

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
YÖNTEMİ İLE DUCHENNE KAS DİSTROFİSİ
TAŞIYICILARININ SAPTANMASI**

AYŞEGÜL ÇINAR KUŞKUCU

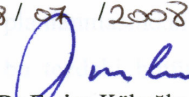
**DANIŞMAN
PROF. DR. SENİHA HACIHANEFİOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

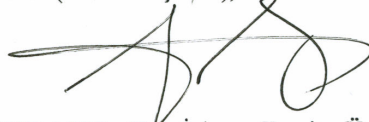
08/07/2008

 Prof. Dr. Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Genetik
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Genetik
 Tez Sahibi : Ayşegül Çınar Kuşkucku
 Tez Başlığı : KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
 YÖNTEMİ İLE DUCHENNE KAS DİSTROFİSİ TAŞIYICILARININ
 SAPTANMASI
 Sınav Yeri : İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD.
 Sınav Tarihi : 30 / 06 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU (Tez Danışmanı), İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD.



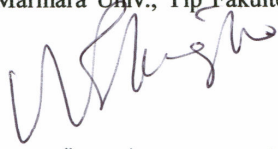
2. Prof. Dr. Piraye SERDAROĞLU OFLAZER (Tez İzleme Komite Üyesi), İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fakültesi., Nöroloji ABD.



3. Prof. Dr. Nur BUYRU (Tez İzleme Komite Üyesi), İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD.



4. Prof. Dr. Nursel ELÇİOĞLU, Marmara Üniv., Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD.



5. Doç. Dr. Z. Oya UYGUNER, İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dr. Ayşegül Çınar Kuşkuçcu



İTHAF

Eğitim hayatım boyunca en büyük desteęim ve yol göstericim olan teyzem,
Uzm.Bio. Fazilet KAYA'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başlangıcından beri bilgi, deneyimlerini ve tüm eğitimim boyunca sevgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve kıymetli hocam, Sayın Prof. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bana yol gösterip, yönlendiren hocam, Sayın Prof. Dr. Nur Buyru'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama büyük destek veren ve çalışmanın her adımında bilgi ve deneyimlerini paylaştan hocam Sayın Prof. Dr. Piraye SERDAROĞLU OFLAZER'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimimde ve yetişmemde emeği geçen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Anabilim Dalımızda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Adnan YÜKSEL'e, Doç. Dr. Ayhan DEVİREN'e teşekkür ederim.

Ayrıca, sitogenetik laboratuvarında bulduğum huzurlu, işbirliğine açık ve verimli çalışma ortamındaki katkılarından dolayı Dr. Şükriye YILMAZ'a, Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN'e, Dr. Gülgün GÜVEN'e, Dr. Dilhan KURU'ya, Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU'na, Bio. Nazlı BİRİNCİ'ye, Lab. İlknur BEYAZIT'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her an sonsuz sevgi, sabır, büyük desteğiyle yanımda ve eğitim hayatımın her döneminde yol gösterici olan çok değerli aileme sonsuz minnetle teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sürecimde yanımda ve bana destek olan kıymetli hayat arkadaşım Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya tüm desteği ve sıcaklığı için teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ayşegül Çınar Kuşkucu

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİ
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KAS DİSTROFİLERİ.....	3
2.2. DUCHENNE / BECKER KAS DİSTROFİSİ.....	5
2.2.1. SIKLIK.....	6
2.2.2. KALITIM	6
2.2.3. PATOGENEZ.....	7
2.2.5. KLİNİK BULGULAR	10
2.2.5.1. Duchenne Kas Distrofisi.....	10
2.2.5.2. Becker Kas Distrofisi	11
2.2.5.3. Taşıyıcı Kadınlarda DMD/BMD.....	12
2.2.6. HASTALIĞIN TANISI.....	14
2.2.6.1. Tanıda Kullanılan Yöntemler	14
2.2.7.HASTALIĞIN ÖNLENMESİ ve GENETİK DANIŞMA.....	19
2.2.8. TEDAVİ	23
2.3. KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. GEREÇ.....	28
3.1.1. HASTA ÖRNEKLERİ.....	28
3.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR	32

3.1.3.KULLANILAN SARF MALZEMELERİ	32
3.1.4.KULLANILAN KİTLER.....	33
3.1.5.KULLANILAN CİHAZLAR	33
3.1.6.KULLANILAN YAZILIMLAR.....	34
3.2. YÖNTEM.....	34
3.2.1. DNA İZOLASYONU	34
3.2.2. PRİMERLERİN SEÇİMİ VE HAZIRLANMASI	35
3.2.3. ÖRNEKLERİN DNA KOSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ.....	38
3.2.4. ÖRNEKLERİN PZR İŞLEMİ İLE ÇOĞALTILMASI	39
3.2.5. PZR ÜRÜNLERİNİN CİHAZA YÜKLENMESİ VE ANALİZİ.....	40
3.2.6. GENETİK ANALİZ CİHAZINDAN ELDE EDİLEN VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMELERİ	44
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	73
FORMLAR	79
ETİK KURUL KARARI	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 1. Kas distrofileri sınıflaması
- Tablo 2. Çalışmadaki Olgular
- Tablo 3. Yayın taraması sonucu derlenen primer dizileri
- Tablo 4. Yeniden tasarlanan primer dizileri
- Tablo 5. STR bölgelerine ait primer dizileri
- Tablo 6. Gerçek zamanlı PZR karışımı
- Tablo 7. Gerçek zamanlı PZR için kullanılan program aşamaları
- Tablo 8. Çoklu PZR oranları
- Tablo 9. Çoklu PZR programı
- Tablo 10. Genetik analiz cihazı yürütme karışımı
- Tablo 11. Applied Biosystems310 Genetik Analiz Cihazı Yürütme Parametreleri
- Tablo 12. GeneMapper Software 4.0 Panel Ayarları
- Tablo 13. Tepe Dozaj Değerleri Normal Sınırları
- Tablo 14. Gerçek zamanlı PZR Sonuçları
- Tablo 15. Amplifiye edilen bölgeler, bunların uzunlukları, ortalama tepe alanları ile tepe dozaj değerleri
- Tablo 16. Amplifiye edilen bölgeler, bunların normal toplumda dağılım olasılıkları.
- Tablo 17. Tez çalışmasında incelenen olgular ve sonuçları

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1 Gowers bulgusu
- Şekil 2 Kasta distrofin ve distrofin-glikoprotein kompleksi
- Şekil 3 A. Normal kasta pozitif boyanma
B. DMD'li hastada negatif boyanma
- Şekil 4 DMD/BMD düşünölen hastada tanı akış şeması
- Şekil 5 Kesin Taşıyıcılık (Ailesel form); Birden fazla kuşakta etkilenmiş birey.
- Şekil 6 A. Olası Taşıyıcılık; Yalnız bir etkilenmiş birey (İzole Olgu)
B. Olası Taşıyıcılık; bir ailede birden fazla etkilenmiş birey
- Şekil 7 Gen dozaj analizi sonuçları
- Şekil 8 Trizomilerde QF-PCR sonuçlarının değeriendirilmesi
- Şekil 9 Applied Biosystems310 Genetik Analiz Cihazı Yürütme Parametreleri
- Şekil 10 A. GeneMapper Tepe Saptama Yöntemi
B. GeneMapper Analiz Parametreleri
- Şekil 11 Primer dizi Tm derecelerinin
A. Literatürdeki dağılımları
B. Yeniden tasarlanmış primerler
- Şekil 12 Gerçek zamanlı PZR ile logaritmik fazın belirlenmesi
- Şekil 13 Eksonların değışik DNA derişimlerinde amplifikasyon sonuçları
- Şekil 14 STR belirteçlerinin değışik DNA derişimlerinde amplifikasyon sonuçları
- Şekil 15 2 no'lu Aile
A. 47. Ekson bölgesinin analizi.
B. 48. Ekson analizi
C. STR belirteçleri
- Şekil 16. 3 no'lu Aileye ait amplifikasyon tepeleri
A. Eksonlar
B. STR belirteçleri

- Şekil 17 12 no'lu Aile
A. ekson tepe görüntüleri
B. STR belirteçleri
- Şekil 18 10 no'lu Aileye ait ekson tepe görüntüleri
- Şekil 19. Anne hücre kontaminasyonunun QF-PCR ile saptanması

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Duchenne Kas Distrofisi (Duchenne Muscular Dystrophy)	DMD
Becker Kas Distrofisi (Becker Muscular Dystrophy)	BMD
Polimeraz zincir reaksiyonu	PZR
Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative-flourecent polymerase chain reaction)	QF-PCR
Deoksiribonükleik Asit	DNA
Ribonükleik Asit	RNA
X'e bağlı çekinik (X linked recessive)	XR
Otozomal baskın (Otozomal dominant)	OD
Otozomal çekinik (Otozomal recessive)	OR
Kilo Dalton	KD
Kilo baz	kb
Elektrokardiyografi	EKG
Ekokardiyografi	EKO
Laktat dehidrogenaz	LDH
Zeka kalitesi (Intelligence quotient)	IQ
Elektromiyografi	EMG
Bilgisayarlı tomografi	BT
Restiriksiyon Parça uzunluk değişkenliği (Restriction Fragment Length Polymorphism)	RFLP
Değişik boyutlu nükleotid tekrarları (Variable Nucleotide Tandem Repeats)	VNTR
Kısa Nükleotid tekrarları (Short Tandem Repeats)	STR
İmplantasyon öncesi genetik tanı (Preimplantation Genetic Diagnosis)	PGT
Tek nükleotid farklılığı (Single Nucleotide Polymorphism)	SNP

Erime değeri (Temperature of Melting)	Tm
Denatüre gradiyentli jel elektroforezi (Denaturing gradient gel electrophoresis)	DGGE
Denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografi (Denaturing high performance liquid chromatography)	DHPLC
Tepe Doz Değeri (Pik Dozaj Değeri = Peak Dosage Quotients)	PDD
Florosan hücre içi melezleme (Flourecent in-situ Hybridisation)	FISH
Dimetilsülfoksit	DMSO
Sığır serum albumini (Bovin Serum Albumine)	BSA
Koryon villus biyopsisi (Chorion villus sampling)	CVS
Amniyosentez	AS
Yer çekimi	g
Mikrolitre	μ l
Mililitre	ml
Derece santigrat	$^{\circ}$ C
Deoksinükleotidtrifosfat	dNTP
Serum kreatin kinaz	CK
Promotor	PM

ÖZET

Kuşkucu, A.Ç. (2008). Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Duchenne Kas Distrofisi Taşıyıcılarının Saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : Duchenne/Becker kas distrofisi, taşıyıcı, kantitatif floresan PZR

Duchenne ve Becker kas distrofileri (DMD/BMD), X'e bağlı çekinik kalıtım gösteren kas hastalıklarıdır. DMD 1/3300 oranında görülen, ilerleyici ve ölümcülken, allelik formu olan BMD daha hafif seyirlidir. DMD/BMD Xp21.2 bölgesinde yer alan Distrofin geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşur. DMD'li olguların %60-65'nde gözlenen kısmi gen delesyonları, %5-10'unda duplikasyonlar genin 2 "hot spot" bölgesinde toplanmıştır. Olguların kalan %25-30'unda nokta mutasyonları ve insersiyonlar bulunur. Olguların 2/3'ü taşıyıcı bir anneden aktarılan mutasyonla, 1/3'ü ise yeni mutasyon sonucu oluşur. Etkilenmiş erkeklerde delesyonlar çoklu PZR ile gösterilebilir. Ancak kadında taşıyıcılığın belirlenmesi zordur. Bu zorluğu çözmeye yönelik bağlantı analizi, floresan in-situ hibridizasyon, MLPA gibi çeşitli moleküler tanı yöntemleri kullanılmıştır. Tüm bu yöntemlerin teknik zorluk, yüksek maliyet, fazla zaman alımı, taze örnek ya da tüm ailelere uygulanamaması gibi dezavantajları vardır. Çalışmamızda, gen dozaj yöntemi olan kantitatif floresan PZR'yi (QF-PCR) bu problemlerin çözümüne yönelik uyarladık. QF-PCR, floresan işaretli primerler kullanılarak çoğaltılan DNA parçalarının bir genetik analiz cihazında kopya sayılarının belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Biz bu yöntemi daha önce çoklu PZR yöntemiyle delesyonları tespit edilmiş DMD/BMD'li hastaların ailelelerindeki kadınlarda taşıyıcılığın belirlenmesinde kullandık. Bunun için 24 ailede 23 olguda ekson delesyonları ve 28 kadında delesyon taşıyıcılığı inceledik. Olgularda 18 ekson ve promotor bölgesinin yanı sıra 3 STR belirtecini iç standart ve bağlantı analizi açısından inceledik. 19 hastada daha önce belirlenen delesyonla örtüşen sonuçlar elde edildi. 3 hastada ek bir ekson, 1 hastada önceki sonucundan eksik bir ekson delesyonu bulundu. 19 ailede annelerde delesyon taşıyıcılığını gösterirken 5 ailede annelerde delesyon gözlenmeyerek normal olarak bulundu. Sonuç olarak QF-PCR'ı DMD/BMD'li hastalarda delesyonun belirlenmesi ve taşıyıcı taramasında hızlı, güvenilir, tekrarlanabilen bir yöntem olarak tanımladık.

ABSTRACT

Kuşkucu, A.Ç. (2008). Detection of Duchene Muscular Dystrophy Carriers with Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetic. Doktora Tezi. İstanbul.

Key Words : Duchenne/Becker Muscular Dystrophy, QF-PCR, carrier

Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD/BMD) are most common X linked neuromuscular diseases. DMD is progressive, lethal, affecting 1/3300 live-born males. BMD is milder, allelic form of DMD. Both of them result from mutations in Dystrophin gene at Xp21.2. Partial gene deletions responsible for up to %60-65 DMD cases and %5-10 of cases result from gene duplications which are cluster in 2 “Hot spot” regions. Point mutations and insertion of few nucleotides account for the remaining cases (%25-30). Mutations are either inherited from female carriers (2/3) or occur de novo (1/3). In affected males, deletions can be easily detected using multiplex PCR. But determining female carrier status is difficult. This difficulty reflected in the great variety of techniques that have been used for this purpose. These include methods such as linkage analysis, fluorescent in-situ hybridization (FISH), MLPA, etc. All of these methods have disadvantages; they are technically demanding, require fresh samples, are subject to error or are not applicable to all families. To overcome these problems we optimized gene dosage method quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). QF-PCR refers to the amplification of DNA fragment using fluorescence-labeled primers, followed by quantitative analysis of the products on a genetic analyzer to determine copy number of DNA fragments. In our study, to determine deletions in DMD/BMD patients, who were previously diagnosed at the molecular level and female carrier status. We used 18 exon and promoter region STR markers as internal control and for linkage analysis. We found the same results, which previously reported, in 19 patients. In 3 patients we found an extra exon deletion and in 1 patient we found less exon deletion than previously found. In 19 families mothers were carriers, in 5 families mothers were not carriers.

As a result we conclude that quantitative florescent PCR is a fast, reproducible and robust for detection of deletions of DMD/BMD patients and useful method for carrier screening.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Modern Genetik biliminin temelini oluşturan Gregor Mendel'in çalışmalarından bu güne, teknolojinin de katkılarıyla meydana gelen gelişmeler sonucunda, genetik biliminin biyokimyasal temeli büyük ölçüde gün ışığına çıkartılmıştır. Günümüzde kalıtsal faktörlerin temelini nükleik asitler yani DNA olduğunu ve DNA'dan oluşmuş türe özgü sayıdaki kromozomların, kalıtsal nitelikleri kuşaktan kuşağa aktarılmasını sağladığını bilmekteyiz. Bir çok hastalığın da temelinde kalıtsallık bulunması, genetik bilimini sağlık alanına sokmuştur.

Tıbbi Genetik, Genetik biliminin, kalıtsal hastalıkları inceleyen bir dalıdır. Tıbbi Genetik'in tıptaki diğer dallardan farkı yalnız hastaya odaklanılmaması, hastalıkları ailesel temelde incelemesi ve gelecek nesiller için de olasılıklar öngörebilmesidir. Bunun için de birçok disiplini içinde bulundurur.

Son 5 yıldır insan genom projesi ve teknolojinin ilerlemesiyle insan genomu dizilenmiş ve giderek daha da artan bir hızla kalıtsal hastalıkların temelinde yatan mutasyonlar belirlenmeye başlamıştır. Bu çalışmalar sayesinde tanıya yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve halen geliştirilmektedir.

Nöroloji biliminin bir kolu olan sinir-kas hastalıkları içinde yer alan kas distrofileri kalıtsal özellik gösteren, ilerleyen kas güçsüzlüğü ile karakterize bir hastalık grubudur. Kas distrofileri içinde en sık görülen X'e bağlı çekinik kalıtım gösteren Duchenne /Becker Kas Distrofisi'leridir (DMD/BMD). DMD, ilerleyici, etkin bir tedavisi olmayan ve ölümcül seyreden bir hastalıktır (29,30,36). Allelik formu olan BMD ise klinik bulguları daha hafif olan bir hastalıktır. Xp21.2 bölgesinde yerleşmiş Distrofin geninde meydana gelen delesyon, duplikasyon veya nokta mutasyonları nedeni ile distrofin proteini üretilemez veya işlevsel olamaz, sonuçta DMD/BMD fenotipi oluşur. Hastalık hemen her zaman erkek çocuklarda görülür çok nadir de olsa kızlarda bulgu verir. Olguların 1/3'ü yeni mutasyona bağlı olarak ortaya çıkarken, 2/3'ü ise klinik bulgu vermeyen taşıyıcı kadınlar yoluyla kuşaktan kuşağa aktarılır (2,10,12). Bu durumda ailede birden fazla erkek çocuk etkilenebilir. DMD/BMD ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış, gen bölgesi belirlenmiş, proteini incelenmiş, mutasyonları bulunmuş, moleküler ve doğum öncesi tanı testleri geliştirilmiştir. Hastalığın tedavisine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

DMD/BMD'nin kalıtsal oluşu, etkin tedavisinin olmayışı ve ağır olabilen gidişi nedeniyle etkilenmiş çocukların ailelerindeki taşıyıcı kadınların belirlenebilmesi önem taşımaktadır. Taşıyıcıların belirlenmesi etkin doğum öncesi tanıyı da sağlayacaktır.

Günümüzde taşıyıcı bireylerin belirlenmesinde aile ağacı analizleri, bağlantı analizi, serum kreatin kinaz (CK) düzeyine bakılması ve Bayesian hesabı gibi yöntemlerden birkaçı veya tümü birlikte kullanılmaktadır. Ancak özellikle izole olgularda, küçük ailelerde ya da bağlantı analizi için yeterli bilgilendiricilerin olmadığı durumlarda taşıyıcılığın belirlenebilmesi son derece güçtür (36,62,63). Taşıyıcılığın belirlenmesinde kullanılacak yöntemler gen dozaj belirleme yöntemleridir. Bu yöntemlerde amaç ilgilenilen eksonun kopya sayısının belirlenmesidir. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH), MLPA, kantitatif floresan PZR (QF-PCR) gen dozaj belirleme yöntemlerinden birkaçıdır (26). QF-PCR, floresan işaretli primerler kullanılarak ilgilenilen gen bölgesinin çoğaltılmasına ve bunun otomatize genetik analiz cihazında kopya sayısının belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Rutinde, en sık rastlanan sayısal kromozom anomalilerinin doğum öncesi tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Gen bölgelerinin kopya sayılarını belirleyebilen bir yöntem olduğu için delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonların tanımlanmasında da kullanılabilmesi bildirilmiştir (1,3,26).

Araştırmamızın amacı; Delesyonu önceden tespit edilerek DMD/BMD kesin tanısı konmuş hastalarda mutasyonları ve kadın akrabalarında delesyon taşıyıcılığının kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) yöntemi ile belirlemektir. Çalışmamızın sonucunda hem Distrofin geninde mutasyonun en sık gözlemlendiği bölgelerdeki delesyon tipi mutasyonların tanısını yapabilecek, hem de taşıyıcıları belirleyebilecek bir mutasyon analiz sistemi geliştirmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAS DİSTROFİLERİ

Kas distrofileri, temelde iskelet kas hücrelerinin tekrarlayan yıkım ve tamir süreçlerinin sonucunda meydana gelen, ilerleyici ve kalıtsal özellik gösteren bir hastalık grubudur (19,30). Distrofi sözcüğü yunanca, “Dys” “anormal” ve “trophy” “büyüme” anlamına gelen 2 sözcükten oluşur. Günümüzde “kas distrofisi” terimi, kalıtsal özellik gösteren dejeneratif kas hastalıkları için kullanılmaktadır. Diğer ilerleyici kas hastalıkları, “miyopatiler” veya “polimiyopatiler” olarak isimlendirilir. (30,78)

Kas distrofileri, sinirsel ileti bozukluğuna bağlı olarak gelişen kas hastalıklarından, 19. yüzyılda ayırt edilmiştir. 1852 yılında Meryon tarafından ilk defa kas distrofisinin kliniği detaylı olarak bildirilmiştir. 1891’de Erb kas dokusunda oluşan harabiyet sonucu meydana gelen bir grup hastalığın klinik ve histolojik bulgularını inceleyerek, bu hastalık grubunu “kas distrofileri” olarak isimlendirmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucu çeşitli kas distrofileri tanımlanmıştır. Son 30 yıl içinde biyoteknolojinin gelişmesiyle kas distrofilerinin nedenleri ve mekanizmaları hakkında biyokimyasal ve moleküler genetik veriler elde edilmiştir. Bu gelişmelerin sonucu olarak, hastalık sınıflandırmalarında yeni düzenlemelere gidilmekte, doğum öncesi tanı ve tedavi stratejileri geliştirilmektedir (29).

Kas distrofileri kalıtsal özelliklerine göre otozomal baskın (OD), otozomal çekinik (OR) ve X’e bağlı çekinik (XR) olarak 3 gruba ayrılır. Ancak bazı hastalıkların birden fazla kalıtım şekli göstermeleri nedeniyle klinik sınıflandırmanın daha anlaşılabilir olabileceği görüşü vardır. Kas distrofileri klinik özelliklerine göre de 2 grupta incelenebilir;

1. Kavşak tipi kas distrofileri: Başlıca kalça ve omuz kavşağı kaslarının tutulumunun görüldüğü ve ilerleyerek diğer iskelet kaslarına da yayılımın olduğu tip distrofilerdir.

2. Özel kas zaafı dağılımı veya klinik tablo gösteren kas distrofileri: Bu grupta özel kas tutulumlarının gözlendiği ilerleyici kas distrofileri yer alır.

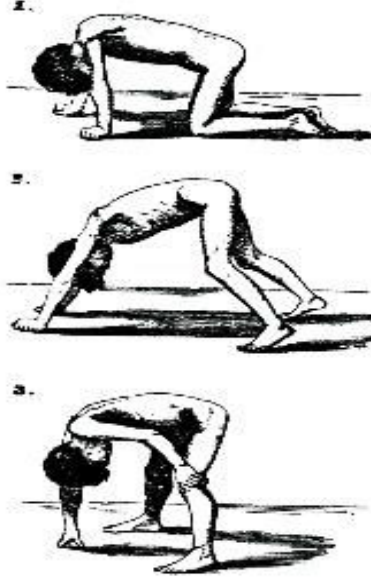
Tablo 1. Kas Distrofileri Sınıflaması (19, 30 ve 65. kaynaklardan derlenmiştir)

a. Kavşak Tipi Kas Distrofileri				
Kas Distrofisi	Tipi	Kalıtım Biçimi	Kromozom Yerleşimi	Etkilenen Protein
Duchenne Kas Distrofisi (DMD)		XR	Xp21.2	Distrofin
Becker Kas Distrofisi (DMD)				
Limb-Girdle kas distrofisi (LGMD 1)	1A	OD	5q	Myotilin
	1B		1q	Lamin-A/C
	1C		3p	Kaveolin-3
	1D		6q	Bilinmiyor
	1E		7q	Bilinmiyor
	1F			
Limb-Girdle kas distrofisi (LGMD 2)	2A	OR	15q	Kalpain-3
	2B		2p	Disferlin
	2C		13q	γ -sarkoglikan
	2D		17q	α - sarkoglikan
	2E		4q	β - sarkoglikan
	2F		5q	δ - sarkoglikan
	2G		17q	Telethonin
	2H		9q	TRIM32
	2I		19q	Fukutin-ilişkili protein
	2J		2q	Titin
B. Özel Kas Zaafı Dağılımı veya Klinik Tablo Gösteren Kas Distrofileri				
Kas Distrofisi	Tipi	Kalıtım Biçimi	Kromozom Yerleşimi	Etkilenen Protein
Emery Dreifuss kas distrofisi		XR	Xq28	Emerin
		OD/OR	1q	Lamin-A/C
Miyotonik distrofi (DM)		OD	19q	
Facio–scapulo–humeral kas distrofisi			4q	Bilinmiyor
Okülarfaringeal kas distrofisi			14q	Poly(A) bağlayıcı protein 2
Konjenital kas distrofileri	Fukuyama Tipi	OR	9q	Fukutin
	Klasik Tip (Merozin Pozitif ve Negatif)	OR		Merozin
	Kas Göz Beyin Hastalığı	OR	19q	Fukutin-ilişkili protein
	Walker-Warburg	OR	9q	O-Mannozil Transferaz 1
	Rijid Spine Sendromu	OR	1p	Selonoprotein
	Integrin	OR	12q	Integrin $\alpha 7$
	LARGE	OR		
FKRP	OR		FKRP	

2.2. DUCHENNE / BECKER KAS DİSTROFİSİ

Duchenne kas distrofisi (DMD) kas distrofileri arasında en sık görülen hastalıktır. 1868’de hastalığa adı verilen Guillame Benjamin Duchenne, çocukluk çağında kas güçsüzlüğü başlayan 13 olgudan, hastalığın farklı dönemlerinde alınan kas biyopsi örneklerinin histolojik incelemelerinde, kas dokusundaki değişimleri ve hastalığın erkek çocuklarda görüldüğünü bildirmiştir (67). 1879’da Gowers benzer 21 olguyu incelemiş ve günümüzde “Gowers Belirtisi” olarak isimlendirilen, hastaların yerden ellerini kullanarak karakteristik doğrulmasını tanımlamıştır (Şekil 1).

Şekil 1. Gowers Belirtisi (62 no’lu kaynaktan alınmıştır)



1955 yılında Becker ve Keiner DMD’ye benzer ancak daha hafif bulguların görüldüğü Becker kas distrofisini (BMD) farklı bir hastalık olarak tanımlamışlardır. Ancak moleküler genetik çalışmalarının sonucunda BMD’nin, DMD’nin allelik formu olduğu belirlenmiştir.

DMD/BMD dünyadaki her ırkta görülür. X’e bağlı çekinik kalıtımla geçer. Bu nedenle erkek çocuklarda görülür ve günümüzde etkin bir tedavisi olmayan bu hastalıklardan DMD daha ağır seyreder ve ölümcüldür.

1983 yılında DMD ve daha hafif formu olan BMD’ye yol açan genin, X kromozomunun kısa kolunda (Xp21.2) yer aldığı bağlantı analizi çalışmaları ile

gösterilmiştir (20,63). 1986 yılında Monaco ve arkadaşları Distrofin geninin pozisyonel klonlamasını yapmıştır. Genin klonlanmasından sonra Hoffman ve ark. Distrofin geninin ürünü olan distrofin proteinini 1987'de tanımlamıştır. Distrofin proteininin yapısının tanımlanması, DMD'yi BMD'den ayırmada ve taşıyıcı kadınların tanısında fayda sağlamıştır (7,29,63). Genin klonlanması sonrasında DMD/BMD'ye neden olan mutasyonların belirlenmesi ile tanıya yönelik moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesi mümkün olmuştur. DMD için kesin bir tedavi yöntemi bulunmamış olmasına rağmen distrofin geni klonlanması sonrasında gen tedavisi ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve günümüzde halen devam etmektedir.

2.2.1.SIKLIK

DMD'nin görülme sıklığı yenidoğan erkek çocuklarda 1/3300 olup, kadınlarda taşıyıcılık oranı 1/2500'dür. Görülme sıklığı toplumlara göre farklılık gösterebilmekle birlikte etkin doğum öncesi tanının sonucunda hastalığın görülme sıklığı azalmaktadır.

30 yılı kapsayan epidemiyolojik bir çalışmada 1.532.218 erkek çocukta yapılan incelemelerde 324 hasta olgu saptanmış ve DMD sıklığı 1/4800 olarak hesaplanmıştır. 1970'de Gardner-Medwin ise hastalık sıklığını 1/3067 olarak belirlemişlerdir (63). Doğum ve ölüm kayıtlarının iyi tutulduğu bir ülke olan Hollanda'da 1961'den önce yapılan çalışmalarda erkek çocuklarda hastalık sıklığı 1/4215 iken, hastalıkta erken tanı olanakları geliştikçe bu oran Ocak 1983'de 1/18.496'ya düşmüştür (25,63).

BMD sıklığı ise net olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık 1/18.000 ile 1/30.000 civarında olabileceği bildirilmiştir.(3,32,49,53)

2.2.2. KALITIM

DMD'li olguların 2/3'ü, mutant genin taşıyıcı anneler ile bir sonraki kuşağa aktarımı sonucu oluşurken, 1/3'ü yeni mutasyon ile oluşur (2,10,12) . Yeni mutasyonlar, X'e bağlı çekinik geçen birçok hastalığın izole olgularının önemli bir kısmını oluşturur. DMD, erkeklerde ölümcül olduğu için, erkekler taşıdıkları mutant geni sonraki kuşağa

aktaramazlar (fitness = 0). Bu nedenle mutant genlerin 1/3'ü her kuşakta kaybolur. Ancak hasta olguların görülme sıklığı değişmediğinden, toplumda kaybolan mutant genlerin yerine konulduğu düşünüldüğünde, DMD'li olguların 1/3 'ünün yeni mutasyon ile oluştuğu kabul edilir (Haldane Kuralı [Haldane, 1935]) (64). Mutasyon hızının bu kadar fazla olmasının nedeni, genin çok büyük olmasına bağlanmıştır (4,62).

BMD'li erkeklerde klinik daha hafif seyrettiği için üretkenlikleri devam eder ve hastalıklı geni kızlarına aktarırlar. Bunun sonucunda, BMD'li olguların büyük çoğunluğu (%90), taşıyıcı anneden erkek çocuğa hastalıklı genin aktarımı ile meydana gelir. Olguların yaklaşık %10'u yeni mutasyon sonucu oluşur (63).

2.2.3. PATOGENEZ

Hastalığın nedeni X kromozomu üzerinde bulunan ve hastalığın adının verildiği, Distrofin geninde meydana gelen mutasyon sonucu, genin ürünü olan distrofin proteininin eksikliği veya hatalı yapımıdır.

Distrofin geni, 2300 kb büyüklüğünde ve X kromozomunun yaklaşık %1,5'ini oluşturan insandaki en büyük genlerden biridir. X kromozomunun kısa kolunda (Xp21.2) yerleşmiş olan Distrofin geni, 79 ekson ve 7 dokuya özgü promotör içerir. Bu özgün promotörler, genin, dokuya özgü izoformlarının oluşumunu sağlar. DMD'li hastalarda, dokuların çoğunda, Distrofin geninin en az bir izoformu ifade edilir. Ancak, iskelet kası dokusuna özgü izoform ifade edilemez ve hastalık oluşur (59,60).

Distrofin geninin tanımlanması ve genle ilgili pek çok araştırma, moleküler genetik çalışmalarının en önemli basamaklarını oluşturmuştur. DMD/BMD, 1986 yılında Monaco ve ark. tarafından, ilk defa “pozisyonel klonlama” yöntemi kullanılarak geni bulunan kalıtsal hastalıktır. Öncesinde 1982 yılında Murray ve ark. ilk bağlantı analizi çalışmalarını ve 1983'te Davies ve ark. genin X kromozomu üzerinde yerleştiği bölgeyi bildirmiştir (19,20,48,63). Her iki çalışma da bağlantı analizine dayalı taşıyıcılık belirlenmesi ve mutasyonu bilinmeyen birçok hastalığın doğum öncesi tanısının temelini oluşturmuştur (29). 1987 yılında Kunkel ve ark. Distrofin geninin tam klonlamasını yapmış ve yapısal özelliklerini bildirmişlerdir. (63)

Distrofin geninde meydana gelen farklı mutasyonlar hastalığa yol açar. Olguların %60-65'inde kısmi gen (ekson) delesyonları, % 5-10'unda duplikasyonlar görülür (2,15,24,27,28,49). Olguların kalan %25-30'unda nokta mutasyonları ve insersiyon tipi mutasyonlar gözlenir (12,13,24,29) En sık görülen delesyon tipi mutasyonlar, gende rastgele bir dağılım göstermezler. Gende, "Hot Spot" olarak adlandırılan bu bölgeler; delesyonların %25-30'unun bulunduğu, genin 5' ucunda yaklaşık 800 kb ve kalan %65-70'inin bulunduğu, genin merkezinde 200 kb'lık alanlardır (29,33,34,35,50). Bu da çoklu PZR tekniği ile en sık delesyona uğrayan 19 eksonun taranabilmesini ve delesyonların %98'inin belirlenebilmesini sağlamıştır (31,32,44,60,73). Nokta mutasyonları olarak adlandırılan tek nükleotit değişimleri ise genin tümüne rastgele yayılmıştır (13,28) Bugüne kadar 400'e yakın nokta mutasyonu belirlenmiştir (13). Tek nükleotit değişimleri, anlamsız (%34), çerçeve kayması (%33), kırılma bölgesinde değişim (%29) ve yanlış anlamlı mutasyonlara neden olarak DMD gen ifadesinde değişimlere ve hatalı protein oluşumuna neden olurlar (13,60)

Aynı gendeki mutasyonlar sonucunda oluşan DMD ve BMD fenotiplerinin farklı olması, mutasyonların genin okuma dizisinde 2 farklı sonuca yol açtığını ortaya koymaktadır;

1- Mutasyonlar çerçeve kaymasına neden olabilir ve Duchenne fenotipine yol açar. Çünkü bu tip mutasyonlar okuma çerçevesini bölerek, protein sentezini, bitmesi gerekli olan yerden çok önce bitirir. Dolayısıyla protein üretilemez. Mutasyonların %92'si bu tiptedir (5,22,49,50,55,59,60)

2- Mutasyonlar çerçeve içinde kalır ve okuma dizisinde bir değişiklik yaratmazlar. Kodlanması gereken bazı amino asitler yanlış kodlanır ve hatalı bir distrofin molekülü yaparlar. Ancak proteinin amino ve karboksi uçları normaldir(40). Bu tip bir mutasyon, yarı işlevsel bir proteinin sentezine neden olur ve Becker tipi distrofiye yol açar(5,22,40,49,55,59,60) .

Hastalığa neden olan gen ve mutasyonların belirlenmesi, genin kodladığı protein olan, distrofinin de bulunmasını sağlamıştır. 1987 yılında Wood ve ark. Distrofin geninin yaklaşık 16 kb'lık bir mRNA kodladığını ve mRNA eğer tek bir protein kodluyorsa, bu proteininin de yaklaşık 500 kD büyüklüğünde olması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmalarının devamında, DMD'li hastalarda eksik olan proteinin nebulin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı yıl Furst ve ark. monoklonal antikor kullanarak

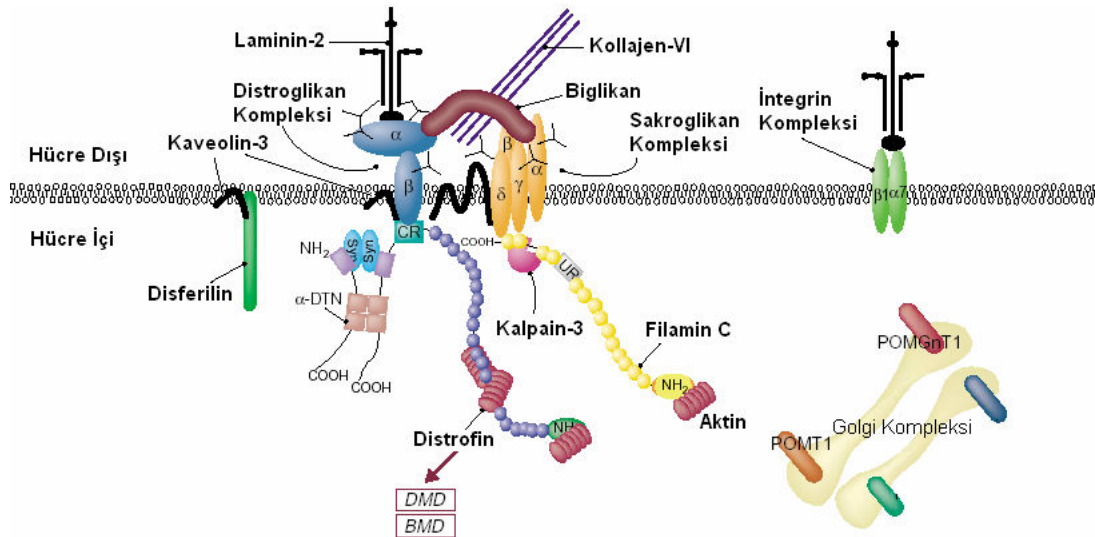
yaptıkları çalışmada, DMD'li hastalarda nebulinin varlığını göstermişlerdir. Yine 1987 yılında Hoffman ve ark. fetal insan iskelet kası ve erişkin fare kalp kası örneklerinde, DMD cDNA'sının ifade ettiği polipeptitlere yönelik antikor kullanarak yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalar sonucu, "distrofin" adını verdikleri proteini tanımlamışlardır (63).

Distrofin geninden üretilen 14 kb'lık bir mRNA tarafından kodlanan, 427 KD büyüklüğündeki distrofin, insanda bilinen en büyük proteindir (19,22,59,60). Distrofin en fazla iskelet ve kalp kasında, az da olsa nöronlar ve damar düz kaslarında, genin dokuya özgü promotörleri aracılığı ile izoformlar şeklinde ifade edilir(59,60,61).

Distrofin, kas hücresi zarı olan sarkolemmanın iç yüzeyindedir ve hücre iskeleti ile hücre dışı alan arasında bağlayıcı öge olarak, sarkolemmanın yapısal bütünlüğünü korur (19, 22,40,60).

Protein, bir aktin bağlayan N-uç alanı, bir merkezi alan, bir sisteinden zengin alan ve bir de C-uç alanından oluşur. N-uç alanı alfa aktinle benzerlik gösterir ve 232-240 amino asit içerir. Merkezi alanı (rod domain) spektrine benzer yapıda 25 ikili sarmal tekrar yapar. Sisteinden zengin alan 280 ve C-uç alanı da 420 amino asit içerir (61,66).

Şekil 2 . Kasta distrofin ve distrofin-glikoprotein kompleksi (19 No'lu yayından değiştirilerek çizilmiştir)



Distrofin kalp ve iskelet kası sarkolemmasına bağlıdır ve buradaki esas görevi sarkolemma ile integral zar proteinleri arasında iletişim kurmaktır. Distrofin ve bu proteinler, distrofin-glikoprotein kompleksini (DGC) oluşturur (Şekil 2). Bu komplekste Distroglikan, sarkoglikan, distrobrevin, sintrofin yer alır. Temel görevleri sarkolemma'nın bütünlüğünün sağlanmasıdır (40). Distrofin N-ucu ile sarkolemma altına yerleşmiş a-aktin aracılığıyla hücre içine, C-ucu ile hücre dışı alandaki laminin ve diğer DGC proteinleri aracılığıyla hücre dışına bağlanır(5,22) . Böylece kas hücresi zarının iki taraflı, hem hücre içi hem de hücre dışı sağlam bir bağlantısı olur. Bu bağlantının sağlam olması önemlidir. Çünkü kas hücresi zarı, kas liflerinin uzun süreli kasılmaları sırasında fazla yük altında kalarak gerilir ve dokunun hasar görmemesi için güçlü bir bağlantı gerekir. Eğer kas dokusunda distrofin eksikliği varsa buna bağlı olarak zar bütünlüğü bozulacak ve uzun süreli kasılmalarda dokuda hasar meydana gelecektir. Distrofinin mekanik işlevinin yanı sıra hücreler arası iletişimde zarlar arası sinyal ileti kompleksi olarak da görev yaptığına dair fikirler de ileri sürülmüştür (5).

2.2.5. KLİNİK BULGULAR

2.2.5.1. Duchenne Kas Distrofisi

DMD'li olgular genellikle 3 yaş civarında, hemen daima 6 yaştan önce tanı alırlar. İzole olgularda bulgular genelde aileler tarafından kolay fark edilemez. Aileler genelde çocuklarında gördükleri yürüme ve koşmada zorluk, koşarken sık sık düşme gibi öyküyle doktora başvurur (7,29,65).

Olguların % 25'ine iki yaşın altında, % 50' sine 2-4 yaş arasında, % 75'ine 4-7 yaş arasında, % 99 - % 100'üne 7-9 yaşları arasında tanı konulabilmektedir (29). DMD'de öncelikle kalça kavşağı kasları (iliopsoas, kuadriseps, gluteal kaslar) tutulur. Bu nedenle merdiven çıkmada, oturduğu yerden kalkmada zorlanır, sallanarak yürür ve vücudun ağılık merkezini uygun duruma getirmek için lordozlarını arttırırlar, sonuçta “ördekvari” yürüme gözlenir. 4 yaş civarında yürüme zorluğu dikkati çekse de 4-8 yaş arası çocuğun büyüme hızı hastalığın ilerleme hızını geçer ve bu bir iyileşme gibi algılanarak yanıltıcı olabilir. Baldırda gözlenen, henüz hastalık nedeniyle

kaybedilmemiş kas liflerindeki hipertrofiye, yağ ve bağ dokusundaki artış eşlik eder. Kas kitlesi artmış görünür, ancak bu gerçek hipertrofi değildir. Buna yalancı hipertrofi “psödohipertrofi” denir. En sık baldır kaslarında görülür. Psödohipertrofi bazen erken yaşta dikkati çekebilir. 8 yaşından itibaren hastalığın gerçek hızı kendini göstermeye başlar. Hastalarda “Gowers belirtisi” olarak isimlendirilen, yerden kalkarken ellerinden güç alarak yaptığı doğrulma hareketi gözlenir(9,30,65,68,69). Hasta giderek parmak ucunda yürümeye eğilimli olur ki, bunun sonucunda Achilles tendonunda kontraktür gelişir. Hastalar genellikle 9-11 yaşları arasında yürümeyi, oturduğu yerden kalkmayı, ayakta durmayı desteksiz yapamaz duruma geldikleri için tekerlekli iskemleyle bağlanırlar (7,65). Tekerlekli iskemle bağımlılığı hastalarda skolyoz gelişimine neden olur (9,65). İlerleyici skolyoz solunum işlevinin, solunum kaslarının tutulumundan da önce bozulmasına yol açabilir. Hastalık ilerledikçe omuz kavşağının da tutulduğu fark edilmeye başlar. Bardak tutma, yemek yeme gibi işlevlerde de yardıma ihtiyaç duyabilirler. 16 yaşından sonra hastaların çoğunda kardiyomiyopati bulguları da klinik tabloya eklenir. 18-19 yaşlarında yatağa bağımlılık süreci başlar, bununla birlikte ortaya çıkan komplikasyonlar; solunum işlevinde azalma ve sıklıkla buna eşlik eden bir akciğer enfeksiyonu veya tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, genel durumun giderek bozulmasına yol açar. Genellikle hastalar 20-25 yaşları arasında solunum veya kalp yetmezliğinden kaybedilir (9,65)

DMD'li çocukların zihinsel yetenekleri konusunda yapılan çalışmalarda hastaların %18-20'sinde IQ 75'in altında bulunmuştur (63).

2.2.5.2. Becker Kas Distrofisi

Distrofin genindeki mutasyonların % 10-15'i BMD'ye yol açar. DMD'li olgularda distrofin proteini ya çok düşük düzeyde (yoğunluğu normalin % 3 'ünden az) veya hiç yokken, BMD'li olgularda distrofin var olmasına rağmen işlevini kısmi olarak yerine getirebilir. Bu nedenle de klinik bulgular ve hastalığın gidişatı DMD'ye göre daha hafif seyreder. Hastalığın bulgularının görülme yaşı 5-55 arasındadır (30, 65). Erken yaşta hastalığın tanınması oldukça zordur. Çoğu zaman çocukların hareketten kaçan tembel çocuklar oldukları zannedilir. Aile çocuğun hastalığından habersiz olarak ikinci, bazen üçüncü çocuğa sahip olabilir.

Genelde hastaların şikayeti baldırlarda şişlik veya egzersize bağlı ortaya çıkan, baldır kaslarında ağrı ve kramptir. Kas güçsüzlüğü başlangıç döneminde olmayabilir. Kas kuvvet azlığının ilerlemesi DMD'deki aynı sırayı izler. Üst ekstremitelerin kas gücü uzun süre korunabilir. BMD de ilerleyicidir ancak ilerleme hızı DMD'ye göre daha yavaştır. DMD'li olgular 11-13 yaşlar arasında tekerlekli sandalyeye bağımlı olurken, BMD'li olgular erişkin yaşa kadar yürüyebilirler.

BMD'de kardiyomiyopatinin görülme olasılığı yüksektir. Kas güçsüzlüğü ile orantılı olmayan kalp kası tutulumu olabilir. Bu nedenle şikayeti olmasa da hastalar kardiyolojik açıdan dikkatle incelenmeli, kontrol altında tutulmalıdır (30,63, 65)

BMD'de de DMD deki gibi CK ve LDH düzeyleri yüksektir (normalin 5 katı). IQ normale göre biraz düşük olabilir (DMD'li olgulardan daha hafif) (10).

BMD ölümcül olmayıp, üreme uyumu % 70'e varır. BMD'li olgular evlenebilir ve bütün kızlarına mutant geni geçirerek kızlarından olan erkek torunlarının hasta olma riskini % 50'ye çıkarırlar. Bu nedenle BMD'li olguların büyük bölümü (%85-90) kalıtsaldır, ancak olguların %10'u yeni mutasyon ile oluşur (28,32).

2.2.5.3. Taşıyıcı Kadınlarda DMD/BMD

Mutant Distrofin genini taşıyan kadınlar genelde klinik bulgu vermez. Ancak taşıyıcı kadınların % 8 kadarında hafif, orta veya ağır derecede klinik bulgu görülebilir (9,41). Kas krampları, kas güçsüzlüğü görülebilir. Kas güçsüzlüğü genelde ağır seyretmez ve çoğunlukla asimetriktir. Bulgu vermeyen taşıyıcıların büyük bölümünde, değişik dercelerde kalp tutulumları da görülebilir (65). Klinik bulguların ortaya çıkış yaşı farklılık göstermekle birlikte 10 ila 40 yaşlar arasındadır (41).

Taşıyıcı kadınlarda klinik bulguların ortaya çıkması aşağıdaki mekanizmalarla açıklanmaktadır;

1- *X-inaktivasyonu mekanizması*; Dişi bir zigotta başlangıçta her iki X kromozomu da aktiftir. Fetus gelişiminin erken evrelerinde hücrelerdeki X kromozomlarından birisi (anneden ya da babadan gelen) rastgele biçimde aktivitesini kaybeder. İnaktif olan X kromozomunun replikasyonu, aktif olan X'e kıyasla daha geç

olur. İnterfaz evresindeki dişi hücrelerinde inaktif X kromozomu çekirdek içinde zara bitişik koyu bir nokta şeklinde görülür ve cinsiyet kromatini (Barr cisimciği) olarak adlandırılır. Vücut hücresindeki iki X'ten birinin rastgele inaktivasyonu belirli bir hastalık için taşıyıcı kadınlarda mutant genin, hücrelerin yaklaşık yarısında aktif, öteki yarısında ise inaktif olmasına yol açar (Lyon hipotezi, Mary Lyon 1961,1962). Böylece taşıyıcı bir kadında mutant genin etkisi, hücrelerin ancak % 50'sinde belirebilir. Geri kalan hücrelerin işlevi normaldir. Bu aktivasyonun oranına göre taşıyıcı kadınlardan bazıları hastalık belirtilerini gösterebilir. Taşıyıcı kızlarda görülen asimetrik kas zayıflığı buna bir örnektir(41).

2- *X-otozom translokasyonu*; X kromozomunun herhangi bir otozomal kromozom ile translokasyonu durumunda, inaktivasyon mekanizması seçici olarak otozom kromozomunu korumak amacıyla, translokasyona uğrayan X'i aktif bırakır ve yapısı bozulmamış X'i ise inaktif duruma geçirir. Translokasyonun Xp21.2 bölgesinden geçmesiyle, Distrofin geninde mutasyon olduğu ve DMD fenotipinin açığa çıktığı düşünülmektedir. İkinci bir hipotez mutant genin kromozomda zayıf bir nokta yaratarak translokasyon oluşumunu kolaylaştırdığı şeklindedir. (20,41,45,62,63)

Bir diğer açıklama da; translokasyonun normal X'de meydana geldiği, bu kromozomda madde kaybı olduğundan yapısı korunmuş olan X kromozomu ve mutant Distrofin genini taşıyan diğer X kromozomunun fenotipe yansıdığı şeklindedir. Bu grup olgular her iki X kromozomunda da mutant geni taşıyan gerçek DMD'li kadın olgulardır. X-otozom translokasyonu mevcut olan DMD fenotipine sahip olgular, genin X'in kısa kolunda olduğunun anlaşılmasında ve fiziksel haritalamada önemli rol oynamışlardır (20, 21,63)

3- *45,X genotipi*; Turner sendromlu kız çocuğunun, taşıdığı tek X'te mutasyon varsa, bunu telafi edecek başka bir X kromozomu olmadığı için klinik bulgu gösterir. (47,62,63)

4- *Her iki X kromozomunun da mutant geni içermesi*; Taşıyıcı bir kadınla, hasta (örneğin BMD'li) bir erkeğin evliliğinden doğan kız çocuklarda veya anneden kalıtılan mutant X'e ek olarak babadan gelen X'te yeni mutasyon oluşması, kız çocuğunda klinik bulguların görülmesine neden olur (62).

Bu olaylar teorik olarak mümkün olmasına rağmen, pratikte pek görülmez.

5- *Uniparental disomi*; Uniparental disomi (İzodisomi) mekanizması eş kromozomlardan birinin 2 kopya şeklinde tek bir ebeveynden çocuğa aktarılmasıdır. Yani anne ve babadan ayrı ayrı değil, yalnız anne veya yalnız babanın 2 eş kromozomundan birinin 2 kopya şeklinde çocuğa geçmesidir. Bu mekanizma ile taşıyıcı olan annenin kız çocuğuna mutant geni taşıyan X kromozomunun iki kopya olarak verilmesi sonucu, kız çocukta homozigot mutant X'in bulunması, Duchenne fenotipinin görülmesine yol açabilir. Pratikte çok düşük olan bu olasılık da teorik olarak düşünülebilir. (47,62,63)

2.2.6. HASTALIĞIN TANISI

DMD/BMD tanısı öykü, fizik muayene, laboratuvar testleri esas alınarak yapılmaktadır. Fizik muayene bulgularında; yürümede güçlük, sık düşme, baldır kaslarında yalancı hipertrofi ve Gowers bulgusunun gözlenmesi, laboratuvar testlerinde; serum CK düzeyinin normalin 5-10 kat üstünde olması ve EMG'de kas tutulumu bulguları DMD/BMD'yi düşündürmelidir. Kas biyopsi örneğinin immünohistokimyasal incelemesinde distrofin yokluğu ve DNA analizi ile delesyonun gösterilmesi DMD/BMD tanısını kesinleştirir (44).

2.2.6.1. Tanıda Kullanılan Yöntemler

a) SERUM KREATİN KİNAZ (CK) düzeyleri yüksektir. Bu yükseklik, hasta, taşıyıcı ve normal kişilerde farklı değerler gösterir. Hastalığın erken evresinde normalin 10 katı kadardır. CK düzeyinin yüksek bulunması iki şekilde açıklanmaktadır:

1- Enzim proteinleri nekrotik kas liflerinden veya nekroz oluşmadan önce sarkolemmmanın fiziksel zedelenmesi sonucu dışarı sızar.

2- Hücre içi büyük moleküllerin içeriğini düzenleyen hücre zarlarının normal işlevlerini aksatan, bozan bir anomali vardır (29).

b) ELEKTROMİYOGRAFİ'de (EMG) kas tutulumu (motor ünit potansiyelleri kısa süreli, düşük amplitüdü polifaziktir) hemen her hastada gözlenir.(30,65,78)

c) KAS ULTRASONOGRAFİSİ VE BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (BT) incelemeleri ile yoğunluk değişikliklerine göre kaslardaki nekrotik bölgeler saptanabilmekte ve erişilmesi güç olan, derindeki kaslar hakkında bilgi edinilebilmektedir (78) .

d) KAS BİYOPSİSİ: Klinik bulguların varlığında biyopsi sonuçları tanıya varmada destekleyici bir anlam taşır. Biyopsi için uygun kaslar, üst bacak kaslarıdır (quadriceps femoris kasının vastus lateralis kolu). Çünkü bu kaslar hemen her zaman sistemik hastalığı yansıtan histopatolojileri taşıyan proksimal kaslardır. Hastaların kas biyopsilerindeki morfolojik değişiklikler klinik bulgular belirginleşmeden mevcut olup, erken bebeklikte bile gözlenir. Başlangıçta bağ dokusu artışı vardır. Her bir kas lifi bağ dokusu ile sarılmış görünümündedir. Olay ilerledikçe bağ dokusu artar ve yağ dokusu da kas lifleri arasında yer alır (19,38). Kas liflerinin çaplarında düzensizlik önemli bir bulgu olup, hem atrofi hem de hipertrofi vardır. Normalde periferde bulunması gereken hücre çekirdeğinin merkeze kayması özgün olmayan bir bulgudur. Kas dokusunda dejeneratif ve rejeneratif değişiklikler bütün kas distrofi türlerinde görülür. Her zaman için dejenerasyon daha fazladır. Dejeneratif sahalar fokal, soluk alanlar olarak başlar ve ilerleme gösterir. Bir sonraki evre hiyalinizasyon ve nekrozdur. Burada miyofibrillerin yaplanması bozulur, çekirdek kromatin kaybına uğrayarak piknotik hale gelir. Nekroz ile birlikte mononükleer hücreler gelerek, nekrotik lifleri fagosite eder. Boşalan hücrelerin yerini bağ dokusu alır (19, 65).

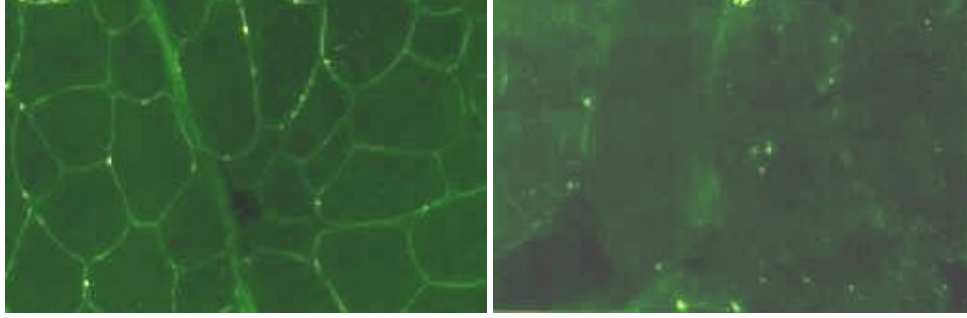
e) KAS BİYOPSİSİNDE DİSTROFİN TAYİNİ ilk kez Hoffman ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyalarla kas biyopsi örneğinde distrofin proteininin yokluğunu göstermek, DMD'nin tanısını kesinleştirmek için kullanılır (Şekil 3 B) (7,30,42,53,65,77). Gen delesyonunun gösterilemediği olgularda, kas immünohistokimyası distrofin varlığı ya da yokluğunu belirleme açısından değerlidir. Delesyon belirlenmiş de olsa hastalık gidişatının belirlenmesi amacıyla da immünohistokimyasal inceleme yapılabilir. Distrofinin bulunduğu durumlarda klinik, kas distrofisiyle uyumluysa, distrofinin kalitesini saptamak için Western Blot testi uygulanır. Bu inceleme BMD tanısının konmasında yararlıdır (49).

Şekil 3 A. Normal kasta pozitif boyanma

B. DMD'li hastada negatif boyanma (65 no'lu kaynaktan alınmıştır)

A

B



f) DNA ANALİZİ;

1- Dolaylı analiz yöntemi (RFLP ve STR analizleri): Hastalığa yol açan mutasyonların doğrudan tanınmadığı durumlarda, hastalıkla birlikte kalıtılan genetik belirteçlerin analiz edilmesi ve değişmiş genin o ailedeki kişilerde izlenmesi amacı ile yapılır. Polimorfizm olarak tanımlanan DNA baz dizileri farklılıkları, zamanı tam bilinmeyen ama binlerce yıl denebilecek kadar uzun bir süre önce oluşmuş ve halen oluşmakta olan mutasyonlar sonucu gelişir. Bu farklılıklar restriksiyon enzimlerinin kesme bölgelerinde oldukları zaman, kolayca tanınır ve restriksiyon enzimi kesimiyle elde edilen parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Enzyme Fragment Length Polymorfizm-RFLP) diye adlandırılır. Bu değişiklikler kişinin fenotipinde herhangi bir bozukluğa yol açmaz ancak DNA'yı kesen çeşitli restriksiyon enzimlerinin kesme bölgelerini değiştirerek, kişiler arası farklı uzunlukta kesim parçaları oluşturur (26).

DMD'de RFLP analizinin temeli, allellerdeki DNA baz dizisi farklılıklarından yararlanılarak, iki eş kromozomun birbirinden ayırt edilmesi ve hasta olgunun annesinden kalıtıldığı X kromozomunun ailedeki izinin sürülmesine dayanır (26).

RFLP analizinde iki kromozom birbirinden gen içinde ya da gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması (bilgilendirici = informatif) ya da bulunmaması (bilgilendirici olmayan = non-informatif) ile ayrılır. Çevresel kan örneklerindeki lenfositlerden elde edilen DNA dört ya da altı nukleotitlik dizileri tanıyan restriksiyon enzimleriyle parçalanır. Daha sonra jel elektroforezi ile boylarına göre ayrılan DNA parçaları, Southern-blot yöntemi ile nitrosellüloz tabakaya geçirilir ve

melezlemeye hazır hale getirilir. Radyoaktif proba işaretlenen DNA parçaları otoradyogramda okunur. Analizin güvenilir olabilmesi için öncelikle mutasyon ile belirteç arasında yakın bağlantı (linkage) olması gerekmektedir. Böylece rekombinasyon olasılığı azalır (gen içi belirteçler tercih edilmelidir). Başka bir koşul, ailenin RFLP ile bilgilendirici olması ve bunların hem mutasyon, hem belirteç için heterozigot bilgilendirici olmasıdır (26).

Uygulama zorluğu ve bilgilendirici bilgi sağlama yönünden günümüzde yetersiz kalan bu yöntem yerini, DNA içersinde bulunan, 2-10 baz tekrarlarının (Short Tandem Repeats = STR) analizine bırakmıştır. STR belirteçlerinin analizi ile kalıtılan gen daha iyi takip edilebilmekte ve istatistiksel açıdan daha anlamlı bağlantı analizleri yapılabilmektedir. (15,26)

2- Doğrudan mutasyon analizi; DMD/BMD mutasyonlarının % 60-65'i distrofini kodlayan gen bölgesinde delesyon olarak görüldüğünden, hastadaki delesyonların tanımında delesyon bölgelerini çoğaltarak bu bölgelerdeki değişimleri tanımlayabilen çoklu gen amplifikasyonu yöntemi kullanılmaktadır. Multipleks I ve Multipleks II olarak adlandırılan iki çoklu amplifikasyon sisteminden her biri Distrofin geninin farklı eksonlarını taramaktadır. Bu eksonlar delesyonların sıklıkla rastlandığı hot spot bölgelerine uyan ekson 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 ve promotor (PM) bölgelerdir. 18 ekson ve PM bölgesi çoklu PZR yöntemi ile ayrı primerler kullanarak çoğaltılabilmekte ve ürünler jel elektroforezi ile doğrudan incelenmektedir (10). Normal kişilerde tüm parçalar mevcutken, hastalarda herhangi bir parçanın saptanmaması ya da çoğaltılan bölgenin boyunda gözlenen bir kısalık, incelenen gen bölgesinde delesyon olduğunu göstermektedir. Mutipleks I ve II'nin birlikte kullanım amacı yalnız birinin kullanımı ile tanınamayan delesyonların tespitidir. Bu sayede gendeki delesyonların % 98'i saptanabilmektedir (26,31,32,44,60,73).

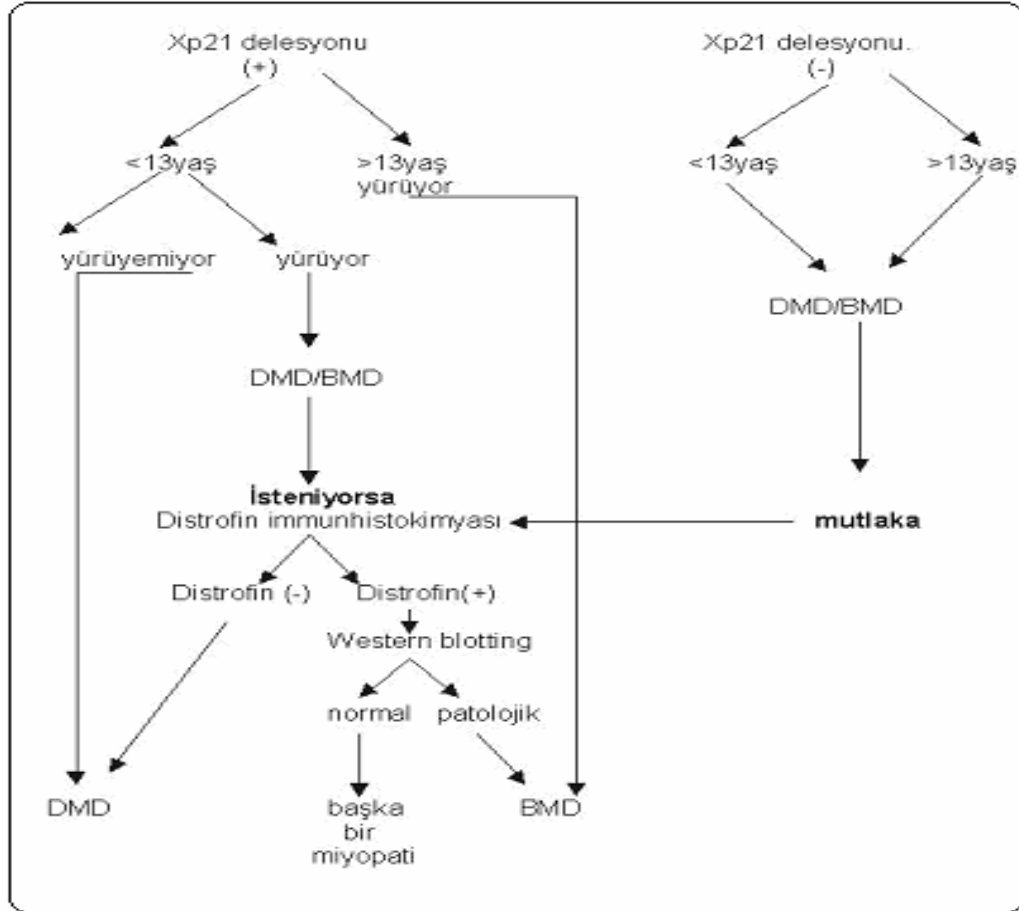
Tanıda çoklu PZR yönteminin yanı sıra, bazı laboratuvarlar, moleküler sitogenetik yöntemi olan floresan in-situ hibridizasyonunu (FISH), hem hastalığın tanısında hem de taşıyıcıların belirlenmesinde kullanmışlardır (56,72). FISH yöntemi, çoklu PZR'de kullanılan eksonlara ait proplar ve Distrofin geni dışında X kromozomuna ait bir kontrol probu kullanarak, metafaz kromozomlarında ilgili eksona ait sinyallerin değerlendirilmesi mantığına dayanır. Eğer hastada delesyon varsa kontrol probuna ait sinyal görülürken, delesyona uğramış Distrofin geni eksonuna birine ait

olan sinyal görülmez. Taşıyıcı kadınlarda iki X kromozom kontrol probunun sinyali ile delesyonun olduğu eksona probuna ait bir sinyal gözlenir. Yöntem, laboratuvar koşullarından yüksek oranda etkilenebildiği, hücre kültürü gerektiği için uzun sürmesi, eğer bir ekson delesyonu varsa, o eksona ait prob sinyallerinin hemen her zaman tam olarak görülememesi ve maliyetinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı rutinde yer almamaktadır.

Yeni bir yöntem olan MLPA'nın (multiplex ligation dependent probe amplification) gen kopya sayısı değişikliklerin belirlenmesinde kullanılabilecek bir gen dozaj testidir. Yöntem, genin eksonlarına özgü prob hibridizasyonunun ardından yapılan PZR yöntemi ile çoğaltılan bölgelerin karşılaştırmalı olarak kantitasyonunu temel alır. Bu yöntemin avantajı eş zamanlı 45'e yakın hedef dizi amplifikasyonu ile gen delesyon ve duplikasyonlarının tespitini mümkün kılmasıdır. DMD'li hasta gruplarında yapılan çalışmalarda Distrofin genine ait 79 eksonun, MLPA yöntemi ile incelenebileceği bildirilmiştir. Bu sayede delesyon tespitinin yanı sıra belirlenmesi daha güç olan gen duplikasyonları ve kadınlarda taşıyıcılık belirlenmesinin de mümkün olabileceği belirtilmiştir.(32,46,53)

Yukarıda tanımlanan tanı yöntemleri, klinikte belirli bir sırayla uygulanır. Şekil 4'de belirtilen tanı akış şemasına göre, DMD/BMD'den şüphelenilen erkek çocuklara öncelikle direkt mutasyon analizi (delesyon incelemesi) yapılmalıdır (65). Eğer delesyon saptanmadıysa mutlaka kas biyopsi örneğinde distrofin immünohistokimyasal incelemesi uygulanmalıdır.

Şekil 4. DMD/BMD düşünülen hastada tanı akış şeması (65)



2.2.7.HASTALIĞIN ÖNLENMESİ ve GENETİK DANIŞMA

Olguların erken tanısı, taşıyıcıların belirlenmesi, uygun genetik danışma ve doğum öncesi tanı ile hastalığın önlenmesi mümkündür.

DMD, çocuk hekimleri, tıbbi genetik doktorları ve nörologlar için genetik danışma açısından problemleri bir hastalıktır. Aslında X'e bağlı çekinik tüm hastalıklar için genetik danışma aynı zorluktadır (36). Özellikle, etkilenmiş bir çocukla doktora başvuran ailelerde, çocuğun anne tarafından kadın akrabalarında da taşıyıcılık olasılığını, genetik danışmanların göz ardı etmemesi gerekir. Bu nedenle DMD genetik danışmasındaki en önemli basamak, hastanın kesin tanısının konmasından sonra

taşıyıcıların belirlenmesidir. DMD'li birey bulunan ailelerdeki kadınların taşıyıcı olup olmadıklarının, olanaklı ise üreme çağından önce bilinmesi önemlidir. Ailesinde DMD veya BMD'li bir bireyin bulunduğu kadınların taşıyıcılık durumlarının belirlenmesi için başlıca üç yöntem uygulanmaktadır.

I- Aile ağacı analizleri (anne tarafındaki sağlıklı ve hasta erkek belirlenmesi),

II- Taşıyıcılık riski olan tüm kadınlarda serum CK düzeyine bakılması,

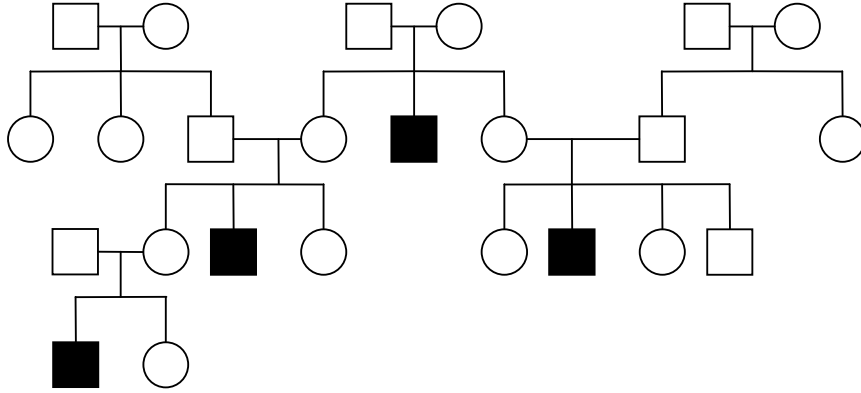
III- DNA testleri ile taşıyıcılık tayini.

DMD'de doğru bir genetik danışma için indeks olgunun kesin tanısı ve kadın akrabalarda taşıyıcılık riskinin olabildiğince doğru hesaplanması için aile ağacı ile ilgili bilgilerin ve taşıyıcılık testlerinin güvenilir olması gerekir. Aile ağacı incelemeleri ile riskli ailelerdeki kadınlar iki gruba ayrılır ;

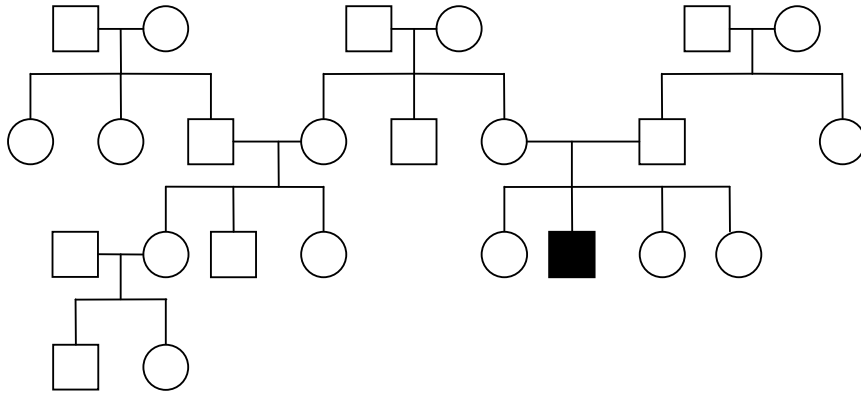
1- Kesin Taşıyıcılar : Hasta bir oğlu ve anne tarafındaki akrabalarında ikinci bir DMD'li hasta olgu olan kadınları kapsar (en az iki kuşakta hasta erkek) (Şekil 5).

2- Olası Taşıyıcılar : Bir veya birden fazla hasta erkek çocuğu olan anneler, ve ailede anne tarafından hasta erkek çocuğa sahip olmayan kadın akrabaları (hastanın kız kardeşi, anneanesi, teyzesi ve teyze kızı) kapsar (Şekil 6A ve B). Annenin birden fazla etkilenmiş erkek çocuğu da olsa hastalık tek kuşakta sınırlı olduğu için anneler kesin taşıyıcı olarak tanımlanamazlar. Bu kadınların bir bölümü (% 5-15), mutasyonu somatik hücrelerinde taşımadığı halde eşey hücrelerinde taşıyabilmektedir. Bu olay germinal mozaisizm olarak adlandırılır (62) ve anneye yaklaşık % 90 oranında taşıyıcılık ön riski verir. Fetus oluşumunun erken mitotik bölünmeler evresinde, öncü hücrelerde ya da eşey hücrelerinde mutasyonlar olabilir ve o hücreden oluşan tüm klonal hücrelerde bu mutasyon devam eder. Sonuçta öteki somatik hücreler normal iken gametlerin önemli bir bölümünde mutasyon taşınabilir ve bu nedenle annenin CK enzim düzeyi normaldir distrofin ile taşıyıcılığı saptanamaz ve DNA analizinde normal bulunur.

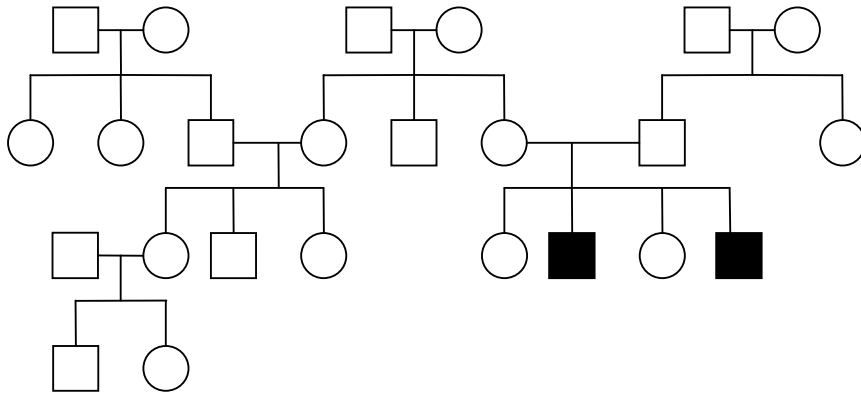
Şekil 5. Kesin Taşıyıcılık (Ailesel form); Birden fazla kuşakta etkilenmiş birey.



Şekil 6A. Olası Taşıyıcılık; Yalnız bir etkilenmiş birey (İzole Olgu)



Şekil 6B. Olası Taşıyıcılık; bir ailede birden fazla etkilenmiş birey



Genetik danışmada öncelikle aileye çocuğun hastalığı ve doğal gidişatı hakkında bilgi verilir, daha sonra kalıtım modeli anlatılır. Annenin taşıyıcı olma riski öncelikle aile ağacı analizine göre belirlenir. Kesin taşıyıcı olarak kabul edilen anne adayının erkek çocuklarının % 50'sinin hasta olma, kız çocuklarının da %50'sinin kendi gibi taşıyıcı olma riskinin bulunduğu anlatılır. Aile ağacına göre olası taşıyıcı grubunda iken, CK düzeyi yüksek bulunan kadınlar kesin taşıyıcı grubuna dahil edilir. Olası taşıyıcılar için 2/3 ile 1/4 arası değişen başlangıç riskleri, serum CK düzeyleri ve aile ağacı analizi birleştirilerek Bayesian yöntemiyle hasta çocuk sahibi olma riskleri hesaplanır. Kadınların kendi taşıyıcılık riskleri ile hasta çocuğa sahip olma riski arasındaki farkı anlamaları sağlanmalıdır. Ayrıca bağlantı analizi çalışmaları da yapılarak taşıyıcılık riskleri tekrar değerlendirilir. Ancak bu testler uzun zaman alabilir. Testler tamamlandıktan sonra çocuk planlayan aileye tüm bu bilgilerin ışığında riskleri, doğum öncesi tanı olanakları ve sonuçların güvenilirliği anlatılır ve aileye kararları doğrultusunda yardımcı olunur.

Genetik danışmada doğum öncesi tanı uygulamalarının temel amacı, söz konusu hastalık için yüksek risk nedeniyle çocuk sahibi olmaktan kaçınan ailelere sağlıklı bir çocuk için güvence verebilmektir. Ailesinde DMD'li olgu bulunan taşıyıcılık riski yüksek kadınlara, moleküler biyoloji alanlarındaki gelişmelerden önce amniosentez (AS) veya koryon villus biyopsisi (CVS) yöntemi ile fetal cinsiyet tayini, tek “doğum öncesi tanı” olanağı olarak sunulmaktaydı. DNA tekniklerinin gelişmesiyle hasta olguda delesyon saptanan ailelerde, riskli kadınlara % 100 doğrulukla doğum öncesi tanı verilebilmekte, delesyon saptanamayan olguların ailelerinde ise bağlantı analizleri ile taşıyıcı kadında bilgilendirici belirteçler bulunursa, rekombinasyon riski dikkate alınarak, bilgilendirici bulunursa % 95 güvenilirlikle sonuç verilebilmektedir. Doğum öncesi tanı yöntemi olarak taşıyıcılık riski % 2'nin altında olanlarda amniosentez, daha yüksek olanlarda ise erken sonuç veren CVS önerilmektedir. Amniosentez yöntemi 14. gebelik haftasından itibaren uygulanabilir. Bu yöntemle elde edilen 15-20 ml sıvıda fetusa ait hücrelerden fetal karyotip analiziyle cinsiyet tayini, ve moleküler genetik testler yapılabilir. 10. gebelik haftasından sonra uygulanabilen transabdominal koryon villus aspirasyonu ile elde edilen dokularda da aynı testler yapılabilir. Doğum öncesi tanı sonucu, fetusun hasta olduğu kesinleşirse yada hasta olma riski artmışsa, konu anne ve baba adayı ile tartışılır ve ailenin isteği doğrultusunda gebelik sona erdirilerek (24. gebelik haftasından önce ise) aileye psikolojik destek verilir.

2.2.8. TEDAVİ

Her ne kadar günümüzde hastalığın etkin bir tedavisi yoksa da tedaviye yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

Tedavi bugünün şartlarında halen koruyucu yöndedir. Bunlar aktif egzersiz, fizik tedavi, steroidlerin kullanımını içeren ilaç tedavisi ve kontraktür geliştirse cerrahi tedavidir. Hepsinde amaç kas gücünün kaybının önlemesi ya da geciktirilmesidir(11,23,78)

Miyoblast transferi, hayvanlarda yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar verirken insanlarda aynı oranda iyi sonuçlar elde edilememiştir(11,23,39,59).

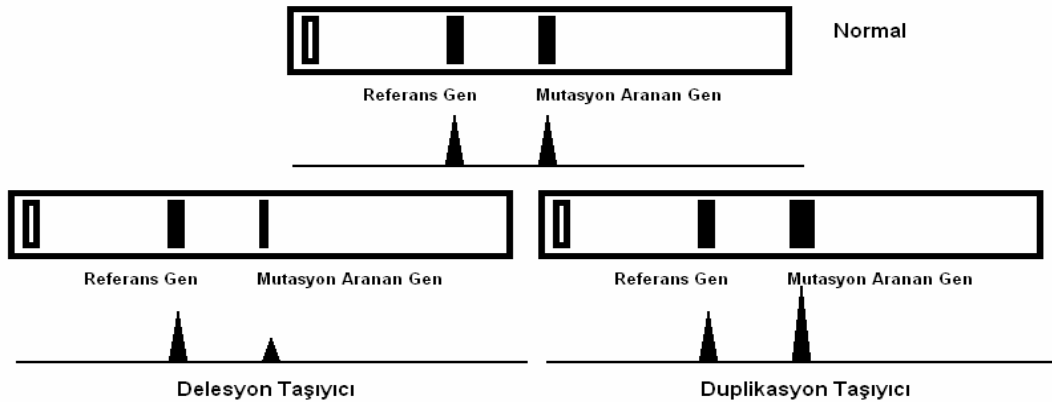
Hastalığın esas tedavisi gen tedavisi olacaktır. Bunun için de uzun yıllardır çalışmalar sürdürülmektedir. Amaç tüm kalıtsal hastalıklarda olduğu gibi, sağlam genin, bir vektör aracılığı ile hasta bireye aktarılmasıdır. En yaygın gen aktarım yöntemi, retroviral DNA'nın vektör olarak kullanılmasıdır. Virüsten 3 gen çıkarılır ve yerine klonlanmış insan geni yerleştirilir. Klonlanmış geni taşıyan virüs, hücre çekirdeğine geçer ve kromozomun yapısına katılır. Sonuçta enfekte olan hücrelerde yabancı gen (normal allel) hücre genomunun bir parçası haline gelip ifade edilerek eksik proteinin oluşumunun sağlanacağı düşünülmektedir. Ancak bu yöntemin sıkıntılı yanı virüslerin yol açacağı immünolojik ve toksik yan etkilerdir. Bunun için de her geçen gün tedavide kullanılacak yeni vektörler geliştirilmektedir.(23,59,66)

Son 15 yıl içinde DMD gen tedavisi çalışmaları yoğunluk kazanmıştır. Günümüzde Distrofin geninin 3,5kb'dan 2,4Mb'a kadar büyüklükteki parçalarının belirgin bir işlev kaybı olmaksızın aktarımı mümkün olmaktadır. Bu aktarım için artık sayısız vektörün kullanılabildiği ve tedavinin kas dokusunda olumlu etkilerinin yanısıra, immünolojik ve toksik yan etkilerin azaldığı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. (23)

2.3. KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

DNA'da meydana gelen nokta mutasyonları ve küçük insersiyon ya da delesyonları belirleyebilen oturmuş yöntemler olmasına karşın, genomik duplikasyon veya delesyonların saptanması daha güç olabilmektedir. PZR, mutasyon tarama yöntemlerinin genelinde ilk basamakta kullanılır. Bu yöntemlerin çoğu niceliksel olmaktan çok nitelikseldir. PZR tabanlı gen dozaj testleri kesin ya da göreceli niceliksel sonuçlar vermektedir. Kesin niceliksel sonuçlara ulaşabilmek için, uygulanan testte dış standartlar ile örnek sonucunun kıyaslanması yöntemi kullanılır. Karşılaştırma sonucunda örnekte aranan miktar kesin olarak belirlenir (molar, nanogram vb olarak). Göreceli niceliksel testlerde ise örneklere ait sonuçlar, iki parametrenin birbirlerine göre durumlarının karşılaştırılması ile elde edilir. Karşılaştırma için kullanılan parametrelerden ilki mutasyon aranan gene (ya da eksona) ait veri, ikincisi ise referans alınan gene (ya da eksona) ait veridir. Gerekli veriler, genellikle mutasyon aranan genle referans genin PZR ile eş zamanlı çoğaltılması, sonrasında elektroforez ile ürünlerin ayrıştırılarak bant yoğunluklarının hesaplanması ile elde edilir. Bant yoğunluk oranları mutasyon taşımayan (normal) örneklerin hepsinde teorik olarak aynı olmalıdır. Delesyon mutasyonlarında örnek bant yoğunluğu, kontrolün yarısıdır. Duplikasyon mutasyonlarında ise iki katı olur. Bu sonuçların normal toplum dağılımına uygunluğuna göre örneğin sonucu normal, delesyon veya duplikasyon tipi mutasyon olarak değerlendirilir (26) (Şekil 7)

Şekil 7 : Gen dozaj analizi sonuçları



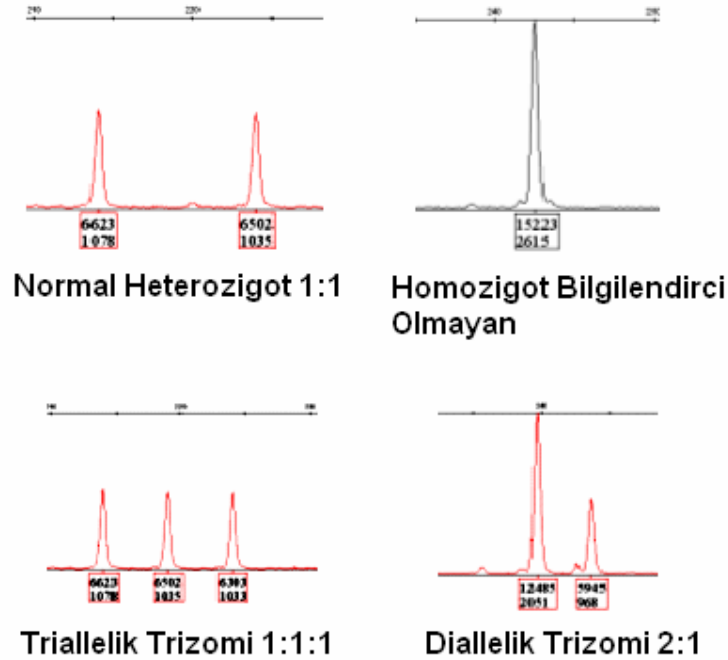
PZR sonrası, miktar karşılaştırması için veriler değişik yollar ile elde edilebilir. Klasik olarak, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezini takiben, etidyum bromür boyaması ile ya da otoradyografi sonucu elde edilen bant yoğunluklarının karşılaştırması gibi yöntemler kullanılabilir (26). Kantitatif floresan PZR yönteminde ise veriler floresan ışımaya değerlerinin karşılaştırması ile yapılır. Bu amaçla kullanılan primerler floresan boyalar ile işaretlenir. PZR sonucu ürünler florofor işaret taşırlar. Bu işaretler, floresanı algılayabilen bir optik okuyucuya sahip genetik analiz cihazlarıyla saptanabilir. Kapiler elektroforezi yapan genetik analiz cihazları, baz çifti uzunluğuna göre sıralanan DNA dizilerini, ekrana tepeler şeklinde yansıtır. Elde edilen görüntüye “elektroforegram “ denir. Elektroforegramda her tepenin kapladığı alanla ilgili bilgiler özel yazılımlarla değerlendirilerek analiz yapılır (1,17,26,58).

1991’de Lubin ve ark. X kromozomuna özgü bir belirteci, referans bir belirteçle beraber çoğaltmış ve elde edilen ürünlerin oranlarının kontrol ve bilinmeyen örneklerle kıyaslanması ile gerçekleştirilen kantitatif PZR stratejisini kesin bir gen dozaj analizi için kullanmıştır. Aynı yıl yine Lubin ve Mansfield, trizomi 21 ve 18 tanısı için bu yöntemi kullanmayı denemişler ama, kesin sonuçlar elde edilebilmesi için daha fazla karşılaştırmanın yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (3,57,58). 1993’te Mansfield bu kromozom dozaj belirleme tekniğini trizomi 21 ve 18 için geliştirmiştir. Yine bu dönemde Mansfield bu yöntemin, delesyon ve duplikasyon tipi mutasyon belirlenmesinde uygulamayı düşünerek, Lesch-Nyhan Sendromunun tanısı ve taşıyıcılığın belirlenmesinde kullanmıştır (57). Gen dozaj testleri günümüzde sık görülen sayısal kromozom anomalilerinin doğum öncesi tanısında, alfa talasemide görülen büyük delesyonların belirlenmesinde ve ailesel meme kanseri ile ailesel nonpolipozis koli gibi hastalıklardaki genetik değişimlerin araştırmalarında kullanılmaktadır (3,26).

Gen dozaj belirleme yöntemleri arasında yer alan kantitatif floresan PZR yöntemi günümüzde tanısal amaçlı olarak, yalnız doğum öncesi tanıda en sık görülen 21, 13, 18, X ve Y kromozomlarının sayısal anomalilerini belirlemede kullanılır (1,3,14,16,17,18,57). Bunun için yukarıda sayılan kromozomlar üzerinde yer alan STR’lere özgü floresan işaretli primerler kullanılır. Bu primerlerle yapılan tek aşamalı çoklu PZR’den elde edilen ürünler otomatize bir genetik analiz cihazında incelenir. İdeal bir elektroforegramda eş kromozomlara ait 2 tepe görülür. Ancak akraba evliliği

gibi durumlarda STR'ler eş uzunlukta olabileceği için tek bir tepe şeklinde görülür. Eğer kromozomdan 3 kopya varsa (trizomi), elektroforegram görüntüsü yan yana eş yükseklikte 3 tepe ya da yan yana biri diğerinin 2 katı yükseklikte olan 2 tepe görülür. (Şekil 8)

Şekil 8 : Trizomilerde QF-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.



Bu yöntemin, özellikle ilgilenilen DNA dizlerinin kopya sayısına yönelik sonuç vermesi nedeni ile delesyon-insersiyon tipi mutasyon saptamalarında klasik çoklu PZR'den ve gerçek zamanlı PZR'den daha duyarlı olduğu için kullanılabileceği düşünülmektedir (26).

Delesyon tipi mutasyonların sık görüldüğü DMD/BMD'li hastaların tanısında, bu yöntemle delesyonun en sık görüldüğü eksonların varlığı ve yokluğu, ilgili eksona ait tepenin elektroforegramda görülüp görülmemesine göre belirlenebilir. Yöntemin düşünülen avantajı, delesyon taşıyıcısı kadınlarda ekson kopya sayısının belirlenmesini de sağlayabilecek olmasıdır. Normal kadınlarda Distrofin genine ait eksonlar 2 kopyadır, ancak taşıyıcıların delesyona uğrayan eksonları tek kopyadır. Bu nedenle taşıyıcılar belirlenirken, delesyona uğradığı düşünülen eksonların verileri normal kadınlara ait elektroforegram verileriyle karşılaştırılması sonucu gen dozaj analizi yapılmalıdır.

Tezin yazım döneminde (2008) Ashton ve arkadaşları QF-PCR yöntemiyle DMD/BMD tanısında tüm eksonların incelenmesine ve eş zamanlı nokta mutasyonlarının da belirlenmesine yönelik yürüttükleri projenin sonuçlarını yayınladılar. Yayında yöntemin DMD/BMD tanısında kullanılabilir hızlı, güvenilir olduğunu belirtmiş ve benzer avantajlarla taşıyıcılık tanısında da kullanılabilirliğini önermişlerdir (3)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. HASTA ÖRNEKLERİ

Olgular İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda klinik olarak tanısı konmuş hastalarla, çeşitli genetik tanı merkezlerinde moleküler yöntemlerle Distrofin geninde mutasyonun belirlendiği hastalar ve hastaların anne, kız kardeş ve anne tarafından kadın akrabalarından seçildi. 24 aileden, 23 DMD tanılı olgu 24 anne 2 kız kardeş, 2 teyze kızı olmak üzere toplam 51 birey ve 60 adet sağlıklı kadın bireyin kan örnekleri EDTA'lı tüplerde, onaylanmış rızaları alınarak toplandı. 24 ailenin 8'inde olgular izoleydi. DNA eldesi yapılanaya kadar -20 °C'de saklandı. Hasta listesi Tablo 2'de verilmiştir. Çalışmanın, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D'de yapılması planlanmıştı. Anabilim dalının, rutin iş yükü ve cihaz arızaları nedeni ile genetik analiz cihazının kullanımı mümkün olmadı ve anabilim dalı tarafından servis verilen firmaya (GENOMED A.Ş.) yönlendirilerek, firmanın sağladığı olanaklarla dış laboratuvarların (Firma ve Metropolitan Hastanesi) genetik analiz cihazları kullanılarak tez çalışması tamamlandı.

Tablo 2. Çalışmadaki Aileler

Aile No	Daha Önce Aldığı Tanı	Örnek No	Örnek
1	8-50 arası ekson delesyonu	1	Anneye ait DNA
2	47-48 arası ekson delesyonu	2	Hastanın DNA'sı
		3	Anneye ait DNA
		4	Kızkardeşe ait DNA
		5	Teyze Kızına ait DNA
3	3-6 arası ekson delesyonu	6	Hastanın DNA'sı
		7	Anneye ait DNA
4	50. ekson delesyonu	8	Hastanın DNA'sı
		9	Anneye ait DNA
		10	Kızkardeşe ait DNA
5	45-50 arası ekson delesyonu	11	Hastanın DNA'sı
		12	Anneye ait DNA
6	Promoter delesyonu	13	Hastanın DNA'sı
		14	Anneye ait DNA
		15	Teyze Kızına ait DNA
7	3-19 arası ekson delesyonu	16	Hastanın DNA'sı
		17	Anneye ait DNA

Tablo 2. Çalışmadaki Aileler (Devamı)			
8	45-47 arası ekson delesyonu	18	Hastanın DNA'sı
		19	Anneye ait DNA
9	45-50 arası ekson delesyonu	20	Hastanın DNA'sı
		21	Anneye ait DNA
10	47-52 arası ekson delesyonu	22	Hastanın DNA'sı
		23	Anneye ait DNA
11	45. ekson delesyonu	24	Hastanın DNA'sı
		25	Anneye ait DNA
12	50. ekson delesyonu	26	Hastanın DNA'sı
		27	Anneye ait DNA
13	45. ekson delesyonu	28	Hastanın DNA'sı
		29	Anneye ait DNA
14	4-8 arası ekson delesyonu	30	Hastanın DNA'sı
		31	Anneye ait DNA
15	47-52 arası ekson delesyonu	32	Hastanın DNA'sı
		33	Anneye ait DNA
16	50. ekson delesyonu	34	Hastanın DNA'sı
		35	Anneye ait DNA
17	45-50 arası ekson delesyonu	36	Hastanın DNA'sı
		37	Anneye ait DNA
18	49-50 arası ekson delesyonu	38	Hastanın DNA'sı
		39	Anneye ait DNA
19	50. ekson delesyonu	40	Hastanın DNA'sı
		41	Anneye ait DNA
20	8-12 arası ekson delesyonu	42	Hastanın DNA'sı
		43	Anneye ait DNA
21	45-50 arası ekson delesyonu	44	Hastanın DNA'sı
		45	Anneye ait DNA
22	8-12 arası ekson delesyonu	46	Hastanın DNA'sı
		47	Anneye ait DNA
23	13. ekson delesyonu	48	Hastanın DNA'sı
		49	Anneye ait DNA
24	48. ekson delesyonu	50	Hastanın DNA'sı
		51	Anneye ait DNA

Hasta Onam Formu

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER GENETİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ
OLUR FORMU *

Proje Adı: “Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile Duchenne Kas Distrofisi taşıyıcılarının saptanması ”

Hastalık adı: DUCHENNE KAS DİSTROFİSİ

Tarih:

Bu araştırma, kalıtsal bir hastalığı bulunan hastalar ile ailelerini ilgilendiren bir çalışmadır. Böylesi bir çalışmaya katılma kararı vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Aşağıdaki **Moleküler Genetik Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Onay Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı : Araştırmanın amacı yukarıda belirtilen genetik hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir .

Hastalığa neden olan gen ve genlerin tanımlanabilmesi amacı ile yapılacak analizler için sizden kan örnekleri almamız gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır.

2. Olası riskler ve faydalar :

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Sizde, hastalığa neden olan gen mutasyonunun taşıyıcılık durumunu saptadığımızda, bulgularımızı istediğiniz takdirde size bildireceğiz. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Çocuklarla ilgili açıklamalar: Çalışmalarımıza daha önceden moleküler yöntemlerle kesin tanı almış çocuklar dahil edileceğinden yapılacak araştırmada onlar ile ilgili yeni ya da farklı sonuçlar elde edilmeyecektir. Çocukları çalışmamıza dahil etmemizin nedeni uygulanacak yöntemin duyarlılığını belirlemek olacaktır. Bu açıklamalar doğrultusunda çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar :Bu çalışmanın esas amacı saptanan genetik hastalığa neden olan veya ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik faktörlerin düzeyini öğrenmektir. Biz bu aşamada size veya çocuğunuza doğrudan yada dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte bu hastalığa sahip bireylerin ailelerinin diğer fertleri ve de diğer hastalara ve hasta yakınlarına daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

(Doktor Adı)

hastaya,

(Aile adı)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :

Doktorun imzası:

İzin :

Yukarıda tanımlanan araştırmanın uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailedeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

Adı Soyadı

Doğum tarih

İmza

(Ebeveyn)

Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----
 Aile üyesi -----

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

3.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Mineral yağ (Sigma-Aldrich, A.B.D.)
 Primerler işaretli ve işaretli (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Almanya)
 Dnaz-RNaz İçermeyen Su (Merck, A.B.D.)
 10x Go*STR Buffer (Promega, İngiltere)
 Taq DNA Polimeraz AmpliTaqGold (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
 HiDi Formamide (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
 Gene Scan Tamra 500 Size Standart (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
 Gene Scan ROX 500 Size Standart (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
 Performace Optimized Polimer 4 (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)

3.1.3.KULLANILAN SARF MALZEMELERİ

EDTA'lı Kan Tüpü (Becton and Dickinson (BD))
 Kapiler 36 cm 50 µm iç çaplı (AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
 Pipet Uçları (Değişik Hacimler için) (Gilson, Inc., A.B.D.)

1.5 ml'lik ependrof tp	(Gilson, Inc., A.B.D.)
310 Sample Tubes	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
310 Sample Tubes Septa	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
96 Well Plate	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
96 Well Plate Septa	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
0.2 ml PZR Tp	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)

3.1.4.KULLANILAN KİTLER

Instagene Matrix Kiti, Bio-Rad	(InstaGene Matrix, 20 ml Cat No:732-6030, A.B.D.)
Quantifiler Kiti	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)

3.1.5.KULLANILAN CİHAZLAR

Mikrosantrifj	(Biofuge Stratos, Heraeus, Almanya)
-20, +4 Soğutucu	(Bosh, Almanya)
Isı Blokları	(Gen Probe, San Diego, A.B.D.)
Pipet Seti (10-100-100 µl)	(Eppendorf, Almanya)
Vorteks	(Combispin, Biosan, Litvanya)
PZR Cihazı	(9700, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	(7000SDS, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
Genetik Analiz Cihazı	(ABI 310GA, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
UV Spektrofotometre	(Biotech photometer UV1101, WPA, İngiltere)

3.1.6.KULLANILAN YAZILIMLAR

Primer Express Software v3.0 Programı	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
BLAST Programı	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)
GeneMapper Software 4.0 Programı	(AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.)
Microsoft Exel	(http://www.vertex42.com/ExcelArticles/mc/Files/NormalDistribution.xls)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA İZOLASYONU

Tablo 2’de belirtilen olgulardan ve sağlıklı kadınlardan toplanan EDTA’lı kan örnekleri oda ısısına getirildikten sonra karıştırılarak homojenize edildi. Her bir kan örneğinden 5 µl alınarak önceden hazırlanmış ve içinde 1 ml steril distile su bulunan 1.5 ml’lik ependrof tüplere aktarıldı. Örnekler vortekslendikten sonra oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu uygulama ile örneklerde bulunan eritrositlerin lizisi gerçekleştirilmiş oldu. İnkübasyondan sonra örnekler 13000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek lökositlerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek tüpte kalan lökosit peleti distile su ile tekrardan yıkandı. Bu amaçla peletler üzerine 1 ml steril distile su eklendi, örnekler iyice vortekslendikten sonra tekrar 13000 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra örneklerin üzerine 150 µl Instagene Matrix (Bio-Rad InstaGene Matrix, 20 ml Cat No:732-6030) eklenerek 56 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda örnekler vortekslendikten sonra 95 °C’de 8 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası 13000 g’de santrifüj edilen örneklerde üstte kalan süpernatant kısmındaki DNA temiz bir tüpe aktarılarak deneyler yapılncaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.2. PRİMERLERİN SEÇİMİ VE HAZIRLANMASI

Yayın taraması sonucu derlenen (10,26,37,55) Chamberlain Seti ve Beggs Setine ait primer dizileri Tablo 3'te verilmiştir. Primerler AppliedBiosystems Primer Express Software v3.0 programı ile dimer oluşumları, ikincil yapı oluşturma ve primer Tm derecelerinin belirlenmesi için kontrol edildi.

Tablo 3. Yayın taraması sonucu derlenen primer dizileri.

Y*= Primerin Yönü; F Düz “Forward”, R Ters “Reverse”.

Ekson	Y*	Orjinal Dizi	Tm °C	Uzunluk (bp)
PM	F	GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGC	65.2	535
	R	TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGAGT	74.6	
3	F	TCATCC R TCATCTTCGGCAGATTAA	61.1	410
	R	CAGGCGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATCA	68.6	
4	F	TTGTCGGTCTCTCTGCTGGTCAGTG	65.7	196
	R	CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC	64.0	
6	F	CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA	59.2	202
	R	GTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG	57.8	
8	F	GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	56.4	360
	R	GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG	56.4	
12	F	GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	56.8	331
	R	GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT	60.7	
13	F	AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT	58.5	238
	R	CTGACCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	62.5	
17	F	GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC	60.5	416
	R	AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC	63.1	
19	F	GATGGCAAAGTGTTGAGAAAAGTC	60.3	459
	R	TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA	61.6	
43	F	GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG	65.6	357
	R	ATATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC	62.3	
44	F	CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA	60.3	268
	R	TCCATCACCTTCAGAACCTGATCT	63	
45	F	AAACATGGAACATCCTTGTTGGGGAC	64.8	547
	R	CATTCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	59.4	
47	F	CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC	62.8	181
	R	GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	58.6	
48	F	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG	61.7	506
	R	CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC	57.5	

Tablo 3. Yayın taraması sonucu derlenen primer dizileri (Devamı)

49	F	GTGCCCTTATGTACCAGGCAGAAATTG	65.3	439
	R	GCAATGACTCGTTAATAGCCTTAAGATC	59.9	
50	F	CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGAAT	61.2	271
	R	TCTCTCACCAGTCATCACTTCATAG	62.0	
51	F	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	59.7	388
	R	GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC	60.4	
52	F	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC	70.1	113
	R	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	64.3	
60	F	AGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACG	69.5	139
	R	CTGCAGAAGCTCCATCTGGTGTTCAGG	69.4	

Yayınlardan derlenen primerlerin Tm dereceleri çok çeşitli dağılım göstermeleri sebebi ile orjinal primerler örnek alınarak yeni primer dizileri yine AppliedBiosystems Primer Express Software v3.0 programı kullanılarak tasarlandılar ve dimer oluşumları, ikincil yapı oluşturma ve primer Tm derecelerinin belirlenmesi açısından kontrol edildi. Her bir primer dizisi SNP farklılıkları ve hedef bölge ile uyum açısından gen bankasında BLAST programı ile kontrol edildi.

Tablo 4. Yeniden tasarlanan primer dizileri

Y*= Primerin Yönü; F Düz “Forward”, R Ters “Reverse”.

Ekson	Y*	Orjinal Dizi	Tm °C	Uzunluk (bp)
PM	F	CTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG	60.0	518
	R	GTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTC	59.1	
3	F	TCCRTCATCTTCGGCAGATTA	59.3	401
	R	CGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATC	59.0	
4	F	CGGTCTCTCTGCTGGTCAGTG	59.6	189
	R	AGCCCTCACTCAAACATGAAGC	59.4	
6	F	CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA	59.2	204
	R	ATGTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG	60.0	
8	F	TTTAGGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	59.5	366
	R	CTGTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG	59.6	
12	F	TGATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC	59.1	331
	R	AAAGCACGCAACATAAGATACACCT	59.2	
13	F	TTGGCTTGGAATGGTTTTAGGTT	59.7	153
	R	CTTGAAGCACCTGAAAGATAAAAATGTT	59.2	
17	F	ACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC	59.0	413
	R	AGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTC	59.2	

Tablo 4. Yeniden tasarlanan primer dizileri (Devamı)

19	F	ATGGCAAAAGTGTTGAGAAAAAGTC	58.8	456
	R	CTACCACATCCCATTTTCTTCCA	58.8	
43	F	TGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG	60.0	346
	R	GTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC	59.6	
44	F	TCTTGATCCATATGCTTTTACCTGC	59.5	264
	R	CATCACCTTCAGAACCTGATCT	58.2	
45	F	ATGGAACATCCTTGTGGGGAC	59.5	543
	R	CATTCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	59.4	
47	F	GTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC	59.1	180
	R	GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	58.6	
48	F	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACAT	59.6	506
	R	TCCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC	59.1	
49	F	CCTTATGTACCAGGCAGAAATTG	59.7	436
	R	GCAATGACTCGTTAATAGCCTTAAGATC	59.9	
50	F	CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGA	59.9	267
	R	TCTCTACCCAGTCATCACTTCATAG	59.7	
51	F	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	59.7	387
	R	GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAAT	58.9	
52	F	AATGCAGGATTTGGAACAGAGG	59.1	104
	R	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	59.8	
60	F	AAATTGCGCCTCTGAAAGAGAAC	59.9	134
	R	AGAAGCTTCCATCTGGTGTTCAG	58.5	

STR çalışması için yayınlarda heterozigote oranı en yüksek olan DXS1236, DX22 STR belirteçleri ile Amelogenin, iç standart ve kontrol amacı ile seçildi.(Tablo 5)

Tablo 5. STR bölgelerine ait primer dizileri

Y*= Primerin Yönü; F Düz “Forward”, R Ters “Reverse”.

STR	Y*	Orijinal Dizi
DXS1236	F	CATATGATACGATTCGTGTTTTGC
	R	AGGTCCTCCAGTAACAGATTTGG
DX22	F	AAATTCTTGCTTAGGCCACTCTAGG
	R	AACGTTGTTCTGGATCGTATGCTA
Amelogenin	F	ACCTCATCCTGGGCACCCTGG
	R	AGGCTTGAGGCCAACCATCAG

Tüm primerlerin amplifikasyon ürün boyutları karşılaştırılarak primerlerin cihazda okunması için gereken florofor işaretleri belirlendi. Promotor (PM) bölgesi, ekson 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52 ve 60 için FAM floroforu, ürün boyutları sayılan bölgeler ile çakışan ekson 44 ile STR belirteçleri için HEX floroforu ve amelogenin için ROX floroforu işaretleme için seçildi. Her bir bölgenin F primerinin 3' ucu belirtilen boya ile işaretlenmiş ve HPLC ile saflaştırılmış olacak şekilde TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin (Germany) firması tarafından 5 nMol miktarında sentezletildi.

Liyofilize olarak gelen primerler 100 mM derişim olacak şekilde sulandırılarak primer stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra "forward" ve "reverse" primerler eşit miktarlarda karıştırılarak 50 mM'lık amplifikasyon primer stokları hazırlandı. Her gende, 19 ekson ve 3 STR bölgesi olmak üzere toplam 22 bölge ile çalışılmak üzere, amplifikasyon primer stoklarından 20 µl alınarak steril bir ependrof tüpte çalışma 440µl primer stoğu hazırlandı. Elde edilen 440 µl'lik son hacim PZR işleminde kolaylık olması amacı ile 500 µl'ye tamamlandı. Bu şekilde derişimi belirlenmiş multipleks amplifikasyon primer karışımı kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.3. ÖRNEKLERİN DNA KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

İzole edilen DNA örneklerin içerisinde, çalışmaların standardize edilmesi amacı ile, 12 örnek rastgele seçilerek konsantrasyonları gerçek zamanlı PZR yöntemi ile aşağıda belirtildiği gibi belirlendi. Geri kalan örneklerin kalite ve miktarlarının değerlendirilmesi, UV spektrofotometre ile 260/280 nm absorpsiyonlarının ölçümüyle yapıldı.

Gerçek zamanlı PZR ile miktar belirlenebilmesi için Applied Biosystems Quantifiler kiti kullanıldı. Aşağıda belirtilen karışım hazırlanıp tüplere dağıtıldıktan sonra her bir tüpe 2 µl örnek veya dış kontrol standardı eklendi (Tablo 6).

Tablo 6: Gerçek zamanlı PZR karışımı

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
Quantifiler PCR Reaction Mix	12.5 µl	1x
Quantifiler Human Primer Mix	10.5 µl	1x
Örnek / Standart DNA'sı	2.0 µl	
Toplam Hacim	25.0 µl	

PZR için hazırlanan karışım Applied Biosystems 7000 SDS cihazında gerçek zamanlı çoğaltma ve miktar belirleme işlemleri için aşağıdaki program kullanılarak inkübe edildi ve sonuçlar 7000 SDS software ile değerlendirildi (Tablo 7).

Tablo 7: Gerçek zamanlı PZR programı

Aşama	Isı (°C)	Süre (dak.)	Tanım
1. Bekleme	95 °C	10.00	Taq Polimeraz Aktivasyonu
2. PZR	95 °C	00.15	x40 Döngü PZR ile Çoğaltma Aşaması
	60 °C	01.00	

3.2.4. ÖRNEKLERİN PZR İŞLEMİ İLE ÇOĞALTILMASI

PZR için aşağıda belirtilen karışım hazırlandı (Tablo 8). Hazırlanan karışımın üzerine son reaksiyon miktarı 1-10 ng olacak şekilde örnekler eklendi. Karışımın üzeri olası evaporasyonları engellemek ve amplifiye olmuş ürünleri daha iyi korumak amacıyla mineral yağ ile kaplandı.

Tablo 8: Çoklu PZR karışım oranları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
Dnase-RNase Free Su	12.0 µl	25 ul son reaksiyon hacmini tamamlamak için
Primer Karışımı	5.0 µl	Her bir Primerin son konsantrasyonu 10 mM
10x GoldST*R Buffer	2.5 µl	1x (Promega)
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl	2.5U (AmpliTaqGold AppliedBiosystems)
Örnek DNA'sı	5.0 µl	Son reaksiyon miktarı 1-10 ng
Toplam Hacim	25.0 µl	

PZR için hazırlanan karışım Applied Biosystems GeneAmp 9700 PZR cihazında çoğaltma işlemleri için aşağıdaki program kullanılarak inkübe edildi. Cihazın 9600 emulation modu çoğaltma işlemleri için seçildi. Böylelikle ısıtma ve soğutma hızlarının 1 °C/saniye olması sağlandı.

Tablo 9: Çoklu PZR programı

Aşama	Isı (°C)	Süre (dak)	Tanım
1. Bekleme	95 °C	10.00	Taq Polimeraz Aktivasyonu
2. PZR Aşamaları	95 °C	00.45	32 Döngü PZR ile Çoğaltma
	57 °C	01.00	
	72 °C	01.20	
3. Bekleme	60 °C	60.00	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	04 °C	Sonsuz	Yükleme süresine kadar ürünleri saklamak için

3.2.5. PZR ÜRÜNLERİNİN CİHAZA YÜKLENMESİ VE ANALİZİ

PZR işlemi sonrası elde edilen ürünler Applied Biosystems 310 Genetik Analiz cihazında yürütüldü. Yürütme işlemi sonuçlarının kontrolü ve optimizasyonu için Applied Biosystems 3130xl cihazında da aynı parametreler kullanılarak testler uygulandı. Genetik analiz cihazına yükleme ve yürütme için aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım ilk önce 95 °C 05.00 dakika denatüre edildi, denatürasyonun korunması için 05.00 dakikanın sonunda örnekler buz üzerine alınarak 02.00 dakika buz üstünde bekletildi. Daha sonra cihaza örnekler sırası ile cihaza yüklendi. Yürütme işlemi için aşağıda belirtilen parametreler kullanıldı. (Tablo 10-11, Şekil 9)

Tablo 10: Genetik analiz cihazında yürütme karışımı

HiDi Formamide (AppliedBiosystems)	18.5 µl
Gene Scan Tamra 500 Size Standart (3130xl cihazı için ROX size Standart Kullanıldı)	0.5 µl
PZR Örneği	1.0 µl
Toplam Hacim	20.0 µl

Tablo 11. Applied Biosystems 310 Genetik Analiz Cihazı Yürütme Parametreleri

Yürütme için Kullanılan Kapiler	36 cm 50 um iç çaplı kapiller (AppliedBiosystems)
Yürütme İçin Kullanılan Polimer	Perfomance Optimized Polimer 4 (POP4, AppliedBiosystems)
Yürütme Modülü	GS STR POP4 (1mL) C.md4
Enjeksiyon Zamanı	5 Saniye
Enjeksiyon Voltajı	15 kV
Yürütme Voltajı	15 kV
Yürütme Zamanı	36 Dakika
Yürütme Isısı	60 °C

Şekil 9. Applied Biosystems310 Genetik Analiz Cihazı Yürütme Parametreleri

310 Data Collection Software - Version 3.0.0

File Edit Instrument Window Help

GeneScan Injection Sheet - Untitled-1

Sample Sheet: at4-Fri May 25 17-40-33 GMT+... Run Pause Cancel

Length to Detector: 36 cm Operator: AYSEGULKUSKUCU

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Secs	Inj. kV	Run kV	Run °C	Run Time
1	A1 - k1	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
2	A3 - k2	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
3	A5 - k3	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
4	A7 - k4	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
5	A9 - AT18	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
6	A11 - AT19	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
7	B2 - AT20	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
8	B4 - AT21	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
9	B6 - AT22	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
10	B8 - AT23	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
11	B10 - AT24	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
12	B12 - AT25	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
13	C1 - AT26	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
14	C3 - AT27	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
15	C5 - AT28	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36
16	C7 - k5	GS STR POP4 (1 mL) C.md4	5	15.0	15.0	60	36

Status

Instrument State Idle Laser Standby

Electrophoresis Power Off Door Closed

Injection Idle

48 Tube Autosampler 1

Buffer Valve Open

Gel Pump At 469 Set 469

Time Remaining 00:00:00

Total Time 00:00:00

Electrophoresis Voltage kV 0.0

Electrophoresis Current µA 0.0

Gel Temperature °C 54 60

Laser Power mW 2.9 9.9

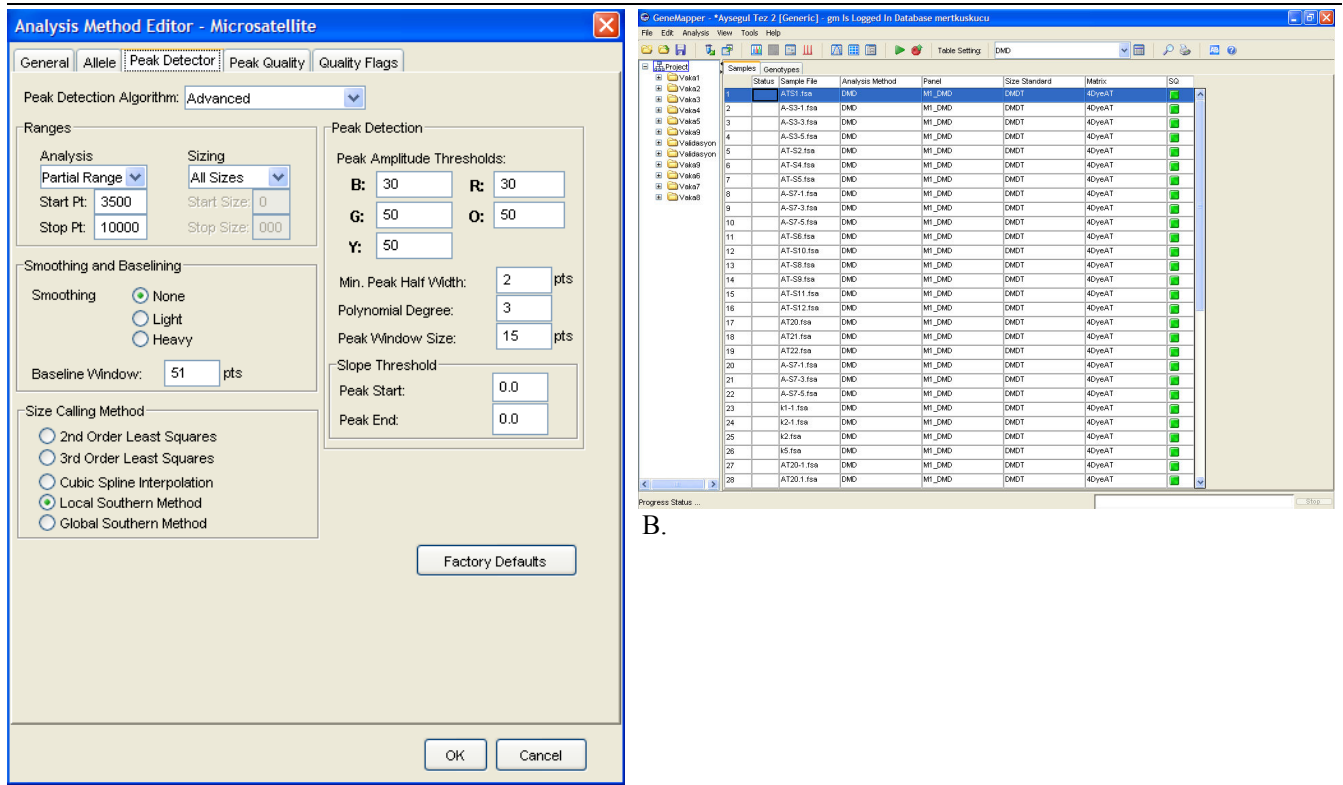
start 310 Data Collection S... 3:03 PM

Elektroferogram sonuçlarının analizi için GeneMapper Software 4.0 programı kullanıldı. GeneMapper Software 4.0 programı ile aşağıdaki analiz parametreleri kullanıldı. (Tablo 12, Şekil 10)

Tablo 12. GeneMapper Software 4.0 Panel Ayarları

Version	GM v 4.0									
Kit type:	MICROSATELLITE									
Chemistry Kit	DMD	none								
Panel	M1_DMD	none								
PM	blue	513.0	523.0	-	2	0.0	none	none	false	
3	blue	396.0	403.0	-	2	0.0	none	none	false	
4	blue	184.0	192.0	-	2	0.0	none	none	false	
6	blue	196.0	209.0	-	2	0.0	none	none	false	
8	blue	360.0	370.0	-	2	0.0	none	none	false	
12	blue	326.0	336.0	-	2	0.0	none	none	false	
13	blue	156.0	165.0	-	2	0.0	none	none	false	
17	blue	406.0	413.0	-	2	0.0	none	none	false	
19	blue	449.0	461.0	-	2	0.0	none	none	false	
43	blue	340.0	350.0	-	2	0.0	none	none	false	
44	Yellow	263.0	277.0	-	2	0.0	none	none	false	
45	blue	537.0	548.0	-	2	0.0	none	none	false	
47	blue	172.0	180.0	-	2	0.0	none	none	false	
48	blue	500.0	511.0	-	2	0.0	none	none	false	
49	blue	428.0	441.0	-	2	0.0	none	none	false	
50	blue	265.0	275.0	-	2	0.0	none	none	false	
51	blue	380.0	391.0	-	2	0.0	none	none	false	
52	blue	95.0	106.0	-	2	0.0	none	none	false	
60	blue	115.0	129.0	-	2	0.0	none	none	false	
AMXY Red	100.0	105.0	-	2	0.0	none	none	false		
X22	Yellow	130.0	168.0	-	2	0.0	none	none	false	
DX1236	Yellow	227.0	255.0	-	2	0.0	none	none	false	

Şekil 10. A. GeneMapper Tepe Saptama Yöntemi B. GeneMapper Analiz Parametreleri



A.

B.

3.2.6. GENETİK ANALİZ CİHAZINDAN ELDE EDİLEN VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMELERİ

Elektroforez sonrası tüm amplifiye edilen eksonlara ait tepe alan değerleri matematiksel hesaplar için kullanıldı. Her bir alanın toplam alana olan yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplanarak Tepelerin Dozaj Değerleri (PDD) hastalar ve sağlıklı bireyler için belirlendi. (26)

$$PDD = (\text{Tek Eksona ait Tepe Alanı} / \text{Tüm Ekson Tepe Alanlarının Toplamı}) * 100$$

Hastalarda delesyon, ilgili ekson tepesinin olmaması ile tanımlanırken taşıyıcılardaki delesyon ya da duplikasyonlar Tablo 13'te yer alan değerler ile karşılaştırılarak bulundu (26).

Tablo 13. Tepe Dozaj Değerleri Normal Sınırları

	Tepe Dozaj Değeri	
	Teorik	Pratik
Normal Oran Sınırları	1.00	0.67-1.5

Tepe dozaj değerleri için kullanılacak toplum ortalaması, sağlıklı kadın kontrol grubunun DNA örneklerinden elde edilen veriler kullanılarak bulundu. Bunun için her tepenin alan değeri her bir kadın için hesaplandı sonuç olarak toplum ortalaması ve standart sapmaları bulundu.

Her bir amplicona ait tepeler değerlendirilirken toplum normalleri ve test güvenilirliğini belirlemek için Gauss Eğrisi (Normal dağılım, Çan Eğrisi) çizilerek toplumun normal dağılım değerleri ile test güvenilirlik sınırları hesaplandı. Gauss eğrisi çizilirken grafik limitleri (Z_{max} ve Z_{min}) -4, +4 olarak alındı ve aşağıda belirtilen fonksiyonun eğrisi çizilerek grafikler oluşturuldu. Hesaplamalar ve fonksiyon grafik çizimleri için Microsoft Excel Yazılımı <http://www.vertex42.com/ExcelArticles/mc/Files/NormalDistribution.xls> bağlantısından indirilen makro aracılığı ile kullanıldı. (μ = Ortalama σ = Standart Sapma.) (73)

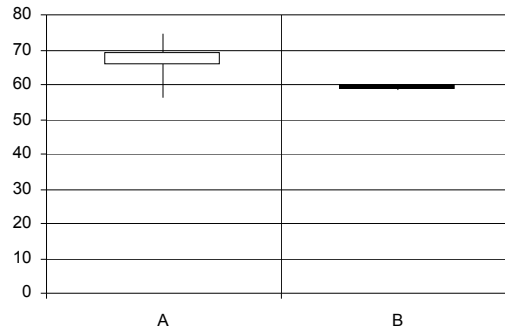
$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

4. BULGULAR

Yayın taraması sonucu elde edilen (10,26,37,55) Chamberlain Seti ve Beggs Setine ait primer dizileri AppliedBiosystems Primer Express Software v3.0 programı ile dimer oluşumları, ikincil yapı oluşturma ve primer Tm derecelerinin belirlenmesi için kontrol edildi. Sonuç olarak hedef bölgelerimize ait primerlerin ortalama Tm dereceleri 62.39 °C, bu değerlerin standart sapmaları 4.13 °C, minimum Tm derecesi 56.4 °C ve maksimum Tm derecesi 74.6 °C olarak bulundu.

Tm derecelerinin çeşitli dağılım göstermeleri sebebiyle tek adımda 18 ekson ve PM bölgesinin incelenebileceği çoklu PZR işlemi için, orjinal primerler örnek alınarak yeni primer dizileri, yine AppliedBiosystems Primer Express Software v3.0 programı kullanılarak tasarlandı. Dimer oluşumları, ikincil yapı oluşturma ve primerlerin Tm derecelerinin belirlenmesi açısından kontrol edildi. Her bir primer dizisi SNP farklılıkları ve hedef bölge ile uyum açısından gen bankasında BLAST programı ile kontrol edildi. Primer dizileri içerisinde herhangi bir SNP bölgesine rastlanmadı. Sonuç olarak hedef bölgelerimize ait primerlerin ortalama Tm dereceleri yeni tasarlanan sette 59.35 °C, bu değerlerin standart sapmaları 0.44 °C, minimum Tm derecesi 58.20 °C ve maksimum Tm derecesi 60.00 °C olarak bulundu. Böylelikle tepkimeler için Ta değerinin 57. 00 °C olmasına karar verildi. (Şekil 11)

Şekil 11. Primer dizi Tm derecelerinin A. Literatürdeki dağılımları B. Yeniden tasarlanmış primerler.



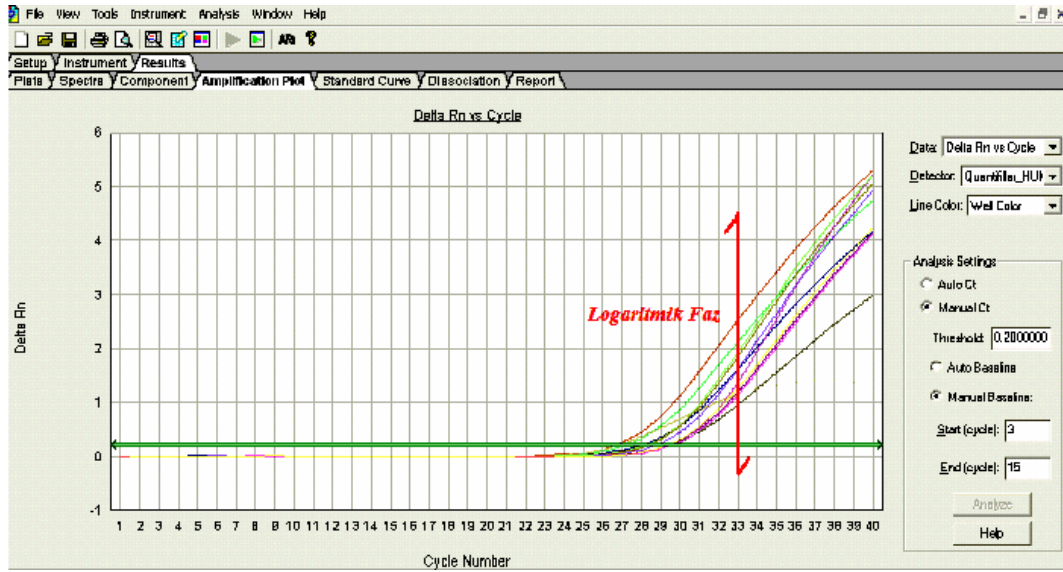
DNA ekstraksiyonu sonrası yapılan gerçek zamanlı PZR işlemi sonunda elde edilen DNA derişimleri Tablo 14’da verilmiştir.

Tablo 14. Gerçek zamanlı PZR Sonuçları

Örnek İsmi	Detektör	Ct	DNA Miktarı (ng/ml)	Örnek İsmi	Detektör	Ct	DNA Miktarı (ng/ml)
Ornek1	İnternal Pozitif Kontrol	25.26		Ornek7	İnternal Pozitif Kontrol	25.54	
Ornek1	Quantifiller_HUMAN	29.36	0.29	Ornek7	Quantifiller_HUMAN	26.68	1.92
Ornek2	İnternal Pozitif Kontrol	24.63		Ornek8	İnternal Pozitif Kontrol	26.08	
Ornek2	Quantifiller_HUMAN	29.44	0.27	Ornek8	Quantifiller_HUMAN	27.16	1.37
Ornek3	İnternal Pozitif Kontrol	24.68		Ornek9	İnternal Pozitif Kontrol	24.67	
Ornek3	Quantifiller_HUMAN	28.65	0.47	Ornek9	Quantifiller_HUMAN	28.27	0.62
Ornek4	İnternal Pozitif Kontrol	25.46		Ornek10	İnternal Pozitif Kontrol	26.08	
Ornek4	Quantifiller_HUMAN	29.5	0.26	Ornek10	Quantifiller_HUMAN	26.77	1.81
Ornek5	İnternal Pozitif Kontrol	26.36		Ornek11	İnternal Pozitif Kontrol	24.61	
Ornek5	Quantifiller_HUMAN	28.04	0.73	Ornek11	Quantifiller_HUMAN	28.17	0.67
Ornek6	İnternal Pozitif Kontrol	26.94		Ornek12	İnternal Pozitif Kontrol	25.8	
Ornek6	Quantifiller_HUMAN	29.4	0.28	Ornek12	Quantifiller_HUMAN	29.24	0.31
	Ortalama IPC Ct	25.51					
	Standart Sapma	0.77					
	Ortalama QH Ct	28.39					
	Standart Sapma	1.06					
	Ortalama DNA Kons	0.75	ng/ml				

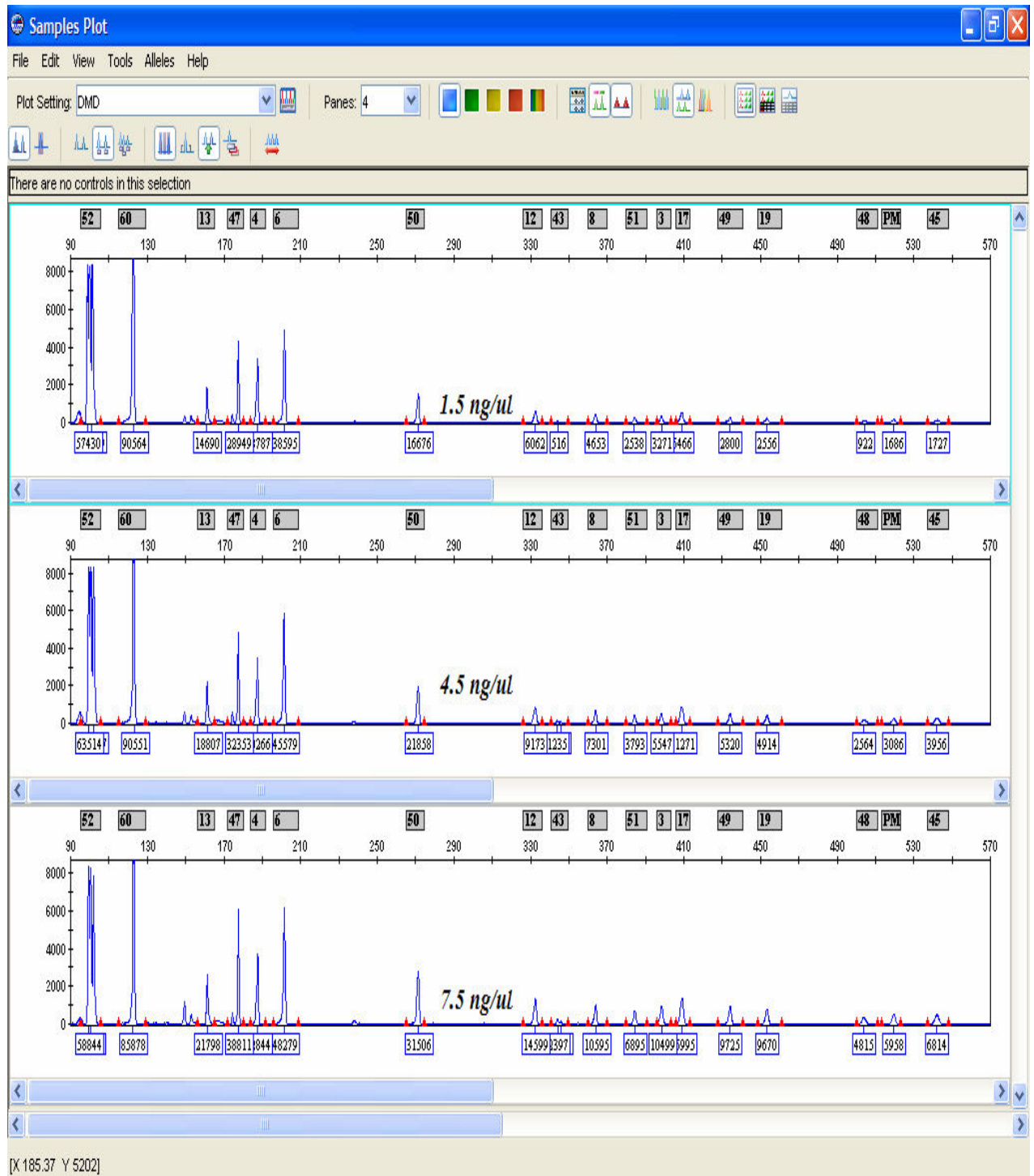
İki nedenle gerçek zamanlı PZR işlemine başvuruldu. Bunlardan birincisi elde edilen DNA'ların kalite ve miktarını belirlemek, ikincisi ise yapılacak işlem göreceli gen kopya sayısı belirlemesi olacağından, her bir örneğin, hangi döngü sayısında logaritmik fazda bulunacağını belirlemektir. Şekil 12'de de görüldüğü gibi örneklerin 32. döngü logaritmik fazda buldukları gözlemlendi. Bu döngü sayısının amplifikasyon ve saptama için yeterli olacağı düşünülerek optimizasyon çalışmaları ve daha sonraki test çalışmaları için döngü sayısı olarak kullanılmasına karar verildi.

Şekil 12. Gerçek zamanlı PZR ile logaritmik fazın belirlenmesi

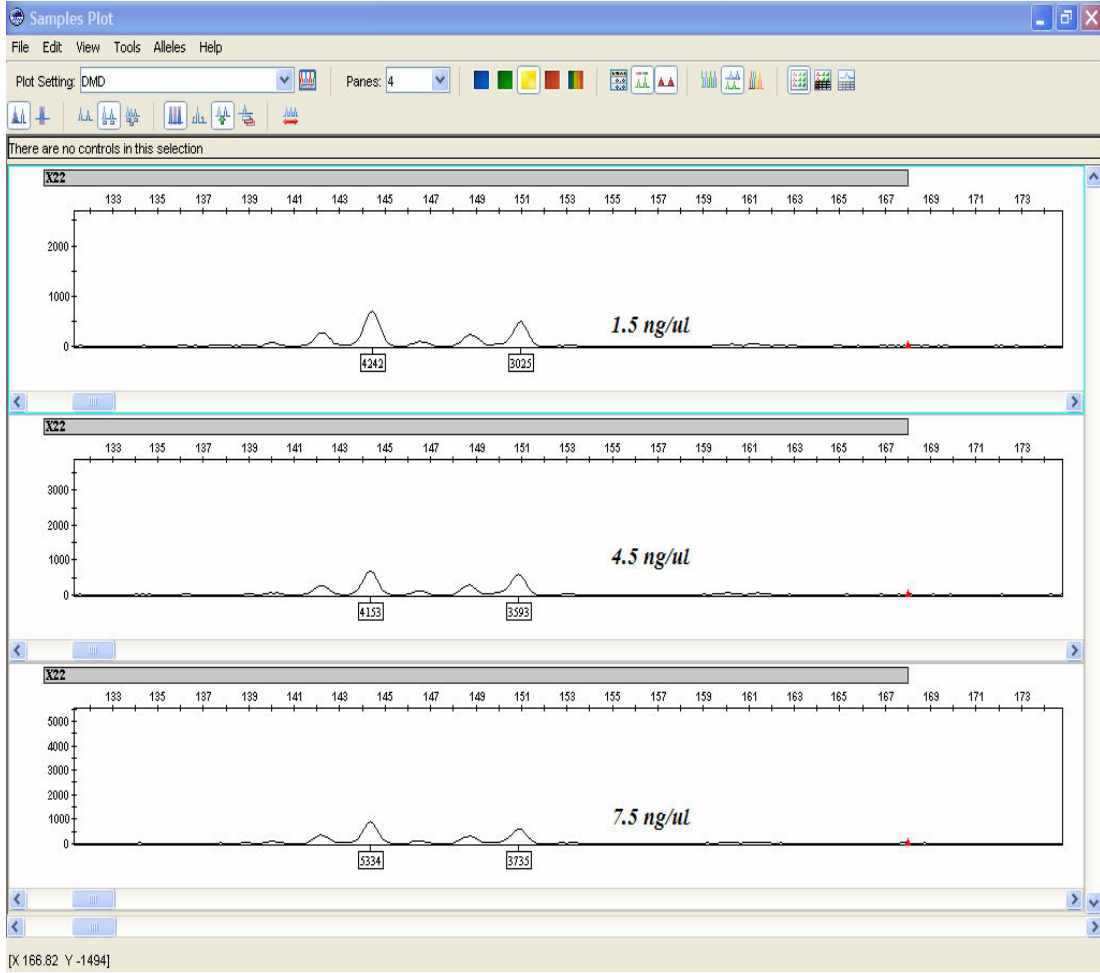


Belirlenen döngü sayısı, hesaplanan Primer Tm değerleri, ampikon uzunlukları göz önünde bulundurulduğunda uygulanması gereken PZR programa karar verildi. DNA miktarı çeşitlilik gösterdiğinden ve optimizasyon çalışmaları için değişik DNA derişimlerine sahip örneklerin çoklu amplifikasyonları ve genetik analiz cihazında yürütmeleri yapılarak, test optimizasyon aşamaları tamamlandı. Detayları gereç ve yöntem kısmında verilen cihaz ayarları ve yürütme parametreleri kullanılarak testlerin uygulanmasına karar verildi. Bu parametreler ile yapılan doğrulama çalışmalarında sırası ile 1,5 ng, 4,5 ng ve 7,5 ng'lık DNA miktarlarına sahip örneklerin amplifikasyonları yapıldı. Belirlenen koşullarda test sonuçlarının belirtilen DNA miktarları kullanıldığında değişmediği gözlemlendi. Testler için optimum DNA miktar 1-10 ng olarak bulundu. (Şekil 13 ve 14)

Şekil 13. Eksonların değişik DNA derişimlerinde amplifikasyon sonuçları



Şekil 14. STR belirteçlerinin değişik DNA derişimlerinde amplifikasyon sonuçları



Sağlıklı kadın kontrol grubu verilerinin değerlendirilmesi, her eksona ait ortalama tepe alanları ortalamaları ile standart sapmaları Tablo 15'te verilmiştir. Bu tepe alan değerleri kullanılarak hesaplanan tepe dozaj değeri, yine aynı tabloda sunulmuştur. Bu değerler taşıyıcıların belirlenmesinde standart değerler olarak kullanılmışlardır.

Tablo 15. Amplifiye edilen eksonlar, bunların uzunlukları, ortalama tepe alanları ile tepe dozaj değerleri

Ekson Tanımı	Tepe Bp	Ortalama Tepe Alanı	Ortalama Tepe Alanı Standart Sapma	Tepe Dozaj Değeri (%)
PM	519,5	6524,24	3933,08518	1,0735355
3	398,6	7658,64	4489,6901	1,26019611
4	187,5	75539,98	25100,3774	12,4297773
6	201,4	42377,38	32926,6261	6,97301474
8	363,9	16604,96	12097,332	2,73227441
12	332	17627,14	11694,2629	2,90046971
13	161,2	21053,34	19219,7272	3,46423611
17	408,9	25124,72	18142,0751	4,1341641
19	453,2	9403,72	7629,89512	1,54734149
43	343,7	2769,74	1971,93877	0,45574875
44	269,6	21077,78	14465,3395	3,46825761
45	541,8	7770,38	4538,11745	1,27858245
47	177,4	41937,36	34039,2231	6,90061135
48	503,9	3763,02	2237,35459	0,61918868
49	433,9	8830,7	6105,69852	1,45305352
50	271	26283,8	20118,4178	4,3248857
51	384,4	5032,94	3628,64627	0,82814853
52	99,23	150955,56	80667,9779	24,839085
60	123,2	117398,58	50875,8942	19,317429

Her bir örnekten elde edilen ilgili eksona ait tepe alan oranının, standart tepe alan oranına olan oranı 1.5'den büyük olduğu durumlar duplikasyon, 0.7'den küçük olduğu durumlar ise delesyon taşıyıcılığı olarak değerlendirildi (Tablo 13) (26). İlgili eksona ait amplifikasyon tepesinin bulunmaması, o eksonun delesyonu olarak değerlendirildi.

Her bir bölge için yapılan amplifikasyon kontrollerinin normal dağılım eğrileri çizildi ve toplum sonuçları normal dağılım eğrileri üzerinde değerlendirilerek testin her bir bölge için istatistiksel güven aralığı bulundu. Bölgelere ait güven aralıkları Tablo 16'te verildi.

Tablo 16. Amplifiye edilen bölgeler, bunların normal toplumda dağılım olasılıkları.

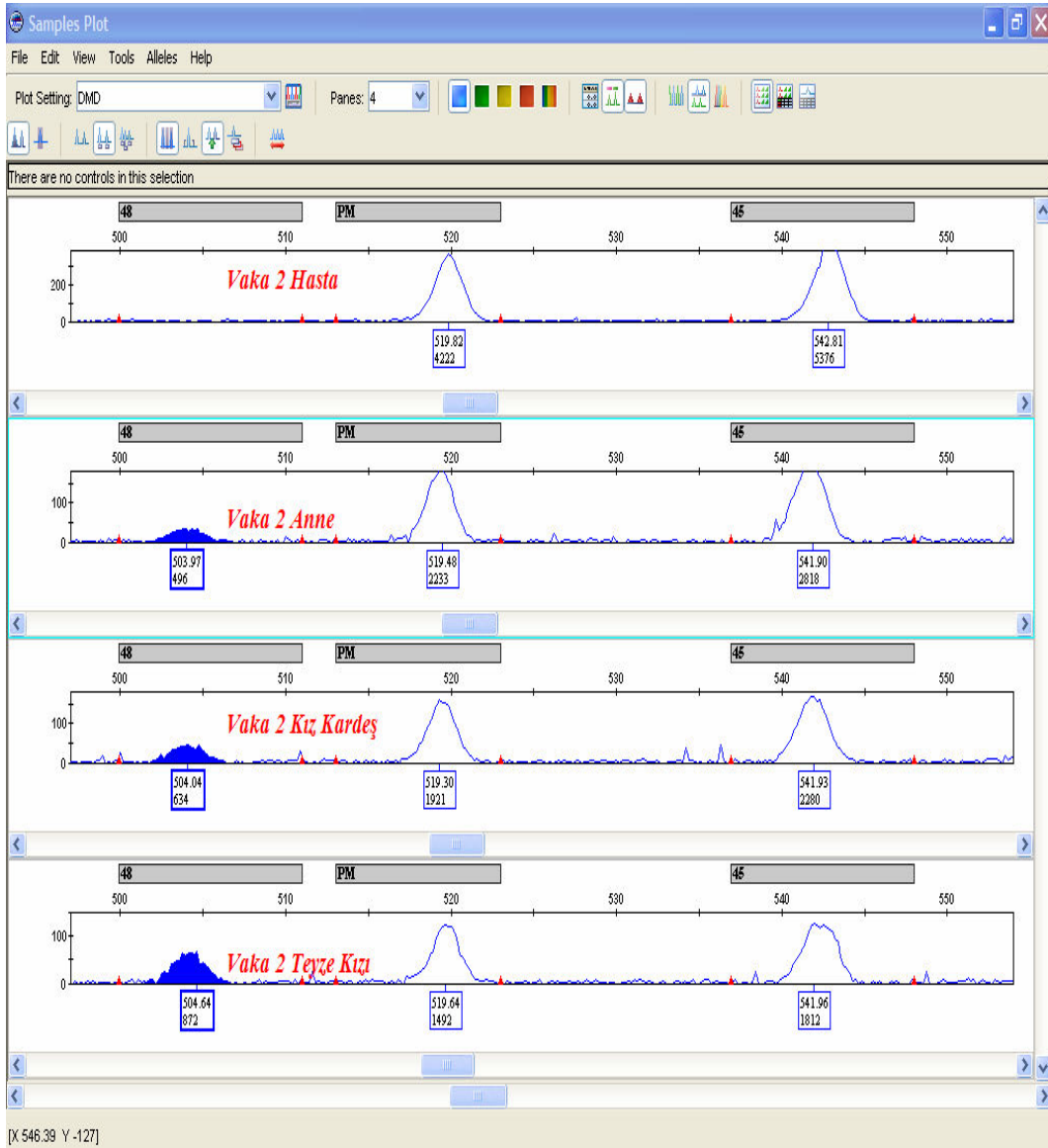
<i>Ekson Tanımı</i>	<i>Olasılık</i>	<i>Olasılık</i>	<i>Olasılık</i>
	<i>X<Xmin</i>	<i>X>Xmaks</i>	<i>Xmin <X<Xmaks</i>
PM	10,91%	1,06%	88,03%
3	14,85%	1,68%	83,48%
4	0,14%	0,02%	99,85%
6	10,46%	0,35%	89,19%
8	9,04%	0,12%	90,84%
12	11,60%	0,08%	88,32%
13	14,59%	0,61%	84,80%
17	13,60%	0,13%	86,26%
19	16,42%	0,09%	83,49%
43	14,04%	0,07%	85,89%
44	12,44%	0,13%	87,43%
45	7,86%	1,23%	90,91%
47	12,19%	1,45%	86,36%
48	9,68%	0,19%	90,13%
49	11,28%	0,57%	88,15%
50	10,04%	0,30%	89,66%
51	9,99%	0,28%	89,74%
52	3,29%	2,49%	94,21%
60	3,44%	7,83%	88,73%
Genel Ortalama	10,27%	0,98%	88,75%

Tüm olgulara ait ortalama tepe oranları incelenip, toplumla karşılaştırıldıktan sonra olguların durumları ve tanıları değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar olguların daha önce aldıkları moleküler tanı ile karşılaştırıldı. 5., 6., 7., 8., 9., 13., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23., 24. aileler incelendiğinde, olguların daha önce aldıkları tanı ile uyumlu sonuçlar elde edildi. 2 no'lu ailede de, olguda saptadığımız delesyon, önceki tanısı ile uyumluydu. Bu ailede hastanın annesinin yanı sıra olgunun kız kardeşi ve teyze kızına ait DNA örneğini de test etme şansımız oldu. Teyze kızı incelediğimiz ekson delesyonları açısından normal bulundu (Şekil 15).

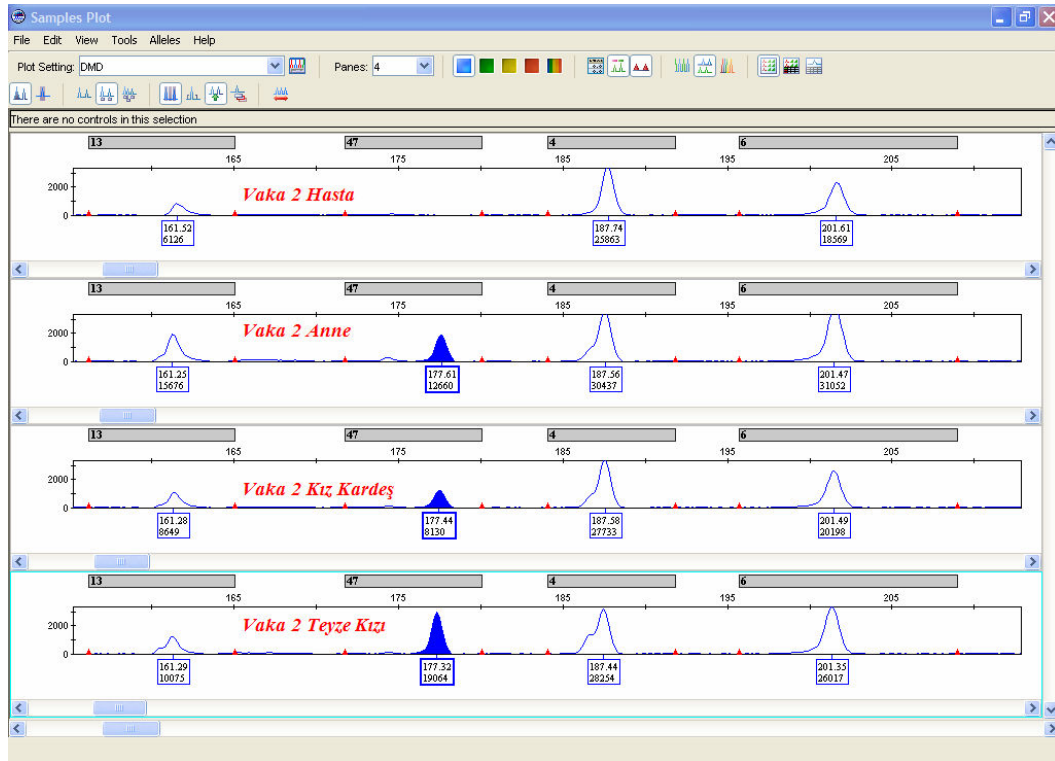
Şekil 15'te, 2 no'lu ailedeki olgu, anne, kız kardeş ve teyze kızına ait amplifikasyon tepeleri sunulmuştur. İndeks olgunun 47 ve 48. eksonları delesyona uğramış olduğundan elektroferogramda ilgili eksonlara ait tepeler görünmemektedir. Olgunun anne ve kız kardeşinde ekson 47 ve 48'e ait tepelerin alan ortalamaları,

toplumun tepe alan ortalamaları ile karşılaştırıldığında oranlar sırası ile annede 0.56, 0.28, kız kardeşte 0.42 ve 0.42 olarak bulundu. Anne ve kız kardeş bu ekson delesyonları için taşıyıcı olarak belirlendi. Olgunun teyze kızı incelendiğinde bu tepelerin, tepe alan ortalamalarının toplumun tepe alan ortalamalarına oranları ekson 47 için 0.98 ve ekson 48 için 0.82 olarak bulundu. Olgunun teyze kızı bu ekson delesyonları için normal olarak tanımlandı. Sonuç olarak bu ailede anne ve kız kardeş taşıyıcı, teyze kızı ise normal olarak değerlendirildi.

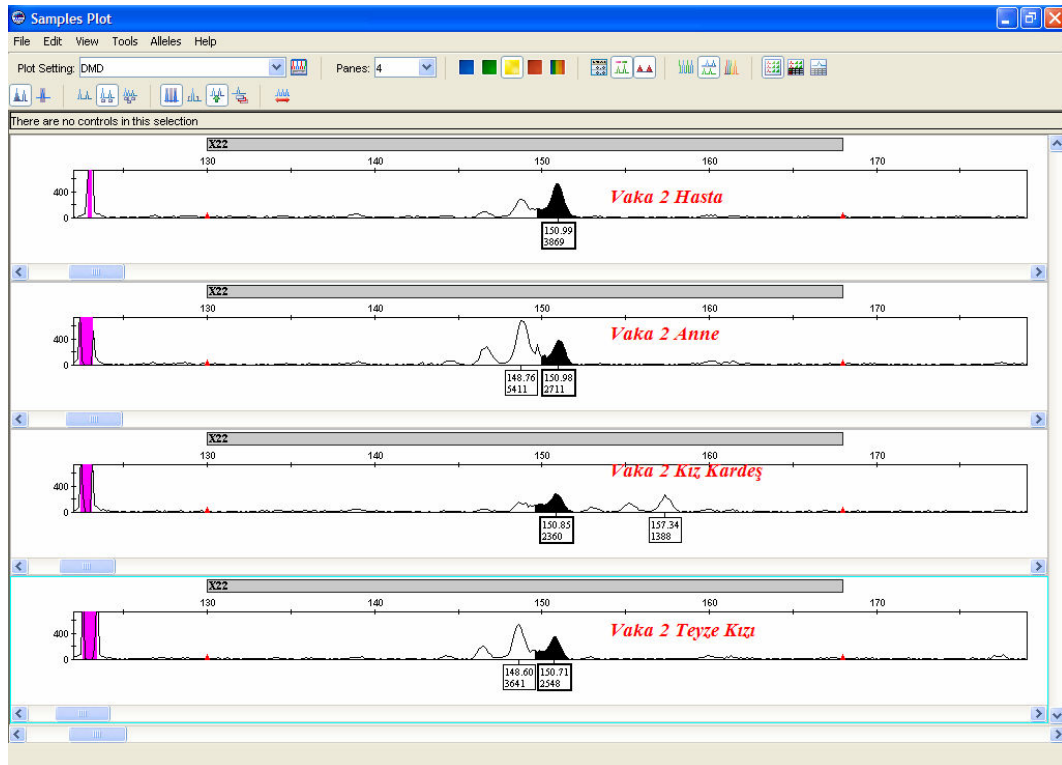
Şekil 15 A. Aile 2 47. Ekson bölgesinin analizi.



Şekil 15 B. 2 no'lu Aile , 48. Ekson analizi

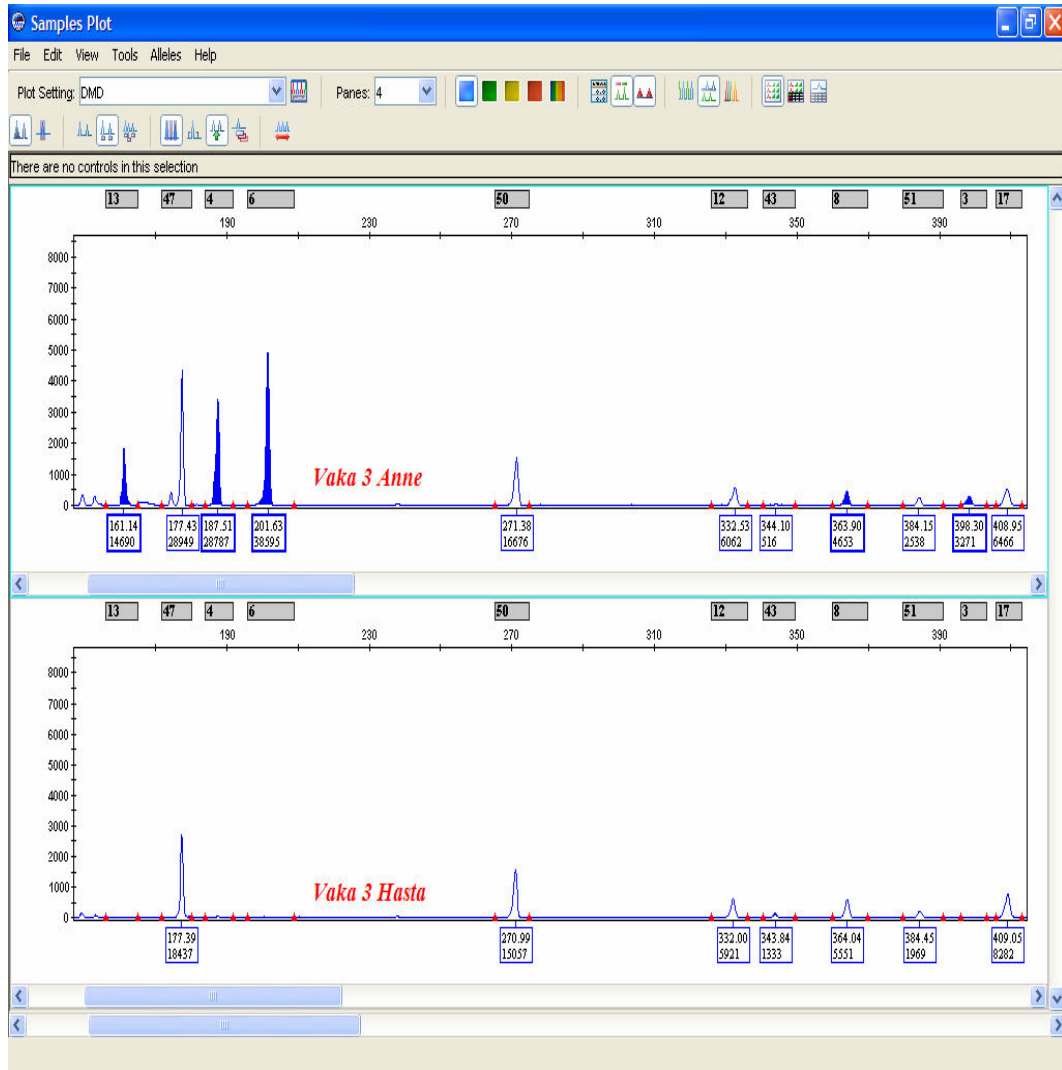


Şekil 15 C. 2 no'lu Aile, STR belirteçleri

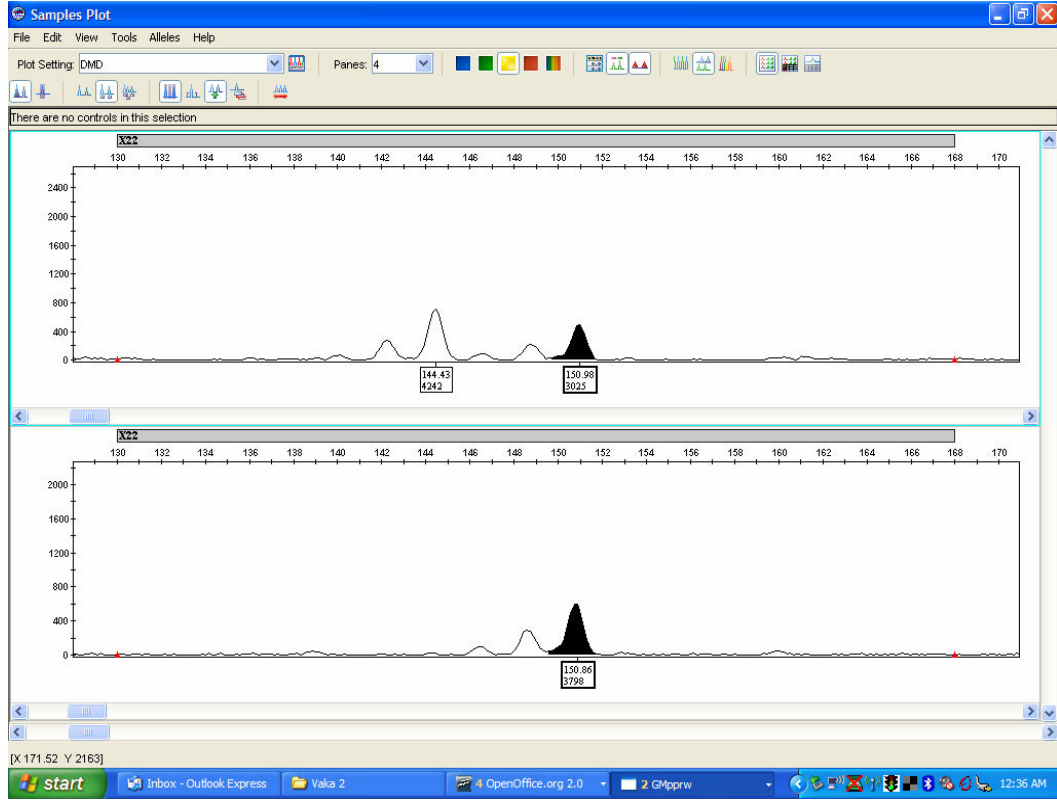


Şekil 16'da yeni mutasyon sonucu oluştuğu düşünülen 3 no'lu ailedeki olgu ve annesine ait elektroforegram sonuçları görülmektedir. Elektroforegram incelendiğinde indeks olguda ekson 3, 4, 6 ve 13'ün amplifikasyonları gözlenmediği ve hastalığa bu eksonlarda meydana gelen delesyonların neden olduğu görülmektedir. Olgunun annesine ait ekson tepelerinin, tepe alan ortalamaları, toplum tepe alan ortalamaları ile karşılaştırıldığında sırası ile 1.48, 1.00, 0.74, ve 0.73 oranları bulundu. Bu oranlar, toplum ile aynı tepe alan oranlarını olgunun annesinin de taşıdığını ortaya koydu ve annede ilgili eksonlara ait delesyon taşıyıcılığının olmadığını gösterdi. Sonuç olarak bu olguda yeni mutasyon olabileceği düşünüldü.

Şekil 16 A. 3 no'lu Aile, Eksonlara ait amplifikasyon tepeleri.



Şekil 16 B. 3 no'lu Aile, STR belirteçleri.



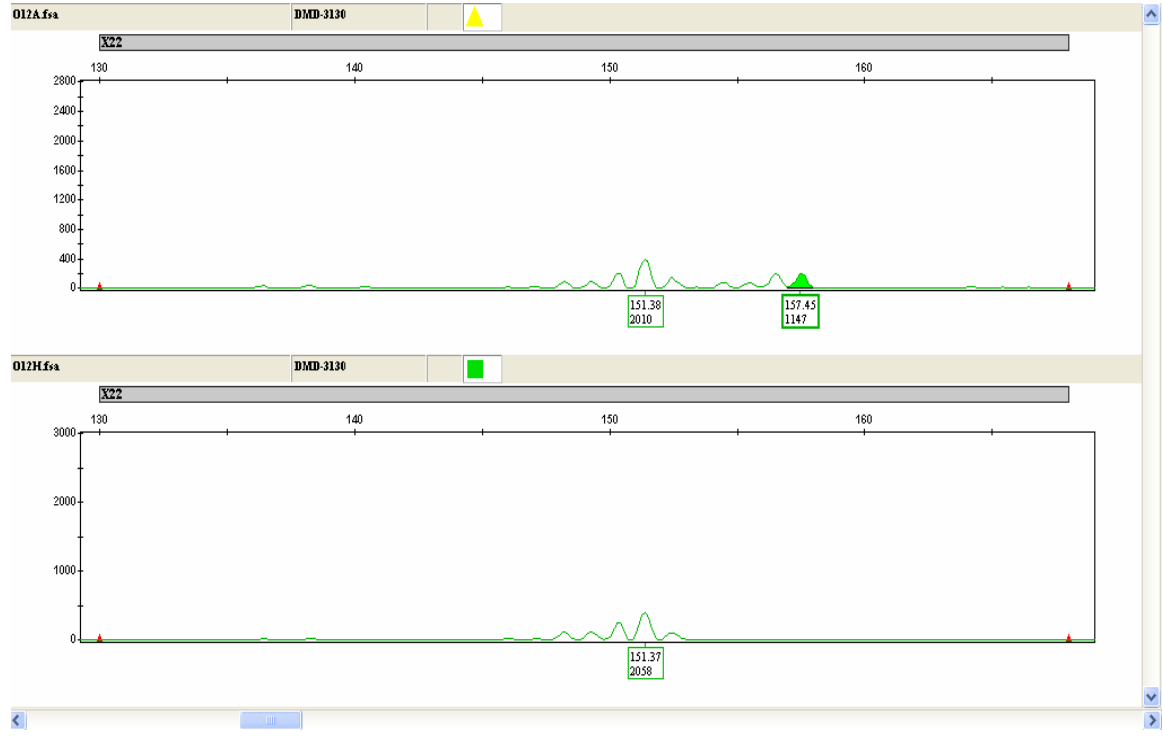
1.aile (sadece anneye ait örnek değerlendirilebildi, hasta çocuğa ulaşılamadığı için değerlendirme yapılamadı),3., 11. ve 14. ailelerde de daha önce aldıkları tanımlar ile uyumlu sonuçlar elde edilirken bu ailelerin annelerin delesyonu taşımadığı görüldü.

3. ailede daha önce bildirilen 3-6 delesyonuna ek olarak bu ailenin hasta vakasında ekson 13 delesyonu ek olarak bulundu (Şekil 16). 12. ailenin bildirilen 50. ekson delesyonuna ek 49. ekson delesyonu ailenin hasta bireyinde saptanırken, annede delesyon taşıyıcılığı gözlenmedi (Şekil 17). Aynı şekilde 50. ekson delesyonuna ek olarak 49. ekson delesyonu 4. ailede incelenen anne ve kız kardeş her iki ekson için de delesyon taşıyıcısı olarak tanımlandılar.

Şekil 17 A. 12 aileyte ait ekson tepe görüntüleri. (Üst tepe görüntüleri anneye alt tepe görüntüleri hasta bireye ait)

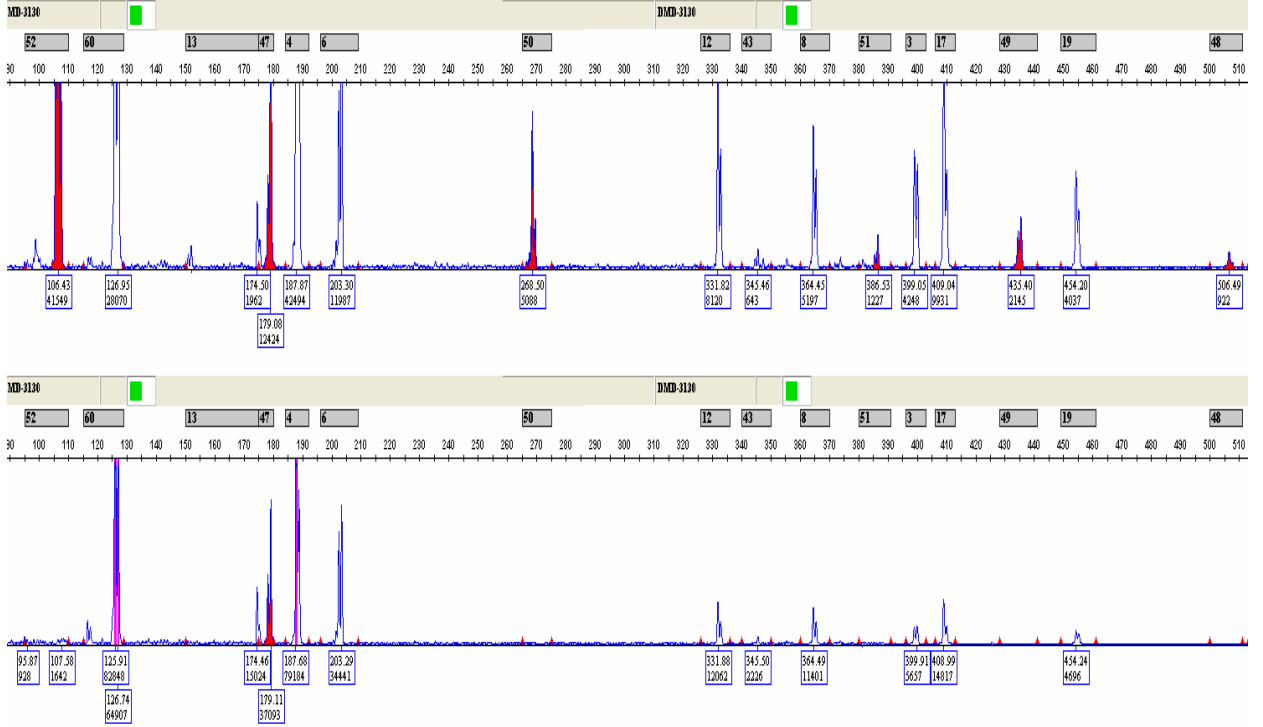


Şekil 17 B. 12 aileye ait Str belirteçleri görüntüleri. (Üst tepe görüntüleri anneye alt tepe görüntüleri hasta bireye ait)



10. ailede de daha önce rapor edilen 47-52. eksonların delesyonlarının 48-52. ekson delesyonu şeklinde olduğu (47. eksonun varlığı) gözlemlendi. Anne de, 48-52. ekson delesyonu açısından taşıyıcı olarak tanımlandı (Şekil 18).

Şekil 18. 10. Aileye ait ekson tepe görüntüleri. (Üst tepe görüntüleri anneye alt tepe görüntüleri hasta bireye ait)



Olgulara ait toplu sonuçlar Tablo 15’de sunulmuştur.

Tablo 15. Tez çalışmasında incelenen olgular ve sonuçları

Aile No	Daha Önce Aldığı Tanı	Örnek No	Örnek	QF-PCR Test Sonucu
1	8-50 arası ekson delesyonu	1	Anneye ait DNA	Normal
2	47-48arası ekson delesyonu	2	Hastanın DNA'sı	47-48 ekson delesyonu
		3	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
		4	Kız kardeşe ait DNA	Taşıyıcı
3	3-6 arası ekson delesyonu	5	Teyze Kızına ait DNA	Normal
		6	Hastanın DNA'sı	3-6 ve 13. ekson delesyonu
4	50. ekson delesyonu	7	Anneye ait DNA	Normal
		8	Hastanın DNA'sı	49-50 ekson delesyonu
5	45-50arası ekson delesyonu	9	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
		10	Kız kardeşe ait DNA	Taşıyıcı
5	45-50arası ekson delesyonu	11	Hastanın DNA'sı	45-50 ekson delesyonu
		12	Anneye ait DNA	Taşıyıcı

6	Promoter delesyonu	13	Hastanın DNA'sı	Promoter delesyonu
		14	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
		15	Teyze Kızına ait DNA	Taşıyıcı
7	3-19arası ekson delesyonu	16	Hastanın DNA'sı	3-19 ekson delesyonu
		17	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
8	45-47 ekson delesyonu	18	Hastanın DNA'sı	45-47 ekson delesyonu
		19	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
9	45-50 ekson delesyonu	20	Hastanın DNA'sı	45-50 ekson delesyonu
		21	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
10	47-52 ekson delesyonu	22	Hastanın DNA'sı	48-52 ekson delesyonu
		23	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
11	45. ekson delesyonu	24	Hastanın DNA'sı	45 ekson delesyonu
		25	Anneye ait DNA	Normal
12	50. ekson delesyonu	26	Hastanın DNA'sı	49-50 ekson delesyonu
		27	Anneye ait DNA	Normal
13	45. ekson delesyonu	28	Hastanın DNA'sı	45 ekson delesyonu
		29	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
14	4-8 ekson delesyonu	30	Hastanın DNA'sı	4-8 ekson delesyonu
		31	Anneye ait DNA	Normal
15	47-52 ekson delesyonu	32	Hastanın DNA'sı	47-52 ekson delesyonu
		33	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
16	50. ekson delesyonu	34	Hastanın DNA'sı	50 ekson delesyonu
		35	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
17	45-50 ekson delesyonu	36	Hastanın DNA'sı	45-50 ekson delesyonu
		37	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
18	49-50 ekson delesyonu	38	Hastanın DNA'sı	49-50 ekson delesyonu
		39	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
19	50. ekson delesyonu	40	Hastanın DNA'sı	50 ekson delesyonu
		41	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
20	8-12 ekson delesyonu	42	Hastanın DNA'sı	8-12 ekson delesyonu
		43	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
21	45-50 ekson delesyonu	44	Hastanın DNA'sı	45-50 ekson delesyonu
		45	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
22	8-12 ekson delesyonu	46	Hastanın DNA'sı	8-12 ekson delesyonu
		47	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
23	13. ekson delesyonu	48	Hastanın DNA'sı	13 ekson delesyonu
		49	Anneye ait DNA	Taşıyıcı
24	48 ekson delesyonu	50	Hastanın DNA'sı	48 ekson delesyonu
		51	Anneye ait DNA	Taşıyıcı

5. TARTIŞMA

DMD/BMD, sık görülen, etkin tedavisi olmayan, ölümcül seyreden, X'e bağlı çekinik geçiş gösteren kalıtsal bir kas hastalığıdır. Bu nedenlerle DMD/BMD tanısı almış çocuğu olan ailelere, doğum öncesi tanı önerilir. İzole olgularda, annenin taşıyıcılık olasılığı $2/3$ 'tür (%66). Kızının taşıyıcılık olasılığı $1/3$, kız kardeşinin taşıyıcı olma olasılığı $1/6$ 'dır. Bu oran, doğum öncesi tanı için uygulanacak girişimsel yöntemin düşük riskinden (AS için %0,5, CVS için %1-3) yüksek olduğu için, bireylere her hamilelikte doğum öncesi tanı önerilir. İzole olguların $1/3$ 'ü yeni mutasyon sonucu olduğundan, anne ve diğer kadın akrabalarda da taşıyıcılık durumu olmaz. Böyle ailelerde anne dışındaki kadın akrabalarda doğum öncesi tanıya gerek yoktur. Ancak annede germinal mozaisizm dışlanmaması gerektiğinden, her hamilelikte doğum öncesi tanı önerilmelidir. Doğum öncesi tanı önerisinin doğru yapılabilmesi, olguların ailelerindeki kadınların taşıyıcılık durumlarının doğru belirlenmesine bağlıdır. Mutasyon taşıyıcılığının belirlenmesinde, günümüzde kullanılan aile ağacı analizi, Bayesiyen hesabı ve bağlantı analizleri gibi olasılık sonucu veren yöntemler yerine, mutasyonun gösterilebileceği ve taşıyıcılığın kesin olarak belirlenebileceği gen dozaj test yöntemlerinin kullanılması daha uygundur.

Buradan yola çıkarak, çalışmamızda gen dozaj testi olan kantitatif floresan PZR(QF-PCR) yöntemini, DMD/BMD taşıyıcılık tanısında kullanmayı planladık. QF-PCR yöntemini seçmemizdeki neden, yöntemin geniş kullanım alanının olması ve bu yüzden istenilen esnekliği sağlamasıydı. Teorik olarak bu yöntemle, Distrofin genine ait tüm eksonların delesyon ve duplikasyon mutasyonlar saptanabilir. Yine bu yöntemi SSCP, HMA gibi yöntemlerle birleştirip, nokta mutasyonlarını taramak için kullanmak mümkündür (3). Bu sayede Distrofin genindeki mutasyonların hemen hepsi saptanabilir. Bu geniş uygulama alanında karşılaştığımız zorluk yöntemin en hızlı, en etkin ve maliyet olarak en ucuz olan kısımlarını seçmektir. Kalabalık Türk aile yapısı göz önüne alındığında, indeks olgunun belirlenmesinin ardından yapılan aile ağacı analizi sonucu, çok sayıda kadın aile bireyinde taşıyıcılık araştırması yapmak ve sonuçlara göre doğum öncesi tanı planlamak gerekebilir. Bu nedenle tasarladığımız testin hızlı ve kolay uygulanabilir, böylelikle gerektiğinde taşıyıcıların belirlenmesi için büyük aileleri

tarayabilecek yapıda olmasına özen gösterdik. Testin aynı zamanda doğum öncesi tanı için de kullanılabileceği düşünülerek, özellikle bu örneklerde, tanısal değerinin yüksek olmasını amaçladık.

Etyolojisinde büyük oranda gen delesyon (%60-65) ve duplikasyon (%10) mutasyonları olan DMD/BMD tanısı, günümüzde mutasyonların en sık gözleendiği eksonların incelendiği 2 aşamalı çoklu PZR yöntemiyle konmaktadır (11,37,30,28,60). Delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonların yaklaşık %98'i genin, "Hot spot" olarak adlandırılan, 5' ucu ve merkez bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Hot spot bölgede yer alan eksonlar 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 ve PM bölgesidir. Çalışmamızda, rutin uygulamalarda bu eksonlara yönelik, 2 ayrı çoklu amplifikasyon karışımıyla yapılan çoklu PZR yöntemini, tek çoklu amplifikasyon karışımı kullanılacak şekilde tasarlayarak geliştirdik. Yalnız mutasyonların sık görüldüğü eksonların seçimi ve rutin uygulamalarda kullanılan 2 testin tek teste indirilmesiyle, delesyon ve duplikasyon mutasyonlarını hızlı ve etkin (delesyon duplikasyon mutasyonlarının %98'ini) biçimde tarayarak, yüksek maliyeti olmayan hızlı tanı yöntemini geliştirdik. Çalışmamızda, genetik analiz cihazını kullanarak, yöntemin yarı otomatik ve kolay uygulanabilir olmasını sağladık.

Tanı yöntemleri içinde, çoklu PZR yöntemi dışında, kas biyopsi örneklerinde distrofinin immünohistokimyasal incelenmesi, bağlantı analizi, FISH yöntemi, DGGE analizi, mikrochip çalışmaları, MLPA yöntemi ve nokta mutasyonlarının neden olduğu durumlarda DNA dizi analizi hastalığın tanısında kullanılabilen yöntemlerdir (2,4,12,24,26,32,43,46,53,56,71,76). Tüm bu yöntemler etkilenmiş bireylerde hastalığa neden olan mutasyonları tanımlayabilmekte ancak taşıyıcı tanısında sınırlı kalmaktadır.

Taşıyıcıların belirlenmesi için birçok merkezde aile ağacı analizleri, serum CPK düzeyi incelemeleri, Bayesian olasılık hesabı ve bağlantı analizi yöntemi rutin olarak kullanılmaktadır. RFLP, VNTR veya STR gibi gen içi ve gen dışı belirteçler kullanılarak yapılan bağlantı analizi çalışmaları, Distrofin geninde mutasyonun gösterilemediği durumlarda da uygulanan öncelikli yöntemdir. Taşıyıcıların belirlenmesine yönelik çeşitli yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunun temelini bağlantı analizleri oluşturmaktadır.

Taşıyıcı olduğu düşünülen bireyden alınan kandan ayrılan serumla uygulanabilen biyokimya testleri, kolay uygulanmaları, hızlı sonuç vermeleri ve

otomatize sistemlerle çok sayıda örneği tarayabilmeleri bakımından kuramsal olarak iyi birer tarama testidirler. Kas hastalıklarının tanısında, kas enzimlerinden CK, aldolaz ve LDH'nin serum düzeyleri incelenen parametrelerdir. Tajmaul ve arkadaşları (75) 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada trombositlerde bulunan ve proteolitik bir enzim olan mili-calpain (m-calpain) düzeylerinin taşıyıcılarda, kalsiyum metabolizmasının bozulması nedeniyle arttığını bildirmişlerdir. Ancak taşıyıcılık tanısı için kullanılabilen bir ölçüt olamamıştır. DMD/BMD taşıyıcısı olduğu düşünülen bireylerde, kontrol edilen rutin biyokimya parametresi serum CK düzeyidir. Bu parametre taşıyıcıların %70'inde yüksek bulunur. Bu artış sadece DMD/BMD'ye özgü olmayıp kas hastalıklarının çoğunda gözlenir. Özellikle kas hücresi zarının bozuklukları ve kas nekrozuyla giden miyopatilerde çok yüksek düzeylere ulaşabilir. Bunun yanı sıra hipotiroidide de serum CK düzeyi yükselir, hipertroidide ise düşer. Bu gibi durumlar taşıyıcıların belirlenmesinde karışıklıklara yol açar ve bu nedenle biyokimyasal parametreler taşıyıcılık tanısı açısından yetersiz kalmaktadır.

Bağlantı analizlerinin tarihsel gelişimine baktığımızda sırası ile RFLP, VNTR ve STR belirteçlerinin kullanıldığını görürüz. Enzim kesimi ile elde edilen parça uzunluğu analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP) kişilerin genetik yapısı hakkında bilgi sağlamasına karşın elde edilen bilgiler, bağlantı analizinin yapılabilmesi için bazen yetersiz kalmaktadır. Günümüzde RFLP paternlerinden daha fazla polimorfik özellikler gösteren DNA içindeki kısa tekrar dizilerinin (STR), tekrar sayılarını yol açtığı farklılıkların (STR belirteçleri) analizi kullanılmaktadır.

Chatuverdi ve ark. (CA) tekrarlarını kullanarak delesyon tespit edilememiş ailelerde yaptıkları taşıyıcılık incelemesinde 9 gen içi (CDVS-I, DYS-I, II, III, STR44, 45, 49, 50, 62/63, DYSMS) ve 1 gen dışı (STR75) belirteci otoradyografi ve poliakrilamid jel elektroforezini kullanmışlardır. Sonuç olarak 14 aile üzerinde yapılan çalışmada 68 aile bireyi test edilmiş, STR45/50, STR44/49 ve DYSMS/DYSII kombinasyonlarını en bilgilendirici (informatif) STR belirteç çiftleri olarak bulmuşlardır (12).

Clemens ve ark. çalışmasında STR44/45/49/50 kullanmıştır. Araştırmacılar, otoradyografi ve floresan saptamayı, sonuçları değerlendirmek için kullanmışlar ve STR50'yi $71,6 \pm 4,6$ ile bilgilendirici özelliği en düşük, STR49'u da $93,3 \pm 1,3$ ile bilgilendirici özelliği en yüksek STR belirteci olduğunu belirtmişlerdir (15). Bunun yanı

sıra CA taramalarında ürünler arasında 2 baz çiftlik fark beklerken bazı ürünler arası 1 baz farklılık gözlediklerini bunun da değerlendirme de güçlük yarattığını da vurgulamışlardır. Değerlendirmedeki bu güçlükleri aşabilmek ve saptama hassasiyetini arttırabilmek için Elhawary ve ark. iyon çifti ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kullanılabilceğini bildirmişler ve 80-587 baz çifti arası -1,28 +0,48 baz okuma hatası ile sistemin yüksek duyarlılıkla kullanılabilceğini belirtmişlerdir (27).

Alcantara ve ark. pERT87.8/TaqI ve pERT87.15/XmnI ile yaptıkları çalışma sonucu %12 gibi yüksek bir oranda rekombinasyon gözlenmesi, izole vakalarda gen içi bir delesyon polimorfizminin bulunması ve hastalığı taşıyan allelin kesin tanısının konulamaması nedeni ile bu gibi bağlantı analizlerinin kullanımını sınırlı bulmuşlardır (2).

Ülkemizde de Battaloğlu ve ark. 1992'de yaptıkları 79 aileden 250 bireyin incelendiği çalışmalarında taşıyıcıların belirlenmesinde CA tekrarlarını ve RFLP yöntemini rutinde kullanılabilcek bir uygulama olabileceğini bildirmişlerdir.(6)

Zhu ve arkadaşları çoklu PZR ile STR analizini ayrı karışımlar olarak delesyonları saptamak ve taşıyıcıları bağlantı analizi ile belirlemek için ayrı ayrı kullanmışlardır (80).

Neden olan mutasyonun bilinmediği veya bulunamadığı hastalıklarda bağlantı analizleri çok değerli tanı yöntemleridir. Günümüzde bağlantı analizlerinin kullanıldığı ikinci bir alan da PGT stratejileridir. Lee ve arkadaşları Distrofin geninin başlangıcı ve sonunda olmak üzere 2 polimorfik belirteci PGT'de kullanmışlardır. Belirteçlerin baz dizisini belirtmiş ancak hangileri olduğunu bildirmemişlerdir (54). Ray ve arkadaşları tek hücre multipleks PCR'ı, ekson 8, 19, 45,47 ve 51'de delesyonları göstermek için ve amelogenini de cinsiyet tayini için tasarladıkları bir yöntem olarak belirtmişler ve bunu da implantasyon öncesi genetik tanıda (PGT) kullanmışlardır (70).

Distrofin geninin büyüklüğünden kaynaklanan yüksek rekombinasyon oranı, bilgilendirici belirteçlerin olmaması, ailelerin küçük olması ya da etkilenmiş olguların erken kaybedilmesi durumları bağlantı analizi çalışmalarını kısıtlar (4,8,15).

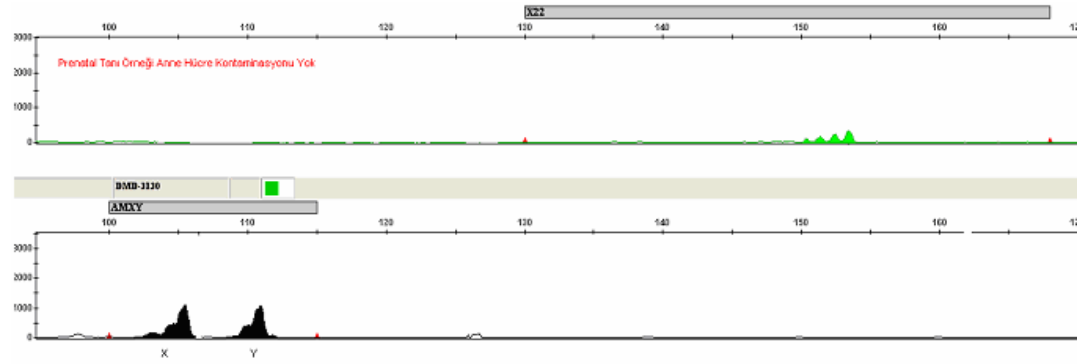
Çalışmamızda, X kromozomunun aile içindeki aktarımı hakkında (linkage=bağlantı) temel bir fikir vermesi açısından STR belirteçlerini kullandık.

Kullandığımız STR belirteç sayısını, çoklu PZR işlemini etkilememesi için, 3 taneyle sınırlı tuttuk. Bu belirteçleri kullanmaktaki esas amacımız, uygulayacağımız gen dozaj testinde ekson kopya sayılarının değerlendirilmesi için bu STR belirteçlerine ait tepe alanlarını referans almak ve iç standart olarak kullanmaktı. Çalıştığımız genetik analiz cihazının hassasiyeti 600 ± 1 baz çifti olmasına karşın elde edilecek tepelerin “Starter“ ve “+ A” artefaktlarının fazla olması nedeniyle yukarıda belirtilen çalışmalarda kullanılmış ikili nükleotit (CA) tekrarları yerine, dördü nükleotit tekrarları olan X22 ve DXS1236 STR belirteçleri ile doğum öncesi tanıda cinsiyetin kesin belirlenmesinde kullanılan ve amplifikasyonunun kalımlı olduğunu bildiğimiz Amelogenin’i hedef bölgeler olarak seçtik. Amelogenin ve X22 belirteçlerinin amplifikasyonları tüm olgularda kalımlıyken DXS1236’da amplifikasyonun başarısız olması nedeniyle, çalışmadan çıkardık. X22 belirteci ile X kromozomunun aile içinde geçişini tüm olgularda belirlememize karşın tek bir STR belirteci bağlantı analizi için güvenle kullanılamayacağından, taşıyıcılığın belirlenmesinde temel amacımız olan QF-PCR sonuçlarını kullandık. Gen dozaj hesaplamaları için bir referans genle, ilgilenilen genin karşılaştırılması esastır. Yapılan çalışmalarda özellikle, çoklu amplifikasyonlar uygulanıyorsa, PZR hatalarından dolayı yapılacak yanlış değerlendirmeleri önlemek için referans gen sayısının birden fazla olması önerilir (26).

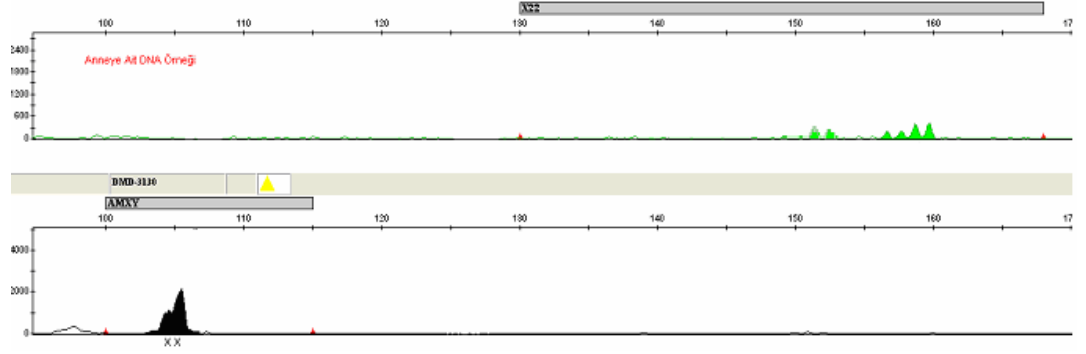
Çalışmamızda, ekson delesyon taşıyıcılığını değerlendirirken toplam tepe alanının, ilgilenilen ekson tepe alanına oranını kullandık. Böylelikle oluşacak PZR hatalarının, sonuçlarımıza yansımalarını en az düzeye inmesini sağladık. Yine de oluşabilecek hataların önlenmesinde STR belirteçleriyle, ekson tepe alan oranlarının kullanımını ikinci bir kontrol noktası olarak tanımladık. Böylelikle taşıyıcılık tanısında şüphede kalınan olguları 2 defa kontrol edebilme şansımız olabilir. Tez çalışmasında şüphede kaldığımız bir olgu olmadığı için, bu hesabı kullanmadık.

STR belirteçlerini seçmemizdeki amaçlardan biri de doğum öncesi tanı için alınan örneklerde (amniyon sıvısı, CVS gibi) yanlış tanıya neden olabilecek anne hücre kontaminasyonunu kontrol etmektir. (Şekil 19)

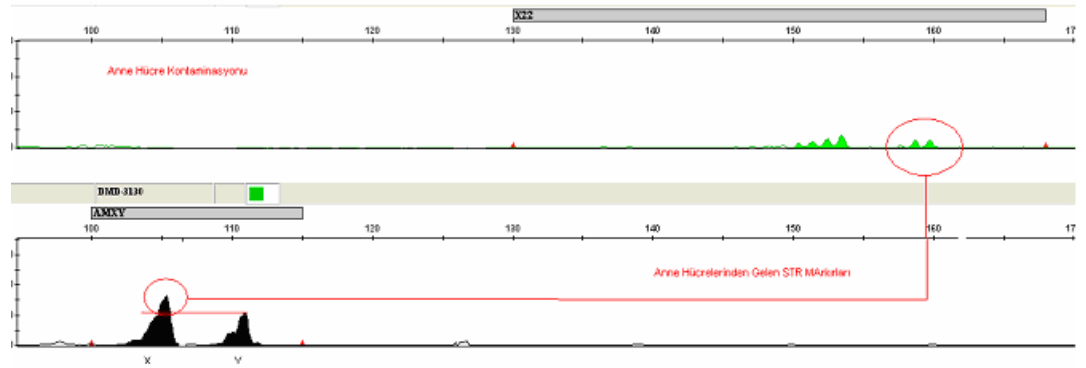
Şekil 19. Anne Hücre Kontaminasyonunun QF-PCR ile Saptanması



A



B



C

Normal şartlarda anne, taşıdığı X kromozomlarından birini erkek çocuğuna aktarır. Bu nedenle erkek çocukta X STR belirtecine ait, tek ve annenin bir belirteciyle

aynı tepe görülür. Annenin hücrelerinin, doğum öncesi tanı örneğine karıştığı durumlarda erkek çocukta X kromozomuna ait STR belirtecinde 2 tepe gözlenir. Bu durum, anne hücre kontaminasyonu olarak adlandırılır ve doğum öncesi tanıda yanlış tanılara neden olabilir. Örnek olarak delesyonu olan bir erkek fetustan alınan doğum öncesi tanı örneğinde anne hücre kontaminasyonu varsa, delesyona uğramış ekson bölgesinde tepe görülür ve sonuç normal (delesyon yok) olarak değerlendirilebilir.

Amelogenin en kalımlı ve iyi amplifiye olan STR belirteci olmasının yanı sıra cinsiyet belirlemede de kullanılabildiği için özellikle doğum öncesi tanıda kullanışlı bir belirteç olarak bulundu. X22 belirteci ise limitli olarak taşıyıcı kromozomun aile içi takibinde kullanışlı olduğunu bulduk. Örnek olarak Şekil 15C ve Şekil 16B'de sırasıyla Olgu 2 ve 3'ün ailelerinde 150 bp uzunlukta alleli taşıyan X kromozomunun delesyonlu DMD gen allelini taşıdığı gözlenmektedir. Olgu 2'de teyze kızının da 150 bp uzunluğunda alleli taşımasına rağmen taşıyıcı bulunmaması bu belirtecin bu hasta için yanlış bilgi verdiğini, bağlantı analizi için daha çok STR belirteci kullanımının gerekli olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak ileride geliştirilecek testlerde X'e ait STR belirteçlerinin ;

- a) Doğum öncesi tanıda, anne hücre kontaminasyonunu belirlemek amacıyla,
- b) Sonuçların kontrolünde ikinci bir referans ve kontrol noktası olarak,
- c) Daha fazla belirteç kullanımı ile bağlantı analizinin, ekson delesyon/duplikasyon analiziyle eş zamanlı yapılabilmesi için kullanımını önermekteyiz.

DMD/BMD mutasyonlarının tanısı için, daha önce de belirtildiği gibi FISH yöntemi, DGGE analizi, mikrochip çalışmaları, MLPA yöntemi ve nokta mutasyonlarının neden olduğu durumlarda DNA dizi analizi kullanılabilir.

Rosenberg ve ark. Distrofin geni delesyonlarını saptamak amacıyla 30 sağlıklı kadın, 9 hasta ve 21 taşıyıcıda yaptıkları çalışmada floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yönteminin etkinliğini araştırmışlardır. 6 kozmid prob kullanılarak 5-7, 8-9, 12-13, 43, 44, 45, 46-47, 49 ve 51. ekson delesyonlarını incelemişlerdir. Metafazlarda, eksona özgü problara ait çift sinyal görülen olgular heterozigot normal olarak tanımlamışlardır (72). Ligan ve ark. ekson 3-6, 8-12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 48, 50, 51 ve 60'a ait kozmid problemleri kullanarak yaptıkları çalışmada 24 aileyi ekson delesyon ya

da duplikasyon mutasyonları açısından taramışlardır (56). Araştırmacılar sonuç olarak FISH'in Southern Blot veya çoklu PZR gibi bir yönteme tercih edilmesinin uygun olmayacağı, fakat bilinen mutasyonlar için FISH'in yardımcı bir test olarak taşıyıcılık tarama amaçlı kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ek olarak günümüzde halen, 79 eksondan oluşan bu genin tüm eksonlarında delesyon ya da duplikasyon mutasyonlarını eş zamanlı tanımlayabilecek FISH prob setinin bulunmadığına dikkati çekmişlerdir.

Tez çalışması planlanırken optimizasyonunu yapmayı planladığımız çoklu PZR yöntemiyle elde edeceğimiz sonuçları FISH yöntemi ile de karşılaştırmayı hedeflemiştik. Tez proje önerisi aşamasında rutin kullanım için tasarlanmış ticari kit (Cytocell Aquarius Dystrophin Exon Specific Probe) kullanımında meydana gelen sorunlar ve etkin olmadığı gerekçesiyle tüm dünyada satıştan kaldırıldı. Bu nedenle de FISH yöntemini çalışmamızda kullanamadık. Rutin laboratuvar uygulaması çok zaman ve deneyim gerektiren, iyi sinyal elde etmesi ve değerlendirmesi her zaman mümkün olmayan, otomatize edilemeyen, maliyeti yüksek ve tarama sınırları tüm eksonlar için genişletilememiş olan bu yöntem DMD tanısında rutin uygulama alanına girememiştir.

Chip mikroarray yöntemi, DMD tanısı için kullanılabilecek yöntemler içinde de yerini almaya başlamıştır. Ferrance ve ark. bu amaçla mikro-total analiz sistemi geliştirmeye çalışmışlardır. Hedef olarak ekson 3,6,8,13,17,19,43,45,48,47 ve PM bölgeleri üzerinde yaptıkları denemelerde başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak halen optimizasyon ve standardizasyon sorunlarının olması ve yüksek maliyet nedeni ile mikroarray chipleri rutin uygulamaya girememiş, fakat gelecekte yaygın kullanılacak bir teknoloji olacağı düşünülmektedir (31).

Taşıyıcıların belirlenmesine yönelik son yıllarda yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler, bizim çalışmamızda olduğu gibi, gen kopya sayısının belirlenebilmesine yönelik gen dozaj testleridir.

DMD'de gerek delesyon tipi gerekse nokta mutasyonlarının tanısı için DGGE ve HPLC yöntemleri kullanılarak da çalışmalar yapılmıştır. Dolinsky ve arkadaşları herhangi bir mutasyon saptanamamış 20 DMD'li olguda yaptıkları çalışmada DGGE ile yeni mutasyonlar tanımlamışlardır. DGGE'nin yüksek mutasyon saptama oranına sahip (%100) bir yöntem olduğunu ve tanıda kullanılabileceğini bildirmişlerdir (24). Hung ve arkadaşları çoklu PZR yöntemiyle DHPLC'yi birleştirmişler ve yaptıkları 4 ayrı çoklu PZR (1. PZR ekson 3, 50, 6 ve 60, 2. PZR ekson 43, 13, 47, 52 ve PM, 3. PZR ekzon

46, 17, 8, 44 ve 46, 4. PZR ekzon 45, 19, 51, 12 ve 4) sonucunu HPLC ile değerlendirmişler, kapiler elektroforez ve MLPA gibi yöntemlere göre bu yöntemin radyoaktif veya floresan işaretleme gerektirmediği için daha kolay ve ucuz bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (43)

Bizim çalışmamızda, kullandığımız primerler florofofor işaretli oldukları için florofofor işaretleme işlemini PZR işleminden sonra ek bir yöntemle yapmamıza gerek kalmadı. Hung ve arkadaşlarının çalışmalarında yaptığı 4 ayrı PZR yerine, tek bir multipleks seti hazırladığımız için, PZR maliyetimiz belirtilen çalışmanın $\frac{1}{4}$ 'ü kadar olmuştur. Bunun yanı sıra sadece genetik analiz cihazı için harcanan sarfların örnek başına maliyeti yaklaşık 4\$'dır. Çoklu PZR ile gerektiğinde 79 eksonun da bir defada taranabileceği ve yurtdışında maliyetlerinin daha düşük olduğu düşünüldüğünde kapiler elektroforez taşıyıcılık taramasında oldukça ucuz ve uygun bir yöntem olacaktır.

Kumari ve arkadaşları çoklu PZR'nin delesyon saptamasının yanı sıra PZR'nin logaritmik fazda durdurulması ile gen miktarı belirlenerek taşıyıcıların saptanmasında da denenebileceğini yaptıkları bir çalışmada belirtmişlerdir (50).

Ionnau ve arkadaşları de Beggs ve Chamberlain'a ait çoklu PZR setlerini kullanarak PZR'nin logaritmik fazında amplifikasyonu durdurarak gen kopya sayısının belirlenebileceği PZR işlemini uygulamışlardır. Sonuçları poliakrilamid jel elektroforezi ve otoradyografi ile değerlendirmişlerdir. 23-25 döngüden sonra PZR ürününün doyuma ulaştığını, bu yüzden amplifikasyonun bu döngü sayısında önce durdurularak analizlerin yapılması gerekliliğini bildirmişlerdir (44). Saptama yöntemi ve amplifikasyon karışımının yapısı gereği bu araştırmacılar 50-250µg (50.000ng-250.000ng) DNA örneğini başlangıç hedefi olarak kullanmışlardır. Bu miktar PZR işleminin erken dönemde doyuma ulaşmasına neden olmuştur. Biz çalışmamızda doğum öncesi tanı için alınan örneklerden az miktarda DNA elde edilebildiğinden yola çıkarak, az miktarda DNA ile çalışmayı hedefledik (1-10ng).

DMD tanısında, çoklu PZR kadar popüler ve taşıyıcılık belirlenmesinde de kullanılabilir olan başka bir gen dozaj yöntemi yeni bir yöntem olan multipleks ligasyon prob amplifikasyon (MLPA) tekniğidir. Gatta ve arkadaşlarının klinik tanı, EMG ve kas biyopsisi sonuçlarına göre DMD tanısı almış 9 aile ile BMD olarak değerlendirilmiş 3 ailede bu tekniğin etkinliğini araştırmışlardır. İncelenen 22 birey için 20 sonuç bilgilendirici nitelikte (%90,9) olarak değerlendirilmiş ve taşıyıcılık

durumlarının da saptanabildiği belirtilmiştir (32). Jansen ve arkadaşları 193 olgudan oluşan daha geniş bir seride retrospektif ve prospektif analizleri MLPA tekniğini kullanarak yapmışlardır. Orijinal protokol üzerinde olumsuzluklara neden olabilen faktörleri ortadan kaldırmak için bazı değişiklikler yapmış ve elektroforez sonuçlarının kalitesini arttırmak için kolon saflaştırma yöntemini de eklemişlerdir. Bir ailede ekson 38 delesyonu ve başka bir ailede ekson 37 delesyonu bildirmişlerdir. Çeşitli örnek türleri ile (kan, CVS, amnion sıvısı gibi) çalışabilme olanağı, 79 eksonu taramanın mümkün olması ve taşıyıcıların da belirlenebilmesi gibi özellikleri MLPA yönteminin başlıca avantajlarıdır. Polimorfizmler nedeniyle tek ekson delesyonlarının saptanmasında problemler yaşandığını ve kompleks düzenlenmelerde testin gücünün yeterli olmadığını belirtmişler fakat bu gibi durumların sık gözlenmediğini de eklemişlerdir (46). Lai ve arkadaşları da MLPA tekniğini klasik çoklu PZR ile karşılaştırmıştır. Bu amaçla 45 DMD tanılı ve 20 BMD tanılı olguda her iki yöntemin de mutasyon saptamadaki gücünü karşılaştırmışlar, MLPA'nın çoklu PZR'den daha fazla delesyon saptayabildiğini belirtmişlerdir. MLPA yönteminin 2 olguda tek ekson delesyonu için yanlış sonuç verdiğini ve tek ekson delesyonlarının mutlaka PZR ile doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir (53).

Uygulama olarak MLPA yöntemi işlemin uzun sürmesi, pek çok manüplasyon aşamasının bulunması nedeni ile rutin uygulaması zor olan bu testin optimizasyon ve standardizasyonu da bu nedenlerle zordur (46,51,52). 79 eksonun aynı anda taranabilmesi, hazır ticari kitinin bulunması MLPA yönteminin avantajlarıdır. Taşıyıcıların tanısında her hastanın sonuçlarının istatistiksel olarak doğru hesaplanabilmesi için en az 3 kontrol testinin de örnekle birlikte yürütülmesinin gerekliliği, testi uygulayabilmek için gerekli DNA miktarının QF-PCR'dan fazla olması da MLPA testinin QF-PCR yöntemine göre dezavantajıdır.

Çoklu PCR ile ilgili son yayın Ashton ve arkadaşlarının 2008'de yayınladıkları makaledir. Bu makalede araştırmacılar, 12 çoklu PZR seti kullanarak, DMD'nin tüm eksonlarında meydana gelebilecek delesyonları belirlenmesinde QF-PCR yöntemini denemişlerdir. Uyguladıkları yöntemin diğer çalışmalardan farklılığı, PZR 22. döngüde durdurulmuş ve ürünlere, QF-PCR için alınıp delesyon ve duplikasyonların saptanması sonrasında 8 döngü daha yapılmış, normal örneklerle karşılaştırılan hasta örneklerinin heterodupleks analizinin yapılarak nokta mutasyonlarının da tanımlanabileceğini

bildirmiş olmasıdır. Çalışmalarında QF-PCR'ın hızlı, güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmiş ve DMD/BMD taşıyıcılığında da kullanılabilir bir yöntem olabileceğine değinmişlerdir (3).

Çalışmamızda 24 ailede DMD/BMD'li hasta ve taşıyıcılık durumlarını değerlendirdik. 24 ailenin 5'inde (1., 3., 11., 12. ve 14. aile) mutasyon hastada gösterildi ancak annede taşıyıcılık görülmedi ve hastada yeni mutasyon olarak değerlendirildi. Kalan 19 ailede, anneler taşıyıcı olarak değerlendirildi. İki ailede (2. ve 4. aile) olguların kız kardeşlerinde de taşıyıcılık durumu belirlenirken, 2. ve 6. ailedeki teyze kızları sırasıyla normal ve taşıyıcı olarak değerlendirildi. Gerek yeni mutasyon olarak değerlendirmeler, gerekse taşıyıcılık durumları, olgular ve annelerinin daha önceki sonuçları, aile değerlendirmeleri ile uyumluydu. Ailelerde belirlenen mutasyonlar dışında taşıyıcılık saptamamız, sağlıklı bireylerden alınan DNA örneklerinin incelenmesinde de taşıyıcılık durumu gözlemememiz nedeni ile tez çalışmamızda yanlış taşıyıcılık saptamadık. Testin tanısal değeri için, optimizasyon çalışmaları sonucu, sağlıklı bireylerden yapılan veri analizleri ile elde edilebilecek DNA'ların normal dağılıma %88.75 oranında uyabileceğini, normal dağılıma uymayan kısmın ($X < X_{min}$) %10.27 olduğu normal dağılım eğrilerinin analizi sonucu hesaplanmıştır (Tablo 16).

$X < X_{min}$, DNA kalitesinin kötü olması ya da miktarının az olmasına bağlı sonuç alınamayan durumdur. Böyle bir durumda testin tekrarı gereklidir. Yeterli miktarda, kaliteli DNA ile yeniden yapılacak çalışmada, yukarıda belirttiğimiz %10.27'lik oranda kalan olgulara da sonuç verilebileceği düşünülürse, yöntem %99.02 oranında taşıyıcıların tanısını koydurabilecek bir testtir.

Olguların önceden aldığı delesyon tanıları, yöntemimizle elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırıldığında, 24 ailenin 20'sinde daha önceki tanı sonuçları ile bire bir uyum gösterirken, 4 ailede farklılıklar bulduk. Ancak önemli olan nokta, farklılık gördüğümüz olgular da dahil, tüm delesyonların bölgesel olarak önceki hasta raporları ile örtüşmesiydi. Böylelikle kantitatif PZR test sonuçlarımızın önceki sonuçlar ile bölgesel olarak tam uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Saptadığımız farklılıklar; 3. ailede ek 13. ekson delesyonu, 4. ailede ek 49. ekson delesyonu, 12. ailede ek 49. ekson delesyonu ile 10. ailede 47-52. ekson delesyonunda 47.eksonu sağlam olarak saptamamızdır. Bu farklılıklar, yöntemlerin

temeli PZR olduğundan, özellikle primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar olarak düşünülebilir. Her ne kadar bu duruma karşı primerlerimizi gen bankası verileri ile karşılaştırsak ta Yau ve arkadaşları bu tip varyasyonlar nedeni ile meydana gelen değerlendirme başarısızlıkları bildirmişlerdir (79). Ülkemize özgü, primer bağlanma bölgeleri dizilerine ait veri tabanı bulunmadığından bu gibi sonuçlar mutlaka DNA dizi analizi ile doğrulanmalıdır. Kantitatif PZR yöntemi üzerine ilk çalışmaları yapan Mansfield ve arkadaşları 14 merkezin katıldığı çalışmada 9 ekson bölgesinden en az birinin çoğalmasında problem olduğuna dikkati çekmişler, özellikle ekson 48'in değerlendirmede en problemleri ekson olduğunu bildirmişlerdir (58). Çalışmamızda, bu eksonla ilgili bir sorun olmamıştır.

Yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonucu, kantitatif floresan PZR testini uygulamada laboratuvarın iş yükünü azaltabilecek, testin tanısal değerini arttıracak şekilde geliştirdik. Rutin kullanılan çoklu PZR testinin, iki aşamalı çoklu PZR işleminden tek aşamaya indirilmesi sağladığımız kolaylıkların ilki olarak düşünülebilir. İşlemin tek tüpe indirilmesi, laboratuvar iş yükünü azaltarak maliyeti düşürmesinin yanı sıra, test karışımına eklediğimiz STR belirteçleri, çoklu PZR işlemiyle ilgili yaptığımız en önemli değişikliktir. Böylelikle, doğum öncesi tanı örneklerinde, hem iç kontrol eklenmesi, hem de anne hücre kontaminasyonunun yapılan tek PZR işlemiyle belirlenebilmesi, testin tanısal gücünü ek işlemlere gerek kalmadan arttırabilecektir. PM bölgesi ile 18 ekson mutasyon analizini yapmayı hedeflediğimiz yöntemimiz, gerektiğinde daha fazla eksonun incelenmesini sağlayabilecek, SSCP ya da HMA gibi yöntemlerle birleştirilerek nokta mutasyonlarını da tarayabilecek bir sistem haline getirilebilir. Bu da yöntemimizin, DMD/BMD hasta ve taşıyıcılık durumu belirlenmesinde tanısal gücünü daha da arttırabilecektir.

Sonuç olarak QF-PCR yöntemini, DMD/BMD'ye yol açan ve en sık gözlenen delesyon mutasyonların saptanmasında hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak tanımladık. Yine bu yöntemi, hastalıkla ilgili mutasyonlar için taşıyıcı olan bireylerin saptanmasında kullanılacak bir tarama testi olarak, laboratuvar şartlarına bağımlı, pahalı ve zaman alan diğer tarama testlerinin aksine daha ucuz, rahat uygulanabilen, tekrarlanabilir sonuçların alınabileceği ve hızlı bir test olarak tanımladık.

KAYNAKLAR

1. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. (1997): Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* Dec. 17(13):1299-311.
2. Alcántara M.A., García-Cavazos R., Hernández E. (2001): Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Annales de Génétique* 44;149–153.
3. Ashton E.J, Yau SC, Deans ZC, Abbs SJ. (2008): Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. *Eur J Hum Genet.* 16(1):53-61.
4. Bachrati C.Z. Z Somodi, Enderffy T.,Kalmar T,Ransko I. (1998): Carrier detection by microsatellite analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Hungarian families. *Ann Hum Genet.* 62;511-20.
5. Batchelor C., Winder S. (2006): Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 16(4):198-205.
6. Battaloğlu E, Telatar M, Deymeer F, Serdaroğlu P, Ozdemir C, Kuseyri F, Apak MY, Tolun A. (1992): Carrier detection by DNA analysis in Duchenne muscular dystrophy families. *Turk J Pediatr.* 34(2):79-92.
7. Beggs.A. KunkelL.M. (1990): Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophies. *J.Clin. Invest.* 85(3):613-9.
8. Bieber F.R., Hoffman E.P., Amas A.J. (1989): Dystrophin analysis in duchenne muscular dystrophy: use in fetal diagnosis and in genetic counseling.*Am J Hum Genet.* 45(3):362-7.
9. Bushby K.M.D., Appleton R., Anderson L.V.B., Welch J.L., Kelly P., Gardner-Medwin D. (1995): Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.* 37:260-269.
10. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier JE, Nguyen PN, Caskey C.T. (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16(23):11141-56.
11. Chamberlain, J. S. (2002): Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 11;2355-2362.
12. Chaturvedi L.S., Srivastava S., Mkhherjee M., Mittal R.D (2001): Carrier detection in non-deletional Duchenne/Becker muscular dystrophy families using polymorphic dinucleotide (CA) repeat loci of dystrophin gene. *Indian J Med Res.* 113;19-25.
13. Chaturvedi L.S., Mkhherjee M., Srivastava S., Mittal R.D., Mittal B. (2001): Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med.* Dec 31-33.
14. Choueiri M.B., Nadine J.M., Tony G.Z., Farid M., Adra A.M., Zeid R., Mrouch A.M., Zalloua R.A. (2006): The consanguinity effect on QF-PCR diagnosis of autosomal anomalies.*Prenat Diagn.* 26(5):409-14.
15. Clemens P.R., Fenwick R.G., Chamberlain J.S., Gibbs R.A., de Andrade M., Chakraborty R., Caskey C. T. (1991): Carrier detection and prenatal diagnosis in

- Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 49; 951-960.
16. Crigliano V., Ejarque M., Cañadas M.P., Lloveras E., Plaja A., Perez M.M., Fuster C., Egozcue J. (2001): Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 7(10):1001-6.
 17. Crigliano V., Voglino G., Cañadas M.P., Marongiu A., Ejarque M., Ordoñez E., Plaja A., Massobrio M., Todros T., Fuster C., Campogrande M., Egozcue J., Adinolfi M. (2004): Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod.* 10(11):839-46.
 18. Crigliano V., Voglino G., Adinolfi M. (2005): Non-invasive screening and rapid QF-PCR assay can greatly reduce the need for conventional cytogenetic analyses in prenatal diagnosis. *Reprod Biomed Online.* 11(6):671-3.
 19. Dalkilic I., Kunkel L.M. (2003): Muscular dystrophies; genes to pathogenesis *Curr Opin Genet Dev.* 13(3):231-8.
 20. Davies, K. E., Speer A., Herrmann F., Spiegler A.W.J., McGlade S., Hofker M. H., Briand P., Hanke R., Schwartz M., Steinbicker V., Szibor R., Korner H., Sommer D., Pearson P. L., Coutelle C. (1985): Human X chromosome markers and Duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res.* 13:3419-3426.
 21. Davies K.E., Pearson P.L., Harper P.S., Murray J.M., O'Brien T., Sarfarazi M., Williamson R. (1983): Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 11(8):2303-12.
 22. Deconinck N., Bernard D. (2006): Pathophysiology of Duchenne Muscular dystrophy: Current Hypothesis. *Pediatr Neurol* 36(1):1-7.
 23. Van Deutekom J.C.T., Ommen G.J.B. (2003): Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* 4(10):774-784.
 24. Dolinsky L.C.B., Moura-Neto R.S, Falcao-Conceição D.N. (2002): DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and carriers of dystrophin gene. *Neuromus Disord.* 12;845-858.
 25. van Essen A. J., Busch H. F. M., te Meerman G. J., ten Kate L. P., (1992): Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in the Netherlands. *Hum. Genet.* 88;258-266.
 26. Elles R., Mounthford R. (ed) (2004): Molecular diagnosis of genetic diseases 2nd ed. Chapter 8, Mann K., Prenatal detection of chromosome aneuploidy by QF-PCR; Chapter 16, Kneppers A.L., Ginjaar B., Bakker E., Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. Humana press USA.
 27. Elhawary N.A., Shawky R.M., Elsayed N. (2006): High-precision DNA microsatellite genotyping in Duchenne muscular dystrophy families using ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 39(7):758-61.
 28. Eraslan S., Kayserili H., Apak M.Y., Kirdar B. (1999): Identification of point mutations in Turkish DMD/BMD families using multiplex-single stranded conformation analysis (SSCA). *Eur J Hum Genet.* 7(7):765-70.

29. Emery A.E.H. (ed) (1998): Neuromuscular disorders: Clinical and Molecular genetics. Chapter 3. Baker E., Van Ommen G.J.B. Chichester, Wiley.
30. Emre M. (ed) 8th ed (Türkçe çeviri) (2006): Adams and Victor's Principles in Neurology Kısım 5-50, Odabaşı Z. Güneş Kitabevi, Ankara.
31. Ferrance J.P., Wu Q., Giordano B., et al (2003): Developments toward a complete micro-total analysis system for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. *Analytica Chimica Acta* 500;223–236.
32. Gatta V., Scarciolla O., Gaspari A.R., Palka C., De Angelis M.V., Di Muzio A., Guanciali-Franchi P., Calabrese G., Uncini A., Stuppia L. (2005): Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.* 117(1):92-98.
33. Gillard E.F, Chamberlain J.S. (1989): Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am.J. Hum Genet* 45(4):507-20.
34. Grimm T., Muller B., Dreier M., Kind E., Bettecken T., Meng G., Muller C. R. (1989): Hot spot of recombination within DXS164 in the Duchenne muscular dystrophy gene. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 368-372.
35. Gualandi F., Rimessi P., TrabANELLI C., Spitali P., Neri M., Patarnello T., Angelini C., Yau S.C., Abbs S., Muntoni F., Calzolari E., Ferlini A. (2006): Intronic breakpoint definition and transcription analysis in DMD/BMD patients with deletion/duplication at the 5' mutation hot spot of the dystrophin gene. *Gene.* 29;370:26-33.
36. Harper P.S. (ed) (2004): Practical Genetic Counseling 6th ed. Arnold, Part I-2, Part II-11.
37. Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. (1997): Multiplex PCR: Critical parameters and step by step protocol. *BioTechniques* 23;504-51.
38. Heydemann A., Huber J.M., Demonbreun A., Hadhazy M., McNally E.M. (2005): Genetic background influences muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 15(9-10):601-9.
39. Heydemann A., Doherty K.R., McNally E.M. (2007): Genetic modifiers of muscular dystrophy: implications for therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1772(2):216-28.
40. Hoogerwaard, E. M., Ginjaar, I. B., Bakker, E., de Visser, M. : Dystrophin analysis in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 65: 1984-1986, 2005
41. Hoogevard E.M., Bakker E., Ippel P.F., Oosterwijk J.C., Majoor-Krakauer D.F., Leschot N.J., Van Essen A.J., Brunner H.G., van der Wouw P.A., Wilde A.A., de Visser M. (1999): Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet.* 353(9170):2116-9.
42. Hoshino S., Ohkoshi N., Masahiko W. (2000): Immunohistochemical staining of dystrophin on formalin-fixed paraffin-embedded sections in Duchenne/Becker muscular dystrophy and manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 10(6):425-9.

43. Hung C., Su N.Y., Lin Yang Lee, et al. (2005): Denaturing HPLC Coupled with MultiplexPCR for Rapid Detection of large deletion in DMD carriers. *Clin. Chem.* 51: 1252-1256.
44. Ioannau P., Christopoulos M., Panayides K., Middelton L. (1992): Detection of duchenne muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex PCR. *Neurol.* 42;1783-1790.
45. Jacobs P.A., Hunt P.A., Mayer M., Bart R.D. (1981): Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X-autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 513-518.
46. Jansen B., et al. (2005): MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene; potentials and pitfalls. *Neurogenetics.* 6;29-35.
47. Katayama Y., Tran V.K., Hoan N.T., Zhang Z., Goji K., Yagi M., Takeshima Y., Saiki K., Nhan N.T., Matsuo M. (2006): Co-occurrence of mutations in both dystrophin- and androgen-receptor genes is a novel cause of female Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 119;516-519.
48. Kingston H.M., Thomas N.S.T., Pearson P.L., Sarfarazi M., Harper P.S. (1983): Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the X chromosome. *J. Med. Genet.* 20;255-258.
49. Koeing M., Beggs A.H., Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T., Meng G., Müller C.R., Lindlöf M., Kaariainen H. (1989): The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 45(4):498-506.
50. Kumari D., Mital A., Gupta M., Goyle S. (2003): Deletion analysis of the dystrophin gene in duchenne and becker muscular dystrophy patients: Use in carrier diagnosis. *Neurol India* 51; 223-226.
51. Kuşkucu A., Kuşkucu M., Yılmaz Ş., Hacıhanefioğlu S., Yüksel A. (2007): Screening subtelomeric rearrangements using MLPA 6th European Cytogenetic Conference 2007, İstanbul.
52. Kuşkucu A., Yüksel A. (2007): Subtelomerik değişimlerin taranmasında MLPA yönteminin uygulanması. *Ulusal Çocuk Nörolojisi Günleri 2007, İstanbul.*
53. Lai K.K.S., et al (2005): Detectin exon deletions and duplications of DMD gene using MLPA. *Clin. Biochem.* 39;367-372.
54. Lee S.H, Kwak I.P, Cha K.E, Park S.E, Kim N.K, Cha K.Y, (1998): Preimplantation diagnosis of non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by polymerase chain reaction analysis. *Mol Hum Reprod* 4;345-349.
55. Leiden Muscular Dystrophy Page, www.dmd.nl
56. Ligon A., Kashork C.D, Richards C.S, Shaffer L.G. (2000): Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Hum Genet.* 8(4):293-8.
57. Mann K., Fox S.P., Abbs S.J., Yau S.C., Scriven P.N., Docherty Z., Ogilvie C.M. (2001): Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet.* 358(9287):1057-61.

58. Mansfield E.S, et al. (1993): Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Carrier Detection using Quantitative PCR and Fluorescence-Based Strategies. *Am J Med. Genet.* 48:200-208.
59. McClorey G., Fletcher S., Wilton S. (2005): Splicing intervention for duchenne muscular dystrophy. *Cur.OP.in Pharma.* 5;529-534.
60. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. (2003): Dystrophin and mutations: one gene several proteins, multiple phenotypes. *Review Neurology* 2; 731-739.
61. Nudel U., Yaffe D. (2001): The duchenne Muscular Dystrophy Gene: Structure, Evolution, Expression and function of the products. http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day/book/uri_nudel.pdf
62. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard F.H. (ed) (2007) *Thompson&Thompson Genetics in Medicine*, Chapter 7, 12 7th Edition. Saunders.
63. Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) www.ncbi.nlm.nih.gov
64. Orr H. A. (1993): Haldane's rule has multiple genetic causes. *Nature* 361: 532-533.
65. Öge A.E, Bahar S.Z (ed) (2004): İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Ders Kitabı, Bölüm 33, Serdaroğlu P., Deymeer F. Kas ve Nöromusküler Kavşak Hastalıkları.
66. Öner C. (çev. Ed) (2002): *Genetik Kavramlar*. Bölüm 21. Klug W., Cummings M., Palme yayıncılık, Ankara.
67. Parent A.D, (2005): Duchenne de Boulange, Parkinsonism Relat Disord. 11; 411-412.
68. Parsons E., Bradley D., Clarke A. (2004): Developmental progress in Duchenne Muscular Dystrophy: lessons for earlier detection. *Europ.J.Ped.Neurol.* 8;145-153.
69. Ramelli G.P., et al (2006): Becker muscular dystrophy with marked divergence between clinical and molecular genetic findings. *Swiss Med. Wkly* 136;189-193.
70. Ray F.P., et al. (2001): Single cel multiplex PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with gender determination. *Mol. Hum. Reprod.* 7(5): 489-494.
71. Romero N.B., et.al. (2001): Pseudo-metabolic presentation in a Duchenne muscular dystrophy symptomatic carrier with denovo duplication of dystrophin gene. *Neuromuscular disorders* 11;494-498.
72. Rosenberg C. (1998): Clinical Diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridisation. *Neuromuscular disorders.* 8;447-452.
73. Sbiti A., (2002): Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan Patients. *J. Biomed & Biotech.* 158-160.
74. Sümbüloğlu K. (1990): *Biyoistatistik Kitabı*. Hatipoğlu yayınevi, Ankara.
75. Tajamul H., Geetha D.N., Kusuma K.C., Anandaraj M.P.J.S. (1998): Deletion analysis&calpain status for carrier detection in a family with DMD. *Ind J. Med. Res.* 108;93-7
76. Traverso M. Malnati M., Minetti C., et al. (2006): Multiplex realtime PCR for detection of deletion and duplication in dystrophin gene. *Biochem.&Biophysical Res. Comm.* 339;145-150

77. Truffey-Giraud S. et al. (2004): The role of muscle biopsy in analysis of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy: experience of a national referal centre. *Neuromuscular disorders*. 14;650-658
78. Tunçbay T., Tunçbay E. (ed) (2004): *Nöromusküler Hastalıklar Bölüm 19MN-Medikal-Nobel Tıp Kitapevi. İstanbul.*
79. Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J. (1996): Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J.Med Genet*. 33(7):550-558.
80. Zhu H.Y., Wu L.Q., Liang D.S., Pan Q., Xia JH. (2006): Identify female carriers and de novo mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Acta Genetica Sinica*. 33(3),206-212.

FORMLAR

T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MOLEKÜLER GENETİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ
 OLUR FORMU ***

Proje Adı: “Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile Duchenne Kas Distrofisi taşıyıcılarının saptanması ”

Hastalık adı: DUCHENNE KAS DİSTROFİSİ

Tarih:

Bu araştırma, kalıtsal bir hastalığı bulunan hastalar ile ailelerini ilgilendiren bir çalışmadır. Böylesi bir çalışmaya katılma kararı vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Aşağıdaki **Moleküler Genetik Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Onay Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı : Araştırmanın amacı yukarıda belirtilen genetik hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir .

Hastalığa neden olan gen ve genlerin normal olarak tanımlanabilmesi amacı ile yapılacak analizler için sizden kan örnekleri almamız gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır.

2. Olası riskler ve faydalar :

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Sizde, hastalığa neden olan gen mutasyonunun taşıyıcılık durumunu saptadığımızda, bulgularımızı istediğiniz takdirde size bildireceğiz. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Çocuklarla ilgili açıklamalar: Çalışmalarımıza daha önceden moleküler yöntemlerle kesin tanı almış çocuklar dahil edileceğinden yapılacak araştırmada onlar ile ilgili yeni ya da farklı sonuçlar elde edilmeyecektir. Çocukları çalışmamıza dahil etmemizin nedeni uygulanacak yöntemin duyarlılığını belirlemek olacaktır. Bu açıklamalar doğrultusunda çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar :Bu çalışmanın esas amacı saptanan genetik hastalığa neden olan veya ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik faktörlerin normal düzeyini öğrenmektir. Biz bu aşamada size veya çocuğunuza doğrudan yada dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte bu hastalığa sahip bireylerin ailelerinin diğer fertleri ve de diğer hastalara ve hasta yakınlarına daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahiptir.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

(Doktor Adı)

hastaya, -----

(Aile adı)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :

Doktorun imzası:

İzin :

Yukarıda tanımlanan araştırmanın uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

Adı Soyadı	Doğum tarih	İmza	(Ebeveyn)
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 5229

İstanbul, / 10 Mart 2006

Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İLGİ: 23.02.2006 tarihli, 225 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Genetik Programı Doktora öğrencisi **AYŞEGÜL ÇINAR** tarafından hazırlanan "Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF PCR) Yöntemi İle Duchenne Kas Distrofisi Taşıyıcılarının Saptanması ve Yöntemin Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi İle Karşılaştırılması" başlıklı proje hakkındaki ilgi yazınız ve ekleri **07 Mart 2006** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya

Prof.Dr. Halil YANARDAĞ
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşegül	Soyadı	Çınar Kuşkucu
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	15.12.1976
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kim No	30176027006
Email	acinar@ogr.iu.edu.tr	Tel	02126612560

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	Sürmekte
Yük.Lis.	-	
Lisans	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	2001
Lise	Cağaloğlu Anadolu Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi	86	
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi	88	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	61	62	62
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Genel işletim Sistemleri	Çok İyi
Ofis Programları	Çok İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Y. Tarkan-Argüden, D. Kuru, A. Çırakoğlu, A. Deviren, Ş. Yılmaz, G. Sağcı-Güven, **A. Çınar**, et al. İ.Ü. GETAM Sitogenetik Laboratvarında 1994-2001 Yıllarında Çalışılan Hematolojik Kansere Örnekleri. 5. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 2002

Ş. Yılmaz, **A. Çınar**, Y. Tarkan-Argüden, et al. Tekrarlayan düşükleri olan 214 çiftte sitogenetik incelemeler 5. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 2002

A. Çınar, Z. Azaklı, H. Kayserili et al. Konjenital Kutis Laksa Sendromu Gösteren 4 Olgu Sunumu. VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 2004

A. Çınar. Tanısız Olgular. III. Dismorfoloji Günleri. 2005

A. Çınar. Trizomi 18 Sendromu, Ek Dismorfik Bulgular. III. Dismorfoloji Günleri. 2005

A. Çınar. Joubert Sendromu ve Dengesiz Translokasyon III. Dismorfoloji Günleri. 2005

Ş. Yılmaz, Tarkan –Argüden Y, Çırakoğlu A, Kuru D, Güven G, Kurt H, Birinci N, **Çınar A**, Öngören Ş, Üre Ü, İzmir-Güner Ş, Deviren A, Hacıhanefioğlu S. Cytogenetic findings of adult ALL cases. XXXth World Congress of the International Society of Hematology 2005

A. Çınar. Preimplantasyon Genetik Tanı 2. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi 2006

Tarkan-Argüden Y, Yılmaz Ş, Çırakoğlu A, Güven G, Kuru D, **Çınar A**, Öngören Ş, Ar C, Başlar Z, Deviren A, Hacıhanefioğlu S. İmatinib Tedavisi Gören Kronik Miyeloid Lösemi Olgularının Kemik iliği Materyallerinde Klonal Evolüsyon İncelemesi VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 2006

Çınar A, Kuskucu Mert, Yılmaz S, Deviren A, Yüksel A, Hacıhanefioğlu S A nonmosaic trisomy 18 case with long term survive 7th Balkan Meeting on Human Genetics BMHG 2006

Kuşkucu A, Kuşkucu M, Yılmaz Ş, Hacıhanefioğlu S, Yüksel A Screening subtelomeric rearrangements using MLPA 6th European Cytogenetic Conference 2007 İstanbul

Kuşkucu A, Yüksel A Subtelomerik değişimlerin taranmasında MLPA yönteminin uygulanması Ulusal Çocuk Nörolojisi Günleri 2007 İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik

Bale

Seyahat