

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HUNTINGTON HASTALIĞI GENİ (IT-15)
POLİMORFİK ÖZELLİKLERİNİN NORMAL VE
MUTANT ALELLERDEKİ DAĞILIMI**

Dr. Halil Gürhan KARABULUT

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK DOKTORA TEZİ**

T 88986

DANIŞMAN

Prof. Dr. Işık BÖKESÖY

1999, ANKARA

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HUNTINGTON HASTALIĞI GENİ (IT-15)
POLİMORFİK ÖZELLİKLERİNİN NORMAL VE
MUTANT ALELLERDEKİ DAĞILIMI**

Dr. Halil Gürhan KARABULUT

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Işık BÖKESÖY

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 99-09-00-09 proje
numarası ile desteklenmiştir.**

1999, ANKARA

DOKTORA
TEZ SINAVI TUTANAĞI
~~YÜKSEK LİSANS~~

Öğrencinin Adı Soyadı : Halil G. Karabulut
Enstitüye Kayıt No : 93723102
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji / Tıbbi Genetik Doktor
Tez Konusu : Huntington Hastalığı için (IT15) polimorfizm
Tez No :
Sınav Tarihi : 27-12-99
Sınav Başlama Saati : 10³⁰
Sınav Bitiş Saati : 11³⁰

Karar :

Süresi içinde tamamlanan sınav sonucunda, yukarıda konusu ve numarası belirtilen tezin

- ☐ düzeltilmesine
☒ kabulüne
☐ reddine

oybirliği / oyçokluğu ile karar verilmiştir.

Gerekçe :

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nemin Mutlu
Üye

Prof. Dr. Sökye Ayte
Üye

Doc. Asma Supretili
Üye

Prof. Dr. Isik Baysal
Üye

Doc. Dr. Ali T. K. K.
Üye

Dinleyici Listesi ektedir.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Kısaltmalar	ii
Şekiller Dizini	iv
Çizelgeler Dizini	vi
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1. Çalışma Grubu	12
2.2. Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi	12
2.2.1. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	12
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
2.2.3. Asimetrik Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
2.2.4. Dizi Analizi	17
2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	18
3. BULGULAR	19
3.1. Çalışma Grubu	19
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	20
3.3. Polimorfik Özellikler	22
3.3.1. G→A ve C→T Nokta Mutasyonları	22
3.3.2. A → G ve C→G Nokta Mutasyonları	23
3.3.3. Altılı ve Yirmili Tekrar Dizileri	23
3.3.4. CAG ve CCG Dizileri Tekrar Sayısı ve Kesikli Tekrar Dizileri	25
4. TARTIŞMA	27
5. SONUÇ	31
ÖZET	32
SUMMARY	33
KAYNAKLAR	34
EK	37

KISALTMALAR

bç:	Baz çifti
Cen:	Sentromer
ddATP:	Dideoksiadenozin trifosfat
ddCTP:	Dideoksisitidin trifosfat
ddGTP:	Dideoksiguanozin trifosfat
ddTTP:	Dideoksitimidin trifosfat
dATP:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP:	Deoksitidin trifosfat
dGTP:	Deoksiguanozin trifosfat
dH₂O:	Distile su
dTTP:	Deoksiadenozin trifosfat
DM:	Myotonik Distrofi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksinükleotid trifosfat
DRPLA:	Dentatorubral Palliduysian Atrofi
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FRAXA:	Frajil X A
FRAXE:	Frajil X E
FRAXF:	Frajil X F
HD:	Huntington Disease
HH:	Huntington Hastalığı
IT 15:	Interesting Transcript 15
kb:	Kilobaz
KHCO₃:	Potasyum bikarbonat
MJD:	Machado –Joseph Disease
mRNA:	Messenger Ribonucleic Acid
NaCl:	Sodyum klorür
NH₄Cl:	Amonyum Klorür
p:	Kromozom kısa kolu
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

q:	Kromozom uzun kolu
RFLP:	Restiction Fragment Length Polimorphism
rpm:	Revolutions per minute
SCA 1:	Spino-cerebellar Ataxia type 1 (Spino-serebellar Ataksi tip 1)
SDS:	Sodyum dodesil sulfat
STE:	Salt – Tris – EDTA
TBE:	Tris – Borik asit – EDTA
Tel:	Telomer
UV:	Ultraviolet



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1** IT15 geninin kromozomal yerleşimi
- Şekil 1.2** CAG ve CCG tekrar bölgeleri ile bu iki tekrar bölgesi arasında yer alan dizinin şematik gösterimi
- Şekil 1.3** Protein ürününde 2642-2645. pozisyonlardaki glutamik asitleri kodlayan GAG kodonlarının IT15 geni 58. ekzonundaki yerleşimi
- Şekil 1.4** G→A ve C→T. nokta mutasyonları ile 6 ve 20 bç uzunluğundaki dizinlerin 5' promoter bölgesindeki yerleşimleri
- Şekil 1.5** TTC ve CCA kodonlarındaki C→G ve A→G nokta mutasyonlarının yerleşimi
- Şekil 1.6** Margolis ve ark. tarafından iki hasta bireyde gözlenen nokta mutasyonları
- Şekil 2.1.** CAG ve CCG tekrar bölgeleri ile bu iki bölge arasındaki 12 bç'lik dizinin çoğaltılmasında kullanılan primerler
- Şekil 2.2.** IT15 geni 5' promoter bölgesindeki polimorfik bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primerler
- Şekil 2.3.** Şekil 2.1. ve 2.2'deki PCR uygulamalarının aynı şemada gösterimi
- Şekil 2.4.** Bu çalışmada kullanılan primerler ve çoğaltılması amaçlanan 600 bç uzunluğundaki hedef bölge.
- Şekil 3.1.** Pozitif aile öyküsü olan hasta bireylere ait kısaltılmış pedigriler.
- Şekil 3.2.** 3, 4, 5, 10 ve 11 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin 0.1 µg/µl ethidium bromide içeren %2 agaroz jeldeki görüntüsü
- Şekil 3.3.** Forward/HD-2 primer çiftine ait PCR ürününden forward/reverse (a) ve HD-1/HD-2 (b) primer çiftleri ile yapılan reaksiyonlar sonunda elde edilen ürünlerin 0.1 µg/µl ethidium bromide içeren %2 agaroz jeldeki görüntüsü
- Şekil 3.4.** C→T nokta mutasyonu bölgesinde 9 ve 12 nolu olgulara ait otoradyografi sonuçları

Şekil 3.5. G→A nokta mutasyonu bölgesinde 9 ve 12 nolu olgulara ait otoradyografi sonuçları

Şekil 3.6. Sırası ile 9 nolu hastanın mutant (ilk dört kuyu) ve 12 nolu hastanın normal (ikinci dört kuyu) ve mutant (üçüncü dört kuyu) alellerine ait yirmili dizi tekrar sayıları otoradyografik bulguları



ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 1.1** IT15 genine ait polimorfik bölgeler
- Çizelge 1.2** Tekrar dizinleri ve ilgili hastalıklar
- Çizelge 1.3** FRAXA ve SCA1'de kesikli tekrar dizinlerinin yapısı
- Çizelge 3.1** Çalışma grubunda yer alan hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları
- Çizelge 3.2** 15 hastaya ait normal alelde polimorfik özellikler ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyne göre dağılımları
- Çizelge 3.3** 15 hastaya ait mutant alelde polimorfik özellikler ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyne göre dağılımları
- Çizelge 4.1** Mutant ve normal alel CAG tekrar sayıları ve paternal/maternal kalıtımın hastalığın başlama yaşı üzerindeki etkisi
- Çizelge 4.2** IT-15 geni 5' bölgesi polimorfik özelliklerine göre tanımlanan aleller.
- Çizelge 4.3** Coles ve ark. tarafından tanımlanan yedi alelin normal ve hasta bireylerde dağılımı

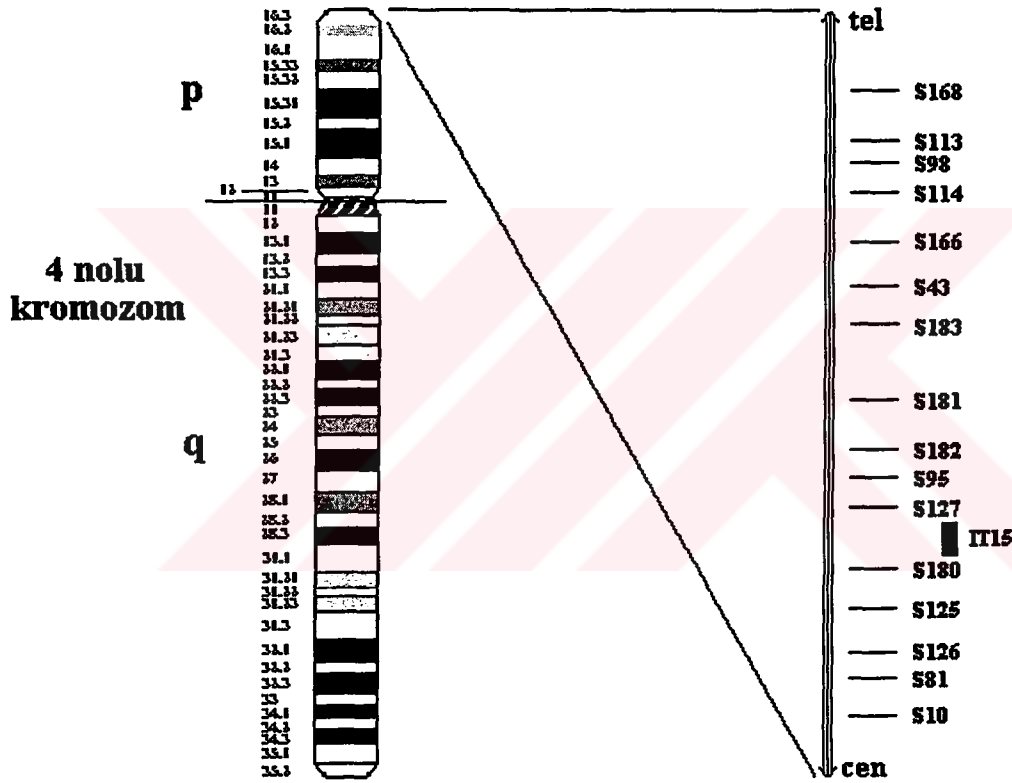
1. GİRİŞ

Huntington Hastalığı (HH), "*spiny cells*" denilen dikenli nöronların kaybı ile karakterize, otozomal dominant geçiş gösteren, santral sinir sisteminin ilerleyici, dejeneratif bir hastalığıdır. Genelde 40 yaşlarında başlayan hastalık; kore, emosyonel bozukluklar, kişilik değişiklikleri ve demans gibi bulgularla seyrederek yaklaşık 15-20 yıl içinde hastanın kaybına neden olmaktadır.

Hastalık, bulguların başlayış yaşına göre, erken (*early onset*: 20 yaşın altında) ve geç (*late onset*: 60 yaşın üzerinde) tip olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Hastalık; bulguların erken yaşta başladığı hastalarda daha ağır seyrederken, geç yaşta başlayan hastalarda daha hafif seyretmektedir. Hastaların doktora başvurma nedeni genellikle koredir. Ancak hastaların kore başlamadan önce sebepsiz düşme, yürüme sırasında hafif uyumsuzluk, elde tutulan birşeyi düşürme eğilimi ya da el yazısında değişiklikler gibi bazı motor fonksiyonlarda değişikliklerin farkına varabilecekleri ve hastaların çoğunda, tanının konduğu tarihten önce emosyonel değişikliklerin meydana geldiği belirtilmektedir (Koroshetz ve ark., 1993; Shaw, 1995, Bölüm 4).

Huntington Hastalığı sıklığının Batı Avrupa ve Amerika toplumları için 5-10/100.000 olarak verilmesine karşın çoğunlukla geç yaşlarda bulgu verdiğinden gerçekte sıklığının bunun 2-4 katı kadar olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca hastalığın görülme sıklığında etnik farklılıktan söz edilmekte ve Japon, Çin, Afrika zencileri ve Finlandiya' da sıklığın 10 kez daha düşük olduğu belirtilmektedir. Yakın bir tarihe kadar hastalıkta taze mutasyon görülme sıklığının hemen hiç yok gibi kabul edilmesine karşın genetik gelişmeler ışığında taze mutasyon olguları saptanabilmektedir (Koroshetz ve ark., 1993; Shaw, 1995, Bölüm 4; Goldberg ve ark., 1995; Chong ve ark., 1997). Aynı gelişmeler hastalığın penetransının bazı olgularda tam olmayabileceği kanısını da uyandırmaktadır (Rubinsztein ve ark., 1996).

"Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) ile yapılan çalışmalar sonucu hastalığa neden olan genin (IT15 [IT=Interesting Transcript]) 4 numaralı kromozomun kısa kolunda (4p16.3) olduğu saptanmış, 1993 yılında da "Huntington Disease Collaborative Research Group" tarafından izole edilmiştir (Huntington Disease Collaborative Research Group, 1993). IT15 geninin kromozomal yerleşimi Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Shaw, 1995, Bölüm 4).

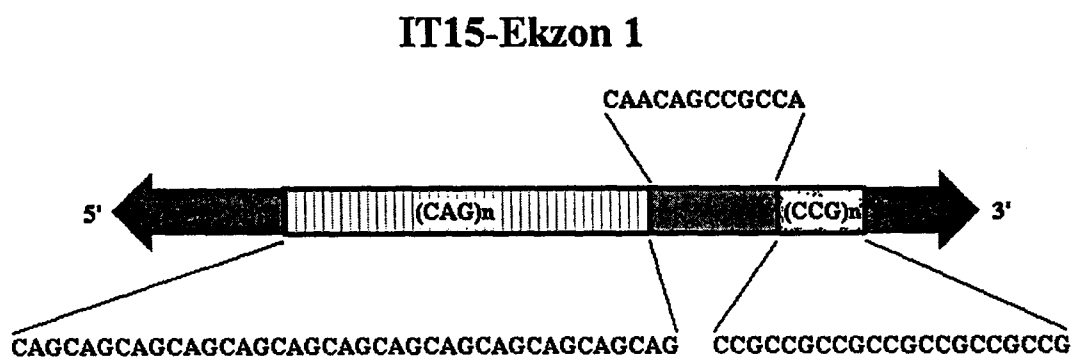


Şekil 1.1. IT15 geninin kromozomal yerleşimi (p:kısa kol, q: uzun kol, tel:telomer, cen:centromer. Şeklin sağ tarafındaki, telomerden sentromere doğru S168'den S10'a kadar belirtilen bölgeler, bu kromozomal bölgede bulunan DNA "marker"larını ve yerleşimini göstermektedir).

67 ekzon içeren 210 kb uzunluğundaki bu gen, 3144 amino asit uzunluğunda, 348 kd büyüklüğünde "huntingtin" olarak adlandırılan bir protein kodlamaktadır (Huntington Disease Collaborative Research Group, 1993; Ambrose ve ark., 1994; Jou ve ark., 1995). Gen, iki farklı

IT15 geni ile ilgili farklı polimorfik bölgeler tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlisi “Huntington Disease Collaborative Research Group” tarafından 1983’te tanımlanan ve genin ilk ekzonunda bulunan, glutamin kodlayan CAG dizini tekrar bölgesidir (Şekil 1.2). Diğer polimorfik bölgeler şunlardır:

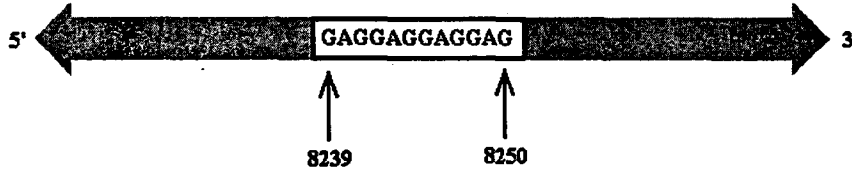
- CAG tekrar bölgesi ile CCG tekrar bölgesi arasında 12 baz-çifti (bç) uzunluğunda 5'-CAACAGCCGCCA-3' dizisi yer almaktadır (Şekil 1.2).



3

- 2) Protein ürününün 2642-2645. pozisyonlarındaki glutamik asitleri kodlayan GAG dizini tekrar bölgesi (Ambrose ve ark., 1994) (Şekil 1.3).

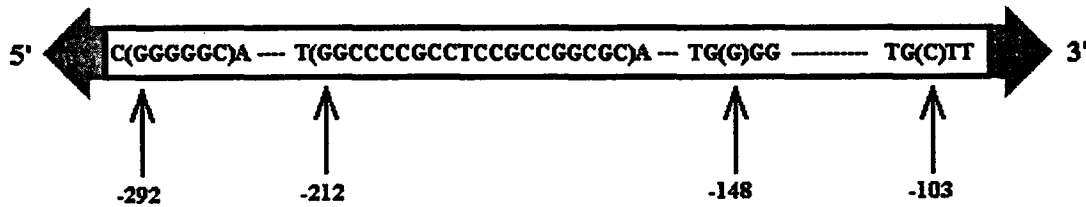
IT15-Ekzon 58



Şekil 1.3. Protein ürününde 2642-2645. pozisyonlardaki glutamik asitleri kodlayan GAG kodonlarının IT15 geni 58. ekzonundaki yerleşimi (bu kodonlar genin mRNA ürününde 8239-8250. nükleotid pozisyonları arasında yer almaktadır).

- 3) Genin 5' promoter bölgesinde tanımlanmış polimorfik bölgeler: Bunlardan ilk ikisi G→A ve C→T nokta mutasyonları, diğer ikisi de 6 ve 20 bç uzunluğundaki (sırası ile GGGGGC ve GGCCCCGCCTCCGCCGGTGC) dizinleri (Coles ve ark., 1997) tekrar bölgesidir (Şekil 1.4).

IT15- 5' promoter bölgesi



Şekil 1.4. G→A ve C→T nokta mutasyonları ile 6 ve 20 bç uzunluğundaki dizinlerin 5' promoter bölgesindeki yerleşimleri (bu polimorfik bölgelerin gendeki +1 translasyon başlama noktasına göre pozisyonları okla gösterilmiştir).

4) CAG tekrar bölgesinin hemen 5' ucunda yer alan TTC kodonunda C→G ve CCG tekrar bölgesinin hemen 5' ucunda yer alan CCA kodonunda A→G nokta mutasyonları (Margolis ve ark., 1999) (Şekil 1.5).

IT15-Ekzon 1



Şekil 1.5. TTC ve CCA kodonlarındaki C→G ve A→G nokta mutasyonlarının yerleşimi (mutasyon bölgeleri okla işaretlenmiş ve mutasyona uğrayan nükleotid parantez içinde gösterilmiştir).

Yukarıda belirtilen polimorfik bölgeler Çizelge 1.1' de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. IT15 genine ait polimorfik bölgeler

Polimorfik Bölgeler	Dizin	Yerleşim
Üçlü Tekrar Dizinleri	CAG	1. ekzon
	CCG	1. ekzon
Delesyon	GAG	58. ekzon
Nokta Mutasyonları	G→A	5' promoter
	C→T	5' promoter
	C→G	1. ekzon
	A→G	1. ekzon
Altılı Tekrar Dizini	GGGGGC	5' promoter
Yirmili Tekrar Dizini	GGCCCCGCCTCCGCCGGCGC	5' promoter

Hastalıktan sorumlu olan mutasyon, ilk ekzonda yer alan CAG üçlü dizininin tekrar sayısının belli bir eşik değerin üzerine artış göstermesidir. Tekrar sayısı, normal kromozomların %99'undan fazlasında 28 ve altında, mutant kromozomların %99'undan fazlasında ise 36 ve üzerinde bulunmuştur. CAG tekrar sayısı bir kuşaktan sonraki kuşağa aktarılırken artma eğilimi göstermekte, özellikle babadan aktarıldığında tekrar sayısındaki artış daha fazla olmaktadır (Kremer ve ark.,1995; Norremolle ve ark., 1995). Yine tekrar sayısı arttıkça hastalık daha genç yaşlarda başlamaktadır (antisipasyon) (Craufurd ve ark., 1993). 29-35 arasında tekrar sayısına sahip aleller "intermediate allele" olarak tanımlanmakta ve taze mutasyonların, bu alellerin aktarımı sırasında tekrar sayısındaki artış sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (Ranen ve ark., 1995).

CAG dizinlerinin 3' komşuluğunda yer alan CCG tekrar sayısının 6 - 12 arasında değişerek polimorfizm gösterdiği ve CCG tekrar sayısı ile CAG tekrar sayısı arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirtilmektedir. CAG tekrar sayısı arttıkça CCG tekrar sayısının azaldığı, tersine, CAG tekrar sayısı azaldıkça CCG tekrar sayısının arttığı belirtilmekte ve mutant kromozomlarda CCG tekrar sayısı sıklıkla 7 iken normal kromozomlarda 10 olarak gözlenmektedir (Andrew ve ark., 1994).

Protein ürününün 2642 ve 2645. pozisyonlarındaki glutamik asiti kodlayan GAG dizinlerinin sayısının 3 ile 4 arasında değişiklik göstermesi diğer bir polimorfizmi oluşturmaktadır. Tekrar sayısının 3 olması, genin protein ürünündeki 2642 - 2645. pozisyonlarında bulunan 4 glutamik asitten birinin olmamasına yol açmakta ve bu polimorfik özellik $\Delta 2642$ (2642. pozisyonundaki aminoasit biriminin delesyonu) olarak gösterilmektedir (Ambrose ve ark., 1994). $\Delta 2642$ ' ye göre farklı iki haplotip belirlenmiş, 2642. aminoasit varsa A aleli, yoksa B aleli olarak tanımlanmıştır. A aleli, B aleline göre daha az sayıda CAG tekrarı içermektedir. $\Delta 2642$, yirmiden fazla CAG tekrarı olan kromozomlarda gözlenmekte, normal kromozomların %7' sinde,

mutant kromozomların ise %38'inde rastlanmaktadır (Almqvist ve ark., 1995; Rubinsztein ve ark., 1995).

$\Delta 2642$ polimorfizmi ve CCG tekrar sayısının, CAG tekrar sayısındaki değişiklik üzerindeki etkilerinin birbirinden bağımsız olduğu gözlenmiştir. $\Delta 2642$ polimorfizmine sahip fakat aynı sayıda CCG tekrarı içeren haplotiplerde CAG tekrar sayılarında farklılıklar saptanmıştır. Yine, $\Delta 2642$ açısından aynı haplotipe sahip, ancak CCG tekrar sayısı farklı olan kromozomlarda yapılan çalışmalarda CAG tekrar sayılarının farklı olduğu gösterilmiştir. Dolayısı ile hem CCG tekrar sayısı hem de $\Delta 2642$ 'nin birbirinden bağımsız olarak CAG tekrar sayısı ile ilgili olduğu belirlenmiştir. İkisi birlikte değerlendirildiğinde CCG ve $\Delta 2642$ polimorfizminin, CAG tekrar sayısındaki değişikliklerin %25'i ile ilgili olduğu sonucu verilmektedir. Hastalığa neden olan mutant alelin B aleli ile birlikteliğinin daha çok izlenmesinin nedeni olarak B alelinde CAG tekrar sayısının daha fazla olması öngörülmektedir (Almqvist ve ark., 1995).

Hastalık sıklığının Batı Avrupa ve Amerika toplumuna oranla Afrikalı zencilerde, Çinli ve Japonlarda 10 kez daha düşük olması, bu topluluklarda $\Delta 2642$ polimorfizminin gözlenmemesine bağlanmaktadır. $\Delta 2642$ polimorfizminin bu ırklarda olmaması, normal kromozomlardaki CAG tekrar sayısının, dolayısı ile de normal alelin mutant hale gelme olasılığının düşük olmasına neden olmaktadır. Geriye doğru gidildiğinde A alelinin yaban aleli olduğu, B alelinin mutasyon sonucunda A alelinden meydana geldiği, daha sonra B alelinde mutasyonların sık görülmesi nedeni ile bu haplotipin mutant alellerdeki sıklığının arttığı belirtilmektedir (Almqvist ve ark., 1995).

Genin translasyon başlama noktasına göre -103 ve -148. nükleotid pozisyonlarında sırası ile C→T ve G→A nokta mutasyonlarının polimorfik özellik gösterdiği ve yine genin 5' promoter bölgesinde yer alan GGGGGC

altılı dizinin 1-2 kez, GGCCCGCCTCCGCCGGTGC yirmili dizinin de 1-3 kez tekrarlayabildiği bildirilmiştir (Coles ve ark., 1997).

Genin 5' ucunda yer alan diğer bir polimorfizm Margolis ve ark. tarafından, biri tanısıl, diğeri de yordama amacı ile CAG tekrar sayısını belirlemek için iki hastaya ait DNA örneğinde gerçekleştirilen PCR uygulamalarında tutarsızlık gözlenmesi üzerine bulunmuştur. İlk hastada gözlenen tutarsızlığın nedeni, CAG tekrar bölgesinin hemen 5' ucundaki TTC kodonunda meydana gelen C→G nokta mutasyonu sonucu uygulamada kullanılan primerin bu bölgeye bağlanamaması, ikinci hastada ise CCG tekrar bölgesinin hemen 5' ucunda yer alan CCA kodonunda A→G nokta mutasyonu nedeni ile CCA dizininin CCG'ye dönüşerek CCG tekrar sayısını değiştirmesidir (Şekil 1.6).

Normal dizi: 5'- TTC (CAG)_n CAA CAG CCG CCA (CCG)_n -3'

İlk hasta : 5'- TTG (CAG)_n CAA CAG CCG CCA (CCG)_n -3'

İkinci hasta: 5'- TTC (CAG)_n CAA CAG CCG CCG (CCG)_n -3'

Şekil 1.6. Margolis ve ark. tarafından iki hasta bireyde gözlenen nokta mutasyonları (mutasyonlar kalın harflerle ve altı çizili olarak gösterilmiştir).

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, DNA molekülünde doğal olarak bulunan üçlü tekrar dizinlerinin bir nesilden sonraki nesile aktarımı sırasında tekrar sayısında %4 oranında azalma göstermekle beraber çoğunlukla artma gösterdiği ve bu artışın bazı genetik hastalıkların etyolojisinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu hastalıklar arasında Frajil-X Sendromları (FRAXA, FRAXF, FRAXE), Dentatorubral Pallidoluysian Atrofi (DRPLA), Machado-Joseph Hastalığı (MJD), Spinocerebellar Ataksi Tip 1 (SCA1), Myotonik Distrofi (DM) ve HH gibi hastalıklar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra; Herediter Non-Polipozis Koli, Kolon Kanseri ve değişik insan kanserlerinde yine üçlü tekrar dizinlerinin saptandığı bildirilmektedir (Coles ve ark., 1997; Carlock ve ark., 1994; Richards ve ark., 1994) (Çizelge 1.2). Tüm bu hastalıkların ortak

özellikleri, belli bir üçlü nükleotid dizininin tekrar sayısının artış göstermesi ile hastalığın ortaya çıkmasıdır.

Çizelge 1.2. Tekrar dizinleri ve ilgili hastalıklar.

Tekrarlayan Dizi	Hastalık
CGG	FRAXA, FRAXE, FRAXF
CAG	Spinobulber Müsküler Atrofi Myotonik Distrofi Huntington Hastalığı Spinocerebellar Ataksi Tip 1 Dentatorubral Pallidoluysian Atrofi
Mononükleotid	Hereditör Non-Polipozis Koli
Dinükleotid	Kolon Kanseri
Trinükleotid	
Mononükleotid	Çeşitli İnsan Kanseri
Trinükleotid	
Tetranükleotid	

Tekrar sayısının artmasının nedeni olarak eşit olmayan krossing-over ve “slippage” mekanizmaları üzerinde durulmaktadır. Eşit olmayan krossing over, iki homolog kromozom arasında meydana gelen krossing-over sonrasında gerçekleşen DNA alış-verişinin birbiri ile aynı olmamasıdır. Bunun nedeni, tekrar bölgelerinin, tekrar dizini içermeleri nedeni ile, krossing-over sırasında karşı zincirdeki kendi komplementeri olan tekrar dizininde herhangi bir bölge ile eşleşebilmesidir. Bunun sonucunda krossing-over sonrasında kromozom üzerindeki o bölgede uzama ya da kısalma gözlemlenmektedir (Brown, 1989). Slippage mekanizmasında ise tekrar bölgelerindeki DNA replikasyonu sırasında sentezlenen yeni zincirin komplementeri olan karşı zincir üzerinde “kayarak” tekrar bölgesi içinde farklı bir bölge ile eşleşebilmesi ve DNA replikasyonunun bu yeni yerleşim bölgesinde kaldığı yerden devam edebilmesidir. Replikasyon

tamamlandığında sentezlenen yeni zincirde "kayma" miktarı ile orantılı olarak uzama gözlenmektedir (Richards ve ark., 1994).

Ancak yapılan son çalışmalarda hastalığın ortaya çıkmasında tekrar sayısının belli bir sayının üstünde olmasının tek başına yeterli olmadığına dair bazı bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, aynı tekrar sayısına sahip olmalarına rağmen bazı kişilerin normal bazılarının hasta olduğu gözlenmiş ve incelendiğinde, normal kişilerde üçlü tekrar dizininin sürekliliğini bozan, tekrar eden üçlü diziden farklı bir kodonun bu tekrar bölgesi içinde yer aldığı izlenmiştir. Bu kesikli dizinin (interrupted ya da imperfect repeat), "slippage" mekanizmasını engelleyerek genin bir sonraki nesile geçişi sırasında tekrar sayısının artmasını önlediği ve bu nedenle kesiksiz dizine (uninterrupted ya da perfect repeat) oranla daha stabil olduğu ileri sürülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, FRAXA' da tekrarlayan CGG dizininin içinde kesintiye neden olan AGG, SCA1'de de tekrarlayan CAG dizini içinde CAT üçlü kodonunun varlığını göstermiştir (Chung ve ark., 1993; Eichler ve ark., 1994) (Çizelge 1.3). HH' nda ise insan dışındaki bazı diğer memelilerde kesikli tekrar dizinlerinin varlığı gösterilebilmiştir (Pechoux ve ark., 1996).

Çizelge 1.3. FRAXA ve SCA1' de kesikli tekrar dizinlerinin yapısı (Tekrar yapısını bozan üçlü dizinler kalın harflerle gösterilmiştir. n= tekrar sayısı)

Hastalık	Kesikli Tekrar Dizinlerinin Yapısı
FRAXA	(CGG)n AGG (CGG)n (CGG)n AGG (CGG)n AGG (CGG)n
SCA1	(CAG)n CAT (CAG)n (CAG)n CAT CAG CAT (CAG)n (CAG)n CAT CAG CAT CAG CAT (CAG)n

Bu çalışmada, IT15 geninin polimorfik özelliklerinden CAG ve CCG tekrar sayıları ile nokta mutasyonları ve altılı-yirmili tekrar dizinleri

polimorfizmi araştırılarak mutant alellerin bu polimorfik özelliklerle olan birliktelik sıklıklarının çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında ayrıca kesikli tekrar dizinleri varlığının araştırılması da gerçekleştirilecektir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Bu proje kapsamında çalışmaya dahil edilen bireyler, Aralık 1996- Eylül 1999 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı tarafından Huntington Hastalığı tanısı alan ya da bu tanı ile takip edilen 15 hasta bireyden oluşmaktadır.

Hastalarla yapılan ve yaklaşık bir saat süren ilk görüşmede hastalığın öyküsü alındıktan sonra pedigrî analizi yapılarak ailedeki diğer hasta bireylerle henüz bulgusu olmayan ancak risk altındaki asemptomatik bireyler saptanmış, hastalığın özellikle genetik özellikleri hakkında aileye detaylı bilgi verilmiştir. Bu bilgiler ışığında istenildiğinde DNA incelemesi yapılabileceği belirtilmiş ve en az bir aylık bir süre sonra gerçekleştirilen ikinci görüşmede incelemeyi kabul eden hastalardan aydınlanmış onamları (bkz. Ek) alındıktan sonra DNA incelemesi için periferik kan örnekleri alınmıştır.

2.2. Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.1. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Genomik DNA, EDTA'lı tüpe alınmış 5 ml periferik kandan standart fenol-kloroform yöntemi ile izole edilmiştir (Sambrook ve ark., 1982, s. 458). 5 ml periferik kan 15 ml'lik polipropilen tüpe aktarılıp 3500 rpm'de 15' santrifüje edildikten sonra (lonetics medical products, Centurion 6000) serum atılıp pelet üzerine 10 ml' ye tamamlayacak şekilde lizis tamponu (0.154 M NH_4Cl [Sigma, A9434], 0.0092 M KHCO_3 [Sigma, P4913], 0.0001 M EDTA [Sigma, E5134]) eklenip iyice karıştırılmış ve tüp içindeki solusyon saydam hale gelene kadar buz içinde bekletilmiştir. 3500 rpm' de 15 dk santrifüje

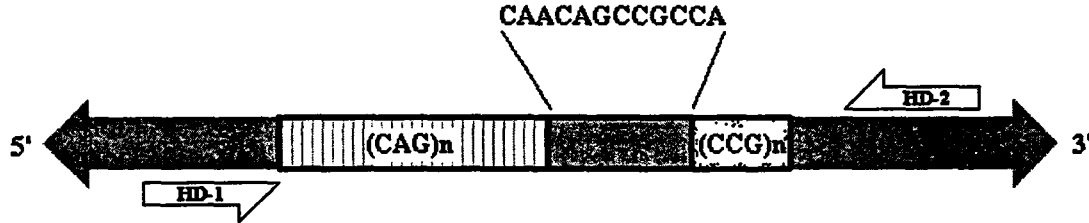
edildikten sonra süpernatant atılıp peletin çözülerek yıkanması için, üzerine 5ml' ye tamamlayacak şekilde 1XSTE (0.1 M NaCl [Merck, 1.06400], 0.01 M Tris pH=8.0 [Sigma, T8524], 0.001 M EDTA) solusyonu ilave edilip vortexle karıştırılmış ve 3500 rpm' de 15 dk santrifüje edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılıp pelet üzerine 4,5 ml 1XSTE solusyonu, 500 µl %10 SDS (Sodium Lauryl Sulfate [Sigma, L4390] ve 50 µg/ml Proteinaz K (Sigma, P4914) ilave edilip bir gece 37°C etüvde (Heraeus, FB 420) inkübe edilmiştir. Ertesi gün solusyon üzerine eşit hacimde doymuş fenol (Sigma, P4557) eklenip yavaşça karıştırıldıktan sonra 3500 rpm' de 15 dk santrifüje edilip süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış, üzerine eşit miktarda kloroform:izoamilalkol (24:1) (Sigma, C2432:Sigma, I9392) eklenip iyice karıştırıldıktan sonra 3500 rpm' de 15 dk santrifüje edilmiştir. Daha sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarılıp üzerine eşit miktarda 0°C saf etanol (Carlo Erba, 414608) eklenip DNA presipite edilmiştir. Presipite olan DNA mikropipetle Eppendorf tüpe aktarılıp bir kez saf etanol, bir kez de %70 etanol ile 13 000 rpm' de 10 dk santrifüje edilip (Herolab, MikroCen 13D) süpernatant atıldıktan sonra pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, daha sonra üzerine 500 µl steril dH₂O eklenip 37°C'de bir gece inkübe edilerek çözülmüştür.

Elde edilen her bir DNA örneğinden 20 µl alınarak 1980 µl dH₂O ile karıştırılıp 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerleri ölçülerek (Jasco UV/VIS Spectrophotometer, V-530) konsantrasyon ve saflığı belirlenmiştir (Sambrook ve ark., 1982, s. 468).

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

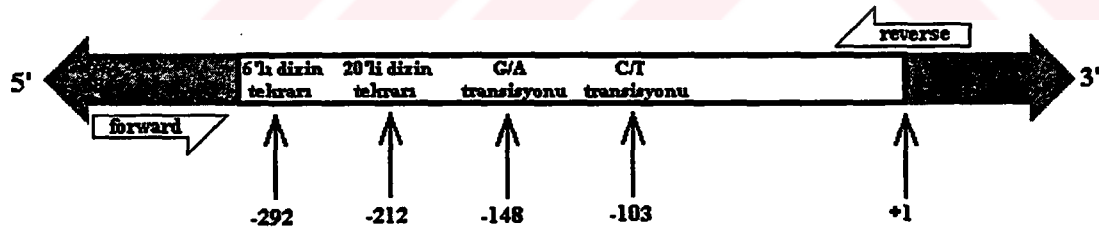
Bu çalışmada uygulanan polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak primerlerin seçilmesinde daha önce literatürde tanımlanmış iki farklı PCR uygulamasından yararlanılmıştır. Bunlardan ilki, CAG ve CCG tekrar bölgeleri ile bu iki bölge arasında yer alan 12 bç'lik dizinin bulunduğu

bölgenin çoğaltılmasını sağlayan PCR uygulamasıdır. Bu uygulamada kullanılan primerler Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



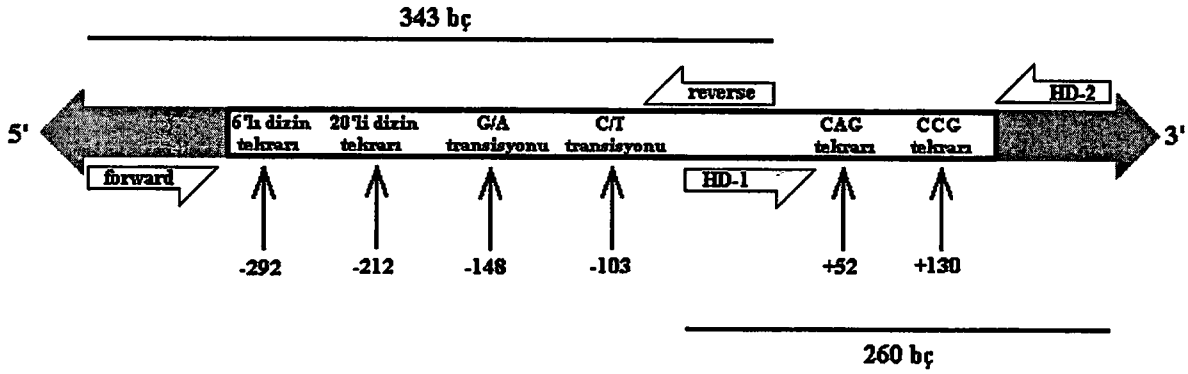
Şekil 2.1. CAG ve CCG tekrar bölgeleri ile bu iki bölge arasındaki 12 bp'lik dizinin çoğaltılmasında kullanılan primerler (HD-1: forward primer, HD-2: reverse primer).

Primerlerin seçiminde yararlanılan diğer PCR uygulaması ise genin 5' promotor bölgesindeki G→A ve C→T nokta mutasyonları ile 6 ve 20 bp uzunluğundaki dizilerin çoğaltılmasında uygulanan PCR'da kullanılan primerlerdir (Şekil 2.2).



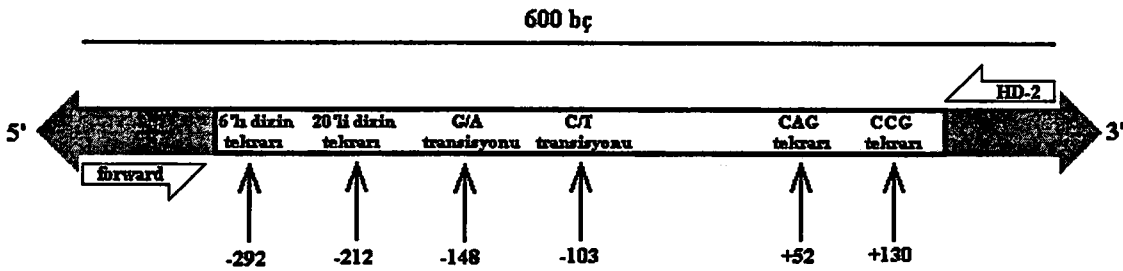
Şekil 2.2. IT15 geni 5' promotor bölgesindeki polimorfik bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primerler (forward: forward primer, reverse: reverse primer).

Bu iki PCR uygulamasında kullanılan primerlerin ve çoğaltılan bölgelerin birbirine göre yerleşimleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Şekil 2.1. ve 2.2'deki PCR uygulamalarının aynı şemada gösterimi (343 ve 260 bç olarak yatay çizgilerle belirtilen bölgeler her iki PCR uygulamasında çoğaltılan bölgeleri ve bu bölgelerin uzunluklarını göstermektedir).

Bu çalışmanın amacına ulaşabilmesi için Şekil 2.3'de gösterilen tüm polimorfik bölgelerin normal ve mutant alellerde ayrı ayrı gözlenebilir hale getirilmesi gerektiğinden, PCR uygulamasında forward ve reverse primer olarak Şekil 2.3'deki forward ve HD-2 primerlerinin kullanılması uygun görülmüştür. Seçilen bu primer çifti ile her iki bölgedeki polimorfik özelliklerin aynı alelde araştırılabilmesi sağlanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Bu çalışmada kullanılan primerler ve çoğaltılması amaçlanan 600 bç uzunluğundaki hedef bölge.

0.1 µg genomik DNA, 0.2 µg (20 pmol) primerler [(forward:5'-GCG CGA GCT CAG CGG CTT GCT GTG TGA GG-3', HD-2: 5'-AAA CTC ACG GTC GGT GCA GCG GCT CCT CAG-3') (lontek)], her bir dNTP'den 200µM (Sigma, dNTP-100), %10 dimetilsulfoksit (Sigma, D5879), Expand™ High

Fidelity PCR System kitine ait 2.5 µl Expand HF 10x tampon ve 0.25 µl Enzim karışımı (Boehringer Mannheim, 1 732 641) toplam 25 µl hacim içinde karıştırılarak üzeri mineral yağı (Sigma, M5904) ile kaplanmış ve thermocycler'da (Biometra Personal Cycler™, 050-500) 94°C'de 1'30" başlangıç denatürasyonundan sonra 94°C'de 1', 60°C'de 1', 72°C'de 2' olmak üzere 30 döngü uygulanıp son olarak 72°C'de 10' inkübe edilerek PCR uygulanmıştır (The Huntington Disease Collaborative Research Group. 1993). Her bir reaksiyona ait PCR ürününden 10 µl alınarak 1xTBE (0.089 M Tris-borat [Sigma, T8524], 0.089 M Borik asit [Sigma, B6768], 0.002 M EDTA) içinde hazırlanmış 0.1 µg/µl ethidium bromide (Sigma, E8751) içeren %2'lik agaroz (Sigma, A9539) jele yüklenmiştir. 90V'da 1 saat yürütüldükten sonra (Biometra-Agagel Mini, 020-000) jel uv transilüminatör üzerine konmuş ve PCR ürünlerine ait bandların bulunduğu jel bölgeleri bistüri ile kesilerek 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere alınmıştır. Daha sonra PCR ürünleri Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, A7170) kullanılarak jelden izole edilmiştir. Bunun için önce jel eriyene kadar tüpler 37°C'de inkübe edilmiş daha sonra üzerine 1 ml resin eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra ucunda mini-column bulunan 2 ml'lik enjektöre aktarılan bu karışım mini-column'dan geçirilmiş ve bu işlem sonrasında aynı enjektöre ikişer kez 2 ml %80 izopropanol alınıp verilerek mini-column yıkanmıştır. Enjektörden ayrılan minicolumn 10000 rpm'de 2 dakika santrifüje edilmiş ve daha sonra içindeki PCR ürünlerinin çözülmesi için 50 µl dH2O eklenerek bir dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Temiz bir Eppendorf tüp üzerine alınan mini-column 10000 rpm'de 20 saniye santrifüje edilmiş ve PCR ürünleri tüp içinde toplanmıştır.

2.2.3. Asimetrik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR ürünleri, her iki ucu da serbest çift zincirli DNA molekülleri olduğundan dizi analizinde yanıltıcı ya da istenmeyen sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu gibi durumlarda PCR ürünlerinin dizi analizinde önce asimetrik PCR

yapılarak tek zincirli PCR ürünlerinin elde edilmesi önerilen bir yoldur (Gyllensten, 1989, Bölüm 5). Asimetrik PCR'ın normal PCR uygulamasından farkı, kullanılan primerlerin eşit miktarda değil farklı miktarlarda reaksiyona katılmasıdır. Bu şekilde hazırlanan reaksiyonda miktarı az olan primer, reaksiyonun ilerleyen döngülerinde yetersiz kalmakta ve senteze devam edememekte, bu aşamadan sonra sadece ortamda fazla miktarda bulunan diğer primer senteze devam edebilmektedir. Reaksiyon sonunda miktarı fazla olan bu primerin sentezlediği DNA molekülleri, kendisi ile eşleşebilecek diğer primerin sentezlediği DNA moleküllerinin azlığı nedeni ile tek zincirli olarak kalmaktadır. Bu çalışmada da dizi analizine geçmeden önce asimetrik PCR yapılmıştır. Bu reaksiyonda, jelden izole edilen mutant ve normal alellere ait PCR ürünleri kalıp DNA olarak kullanılmış ve primer konsantrasyonları değiştirilerek (forward/HD-2) aynı sıcaklık ve sürelerde asimetrik PCR uygulanmıştır. Asimetrik PCR'dan sonra, bu PCR karışımının 5 µl'si dizi analizi için kullanılmıştır. Asimetrik PCR sonrasında reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol amacı ile sadece bir kez 10 µl asimetrik PCR ürünü 0.1 µg/µl ethidium bromide içeren %2'lik agaroz jelde yürütülerek uv transillüminatörde görüntülenmiştir.

2.2.4. Dizi Analizi

Asimetrik PCR ürünlerinin dizi analizinde Omnibase™ DNA Cycle Sequencing System (Promega, Q6800) kullanılmıştır. PCR ürününün 5' bölgesinin dizi analizi için (IT15 geninin 5' promoter bölgesindeki polimorfik bölgelerin bulunduğu kısım-Şekil 2.2) forward, 3' bölgesi için (CAG ve CCG tekrar bölgeleri ile bu bölgede yer alan diğer polimorfik bölgeler-Şekil 2.1) HD-2 primeri kullanılmıştır. Öncelikle dizi analizinde kullanılacak primerden 10 pmol alınarak 1 µl T4 polinükleotid kinaz, 1 µl T4 polinükleotid kinaz tamponu, 3 µl [γ -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham, PB10168) ve 4 µl dH₂O ile karıştırılmış ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilerek primer işaretlenmiştir. Her bir dizi analizi reaksiyonu için A, C, G ve T olarak

etiketlenmiş 4 ayrı 0.5 µl Eppendorf tüpe uygun dNTP/ddNTP karışımlarından 2'şer µl konmuş ve buz üzerine alınmıştır. Daha sonra ayrı bir tüpte dizi analizi yapılacak asimetrik PCR ürününden 5 µl, 5 µl dizi analizi tamponu, 1.5 µl işaretli primer, 4.5 µl dH₂O ve 1 µl enzim karıştırılarak hazırlanmış olan A, C, G ve T tüplerine 4'er µl eklenmiştir. Karışımların üzerini örtecek kadar mineral yağı eklendikten sonra thermocycler'da 95°C 2 dk başlangıç denatürasyonundan sonra 95°C 30 s, 60°C 30 s ve 70°C 60 s olmak üzere 30 döngü uygulanarak dizi analizi yapılmıştır. Reaksiyon sonunda tüplere 3 µl formamid stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon ürünleri 70°C'de 2 dk denature edildikten sonra 60x20 cm'lik %6 denatüran poliakrilamid jelde (20 gram üre [Sigma, U5378], 6 ml %40 akrilamid:bisakrilamid stok solusyonu (38:2 akrilamid [Sigma, A9099] : bisakrilamid [Sigma, M2022]), 4 ml 10x TBE ve 15.3 ml deiyonize dH₂O) 1500 V'da 10 saat yürütülmüştür (Biometra DNA Sequencing Gel Apparatus, 022-100). Jel, elektroforez sonrasında %10 glasiyal asetik asit (Merck, 1.000.56) içeren fiksatifte 20 dakika bekletilmiş, daha sonra 1 litre deiyonize su ile yıkandıktan sonra filtre kağıdına (Biorad, 1650959) aktararak kurutucuda (Biorad, 583 Gel Dryer) 80°C'de 1 saat kurutulmuştur. Kuruma sonrasında kurutucudan alınan jel Kodak X-OMAT AR film (Sigma Z35, 858-4) ile film kasetine yerleştirilmiş ve kaset alüminyum folyo ile sarılarak -70°C'de 16-24 saat inkübe edilerek otoradyografi sonrası değerlendirilmiştir.

Tüm reaksiyonlarda elde edilen ürünler ya hemen kullanılmış ya da kullanılabilecek kadar geçen sürede -20°C'de saklanmış ve kullanma sırasında çözölmüştür.

2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar Spearman'ın korelasyon katsayısı, çoklu regresyon analizi, Mann-Whitney U testi ve ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

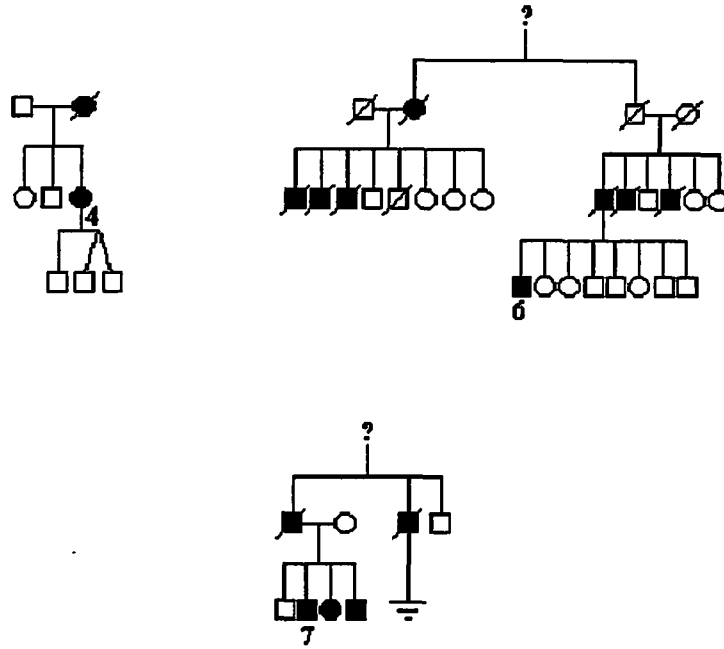
3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubunda yer alan toplam 15 hasta bireyden 8'ini kadın (% 53), 7'sini erkek hastalar oluşturmuştur. Hastaların ortalama yaşı 48 olup bu ortalama kadınlarda 45, erkeklerde ise 51' dir. Hastalığın başlama yaşı genel hasta grubunda 41 iken, kadınlarda 39, erkeklerde 43 olarak gözlenmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Çalışma grubunda yer alan hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları.

Olgu no	Cinsiyeti	Yaşı	Hastalığın Başlama Yaşı
1	K	48	41
2	K	29	24
3	E	36	24
4	K	61	53
5	E	66	51
6	E	54	51
7	E	49	37
8	E	61	53
9	K	43	39
10	K	44	43
11	E	47	45
12	K	52	35
13	E	45	38
14	K	48	40
15	K	38	36

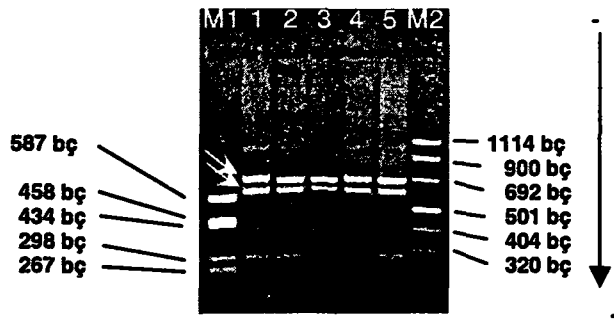
Çalışma grubundaki pozitif aile öyküsü olan bireylerin kısaltılmış pedigrileri Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Pozitif aile öyküsü olan hasta bireylere ait kısaltılmış pedigriler. (rakamlar Tablo 3.1.'deki aynı nolu olguları göstermektedir)

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA örnekleri üzerinde forward ve HD-2 primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonunda elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



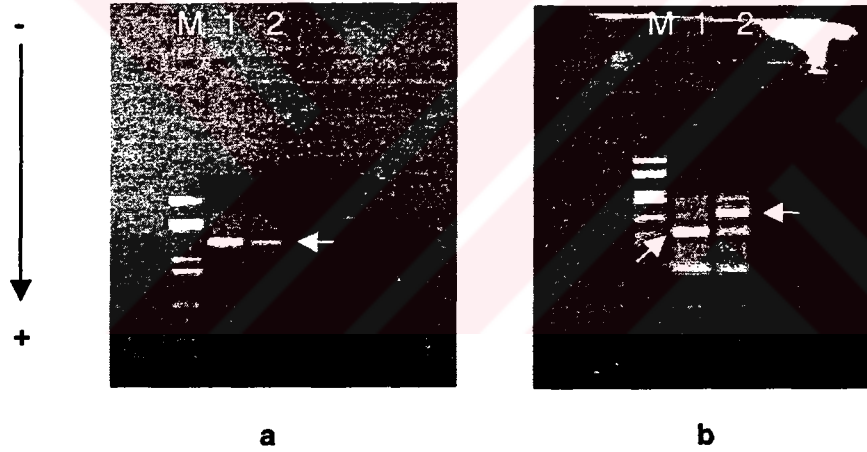
Şekil 3.2. 3, 4, 5, 10 ve 11 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin 0.1 µg/µl ethidium bromide içeren %2 agaroz jeldeki görüntüsü (istenilen bölgeye ait PCR ürünleri küçük beyaz oklarla, - ve + kutuplar ve yürüme yönü siyah okla gösterilmiştir).

M1:Marker, pUC18/HaeIII kesimi

M2:Marker, pUCBM21/HpaII kesimi + pUCBM21/Dra1+HindIII kesimi

1-5 nolu kuyular: Sırası ile 3,4,5,10 ve 11 nolu olgulara ait PCR ürünleri. Kısa bandlar normal alelleri, uzun bandlar mutant alelleri göstermektedir.

Elektroforez sonrasında jelde görülen DNA bandlarının beklenen uzunlukta olması (CAG tekrar sayısındaki farklılık nedeni ile PCR ürünlerinin normal ve mutant alellerdeki boyları farklılık göstermektedir), öngörülen primerler ile uygulanan PCR'ın gerçekleştiğini ve istenilen ürünün elde edildiğini göstermiştir. Ancak bunu doğrulamak amacı ile elde edilen bu PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak forward/reverse ve HD-1/HD-2 primer çiftleri ile ayrı ayrı PCR yapılmıştır. Bu reaksiyonlar sonucunda her iki primer çifti ile de bu primer çiftlerine özgü sırası ile 343 ve 260 bp'lik bölgeler çoğaltılabilmektedir (CAG tekrar sayısındaki farklılık nedeni ile HD-1 ve HD-2 primerlerine ait PCR ürünlerinin normal ve mutant alellerdeki boyları farklılık göstermektedir). Bunun sonucunda forward ve HD-2 primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyon sonunda elde edilen ürünün amaçlanan bölgeye ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Forward/HD-2 primer çiftine ait PCR ürününden forward/reverse (a) ve HD-1/HD-2 (b) primer çiftleri ile yapılan reaksiyonlar sonunda elde edilen ürünlerin 0.1 µg/µl ethidium bromide içeren %2 agaroz jeldeki görüntüsü (hedef bölgeye ait PCR ürünleri okla işaretlenmiştir. Diğer bandlar spesifik olmayan ürünlerdir).

a: M=Marker (pUC18/HaeIII kesimi)

1 nolu kuyu: 3 nolu hastanın normal alelinden forward/reverse primer çifti ile elde edilen PCR ürünü

2 nolu kuyu: 3 nolu hastanın mutant alelinden forward/reverse primer çifti ile elde edilen PCR ürünü

b: M=Marker (pUC18/HaeIII kesimi)

1 nolu kuyu: 3 nolu hastanın normal alelinden HD-1/HD-2 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü

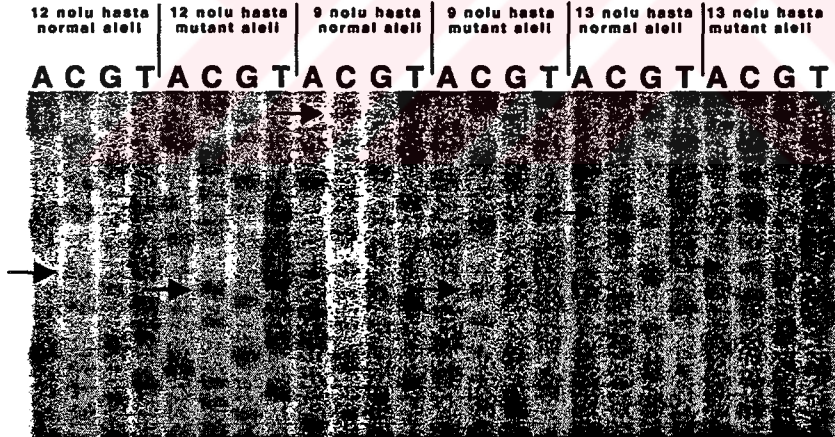
2 nolu kuyu: 3 nolu hastanın mutant alelinden HD-1/HD-2 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü

Tamamlanan bu ilk aşamadan sonra PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak aynı primerlerin (forward ve HD-2) değişik oranlardaki miktarları ile asimetrik PCR gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünlerde dizi analizi yapılmıştır. En iyi sonuç 1:100 oranında primer konsantrasyonlarında yapılan asimetrik PCR ürünlerinde elde edilmiş ve sonraki tüm dizi analizi reaksiyonları, bu konsantrasyonda gerçekleştirilmiş asimetrik PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak yapılmıştır.

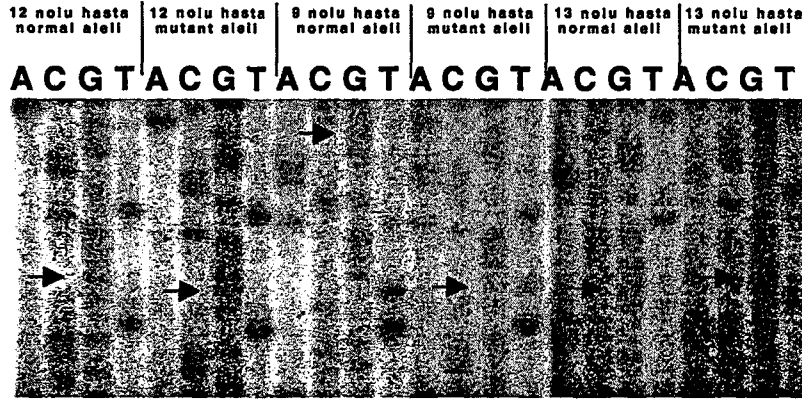
3.3. Polimorfik Özellikler

3.3.1. G→A ve C→T Nokta Mutasyonları

15 hasta bireyin gerek normal gerekse mutant alellerinin hiçbirisinde nokta mutasyonu gözlenmemiş, -103 ve -148 nükleotid pozisyonlarında sırası ile C ve G nükleotidlerinin bulunduğu saptanmıştır (%100 [30/30]) (Şekil 3.4. ve 3.5.).



Şekil 3.4. C→T nokta mutasyonu bölgesinde 9, 12 ve 13 nolu olgulara ait otoradyografi sonuçları (dizi analizi sonunda, nokta mutasyonu beklenen nükleotid pozisyonunda gözlenen nükleotidler okla gösterilmiştir. A: dATP/ddATP, C: dCTP/ddCTP, G: dGTP/ddGTP, T: dTTP/ddTTP dizi analizi reaksiyon tüplerinin yüklendiği kuyuları göstermektedir.)



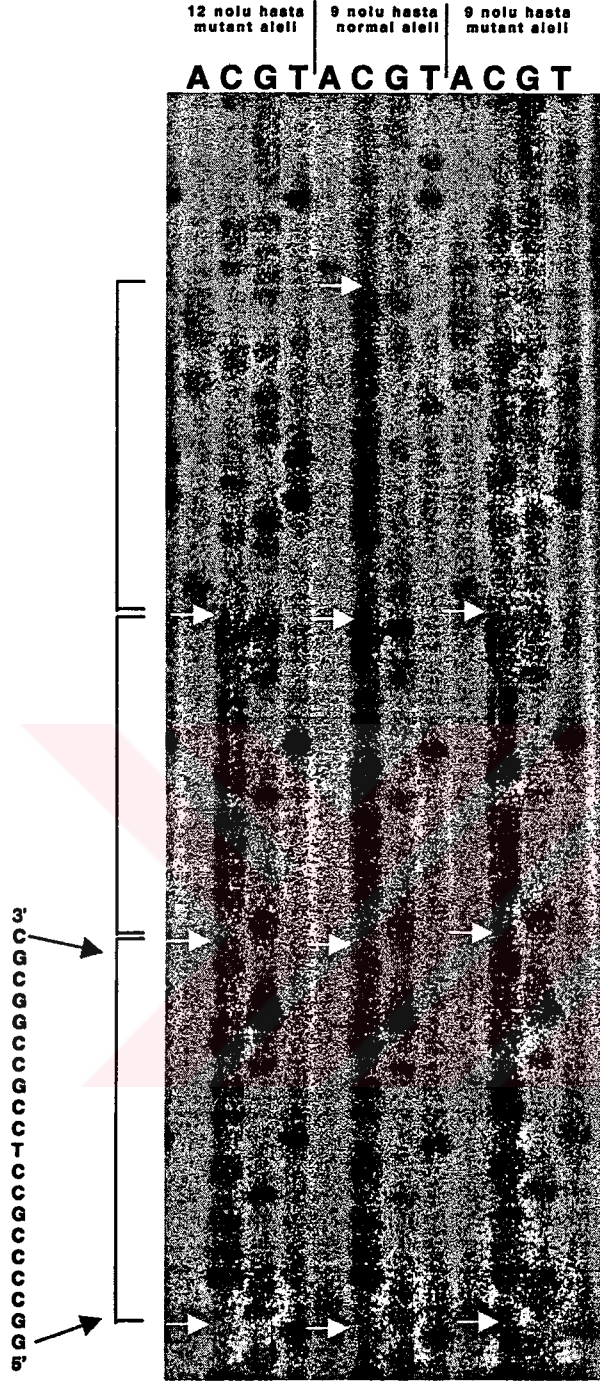
Şekil 3.5. G→A nokta mutasyonu bölgesinde 9, 12 ve 13 nolu olgulara ait otoradyografi sonuçları (dizi analizi sonunda, nokta mutasyonu beklenen nükleotid pozisyonunda gözlenen nükleotidler okla gösterilmiştir. A: dATP/ddATP, C: dCTP/ddCTP, G: dGTP/ddGTP, T: dTTP/ddTTP dizi analizi reaksiyon tüplerinin yüklendiği kuyuları göstermektedir).

3.3.2. A → G ve C→G Nokta Mutasyonları

İncelenebilen 2 hasta bireyin gerek normal gerekse mutant alellerinin hiçbirisinde bu pozisyonlarda nokta mutasyonu gözlenmemiştir (%100 [4/4]).

3.3.3. Altılı ve Yirmili Tekrar Dizileri

15 hastadan sadece birisinde (13 nolu hasta) normal alelde altılı dizi tekrar sayısı 2 bulunmuş (%3 [1/30]), bu hastanın mutant alelinde ve diğer tüm hastaların normal ve mutant alellerinde tekrar sayısı 1 olarak gözlenmiştir (%97 [29/30]). Yine, sadece bir hastanın (9 nolu hasta) normal alelinde yirmili dizi tekrar sayısı 3 olarak gözlenirken (%3 [1/30]), bu hastanın mutant ve diğer tüm hastaların normal ve mutant alellerinde tekrar sayısı iki olarak gözlenmiştir (%97 [29/30]) (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Sırası ile 12 nolu hastanın mutant (ilk dört kuyu) ve 9 nolu hastanın normal (ikinci dört kuyu) ve mutant (üçüncü dört kuyu) alellerine ait yirmili dizi tekrar sayıları otoradyografik bulguları. (A: dATP/ddATP, C: dCTP/ddCTP, G:dGTP/ddGTP, T: dTTP/ddTTP dizi analizi reaksiyon tüplerinin yüklendiği kuyuları göstermektedir. Tekrar eden dizin iki ok arasında kalan dizindir).

3.3.4. CAG ve CCG Dizileri Tekrar Sayısı ve Kesikli Tekrar Dizileri

Bu inceleme, ilk aşamada çalışılan iki hastanın (9 ve 12 nolu olgular) normal ve mutant alellerinde gerçekleştirilebilmiştir. Sonrasında tüm denemelere rağmen diğer hastalardan sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine kullanılan primer değiştirilmiş, ancak yeni primer ile de (HD-1) başarılı sonuç alınamamıştır. HD-1 primeri ile bir örnek üzerinde [α -³²P]dATP ile yapılan denemede ürün elde edilmesi primer işaretlenmesinde bir sorun olduğunu göstermiş ancak çalışma devam ettirilmemiştir.

Çalışılabilen iki hastadan 12 nolu hastanın normal alelinde CCG tekrar sayısı 10, mutant alelinde ve 9 nolu olgunun hem mutant hem normal alelinde 7 olarak bulunmuştur. Ayrıca her dört alelde de kesikli tekrar dizisinde değişikliğin olmadığı gözlenmiştir.

Geri kalan hastalardan 10 ve 11 nolu olgular dışındaki (1,2,3,4,5,6,7,8,13,14 ve 15 nolu olgular) hastaların CAG tekrar sayılarının değerlendirilmesinde, bu hastaların yer aldığı daha önce yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar kullanılmıştır (Mutluer ve ark., 1998).

15 hastaya ait normal ve mutant alellerde elde edilen polimorfik özellikler ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyne göre dağılımları Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. 15 hastaya ait normal alelde polimorfik özellikler ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyne göre dağılımları.

Olgu no	G/A	C/T	Altılı tekrar sayısı	Yirmili tekrar sayısı	A/G	C/G	CAG tekrar sayısı	CCG tekrar sayısı	Hastalık başlama yaşı	Kalıtım
1	G	C	1	2			18		41	Maternal
2	G	C	1	2			19		24	Maternal
3	G	C	1	2			19		24	Maternal
4	G	C	1	2			19		53	Maternal
5	G	C	1	2			20		51	Paternal
6	G	C	1	2			18		51	Paternal
7	G	C	1	2			23		37	Paternal
8	G	C	1	2			19		53	?
9	G	C	1	3	A	C	17	7	39	?
10	G	C	1	2			?		43	?
11	G	C	1	2			?		45	Paternal
12	G	C	1	2	A	C	14	10	35	Maternal
13	G	C	2	2			19		38	?
14	G	C	1	2			25		40	Maternal
15	G	C	1	2			21		36	Paternal

Çizelge 3.3. 15 hastaya ait mutant alelde polimorfik özellikler ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyne göre dağılımları.

Olgu no	G/A	C/T	Altılı tekrar sayısı	Yirmili tekrar sayısı	A/G	C/G	CAG tekrar sayısı	CCG tekrar sayısı	Hastalık başlama yaşı	Kalıtım
1	G	C	1	2			44		41	Maternal
2	G	C	1	2			51		24	Maternal
3	G	C	1	2			51		24	Maternal
4	G	C	1	2			45		53	Maternal
5	G	C	1	2			43		51	Paternal
6	G	C	1	2			42		51	Paternal
7	G	C	1	2			43		37	Paternal
8	G	C	1	2			41		53	?
9	G	C	1	2	A	C	48	7	39	?
10	G	C	1	2			?		43	?
11	G	C	1	2			?		45	Paternal
12	G	C	1	2	A	C	45	7	35	Maternal
13	G	C	1	2			48		38	?
14	G	C	1	2			49		40	Maternal
15	G	C	1	2			43		36	Paternal

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada IT15 genine ait sekiz polimorfik özelliğin 15 hastanın normal ve mutant alelleri üzerindeki dağılımı araştırılmıştır. Çalışılan hiçbir hastanın normal ve mutant alellerinde nokta mutasyonlarına rastlanmamıştır. Genin 5' promoter bölgesindeki altılı ve yirmili dizinlerin tekrar sayısı tüm mutant alellerde sırası ile 1 ve 2 olarak bulunurken, normal alellerden birisinde altılı dizi tekrar sayısı 2, birisinde ise yirmili dizi tekrar sayısı 3 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürde bildirilen populasyon çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir (Coles ve ark., 1997).

Normal ve Mutant Alel CAG Tekrar Sayısı ve Paternal/Maternal Kalıtımın Hastalığın Başlama Yaşı Üzerindeki Etkisi: 15 hastaya ait normal ve mutant alellerden elde edilen sonuçların çoklu regresyon analizi ile ilk istatistik değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlar, hastalığın başlama yaşı ile CAG tekrar sayısı arasında ters orantılı bir ilişki olduğu ve sadece mutant aleldeki CAG tekrar sayısının bu ilişkideki katkısının %59 oranında olduğunu göstermiştir. Normal aleldeki CAG tekrar sayısı ve hastalığın kalıtıldığı ebeveyn ile birlikte değerlendirildiğinde, bu üç özelliğin hastalığın başlama yaşı üzerinde %63.7 oranında etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak normal aleldeki CAG tekrar sayısı ve kalıtımı gösteren ebeveyne göre tek tek incelendiğinde, normal CAG tekrar sayısının ve paternal ya da maternal kalıtımın hastalığın başlama yaşı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Mutant aleldeki CAG tekrar sayısı ile kalıtımı gösteren ebeveyn arasındaki ilişki incelendiğinde maternal aleldeki CAG sayısının paternal alele göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Literatürdeki bilgilerle uyumlu görülmeyen bu sonuçların, sınırlı sayıdaki bu hasta grubu içinde hem maternal kalıtım özelliği gösteren ve hem de en yüksek CAG tekrar sayısına sahip olan 2 ve 3 nolu olguların varlığı nedeni ile olabileceğinden hareketle bu olgular değerlendirme dışı bırakılarak ikinci bir değerlendirme yapılmıştır. Bu inceleme sonunda gerek mutant alel CAG

sayısı gerekse maternal/paternal kalıtımın hastalığın başlama yaşı üzerindeki etkilerinin ortadan kalktığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bu bilgiler ışığında, bu hasta grubu için, hastalığın başlama yaşı üzerinde maternal/paternal kalıtım ya da mutant aleldeki CAG tekrar sayısının etkisi konusunda yorumda bulunulamayacağı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. Mutant ve normal alel CAG tekrar sayıları ve paternal/maternal kalıtımın hastalığın başlama yaşı üzerindeki etkisi (Mann-Whitney U testi)

	Mutant Alel CAG Tekrar Sayısı		Normal Alel CAG Tekrar Sayısı		Hastalığın Başlama Yaşı	
	X ± SD	Ortanca	X ± SD	Ortanca	X ± SD	Ortanca
Paternal	42.75±0.5	43	20.5±2	20.5	44.7±7.3	45
Maternal	46±2.65	45	20.7±3.8	19	42.25±7.6	40.5

Polimorfik Özelliklerin Normal ve Mutant Alellerle Birlikteliği: Coles ve ark. 208 hasta ve farklı etnik gruplardan (Afrikalı, Japon ve “East Anglians”) oluşan 120 normal bireyde yaptığı çalışma sonunda, G→A ve C→T nokta mutasyonları ile altılı ve yirmili dizilerin tekrar sayılarına göre farklı yedi alel tanımlamıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. IT-15 geni 5' bölgesi polimorfik özelliklerine göre tanımlanan aleller.

Alel	Polimorfik Özellikler			
	G→A Nokta mutasyonu	C→T Nokta mutasyonu	Altılı dizi tekrar sayısı	Yirmili dizi tekrar sayısı
i	G	C	1	2
ii	A	C	1	2
iii	G	T	1	2
iv	G	C	2	2
v	A	C	2	2
vi	G	C	1	3
vii	G	C	1	3

Bu alellerden, IT-15 geninin orijinal dizininde belirtilen diziyle uyumlu olanı ilki (*i* aleli) olup, Coles ve ark.'nın çalışmasında 120 normal bireyde %68.3 - 90.2 arasında, 208 kişilik hasta grubunda da %90.4 oranında gözlenmiştir. Tanımlanan bu yedi alelin bizim çalışmamızdaki 15 hasta bireye ait normal ve mutant alellerdeki dağılımları ile Coles ve arkadaşlarının normal ve hasta bireylerde elde ettiği değerlendirme sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Coles ve ark. tarafından tanımlanan yedi alelin normal ve hasta bireylerde dağılımı (%).

Aleller	Coles ve ark. Çalışma Grubu				Tez Çalışma Grubu	
	Afrikanlı n=60	Japon n=68	East Anglian n=112	Hasta Grubu n=416	Normal Alel n=15	Mutant Alel n=15
<i>i</i>	68.3	89.7	90.2	90.4	86.6	100
<i>ii</i>	3.8	0	3.1	1.5	0	0
<i>iii</i>	3.8	0	2.1	5.25	0	0
<i>iv</i>	16.7	0	1.8	0.96	0	0
<i>v</i>	6.7	0	0	0.24	6.7	0
<i>vi</i>	0	0	3.6	1.2	0	0
<i>vii</i>	1.7	10.3	0	0.48	6.7	0

Coles ve ark.'nın çalışmasında, *i* aleli dışındaki diğer alellerin oldukça seyrek gözleendiği, sadece *iii* alelinin sıklığının istatistik değerlendirme açısından yeterli görüldüğü belirtilmekte, ancak inceleme sonunda hastalığın başlama yaşı ile bu alelin sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığı belirtilmektedir. Bunun nedeni olarak da çalışma grubunun küçük olması ve kullandıkları yöntemle, bu alellerin normal ve mutant alellere göre dağılımlarının yapılamamasını öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmadaki hasta grubunda ise mutant alellerde *i* aleli dışında alele rastlanmamış, normal ve mutant aleller birlikte değerlendirildiğinde *i*, *v* ve *vii* alellerinin sıklıkları sırası ile %93.4, %3.3 ve %3.3 olarak bulunmuştur. Normal ve mutant alellerdeki bu dağılım, gerek ayrı ayrı gerekse birlikte Coles ve ark.'nın çalışma grubundaki dağılımlara göre incelendiğinde uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan yöntem, tanımlanan bu yedi alelin normal ve mutant alellere dağılımını olası kılmakla birlikte,

Çalışma grubunun çok küçük olması nedeni ile bu alellerden belli birinin mutant alel ile birlikteliği ya da hastalığın başlama yaşı ya da kalıtımı gibi faktörler üzerinde olası etkilerini yorumlama olanağı bulunamamıştır.

Bu çalışmada yer verilmeyen ancak IT15 geni 5' ucuna ait bir başka polimorfik zellik Sau3A RFLP' dir (Carlock, 1994). Genomik DNA Sau3A enzimi ile kesildiğinde, CAG tekrar bölgesini içine alan 1.8 ve 2.7 kb'lık iki ürün vermektedir. Carlock ve ark.' nın 13 ailede 50'nin üzerinde hasta bireyde yaptığı çalışmada bu ürünlerin sıklığını 1.8 ve 2.7 kb'lık iki ürün için sırası ile %81.9 ve %18.2, normal popülasyonda ise %70.2 ve %29.8 olarak belirtilmektedir. Bu dağılım ilk bakışta farklılık göstermemektedir. Ancak aynı çalışmada ileri incelemede mutant alellerin tümünün 1.8 kb'lık ürün içinde yer aldığı gösterilmiştir. Mutant alellerin neden 1.8'lik alellerde birikme gösterdiği tam olarak açıklanamamakla birlikte mutant kromozomlarda CAG tekrar bölgesi dışındaki bazı dizi ya da yapıların etkisi olabileceğinden söz edilmektedir. Taze mutasyon olguları da dikkate alındığında, mutant alellerin 2.7 kb'lık ürünlerde de rastgele dağılım göstermesi gerektiği ancak bu olgularda yapılacak çalışmalarla yine mutant alellerin 1.8'lik ürünle birlikteliği saptanırsa, bu alelin CAG tekrar bölgesi ile tam bir bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) gösteren atasal bir karakterinin olabileceğinden söz edilmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma, IT15 geni 1. ekzonu ve 5' promoter bölgesinde tanımlanmış olan polimorfik özelliklerin mutant alellerle olan birlikteliğinin, Huntington hastalığının ortaya çıkmasındaki direkt ya da dolaylı etkisini araştırmak amacı ile planlanmıştır. Kullanılan yöntem, araştırılan polimorfik özelliklerin normal ve mutant alellerde ayrı ayrı gözlenebilmesini olanaklı kılmış ancak çalışma grubundaki hasta sayısının son derece kısıtlı olması ve aile bireylerinin çalışılamamış olması nedeni ile bu polimorfik özelliklerin mutant alellerle birlikteliği ya da hastalığın ortaya çıkmasındaki olası etkileri konusunda yorum yapılabilecek yeterli veri elde edilememiştir.



ÖZET

Huntington Hastalığı Geni (IT15) Polimorfik Özelliklerinin Normal ve Mutant Alellerdeki Dağılımı

Huntington Hastalığı (HH), dikenli nöronların kaybı ile karakterize, otozomal dominant geçiş gösteren, santral sinir sisteminin ilerleyici, dejeneratif bir hastalığıdır.

Hastalıktan sorumlu gen 1993 yılında "Huntington Disease Collaborative Research Group" tarafından izole edilmiştir. Hastalığa neden olan mutasyon, genin 1. ekzonunda yer alan CAG dizisi tekrar sayısındaki artıştır. Gen üzerinde tanımlanan bazı polimorfik özelliklerin CAG tekrar sayısı ile ilişkili olduğu ve bu nedenle hastalığın ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, genin 1. ekzonunda ve 5' promoter bölgesinde tanımlanan polimorfik özelliklerin hastalığa neden olan mutant alellerle birlikteliği araştırılmıştır. Bu amaçla 15 hastanın periferik kan örneğinden DNA izolasyonu yapılarak PCR ve DNA dizi analizi uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntem, CAG tekrar sayıları yanısıra araştırılan polimorfik özelliklerin de normal ve mutant alellerde ayrı ayrı gözlenebilmesini olanaklı kılmış ancak çalışma grubundaki hasta sayısının kısıtlı kalması ve aile bireylerinin çalışılamamış olması nedeni ile bu polimorfik özelliklerin mutant alellerle birlikteliği ya da hastalığın ortaya çıkmasındaki olası etkileri konusunda yorum yapılabilecek yeterli veri elde edilememiştir.

Anahtar kelimeler: Huntington hastalığı, tekrar dizileri, PCR, polimorfizm.

SUMMARY

The Distribution of Huntington Disease Gene (IT15) Polimorphic Features on Normal and Mutant Alleles.

Huntington Disaese is an autosomal dominant, progressive degenerative disorder of central nervous system characterized by loss of spiny cells.

The gene responsible for the disease was identified by the Huntington's Disease Collaborative Research Group in 1993. The underlying mutation causing the disease is the expansion of a CAG trinucleotide repeat in the first exon beyond a certain repeat number. It is suggested that some polimorphic features of the gene may be associated with the CAG repeat number and therefore may have a role in disease expression.

In this study, the distribution of polymorphic features identified on the first exon and the 5' promoter region of the gene on normal and mutant alleles was investigated. PCR and DNA sequencing was performed following DNA isolation from peripheral blood samples of 15 patients for this purpose. The method of choice enabled a clear observation of the CAG repeats as well as the polymorphic features under investigation both in mutant and wild type alleles separately. But, the limited number of the patient group and unavailability of the samples from the family members didn't allow the researcher for a thorough comment on the co-existence of mutant alleles with the polymorphic features to effect the expression and the characteristics of the disease due to the insufficient data obtained.

Key words: Huntington disease, trinucleotide repeats, PCR, polymorphism.

KAYNAKLAR

- ALMQVIST E., SPENCE N., NICHOL K., ANDREW S.E., VESA J., PELTONEN L., ANVRET M., GOTO J., KANAZAWA I., GOLDBERG Y.P., HAYDEN M.R. (1995). Ancestral differences in the distribution of the $\Delta 2642$ glutamic acid polymorphism is associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insights into the genetic evolution of Huntington disease. *Hum Mol Genet*, Vol.4, No.2, 207-214.
- AMBROSE C.M., DUYAO M.P., BARNES G., BATES G.P., LIN C.S., SRINIDHI J., BAXENDALE S., HUMMERICH H., LEHRACH H., ALTHERR M., WASMUTH J., BUCKLER A., CHURCH D., HOUSMAN D., BERKS M., MICKLEM G., DURBIN R., DODGE A., READ A., GUSELLA J., MACDONALD M.E. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Som Cell Mol Genet*, Vol.20, No.1:27-38.
- ANDREW S.E., GOLDBERG Y.P., THEILMANN J., ZEISLER Z., HAYDEN M.R. (1994). A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum Mol Genet*, 3:65-68.
- BROWN WT (1989). DNA studies of the fragile X mutation. *The Fragile X Syndrome*. ed. Davies KE. Oxford University Press. Chapter 4.
- CARLOCK L., GUTRIDGE K., VO T. (1994). A Sau3A polymorphism in the 5' end of the IT15 gene that nonrandomly segregates with the Huntington disease trinucleotide expansion. *Hum Genet*, 93:457-459.
- CHONG S.S., ALMQVIST E., TELENUS H., LATRAY L., NICHOL K., BOURDELAT-PARKS B., GOLDBERG Y.P., HADDAD B.R., RICHARDS F., SILENCE D., GREENBERG C.R., IVES E., VAN DEN ENGH G., HUGHES M.R., HAYDEN M.R. (1997). Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Hum Mol Genet*, Vol.6, No.2:301-309.
- CHUNG M., RANUM L.P.W., DUVICK L.A., SERVADIO A., ZOGHBI H.Y., ORR H.T. (1993) Evidence for a Mechanism Predisposing to Intergenerational CAG Repeat Instability in Spinocerebellar Ataxia Type I. *Nat Genet*, 5:254-258.
- COLES R., LEGGO J., RUBINSZTEIN D.C. (1997). Analysis of the 5' upstream sequence of the Huntington disease (HD) gene shows six new rare alleles which are unrelated to the age at onset of HD. *J Med Genet*, 34:371-374.
- CRAUFURD D., DODGE A. (1993). Mutation size and age at onset in Huntington's Disease. *J Med Genet*, 30:1008-1011.

- EICHLER E.E., HOLDEN J.J.A., POPOVICH B.W., REISS A.L., SNOW K., THIBODEAU S.N., RICHARDS C.S., WARD P.A., NELSON D.L. (1994). Length of Uninterrupted CGG Repeats Determines Instability in the FMR Gene. *Nat Genet*, 8:88-94.
- GYLLENSTEN U. (1989) PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. Ed. Erlich H.A. Stockton Press, New York. Chapter 5.
- GOLDBERG Y.P., MCMURRAY C.T., ZEISLER J., ALMQVIST E., SILENCE D., RICHARDS F., GACY A. M., BUCHANAN J., TELENUS H., HAYDEN M.R. (1995). Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum Mol Genet*, Vol.4, No.10:1911-1918.
- JOU Y-S., MYERS R.M. (1995). Evidence from antibody studies that the CAG repeat in the Huntington disease gene is expressed in the protein. *Hum Mol Genet*, Vol.4, No.3, 465-469.
- KOROSHETZ W.J., MYERS R.H., MARTIN J.B. (1993) Huntington Disease. The molecular and genetic basis of neurological disease. First Ed. Butterworth-Heinemann Press. Chapter 46.
- KREMER B., ALMQVIST E., THEILMANN J. SPENCE N., TELENUS H., GOLDBERG Y.P., HAYDEN M.R. (1995). Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet*, 57:343-350.
- MARGOLIS L.R., STINE O.C., CALLAHAN C., ROSENBLATT A., ABBOTT M.H., SHERR M., ROSS C.A. (1999) Two Novel Single-Base-Pair Substitutions Adjacent to the CAG Repeat in the Huntington Disease Gene (IT15): Implications for Diagnostic Testing. *Am J Hum Genet*, 64:323-326.
- MUTLUER N., KARABULUT H.G., AKBOSTANCI C., ATBAŞOĞLU C., BÖKESÖY I. (1998). Huntington hastalığında nörolojik, psikiyatrik ve genetik değerlendirme. TÜBİTAK-Araştırma Altyapısını Destekleme Programı, Proje No: SBAG – AYG – 159.
- NORREMOLLE A., SORENSEN S.A., FENGER K., HASHOLT L. (1995). Correlation between magnitude of CAG repeat length alterations and length of the paternal repeat in paternally inherited Huntington's disease. *Clin Genet*, 47, 113-117.
- PECHEUX C., LeGALL A., KAPLAN J.C., DODE C. (1996). Sequence analysis of the CAG triplet repeats region in the Huntington disease gene (IT15) in several mammalian species, *Ann Genet*, Vol.39, No. 2:81-86.

- RANEN N.G., STINE O.C., ABBOTT M.H., SHERR M., CODORI A.M., FRANZ M.L., CHAO N.I., CHUNG A.S., PLEASANT N., CALLAHAN C., KASCH L.M., GHAFARLI M., CHASE G.A., KAZAZIAN H.H., BRANDT J., FOLSTEIN S.E., ROSS C.A. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet*, 57:593-602.
- RICHARDS R., SUTHERLAND G.R. (1994). Simple Repeat DNA Is Not Replicated Simply. *Nature*, 6:114-116.
- RUBINSZTEIN D.C., LEGGO J., COLES R., ALMQVIST E., BIANCALANA V., CASSIMAN J.J., CHOTAI K., CONNARTY M., CRAUFURD D., CURTIS A., CURTIS D., DAVIDSON M.J., DIFFER A.M., DODE C., DODGE A., FRONTALI M., RANEN N.G., STINE O.C., SHERR M., ABBOTT M.H., FRANZ M.L., GRAHAM C.A., HARPER P.S., HEDREEN J.C., JACKSON A., KAPLAN J.C., LOSEKOOT M., MACMILLAN J.C., MORRISON P., TROTTIER Y., NOVELLETO A., SIMPSON S.A., THEILMANN J., WHITTAKER J.L., FOLSTEIN S.E., ROSS C.A., HAYDEN M.R. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington Disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet*, 59:16-22.
- RUBINSZTEIN D.C., LEGGO J., GOODBURN S., BARTON D.E., FERGUSON-SMITH M.A. (1995). Haplotype analysis of the $\Delta 2642$ and (CAG)_n polymorphisms in the Huntington's disease (HD) gene provides an explanation for an apparent 'founder' HD haplotype. *Hum Mol Genet*, Vol.4, No.2, 203-206.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- SCHILLING G., SHARP A.H., LOEV S.J., WAGSTER M.V., LI S-H., STINE O.C., ROSS C.A. (1995). Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. *Hum Mol Genet*, Vol.4, No.8, 1365-1371.
- SHAW D.J. (1995) Molecular genetics of human inherited disease. First Ed. John Wiley & Sons Press. Chapter 4.
- THE HUNTINGTON DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, Vol.72, 971-983.

EK

HASTA BİLGİLENDİRME ve ONAM FORMU

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek amacı ile düzenlenmiştir. Formun düzenlenmesinde, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Adı: Huntington Hastalığı geni (IT-15) polimorfik özelliklerinin normal ve mutant alellerdeki dağılımı

Araştırmanın Amacı: Genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan Huntington Hastalığı, psikolojik ve nörolojik sorunlarla birliktelik göstermektedir. Hastalık, aynı zamanda genetik özellikler taşıması nedeni ile sadece birey açısından değil aile açısından da önem kazanmaktadır. Hastalıkla ilgili gen ve bu gendeki hastalığa neden olan değişiklik 1993 yılında belirlenmiştir. Bu tarihten itibaren gen düzeyinde çeşitli topluluklarda yapılan çalışmalarla gen üzerinde toplumdan topluma değişebilen özellikler saptanmış ve bu özelliklerden hastalıkla ilgili olabilecek değişiklikler üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Bu proje, Huntington Hastalığı geninin, sözkonusu değişiklikler açısından Türk Toplumundaki yapısını belirlemeye yönelik bir çalışma olarak planlanmıştır.

Çalışma Protokolü: Araştırmaya katılacak bireylerden 5 ml periferik kan alınarak gen düzeyinde çalışma yapılacaktır. Bu yöntem herhangi bir yan etki taşımamaktadır.

Ben, bu araştırma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim. Araştırma ile ilgili sorularımı Dr. Halil Gürhan Karabulut'a sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım. Bu bilgiler ışığında çalışmaya kendi isteğimle katılıyorum.

Tarih:

İmza:

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOĞUMANTASYON MERKEZİ**