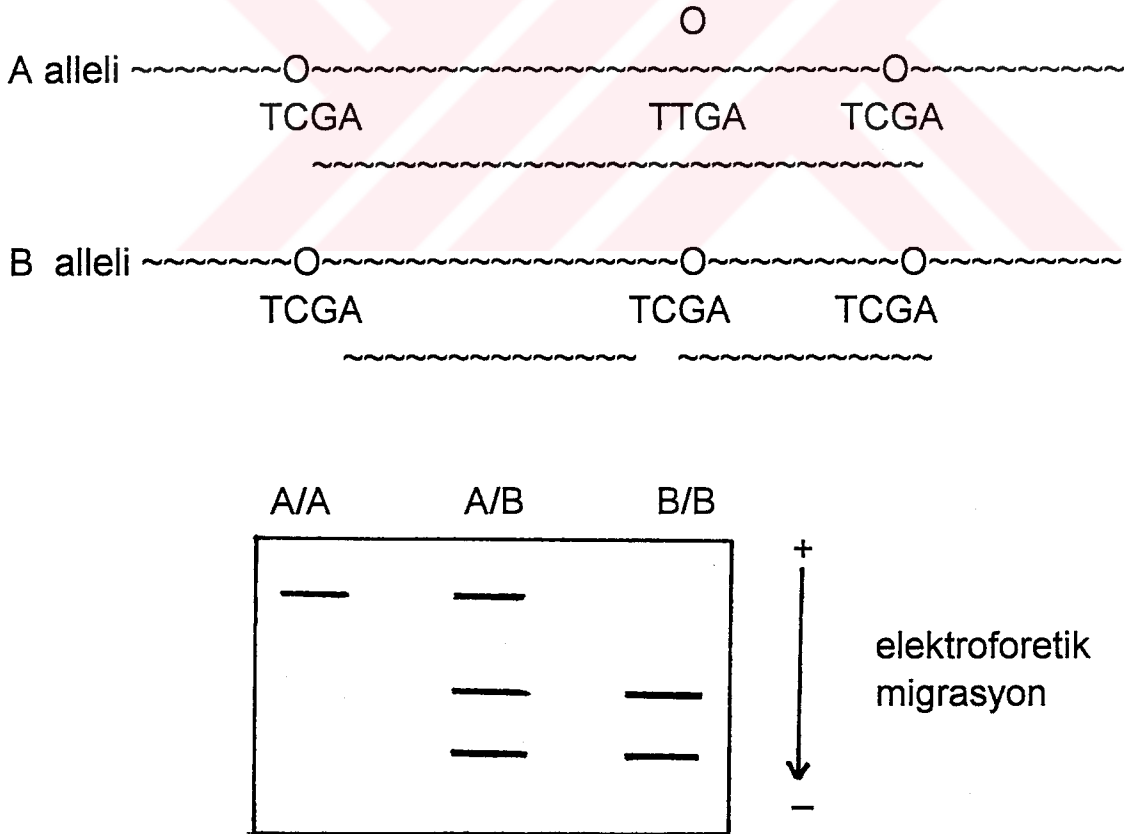
Gen ekspresyonunun dokuya özgül olduğu durumlarda, örneğin, tip I glikojen depo hastalığı veya fenilketonüri için karaciğer dokusu gerekmektedir. Hastalığa neden olan biyokimyasal bozukluğun mekanizması bilinse bile, bazı kalıtsal hastalıklarda protein analiz yöntemleri ile tanı mümkün olamamaktadır. Bu durumda, doku farklılaşmasına rağmen her çekirdekli hücrede sabit olan DNA molekülü, moleküler biyolojik metodlar ile incelenerek kalıtsal hastalıkların tanısı DNA analizi ile konulabilmektedir.

1.5. Tek Gen Hastalıklarının Moleküler (DNA) Analizi.

Moleküler biyolojik teknikler ile genetik hastalıkların tanısına yaklaşımda ilk basamak hastalığa neden olan genin klonlanmış olmasıdır. Geni klonlanmış ve cDNA' sının (komplementer DNA) dizi analizi ile tüm mutasyonları saptanmış bir kalıtsal hastalık ile, geni klonlanmış fakat özgül mutasyonları henüz saptanamamış kalıtsal hastalıklar farklı teknikler ile analiz edilmektedir.

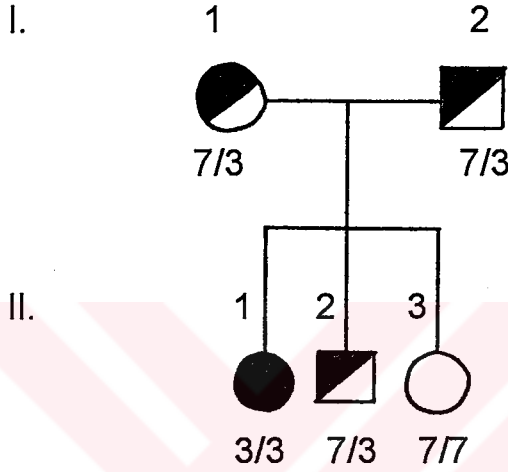
Mutasyonu belirlenmemiş kalıtsal hastalıklarda tanı indirekt yöntemler ile konulmaktadır (12). Bu yöntemde, klonlanan cDNA' nın polimorfik yapısından faydalanılır. Hastalığa neden olan gen ile birlikte kalıtıldığı gösterilen gen içi veya gen dışı polimorfik bölgeler "Linkage Analiz" yöntemleri ile incelenerek allellerin aile içinde kalıtımı takip edilir. Bu yöntem ile, normal ve mutant allelleri birbirinden ayırabilmek için hasta çocuğun muhakkak çalışılması gerekmektedir.

Gen içinde intronda veya gen dışında meydana gelen ve fenotipe yansımayan bir nükleotid değişimi, bir restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesinin içinde yer alırsa, o restriksiyon endonükleaz enziminin DNA molekülünü kesip kesmemesine bağlı olarak, DNA fragmentlerinin boyutlarında bir farklılık meydana gelir. Bu durum RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır (13) (Şekil 1).



Şekil 1 : Restriksiyon endonükleaz polimorfizmi.

Diğer bir tip polimorfizm de, DNA üzerinde bulunan tekrarlayan dizilerdir (tandem repeats). Bu tekrarlar 15-30 baz çifti uzunluğunda değişen diziler içerirler, bu dizilere "minisatellite" adı verilir (14,15). Bu diziler her allelde farklı sayıda tekrar içerebilir (VNTR, Variable Number of Tandem Repeats) ve bu polimorfizmden yararlanarak normal ve mutant alleller birbirinden ayrılabilir (Şekil 2).



Şekil 2: Tekrarlayan (VNTR) baz dizilerinin polimorfizmi. Anne ve baba (I.1 ve I.2) bir allellerinde 7, diğer allellerinde 3 kez tekrarlayan diziyi taşımaktadırlar. Hasta çocuk (II.1) her iki allelde de 3 kez tekrarlayan diziyi taşıdığından hastalığın bu allel ile aktarıldığını göstermekte. 2. kardeş (II.2) bir allelde 7, diğer allelde 3 kez tekrarlanan dizileri taşıdığından taşıyıcı birey. 3. kardeş (II.3) her iki allelde de 7 kez tekrarlayan diziyi taşıdığından sağlam birey.

RFLP yönteminde alleller restriksiyon endonükleaz enziminin kesim yapması (+) veya yapmamasına (-) göre ayırt edildiği için bu yöntem her aile için % 100 informatif olmayabilir. Fakat VNTR bölgeleri değişken sayıda tekrar içerdiği için allellerin ve kişilerin saptanmasında daha informatif bir sistem oluştururlar.

Geni klonlanmış ve DNA dizi analizi ile hastalığa neden olan mutasyonları tesbit edilmiş kalıtsal hastalıklar direkt yöntem ile tanımlanmaktadır (12). Bu yöntemde DNA üzerinde mutasyonun bulunduğu bölge tek kopya halindeyken PCR (Polymerase Chain Reaction) metodu ile in-vitro şartlarda 1×10^6 kere çoğaltılarak bu bölgedeki mutasyon, ASO (Allele Specific Oligonucleotide) veya restriksiyon endonükleaz enzimler ile analiz edilebilmektedir (16,17,18). Bu yöntem ile hastalığa neden olan mutasyon direkt olarak gösterildiği için daha önce ailenin çalışılması gerekmeden hasta çocuk analiz edilebilir.

1.6. Yeni Mutasyonların Saptanması.

Bazı kalıtsal hastalıklar tek bir mutasyonun etkisi ile çıkabilirler. Örneğin, orak hücreli anemi, hemoglobinin beta zincirinin 6. kodonundaki (GAG) adenin bazının, timin bazı ile değişmesi (GTG) sonucunda, proteinde önemli bir yerde bulunan glutamik asit yerine valin amino asidinin gelmesi ile ortaya çıkar (19). Fakat talasemi, fenilketonüri, kistik fibrozis v.b. gibi kalıtsal hastalıklarda gen içinde birden fazla, yaklaşık 100 veya 300'e yakın mutasyon tesbit edilmiştir. Mutasyonların genin neresinde yer aldığı ve proteine nasıl yansıdığı önem taşımaktadır. Mutasyonlar, dağılım açısından popülasyonun bulunduğu coğrafik bölgeye bağlı olarak bir seçime tabi tutulurlar. Örneğin, kistik fibrozisde delF508 mutasyonu kuzey Avrupa' da % 70-80 oranında görülürken, güney Avrupa' da insidansı % 30' dur (20). Bu nedenle kalıtsal hastalıkların heterojenliklerini açıklamak ve popülasyon taramalarını direkt tanı metodları ile gerçekleştirebilmek için popülasyona özgül mutasyonların bulunması gerekmektedir.

1.6.1. Öntarama Metodları.

Bu metodlar ile mutasyonlar, komplementer DNA zincirinin denatürasyon sırasında gösterdikleri davranışlardan yararlanılarak

saptanmaktadır. Analiz edilecek DNA fragmentleri, ısı veya bir denatüre edici ajan ile denatüre edildiği zaman tek zincir haline gelen DNA fragmentleri bir mutasyon taşıyor ise, DNA zinciri farklı bir sekonder yapı kazanmaktadır. Bu durum, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) tekniğinde, DNA' nın denatürasyonu bir denatüre edici ajan ile, TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) tekniğinde, DNA' nın denatürasyonu ısı ile gerçekleştirilir. Her iki sistemde de denatüre edilen DNA fragmentleri, % 6' lik denatüre gradient gel elektroforezinde yürütülür ve farklı migrasyon gösteren DNA fragmentleri, etidium bromür ile boyanan jelin UV lamba altında incelenmesi ile gözlenir (21). SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) tekniğinde ise, incelenecek olan DNA fragmentleri, PCR ile çoğaltılırken, ortamda bulunan radyoaktif işaretli nükleotidlerin DNA fragmentlerinin yapısına katılması ile radyoaktif olarak işaretlenir. Isı ile denatüre edilen radyoaktif işaretli DNA fragmentlerinin jel elektroforezindeki farklı migrasyonları otoradyografiden alınan sinyale göre ayırt edilmektedir. Bu ön tarama teknikleri ile, analiz edilen DNA fragmentlerindeki herhangi bir mutasyon veya polimorfizmin yeri analiz edilmektedir (22,23).

1.6.2. DNA Dizi Analizi

Öntarama teknikleri ile DNA fragmentlerindeki mutasyonların lokalizasyonu saptandıktan sonra, mutasyonun tipi DNA dizi analiz tekniklerinden biri ile gösterilebilmektedir. Mutasyonların belirlenmesi amacıyla uygulanan DNA dizi analizleri A. Maxam ve W. Gilbert veya F. Sanger metodları olarak ikiye ayrılır (24,25). Kullanma kolaylığı ve hassasiyeti açısından günümüzde tercih edilen metod F. Sanger' in yöntemidir. Bu yöntemde, incelenecek olan DNA fragmentleri öncelikle tek zincir halinde çoğaltılır. Tek iplikli DNA fragmentleri, kalıp olarak kullanılarak, bu zincirden, 5' uçları radyoaktif olarak işaretlenmiş ve sentezleri dideoksiribonükleotidler kullanılarak durdurulmuş farklı uzunluktaki yeni zincirler sentezlenir. Radyoaktif işaretli kısa DNA fragmentlerinin denatüre akrilamid jeldeki migrasyonlarına göre kalıp

DNA zincirinin dizi analizi gerçekleştirilir. Bu yöntem ile, DNA fragmentleri iki farklı şekilde incelenebilmektedir.

1.6.2.1. İndirekt Dizi Analizi

Bu metod, klonlanan DNA' nın tek zincirinin kopyalarının oluşturulmasına bağlıdır. Bunun için en iyi yol, M13 vektörleridir. 6407 nükleotidlik tek zincirli bir genoma sahip olan M13 vektörleri dizi analizine alınacak olan DNA' ların klonlanmasında kullanılır. Çift iplikli DNA fragmenti, replikatif formdaki faja klonlanabilir. Bu fajların bakterilere (E.coli, JM 101 suşları) transformasyonundan sonra, iki DNA ipliğinden birtanesi kapsit içersine paketlenir. Hangi DNA zincirinin klonlanacağı tesadüfe bağlıdır. Üniversal primerler ve zincir terminasyon faktörü olarak dideoksiribonkleotidler kullanarak, M13mp vektörlerine klonlanan DNA zincirinin dizi analizi çıkartılır. Bu metod ile, yaklaşık 2-3 kilobazlık DNA fragmentlerinin dizi analizi gerçekleştirilir (26,27).

1.6.2.2. Direkt Dizi Analizi.

Bu metodta, çift iplikli DNA fragmentinin hangi zinciri incelenecek ise, DNA' nın in-vitro amplifikasyonu sırasında, o ipliğezl primer normal konsantrasyonda, diğer primer 1/10 daha az konsantrasyonda kullanılarak istenilen DNA zinciri asimetric PCR tekniği ile oğaltılmış olur (28). Bu tek zincirli DNA fragmenti dizi analizi için direkt olarak kullanılır. Bu zincirezl primer ve zincir terminasyon faktörü olarak dideoksiribonkleotidler kullanarak DNA zincirinin dizisi çıkartılır. Bu metod hızlı ve daha pratik olmasına karşın en fazla 1 kilobazlık bölgelerin analizinde kullanılabilmektedir (29).

Dizi analizleri ile mutasyonun tipi saptandıktan sonra, bu mutasyonun kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunun için mutasyon, bir restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesi ile ilişkili ise, o restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak veya ASO (Allele Specific Oligonukleotide) tekniği ile kontrol edilebilmektedir.

1.7. KİSTİK FİBROZİS' İN MOLEKÜLER GENETİĞİ

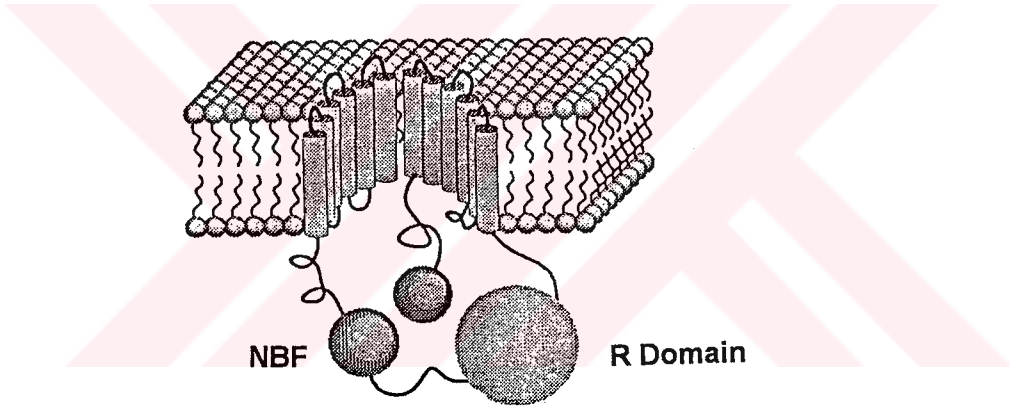
Kistik fibrozis (CF) dış salgı bezlerindeki fonksiyon bozukluğu ile giden ve başlıca akciğer ve pankreas tutulumu olan ve ter elektrolitlerinde anormal yükselme ile giden otozomal resesif bir hastalıktır. Beyaz ırkta, siyah ırka nazaran daha yaygın görülen CF' in beyaz ırktaki insidansı 1 / 2500 dir (30,31). 1975 yılında ülkemizde yapılan bir araştırmada K. Tınaztepe ve arkadaşları 525 otopsi vakası arasında % 7.04 oranında CF vakası saptamışlardır (32,33).

Hastalık, dış salgı yetersizliği, ter elektrolitlerinde anormal yükselme (>60 mEq/L) ve akciğer enfeksiyonları ile gitmektedir (34). Organizmadaki tüm salgı bezlerinde anormal bir viskoz salgı salgınımı söz konusudur. Bu durum, salgı yollarında tıkanıklığa neden olurken bronş ve bronşiolde oluşan tıkanıklık kronik obstrüktif akciğer hastalığına neden olmakta ve sekonder akciğer enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır. İlerleyici akciğer enfeksiyonları (H. influenza, E. coli, P. aureginosa, ve stafilokok) CF' in en önemli sorunu olup ölümlere bu enfeksiyonlar neden olmaktadır.

CF vakalarının % 85-90' nında pankreas yetmezliği görülmektedir. Duedonum sıvısında pankreatik lipaz, amilaz ve proteolitik enzimler bulunmamakta veya miktarları çok azalmıştır. Pankreatik enzimlerin intestinal kanala boşalamaması sonucu yağ ve protein emilimi bozulmakta ve buna bağlı olarak malabsorbsiyon ortaya çıkmaktadır (35,36).

CF geni 1989 yılında Lap Chee Tsui ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (37). Bu gen 7. kromozomun q kolunun 31. bandında (7q31) yer alır. 27 ekzon içeren 250 kilobazlık bu gen, 6.5 kilo bazlık bir mRNA' ya transkribe olmaktadır. Genin ürünü olan protein, "Transmembrane Conductance Regulator Protein, CFTR" olarak adlandırılan 1480 amino asitten oluşan, cAMP bağımlı bir klor kanalı olarak görev yapmaktadır (38). CFTR proteini ATP

moleküllerinin bağlandığı iki tane NBF (Nucleotide Binding Fold, NBF1 ve NBF2), bölgesi, protein kinaz A veya C' nin bağlandığı bir regülör bölge ve iki tane transmembran bölgesi içermektedir (Şekil 3).



Şekil 3 : CFTR proteininin epitel hücre membranındaki yerleşimi ve fonksiyonel domainleri.

Proteinin regülör bölgesinde 660, 737, 795 ve 813. pozisyonundaki serin amino asitlerinin protein kinaz A veya C tarafından fosforlanması ve NBF bölgesine bağlanan ATP' lerin hidrolizi ile kanal açılmakta ve Cl⁻ iyonları mukozal bölgeye geçmektedir. CFTR proteini bir Cl⁻ pompası olarak görev yapmamaktadır. Kanalin açılması ile Cl⁻ elektrokimyasal gradient ile hareket ederek mukozal bölgeye geçmektedir. Hidroliz olan ATP molekülü ile kanaldan geçen Cl⁻ iyonu sayısı arasında sitokiometrik bir ilişki

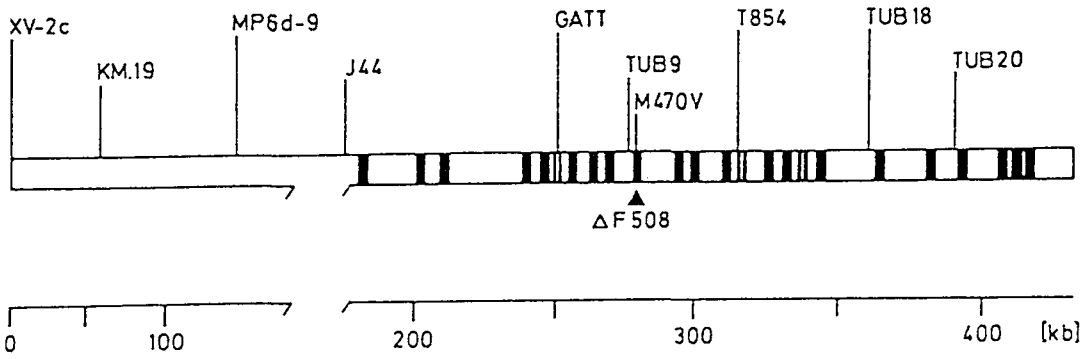
yoktur. Regülatör veya NBF bölgelerine yansıyan mutasyonlar proteinin non fonksiyonel olmasına neden olduğundan kanal açılmamakta ve hücre içinde Cl⁻ kristalleri oluşmaktadır (38).

Mutasyonların CFTR proteini üzerinde yansıdığı bölgeler hastalığın şiddeti açısından önemlidir. CF geninde görülen mutasyonlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (Tablo IV).

Tablo IV : Kistik fibrozis genindeki mutasyonların sınıflandırılması.

SINIF I - II	: PI (pankreas insufficient) < % 1 enzim sekresyonu
	mutasyon tipleri anlamsız, çerçeve kayması, splice-site
SINIF III	: PS (pankreas sufficient)
	mutasyon tipleri yanlış anlamlı

CF genindeki en sık görülen mutasyon ATP molekülünün bağlandığı 1. NBF bölgesine rastlayan ve fenilalanin amino asidini kodlayan 3 baz çiftlik bir delesyondur (del F508). Bu mutasyonun kuzey Avrupa' daki insidansı % 70-80 iken, güney Avrupa' da insidansı % 30' dur (20). delF508 mutasyonunun Türk CF hastalarındaki insidansı % 28 dir (39). Bugün CF geninde yaklaşık 300 kadar mutasyon tanımlanmıştır (40). Özgül mutasyonların henüz gösterilemediği popülasyonlarda taşıyıcı tesbiti gen içinde veya gen dışında yer alan polimorfik marker bölgeler kullanılarak saptanmaktadır. CF geni içinde bulunan GATT tekrarı, TUB9, T854, TUB18, TUB20 gibi polimorfik bölgeler ile, gen dışında yer alan XV2C, KM19, Mp6D-9 gibi polimorfik bölgeler (Şekil 4) kullanılarak normal ve mutant alleller birbirinden ayırt edilebilmektedir (41).



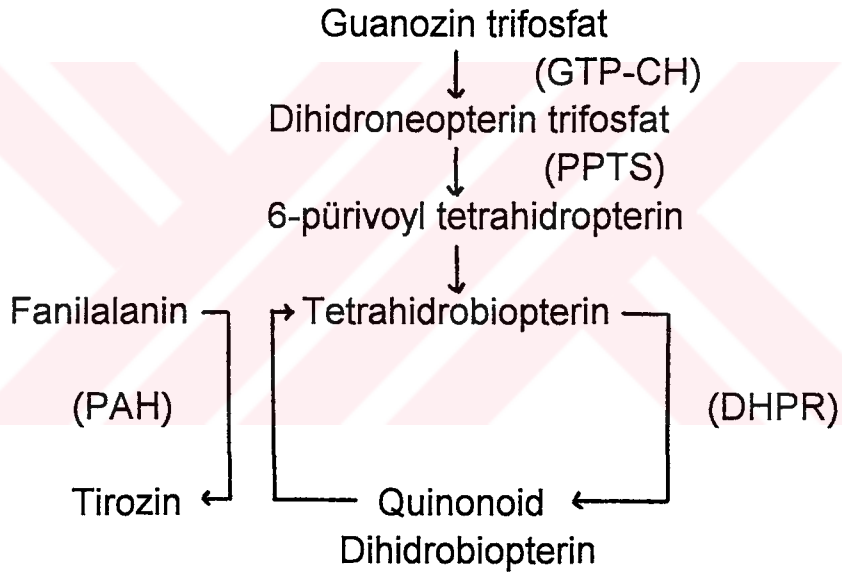
Şekil 4: CF lokusunun fiziksel haritasında, gen içi ve gen dışı polimorfik bölgelerin lokalizasyonları. Siyah bölgeler CFTR genindeki ekzonları göstermektedir.

Bu polimorfik bölgelerin kullanımında üç allelik kombinasyon söz konusudur. (1/1, 1/2, 2/2) 1/1; her iki allelde de o polimorfik bölgeyi tanıyan restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesinin olmaması, 1/2; polimorfik bölgede restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesinin bir allelde olması, diğer allelde olmaması, 2/2; her iki allelde de o polimorfik bölgeyi tanıyan restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesinin olması. Bu polimorfik markerlar kullanılarak, popülasyondaki normal ve mutant allellerin ayrımı yapılacak ise, öncelikle o polimorfik bölgenin normal ve mutant allellerdeki frekanslarının saptanması gerekmektedir. Çünkü, özgül mutasyonların henüz saptanamadığı popülasyonlarda doğum öncesi tanı polimorfik markerlar kullanılarak yapılıyor ise, o polimorfik bölgenin o popülasyon için ne kadar bilgi verici (informatif) olduğunun bilinmesi gerekmektedir.

Mutasyon veya polimorfik markerlar ile CF' in doğum öncesi tanısının yapılamadığı vakalarda, hamileliğin 12-14. haftasında alınan amniyon sıvısında, gama glutamil transpeptidaz (GGT), lösin aminopeptidaz (LAP) ve alkalin fosfataz enzim düzeylerine bakılarak fetusun hastalıktan etkilenip etkilenmediği saptanabilmektedir (42).

1.8. FENİLKETONÜRİ' NİN MOLEKÜLER GENETİĞİ

Kalıtsal hiperfenilalaninemilerin büyük bir çoğunluğu, fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin aktivitesindeki bir eksiklik sonucu görülen fenilketonüri (PKU) iken, vakaların % 1-3' ü ise, bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterin (BH₄) mekanizmasındaki, guanozin trifosfat siklohidrolaz (GTP-CH), 6-pürivoyl tetrahidropiterin sentetaz (PPTS) ve dihidropiteridin redüktaz (DHPR) enzimlerinin aktivitesindeki bozukluğa bağlı hiperfenilalaninemilerdir (43) (Şekil 5).



Şekil 5 : Hiperfenilalaninemilere neden olan enzim blokları. GTP-CH: Guanozin trifosfat siklohidrolaz, PPTS: 6-pürivoyl tetrahidropiterin sentetaz, DHPR: Dihidropteridin redüktaz, PAH: Fenilalanin hidroksilaz.

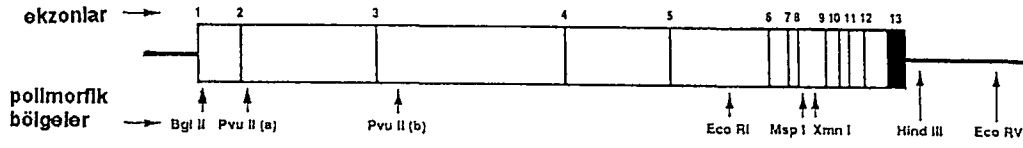
Fenilalanin hidroksilaz (PAH) eksikliğine bağlı olarak hiperfenilalaninemiler 3 gruba ayrılmaktadır. Fenilalanin hidroksilaz

aktivitesi % 1' in altında olan ve kan fenilalanin düzeyi >20 mg/dl olan hiperfenilalaninemiler PHD I (Phenylalanine Hydroxylase Deficiency PHD) veya klasik fenilketonüri, enzim aktivitesi % 1-3 arasında olanlar ve kan fenilalanin düzeyi 10-20 mg/dl olan hiperfenilalaninemiler, PHD II veya mild PKU, enzim aktivitesi % 3' ün üstünde olan ve kan fenilalanin düzeyi < 10 mg/dl olan hiperfenilalaninemiler, PHD III veya geçici hiperfenilalaninemi olarak adlandırılmaktadır (44).

Hastalık klinik ve biyokimyasal açıdan heterojen bir tablo göstermektedir. Fenilalanin hidroksilaz enziminin aktivitesindeki bozukluk sonucu tirozine dönüşemiyen fenilalanin amino asidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitler (fenil piruvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında toplanarak mental-motor geriliğe neden olmaktadır.

Hiperfenilalaninemiler hayatın erken döneminde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile beyin hasarı önlenabilmektedir. Hiperfenilalaninemilerin insidansı Avrupa'da 1/10.000 iken, ülkemizdeki insidansı 1/5524' dir (9,45).

Fenilalanin hidroksilaz geni 12. kromozomun q kolunun 24. bandında (12q24) yer almaktadır. Gen 90 kilobaz uzunluğunda olup, 13 ekzon içermektedir (Şekil 6) (46). Bu genden 2.5 kilobazlık bir mRNA transkribe olmaktadır. Fenilalanin hidroksilaz geni içinde kesim bölgesi bulunan 7 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanarak, gen, 9 farklı polimorfik bölge halinde incelenebilmektedir (47). Bu çalışmalar ile fenilketonüri için yaklaşık 40 haplotip elde edilmiştir. Çeşitli popülasyonlarda görülen haplotipler arasında farklılık bulunmaktadır (Tablo 5).



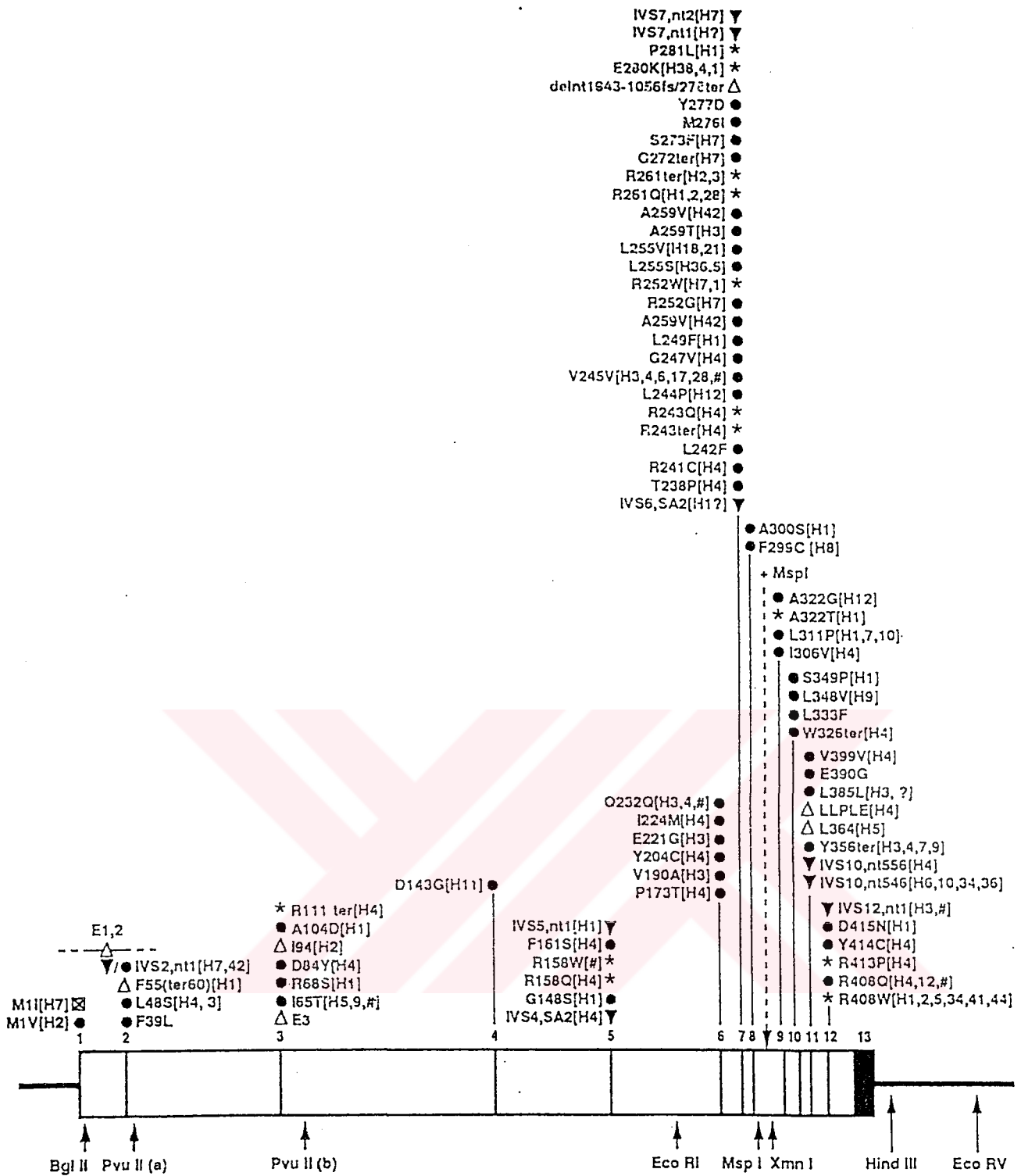
Şekil 6 : Fenilalanin hidroksilaz genindeki restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgeleri ve ekzonların lokalizasyonu.

Tablo 5 : Fenilalanin hidroksilaz geninde en sık görülen haplotiplerin bazı popülasyonlardaki insidansları.

ÜLKELER	(%)	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Kuzey Avrupa							
Danimarka		18	20	38	13	0	6
Norveç		21	11	17	9	6	0
Batı Avrupa							
İskoçya		30	9	18	6	3	0
İsviçre		50	11	5	18	0	5
Doğu Avrupa							
Çekoslovakya		0	68	0	23	0	0
Polonya		9	57	2	11	2	5
Güney Avrupa							
İtalya		40	6	3	9	4	20
Türkiye		25	1	1	17	4	40

Fenilalanin hidroksilaz geninde bugüne kadar yaklaşık 100 adet mutasyon tanımlanmıştır (Şeki 7). Bu mutasyonlar, yanlış anlamlı (missense), anlamsız (nonsense), "splicing" mutasyonları ve ufak delesyonlar şeklinde görülmektedir (48). Mutasyonların protein üzerinde yansıdıkları bölgeye bağlı olarak fenilalanin hidroksilaz enziminin aktivitesi değişmektedir. Enzimin aktivitesine bağlı olarak, hastaların serum fenilalanin düzeylerine göre uygulanan diyet tedavisi farklı olmaktadır. Bu nedenle popülasyondaki mutasyonların ve frekanslarının bulunması önemlidir. Popülasyonlar fenilalanin hidroksilaz geninde bulunan mutasyonlar açısından incelendiğinde, haplotiplerde olduğu gibi mutasyonların da popülasyondan popülasyona farklılık gösterdiği ve bazı mutasyonların belirli haplotipler ile birlikte görüldüğü saptanmıştır. Örneğin; Haplotip 1:R261Q, Haplotip 2:R408W, Haplotip 3:IVS12nt1, Haplotip 4: R158Q ve Haplotip 6:IVS10nt546 mutasyonları ile birlikte görülmektedir.

Fenilketonüride de kistik fibrozisde olduğu gibi majör mutasyonların henüz saptanamadığı toplumlarda, mutant ve normal allellerin ayrımı, gen içi; Msp I, Xmn I, Bgl II, Pvu II polimorfizmleri veya gen dışı; 3' PAH VNTR polimorfizm markerları kullanılarak yapılmaktadır (49-53). RFLP yönteminde alleller restriksiyon endonükleaz enziminin kesim yapması (+) veya yapmamasına (-) göre ayırt edildiği için, bu polimorfik bölgeler her aile için informatif olmayabilmektedir. Fakat VNTR bölgeleri değişken sayıda tekrar içerdiği için allellerin ve kişilerin saptanmasında daha informatif bir sistem oluştururlar. PAH geninin 3' ucunda bulunan VNTR bölgesi 3, 7, 8, 9 ve 12 kez tekrar bölgeleri içermektedir. Bu tekrar bölgeleri belirli haplotipler ve belirli mutasyonlar ile birlikte görülebilmektedir. Bu durum bize mutasyonların orijinleri hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 7: Fenilalanin hidroksilaz genindeki mutasyonlar, tipleri ve bulundukları ekzonlar. ● : baz değişimi, * : CpG bölgesi
 □ : Devova mutasyon, Δ : delesyon, ▼ : splice-bölgesi
 H : haplotip, + : yeni restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi, #: sınıflandırılmıyan haplotip.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. TAMPONLAR

2.1.1. DNA İzolasyon Tamponları.

Liziz Tampon	: NH_4Cl	115 mM
	KHCO_3	10 mM
	EDTA	0.1 mM
STE Tampon (pH 7.4)	: NaCl_2	100 mM
	EDTA	1 mM
	Tris HCL	50 mM
Proteinaz K	: 10 mg/ml, 10 mM Tris HCL (pH 7.5) ile çözülür.	
% 10 (w/v) SDS	: Sodyum dodesil sülfat	10 gr
	Distile su	100 ml
Fenol Tampon (v/v) (25:24:1)	: Doymuş fenol (pH 7.4)	25 ml
	Kloroform	24 ml
	İzoamil alkol	1 ml
Sodyum Asetat Tampon (3m)	: Sodyum asetat	204 gr
	Distile su	500 ml
	pH 5.2, asetik asit ile ayarlanır.	
TE Tampon	: Tris HCL (pH 7.4)	10 mM
	EDTA (pH 8.0)	1 mM

2.1.2. Jel Elektroforez Tamponları.

Tris Asetat Tampon (TAE 50X, pH 8.0)	: Tris baz EDTA Asetik asit	2 M 50 mM 57 ml
Tris Borat Tampon (TEB 20X, pH 8.3)	: Tris baz Borik asit EDTA	1.8 mM 1.8 mM 50 mM
Yükleme Tamponu	: Gliserol 1xTAE tampon Orange G	55 ml 45 ml 0.1 gr
Etidium Bromür	: 10 mgr/ml, distile su ile çözülür.	

2.1.3. DNA Amplifikasyon Tamponları.

Taq DNA Polimeraz Tampon (10X)	: Tris HCL (pH 9.0) MgCl ₂ KCl ₂ Triton X-100	100 mM 10 mM 500 mM % 1
dNTP Karışımı (pH 7.4)	: 20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP 20 mM dTTP.	
Amplifikasyon primerleri	: Amplifikasyon için kullanılan her primer bir reaksiyon için 660 ng (nano gram) olacak şekilde distile su ile çözülür.	

2.1.4. Dot Blot Tamponları.

Denatürasyon Tamponu	: NaOH EDTA Brom fenol mavisi	0.4 M 25 mM % 6
Yükleme Tamponu	: NaOH EDTA Brom fenol mavisi	0.4 M 25 mM % 0.6
20X SSPE Tampon (pH 7.7)	: NaCl NaH ₂ PO ₄ EDTA	3.6 M 0.2 M 20 mM

2.1.5. Hibridizasyon Tamponları.

50X Denhardt's	: Bovin serum albumin Ficoll type 400 Polivinilprolidon Distile su	1 gr 1 gr 1 gr 100 ml
Pre Hibridizasyon	: 5X SSPE, 5X Denhardt's, % 0.5 SDS.	
Hibridizasyon	: 5X SSPE, 5X Denhardt's % 0.5 SDS, Radyoaktif işaretli oligonükleotid prob.	
Post Hibridizasyon A	: 2X SSPE, % 0.1 SDS.	
Post Hibridizasyon B	: 5X SSPE, % 0.1 SDS.	

2.1.6. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) Tamponları.

Tris Borat Tampon (20XTEB, pH 8.3)	: Tris baz Borik asit EDTA	1.8 M 1.8 M 50 mM
---------------------------------------	----------------------------------	-------------------------

Akrilamid Jel tamponu (% 6)	: Akrilamid - bisakrilamid (19/1) % 40 Gliserol 20X TEB Tampon Amonyumpersülfat %25 Temed Distile su	13 ml 9 ml 4.5 ml 150 ul 50 ul 63 ml
--------------------------------	--	---

2.1.7. DNA Dizi Analizi Tamponları.

Akrilamid Jel Tamponu	: Akrilamid - bisakrilamid (19/1) % 40 Üre 20XTEB tampon Distile su	72 ml 240 gr 12 ml 430 ml
-----------------------	---	--

Amonyumpersülfat (% 25)	: 25 mgr Amonyumpersülfat distile su ile çözülür.	1 ml
----------------------------	--	------

Denatüre Akrilamid Jel (% 6)	: Akrilamid jel tampon Amonyumpersülfat %25 Temed	60 ml 80 ul 80 ul
---------------------------------	---	-------------------------

10X Enzim Tamponu	: KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ Tris HCL pH 8.8 MgSO ₄	100 mM 100 mM 200 mM 50 mM
-------------------	--	-------------------------------------

30X Triton X100	: 3 gr Triton X100, 100 ml distile su ile çözülür.	
-----------------	---	--

Yükleme Tamponuu	: % 95 deiyonize formamid, % 0.3 ksilen siyanol FF, % 0.3 brom fenol mavisi, % 0.37 EDTA pH 7.0.	
------------------	--	--

ddATP Karışımı	: 900 uM ddATP, 30 uM dATP, 100 uM dCTP, 100 uM dGTP, 100 uM dTTP, 1X enzim tamponu ile hazırlandı.	
----------------	---	--

- ddCTP Karışımı : 480 uM ddCTP, 30 uM dATP, 37 uM dCTP, 100 uM dGTP, 100 uM dTTP, 1X enzim tamponu ile hazırlandı.
- ddGTP Karışımı : 400 uM ddGTP, 30 uM dATP, 37 uM dGTP, 100 uM dCTP, 100 uM dTTP, 1X enzim tamponu ile hazırlandı.
- ddTTP Karışımı : 720 uM ddTTP, 30 uM dATP, 100 uM dCTP, 100 uM dGTP, 37 uM dTTP, 1X enzim tamponu ile hazırlandı.



2.2. METODLAR.

2.2.1. DNA İzolasyonu.

Fenilketonürlü ve kistik fibrozisli çocuklardan ve ebeveynlerinden EDTA' lı tüplere alınan kan, 50 ml' lik plastik tüplere aktarılıp üzerine 30 ml liziz tampon eklendi ve kırmızı kan hücrelerinin parçalanması için 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra örnekler 2000 g' de 10 dakika santrifüj (IEC International Santrifuge Model K) edilerek beyaz hücreler toplandı. Hücreler 2000 g' de bir kez daha 10 ml liziz tamponu ile yıkanıp, 15 ml STE tamponu ile tekrar süspanse edildi. Hücreler % 10 SDS, proteinaz K (10 mg/ml) ile 37 derecede bir gece inkübe edildi. İki kez fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1), bir kez de kloroform-izoamil alkol (24:1) ekstrasyonu sonucu, süpernatant üzerine 3 M sodyum asetat (1ml) ve 20 ml % 99' luk soğuk etanol eklenerek, DNA' nın çökmesi sağlandı (54).

Çöktürülen DNA bir pipet yardımı ile toplanıp, % 70' lik etanol ile yıkandı ve DNA örnekleri 0.5 ml TE tamponunda bir gece oda sıcaklığında (25 derece) bekletildi. DNA örnekleri analize kadar -20 derecede saklandı.

2.2.2. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması.

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

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA üzerinde incelemek istediğimiz hedef bölgenin yapay olarak hazırlanmış oligonükleotid primerler ile sınırlandırılarak çoğaltılmasıdır. Yöntem; çift iplikli hedef bölgenin iki ayrı iplikciğinin 5' ve 3' uçlarına komplementer olan primer adı verilen oligonükleotidlerin, denatüre edilerek ayrılmış

DNA zincirlerine bağlanması (annealing), hedef bölgeye karşılık gelen zincirin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi (extension) ve sentezlenen zincirlerin ısı ile denatüre edilerek birbirinden ayrılması (denatürasyon) şeklinde 3 temel aşamayı içermektedir. Bu üçlü aşama bir döngü olarak kabul edilir ve ortalama 25-30 döngü uygulanır (16).

Çalışmamızda kullanılan DNA' lar tablo 6' da verilen şemaya göre amplifiye edildiler (DNA Thermal Cycler 480 Cetus). Amplifikasyon için hazırlanan tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 2-3 saniye santrifüj edildi ve örneklerin üzerine 100 ul mineral oil ilave edilerek buharlaşma engellendi.

Tablo 6 : Amplifikasyon için gerekli maddeler ve konsantrasyonları.

	stok	final
Taq tampon	10X	1X
Primer 1		50pMol/L
Primer 2		50pMol/L
dATP	20 mM	0.2 mM
dCTP	20 mM	0.2 mM
dGTP	20 mM	0.2 mM
dTTP	20 mM	0.2 mM
Taq DNA polimeraz	5 ü/ul	2.5 ünite
DNA		0.5 ug
Distile su		
Toplam		100 ul

Mutasyon taraması için kullanılan primerler ve "annealing" dereceleri farklı olduğu için, bu çalışmada kullanılan tüm primerlerin sekansları ve "annealing" dereceleri ek 1' de verilmiştir.

2.2.4. Amplifiye Olan DNA Örneklerinin Analizi.

Amplifiye edilen hedef bölge içersindeki mutasyonlar, eğer bir restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesi ile ilişkili ise mutasyon, PCR-RFLP ile analiz edilir. Eğer herhangi bir restriksiyon

endonükleaz enziminin kesim bölgesi ile ilişkili değil ise, ASO metodu ile analiz edilir. Mutasyon amplifikasyon ürünüde bir delesyon ise, amplifikasyon ürününün poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) yürütülmesi ile analiz edilebilmektedir.

2.2.4.1. PCR-RFLP Analizi.

İncelenen mutasyon, bir restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesini yok ediyor veya bir restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesini oluşturuyor ise, mutasyon bu restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak analiz edilmektedir. Bu işlem için, 10 ul amplifiye DNA örneği 20 ünite restriksiyon endonükleaz enzim ve 2 ul enzim tamponu ile 37 derecede 16-18 saat inkübe edildikten sonra, amplifiye edilen DNA örneklerinin mutasyonu taşıyıp taşımadıkları, restriksiyon endonükleaz enzim ile inkübe edilen amplifikasyon ürünlerinin % 2-3' lük agaroz jel elektroforezinde yürütülmeleri ile test edilir.

2.2.4.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Analizi.

İncelenecek mutasyon bir veya birkaç nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu oluşuyor ise, amplifiye edilen hedef DNA bölgesinin 10 ul' si, % 6 veya % 12 poliakrilamid jel elektroforezinde 250 volt' ta, 3-4 saat yürütülerek mutasyon tesbit edilir.

2.2.4.3. Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) Analizi.

Bu metod, DNA üzerindeki nokta mutasyonlarını saptayabilmemiz için, PCR ile amplifiye edilen DNA' ların Dot Blot cihazı ile naylon membranlar üzerine emdirilip oligonükleotid problemler ile analiz edilmesidir.

Amplifiye olan DNA' nın 1/10' i, 100 ul denatürasyon tamponu ile 95 derecede 3 dakika inkübe edilerek denatüre edildi. Bu örnekler dot blot cihazı (LKB Dot-Blot Apparatus) kullanılarak vakum altında naylon membranlara (Hybond N+ Membran Amersham) yüklendi.

Cihaza ait kuyucuklar iki kere 200 ul 20XSSPE ile yıkanarak örneklerin membrana fikse olmaları sağlandı. Cihazdan çıkarılan membran 2XSSPE ile 1 dakika yıkanıp kurutuldu ve moleküler hibritleme çalışmasına alındı.

2.2.4.3.1. Normal ve Mutant Oligonükleotid Probların İşaretlenmesi.

Normal ve mutant oligonükleotid proplar tablo 7' de verilen şemaya göre hazırlanıp 37 derecede 30 dakika inkübe edilerek, radyoaktif olarak işaretlendi.

Tablo 7 : Oligonükleotid propların radyoaktif olarak işaretlenmesi.

	normal	mutant
Oligonükleotid prob	20 ng	20 ng
T ₄ Kinaz tampon (10X)	1.5 ul	1.5 ul
Spermidin (20 mM)	1 ul	1 ul
Gama ³² P ATP (10 uCi/ul)	3 ul	3 ul
T ₄ Kinaz enzim (10 ü/ul)	1 ul	1 ul
Distile su		
Toplam	15 ul	15 ul

2.2.4.3.2. Hibridizasyon.

Amplifiye olan DNA' ların emdirildiği membranlar hibridizasyon torbasına yerleştirildi ve 24 örnek için 2 ml hibridizasyon tamponu ilave edildikten sonra, kapatılıp her mutasyon için öngörülen hibridizasyon derecesinde 30 dakika prehibridizasyona alındı. İnkübasyondan sonra torbalar açılıp bir torbaya radyoaktif işaretli normal dizi prob, diğerine radyoaktif işaretli mutant dizi prob eklenip aynı derecede hibridizasyona alındı.

Hibridizasyondan sonra membranlar önce, post hibridizasyon tampon(A) ile oda sıcaklığında iki kere 2 dakika, sonra post hibridizasyon tampon(B) ile hibridizasyon derecesinde 10 dakika yıkandı ve filtre üzerinde kurutulup otoradyografiye alındı.

2.2.5. Yeni Mutasyonların Analizi için DNA Örneklerinin Hazırlanması.

2.2.5.1. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)Analizi

Mutasyon analizine alınacak ekzonun amplifikasyonu için tablo 6'da verilen şemaya ek olarak amplifikasyon tüpüne 1 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP eklenerek amplifiye örneklerin radyoaktif olarak işaretlenmesi sağlandı. Radyoaktif olarak işaretlenen amplifiye DNA örnekleri % 1' lik agaroz jel elektroforezinde test edildi. Örneklerin 1 μl ' si, 10 μl yükleme tamponu ile karıştırılıp 80 derecede 3 dakika denatüre edildikten sonra % 6 poliakrilamid jel elektroforezinde 10 watt'ta 16-18 saat yürütüldü. Daha sonra jel, filtre üzerine alınıp jel kurutucusunda 80 derecede vakum altında kurutuldu ve otoradyografiye alındı.

2.2.5.2. Dizi Analizi için DNA Örneklerinin Asimetrik PCR ile Çoğaltılması.

Dizi analizi çıkartılacak olan DNA fragmentinin öncelikle tek zincir haline getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem asimetrik PCR ile gerçekleşir. Asimetrik PCR' da, primerlerden bir tanesi 50 pMol/L konsantrasyonda kullanılırken, diğeri 1pMol/L konsantrasyonda kullanılarak DNA zincirlerinden bir tanesinin amplifiye olması sağlandı.

2.2.5.3. DNA Dizi Analizi.

Her bir tüpte bir tip dideoksiribonükleotid olacak şekilde dört ayrı tüpe 3 μl dideoksiribonükleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) konuldu. Tablo 8' de verilen DNA dizi reaksiyon solüsyonu, eşit bir

şekilde dideoksiribonükleotidlerin bulunduğu tüplere dağıtıldı. Örneklerin üzeri 1-2 damla mineral oil ile kapatıldıktan sonra DNA Thermal Cycler' da DNA dizi reaksiyonunun işlemesi için 20 döngü amplifiye edildi.

Tablo 8 : DNA dizi analiz reaksiyonu.

Kalıp DNA	0.01 pMol
Primer	1.2 pMol
Enzim Tampon (10X)	1.5 ul
Triton X100 (30X)	1 ul
Distile su	
Alfa ³⁵ S dATP (10 uCi/ul)	2 ul
Enzim (1ü/ul)	2 ul
Toplam	12 ul

Amplifikasyondan sonra örnekler 4 ul stop solüsyonu eklenerek -20 derecede 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 80 derecede 3 dakika denatüre edildikten sonra, seri bir şekilde % 6' lık denatüre poliakrilamid jel elektroforezine (BRL S2) yüklenip, 1250 volt' ta 3-4 saat yürütüldü (PS 2500 DC Power Supply Hoefer). Elektroforezden sonra jel, % 10 asetik asit, % 10 metanol solüsyonu ile 10 dakika jeldeki ürenin temizlenmesi için yıkandı ve filtre üzerine alınıp, jel kurutucusunda (Dry Gel SE 1160 Hoefer) 80 derecede vakum altında kurutulup otoradyografiye alındı.

Kistik fibrosis ve fenilketonüri genlerinde incelenen mutasyonlar ve bu mutasyonların analiz metodları tablo 9 ve tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 9 : CFTR geninde incelenen mutasyonlar, bulundukları ekzonlar ve analiz metodları.

MUTASYON	EKZON	ANALİZ METODU
R334W	7	RFLP/MspI
R249Q	7	RFLP/DdeI
R347H	7	Dizi Analizi
Δ F508	10	% 12 PAGE
G542X	11	ASO
G551D	11	RFLP/Hinc II
S549N	11	RFLP/Dde I
S549 I	11	RFLP/Dde I
R553X	11	RFLP/Hinc II
L558S	11	RFLP/Xmn I
N1303K	21	ASO

Tablo 10 : Fenilalanin hidroksilaz geninde incelenen mutasyonlar, bulundukları ekzon veya intronlar ve analiz metodları.

MUTASYON	EKZON/INTRON	ANALİZ METODU
L48S	2	RFLP/Eae I
R158Q	5	RFLP/Msp I
R252W	7	ASO
R261Q	7	ASO
R261X	7	RFLP/Dde I
A259V	7	RFLP/Hae III
Y277D	7	RFLP/Acc I
G272ter	7	RFLP/Bam HI
E280K	7	ASO
IVS10nt546	10	RFLP/Dde I
ΔL346	11	RFLP/Hind III
R408W	12	ASO
IVS12nt1	12	ASO

3. SONUÇLAR.

Bu çalışmada kullanılan DNA' lar CF ve PKU' lu çocuklardan ve ebeveynlerinden izole edilmiştir. Bu bölümde, her iki hastalığın genlerinde incelenen mutasyonlar ve frekansları tablolar halinde özetlenip bazı örnek fotoğraflar verilmiştir.

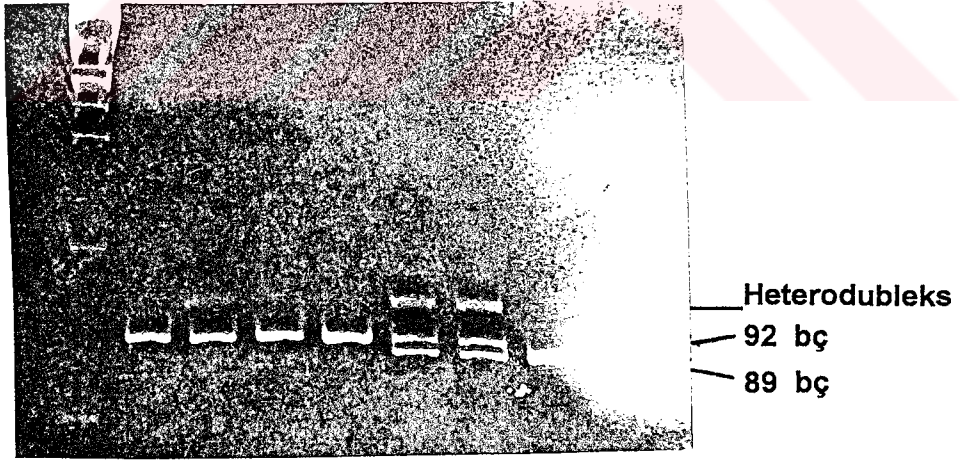
64 kistik fibrozis tanısı almış çocuğun CFTR geninin 7, 11 ve 21. ekzonlarında yeralan R334W, R297Q, R347H, delF508, G542X, G551D, S549N, S549I, R553X, L558S, N1303K mutasyonları incelendi. Tablo 11' de CFTR geninde incelenen mutasyonlar ve insidansları görülmektedir.

Tablo 11: CFTR geninde incelenen mutasyonların insidansları.

MUTASYON	FREKANS	İNSİDANS (%)
R334W	-/134	0.00
R297Q	-/134	0.00
R347H	4/134	2.90
ΔF508	38/134	28.30
G542X	-/134	0.00
G551D	-/134	0.00
S549N	-/134	0.00
S549 I	-/134	0.00
R553X	-/134	0.00
L558S	-/134	0.00
N1303K	5/134	3.70

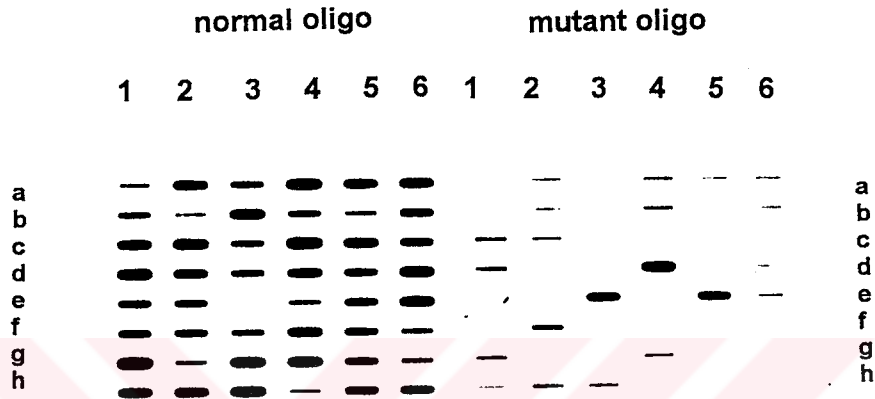
n: 134 allel.

İncelenen mutasyonlar arasından delF508 mutasyonunun oranı diğerlerine göre daha yüksek bulundu (% 28.30). Şekil 8' de delF508 mutasyonunun % 12 poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi görülmektedir.

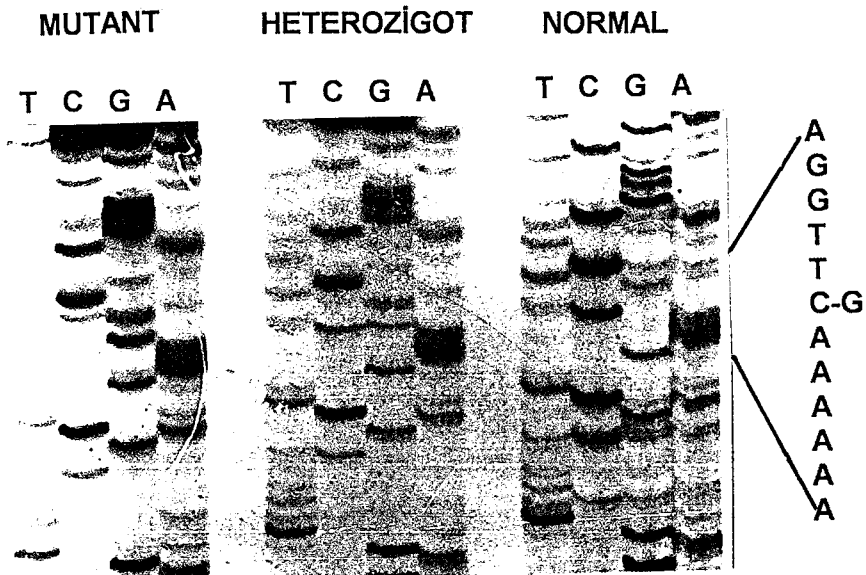


Şekil 8: delF508 mutasyonunun % 12 poliakrilamid jel elektroforezi.
1. ØX174 Hae III marker DNA, 2-5: Homozigot (-/-); 6,7,9: Heterozigot (delF508/-); 8: Homozigot (delF508/delF508)

İncelenen mutasyonlar arasında CF vakalarında % 3.70 oranında görülen N1303K mutasyonu, ASO (Allele Specific Oligonucleotide) tekniği ile gösterildi. Şekil 9' da bu mutasyonun ASO tekniği ile analizi, şekil 10' da ise, CFTR geninin 21. ekzonunun dizi analizi sonucunda, N1303K mutasyonu için homozigot ve heterozigot olan bireylerin analizi görülmektedir.

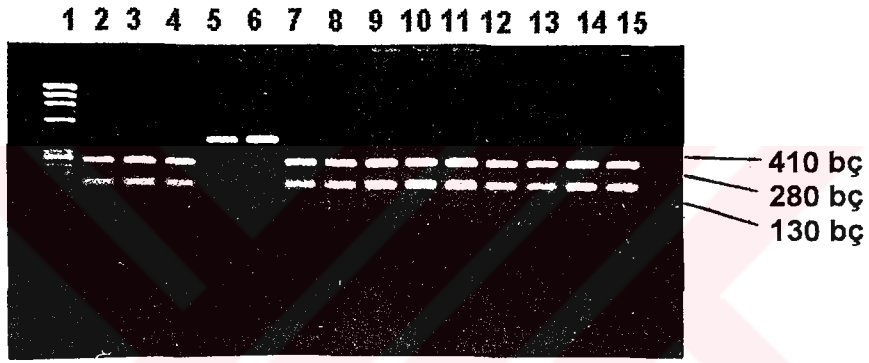


Şekil 9: N1303K mutasyonunun ASO ile analizi. 3.E: Homozigot (N1303K/N1303K) birey, 4.D ve 5.E: Heterozigot (N1303K/-) birey, diğer bireyler N1303K mutasyonu için homozigot (-/-).

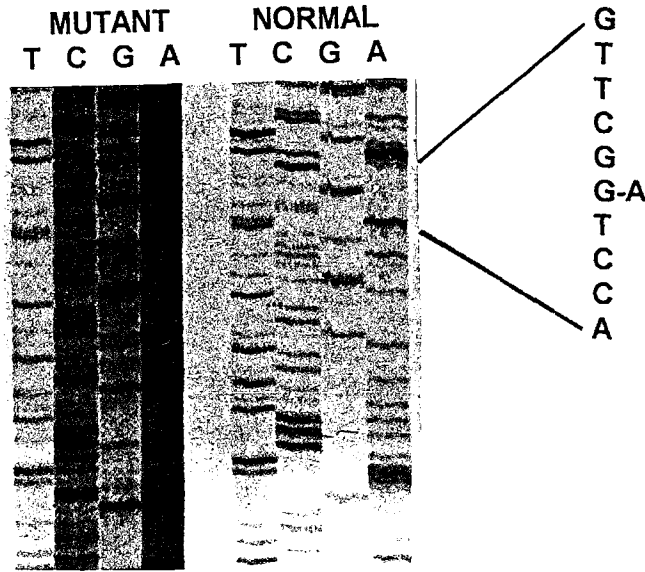


Şekil 10: N1303K mutasyonunun dizi analizi ile gösterilmesi.

CFTR geninin 7. ekzonunda bulunan 347. kodon (CTG) mutasyonu, PCR/RFLP/Hha I restriksiyon endonükleaz enzimi ile analiz edildi (Şekil 11). Fakat bu kodon mutasyonunda guanin (G) bazının, sitozin (C), timin (T) veya adenin (A) bazları ile değişebileceği rapor edilmiştir (40). (R347H arg---his G---A, R347P arg---pro G---C, R347L arg---leu G---T). Bu mutasyon için homozigot olan iki vakanın CFTR geninin 7. ekzonunun dizi analizi ile incelenmesi sonucunda bu kodon mutasyonunun R347H olduğu gösterildi. Şekil 12' de CFTR geninin 7. ekzonunun dizi analizi görülmektedir.



Şekil 11: CFTR geninin 347. kodon mutasyonunun PCR/RFLP/Hha I restriksiyon endonükleaz enzimi ile analizi. 1: ϕ X174 Hae III marker DNA; 2-4,7-15: Homozigot (-/-); 5 ve 6: Homozigot (+/+) bireyler.



Şekil 12 : R347H mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

CFTR geninde mutasyon taramasının yanısıra XV2C/KM19 polimorfik markerları ile yapılan haplotip çalışmalarında (XV2C/KM19: 1/1; A, 1/2; B, 2/1; C, 2/2; D) CF allellerinin % 42.2 oranında haplotip B, % 32.7 oranında haplotip C ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Haplotip analizine alınan 28 vakadan 5 tanesi delF508 mutasyonu için homozigot olarak bulundu. delF508 mutasyonu için homozigot olan 5 vakadan 3' ü haplotip B, 2' si haplotip B/D ile ilişkili bulunmuştur.

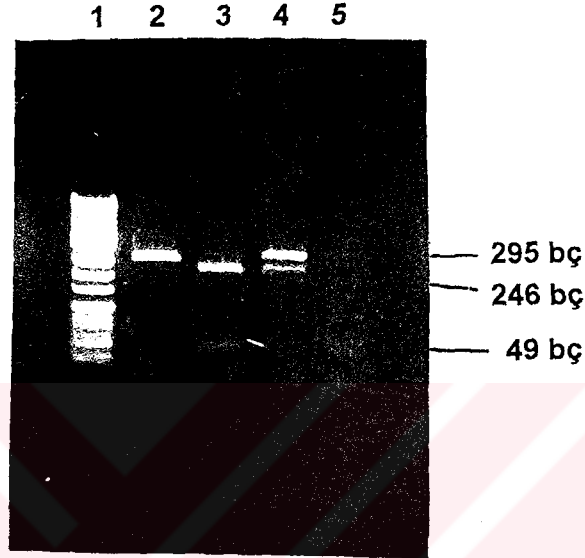
Haplotip çalışmalarına ek olarak CFTR geni içinde yer alan GATT tekrar polimorfizim bölgesi ile genin dışında yer alan Mp6D-9 polimorfizim bölgelerinin, CF allelleri ile olan ilişkisi incelenmiştir. GATT tekrar dizisi CF geni içersinde 6 kez tekrar veya 7 kez tekrar şeklinde görülmektedir. Mp6D-9 polimorfik bölgesinde ise, Msp I restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesinin bulunup bulunmamasına göre normal ve mutant alleller birbirinden ayrılabilir. GATT ve Mp6D-9 polimorfik bölgeleri birlikte çalışıldığında, mutant allellerin GATT₆ tekrar dizisi ve Mp6D-9 : 2 allelleri ile sıkı ilişki gösterdiği bulunmuştur.

Fenilketonüride ise, fenilalanin hidroksilaz (PAH) geninin 2, 5, 7, 11, 12. ekzonları ile 10 ve 12. intronlarında yer alan L48S, R158W, R252W, R261Q, R261X, A259V, Y277D, G272ter, E280K, IVS10nt546, delL346, R408W, IVS12nt1 mutasyonları incelenmiştir. Tablo 12' de PAH geninde incelenen mutasyonlar ve insidansları görülmektedir.

Tablo 12: Fenilalanin hidroksilaz geninde incelenen mutasyonların insidansları.

MUTASYON	FREKANS	İNSİDANS (%)
L48S	-/88	0.00
R158W	2/88	2.30
R252W	1/88	1.70
R261Q	6/88	6.80
R261X	-/30	0.00
A259V	-/88	0.00
Y277D	-/88	0.00
G272ter	-/88	0.00
E280K	-/88	0.00
IVS10nt546	63/250	25.20
L346	-/88	0.00
R408W	-/88	0.00
IVS12nt1	-/88	0.00

PAH geninde incelenen mutasyonlar arasında IVS10nt546 mutasyonu diğer mutasyonlara göre yüksek insidanda bulunmuştur. Bu mutasyon, 10. ekzon ile 10 intronun birleşme bölgesine 9 nükleotidlik bir baz grubunun eklenmesi sonucu ortaya çıkan Dde I restriksiyon endonükleaz enzimi ile analiz edilmektedir. Şekil 13' de IVS10nt546 mutasyonunun Dde I restriksiyon endonükleaz enzimi ile analizi görülmektedir.



Şekil 13: IVS10nt546 mutasyonunun PCR/RFLP/Dde I ile analizi. 1. ϕ X174 Hae III marker DNA, 2 ve 5. homozigot (-/-), 3. homozigot (IVS10/IVS10), 4. heterozigot (IVS10/-) bireyler.

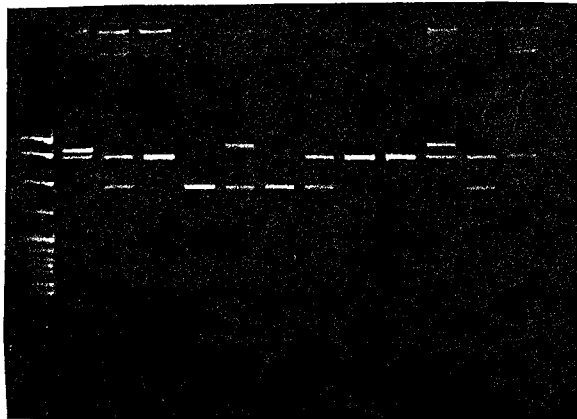
Mutasyon çalışmalarının yanısıra PKU allellerinin analizi gen içi Msp I, Xmn I, Bgl II ve Pvu II polimorfik marker bölgeleri veya 3' PAH VNTR polimorfik marker bölgesi kullanılarak gösterilmektedir. Doğum öncesi tanı çalışmaları için polimorfik marker bölgeleri kullanılarak PKU allelleri, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim yapması (+) veya yapmamasına (-) göre gösterilmektedir. Fakat PAH geninin 3' ucunda bulunan VNTR polimorfizm bölgesi değişken sayıda tekrar içerdiği için allellerin ve kişilerin saptanmasında daha informatif bir sistemdir. Bu tekrar dizilerinin belirli haplotipler ve mutasyonlar ile birlikte görülmesi, doğum öncesi

tanı çalışmalarında gen içi polimorfik markerlar ile birlikte kullanıldığında fetus hakkında daha fazla bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Tablo 13' de IVS10nt546 mutasyonunu taşıyan bir çocuğa sahip 12 PKU ailesinin normal ve mutant kromozomlarındaki VNTR allelleri, şekil 14' de ise, 3' PAH VNTR polimorfizminin agaroz jel elektroforezi görülmektedir.

Tablo 13: IVS10nt546 mutasyonu için homozigot bir çocuğa sahip 12 PKU ailesinin normal ve mutant kromozomlarındaki VNTR allelleri.

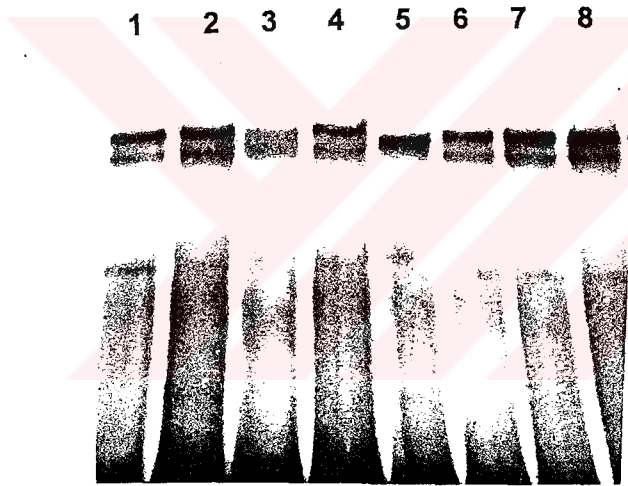
VNTR Allel	3	7	8	9
Normal (n:24)	7	5	8	4
Mutant (n:24)	-	24	-	-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Şekil 14: 3' PAH VNTR polimorfizminin agaroz jel elektroforezi. 1.pBR 322 Msp I marker DNA, 2:7/8; 3, 8, 12:7/3; 4,9, 10,13:7/7; 5, 7:3/3; 6: 9/3; 11:9/7.

Her iki gende de incelenen mutasyonlar sonucunda, CF allellerinin % 34.6' sının mutasyonları, PKU allellerinin % 30' unun mutasyonları tanımlanmıştır. Mutasyon taraması sonucunda allellerindeki mutasyonu gösterilemeyen 10 CF vakasının 4, 7, 11 ve 21. ekzonları dizi analizi ile incelenmiş fakat mutasyona rastlanmamıştır. Fenilketonüri' de ise, 10 PKU vakası öncelikle mutasyona yatkın bir bölge olan ekzon 7, daha sonra 1, 2, 3, 11 ve 12. ekzonlar SSCP analizi ile incelenmiştir. Şekil 15' de PAH geninin 11. ekzonunun SSCP analizi görülmektedir.



Şekil 15: PAH genin 11. ekzonunun SSCP analizi.
5. birey 11. exzonda bir mutasyon taşımakta.

4. TARTIŞMA.

Kalıtsal hastalıklar genlerde meydana gelen mutasyonlardan dolayı ortaya çıkmaktadır. yapısal ve enzimatik görevi olan proteinlere yansıyan gen seviyesindeki bu mutasyonların tesbiti için, proteinlerin izolasyonu ve analizi doku farklılaşması nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır. Bunun yanı sıra farklılaşmaya rağmen her dokuda sabit olan DNA molekülü, moleküler biyolojik teknikler kullanılarak, analiz edilebilmektedir.

Çalışmamızda, fenilketonüri ve kistik fibrozis tanısı almış bireyler ve onların ebeveynlerinden alınan lökosit DNA örneklerinde, her iki hastalığın genlerinde sık görülen mutasyonlar incelenmiştir. Bu çalışmaların sonunda, CF vakalarında mutant allellerin % 34.6' sında, PKU vakalarında mutant allellerin % 30' unda mutasyon tesbit edilmiştir. Her iki hastalıkta da mutant allellerin yaklaşık % 65-70'inde araştırılan mutasyonlara rastlanmamıştır.

Taşıyıcı tesbiti ve doğum öncesi tanının, hızlı bir şekilde yapılabilmesi için, içinde bulunduğumuz toplumun genetik yapısının bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle, popülasyonlara özgül mutasyonların hızla tesbit edilmesi gerekmektedir. Örneğin, İngiltere' de delF508, N1303K, G551D mutasyonları ile CF allellerinin % 92.25' i (55), Almanya' da delF508, G542X, R553X, N1303K ve 1717G-A mutasyonları ile CF allellerinin % 80' i tanımlanabilirken (56), Türk CF vakalarında ise, CFTR geninde mutasyonların sık görüldüğü bölgelerde bulunan R334W, R297Q, R347H, delF508, G542X, G551D, S549N, S549I, R553X, L558S, N1303K mutasyonlarının taranması sonucu, delF508 (%28.30), R347H(%2.90), N1303K (%3.70) mutasyonları ile CF allellerinin ancak % 34.6' sı tanımlanabilmektedir. Bu nedenle, özgül mutasyonların henüz saptanamadığı toplumlarda, haplotip analizleri ile risk hesaplamaları yapılabilmektedir.

CFTR geninin 5' ucunda bulunan XV2C ve KM19 polimorfik bölgeleri ile yapılan haplotip çalışmalarında, delF508 mutasyonunun haplotip B ile sıkı ilişkili olduğu gösterilmiştir (56). Örneğin, Finlandiya'da delF508 mutasyonunun haplotip B ile görülme oranı % 100,

Bulgaristan'da delF508 mutasyonunun haplotip B ile görülme oranları % 88.9, haplotip D ile görülme oranları % 11.1' dir (57). Türk CF vakalarında ise, delF508 mutasyonunun haplotip B ile görülme oranı % 80 olarak bulunmuştur.

Haplotip çalışmalarına ek olarak CFTR geninin içinde yer alan GATT tekrar polimorfizm bölgesi ile, genin dışında yer alan Mp6D-9 polimorfizm bölgelerinin CF mutant allelleri ile olan ilişkileri incelendiğinde, mutant allellerin, GATT₆ tekrar ve Mp6D-9:2 allelleri ile sıkı ilişki gösterdiği bulunmuştur ($p<0.001$). Bu iki polimorfik bölgenin kombinasyonundan bir haplotip tablosu çıkartılmıştır. Buna göre, haplotip b (Mp6D-9:1 ve GATT₇) normal allellerde % 63, haplotip c (Mp6D-9:2 ve GATT₆) mutant allellerde % 67 oranında görülmektedir (58).

CFTR geninde görülen mutasyonlar sınıflandırıldığında R347H mutasyonu sınıf III grubuna girmektedir. Bu grup mutasyonları taşıyan CF vakalarında pankreatik enzimler işlev görece kadar sentezlenmekte ve vakalarda hafif seyreden akciğer enfeksiyonları görülmektedir. Yani hastalık hafif seyreden semptomlar ile gitmektedir. Bu mutasyon için homozigot olan iki vakamızdan birtanesinde hastalık hafif seyreden klinik bulgular göstererek fenotip-genotip ilişkisine iyi bir örnek teşkil ederken, diğer vaka aynı mutasyonu taşımasına rağmen, klinik olarak ağır seyreden bir tablo göstermektedir.

Fenilketonüride ise, Polonya' da R408W (%65.4) ve IVS10nt546 (%3.8) mutasyonları ile PKU allellerinin % 69.20' sindeki mutasyonlar tesbit edilmesine karşın (59), Türk hastalarında IVS10nt546 (%25.20), R158Q (%2.30), R525W (%1.70), R261Q (%6.80) mutasyonları ile PKU allellerinin ancak % 30.0' daki mutasyolar tanımlanabilmiştir.

Fenilketonüri' de yapılan haplotip analiz çalışmalarında, farklı haplotiplerin coğrafik dağılımı incelendiğinde Doğu-Batı, kuzey-Güney kuşağında belirgin bir farklılık görülmektedir. Örneğin, mutant PKU allellerinin haplotip 2 ile görülme yüzdesi, Çekoslovakya' da % 70, Almanya' da % 26, Fransa' da % 18, İskoçya' da % 9 ile Doğudan Batıya; haplotip 3' ün mutant PKU allelleri ile olan ilişkisine bakıldığında, Danimarka' da % 34, Almanya' da % 11, İtalya' da % 3, Türkiye' de % 1.5 ile Kuzeyden Güneye doğru bir farklılık göstermektedir (59). Yaptığımız bir ön çalışmada, Türk PKU allelleri

% 40 oranında haplotip 6 ile ilişkili iken, haplotip 1-4' ün toplam oranı % 55' tir (60). Avrupa' da ise ençok görülen haplotipler 1-4' tür.

Mutasyonların fenotipe olan etkileri incelenecek olursa, PKU' da fenotipik kriterler kandaki fenilalanin seviyesine göre tesbit edilmektedir ve fenilalanin toleransı, yükleme testi ile gösterilmektedir. PAH geninde Y414C kodon mutasyonunu taşıyan bireylerde % 50, R261Q kodon mutasyonunu taşıyan bireylerde % 30, R158Q kodon mutasyonunu taşıyan bireylerde % 10 PAH enzim aktivitesi görülürken, diğer mutasyonları taşıyan bireylerde % 3 veya daha az PAH enzim aktivitesi görülmektedir. Bu üç mutasyon mild PKU' ye sebep olurken çalıştığımız PKU hastaları arasında, R158Q ve R261Q mutasyonları için homozigot olan 2 hasta ciddi mental-motor bozukluk göstermektedir. R261Q ve IVS10nt546 mutasyonları için genetik "compound" olan bir hastamız ile, IVS10nt546 mutasyonu için homozigot veya başkabir mutasyon ile genetik "compound" olduğu düşünülen hastalar klinik yönden heterojen bir dağılım göstermektedir. Fenotip-genotip ilişkisi arasındaki bu değişikliğin sebebi, hastalarımızın diyet tedavisine başlama yaşları ve tedavinin düzensizliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Mutasyon çalışmaları sonucunda her iki hastalığın genlerinde de mutasyonların ancak % 30' unun bulunmasından dolayı her iki kalıtsal hastalık için Türk popülasyonuna özgül mutasyon veya mutasyonları araştırmak amacı ile başlattığımız bu çalışmada, mutasyonun lokalizasyonunu bulmak amacıyla SSCP tekniğini tercih etmemizin sebebi, mutasyonu taşıyan ve taşımayan DNA fragmentlerinin elektroforetik migrasyondaki farklılıklarının, radyoaktif sinyal ile daha güvenilir bir şekilde ayırt edilmesinden dolayıdır. Bu teknik ile, PKU ve CF genlerindeki ekzonlar taranarak mutasyon olduğu düşünülen ekzonlar DNA dizi analizine alınmaktadır. İncelenecek olan DNA fragmentleri genel bilgilerde bahsedildiği gibi, indirekt veya direkt DNA dizi analizleriyle çalışılabilmektedir. İndirekt dizi analizinde, incelenecek olan DNA fragmentlerinin M13mp vektörlerine klonlanması ve bu klonlar arasından gerçek klonların seçimi uzun zaman alan çalışmalar olduğundan, dizi analiz çalışmalarımızı, gendeki ekzonların asimetrik PCR ile çoğaltıldıktan sonra direkt dizi analizi ile incelenmesi

yönünde sürdürmekteyiz. Bu yöntemde gen ekzon, ekzon dizi analizine alınabilmektedir. Az sayıda ekzon içeren genlerin analizleri için pratik bir yöntem olmasına karşın, fazla sayıda ekzon içeren genlerin analizinde uzun süren çalışmalar gerekmektedir. Bu nedenle dizi analizini tamamladığımız vakaların dışındaki vakalarda çalışmalarımız, lökosit hücrelerinde bulunan "illegitimate" mRNA'ların izolasyonu (61) ve bu mRNA' ların reverstranskriptaz enzimi ile cDNA' larının sentezlenmesi ve bu cDNA' lar arasından PAH ve CFTR genlerinin amplifiye edildikten sonra genin 1 veya 2 parça halinde dizi analizinin çıkartılması yönünde devam edecektir.



EK 1.

ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ

A. CFTR geninde incelenen mutasyonların analizinde kullanılan primerler ve " annealing " dereceleri.

7. EKZON (55 derece) *

7i 5': AGA CCA TGC TCA GAT CTT CCA T
7i 3': GCA AAG TTC ATT AGA ACT GAT C

10. EKZON (54 derece, delF508 mutasyon primeri) **

DFA 5' GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG 3'
DFB 5' ATG CTT TGA TGA CGC TTC TGT 3'

11. EKZON (52 derece)

11i 5' CAA CTG TGG TTA AAG CAA TAG TGT
11i 3' GCA CAG ATT CTG AGT AAC CAT AAT

G542X mutasyonu için ASO primerleri

Normal: 5' ACC TTC TCC AAG AAC T 3'
Mutant: 5' ACC TTC TCA AAG AAC T 3'
Hibridizasyon: 45 derece.

21. EKZON (61 derece) *

21i 5' AAT GTT CAC AAG GGA CTC CA
21i 3' CAA AAG TAC CTG TTG CTC CA

N1303K mutasyonu için ASO primerleri.

Normal: 5' TAG AAA AAA CTT GGA TCC 3'
Mutant : 5' TAG AAA AAA GTT GGA TCC 3'
Hibridizasyon: 45 derece.

B. PAH geninde incelenen mutasyonların analizinde kullanılan primerler ve " annealing " dereceleri.

2. EKZON (47 derece)

5' AAA CAA GCT ATA TTG AAG AC 3'
5' TCA AAT AAG CGC AAT ACT TT 3'

5. EKZON (57 derece) ***

5' CCA TCC TAC ACT GGA TGA GG 3'
5' TCC TGT GTA CCG TGC AAG CC 3'

7. EKZON (51 derece) ***

5' AGA TGA CGC TCA GTG TGC CT 3'
5' ATC CCA GCT TGC ACT GGT TTC CGC C 3'

R252W mutasyonu için ASO primerleri ***

Normal: 5' GCT TTC CTC TGG GGA TTT CTT 3'
Mutant : 5' GCT TTC CTC TTG GGA TTT CTT 3'
Hibridizasyon: 57 derece

R261Q mutasyonu için ASO primerleri ***

Normal: 5' GTG GAA GAC TCG GAA CGC CAG 3'
Mutant : 5' GTG GAA GAC TTG GAA CGC CAG 3'
Hiridizasyon: 62 derece

E280K mutasyonu için ASO primerleri ***

Normal: 5' TAT ACC CCC GAA CCG TGA 3'
Mutant : 5' TAT ACC CCC AAA CCG TGA 3'
Hibridizasyon: 54 derece

10. İNTRON (56 derece, IVS10nt546 mutasyon primeri)

5' TGC AGC AGG GAA TAC TGA TC 3'
5' TAG ACA TTG GAG TCC ACT CT 3'

11. EKZON (55 derece) ***

5' TGC AGC AGG AAT ACT GAT 3'
5' TCC TGA CTG GTG CCA CTC 3'

12. EKZON (55 derece) ***

5' GTG AAT CGA TGT GGT GAC CA 3'
5' CTG GTT TAG CAT GAG GCG GT 3'

R408W mutasyonu için ASO primerleri ***

Normal: 5' TTC CGT GGC ATG AAC TGG 3'
Mutant : 5' TTC CGA GAC ATG AAC TGG 3'
Hibridizasyon: 65 derece

IVS12nt1 mutasyonu için ASO primerleri ***

Normal: 5' CAA ATT CTG AAC CAT GGC 3'
Mutant : 5' CAA ATT CTA AAC CAT GGC 3'
Hibridizasyon 61 derece

Çalışmamızda kullanılan primerlerin bir kısmı aşağıda isimleri verilen laboratuvarlar tarafından hediye edilmiş, diğerleri çeşitli projelerden sağlanmıştır.

* : Dr.T.Bienvenu, Cochin-Tarnier, Laboratoire de Biochimie Genetique, Paris, France.

** : Dr.R.Williamson, St Mary's Hospital London, England.

*** : Dr.A.Munnich, Unite de Recherches de Genetique Medicale INSERM U 12 Hospital des Enfants Malades, Paris, France.

ÖZET

Popölasyonların bulundukları coğrafik bölge farklılığı, etnik orijin ve popölasyon içerisindeki diğer faktörler (akraba evliliği ve çevresel faktörler) nedeniyle, kalıtsal hastalıkların ve bu hastalıklara neden olan mutasyonların insidansları popölasyondan popölasyona farklılık göstermektedir.

Yapısal ve enzimatik görevi olan proteinlere yansıyan gen seviyesindeki bu mutasyonların tesbiti için, protein izolasyonu ve analizi doku farklılaşması nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır. Bunun yanı sıra, farklılaşmaya rağmen her dokuda sabit olan DNA molekülü, moleküler biyolojik teknikler kullanılarak analiz edilebilmektedir.

Çalışmamızda, fenilketonüri (PKU) ve kistik fibrozis (CF) tanısı almış bireyler ve onların ebeveynlerinden alınan lökosit DNA' sını her iki hastalığın gen lokusunda sık görülen mutasyonlar açısından incelendi. Mutasyon analizleri sonucunda, CF allellerinin % 34.6' sında, PKU allellerinin % 30.0' unda ki mutasyonlar belirlendi. Her iki hastalıkta da popölasyonumuza özgül mutasyonların araştırılması amacı ile SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ve DNA dizi analizi çalışmaları başlatılmıştır.

SUMMARY

Due to geographic localization, ethnic origin and other factors such as consanguinity the frequency of inherited mutations which cause genetic diseases differ.

Due to tissue differentiation, detection of mutations at the protein level is not always possible. Thus DNA analysis is required for estimation of mutation incidence and investigation for new mutations.

In this study, we have investigated the cystic fibrosis (CF) and phenylketonuria (PKU) gene locus for the most common mutations. 34.6 % of CF, 30.0 % of PKU alleles have been typed. To determine the population specific mutations in the rest of the mutant alleles, SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) analysis and gene sequencing have been initiated.

5. KAYNAKLAR

1. Ulusoy M. Tunçbilek E. et.al. Consanguinous marriages in Turkey and its effects on infant mortality. *Türk J. Popul. Stud.* 9:7-26, 1987.
2. Ulf Landegnen. Detection of mutations in human DNA. *GATA.* 9(1):3-8, 1992.
3. Trimble BK. and Doughty JH. The amount of hereditary disease in human populations. *Annals Hum. Genet.* 38:199-223, 1974.
4. Evans HJ. Chromosome anomalies among livebirths. *J. Med. Genet.* 14:309-315, 1980.
5. Curnow RN. Smith C. Multifactorial model for familial disease in man. *J. Royal Statistical Society.* 138: 131-169, 1975.
6. Carter CO. Monogenic disorders. *J. Med. Genet.* 14:316-320, 1977.
7. McKusick VA. Mendelian inheritance in man. 8th edn. Johns Hopkins University Press. Baltimore, 1988.
8. Veale AMO. Screening for phenylketonuria. In: Bickel H. Guthrie. Hammerson G. Neonatal screening for inborn errors of metabolism. Springer Berlin Heidelberg New York , pp:7-18, 1988.
9. Özalp İ. Coşkun T. Tokatlı A. Tokol S. Incidence of PKU and HPA in a sample of Turkish newborns. 9th International Neonatal Screening Symposium and Second Meeting of the international society for neonatal screening. 3-17 September, Lille, France, 1993.
10. Daiger SP. Reed L. Huang SS. et.al Polymorphic DNA haplotypes at the PAH locus in Asian families with PKU. *Am. J. Hum. Genet.* 45:319-324, 1989.
11. Aoki K. Wada Y. Outcome of the patients detected by new-born screening in Japan. *Acta. Pediatr.* 30:429-434, 1988.

12. Williamson RA. Murray JC. Molecular analysis of genetic disorders. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 31(2):270-284, 1988.
13. Cooper DN. Schmidtke J. DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome. *Hum. Genet.* 66:1-16, 1984.
14. Devlin B. Risch N. Toeder K. Estimation of allele frequencies of VNTR loci. *Am. J. Hum. Genet.* 48:662-676, 1991.
15. Devlin B. Risch N. Ethnic differentiation at VNTR loci with special reference to forensic applications. *Am. J. Hum. Genet.* 51:534-548, 1992.
16. Lynch J. Brown J. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. *J. Med. Genet.* 27:2-9, 1990.
17. Newton CR. Graham A. Heptinstall IE. et.al. Analysis of any point mutation in DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:2503-2515, 1989.
18. Conner BJ. Reyes A. Morin C. et.al. Detection of beta globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:278-282, 1983.
19. Wu DY. Ugozzoli L. Pal BK. et.al. Allele specific amplification of beta globin genomic DNA for diagnosis of sickle-cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2757-2760, 1989.
20. Tizzano FE. and Buchwald M. Recent advances in cystic fibrosis research. *J. Clinical Pediatrics.* 122(6):985-987, 1993.
21. Vidaud M. Fanen P. Martin J. et. al. Three point mutations in the CFTR gene in French cystic fibrosis patients: Identification by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Genet.* 85:446-449, 1990.
22. Hayashi K. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *GATA.* 9(3):73-79, 1992.
23. Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformational polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2766-2770, 1989.

24. Maxam A. Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:560-564, 1977.
25. Sanger F. Nicklen S. Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467, 1977.
26. Anderson S. Gart MJ. Mayol L. et.al. A short primer for sequencing DNA cloned in the single strand phage vector M13mp2. *Nucleic Acids Res.* 8:1731-1738, 1980.
27. Yanisch-Perron C. Vieira J. and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene.* 33:103-119, 1985.
28. Gyllensten UB. and Erlich HA. Generation of single stranded DNA by the PCR and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7652-7656, 1988.
29. Jin-Sung Lee. Alternative dideoxy sequencing of double-stranded DNA by cyclic reactions using Taq polymerase. *DNA and Cell Biology.* 10(1):67-73, 1991.
30. Romeo G. Devoto M. Galletta V. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum. Genet.* 81:125-129, 1989.
31. Wilcken B. Brown ARD. Urwin R. et. al. Cystic fibrosis screening by dried blood spot trypsin assay: results in 75.000. newborn infants. *J. Pediatr.* 102:383-387, 1988.
32. Tınaztepe B. Kudal N. Tınaztepe K. et. al. Clinicopathological evaluation of 37 cases of cystic fibrosis of the pancreas at necropsy. *Türk J. Pediatr.* 17:108-110, 1975.
33. Gürson CT. Sentel H. Gürkan M. et. al. Newborn screening for cystic fibrosis with the chloride electrode neutron activation analysis. *Helv. Pediatr. Acta.* 28:165-169, 1973.
34. Knowles MR. Stutts MJ. Spock A. et. al. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science.* 221:1067-1070, 1983.

35. Kopelman H. Durie P. Gaskin K. Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N. Eng. J. Med.* 312:329-334, 1985.
36. Durie P. and Forstner G. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J. R. Soc. Med.* 82:Suppl.16:2-10, 1989.
37. Riordan JR. Rommens JM. Kerem BS. et. al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-1073, 1989.
38. Li M. McCann JD. Liedtke CM. et. al. Cyclic AMP dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature.* 331:358-360, 1988.
39. Özgüç M. Yılmaz E. Erdem H. et. al. Distribution of delF508 mutation on the XV2C/KM19 haplotypes in Turkish cystic fibrosis mutant alleles. *Doğa. Tr. J. Medical Science.* 16:523-531, 1992.
40. Lap Chee Tsui. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *TIG.* 8(11):392-398, 1992.
41. Dörk T. Neumann T. Wulbrand U. et. al. Intra-and extragenetic marker haplotypes of CFTR mutations in cystic fibrosis. *Hum. Genet.* 88:417-425, 1992.
42. Bozon D. Maire I. Vialle A. et. al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: Experience of two complementary methods. *J. Inher. Metab. Dis.* 12 suppl. 2:305-307, 1989.
43. Scriver CR. Kaufman S. Woo SLC. Mendelian hyperphenylalaninemia. *Ann. Rev. Genet.* 22:301-321, 1988.
44. Scriver CR. Baudet AL. Sly WS. et. al. Metabolic basis of inherited disease. McGraw Hill, New Yourk, 1989.
45. Bickel H. Bachmann C. Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *Eur. J. Pediatr.* 137:133-139, 1981.
46. Kwok SCM. Ledley FD. DiLella AG. et. al. Nucleotide sequence of a full length complementary DNA clone and amino acid sequence of human PAH gene. *Biochemistry.* 24:556-561, 1985.

47. Eisensmith RC. and Woo SLC. Update listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1445-1448, 1992.
48. Konecki DS. and Konecki UL. The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the PAH gene in various populations. *Hum. Genet.* 87:377-388, 1991.
49. Wedemeyer N. Dworniczak B. and Horst J. PCR detection of the Msp I (Aa) RFLP at the human PAH locus. *Nucleic Acids Res.* 20(4):927, 1992.
50. Goltsov AA. Eisensmith RC. Woo SLC. Detection of the Xmn I RFLP at the human PAH locus by PCR. *Nucleic Acids Res.* 20(4):927, 1992.
51. Dworniczak B. Wedemeyer N. Horst J. PCR detection of the Bgl II RFLP at the human PAH locus. *Nucleic Acid Res.* 19(8):1958, 1992.
52. Dworniczak B. Wedemeyer N. Eigel A. Horst J. PCR detection of the PVU II (Ea) RFLP at the human PAH locus. *Nucleic Acid Res.* 19(8):1958, 1992.
53. Goltsov AA. Eisensmith RC. Konecki DS. et. al. Association between mutations and a VNTR in the human PAH gene. *Am. J. Hum. Genet.* 51:627-636, 1992.
54. Maniatis T. Fritsch EF. Sambrook J. *Molecular cloning; a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
55. Osborne L. Knight R. Santis G. et al. A mutation in the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis gene. *Am. J. Hum. Genet.* 48:608-612, 1991.
56. Linder M. Wolf A. Steinbach P. et al. The spectrum of CFTR mutations in south-west German CF patients. *Hum. Genet.* 90:267-269, 1990.
57. European Working Group on CF Genetics (EWGCFG) . Gradient and distribution in Europe of the major CF mutations and of its associated haplotype. *Hum. Genet.* 85:436-445. 1990.

58. Özgüç M. Yılmaz E. Erdem H. et.al. Allele frequencies of Mp6D-9 and GATT markers in 32 Turkish cystic fibrosis families. Clin. Genet. (in press).
59. Eisensmith RC. Okano Y. Dasovich M. et.al. Multiple origins for phenylketonüria in Europe Am. J. hum. Genet. 51:1355-1365, 1992.
60. Konecki D. Schlotter M. Yaylak C. et. al. DNA haplotype analysis at the phenylalanine hydroxylase locus in the Turkish population. Hum. Genet. 81:373-376, 1989.
61. Chalkley G. Harris A. Lymphocyte mRNA as a resource for detection of mutations and polymorphisms in the CF gene. J. Med. Genet. 28:777-780, 1991.

