

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SPİNO SEREBELLAR ATAKSİ SENDROMLU HASTALARDA TİP
7 (SSA7) VE TİP 17 (SSA17) CAG TRİNÜKLEOTİT
TEKRARLARININ İNCELENMESİ**

Perçin PAZARCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil KASAP

ADANA-2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SPİNO SEREBELLAR ATAKSİ SENDROMLU HASTALARDA TİP
7 (SSA7) VE TİP 17 (SSA17) CAG TRİNÜKLEOTİT
TEKRARLARININ İNCELENMESİ**

Perçin PAZARCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil KASAP

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TF2009YL26 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2011


KABUL VE ONAY

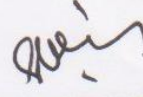
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Spinocerebellar Ataksi Sendromlu Hastalarda Tip 7 (SSA7) Ve Tip 17 (SSA17) CAG Trinükleotit
Tekrarlarının İncelenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 21/07/2011

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Halil KASAP
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Şakir ALTUNBAŞAK
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Halil Kasap
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalara başladığımdan beri beni doğru bir şekilde yönlendiren, yol gösteren, fikir veren, çıkan sorunların çözülmesinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Halil KASAP'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim sırasında desteklerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Davut ALPTEKİN, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN, Prof. Dr. Mülkiye KASAP ve Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP 'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Araştırmamızın laboratuvar çalışmaları sırasında sorunların çözülmesinde fikir ve yardımlarını esirgemeyen Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. A. İrfan GÜZEL ve anabilim dalımız Öğr. Gör. Dr. M. Bertan YILMAZ, Uzm. Bio. Sabriye KOCATÜRK SEL ve Yüksek Lisans Öğrencisi M. Ali ERKOÇ'a ayrıca teşekkür ederim.

Araştırmamızın klinik ve hasta tanısı kısmında yardımlarını esirgemeyen, bizi her aşamada bilgilendiren ve ilgilenen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Filiz KOÇ'a ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şakir ALTUNBAŞAK'a teşekkür ederim.

Ayrıca manevi yönden bana her zaman destek olan anneme, babama, kardeşime ve çalışmanın çeşitli aşamalarında yardımcı dokunan anabilim dalımız personeline sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Üçlü Nükleotit Tekrarlarının Artışı	3
2.2. Ataksiler	9
2.3. Spinoserebellar Ataksiler	10
2.3.1. Spinoserebellar Ataksi Tip 7	11
2.3.2. Spinoserebellar Ataksi Tip 17	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. GEREÇ	15
3.2. YÖNTEM	16
3.2.1. Örneklerin Sağlanması	16
3.2.2. DNA Elde Edilmesi	17
3.2.3. Spinoserebellar Ataksi Tip 7 ve Spinoserebellar Ataksi Tip 17 İçin Üçlü Nükleotit Tekrar Artışı Olan Bölgelerin çoğaltılması	18
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	19
3.2.5. Örneklerin Baz Uzunluklarının Ölçülmesi ve Tekrar Sayılarının Bulunması	20
3.2.6. İstatistiksel Analiz	20
4. BULGULAR	21
4.1. Spinoserebellar Ataksi Tip 7'ye İlişkin Bulgular	22
4.2. Spinoserebellar Ataksi Tip 17'ye İlişkin Bulgular	28
5. TARTIŞMA	37

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	44
EKLER	53
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	TNR'lerin oluşturduğu olağandışı formasyonlar	5
Şekil 2.2.	Replikasyon sırasında oluşan kayma ile tekrar sayısının artışı	6
Şekil 2.3.	Baz çıkarma tamiri sırasında oluşan tekrar artışının mekanizması	7
Şekil 4.1.	SSA7 ilgili gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntülerine ait bir örnek	25
Şekil 4.2.	SSA7 gen bölgesinde TNR artışı gösteren hastanın agaroz jel görüntüsü	26
Şekil 4.3.	SSA7 gen bölgesi için TNR sayılarının frekanslarını gösterir grafik	27
Şekil 4.4.	SSA17 ilgili gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntülerine ait bir örnek	32
Şekil 4.5.	SSA17 gen bölgesinde TNR artışı gösteren düşük penetrans hastasının agaroz jel görüntüsü	33
Şekil 4.6.	SSA17 gen bölgesinde TNR artışı gösteren tam penetrans hastasının agaroz jel görüntüsü	34
Şekil 4.7.	SSA17 gen bölgesi için TNR sayılarının frekanslarını gösterir grafik	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	TNR'lerin artışından kaynaklanan bazı hastalıklar	4
Çizelge 2.2.	SSA tipleri, mutasyonların meydana geldiği kromozom bölgeleri, mutasyonların meydana geldiği genler, mutasyon tipleri ve etkilenen proteinler	11
Çizelge 2.3.	ATXN7 geninin TNR artışı göstererek SSA7'ye sebep olan bölgesi	12
Çizelge 2.4.	TBP geninin TNR artışı göstererek SSA17'ye sebep olan bölgesi	14
Çizelge 4.1.	Hasta ve kontrol gruplarının yaş dağılımları ve ortalamaları. Hasta grubundaki HBY ortalamaları	21
Çizelge 4.2.	Ataksi hastalarında görülen şikayetlerin dağılımı	22
Çizelge 4.3.	Ataksi hastalarında FA tanısı, mental retardasyon ve anne-babada akraba evliliği dağılımı	22
Çizelge 4.4.	Ataksi hastalarında tetraparezi ve paraparezi dağılımı	22
Çizelge 4.5.	SSA7 gen bölgesi mutasyon taramalarında elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayıları	23
Çizelge 4.6.	SSA7 gen bölgesi için TNR sayıları ortalamaları	25
Çizelge 4.7.	SSA7 TNR artışı tespit edilen örneğe ilişkin bilgiler	26
Çizelge 4.8.	SSA7 ilgili gen bölgesi için TNR sayılarının frekansları	27
Çizelge 4.9.	SSA17 gen bölgesi mutasyon taramalarında elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayıları	28
Çizelge 4.10.	SSA17 gen bölgesi için TNR sayıları ortalamaları	32
Çizelge 4.11.	SSA17 TNR artışı tespit edilen örneklere ilişkin bilgiler	34
Çizelge 4.12.	SSA17 ilgili gen bölgesi için TNR sayılarının frekansları	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
FA	Frederich Ataksi
HBV	Hastalık Başlama Yaşı
MgCl₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Dakikadaki Rotor Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSA	Spinoserebellar Ataksi
SSA7	Spinoserebellar Ataksi Tip 7
SSA17	Spinoserebellar Ataksi Tip 17
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> adlı bakteriden izole edilen DNA polimeraz enzimi
TBE	Tris-Boron-EDTA
TBP	TATA Box-binding Protein
TE	Tris-EDTA
TE-9	Tris-EDTA pH 9.0
TNR	Üçlü Nükleotit Tekrarı (Trinucleotide Repeat)
UTR	Genin Protein Sentezinde Kullanılmayan Bölgesi (Untranslated Region)

ÖZET

Spinocerebellar Ataksi Sendromlu Hastalarda Tip 7 (SSA7) ve Tip 17 (SSA17) CAG Trinükleotit Tekrarlarının İncelenmesi

Spinocerebellar Ataksi (SSA), beyincik, beyin sapı ve omurilikte ilerleyen fonksiyon bozukluğu ile karakterize, zamanla ilerleyen, dejeneratif, şu ana kadar birçok farklı tipi belirlenmiş bir genetik hastalıktır. Klinik semptomlar genellikle yürüyüşte bozulma, el ve ayak hareketlerinin koordinasyonunda azalma, konuşmada bozukluk, görme kaybı ve bunama olarak sıralanabilir. Hastalarda genellikle beyincik atrofişi görülmekle birlikte farklı tipteki ataksilerin beyincığın farklı bölgelerini etkilediği bilinmektedir. Günümüzde farklı kromozomal lokus ya da gen farklılığına göre 30'nin üzerinde farklı tipleri olan kalıtsal SSA hastalığı tanımlanmış durumdadır. Farklı tipteki SSA'ların klinik belirtileri birbirleriyle çok benzer olmakla birlikte, bu sendromun farklı tiplerine neden olan gen bölgeleri ve bu bölgelerdeki mutasyonlar farklılık göstermektedir. Bu nedenle hastalığın klinik tanısı çok zor olmakla birlikte, hastalığa neden olan özgün lokustaki genetik düzensizliğin moleküler yöntemlerle belirlenmesi tanının kesin olarak yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. SSA hastalığına neden olan mutasyonlar birkaçı dışında üçlü nükleotit tekrarlarındaki (TNR) anormal artışlardan kaynaklanmaktadır. SSA7'ye 3'üncü kromozomun p21.1 bölgesinde bulunan ATXN7 geninin üçüncü ekzonundaki tekrar artışları ve SSA17'ye 6'ncı kromozomun q27 bölgesinde bulunan TATA box-binding protein (TBP) geninin üçüncü ekzonundaki tekrar artışları sebep olmaktadır.

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Pediatrik Nöroloji servislerine başvurmuş, SSA teşhisi konmuş hastalardan ve sağlıklı kişilerden kan örnekleri toplandı. Hasta ve normal bireylerin SSA7 ve SSA17 bölgeleri için tekrar sayıları, tekrar artışı gösteren bölgelerin PCR amplifikasyonu yoluyla çoğaltılmasının ardından elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapıp uzunlukları bilinen DNA parçalarıyla karşılaştırılması yoluyla belirlendi.

Çalışmamızda; SSA7 taramalarında 1 bireyde (1/60, %1,7) tam penetrans, SSA17 taramalarında ise 3 bireyde (3/159, %1,9) 43-48 arasında TNR sayısı olan düşük penetrans, 3 bireyde (3/159, %1,9) 49-66 TNR sayısı ile tam penetrans gösterdiği ve hepsinin genotipinin heterozigot olduğu saptandı. SSA7 ve SSA17'nin görülme sıklıkları, normal bireylerde görülen tekrar sayılarının ortalamaları ve frekansları belirlendi. Ayrıca, hasta bireylerdeki tekrar sayılarının hastalık başlama yaşıyla ilişkisi incelendi.

Anahtar Sözcükler: ATXN7, TATA Box-binding Protein, Spinoserebellar Ataksi Tip 7, Spinoserebellar Ataksi Tip 17, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABSTRACT

Determination of Type 7 (SCA7) and Type 17 (SCA17) CAG Trinucleotide Repeats In Patients with Spinocerebellar Ataxia Syndrome

Spinocerebellar Ataxia (SCA) is a progressive, degenerative, genetic disease with multiple types determined until now. It is characterized by the progressive function disorder in cerebellum, brainstem and spinal cord. Clinical symptoms are generally incoordination of gait, poor coordination of hands and feet, distortion of speech, loss of vision and dementia. Mostly atrophy of the cerebellum is seen in patients however, it is known that different ataxias affect different regions of the cerebellum. Today, more than 30 different types of hereditary SCA is determined according to different chromosomal locus or different gene. Different types of ataxias have very similar clinical symptoms however, they are caused by different gene locus and mutations in these locus are also different. Due to this reason clinical diagnosis of the disease is very hard but mutations in the specific locus can be determined by molecular methods and disease can be diagnosed. The mutations causing SCA are usually the abnormal increases in trinucleotide repeats (TNR). SCA7 is caused by the increased repeats in ATXN7 gene which is located on p21.1 region of 3rd chromosome and SCA17 is caused by the increased repeats in TATA box-binding protein (TBP) gene which is located on q27 region of 6th chromosome.

In this research, blood samples are collected from patients who applied to Neurology and Pediatric Neurology clinics of Çukurova University Medical School and are diagnosed for SCA and from healthy people for control. The repeat numbers of the SCA7 and SCA17 regions of the patients and normal people are determined by the PCR amplification of the regions that show expansion followed by agarose gel electrophoresis to compare these PCR products with the known DNA fragments.

In our research; during SCA7 screening 1 person (1/60, 1,7%) is identified as having full penetrance, during SCA17 screening 3 people (3/159, 1,9%) are identified as having low penetrance with 43-48 TNR numbers, 3 people (3/159, 1,9%) are identified as having full penetrance with 49-66 TNR numbers and all

having heterozygous genotype is determined. Prevalences of the SCA7 and SCA17, averages and frequencies of the repeat numbers are determined. Furthermore, relation of the repeat numbers and disease onset age is examined.

Key Words: ATXN7, TATA Box-binding Protein, Spinocerebellar Ataxia Type 7, Spinocerebellar Ataxia Type 17, Polymerase Chain Reaction

1. GİRİŞ

Spinocerebellar Ataksiler (SSA) kalıtsal özellik gösteren kompleks nörodejeneratif hastalıklardır ve oftalmopleji, görme kaybı, dizatri, demans ve dengesizlikle karakterizedir^{1,2}. Bu kompleks hastalık grubu ve alt tipleri sendroma neden olan farklı gen lokuslarının bulunmasıyla tanımlanmaya başlamıştır³. Sayılarının artacağı tahmin edilmekte birlikte günümüzde 30'dan fazla SSA tipi bulunmuştur. Birkaçı dışında SSA hastalığına neden olan mutasyonlar TNR'lerdeki anormal artışlardan kaynaklanmaktadır⁴. Artış miktarının, hastalığın şiddeti ve ortaya çıkış yaşıyla ilgili olduğu düşünülmeyle beraber henüz kesin bir kanıt bulunamamıştır⁵. Bu hastalık için henüz kesin bir tedavi olmamakla birlikte, hastalık tipinin doğru teşhis edilmesi hayat kalitesinin artırılabilmesi ve diğer aile bireylerinde ortaya çıkabilecek sendromun erken teşhis edilmesi açısından önem taşımaktadır.

SSA7'ye yol açan gen bölgesi birçok farklı makalede farklı coğrafi bölgeler ve etnik kökenler için haritalanmış, görülme sıklığı ve tekrar sayılarındaki artış miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır^{6,7,8,9}. Elde edilen bulgulara göre SSA7, 3'üncü kromozomun p21.1 lokusundaki ATXN7 geninin üçüncü ekzonundaki CAG trinükleotit artışlarından kaynaklanmaz ve Kafkas populasyonunda en sık görülen tiplerden biridir¹⁰. Normal bireylerde bu bölgede trinükleotid tekrarları 17'nin altındayken (ortalama 10), hasta bireylerde bu tekrarların 37'den 460'a kadar artabildiği görülmüştür¹¹. Ayrıca hastalığa neden olan ATXN7 alleleline sahip olan ailelerde tekrar sayılarının nesilden nesile arttığı ve dolayısıyla hastalığın görülme şiddetinin sonraki nesillerde dramatik şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir¹².

SSA17, yine SSA7 gibi, SSA1, SSA2, SSA3 ve SSA6'dan sonra Kafkas populasyonunda en sık görülen tiptir¹³. SSA'nın bu tipine 6'ncı kromozomun q27 bölgesinde bulunan TBP geninin üçüncü ekzonundaki CAG trinükleotit tekrarlarındaki artışlar sebep olmaktadır¹⁴. Normal bireylerde bu lokustaki tekrar sayıları 25-42 arasındayken hasta bireylerdeki bugüne kadar bulunan en fazla tekrar sayısı 66 olmakla birlikte 49'dan fazla tekrara sahip bireyler hasta kabul edilmektedir¹⁵.

Günümüzde, özgün bölgenin PCR amplifikasyonu yoluyla çoğaltılıp tekrar sayılarının belirlenmesiyle SSA7 ve SSA17'nin teşhisi kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu tanı şekli, kan ve amniyon sıvısı gibi kolaylıkla elde edilebilen materyaller kullanılarak

uygulanmakta, erken teşhis ve tanı, önleyici diaqnoz, hastalığın şiddetinin belirlenmesi, hastalık görülen bireylerin ailelerinin uyarılması, hastalara genetik danışmanlık verilmesi gibi çeşitli amaçlarla dünyanın birçok yerinde birçok hastane ve klinikte kullanılmaktadır⁵.

Ataksi tiplerinin doğru teşhisi klinik tanıdan çok moleküler yöntemlerle olabilmektedir. Farklı ataksi tiplerinde görülen TNR sayılarının artışı bölgeden bölgeye ve etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir. Dünyanın birçok farklı bölgesinde bu hastalığın farklı tiplerinin frekanslarının belirlenmesi için çalışmalar yapılmakla birlikte, bölgemiz için henüz bu yönde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde spinoserebellar ataksi teşhisi konmuş hastalar SSA7 ve SSA17'ye neden olan gen bölgelerindeki mutasyonlar açısından incelenerek, bu mutasyonların görülme sıklığının belirlenmesi planlanmıştır. Elde edilecek bilgilerin erken tanıda kullanılabilmesi, tekrar sayısı ile hastalığın şiddeti ve başlangıç yaşının ilişkilendirilmesi ile tedavi sürecine yardımcı olunması ve hasta bireylerin ailelerine gerekirse genetik danışmanlık verilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üçlü Nükleotit Tekrarlarının Artışı

TNR'ler ve artışlarına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların ilk olarak keşfedilmesi, Frajil-X sendromu olarak bilinen genetik hastalıkla ilgili yapılan çalışmalara dayanır. Bu sendrom, insanlarda görülen kalıtsal mental retardasyonun klinik olarak 1:5000 insidans ile en sık karşılaşılan formudur¹⁶. Bu sendromla ilgili olarak yapılan ilk çalışmalarda, sendromun kuşaklar arasında aktarılırken şiddeti, ilk olarak ortaya çıkma yaşı ve ortaya çıkma ihtimalinin bilinen diğer kalıtsal hastalık türlerinden büyük oranda farklı olduğu bulunmuştur¹⁷. Yapılan bu çalışmalarda "Antisipasyon" olarak anılan bu fenomenin Mendel kalıtımıyla bağdaşmazlık gösterdiği ve Frajil-X sendromuna yol açan mutasyonun dinamik bir yapıda olduğu bulunmuştur. Daha sonra Frajil-X bölgesinin 1991'de klonlanmasıyla birlikte bu fenomen açıklığa kavuşturulmuştur¹⁸. Yapılan çalışmalarla sendromun, daha sonradan FMR1 olarak adlandırılan, ilgili gen bölgesinin 5' ucundaki protein sentezinde kullanılmayan kısmındaki (5'-UTR) (CGG)_n tekrarlarında meydana gelen artıştan kaynaklandığı, 5-50 arası tekrara sahip bireylerin normal olduğu ve bu tekrar sayılarını diğer nesillere stabil bir şekilde aktardığı ancak 50-200 arası tekrara sahip bireylerin premutasyon skalasında bulunduğu, kendilerinin sendromun klinik belirtilerini göstermemelerine rağmen diğer nesillere bu mutasyonu artış göstererek aktardığı ve her sonraki neslin sendromu gösterme sıklığının bir öncekinden daha fazla olduğu anlaşılmış ve antisipasyon olarak adlandırılan fenomene açıklama getirilmiştir.

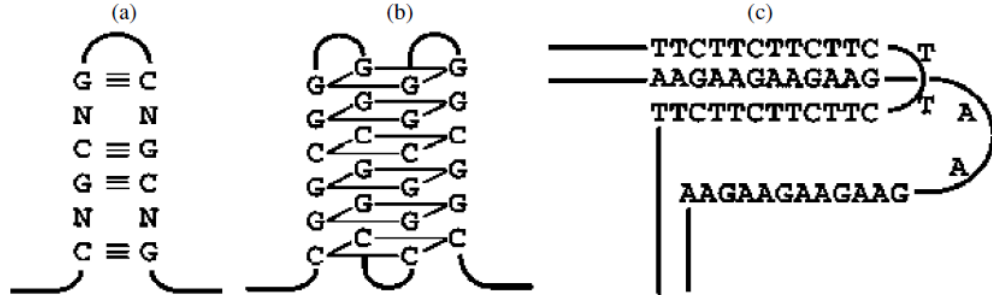
Antisipasyon gösteren kalıtsal hastalıkların büyük çoğunluğunun basit TNR'lerin artışından kaynaklandığı ve 3 tip TNR'nin; (CGG)_n-(CCG)_n, (CTG)_n-(CAG)_n, (GAA)_n-(TTC)_n, artış göstermeye yatkın olduğu bilinmektedir¹⁹. Daha sonra yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular ışığında günümüzde TNR'lerin artışından kaynaklanan birçok hastalık tespit edilmiştir (Çizelge 1.1). Miyotonik distrofi, Huntington hastalığı, Friedreich ataksi (FA) ve SSA bu hastalıklara örnek olarak verilebilir.

Çizelge 2.1 TNR'lerin artışından kaynaklanan bazı hastalıklar

Hastalık	Gen	Tekrar Dizisi	Tekrar Sayısı	
			Normal	Mutant
Frajil-X	FMR1	CGG	< 50	> 200
Miyotonik Distrofi	DMPK	CTG	< 35	> 50
Friedreich Ataksi	X25	GAA	< 35	> 100
Huntington	IT15	CAG	< 40	> 40
SSA1	ATAXIN1	CAG	< 40	> 40
Spinobulbar Müsküler Atrofi	AR	CAG	< 30	> 40

Artış gösteren TNR'lerin etkileri, tekrarların bulunduğu kromozoma, buldukları gene, gen üzerinde buldukları konuma, genin sentezlediği protein üzerindeki etkilerine ve buna benzer daha birçok faktöre göre değişiklik gösterebilir. Bu tip artışların sebep olduğu hastalıkların çok değişik patogenez ve semptomlar göstermesinin nedenlerinin bunlar olduğu bilinmektedir. Ancak, her ne kadar yukarıda yazılan sebeplerden dolayı hastalıklar birbirlerinden farklı seyir gösterse de, bu sebeplerden bağımsız olarak, TNR'lerin artışlarının oluşumunda belirli bir mekanizma olduğu genel olarak düşünülmektedir. Bu düşüncenin dayandığı temel nokta ise birinci olarak, hemen hemen tüm hastalık türlerinde normal tekrar sayılarının genel olarak 30-40 aralığında bulunması, ikinci olarak ise artış göstermeye başlayan tekrar dizilerinin tek basamakta birden çok artış birikimine neden olmasıdır²⁰. Günümüzde bu mekanizmalar tam olarak bilinmese de, çeşitli hipotezler ve önerilen modeller bulunmaktadır. Normal tekrar sayılarının belirli aralıkta (30-40) bulunması ve hasta bireylerde bunların artış göstermesi, supercoil formdaki DNA'da oluşan normal olmayan ikincil bir yapıyı akla getirmektedir. Bu görüş Vologodskii'nin²¹, DNA tekrarlarının DNA'da bulunan normal dışı ikincil yapılar oluşturma ihtimallerinin tekrarların uzunluklarına bağlı olarak logaritmik olarak arttığını bulduğu çalışmalarına dayandırılmaktadır. Ayrıca, farklı TNR'ler içeren DNA bölgeleri ve birçok farklı yöntemler kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda^{22,23,24,25}, bu bölgelerin katlanarak belirli kompakt bir yapıya dönüştüklerinin gözlemlenmesi bu görüşü desteklemiştir. Yapılan nükleer manyetik rezonans analizleri bu TNR'lerin DNA üzerinde saç tokası formasyonu başta olmak üzere birçok değişik olağandışı DNA formasyonu

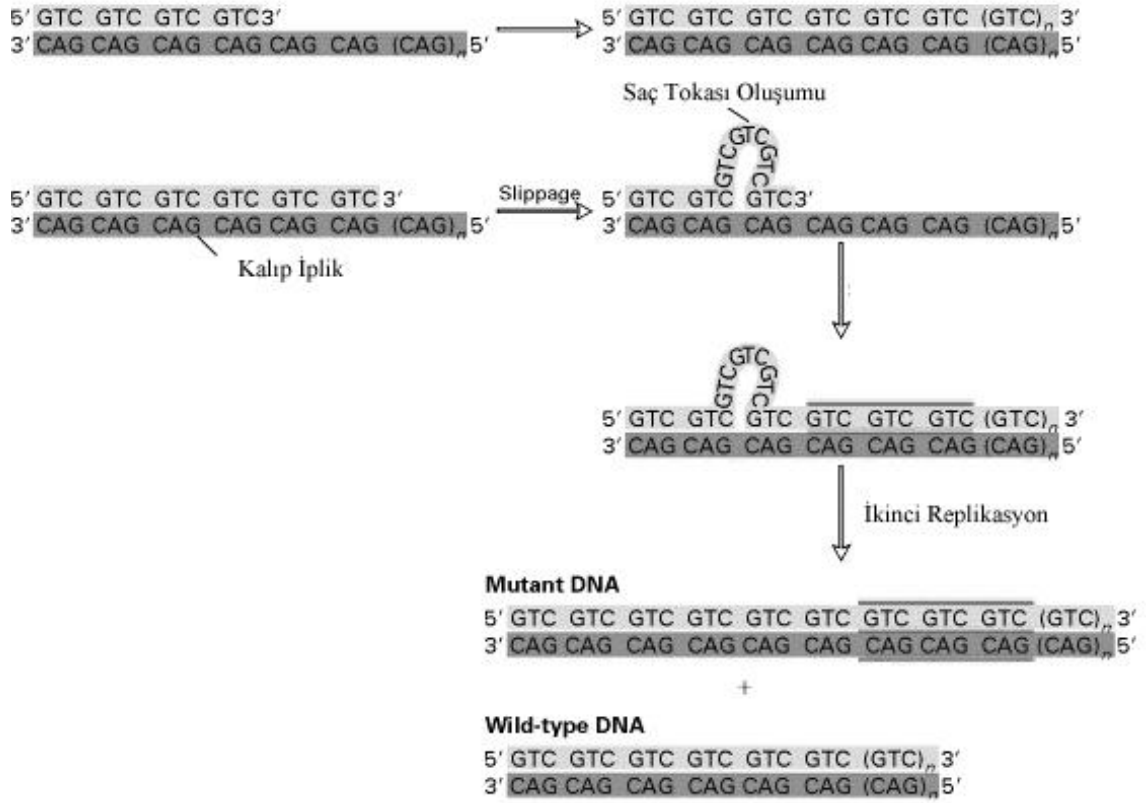
oluşturduğunu ispatlamıştır^{26,27,28}. (Şekil 2.1). Bazı tekrarların neden diğerlerinden daha çok arttığı ise bilinmezliğini korumaktadır.



Şekil 2.1 TNR'lerin oluşturduğu olağandışı formasyonlar. (a) Saç tokası, (b) Quadrupleks, (c) H-DNA¹⁸.

Olağandışı DNA formasyonlarının (özellikle saç tokası) DNA polimeraz enzimini yavaşlattığı veya durdurduğu bilinmektedir. Kunkel²⁹, yaptığı çalışmalarla basit tekrar dizilerinin replikasyon esnasında uzunluk polimorfizmine yol açabildiğini, birkaç bazlık tekrar dizilerinin replikasyon sırasında “kayma” (slippage) olarak adlandırılan bir duruma sebep olup tekrar sayısını birkaç tekrar kadar artırabildiğini göstermiştir (Şekil 2.2³⁰). Ancak bu kayma modeli, tekrar artışlarının bir seferde birden çok artış birikimine sebep olmasından ve bölünmeyen hücrelerde de tekrar artışı meydana gelmesinden dolayı, TNR artışlarını açıklamada yetersiz kalmaktadır.

TNR'lerde en fazla miktarda artış oluşumunun bölünmeyen hücrelerde görülmesi şaşırtıcı ve bir o kadar da umulmayan bir durumdur. Farklılaşmasını tamamlamış nöronlar gibi bölünme geçirmeyen hücrelerin bu şekilde TNR artışı göstermesi nasıl açıklanabilir? Bölünmeyen hücrelerde, onlarca hatta bazı durumlarda yüzlerce TNR artışı görülmesi DNA'nın bir şekilde kırılması gerçekleşmeden termodinamik olarak mümkün görülmemektedir. Yapılan çalışmalarda, çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon, crossing-over veya homolog olmayan uç birleştirmesi gibi mekanizmalarla tamirinin insanlarda TNR artışlarını etkilemediği ancak tek zincir kırıklarının tamiri sırasında hasarlı DNA bazlarının çıkarılması esnasında saç tokası yapısının oluştuğu ve TNR sayısını artış yönünde etkilediği gözlemlenmiştir^{31,32}.

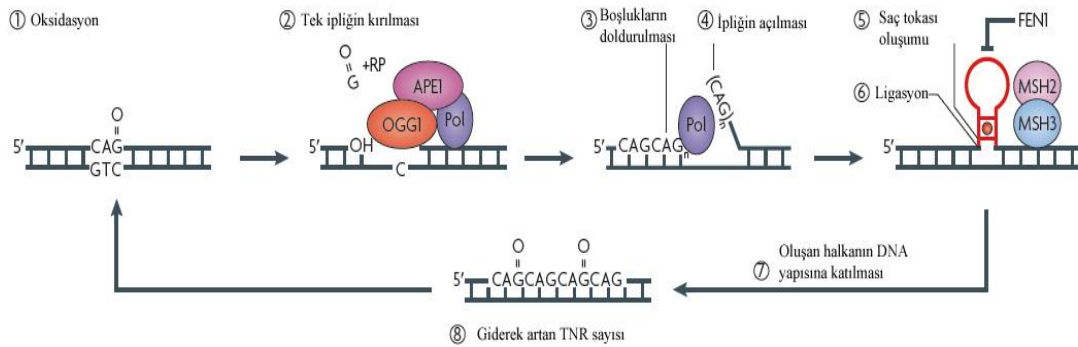


Şekil 2.2 Replikasyon sırasında oluşan kayma ile tekrar sayısının artışı³⁰.

Tek zincir kırıkları, baz çıkarma tamiri mekanizmasıyla kimyasal olarak hasarlı bazların DNA'dan çıkarılması esnasında oluşan bir ara yapıdır. Fareler üzerinde yapılan bir Huntington Hastalığı çalışmasında, oksitlenmiş DNA bazlarının birikmesinin bir sonucu olarak somatik hücrelerdeki yaşa bağlı TNR artışının olduğu gözlemlenmiştir³³. Fareler üzerinde Frajil-X sendromuyla ilgili in vivo olarak yapılan diğer bir çalışmada potasyum bromür (yüksek derecede oksidan) uygulamasının TNR artışlarını tetiklediği bulunmuştur³⁴. Bunlara ek olarak, Huntington Hastalığı'na sahip insanlarda yapılan başka bir çalışmada, kültür ortamında bulunan fibroblastların TNR'lerinde normalde artış olmamasına rağmen peroksit uygulamasının artışı indüklediği tespit edilmiştir³³. Bu fikri destekler nitelikteki bir başka bulgu ise 7,8-dihidro-8-oksoguaninin (8-oxoG) (DNA üzerinde en sık oksitlenme görülen baz) çıkarılmasından sorumlu 7,8-dihidro-8-oksoguanin DNA glikosilaz (OGG1) enziminin kaybedilmesinin Huntington Hastalığı taşıyan farelerde TNR artışını baskıladığının görülmesidir³³. Bu bulgular hep beraber ele alındığında bölünmeyen hücrelerde TNR

artışına, oksitlenmiş DNA bazlarının çıkarılması esnasında işleyen baz çıkarma tamir mekanizmasının katkısı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Bilindiği üzere, oksitlenmiş bazın çıkarılmasının ardından baz çıkarma tamir mekanizması oluşan boşlukları doldurmak üzere harekete geçmektedir. Bu tamir esnasında tek zincir kırıklarının oluştuğu ve bu zincirde flap (savrulmuş kanat benzeri bir yapı) oluşumu gerçekleştiği ayrıca oluşan bu flapların boşlukları doldurması için DNA polimeraz β 'yi uyardığı çeşitli çalışmalarda gözlemlenmiştir^{33,35}. Normal koşullarda, baz çıkarma tamiri esnasında oluşan flaplar, 5' → 3' endonukleaz aktivitesine sahip bir enzim olan Flap Endonukleaz 1 tarafından kaldırılmaktadır^{36,37,38}. Ancak, *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda saç tokası benzeri yapıların flapın 5' ucunu sakladığı ve flap endonukleaz 1 tarafından kesilmesini engellediği bulunmuştur^{38,39}. Daha sonraki aşamalarda kesilemeyen bu saç tokasının DNA'ya entegre olduğu ve karşı iplik sentezinin tamamlanmasının ardından da TNR artışlarına sebep olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.3⁴⁰).



Şekil 2.3 Baz çıkarma tamiri sırasında oluşan tekrar artışının mekanizması. Baz çıkarma tamiri sırasında OGG1 oksitlenmiş guaninleri (G=O) tanır ve iplikten çıkarır bu esnada bir riboz-fosfat ucu (RP) açığa çıkar ancak bu uç polimerazlar tarafından tanınmaz bu sebeple, apurinik/apirimidinik endonukleaz 1 (APE1) RP'yi kaldırır ve OH ucu ekler (1-2). Daha sonra DNA polimeraz β boşluğu doldurur bu esnada ipliğin diğer kısmında açılma meydana gelir (3-4). Açılma bölgesinde bulunan CAG tekrarları saç tokası veya benzer yapıların oluşmasına müsaittir ve bu yapılar normal durumda Flap endonukleaz 1 (FEN1) tarafından kesilmesi gereken bölgenin 5' ucunu sakladığından dolayı kesilmeyi engeller (5-6). Daha sonra bu saç tokası yapısındaki halkanın DNA yapısına katılmasıyla TNR artışı gerçekleşir (7). Bu tip baz oksitlenmeleri günlük hayatta çok kereler meydana geldiğinden dolayı bu şekilde aksayarak gerçekleşen her baz çıkarma tamiri döngüsünde TNR sayısı artmaktadır (8).

Ancak baz çıkarma tamir mekanizmasının TNR artışlarını tetiklediğini öngören modeller ilgili bazı itilaflar bulunmaktadır. Elde edilen bulgulara göre, OGG1 TNR artışını tetikleyen bilinen tek glikosilazdır fakat 8-oxoG'yi çıkaran tek glikosilaz olmamakla beraber 8-oxoG oksidasyon sonucu oluşabilen tek lezyon özelliği de taşımamaktadır^{40,41}. Bu sebeple OGG1'in TNR artışındaki rolü tam olarak anlaşılamamaktadır.

Yukarıda bahsedilen şimdiye kadar önerilmiş modeller TNR artışlarının oluşum mekanizmalarını ve sebeplerini tam olarak açıklayamamasalar da, TNR artışlarının oluşumunda benzer yolların bulunduğu hakkında ipuçları sağlamaktadır. Bu modeller göz önüne alındığında, akla gelen bir diğer soru ise replikasyon veya tamir sırasında meydana gelen saç tokası şeklindeki halka yapıların DNA'ya nasıl entegre olup TNR sayısını artırdığıdır.

Replikasyon veya tamir sırasında halka yapıların oluşması birçok durumda kaçınılmazdır ancak oluşan bu halka yapılar normal koşullarda başka bir tamir mekanizması olan ve yanlış eşleşen bazların tamirinden sorumlu "mismatch" tamiri mekanizmasıyla kaldırılmaktadır. Modrich⁴² tarafından yapılan çalışmada, 5' → 3' yönünde çalışan bir ekzonukleaz olan EXO1 tarafından bu halka yapıların kaldırıldığı, oluşan boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulduğu ve bu sayede normal DNA yapısının mutasyona uğramadan korunduğu bulunmuştur. Ayrıca "in vitro" olarak yapılan bazı çalışmalarda insan hücresi ekstraktlarının (CAG) ve (CTG) den oluşan halka yapıların tamirini katalizleyebildiği gözlemlenmiştir^{43,44}. Bu durumda, oluşan halka yapıların DNA'ya katılıp TNR artışına sebep olabilmeleri için öncelikle bu yapıların kaldırılmasından sorumlu tamir mekanizmasında bir aksaklık gerçekleşmesi gerektiği ve halkaların DNA'ya katılımında bu tamir mekanizmasının da bir rolü bulunduğu düşünülmektedir^{42,45}. Gomes-Periera ve ark.⁴⁶ tarafından yapılan fare deneylerinde, mismatch tamir mekanizmasında görev alan MutS homolog 2 ve MutS homolog 3 (MSH2, MSH3) proteinlerinin mutasyon yoluyla kaybedilmesi halinde TNR artışının baskılandığı bulunmuştur. Elde edilen bulgular ışında, halka yapıların DNA'ya katılması ile ilgili önerilen iki farklı görüş bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, mismatch tamir mekanizmasının halka yapılarının DNA'ya katılmasında direkt olarak rol oynadığı, diğeri ise MSH2 ve MSH3 halka yapılarının oluşumuna yardımcı olduğu ancak halka yapılarının DNA'ya katılmasında etkileri bulunmadığı yönündedir^{47,48}.

2.2. Ataksiler

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Ataksi Kuruluşu'nun⁴⁹ yaptığı tanımlamaya göre; "Ataksi" Latince bir kelime olan "a taxis" ten gelmektedir ve kelime manası olarak "düzensiz, ahenksiz" manasına gelmektedir. Merkezi sinir sisteminin dejenerasyona uğrayan bölgelerine göre serebellar, duyuşal ve vestibüler ataksi şeklinde adlandırılabilirler. Ataksi hastaları, merkezi sinir sistemlerinin hareket ve dengeden sorumlu bölgeleri etkilendiğinden dolayı, çeşitli koordinasyon bozukluklarından muzdariptirler. Ataksiler, kalıtsal olarak aktarılabilir veya enfeksiyon, yaralanma, toksisite, merkezi sinir sistemindeki dejeneratif değışikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilirler ve parmakları, elleri, ayakları, tüm vücudu, konuşmayı, gözleri, hafızayı olumsuz yönde etkileyebilirler. Ataksiler için genel geçerli bir sınıflandırma olmamakla birlikte, çoğunlukla, kalıtsal olarak aileden gelen ve sonradan oluşan (sporadik) olmak üzere iki grupta değerlendirilmektedirler.

Kalıtsal ataksiler, kalıtım modeline, mutasyonların oluştuğı gene veya kromozom bölgesine göre, otozomal dominant (SSA'lar, Episodik Ataksiler), otozomal resesif (FA, Ataksi Telenjektazi), X'e bağılı (Konjenital X'e bağılı Ataksi, Arts Sendromu) veya mitokondriyal (Sitokrom C Oksidaz II mutasyonu) olarak sınıflandırılabilirler⁵⁰.

Kalıtsal ataksilerin genetik temellerinin anlaşılması konusunda çok fazla mesafe alınmış olunmasına karşın, sporadik ataksilerin orijini hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır. Kronik alkolizm (etil alkol tüketimi), antiepileptik ilaç ve ketamin kullanımı, paraneoplastik nedenler, avitaminazlar, hipotiroidizm, radyasyon zehirlenmesi ve çölyak hastalığının sporadik ataksiye neden olabileği bilinmektedir, ancak henüz sebebi yukarıdaki nedenlerle açıklanamamış birçok sporadik ataksi vakası bulunmaktadır⁵¹.

Ataksilerin tedavisi ve tedavinin etkinliği, hastalığın altında yatan sebeple direkt olarak bağılantılıdır. Tedavi, ataksinin etkilerini azaltabilir veya sınırlandırabilir ancak tamam ortadan kaldırması mümkün görülmemektedir⁵². Tedaviler genel olarak, oluşan bozuklukların giderilmesine, dejeneratif tip ataksilerde dejenerasyon hızının azaltılmasına yönelik olarak uygulanmaktadır ve bu amaçla 5-hidroksitriptofan, idebenon, amantadin, vigabatrin gibi çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır⁵³.

2.3. Spinocerebellar Ataksiler

SSA'lar, serebellum ve serebellumun afferent ve efferent bağlantılarının ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize, otozomal dominant kalıtım modeline sahip, kompleks, heterojen bir hastalık grubudur⁵⁴. Klinik olarak SSA'lar, yürüyüş bozukluğu, dismetri, dizartri, nistagmus, distoni, demans ve görme bozukluğu gibi, bir veya birden çok, çeşitli bulgular gösterebilmektedir⁵⁵.

SSA'ların prevalansı 1-5/100000 olarak çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir^{56,57}. SSA Tip 3 dünya çapında en sık rastlanan tip olmakla beraber, Tip 1,2,6,7,8,17 diğer en sık rastlanan SSA tipleridir ancak bu tiplerin prevalansı toplumun etnik kökenine göre büyük değişiklikler göstermektedir^{58,59,60,61,62,63}.

SSA'larda hastalık başlama yaşı (HBY) genellikle 30-50 arasındadır ancak 20 yaşından önce ve 60 yaşından sonra başlayan SSA'lar da çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir^{54,55,64}.

SSA'lar ilk olarak Harding¹ tarafından fenotipik özellikleri dikkate alınarak, 4 başlık altında sınıflandırılmıştır. Ancak günümüzde moleküler biyolojideki gelişmeler ışığında, hastalık genetik özelliklerine göre sınıflandırılmaya başlanmış olup şu ana kadar 30 farklı tip SSA (SSA1-SSA30) tanımlanmıştır. Bunların 15 tanesinden sorumlu genler ve mutasyonlar tanımlanmış, diğerleri linkaj analizleriyle tespit edilmiş ancak ilgili genler ve mutasyonlar henüz tanımlanamamıştır⁶⁵.

Tip 1,2,3,6,7,17 SSA'lar ilgili genlerin kodlama yapan bölgelerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır ve CAG tekrarlarının artışıyla karakterizedir⁶⁵. Bilindiği üzere CAG kodunu glutamin amino asidini kodlamaktadır. Bu tip SSA'larda, ilgili genler ataksin adı verilen bir protein kodlamaktadır ve geni kodlayan bölgedeki CAG tekrarlarında meydana gelen artış, kodlanan mutant proteinin normalden fazla glutamin içermesine sebep olmakta, bu nedenle poliglutamin hastalıkları olarak nitelendirilmektedir⁶⁶. Mutant ataksin proteini toksik bir fonksiyon kazanmakta ve nörodejenerasyona sebep olmaktadır⁶⁵.

Tip 8,10,12 SSA'lar ilgili genlerin kodlama yapmayan bölgelerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır ve gen ekspresyonunun kontrolü etkilenmektedir⁵⁵.

Tip 5,11,13,14,15,27 SSA'lar ise ilgili genlerin kodladığı proteinlerin kompozisyonundaki (dolayısıyla fonksiyonundaki) değişikliklerle karakterize olmaktadır⁵⁵.

Günümüze kadar çeşitli çalışmalarla tespit edilen SSA tipleri, mutasyonların tipleri, meydana geldiği gen ve kromozom bölgeleri, etkilenen proteinler Çizelge 2.2'de derlenmiştir.

Çizelge 2.2 SSA tipleri, mutasyonların meydana geldiği kromozom bölgeleri, mutasyonların meydana geldiği genler, mutasyon tipleri ve etkilenen proteinler

SSA Tipi	Kromozom Bölgesi	Etkilenen Gen	Mutasyon Tipi	Etkilenen Protein
SSA1	6p22.3	ATAXIN1	CAG tekrar artışı	Ataksin 1
SSA2	12q24.13	ATAXIN2	CAG tekrar artışı	Ataksin 2
SSA3	14q32.12	ATAXIN3	CAG tekrar artışı	Ataksin 3
SSA5	11q13.2	SPTBN2	Missense Mutasyonu	Beta-III Spektrin
SSA6	19p13.13	CACNA1A	CAG tekrar artışı	CACNA1A
SSA7	3p14.1	ATXN7	CAG tekrar artışı	Ataksin 7
SSA8	13q21	KLHLIAS	CTG tekrar artışı	Kelch-like 1
SSA10	22q13.31	ATXN10	ATTCT tekrar artışı	Ataksin 10
SSA11	15q14-q21.3	?	?	TTBK2
SSA12	5q32	PPP2R2B	CAG tekrar artışı	PPP2R2B
SSA13	19q13.33	KCNC3	Missense Mutasyonu	KCNC3
SSA14	19q13.42	PRKCG	Missense Mutasyonu	PRKCG
SSA15	3p24.2-3ptr	ITPR1	Nokta Mutasyonu	ITPR1
SSA17	6q27	TBP	CAG tekrar artışı	TBP
SSA27	13q33.1	FGF14	Missense Mutasyonu	FGF14

2.3.1. Spinoserebellar Ataksi Tip 7

SSA7 diğer SSA'lar gibi nörodejeneratif, toplumda çok sık rastlanmayan, otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalıktır. Harding¹ tarafından ilk olarak "Otozomal Dominant Serebellar Ataksi Tip II" olarak adlandırılmış, daha sonra Konigsmark ve Weiner⁶⁷ tarafından retinal distrofiye neden olduğundan dolayı

“Olivoponto Serebellar Atrofi” olarak adlandırılmıştır. Genetik metotların ilerlemesiyle birlikte, Holmberg ve ark.⁹ tarafından meydana gelen mutasyonun kromozom üzerindeki yeri ve şekli tespit edilmiş ve SSA’ların bir alt tipi SSA7 olarak adlandırılmıştır.

Klinik bulguları diğer SSA’lar ile çoğunlukla benzerlikler gösterir. Klinik olarak diğer SSA’lardan farkı ise, neredeyse tüm hastalarda karşılaşılan retinal dejenerasyondur ve bu dejenerasyon kimi hastalarda körlüğe kadar ilerleyebilir⁶⁸.

SSA7 tüm SSA’ların %1-%12’sini oluşturmaktadır^{69,70,71}. İsveç ve Finlandiya toplumlarında en sık karşılaşılan SSA tipidir^{10,72}. Kafkas toplumlarında ise SSA1, SSA2, SSA3 ve SSA6’nın ardından en sık rastlanan SSA tipidir⁷³.

SSA7’ye, 3’üncü kromozomun p21.1-p12 bölgesinde bulunan, ataksin 7 isimli bir proteinin sentezinden sorumlu, yaklaşık 140.000 baz çifti (bp) boyutunda olan ATXN7 geninin, üçüncü ekzonundaki CAG tekrarlarının artışı sebep olmaktadır¹⁰. Normal bireylerde bu bölgedeki TNR sayısı 17’nin altındayken (ortalama 10), hasta bireylerde 460’a kadar çıkabilmektedir¹¹. Lebre ve ark.⁷⁴, 28-33 aralığındaki TNR’leri mutasyona uğramaya eğilimli normal alleller olarak adlandırmışlardır ve fenotipte çeşitli bozuklar yaratabildiklerini söylemişlerdir. Mittal ve ark.⁷⁵, bu aralıktaki TNR sayılarının stabil olmadığını ve gelecek kuşaklara artarak aktarılmaya eğilimli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, 34-36 aralığındaki TNR sayılarının düşük penetrans allelleri olduğu, semptomların daha geç yaşta ve daha hafif olarak fenotipe yansıdığı çeşitli çalışmalarda bulunmuştur^{76,77}. Tam penetrans allellerinde ise TNR sayıları 37 ile 460 arasında değişmektedir¹¹. Çizelge 2.3’te TNR artışının gerçekleşerek SSA7’ye sebep olan gen bölgesi gösterilmiştir⁷⁸.

Çizelge 2.3 ATXN7 geninin TNR artışı göstererek SSA7’ye sebep olan bölgesi. Artışa sebep olan bölge genin başlangıcından yaklaşık 48.000 bp uzaklıktadır. TNR bölgesi koyu renkle gösterilmiştir. “(CAG)_n” triplet artışın olduğu bölgeyi, “n” sayıdaki artışı temsil etmektedir (aşağıdaki nükleotit dizisi gösterilen normal bireyde 10 tekrar bulunmaktadır).

Bp	Nükleotit Dizisi
48061	gatgacgtca ggggggagcc gcgccgcgcg gcggcggcgg cgggaggagc agcggccgcg
48121	gccgcccggc agcag(cag)_nca gcagcagcag cagcagcagc cgccgcctcc gcagccccag
48181	cggcagcagc acccgccacc gccgccacgg cgcacacggc cggaggacgg cgggcccggc

2.3.2. Spinocerebellar Ataksi Tip 17

SSA17, tüm SSA'ların %0.5-3'üne^{79,80} sebep olan bir mutasyondan kaynaklanan, poliglutamin hastalıklar grubuna dahil, dominant kalıtım gösteren, nörodejeneratif bir hastalıktır. Harding¹ tarafından ilk olarak "Otozomal Dominant Serebellar Ataksi Tip I" olarak adlandırılmış, daha sonra moleküler tekniklerin ilerlemesiyle birlikte Koide ve ark.¹⁴ tarafından meydana gelen mutasyonun kromozom üzerindeki yeri, şekli ve fenotiple ilişkisi tespit edilmiş ve daha sonra SSA'nın bir alt tipi SSA17 olarak isimlendirilmiştir.

Klinik bulgular olarak diğer SSA tipleriyle benzerlik gösterir ve serebellar atrofi, Purkinje hücrelerinde kayıp, demans ile karakterize olmakla birlikte kimi vakalarda Huntington Hastalığına oldukça benzerlikler gösterebilir, fokal distoni ve psikozla birlikte seyredebilir^{81,82}.

SSA17'ye neden olan gen, 6'ncı kromozomun q27 bölgesinde telemore yakın bir pozisyonda bulunmaktadır ve 1867 bp'lik bir mRNA ürününü sentezleyen yaklaşık 18000 bp uzunlukta ve 8 ekzona sahip bir gendir⁸³. Bu gen, TATA kutusuna bağlanan proteini sentezlemekte, bu sebeple TBP (TATA-box Binding Protein) geni olarak adlandırılmaktadır ve bu genin üçüncü ekzonunda bulunan, glutamin kodlayan TNR'lerde (CAG) meydana gelen artışlar SSA17'ye sebep olmaktadır⁸³. Normal bireylerde bu bölgedeki glutamin kodlayan (CAA ve CAG) TNR sayısı 25 ile 42 arasında değişmekte, hasta bireylerde ise 66'ya kadar çıkabilmektedir¹⁵. Çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgulara dayanılarak, 43-48 arasında TNR sayılarına sahip alleller düşük penetrans allelleri olarak, 49-66 arasında TNR sayılarına sahip alleller ise tam penetrans allelleri olarak kabul edilmiştir^{84,85,86,87}. SSA17 ye neden olan gen bölgesinin yapısı (CAG)₃ (CAA)₃ (CAG)_n (CAA) (CAG) (CAA) (CAG)_n (CAA) (CAG) şeklindedir ve bu bölgede meydana gelebilen "ekleme", "duplikasyon" gibi mutasyonlar TNR artışına sebep olmakta ve hastalıkla sonuçlanmaktadır^{14,88,89}. Çizelge 2.4'te TNR artışının gerçekleşerek SSA17'ye sebep olan gen bölgesi gösterilmiştir⁹⁰.

Çizelge 2.4 TBP geninin TNR artışı göstererek SSA17'ye sebep olan bölgesi. Artışa sebep olan bölge genin başlangıcından yaklaşık 7500 bp uzaklıktadır. Artışın meydana geldiği TNR bölgesi koyu renkle gösterilmiştir (aşağıdaki nükleotit dizisi gösterilen normal bireyde 38 tekrar bulunmaktadır).

Bp	Nükleotit Dizisi
7501	ccttatggca ctggactgac cccacagcct attcagaaca ccaatagtct gtctatttg
7561	gaagagcaac aaagg cagca gcagca caaa caacagcagc agcagcagca gcagcagcaa
7621	cagcaacagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag
7681	cagcaacagg cagtggcagc tgcagccgtt cagcagtc caa cgtcccagca ggcaacacag

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'nda SSA tanısı almış 159 hasta ve 42 sağlıklı birey SSA7 ve SSA17'ye neden olan gen bölgelerindeki mutasyonlar açısından taranmıştır. Bu mutasyonların görülme sıklığı ve tekrar sayılarının frekansları özgün bölgenin PCR amplifikasyonu yapılması yoluyla belirlenmiştir.

3.1. GEREÇ

A) Kimyasal Malzemeler

- Agaroz (Sigma)
- TBE Tampon Çözeltisi 1X (Ek-2)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma)
- Yükleme Boyası 6X (Sigma)
- Distile Su
- Deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) (Fermantas)
- Magnezyum Klorür (MgCl₂) Çözeltisi (Fermantas)
- PCR Primerleri (Bio Basic)
 - SSA7 Forward Primer (5'→3') (TGTTACATTGTAGGAGCGGAA)
 - SSA7 Reverse Primer (5'→3') (CACGACTGTCCCAGCATCACTT)
 - SSA17 Forward Primer (5'→3') (GACCCACAGCCTATTCAGA)
 - SSA17 Reverse Primer (5'→3') (TTGACTGCTGAACGGCTGCA)
- DNA Polimeraz Enzimi (Taq) (Fermantas)
- Taq tampon çözeltisi 10X ((NH₄)₂SO₄) (Fermantas)
- Dimetil Sulfoksit (DMSO) (AppliChem)
- Eritrosit Lizis Çözeltisi (Ek-2)
- Fizyolojik Tampon (Ek-2)
- Proteinaz K (Sigma)
- Tris-EDTA (TE) (Ek-2)
- Tris-EDTA pH 9 (TE-9) (Sigma)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- 6 M Yoğun Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi (Ek-2)

- %100'lük Etil Alkol (Sigma)
- %70'lik Etil Alkol (Ek-2)

B) Kullanılan Aygıtlar

- Steril Enjektörler (10 ml'lik) (Ayset)
- EDTA'lı Steril Tüpler (BD Vacutainer)
- Steril PCR Tüpleri (Axygen)
- Steril Tüpler (1.5 mL) (Eppendorf)
- Mikropipet (Gilson)
- Mikropipet Ucu (Expell Plus)
- Su Banyosu (Grant)
- Santrifüj Cihazı (Nüve)
- Thermal Cycler (Eppendorf)
- Güç Kaynağı (Consort)
- Elektroforez Tankı (Maxicell)
- Beher (IsoLab)
- Mezur (IMC)
- Hassas Tartı (Sartorius)
- Jel Tablası (Maxicell)
- Jel Tarağı (Maxicell)
- Mikro Dalga Fırın (Arçelik)
- Jel Görüntüleme Cihazı (UVI Tec)

C) Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

- Adobe Photoshop CS4⁹¹ (Adobe Systems Inc.)
- SPSS 13.0⁹² (SPSS Inc.)
- DNASIZE⁹³ (Raghava)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklerin Sağlanması

Çalışmamız ile ilgili kan örnekleri 2002-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'na

çeşitli yakınmalarla başvuran ve SSA tanısı konmuş hastalardan alındı. Hastaneye tedavi amacıyla başvuran 159 hasta birey ve 42'si sağlıklı kontrol grubu oluşturuldu. Aynı zamanda, her birey için önceden düzenlenmiş bir adet "Bilgilendirme ve Rıza Formu" doldurularak imzalatıldı. Bu form fakültemizin etik kurulunun görüşleri doğrultusunda hazırlandı (EK-1). Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere 2ml kan örneği alındı. Daha sonra bu kan örneklerinden tuzla çöktürme metoduyla⁹⁴ DNA örnekleri elde edildi. Hastaların şikayetleri ve diğer tetkikleri ile ilgili bilgiler hastaları muayene eden uzman doktorların hazırladığı hasta dosyalarından temin edildi.

3.2.2. DNA Elde Edilmesi

- Steril tüplere 700 µL kan ve 700 µL eritrosit lizis çözeltisi konulup 2-3 dakika oda ısısında bırakıldı
- 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant atıldı ve 700 µL eritrosit lizis pellete eklenip pipetajlandıktan sonra 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant atıldı ve 1000 µL fizyolojik tampon eklenip pipetaj yapıldıktan sonra 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant atıldı
- 300 µL TE-9 ilave edildi
- 20 µL Proteinaz K ilave edildi
- 100 µL SDS ilave edildi
- Pipetaj yapıp pellet çözdürüldü
- Örnekler su banyosunda 65 °C sıcaklıkta 2 saat bekletildi
- 200 µL 6 M yoğun NaCl çözeltisi ilave edilip karıştırıldı
- 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant yeni steril tüpe alınıp pellet atıldı
- 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant yeni steril tüpe alınıp üzerine 900 µL %100'lük etil alkol konuldu
- 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı
- Süpernatant atılıp pelletin üstüne 1000 µL %70'lik etil alkol konuldu
- 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapıldı

- Süpernatant atılıp tüpler ters çevrilerek oda sıcaklığında 15-20 dakika alkolün tamamen buharlaşması beklendi
- Tüplere 200 µL TE ilave edilip -20 °C de stoklandı

3.2.3. Spinocerebellar Ataksi Tip 7 ve Spinocerebellar Ataksi Tip 17 İçin Üçlü Nükleotit Tekrar Artışı Olan Bölgelerin Çoğaltılması

Üçlü nükleotit tekrar artışı olan bölgeler standart PCR amplifikasyonu yöntemi⁹⁵ kullanılarak çoğaltıldı.

Her örnek için SSA7'ye özgü tekrar bölgesinin çoğaltılması için steril PCR tüplerine aşağıda belirtilenler eklenerek 25 µL PCR karışımları hazırlandı:

- 16.4 µL distile su
- 2.5 µL Taq tampon çözeltisi
- 0.2 µL dNTP (25 mM)
- 2 µL MgCl₂ (2 mM)
- 0.5'er µL SSA7 Forward Primer ve SSA7 Reverse Primer
- 0.4 µL Taq (2 ünite)
- 1.5 µL DNA
- 1 µL DMSO

Her örnek için SSA17'ye özgü tekrar bölgesinin çoğaltılması için steril PCR tüplerine aşağıda belirtilenler eklenerek 25 µL PCR karışımları hazırlandı:

- 17.4 µL distile su
- 2.5 µL Taq tampon çözeltisi
- 0.2 µL dNTP (25 mM)
- 2 µL MgCl₂ (2 mM)
- 0.5'er µL SSA17 Forward Primer ve SSA17 Reverse Primer
- 0.4 µL Taq (2 ünite)
- 1.5 µL DNA

Hazırlanan PCR tüpleri Thermal Cycler cihazında SSA7'ye özgü tekrar bölgesinin çoğaltılması için aşağıdaki döngü zamanlarına ve sayılarına tabi tutuldu:

94 °C → 5 dakika
94 °C → 1 dakika
57 °C → 1 dakika
72 °C → 1 dakika
72 °C → 5 dakika
4 °C → 5 dakika

30 Döngü

Hazırlanan PCR tüpleri Thermal Cycler cihazında SSA17'ye özgü tekrar bölgesinin çoğaltılması için aşağıdaki döngü zamanlarına ve sayılarına tabi tutuldu:

94 °C → 3 dakika
94 °C → 30 saniye
60 °C → 30 saniye
70 °C → 40 saniye
72 °C → 5 dakika
4 °C → 5 dakika

30 Döngü

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR yöntemiyle çoğaltılan örnekler, daha sonra uzunluklarının ölçülebilmesi için aşağıdaki basamaklar izlenerek agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve jel görüntüleri kaydedildi:

- 3gr agaroz tartıldı ve 100 mL TBE tampon çözeltisi (1X) içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla ısıtılarak çözüldü
- Sıvı haldeki çözülmüş agaroz oda sıcaklığına geldikten sonra 10µL EtBr eklenip karıştırıldı ve jel tablasına döküldü
- Örneklerin yüklenebilmesi için kuyucuklar açmak amacıyla jel tablasına 22'lik jel tarağı yerleştirildi
- PCR işleminin sonucunda elde edilen 25 µL örneklerin üzerine 5 µL yükleme tamponu (6X) ilave edilip 30 µL'ye tamamlandı ve pipetaj yapıldı
- Jel, polimerleştikten sonra, TBE tampon çözeltisi (1X) ile dolu jel tankına alındı ve açılan kuyucuklardan birincisine 7 µL 50 bp DNA merdiveni, kalan kuyucuklara 30 µL PCR ürünü-yükleme tamponu karışımından 7 µL yüklendi

- Jel daha sonra 130 V'luk elektrik akımına 90 dakika civarı tabi tutularak DNA'ların negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutupa yürümleri sağlandı
- Yürütme işleminin ardından jel görüntüleme cihazına alındı ve jel görüntüleri kaydedildi

3.2.5. Örneklerin Baz Uzunluklarının Ölçülmesi ve Tekrar Sayılarının Bulunması

Elektroforez sonucu elde edilen jel görüntüleri aşağıdaki basamaklar izlenerek değerlendirildi ve PCR ürünlerinin baz uzunlukları ve tekrar sayıları bulundu:

- Jel görüntüleri Adobe Photoshop CS4 bilgisayar programı kullanılarak açıldı ve program yardımıyla 50 bp DNA merdivende bulunan 50-100-150-200-250-300-400 bp uzunluğundaki ürünlerin yüklendikleri kuyucuklara uzaklığı referans değeri olarak alınmak üzere milimetre cinsinden ölçüldü
- Örneklerin yüklendikleri kuyucuklara uzaklığı milimetre cinsinden aynı şekilde ölçüldü
- Referans değerleri DNASIZE bilgisayar programına girildi
- Örneklerin ölçülen milimetre değerleri DNASIZE bilgisayar programına girilerek bp uzunlukları elde edildi
- Elde edilen bp uzunluklarından, referans bireyler için kullanılan primerler ile elde edilmesi öngörülen PCR ürünlerinin bp uzunlukları (SSA7 özgün bölgesi için 308 bp⁷⁸, SSA17 özgün bölgesi için 203 bp⁹⁰) çıkarıldı ve çıkan sonuç 3'e bölünüp tekrar sayılarındaki artış bulundu
- Bulunan artış sayılarına kullanılan primerler ile elde edilmesi öngörülen TNR sayıları (SSA7 özgün bölgesi için 10 tekrar⁷⁸, SSA17 özgün bölgesi için 38 tekrar⁹⁰) eklendi ve toplam TNR sayıları bulundu

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Hasta ile kontrol gruplarında bulunan tüm bireylerin TNR sayıları kaydedildikten sonra, elde edilen moleküler veriler klinik bulgularla birleştirilerek SPSS 13.0 bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde spinoserebellar ataksi teşhisi konmuş 159 hasta ve 42 sağlıklı birey denek olarak seçildi. 159 hastadan 74'ünün detaylı medikal kayıtları (yaş, şikayet, HBY vs.) elde edildi. 60 hasta SSA7'ye neden olan gen bölgesindeki mutasyonlar açısından ve 159 hasta SSA17'ye neden olan gen bölgesindeki mutasyonlar açısından tarandı. Bu mutasyonların görülme sıklığı ve TNR sayılarının frekansları özgün bölgenin PCR amplifikasyonu yapılması yoluyla belirlendi. Kontrol grubu olarak 42 sağlıklı birey aynı yöntemler kullanılarak iki gen bölgesindeki mutasyonlar açısından da ayrıca tarandı.

Elde edilen verilere göre hastaların yaş aralığı 1-66 yaş arasında olup, genel yaş ortalaması $23,1 \pm 16,5$, HBY ortalaması ise $15,6 \pm 15,4$, kontrol grubunun ise yaş aralığı 18-55 olup, genel yaş ortalaması $32,9 \pm 11,9$ olarak belirlendi. Hastaların cinsiyet dağılımının %52,7-47,3 (Kadın-Erkek), kontrol grubunun cinsiyet dağılımının ise %52,4-47,6 (Kadın-Erkek) olduğu belirlendi (Çizelge 4.1). Medikal kayıtlara göre ataksi hastalarında en sık görülen şikayet %43,2 ile yürüme güçlüğü olarak tespit edildi (Çizelge 4.2). Hastaların %13,5'ine daha önceden FA tanısı konulduğu, %13,5'inde mental retardasyon bulunduğu ve %37,8'inin anne-babasının yakın akraba (Dayı/Hala/Teyze/Amca çocukları) olduğu belirlendi (Çizelge 4.3). Nörolojik muayenede hastaların %24,3'ünde paraparezi, %13,5'inde ise tetraparezi saptandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.1 Hasta ve kontrol gruplarının yaş dağılımları ve ortalamaları. Hasta grubundaki HBY ortalamaları.

	Hasta (n = 74)	Kontrol (n = 42)
Yaş (Yıl) (Ortalama \pm SD)	$23,1 \pm 16,5$	$32,9 \pm 11,9$
Yaş Aralığı (Yıl)	1-66	18-55
HBY (Yıl) (Ortalama \pm SD)	$15,6 \pm 15,4$	-
Cinsiyet % (Kadın-Erkek)	% 52,7-47,3	% 52,4-47,6

Çizelge 4.2 Ataksi hastalarında görülen şikayetlerin dağılımı.

Şikayet	Hasta Sayısı (n = 74)	Oran (%)
Yürüme Güçlüğü	32	43,2
Dengesizlik	18	24,3
Gelişme Geriliği	6	8,1
Ellerde Titreme	6	8,1
Görme Bozukluğu	4	5,4
Konuşma Bozukluğu	5	6,8
El Hareketlerinde Güçsüzlük	3	4,1

Çizelge 4.3 Ataksi hastalarında FA tanısı, mental retardasyon ve anne-babada akraba evliliği dağılımı.

	FA Tanısı (n = 74)	Mental Retardasyon (n = 74)	Anne-Babada Akraba Evliliği (n = 74)
Var (%)	10 (%13,5)	10 (%13,5)	28 (%37,8)
Yok (%)	64 (%86,5)	64 (%86,5)	46 (%62,2)

Çizelge 4.4 Ataksi hastalarında tetraparezi ve paraparezi dağılımı.

Özellik	Hasta Sayısı (n = 74)	Oran (%)
Normal	46	62,2
Paraparezi	18	24,3
Tetraparezi	10	13,5

4.1. Spinocerebellar Ataksi Tip 7'ye İlişkin Bulgular

SSA tanılı hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan SSA7 gen bölgesindeki mutasyonlar için tarananların elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayılarının sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

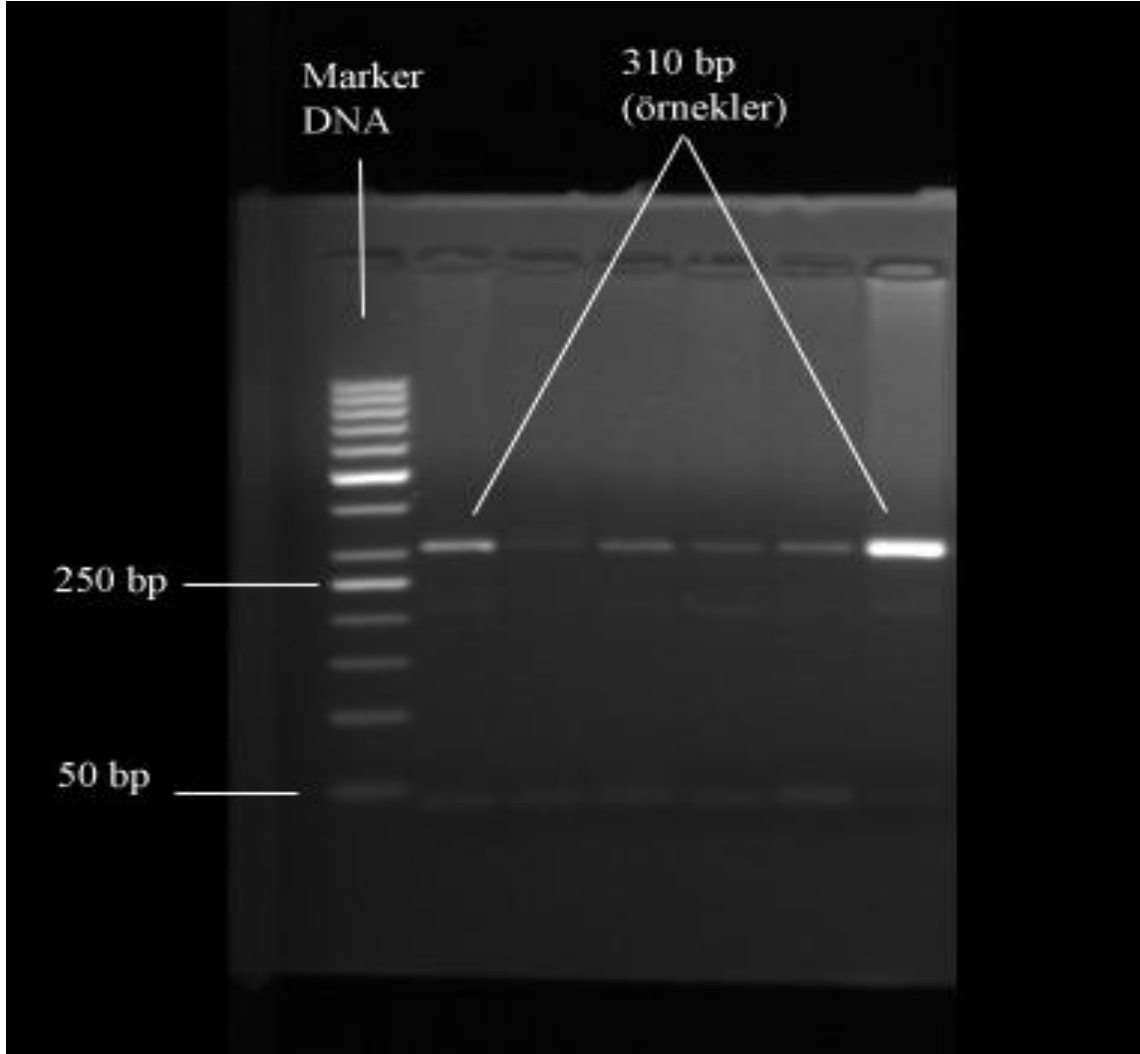
Çizelge 4.5 SSA7 gen bölgesi mutasyon taramalarında elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayıları (“H” ile numaralandırılmış örnekler ataksi hastalarını, “K “ ile numaralandırılmış örnekler kontrol grubunu göstermektedir). Heterozigotlarda allel tekrar sayıları ayrı ayrı verilmiştir.

Örnek	Baz Uzunluğu	Tekrar Sayısı	Örnek	Baz Uzunluğu	Tekrar Sayısı
H 1	317	13	H 68	327	16
H 3	320	14	H 75	325	16
H 5	320	14	H 76	327	16
H 6	314	12	H 77	306	9
H 7	314	12	H 81	306	9
H 11	320	14	H 82	327	16
H 15	327	16	H 86	327	16
H 28	306	9	H 90	327	16
H 29	323	15	H 93	315	12
H 31	330	17	H 96	323	15
H 32	325	16	H 99	330	17
H 33	330	17	H 102	306	9
H 34	508	77	H 108	314	12
H 35	304	9	H 110	327	16
H 39	325	16	H 112	323	15
H 40	318	13	H 115	314	12
H 43	327	16	H 116	323	15
H 44	327	16	H 117	309	10
H 45	309	10	H 118	306	9
H 51	330	17	H 120	317	13
H 52	327	16	H 121	318	13
H 53	310	11	H 124	323	15
H 54	306	9	H 126	314	12
H 57	317	13	H 127	325	16
H 58	330	17	H 131	314	12
H 59	330	17	H 134	327	16
H 62	312	11	H 135	325	16
H 67	327	16	H 137	330	17

Çizelge 4.5 (Devamı)

H 140	309	10	K 20	315	12
H 141	320	14	K 21	314	12
H 143	327	16	K 22	318	13
H 155	320	14	K 23	318	13
K 1	309	10	K 24	318	13
K 2	309	10	K 25	317	13
K 3	309	10	K 26	317	13
K 4	309	10	K 27	317	13
K 5	309	10	K 28	320	14
K 6	309	10	K 29	320	14
K 7	309	10	K 30	320	14
K 8	309	10	K 31	320	14
K 9	309	10	K 32	320	14
K 10	309	10	K 33	320	14
K 11	309	10	K 34	323	15
K 12	309	10	K 35	323	15
K 13	309	10	K 36	323	15
K 14	309	10	K 37	323	15
K 15	309	10	K 38	327	16
K 16	309	10	K 39	327	16
K 17	309	10	K 40	327	16
K 18	309	10	K 41	327	16
K 19	309	10	K 42	327	16

SSA7 gen bölgesinin amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra ultraviyole ışık altında görünümüne ait bir örnek Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 SSA7 ilgili gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntülerine ait bir örnek.

SSA7 TNR sayıları ortalamaları hasta grubunda $13,8 \pm 2,7$, kontrol grubunda ise $12,3 \pm 2,3$ bulunmuştur. Kontrol ve ataksi hastaları dahil tüm bireyler için bu sayı $13,2 \pm 2,6$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

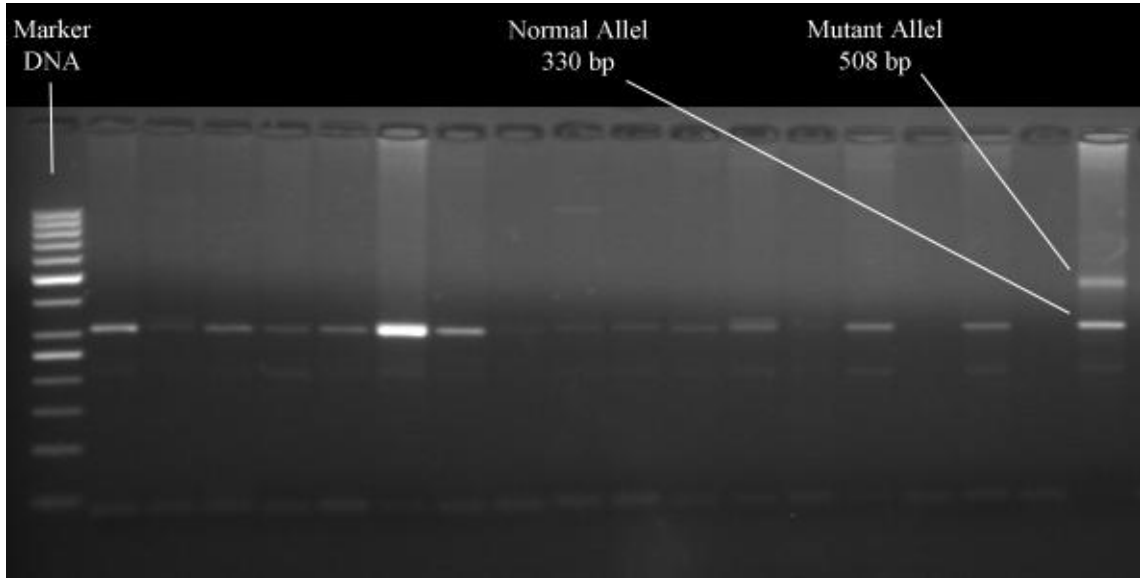
Çizelge 4.6 SSA7 gen bölgesi için TNR sayıları ortalamaları (Tam penetrans tespit edilen birey dahil edilmemiştir).

	Kontrol (n=42)	Ataksi Hastaları (n=59)	Kontrol + Ataksi Hastaları (n=101)
Ortalama \pm SD	$12,3 \pm 2,3$	$13,8 \pm 2,7$	$13,2 \pm 2,6$

Yapılan taramalar sonucu 1 hastada (H 34) normal sınırların üzerinde tam penetrans aralığında (37-460) TNR sayısı tespit edilmiştir. Bu sayı SSA7 ilgili gen bölgesi için taranan hastalara (60 ataksi hastası) oranlandığında SSA7'nin tüm ataksiler içinde görülme sıklığı %1,7 olarak hesaplanmıştır. Bu hastada TNR artışı bakımından heterozigot bir genotipe sahip olup TNR sayısı normal olan allel için 17 (330 bp), artış göstermiş allel için 77 (508 bp) olarak hesaplanmıştır. Hasta anne-baba akrabalığı olan ve görme bozukluğu yakınması ile kliniğe kabul edilen 5 yaşında bir kız çocuğu olup hastalığın başlama yaşı 3 olarak belirtilmiştir. Nörolojik muayenede mental fonksiyonlar normal olup manuel motor güç muayenesinde paraparezi saptanmıştır (Çizelge 4.7). Bu hastaya ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 SSA7 TNR artışı tespit edilen örneğe ilişkin bilgiler.

Hasta No	TNR Sayısı	Cinsiyet	Yaş	HBV	Akraba Evliliği	Mental Retardasyon	Kas Gücü	Şikayet
H 34	17-77	Kadın	5	3	Evet	Hayır	Paraparezi	Görme Bozukluğu



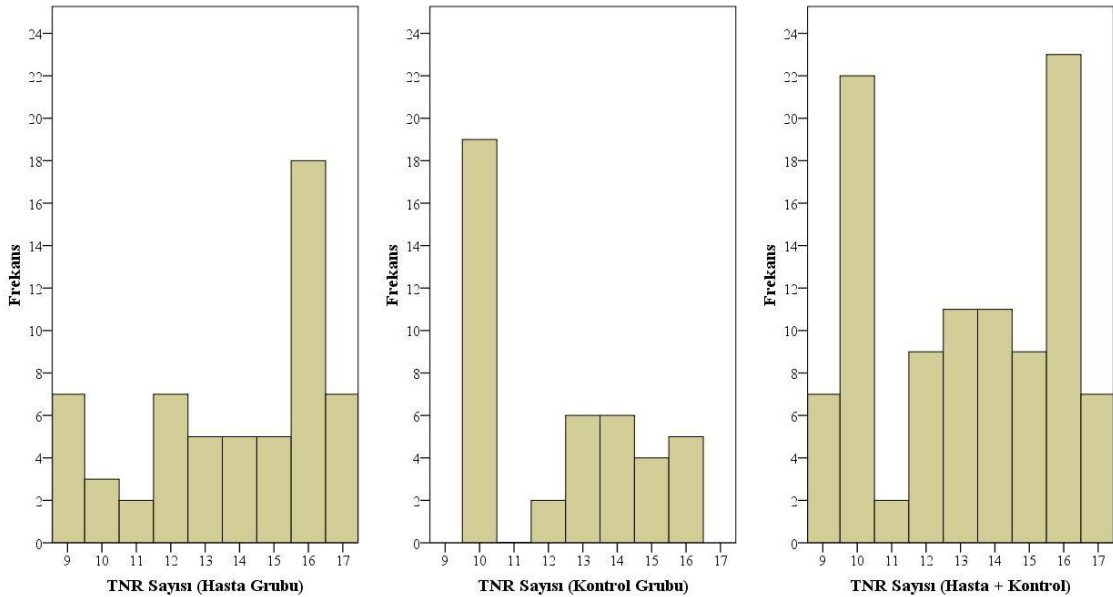
Şekil 4.2 SSA7 gen bölgesinde TNR artışı gösteren hastanın agaroz jel görüntüsü.

SSA7 ilgili gen bölgesi için en sık görülen TNR sayıları ataksi hastalarında %30,5 ile 16 TNR, kontrol grubunda %45,2 ile 10 TNR, hepsi birlikte

değerlendirildiğinde %22,8 ile 16 tekrar olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). SSA7 gen bölgesi için frekansların dağılımları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 SSA7 ilgili gen bölgesi için TNR sayılarının frekansları (Tam penetrans tespit edilen birey dahil edilmemiştir).

TNR Sayısı	Ataksi Hastaları (n = 59)	Kontrol (n = 42)	Ataksi Hastaları ve Kontrol (n = 101)
9	7 (%11,9)	-	7 (%6,9)
10	3 (%5,1)	19 (%45,2)	22 (%21,8)
11	2 (%3,4)	-	2 (%2,0)
12	7 (%11,9)	2 (%4,8)	9 (%8,9)
13	5 (%8,5)	6 (%14,3)	11 (%10,9)
14	5 (%8,5)	6 (%14,3)	11 (%10,9)
15	5 (%8,5)	4 (%9,5)	9 (%8,9)
16	18 (%30,5)	5 (%11,9)	23 (%22,8)
17	7 (%11,9)	-	7 (%6,9)



Şekil 4.3 SSA7 gen bölgesi için TNR sayılarının frekanslarını gösterir grafik (Tam penetrans tespit edilen birey dahil edilmemiştir).

4.2. Spinoserebellar Ataksi Tip 17'ye İlişkin Bulgular

Spinoserebellar ataksi teşhisi konmuş hastalardan ve kontrol grubundan SSA17 gen bölgesindeki mutasyonlar için tarananların elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayılarının sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 SSA17 gen bölgesi mutasyon taramalarında elde edilen baz uzunlukları ve tekrar sayıları ("H" ile numaralandırılmış örnekler ataksi hastalarını, "K" ile numaralandırılmış örnekler kontrol grubunu göstermektedir). Heterozigotlarda allel tekrar sayıları ayrı ayrı verilmiştir.

Örnek	Baz Uzunluğu	Tekrar Sayısı	Örnek	Baz Uzunluğu	Tekrar Sayısı
H 1	200	37	H 101	207	39
H 2	200	37	H 102	189	33
H 3	211	41	H 103	197	36
H 4	212	41	H 104	178	30
H 5	203	38	H 105	224	45
H 6	229	47	H 106	189	33
H 7	207	39	H 107	198	36
H 8	187	33	H 108	271	61
H 9	200	37	H 109	209	40
H 10	190	34	H 110	205	39
H 11	188	33	H 111	189	33
H 12	205	39	H 112	215	42
H 13	212	41	H 113	187	33
H 14	183	31	H 114	191	34
H 15	203	38	H 115	203	38
H 16	191	34	H 116	231	47
H 17	194	35	H 117	189	33
H 18	208	40	H 118	205	39
H 19	213	41	H 119	192	34
H 20	208	40	H 120	205	39
H 21	204	38	H 121	205	39
H 22	205	39	H 122	189	33
H 23	200	37	H 123	210	40

Çizelge 4.9 (Devamı)

H 24	193	35	H 124	200	37
H 25	193	35	H 125	178	30
H 26	205	39	H 126	213	41
H 27	189	33	H 127	191	34
H 28	209	40	H 128	182	31
H 29	215	42	H 129	178	30
H 30	208	40	H 130	207	39
H 31	193	35	H 131	206	39
H 32	263	58	H 132	193	35
H 33	198	36	H 133	188	33
H 34	213	41	H 134	214	42
H 35	209	40	H 135	191	34
H 36	183	31	H 136	213	41
H 37	198	36	H 137	193	35
H 38	190	34	H 138	188	33
H 39	193	35	H 139	198	36
H 40	199	37	H 140	191	34
H 41	186	32	H 141	186	32
H 42	186	32	H 142	200	37
H 43	200	37	H 143	199	37
H 44	207	39	H 144	200	37
H 45	193	35	H 145	193	35
H 46	200	37	H 146	203	38
H 47	200	37	H 147	212	41
H 48	178	30	H 148	203	38
H 49	183	31	H 149	199	37
H 50	207	39	H 150	184	32
H 51	278	63	H 151	193	35
H 52	212	41	H 152	211	41
H 53	191	34	H 153	210	40
H 54	211	41	H 154	192	34

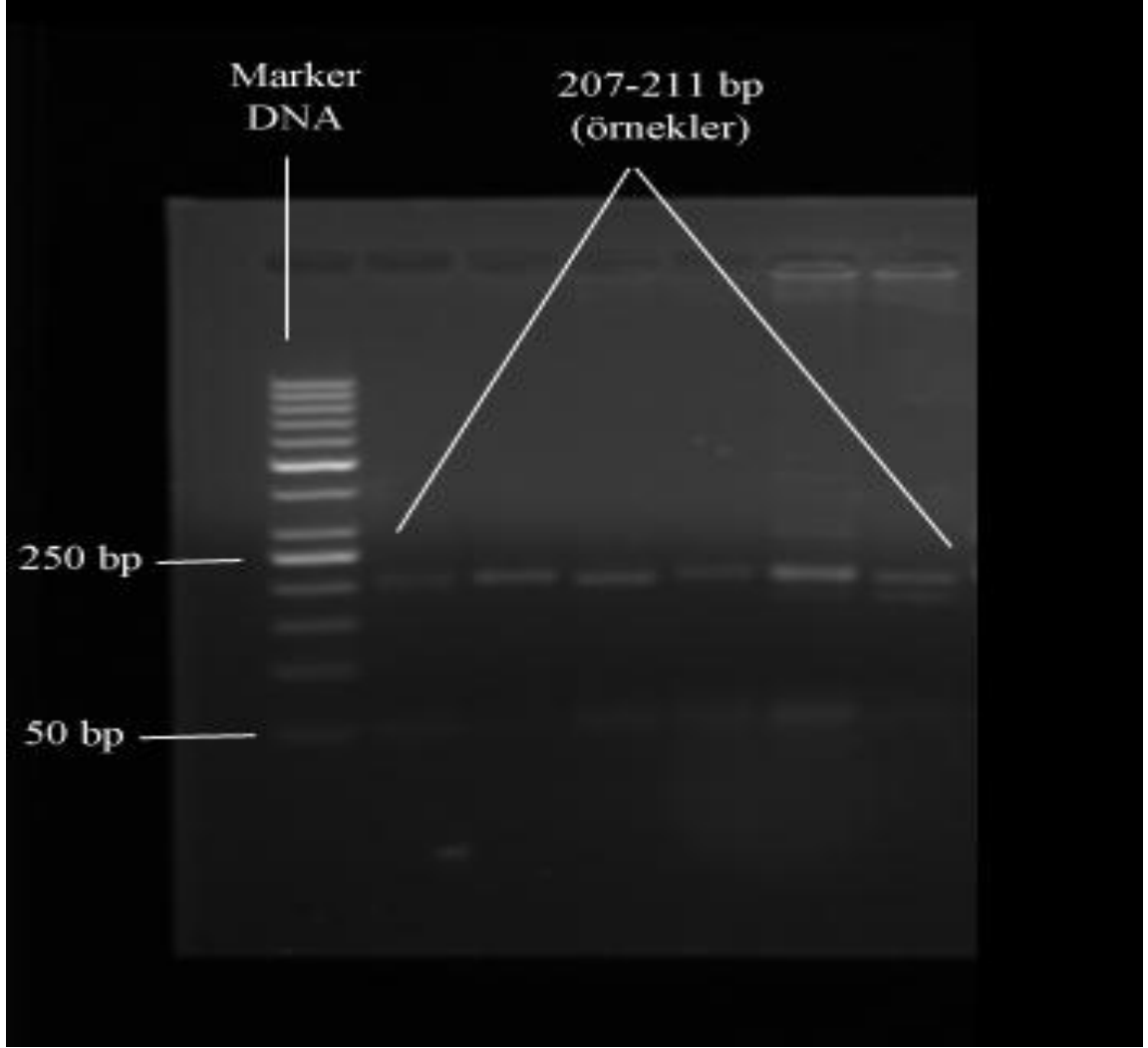
Çizelge 4.9 (Devamı)

H 55	211	41	H 155	200	37
H 56	213	41	H 156	207	39
H 57	211	41	H 157	212	41
H 58	200	37	H 158	189	33
H 59	193	35	H 159	206	39
H 60	203	38	K 1	212	41
H 61	193	35	K 2	190	34
H 62	215	42	K 3	190	34
H 63	208	40	K 4	205	39
H 64	185	32	K 5	193	35
H 65	191	34	K 6	183	31
H 66	200	37	K 7	178	30
H 67	210	40	K 8	204	38
H 68	207	39	K 9	200	37
H 69	211	41	K 10	178	30
H 70	208	40	K 11	200	37
H 71	190	34	K 12	178	30
H 72	208	40	K 13	190	34
H 73	200	37	K 14	208	40
H 74	184	32	K 15	190	34
H 75	190	34	K 16	208	40
H 76	211	41	K 17	211	41
H 77	208	40	K 18	212	41
H 78	189	33	K 19	208	40
H 79	183	31	K 20	192	34
H 80	191	34	K 21	200	37
H 81	211	41	K 22	189	33
H 82	197	36	K 23	193	35
H 83	190	34	K 24	200	37
H 84	186	32	K 25	186	32
H 85	212	41	K 26	212	41

Çizelge 4.9 (Devamı)

H 86	198	36	K 27	187	33
H 87	194	35	K 28	200	37
H 88	193	35	K 29	203	38
H 89	187	33	K 30	186	32
H 90	204	38	K 31	183	31
H 91	200	37	K 32	186	32
H 92	211	41	K 33	184	32
H 93	188	33	K 34	184	32
H 94	208	40	K 35	211	41
H 95	190	34	K 36	207	39
H 96	197	36	K 37	200	37
H 97	200	37	K 38	213	41
H 98	189	33	K 39	208	40
H 99	211	41	K 40	200	37
H 100	212	41	K 41	178	30
			K 42	207	39

SSA17 gen bölgesinin amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra ultraviyole ışık altında görünümüne ait bir örnek Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



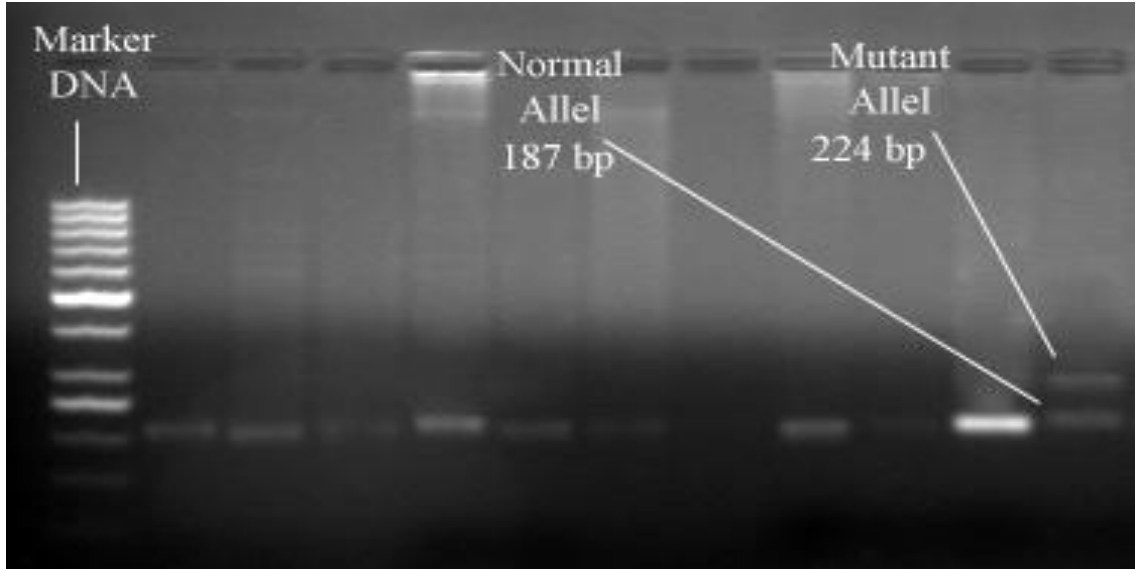
Şekil 4.4 SSA17 ilgili gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntülerine ait bir örnek.

SSA17 TNR sayıları ortalamaları ataksi hastası bireyler için $36,7 \pm 3,3$, kontrol grubu için $35,9 \pm 3,7$, kontrol ve ataksi hastaları dahil tüm bireyler için $36,5 \pm 3,4$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

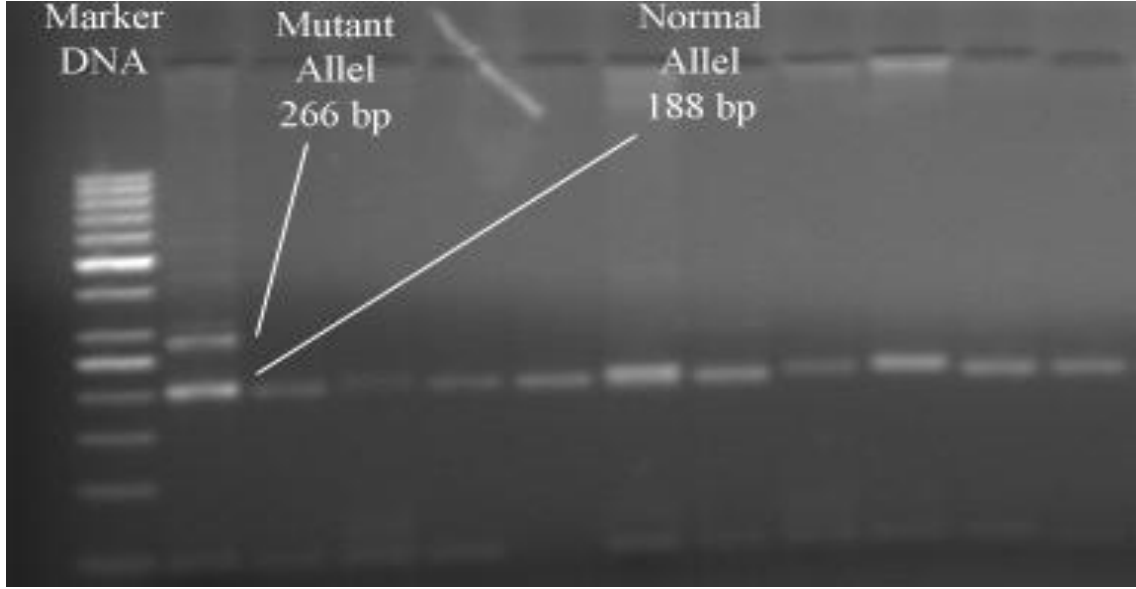
Çizelge 4.10 SSA17 gen bölgesi için TNR sayıları ortalamaları (Tam penetrans ve düşük penetrans tespit edilen bireyler dahil edilmemiştir).

	Kontrol (n=42)	Ataksi Hastaları (n=153)	Kontrol + Ataksi Hastaları (n=195)
Ortalama \pm SD	$35,9 \pm 3,7$	$36,7 \pm 3,3$	$36,5 \pm 3,4$

Yapılan taramalar sonucu 3 hastada (H6, H105, H116) normal sınırların üzerinde düşük penetrans aralığında (43-48), 3 hastada (H32, H51, H108) normal sınırların üzerinde tam penetrans aralığında (49-66) TNR sayısı tespit edilmiştir. Bu sayılar SSA17 ilgili gen bölgesi için taranan hastalara (159 ataksi hastası) oranlandığında SSA17'nin (tam penetrans) tüm ataksiler içinde görülme sıklığı %1,9, düşük penetrans gösteren hastaların görülme sıklığı ise %1,9 olarak hesaplanmıştır. Tam penetrans gösteren hastalarda TNR sayıları sırasıyla (H108, H32, H51) normal olan alleller için 32, 33, 38 (185, 189, 203 bp), artış göstermiş alleller için 61, 58, 63 (271, 263, 278 bp) olarak hesaplanmıştır. Düşük penetrans gösteren hastalarda TNR sayıları sırasıyla (H6, H105, H116) normal olan alleller için 30, 33, 31 (178, 187, 182 bp), artış göstermiş alleller için 47, 45, 47 (229, 224, 231 bp) olarak hesaplanmıştır. Düşük penetrans hastalarına ait agaroz jel görüntülerine bir örnek Şekil 4.5'te, tam penetrans hastalarına ait agaroz jel görüntülerine ait bir örnek de Şekil 4.6'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 SSA17 gen bölgesinde TNR artışı gösteren düşük penetrans hastasının agaroz jel görüntüsü.



Şekil 4.6 SSA17 gen bölgesinde TNR artışı gösteren tam penetrans hastasının agaroz jel görüntüsü.

SSA17 gen bölgesi için tam penetrans aralığında TNR sayısı tespit edilen 3 hastanın TNR sayıları, cinsiyet, yaş, hastalık başlama yaşı, akraba evliliği sonucu doğmuş olma durumları, mental retardasyon durumları, kas gücü durumları ve şikayet bilgileri Çizelge 4.11’de verilmiştir.

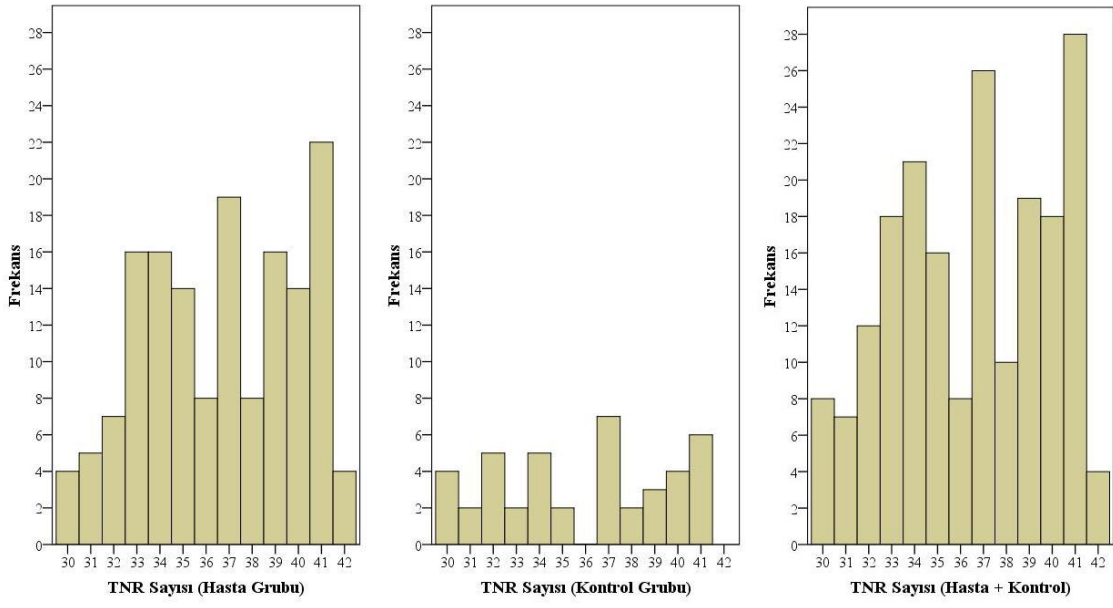
Çizelge 4.11 SSA17 TNR artışı tespit edilen örneklere ilişkin bilgiler.

Hasta No	TNR Sayısı	Cinsiyet	Yaş	HBV	Akraba Evliliği	Mental Retardasyon	Kas Gücü	Şikayet
H32	33-58	Kadın	10	8	Hayır	Var	Normal	Yürüme Güçlüğü
H51	38-63	Kadın	5	1	Hayır	Yok	Normal	Yürüme Güçlüğü
H108	32-61	Kadın	3	1	Evet	Yok	Normal	Yürüme Güçlüğü

SSA17 ilgili gen bölgesi için en sık görülen TNR sayıları ataksi hastalarında %14,4 ile 41 TNR, kontrol grubunda %16,7 ile 37 TNR, hepsi birlikte değerlendirildiğinde %14,4 ile 41 TNR olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). SSA17 gen bölgesi için frekansların dağılımları Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 SSA17 ilgili gen bölgesi için TNR sayılarının frekansları (Tam penetrans ve düşük penetrans tespit edilen bireyler dahil edilmemiştir).

TNR Sayısı	Ataksi Hastaları (n = 159)	Kontrol (n = 42)	Ataksi Hastaları ve Kontrol (n = 201)
30	4 (%2,6)	4 (%9,5)	8 (%4,1)
31	5 (%3,3)	2 (%4,8)	7 (%3,6)
32	7 (%4,6)	5 (%11,9)	12 (%6,2)
33	16 (%10,5)	2 (%4,8)	18 (%9,2)
34	16 (%10,5)	5 (%11,9)	21 (%10,8)
35	14 (%9,2)	2 (%4,8)	16 (%8,2)
36	8 (%5,2)	-	8 (%4,1)
37	19 (%12,4)	7 (%16,7)	26 (%13,3)
38	8 (%5,2)	2 (%4,8)	10 (%5,1)
39	16 (%10,5)	3 (%7,1)	19 (%9,7)
40	14 (%9,2)	4 (%9,5)	18 (%9,2)
41	22 (%14,4)	6 (%14,3)	28 (%14,4)
42	4 (%2,6)	-	4 (%2,1)



Şekil 4.7 SSA17 gen bölgesi için TNR sayılarının frekanslarını gösterir grafik (Tam penetrans ve düşük penetrans tespit edilen bireyler dahil edilmemiştir).

5. TARTIŞMA

Tekrarlanan DNA bölgeleri insan genomunun yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır⁹⁶ ve çoğu türde tekrarlanan DNA bölgelerindeki değişimlerin evrim sırasında çeşitliliğe katkı sağladığı düşünülmektedir⁹⁷. Memeliler, tekrar sayılarında zararlı olabilecek değişiklikleri engellemek için çeşitli sistemler geliştirmişlerdir ancak tekrarlanan DNA bölgelerindeki tekrar sayıları kritik bir eşik değerini aştıklarında bu sistemleri geçersiz kılmaktadır. Macmurray⁴⁵ çalışmasında, basit TNR tekrarlarının, genin kodlama bölgesinde bulduklarında 25-40 tekrar sayısından sonra, genin kodlama yapmayan bölgesinde bulduklarında ise 55-200 tekrar sayısından sonra kararsızlaştıklarını ve tekrar sayılarının zararlı artışını önleyen mekanizmaları geçersiz kılıp ebeveyn-çocuk geçişlerinde veya bireyin yaşamı süresince artış gösterdiklerini belirtmiştir.

Tekrarlanan DNA bölgelerinde meydana gelen artış şeklindeki mutasyonların genetik hastalıklara sebep olabildiği ilk olarak 1991 yılında Frajil-X sendromunun genetik sebepleri incelenirken keşfedilmiştir ve günümüze kadar tekrarlanan DNA bölgelerindeki artışlardan kaynaklanan 22 tane nöromusküler ve nörodejeneratif hastalık tespit edilmiştir ve bu hastalıklardan 20 tanesi TNR artışlarından kaynaklanmaktadır⁹⁸. Bu hastalıkların oluşum şekilleriyle ilgili şu ana kadar 4 farklı mekanizma bilinmektedir. Bunlar; tekrarı içeren genin fonksiyonunu kaybetmesi, poliglutamin artışının bir sonucu olarak üretilen proteinin farklı bir fonksiyon kazanması, polialanin artışının bir sonucu olarak üretilen proteinin farklı bir fonksiyon kazanması ve üretilen RNA'nın artmış miktarda CUG içermesinin bir sonucu olarak farklı bir fonksiyon kazanmasıdır⁹⁸.

Çalışmamızda incelenen SSA7 ve SSA17 gen bölgeleri de TNR artışı gösterebilmekte ve hastalığa sebep olabilmektedir. İki gen bölgesinde oluşan mutasyonlar da oluşum şekli itibarıyla poliglutamin artışının bir sonucu olarak üretilen proteinin farklı bir fonksiyon kazanıp spinocerebellar ataksiye (Tip 7 ve Tip 17) sebep olmasıyla sonuçlanmaktadır. Proteinlerde meydana gelen poliglutamin artışının nasıl SSA7 ve SSA17'ye sebep olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarla elde edilmiş veriler ışığında ortaya atılan çeşitli görüşler bulunmaktadır. Gatchel ve Zoghbi'ye⁹⁹ göre, poliglutamin artışı anormal ve toksik protein üretimine ve bu

proteinlerin hücre içerisinde birikmesine sebep olmakta, bunun bir sonucu olarak da hücrenin protein homeostazı bozulmaktadır. Nöronlar gibi hassas hücrelerde ise bunun organellerin düzgün çalışmaması, aksonal iletimde bozukluklar meydana gelmesi, sinaptik aktivitede bozukluklar meydana gelmesi gibi zararlı sonuçları olmaktadır. Williams ve Paulson'a¹⁰⁰ göre, poliglutamin artışı proteinlerin kalite kontrol mekanizmasını da etkilemekte ve yanlış katlanmış proteinlerin hücre içinde birikmesini kısmen tetiklemektedir. Ortaya atılan bu ve benzeri görüşler bir kesinlik taşımasa da, proteinlerde meydana gelen poliglutamin artışının toksik etki yaptığı ortak paydasını taşımaktadırlar.

Çalışmamızda spinoserebellar ataksi teşhisi konmuş 159 hastadan kan örnekleri toplandı ve SSA7 ve SSA17'ye neden olan ilgili gen bölgesindeki TNR sayıları tespit edilmeye çalışıldı. Tuzla çöktürme metoduyla izolasyonu yapılan DNA'lar SSA7 ve SSA17 ilgili gen bölgesindeki TNR artışı gösteren kısımları da kapsayacak şekilde uygun primer dizileri kullanılarak PCR yöntemiyle amplifiye edildi ve agaroz jelde elektroforezi yapılarak uzunluğu bilinen bir marker DNA ile karşılaştırılmak suretiyle uzunlukları tespit edildi ve bu uzunluklardan gerekli hesaplamalar yapılarak tekrar sayılarına ulaşıldı.

DNA izolasyonu aşaması için kolay yapılabilir, verimli ve maliyetinin düşük olması sebebiyle tuzla çöktürme metodu tercih edildi. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler tercih edilirken amplifikasyon başarı oranını en üst düzeye taşımak için TNR artışı gösteren bölgenin DNA dizisinin gerisinden ve ilerisinden uygun C-G oranına sahip kısımlar tercih edildi. PCR ürünlerinin boyutlarının tespit edilmesi ve görüntülenmesi aşamasında kolay yapılabilir, verimli ve maliyeti düşük olduğundan agaroz jel elektroforezi tercih edildi. Yüksek konsantrasyonlu jel, düşük voltaj ve uzun elektroforez süresi uygulanarak PCR ürünlerinin başarılı bir şekilde bp uzunluklarının ölçümlerinin yapılabilmesi amaçlandı. Elde edilen jel görüntülerinin değerlendirilmesi aşamasında PCR ürünlerinin jel üzerindeki ilerleme mesafelerinin ölçülmesi için Adobe Photoshop CS4 bilgisayar programı kullanılarak milimetrik ölçekte ölçümler yapıldı ve tekrar sayılarının en az hatayla tespit edilmesi amaçlandı.

SSA17 gen bölgesi için tüm örneklerden (159) sonuç alınırken SSA7 gen bölgesi için 60 örnekten sonuç alınabildi. Sonuç alınamayan örneklerin bir kısmı düşük DNA konsantrasyonuna sahip olduğundan görsel inceleme için yeterli miktarda PCR ürünü

elde edilemedi ve değerlendirmeye alınmadı. Sonuç alınamayan örneklerin bir kısmında ise fazla miktarda spesifik olmayan bantlar gözlemlendi ve değerlendirmeye alınmadı. Bu iki sebep dikkate alındığında SSA7 ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunun daha düşük bir başarı yüzdesine sahip olduğu sonucuna varıldı. Bazı örneklerde SSA7 gen bölgesinde yeterli miktarda amplifikasyon olmamasının veya spesifik olmayan bantların görülmesinin sebeplerinin ise kullanılan primerler ile ilgili olduğu düşünülmektedir. PCR yöntemiyle amplifikasyon yapılırken kullanılan primerler kimi zaman kendi üstüne katlanabilmekte, bağlanması gereken bölgeye düşük afinite ile bağlanabilmekte veya bağlanması gerekenden farklı bölgelere de bağlanabilmektedir¹⁰¹. Bunların bir sonucu olarak elde edilen PCR ürünleri düşük konsantrasyona sahip olabilmekte veya spesifik olmayan DNA parçaları içerebilmektedir.

SSA7 gen bölgesi için yapılan TNR sayısı taramalarında bir kişide heterozigot genotipte, normal aralıkların üstünde TNR sayısı tespit edildi. Hastanın normal olan alleli 17 TNR içerirken, artış göstermiş allelinde 77 TNR tespit edildi. Henüz 5 yaşında olan hastanın 3 yaşından beri görme bozukluğu şikayeti bulunmaktadır. Klinik çalışmalarda hastada retinal dejenerasyona rastlanmıştır ve bu klinik bulgu Garden ve Spada'nın⁶⁸ da belirttiği gibi SSA7'de görülen karakterize klinik bulgulardan biridir. Johansson ve ark.¹⁰² yaptıkları çalışmada 59 TNR sayısına kadar olan artışların serebellar bulgulara neden olduğunu, 59'dan fazla olan TNR sayısının ise retinal dejenerasyona neden olup hastalarda ilk olarak gözlerle ilgili şikayetler olduğunu göstermişlerdir. Hastada ayrıca parapareziye bağlı yürüme güçlüğü tespit edilmiştir. Erken yaşta başlayan ve retinal dejenerasyona kadar ilerleyen SSA7 hastalarında yürüme bozukluğu genellikle gözlenen bir durumdur¹⁰².

SSA7 hastalarında HBY bebeklik çağından 70 yaşına kadar değişebilmektedir ve hastalık başlama yaşının erken olduğu hastalarda dejenerasyon çok daha hızlı ilerlemektedir⁶⁵. Hastalık başlama yaşının tekrar sayısı ile ters orantılı olduğu ve çok küçük yaşlarda hastalığa yakalanan bireylerin ailelerinde antisipasyon görüldüğü çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir ve genel olarak kabul görmektedir^{103,104}. Çalışmamızda tespit edilen SSA7 hastası sayısı sadece bir tane olduğundan HBY veya diğer klinik parametrelerle (mental retardasyon, cinsiyet, şikayet vs.) ilgili herhangi bir istatistiksel analiz yapıp korelasyon kurulamadı. Ancak hastanın yüksek miktarda artış göstermiş TNR sayısı, hastalığın çok küçük yaşta başlamış olması dikkate alındığında elde edilen

bulguların genel kabullerle uyumlu olduğu düşünülmektedir. Değnilmesi gereken diğer önemli bir nokta ise hastanın akraba evliliği sonucu dünyaya gelmiş olmasıdır. Daha önce belirtildiği gibi hastalık başlama yaşı küçük olan bireylerde antisipasyon görülmektedir. Hastanın normal olan allelinin de kontrol grubu ortalamasına göre daha fazla tekrar içerdiği göz önüne alınırsa anne ve babada da TNR sayılarında artış olabileceği tahmin edilmektedir. Babadan gelen allelin antisipasyon sonucu hasta çocukta yüksek miktarda TNR artışına sebep olduğu, annenin de babanın akrabası olması dolayısıyla bir önceki kuşaktan aktarılan normal sayının biraz üzerinde TNR sayısına sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda elde edilen bulgulara göre çocukluk çağında başlayan SSA7'ler büyük çoğunlukla babadan antisipasyon yoluyla geçiş göstermektedir ve bu düşüncemizi desteklemektedir^{6,7,105}. Ayrıca, David ve ark.¹⁰ yaptıkları çalışmada SSA7 hastalarının spermlerindeki TNR sayısının kan hücrelerindeki TNR sayısından belirgin şekilde fazla olduğunu rapor etmiştir ve buda düşüncemizi destekleyen diğer bir unsurdur. Ancak anne ve babadan alınan kan örnekleri bulunmadığından bu varsayımın kesinliği bulunmamaktadır.

Çalışmamızda ayrıca SSA7'ye neden olan gen bölgesi için hasta birey dışındaki bireylerin (kontrol ve SSA hastaları) TNR sayılarının ortalamaları ve frekansları hesaplandı. Bu sayede ülkemizde SSA7 için en sık görülen TNR sayılarının ve ortalamalarının tespit edilmesi amaçlandı. SSA7 için TNR sayılarının ortalaması $13,2 \pm 2,6$ bulundu ve en sık görülen TNR sayısı 16 olarak tespit edildi. Dünyada, normal bireylerde SSA7 gen bölgesi için ortalama 10 TNR bulunmaktadır¹¹. Elde edilen verilerde frekansı en yüksek TNR sayılarından birisinin 10 olması bu ortalama ile uyumludur. Ancak daha önce de belirtildiği gibi TNR sayılarının ortalamaları coğrafi bölgelere ve ırklara göre değişiklik göstermektedir. Elde ettiğimiz verilere göre SSA7 ilgili gen bölgesi için TNR sayılarının ortalaması dünya ortalamasından biraz daha fazla bulunmuştur.

Çalışmamızda SSA7'nin tüm SSA'lar içindeki görülme sıklığı %1,7 olarak bulunmuştur. Bu oran SSA7'nin diğer coğrafi bölgelerdeki görülme sıklığı ile karşılaştırılırsa (%1-12) alt sınıra yakın görülmektedir. Finlandiya, İsveç gibi kuzey Avrupa ülkelerinde en sık görülen tip olan SSA7, Doğu Asya toplumlarında ise daha seyrek görülmektedir⁶⁵. Han ve ark.¹⁰⁶ yaptıkları çalışmada çeşitli Doğu Asya toplumlarındaki SSA7'nin görülme sıklığı verilerini derlemişler ve %0.8-2,6 arasında

oranlar bulmuşlardır. Çalışmamız, Han ve ark.'nın¹⁰⁶ yaptığı bu çalışmayla karşılaştırıldığında SSA7'nin görülme sıklığı dikkate alındığında en çok Japon popülasyonu ile benzerlik göstermektedir (%1,7). Genetik yapısı daha çok Kafkas popülasyonuna benzetilen Türk toplumunun SSA7 için Asya toplumlarıyla daha çok benzerlik göstermesi ise ilgi çekicidir.

SSA17 gen bölgesi için yapılan TNR sayısı taramalarında 3 kişide heterozigot genotipte, tam penetrans aralığında TNR sayısı tespit edildi. Hastaların normal olan allelleri 32-38 arası TNR içerirken, artış göstermiş allellerinde 58-63 arası TNR sayısı tespit edildi. Hastaların klinik bulgularında yürüme güçlüğü, mental retardasyon gibi şikayetlere rastlanmıştır. Bu bulgular genel olarak literatürde belirtilen SSA17 bulgularıyla uyum göstermektedir^{81,82}. Çalışmamızda, klinik bulguların şiddetiyle ilgili ölçeklendirme yapılamadığından TNR sayılarıyla aralarında bir ilişki kurulamadı.

SSA17 hastalarında HBY ortalama 30 civarındadır ancak bebeklik çağından 60'lı yaşlara kadar değişebilmektedir⁸³. Bebeklik çağına başlayan SSA17'ler gelişme geriliği ve erken ölümlerle karakterizedir⁸⁵. Çalışmamızda SSA17 tespit edilen 2 hasta bebeklik çağındadır (1 Yaş) ve gelişme geriliğine bağlı yürüme ve hareket güçlüğü şikayeti bulunmaktadır. Elde edilen bu veriler de, diğer çalışmalarda belirtilen klinik bulguları destekler niteliktedir. Diğer SSA'lar gibi SSA17'de de, hastalık başlama yaşının tekrar sayısı ile ters orantılı olduğu ve çok küçük yaşlarda hastalığa yakalanan bireylerin ailelerinde antisipasyon görüldüğü bilinmektedir^{103,104}. Yaptığımız çalışmada da, HBY'nin TNR sayısı ile korelasyonu olup olmadığı hasta sayısının çok az olmasından dolayı değerlendirilemedi.

Hastaların cinsiyetlerine baktığımızda 3'ünde kadın olması dikkat çekmektedir ancak SSA17'nin otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalık olduğu ve şimdiye kadar hastalığın cinsiyetle ilişkisi kurulmadığı göz önüne alındığında bunun sadece bir rastlantı olabileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak çalışmamızda, SSA17 hastalarının TNR sayılarıyla diğer klinik bulgularıyla (mental retardasyon, yakınma, akraba evliliği, kas gücü) ilişki kurulmaya çalışıldı ancak hasta sayısının çok az olmasından dolayı değerlendirme yapılamadı.

SSA17'ye neden olan gen bölgesi için hasta birey dışındaki bireylerin (kontrol ve SSA hastaları) TNR sayılarının ortalamaları ve frekansları hesaplandı. Bu sayede ülkemizde SSA17 için en sık görülen TNR sayılarının ve ortalamalarının tespit edilmesi

amaçlandı. SSA17 için TNR sayılarının ortalaması $36,5 \pm 3,4$ bulundu ve en sık görülen TNR sayısı 41 olarak tespit edildi. SSA17'ye neden olan gen bölgesindeki TNR sayısının genel ortalamasının 38 olduğu¹⁵ göz önüne alındığında elde ettiğimiz verilere göre SSA17'ye neden olan gen bölgesi için TNR sayılarının ortalaması dünya ortalamasından biraz daha düşük bulunmuştur. Bu fark, SSA'lardaki TNR sayılarının coğrafi bölgelere ve ırklara göre farklılık gösterebilmesiyle açıklanabilir.

SSA17'nin tüm SSA'lar içindeki görülme sıklığı %1,9 olarak bulunmuştur. Bu oran SSA17'nin diğer coğrafi bölgelerdeki görülme sıklığı ile karşılaştırılırsa (%0,5-3) üst sınıra yakın görülmektedir. Almanya, İtalya, İngiltere gibi Avrupa ülkelerinde sık rastlanan (%2-3) bir tip olan SSA17, Japonya, Tayvan, Çin gibi Doğu Asya toplumlarında ise daha seyrek (%0,5-1) görülmektedir^{13,107}. Çalışmamız, bu verilerle karşılaştırıldığında SSA17'nin görülme sıklığı dikkate alındığında en çok Avrupa popülasyonu ile benzerlik göstermektedir.

Daha önce belirttiğimiz gibi, birçok kaynakta SSA7'nin, SSA17'den daha sık rastlanan bir tip olduğu söylenmektedir. Çalışmamızda, SSA17'nin görülme sıklığının SSA7'den fazla olması beklenmeyen bir sonuçtur. Bunun sebebinin ise sonuç alınabilen SSA17 hasta sayısının SSA7 hasta sayısından fazla olması olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Nöroloji ve Pediatrik Nöroloji Servislerinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, otozomal dominant kalıtım gösteren SSA7 ve SSA17 ile ilgili olarak aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir:

1. SSA7'nin tüm SSA'lar içindeki görülme sıklığı %1,7 olarak belirlenmiştir.
2. SSA7 hastası olmayan bireylerde hastalığa neden olan gen bölgesindeki ortalama TNR sayısı $13,2 \pm 2,6$ olarak belirlenmiştir.
3. SSA7 hastası olmayan bireylerde hastalığa neden olan gen bölgesinde en fazla görülen TNR sayısı 16 olarak belirlenmiştir.
4. SSA17'nin tüm SSA'lar içindeki görülme sıklığı %1,9 olarak belirlenmiştir.
5. SSA17 hastası olmayan bireylerde hastalığa neden olan gen bölgesindeki ortalama TNR sayısı $36,5 \pm 3,4$ olarak belirlenmiştir.
6. SSA17 hastası olmayan bireylerde hastalığa neden olan gen bölgesinde en fazla görülen TNR sayısı 41 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, SSA7 ve SSA17'ye neden olan gen bölgeleri için belirlenen ortalama TNR sayıları ve TNR frekansları ülkemizde ilerde bu iki hastalık üzerine yapılacak moleküler araştırmalarda yol gösterici olabilecektir. SSA7 ve SSA17 tespit edilen hasta bireyler SSA tipinin tanısı konduğundan hekimlerden daha spesifik tedavi ve öneriler alabileceklerdir. SSA7 ve SSA17 tespit edilen bireylerin ailelerine genetik danışmanlık verilebilecektir. Çalışmamız, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi'ne ilerde başvuran SSA hastalarının, hastalık tiplerinin belirlenmesinde uygulanacak yöntemler açısından yol gösterici olabilecektir. Bu konuda; SSA7 ve SSA17'ye sebep olan moleküler mekanizmaların ve TNR sayılarının hastalığın seyri üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Harding AE.** The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain*;1982;105(Pt 1): 1-28.
2. **Harding AE.** Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol*;1993;61: 1-14.
3. **Yakura H WA, Fujimoto S, Itakura K.** Hereditary ataxia and HLA genotypes. *N. Engl. J. Med.*;1974: 291, 2
4. **Dorschner MO, Barden D , Stephens K.** Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn*;2002;4(2): 108-113.
5. **Klockgether T , Paulson H.** Milestones in ataxia. *Mov Disord*;2011;26(6): 1134-1141.
6. **Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Durr A, Zaim A , et al.** The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. *Nat Genet*;1995;10(1): 84-88.
7. **David G, Giunti P, Abbas N, Coullin P, Stevanin G, Horta W, Gemmill R, Weissenbach J, Wood N, Cunha S, Drabkin H, Harding AE, Agid Y , Brice A.** The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia type II is located in a 5-cM region in 3p12-p13: genetic and physical mapping of the SCA7 locus. *Am J Hum Genet*;1996;59(6): 1328-1336.
8. **Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY , Ptacek LJ.** Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat Genet*;1995;10(1): 89-93.
9. **Holmberg M, Johansson J, Forsgren L, Heijbel J, Sandgren O , Holmgren G.** Localization of Autosomal-Dominant Cerebellar-Ataxia Associated with Retinal Degeneration and Anticipation to Chromosome 3p12-P21.1. *Human Molecular Genetics*;1995;4(8): 1441-1445.
10. **David G, Durr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Benomar A, Belal S, Lebre AS, Abada-Bendib M, Grid D, Holmberg M, Yahyaoui M, Hentati F, Chkili T, Agid Y , Brice A.** Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Mol Genet*;1998;7(2): 165-170.
11. **van de Warrenburg BP, Frenken CW, Ausems MG, Kleefstra T, Sinke RJ, Knoers NV , Kremer HP.** Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J Neurol*;2001;248(10): 911-914.
12. **Gouw LG, Castaneda MA, McKenna CK, Digre KB, Pulst SM, Perlman S, Lee MS, Gomez C, Fischbeck K, Gagnon D, Storey E, Bird T, Jeri FR , Ptacek LJ.** Analysis of the dynamic mutation

in the SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. *Hum Mol Genet*;1998;7(3): 525-532.

13. **Mariotti C, Alpini D, Fancellu R, Soliveri P, Grisoli M, Ravaglia S, Lovati C, Fetoni V, Giaccone G, Castucci A, Taroni F, Gellera C, Di Donato S.** Spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17): oculomotor phenotype and clinical characterization of 15 Italian patients. *J Neurol*;2007;254(11): 1538-1546.

14. **Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S.** A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Human Molecular Genetics*;1999;8(11): 2047-2053.

15. **Maltecca F, Filla A, Castaldo I, Coppola G, Fragassi NA, Carella M, Bruni A, Coccozza S, Casari G, Servadio A, De Michele G.** Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17. *Neurology*;2003;61(10): 1441-1443.

16. **Imbert G FY, Nelson DL, Warren ST, Mandel JL.** Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Disorders. San Diego, Academic Press;1998:27-53.

17. **Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G, Watson M.** Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet*;1985;69(4): 289-299.

18. **Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al.** Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*;1991;65(5): 905-914.

19. **Siianova E, Mirkin SM.** [Expansion of trinucleotide repeats]. *Mol Biol (Mosk)*;2001;35(2): 208-223.

20. **McMurray CT.** Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma*;1995;104(1): 2-13.

21. **Vologodski AV.** Topology and physics of circular DNA. Boca Raton, CRC Press;1992:

22. **Mitchell JE, Newbury SF, McClellan JA.** Compact structures of d(CNG)_n oligonucleotides in solution and their possible relevance to fragile X and related human genetic diseases. *Nucleic Acids Res*;1995;23(11): 1876-1881.

23. **Petruska J, Arnheim N, Goodman MF.** Stability of intrastrand hairpin structures formed by the CAG/CTG class of DNA triplet repeats associated with neurological diseases. *Nucleic Acids Res*;1996;24(11): 1992-1998.

24. **Yu A, Barron MD, Romero RM, Christy M, Gold B, Dai J, Gray DM, Haworth IS, Mitas M.** At physiological pH, d(CCG)₁₅ forms a hairpin containing protonated cytosines and a distorted helix. *Biochemistry*;1997;36(12): 3687-3699.

25. **Yu A, Dill J, Wirth SS, Huang G, Lee VH, Haworth IS, Mitas M.** The trinucleotide repeat sequence d(GTC)₁₅ adopts a hairpin conformation. *Nucleic Acids Res*;1995;23(14): 2706-2714.
26. **Chen X, Mariappan SV, Catasti P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A, Smith SS, Bradbury EM, Gupta G.** Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*;1995;92(11): 5199-5203.
27. **Gacy AM, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray CT.** Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell*;1995;81(4): 533-540.
28. **Zheng M, Huang X, Smith GK, Yang X, Gao X.** Genetically unstable CXG repeats are structurally dynamic and have a high propensity for folding. An NMR and UV spectroscopic study. *Journal of Molecular Biology*;1996;264(2): 323-336.
29. **Kunkel TA.** Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature*;1993;365(6443): 207-208.
30. **Lodish HF.** *Molecular cell biology*. New York, W.H. Freeman;2000:
31. **Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J, Sutherland GR.** Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet*;1991;28(12): 818-823.
32. **Wolff RK, Plaetke R, Jeffreys AJ, White R.** Unequal Crossing-over between Homologous Chromosomes Is Not the Major Mechanism Involved in the Generation of New Alleles at Vntr Loci. *Genomics*;1989;5(2): 382-384.
33. **Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, Klungland A, Wilson SH, McMurray CT.** OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature*;2007;447(7143): 447-452.
34. **Entezam A, Lokanga AR, Le W, Hoffman G, Usdin K.** Potassium bromate, a potent DNA oxidizing agent, exacerbates germline repeat expansion in a fragile X premutation mouse model. *Hum Mutat*;2010;31(5): 611-616.
35. **Daube SS, Arad G, Livneh Z.** Translesion replication by DNA polymerase beta is modulated by sequence context and stimulated by fork-like flap structures in DNA. *Biochemistry*;2000;39(2): 397-405.
36. **Henricksen LA, Veeraraghavan J, Chafin DR, Bambara RA.** DNA ligase I competes with FEN1 to expand repetitive DNA sequences in vitro. *J Biol Chem*;2002;277(25): 22361-22369.
37. **Liu Y, Prasad R, Beard WA, Hou EW, Horton JK, McMurray CT, Wilson SH.** Coordination between Polymerase beta and FEN1 Can Modulate CAG Repeat Expansion. *Journal of Biological Chemistry*;2009;284(41): 28352-28366.

38. **Spiro C, Pelletier R, Rolfsmeier ML, Dixon MJ, Lahue RS, Gupta G, Park MS, Chen X, Mariappan SVS , McMurray CT.** Inhibition of FEN-1 processing by DNA secondary structure at trinucleotide repeats. *Molecular Cell*; **1999**;4(6): 1079-1085.
39. **Asagoshi K, Liu Y, Masaoka A, Lan L, Prasad R, Horton JK, Brown AR, Wang XH, Bdour HM, Sobol RW, Taylor JS, Yasui A , Wilson SH.** DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair in living cells. *DNA Repair (Amst)*; **2010**;9(2): 109-119.
40. **Bjelland S , Seeberg E.** Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*; **2003**:531(1-2): 37-80.
41. **Rolseth V, Runden-Pran E, Luna L, McMurray C, Bjoras M , Ottersen OP.** Widespread distribution of DNA glycosylases removing oxidative DNA lesions in human and rodent brains. *DNA Repair*; **2008**:7(9): 1578-1588.
42. **Modrich P.** Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *Journal of Biological Chemistry*; **2006**:281(41): 30305-30309.
43. **Hou CX, Chan NLS, Gu LY , Li GM.** Incision-dependent and error-free repair of (CAG)(n)/(CTG)(n) hairpins in human cell extracts. *Nature Structural & Molecular Biology*; **2009**:16(8): 869-U896.
44. **Panigrahi GB, Lau R, Montgomery SE, Leonard MR , Pearson CE.** Slipped (CTG)center dot(CAG) repeats can be correctly repaired, escape repair or undergo error-prone repair. *Nature Structural & Molecular Biology*; **2005**:12(8): 654-662.
45. **McMurray CT.** Hijacking of the mismatch repair system to cause CAG expansion and cell death in neurodegenerative disease. *DNA Repair*; **2008**:7(7): 1121-1134.
46. **Gomes-Pereira M, Fortune MT, Ingram L, McAbney JP , Monckton DG.** Pms2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG/CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion. *Human Molecular Genetics*; **2004**:13(16): 1815-1825.
47. **Manley K, Shirley TL, Flaherty L , Messer A.** Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nature Genetics*; **1999**:23(4): 471-473.
48. **van den Broek WJAA, Nelen MR, Wansink DG, Coerwinkel MM, Riele HT, Groenen PJTA , Wieringa B.** Somatic expansion behaviour of the (CTG)(n) repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins. *Human Molecular Genetics*; **2002**:11(2): 191-198.
49. Erişim: <http://www.ataxia.org/learn/ataxia-diagnosis.aspx> Erişim tarihi: 28.04.2011.
50. Erişim: <http://neuromuscular.wustl.edu/ataxia/aindex.html> Erişim tarihi: 28.04.2011.

51. **Abele M, Burk K, Schols L, Schwartz S, Besenthal I, Dichgans J, Zuhlke C, Riess O , Klockgether T.** The aetiology of sporadic adult-onset ataxia. *Brain*;2002;125: 961-968.
52. **Morton SM , Bastian AJ.** Can rehabilitation help ataxia? *Neurology*;2009;73(22): 1818-1819.
53. **Trujillo-Martin MM, Serrano-Aguilar P, Monton-Alvarez F , Carrillo-Fumero R.** Effectiveness and Safety of Treatments for Degenerative Ataxias: A Systematic Review. *Movement Disorders*;2009;24(8): 1111-1124.
54. **Duenas AM, Goold R , Giunti P.** Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*;2006;129: 1357-1370.
55. **Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T , Riess O.** Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*;2004;3(5): 291-304.
56. **Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M , Tallaksen CM.** Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*;2009;132(Pt 6): 1577-1588.
57. **van de Warrenburg BPC, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NVAM , Kremer HPH.** Spinocerebellar ataxias in the Netherlands - Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*;2002;58(5): 702-708.
58. **Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Ceu Moreira M, Mendonca P, Ferreirinha F, Sequeiros J , Giugliani R.** A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*;2001;248(10): 870-876.
59. **Lopes-Cendes I, Teive HG, Calcagnotto ME, Da Costa JC, Cardoso F, Viana E, Maciel JA, Radvany J, Arruda WO, Trevisol-Bittencourt PC, Rosa Neto P, Silveira I, Steiner CE, Pinto Junior W, Santos AS, Correa Neto Y, Werneck LC, Araujo AQ, Carakushansky G, Mello LR, Jardim LB , Rouleau GA.** Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr*;1997;55(3B): 519-529.
60. **Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Jerin S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg R, MacLeod P, Chitayat D, Babul R, Sequeiros J , Rouleau GA.** Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology*;1996;46(1): 214-218.
61. **Storey E, Bahlo M, Fahey M, Sisson O, Lueck CJ , Gardner RJM.** A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*;2009;80(4): 408-411.
62. **Subramony SH , Filla A.** Autosomal dominant spinocerebellar ataxias ad infinitum? *Neurology*;2001;56(3): 287-289.

63. **Teive HA, Roa BB, Raskin S, Fang P, Arruda WO, Neto YC, Gao R, Werneck LC , Ashizawa T.** Clinical phenotype of Brazilian families with spinocerebellar ataxia 10. *Neurology*;2004;63(8): 1509-1512.
64. **Teive HA.** Spinocerebellar degenerations in Japan. New insights from an epidemiological study. *Neuroepidemiology*;2009;32(3): 184-185.
65. **Teive HAG.** Spinocerebellar Ataxias. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*;2009;67(4): 1133-1142.
66. **Pulst S-M.** Genetics of movement disorders. **2003**: 561 p.
67. **Konigsmark BW , Weiner LP.** The olivopontocerebellar atrophies: a review. *Medicine (Baltimore)*;1970;49(3): 227-241.
68. **Garden GA , La Spada AR.** Molecular pathogenesis and cellular pathology of spinocerebellar ataxia type 7 neurodegeneration. *Cerebellum*;2008;7(2): 138-149.
69. **Michalik A, Martin JJ , Van Broeckhoven C.** Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet*;2004;12(1): 2-15.
70. **Lebre AS , Brice A.** Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res*;2003;100(1-4): 154-163.
71. **Modi G, Modi M, Martinus I, Rodda J , Saffer D.** The clinical and genetic characteristics of spinocerebellar ataxia type 7 (SCA 7) in three Black South African families. *Acta Neurologica Scandinavica*;2000;101(3): 177-182.
72. **da Cunha Linhares S, Horta WG , Marques Junior W.** Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): family princeps history, genealogy and geographical distribution. *Arq Neuropsiquiatr*;2006;64(2A): 222-227.
73. **Takano H, Cancel G, Ikeuchi T, Lorenzetti D, Mawad R, Stevanin G, Didierjean O, Durr A, Oyake M, Shimohata T, Sasaki R, Koide R, Igarashi S, Hayashi S, Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Zoghbi H, Brice A , Tsuji S.** Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *American Journal of Human Genetics*;1998;63(4): 1060-1066.
74. **Lebre AS SG, Brice A.** Genetics of movement disorders. San Diego, Calif., Academic Press;2003:85-94.
75. **Mittal U, Roy S, Jain S, Srivastava AK , Mukerji M.** Post-zygotic de novo trinucleotide repeat expansion at spinocerebellar ataxia type 7 locus: evidence from an Indian family. *Journal of Human Genetics*;2005;50(3): 155-157.

76. **Nardacchione A, Orsi L, Brusco A, Franco A, Grosso E, Dragone E, Mortara P, Schiffer D , De Marchi M.** Definition of the smallest pathological CAG expansion in SCA7. *Clinical Genetics*;1999;56(3): 232-234.
77. **Stevanin G, Giunti P, David G, Belal S, Durr A, Ruberg M, Wood N , Brice A.** De novo expansion of intermediate alleles in spinocerebellar ataxia 7. *Human Molecular Genetics*;1998;7(11): 1809-1813.
78. Erişim:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000003.11?report=genbank&from=63850233&to=63989138
Erişim tarihi: 28.04.2011.
79. **Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S , Taroni F.** Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia - Mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Archives of Neurology*;2004;61(5): 727-733.
80. **Rolfs A, Koepfen AH, Bauer I, Bauer P, Buhlmann S, Topka H, Schols L , Riess O.** Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17). *Annals of Neurology*;2003;54(3): 367-375.
81. **Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O, Shimohata M, Inenaga C, Fujita N, Morita M, Tsuji S , Takahashi H.** SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Annals of Neurology*;2004;55(2): 281-286.
82. **Hagenah JM, Zuhlke C, Hellenbroich Y, Heide W , Klein C.** Focal dystonia as a presenting sign of spinocerebellar ataxia 17. *Movement Disorders*;2004;19(2): 217-220.
83. **Zuhlke C , Burk K.** Spinocerebellar ataxia type 17 is caused by mutations in the TATA-box binding protein. *Cerebellum*;2007;6(4): 300-307.
84. **Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, Imamura T, Yasuda M, Ichikawa K, Ogawa M, Matsumoto M , Kawakami H.** Possible reduced penetrance of expansion of 44 to 47 CAG/CAA repeats in the TATA-binding protein gene in spinocerebellar ataxia type 17. *Archives of Neurology*;2004;61(2): 209-212.
85. **Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre AS, Camuzat A, Jeannequin C, Dode C, Takahashi J, San C, Bellance R, Brice A , Durr A.** Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain*;2003;126: 1599-1603.
86. **Zuhlke C, Dalski A, Schwinger E , Finckh U.** Spinocerebellar ataxia type 17: Report of a family with reduced penetrance of an unstable GIn(49) TBP allele, haplotype analysis supporting a founder effect for unstable alleles and comparative analysis of SCA17 genotypes. *Bmc Medical Genetics*;2005;6.
87. **Zuhlke C, Gehlken U, Hellenbroich Y, Schwinger E , Burk K.** Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene - Reduced penetrance in SCA17? *Journal of Neurology*;2003;250(2): 161-163.

88. **Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S , Kanazawa I.** SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Human Molecular Genetics*;2001:10(14): 1441-1448.
89. **Shatunov A, Fridman EA, Pagan FI, Leib J, Singleton A, Hallett M , Goldfarb LG.** Small de novo duplication in the repeat region of the TATA-box-binding protein gene manifest with a phenotype similar to variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Clinical Genetics*;2004:66(6): 496-501.
90. Erişim:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000006.11?report=genbank&from=170863421&to=170881958
Erişim tarihi: 28.04.2011.
91. **Adobe Systems Inc.** Adobe Photoshop CS4. Version 11.0, California:2008.
92. **SPSS Inc.** SPSS for Windows. Version 13.0, Chicago:2004.
93. **Raghava GP.** Improved estimation of DNA fragment length from gel electrophoresis data using a graphical method. *Biotechniques*;1994:17(1): 100-104.
94. **Miller SA, Dykes DD , Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*;1988:16(3): 1215.
95. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G , Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*;1986:51 Pt 1: 263-273.
96. **Alberts B.** *Molecular biology of the cell.* New York ; Abingdon, Garland Science;2008:207.
97. **Slattery JP, Murphy WJ , O'Brien S.** Patterns of diversity among SINE elements isolated from three Y-chromosome genes in carnivores. *Molecular Biology and Evolution*;2000:17(5): 825-829.
98. **La Spada AR , Taylor JP.** Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet*;2010:11(4): 247-258.
99. **Gatchel JR , Zoghbi HY.** Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*;2005:6(10): 743-755.
100. **Williams AJ , Paulson HL.** Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci*;2008:31(10): 521-528.
101. **Hecker KH , Roux KH.** High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*;1996:20(3): 478-485.

102. **Johansson J, Forsgren L, Sandgren O, Brice A, Holmgren G , Holmberg M.** Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Hum Mol Genet*; **1998**;7(2): 171-176.
103. **Soong BW , Paulson HL.** Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol*; **2007**;20(4): 438-446.
104. **Durr A , Brice A.** Clinical and genetic aspects of spinocerebellar degeneration. *Curr Opin Neurol*; **2000**;13(4): 407-413.
105. **Benomar A, Le Guern E, Durr A, Ouhabi H, Stevanin G, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y , Brice A.** Autosomal-dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA type II) is genetically different from ADCA type I. *Annals of Neurology*; **1994**;35(4): 439-444.
106. **Han Y, Yu L, Zheng HM , Guan YT.** Clinical and genetic study of spinocerebellar ataxia type 7 in East Asian population. *Chin Med J (Engl)*; **2010**;123(16): 2274-2278.
107. **Basri R, Yabe I, Soma H , Sasaki H.** Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families. *J Hum Genet*; **2007**;52(10): 848-855.

EKLER

EK-1

DNA ÇALIŞMASI ONAM FORMU

Spinocerebellar Ataksi Sendromlu Hastalarda Tip 7 (SSA7) ve Tip 17 (SSA17) CAG Trinükleotit Tekrarlarının İncelenmesi

Prof. Dr. Halil KASAP danışmanlığında, Araştırma Görevlisi Perçin PAZARCI tarafından yüksek lisans tez çalışması olarak sürdürülecek olan çalışmamızda Çukurova bölgesindeki Spinocerebellar Ataksi sendromlu bireylerin kanlarındaki lökosit hücrelerinden izole edilen DNA'lardan, bireylerin sahip oldukları değişimler (polimorfizm tipleri) belirlenecek, bu polimorfizmlerin Spinocerebellar ataksi ile ilişkisinin olup olmadığı incelenecektir.

Çalışmamız çerçevesinde Ç.Ü.T.F. Balcalı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji polikliniğine başvuran Spinocerebellar Ataksi şüphesi bulunan kadın ve erkek bireylerden kan örneği alınarak Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında değerlendirmeye alınacaktır. Sonuçlar sadece bilimsel amaçlı kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır. Parasal bir ödeme yapmanızı gerektirmeyen ve size bir ödeme yapılmasının söz konusu olmadığı çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Araştırmayı katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden 3ml kan örneği alacağız.

Bu çalışmayla ilgili ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır. Aşağıda isimleri ve telefon numaraları bulunan araştırmacılar tarafından gerekli bilgilendirmeler yapılacaktır.

Araş. Gör. Perçin PAZARCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı: (0322) 338 60 60 / 3498

YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLARI OKUDUM, KANIMDAN GENETİK İNCELEME
YAPILMASINI KABUL EDİYORUM.

Hasta veya hukuksal olarak sorumlu kişi	Şahit Kişi	Kanı alan kişi
Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:
İmza:	İmza:	İmza:
Tarih:	Hastaya Yakınlığı:	

EK-2

1) TBE Tampon Çözeltisi (1X)

10,6 gr Tris, 5,5 gr Borik Asit ve 20 ml 0.5M EDTA çözeltisi 2 litrelik boş şişeye eklendikten sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı ve içerisindekiler çözünene kadar sıcak su banyosunda 40 °C de bekletilip karıştırıldı.

2) Eritrosit Lizis Çözeltisi

8,26 gr amonyum klorit, 1 gr potasyum bikarbonat 37 mg EDTA 1 litre distile suyun içinde çözülerek pH'si 7.2'ye ayarlandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3) Fizyolojik Tampon

8,00 gr NaCl, 0,20 gr KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄ • 2 H₂O ve 0,24 gr KH₂PO₄ 1 litre distile suyun içinde çözülerek pH'si 7.2'ye ayarlandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4) Tris-EDTA

10 mL 1 M Tris-Cl, 2 mL 0,5 M EDTA (pH=8) ve 988 mL distile su karıştırılarak hazırlandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere 4 °C'de muhafaza edildi.

6) 6 M Yoğun Sodyum Klorür Çözeltisi

350,76 gr NaCl 1 litre distile su içinde çözülmeye gerektiğinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

7) %70'lik Etil Alkol

700 mL saf etil alkolün üzerine 300 mL distile su eklenerek karıştırıldı ve gerektiğinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdu. İlköğrenimini Ankara'da ortaöğrenimini Adanada tamamladı. 2000'de Adana Fen Lisesinden mezun olup 2000'de Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programını kazandı. 2009 yılında aynı Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı.