

Düzeltilmiştir

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Düzeltilmiştir ve
Uygundur*

[Signature]

Düzeltilmiştir

[Signature]

TÜRK KİSTİK FİBROZ AİLELERİNDE $\Delta F508$ VE

1677delTA MUTASYONLARININ TARANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sibel KANTARCI

Biyoloji Anabilim Dalı

(Moleküler Biyoloji-Genetik Programı)

Danışman: Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

56132

MAYIS - 1996

ÖNSÖZ

Kistik fibroz (KF) otozomal çekinik karakterde en ciddi kalıtsal hastalıklardan biridir.

Bu çalışmada Türk kistik fibroz olgularının çoğunluğunda rastlanan ve genin 10. eksonunda üç baz çiftlik bir delesyondan kaynaklanan $\Delta F508$ mutasyonu ile genin yine 10. eksonunda iki baz çiftlik bir delesyondan kaynaklanan 1677delTA mutasyonu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak heterodupleks oluşum analizi ile incelendi.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan Düzen Laboratuvarlar Grubu kurucusu ve yöneticisi Prof. Dr. Yahya LALELİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bilgilerinden yararlandığım Boğaziçi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Betül KIRDAR'a ve Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencisi Tuncer ONAY'a çok teşekkür ederim.

Daima yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZ VE ABSTRACT.....	IV
I. GİRİŞ.....	1
II. MATERYAL VE METOD.....	11
II. 1. Kistik Fibroz Tanısında Terde Klorür Tayini.....	11
II. 1. 1. Terlemenin Uyarılması.....	11
II. 1. 2. Ter Numunesinin Toplanması.....	12
II. 1. 3. Toplanan Ter Örneğinin Analizi.....	12
II. 2. EDTA'lı Kan Materyali.....	12
II. 2. 1. EDTA'lı Kan Materyali'nin Saklanması.....	13
II. 2. 2. Genomik DNA İzolasyonu.....	13
II. 3. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Miktar Tayini.....	15
II. 3. 1. Spektrofotometrik Ölçüm.....	15
II. 3. 2. Mini Jel Metodu.....	16
II. 4. PCR Tekniği Kullanılarak Heterodupleks Oluşum Analizi.....	17
II. 4. 1. Primerler.....	17
II. 4. 2. Enzim.....	18
II. 4. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	19
II. 4. 4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
II. 5. Heterodupleks Oluşum Analizi.....	22

III. BULGULAR.....	24
III. 1. Heterodupleks Oluşum Analizi ile $\Delta F508$ ve 1677delTA Mutasyonlarının Tespiti.....	24
III. 2. Türk Kistik Fibroz Ailelerinde $\Delta F508$ ve 1677delTA Mutasyonlarının Frekansı.....	30
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
V. ÖZET VE SUMMARY.....	35
VI. KAYNAKLAR.....	37
VII. ÖZGEÇMİŞ.....	44



ÖZ**TÜRK KİSTİK FİBROZ AİLELERİNDE Δ F508 VE 1677delTA MUTASYONLARININ TARANMASI**

Bu çalışmada 20 Türk kistik fibroz ailesinin birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 kistik fibroz kromozomu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak Heterodupleks Oluşum Analizi ile incelendi.

ABSTRACT**THE SCREENING OF Δ F508 AND 1677delTA MUTATIONS IN TURKISH CYSTIC FIBROSIS FAMILIES.**

In this study, 36 unrelated cystic fibrosis chromosomes in 20 Turkish cystic fibrosis families were investigated by Heteroduplex Formation Analysis using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

I. GİRİŞ

Kistik fibroz beyaz ırkta sıklıkla rastlanan otozomal çekinik karakterde en ciddi kalıtsal hastalıklardan birisidir. Kistik fibroz tüm etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde görülür. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika popülasyonundaki insanlarda daha sık oranda görülmektedir. Bu popülasyonlarda yaklaşık her 2500 doğumda bir kistik fibrozlu bebek dünyaya gelmektedir. Bu, taşıyıcılık frekansının 20-25'te bir olduğu anlamına gelmektedir (THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM, 1993). Kistik fibrozun görülme sıklığı Amerika'daki zencilerde (1:17000) ve Asya toplumunda (< 1:100000) oldukça düşüktür (McIntosh ve ark., 1992).

Kistik fibroz, dış salgı bezlerinde klor iyonu taşınmasını düzenleyen 'kistik fibroz hücre zarından geçişi düzenleyen protein'i kodlayan gen bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (TSUI, 1992). Literatürde şimdiye kadar 400'den fazla kistik fibroza neden olan mutasyon yayınlanmıştır (THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM, 1993).

Kistik fibroz ile ilgili olarak ilk geniş tanımı 1938'de Anderson yapmıştır. "Pankreasta kistik fibroz" terimini kullanarak hastalığın bir sonucu olan pankreatik dış salgı fonksiyonundaki tahribe dikkati çekmiştir (ANDERSON, 1938). Bu ilk tanımdan sonra kistik fibrozun en genel öldürücü otozomal çekinik karakterdeki hastalıklardan biri olduğu kabul edilmiştir. 1938'deki bu ilk tanımdan sonra 1953'te Di Sant' Agnese kistik fibrozlu çocukların terinde çok fazla miktarda tuz kaybı olduğunu açıklamıştır (DI SANT'AGNESE ve ark., 1976). Bu bulgu, bir süre sonra kistik fibroz hastalığı tanısında terde Na^+ ve Cl^- ölçümlerinin kullanılmasına olanak sağlamıştır.

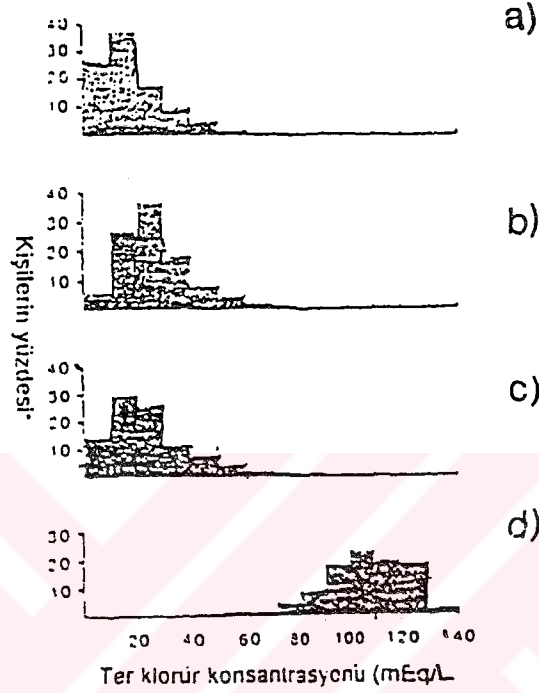
Kistik fibroz hastalığında belirtiler tüm dış salgı bezlerinde görülür. Normalde mukus üreten dış salgı bezleri ince ve akışkan mukus salgısı üretirler. Oysa kistik fibrozlu hastalarda üretilen mukus salgısı çok yoğun ve yapışkandır. (CUNNINGHAM, 1991). Kistik fibroz kronik akciğer hastalığı, pankreatik dış salgı yetersizliği ve anormal yüksek ter elektrolit değerleri üçlüsü ile karakterize edilir (DEAN ve ark., 1993). Hastalığın klinik belirtileri;

a) Kronik akciğer hastalığı: Alt solunum yolundaki boru ve borucuklar yoğun ve yapışkan mukus tabakası ile tıkanıyor için, alveollerdeki O₂ ve CO₂ gaz değişimi ile mikroorganizma ve toz partiküllerinin alt solunum yolundan uzaklaştırılması engellenir. Yoğun mukus tabakası sebebiyle akciğerler sık olarak Staphylococcus aureus ve Pseudomonas aeruginosa bakterileri ile enfekte olur. Enfeksiyon sebebiyle mukus üretimi daha da artar. Mukus üretimi arttıkça bakteri enfeksiyonu devam eder. Bu döngü sebebiyle akciğerlerdeki hasar devamlı olarak artar. Kronik akciğer hastalığı kistik fibrozlu olguların hepsinde görülür (CUNNINGHAM, 1991).

b) Pankreatik dış salgı yetersizliği: Kistik fibroz hastalarının %85'inde pankreas enzim salgısı normalin %1'inden azdır (pankreas yetersizliği). Hastaların %15'inde ise pankreas yetersizliği görülmez (COLLINS, 1992). Pankreas yetersizliği olan kistik fibrozlu hastalarda pankreas dış salgı bezleri yoğun ve yapışkan mukus salgısı üretirler. Bu mukus pankreas kanalını tıkar ve pankreas sindirim enzimleri barsaklara ulaşamaz. Sindirim enzimlerinin olmaması sebebiyle barsaktaki besinler çok zayıf olarak sindirilir. Sonuç olarak yiyeceklerdeki protein ve yağlar emilemez. Böylece vücutta protein ve yağ eksikliği ortaya çıkar (CUNNINGHAM, 1991).

c) Anormal yüksek ter elektrolit değerleri: Kistik fibrozda ter bezleri de etkilenir. Salgılanan ter miktarı normaldir. Fakat, ter elektrolit değerleri (Na⁺ ve Cl⁻) normalin yaklaşık iki ile beş katı kadardır (ROSENSTEIN, 1987). Şekil 1'de çeşitli sayıda kistik fibrozlu olmayan çocuk, normal yetişkin, akciğer hastalığı olan yetişkin ve kistik

fibrozlu çocukta terdeki Cl⁻ konsantrasyonu dağılımı verilmektedir (DI SANT'AGNESE ve ark., 1984).



Şekil 1. Terdeki Cl⁻ konsantrasyonunun dağılımı: a) 1094 kistik fibrozlu olmayan çocuk; b) 355 normal yetişkin; c) 187 akciğer hastalığı olan yetişkin; d) 213 kistik fibrozlu çocuk.

d) Kistik fibrozlu kişilerin yaklaşık %2-5'inde karaciğer rahatsızlığı görülmektedir (SANTIS ve ark., 1990).

e) Kistik fibrozlu erkekler üretkenlik bakımından sterildir. Dişiler ise üretken olabilir (COHEN ve ark., 1980). Normalde testislerde üretilen sperm vas deferens tübünden prostat bezine geçer. Kistik fibrozlu erkeklerde vas deferens ya yoğun

mukus ile tıkanmıştır, ya da anormal olarak gelişmiştir. Kistik fibrozlu dişilerin vajinal ve servikal mukusları yoğun ve yapışkan olabilir. Bu sebeple hamile kalma şansları normal kişilere göre daha düşüktür (CUNNINGHAM, 1991).

Kistik fibroz ile ilgili hastalık belirtileri, ciddiyet dereceleri ve hastalığın tanı zamanı kişiden kişiye göre değişir. Kistik fibrozlu hastaların çoğunda tanı yaklaşık ilk üç yaş içinde konulur (CUNNINGHAM, 1991). Kistik fibroz olgularının %5-10'u meconium ileus ile doğmaktadır (COLLINS, 1992). Barsak tıkanmasının bir türü olan meconium ileuslu doğan bebeklerde tanı doğumdan birkaç saat sonra verilebilmektedir. Bazı kistik fibrozlu hastalarda ise tanı çocukluk veya ilk gençlik yıllarında konulmaktadır.

Kistik fibrozda temel arıza epitel hücrelerin apikal zarlarında Cl^- iyonunun karşılıklı taşınmasındaki azalma ile ilişkilidir (WELSH, 1990). Bu anormallik ter kanallarında emilim ile alt solunum yolu ve pankreatik kanallarda salgı işlemlerini etkiler.

Kistik fibroz hastalarında, ter bezlerinin β -adrenerjik ajanlara cevap vermemesi, sorunun hücre zarındaki cAMP ile düzenlenen Cl^- kanallarının işlevlerini yetersiz görmesi sebebiyle olduğuna işaret etmektedir (QUINTON, 1990). Bu buluşlara rağmen, kistik fibrozdan sorumlu genin klonlanıp dizi analizinin yapıldığı 1989 yılına kadar kusurlu protein bilinmiyordu (ROMMENS ve ark., 1989; RIORDAN ve ark., 1989; KEREM ve ark., 1989).

Kistik fibroz için özel bir tedavinin var olmaması sebebi ile bu öldürücü hastalığın doğum öncesi tanısı çok önemlidir. 1986'da kistik fibrozlu doğum yapma riski 1:4 olan 200 hamile kadında doğum öncesi çalışmalar yapılmıştır (BOUE ve ark., 1986). Bu yöntem, hamileliğin ikinci üç aylık döneminde amniyotik sıvıda γ -glutamil transpeptidaz, aminopeptidaz M ve alkalin fosfatazın total enzim ve izoenzimlerinin ölçülmesini kapsamaktadır. DNA'ya bağlı tanı yöntemlerinin

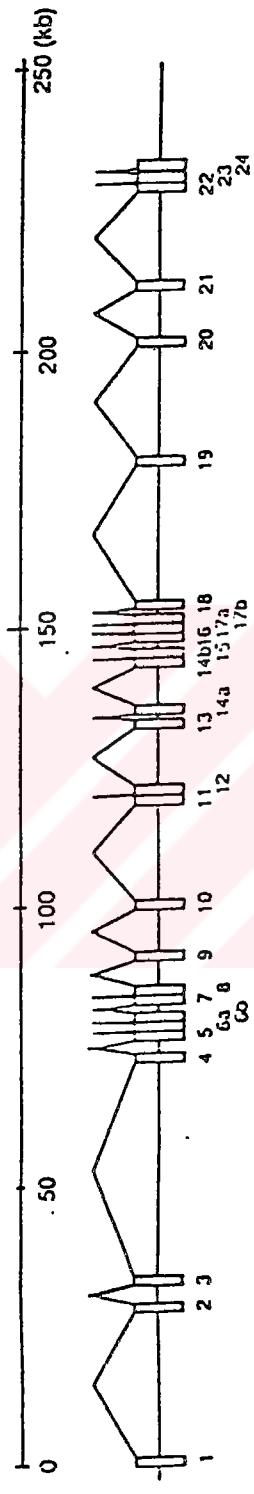
geliştirilmesi, daha kesin bir doğrulukla doğum öncesi tanı ve taşıyıcılık tespitinin yapılmasını mümkün kılmıştır (BARANOV ve ark., 1992).

Bugün, moleküler temele dayalı kistik fibroz tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili bazı çalışmalar vardır. Gen tedavisi, eksik proteinin yerine yenisinin yerleştirilmesi ve ilaç tedavisi olmak üzere bu çalışmalar üç kategoriye ayrılmaktadır (ROSENFELD ve ark., 1992). Son 10 yılı aşkın süredir devam eden tedavideki gelişmelere rağmen kistik fibrozlu kişilerin yaşama şansı 30 yaşından daha azdır (COLLINS, 1992).

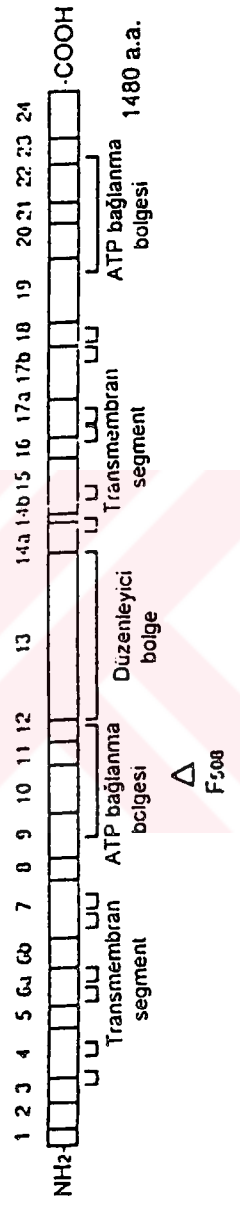
Kistik fibrozdan sorumlu olan gen 1989 yılında Lap Chee Tsui ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (ROMMENS ve ark., 1989; RIORDAN ve ark., 1989; KEREM ve ark., 1989). Bu gen, 7. kromozomun uzun kolunun q31-q32 bölgesinde lokalize olmuştur. 250 kilobaz uzunluğunda olan gen 27 ekson içerir ve 6.5 kilobazlık mRNA'yı şifreler (ZIELENSKI ve ark., 1991). Genin 5' ucundaki promotör bölgesi GC (guanin-sitozin) nükleotidleri açısından yüksek bir zenginlik gösterir. TATA kutusu veya CAAT kutusu yoktur (CHOU ve ark., 1991). Başlama kodonu 1. eksonun +72 pozisyonunda bulunmuştur. En küçük ekson, 38 baz çifti uzunluğundaki 14b eksonudur. En büyük ekson ise 724 baz çifti uzunluğundaki 13. eksondur. İntronların uzunluğu da çeşitlidir. Üçüncü intron 40 kilobaz ve 6a intronu 1.1 kilobaz uzunluğundadır (ZIELENSKI ve ark., 1991). Şekil 2'de kistik fibroz geninin şematik çizimi gösterilmektedir (ZIELENSKI ve ark., 1991).

Kistik fibroz geninin ürünü olan protein 1480 amino asit içerir ve bu genin 6.5 kilobazlık mRNA'sı tarafından kodlanır (RIORDAN ve ark., 1989; ROMMENS ve ark., 1989). Bu protein, kistik fibroz hücre zarından geçişi düzenleyen protein [cystic fibrosis transmembrane conductance regulatory (CFTR) protein] olarak adlandırılmaktadır (RIORDAN ve ark., 1989). Bu protein cAMP ve protein kinaz A'ya bağımlı olarak çalışan bir Cl⁻ kanalı görevi yapmakta olan plazma zarı proteindir (KOCH ve ark., 1993). Bu proteinin amino asitleri iki benzer motifte organize

a) Kistik fibroz geni

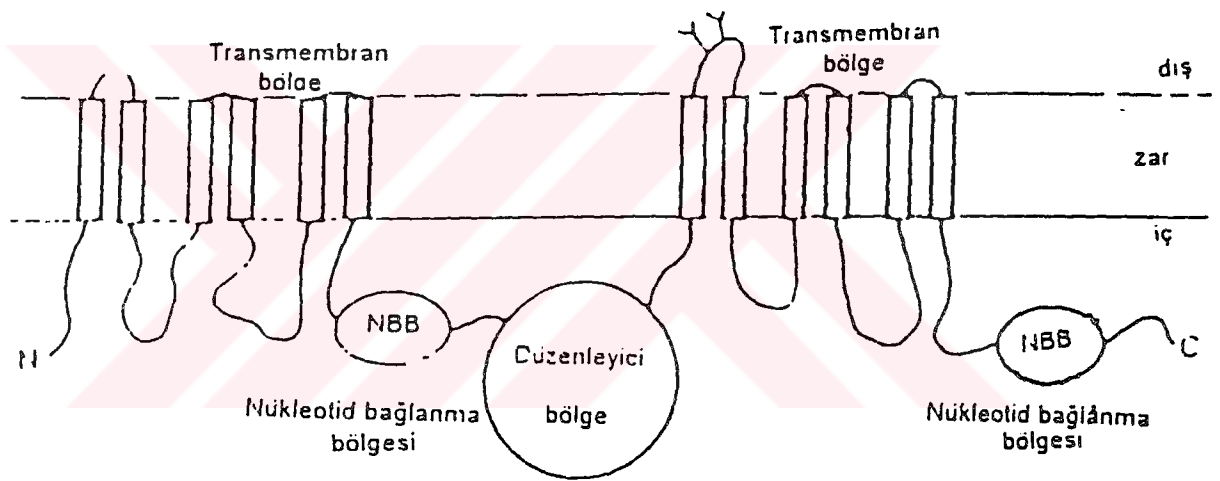


b) Kistik fibroz hücre zarından geçişi düzenleyen (CFTR) proteini



Şekil 2. Kistik fibroz geninin ekson/intron organizasyonunun şematik çizimi ve ürünü olan proteinin bölgesel yapısı

olmuştur. Her bir motif altı adet hidrofobik transmembran segment ve bir adet nükleotid bağlanma bölgesi; NBB (nucleotide binding fold; NBF) içermektedir. İki motif birbirinden düzenleyici bölge (regulatory domain, R domain) ile ayrılmaktadır. Bu bölge serin amino asidi açısından zengin, hidrofilik bir bölgedir ve protein kinaz A tarafından fosforlanır (HYDE ve ark., 1990; RIORDAN ve ark., 1993). İlk NBB 9, 10, 11 ve 12. eksonların nükleotid dizisi ile, ikinci NBB 20, 21 ve 22. eksonların nükleotid dizisi ile kodlanır (ZIELENSKI ve ark., 1991). Şekil 3'te kistik fibroz hücre zarından geçişi düzenleyen proteinin modeli verilmektedir (RIORDAN, 1993).



Şekil 3. Kistik fibroz hücre zarından geçişi düzenleyen (CFTR) protein modeli.

Kistik fibroz geninin 10. eksonunda 1652 ve 1655 nükleotidleri arasında üç baz çiftlik (-CTT) delesyondan kaynaklanan ve polipeptidin 508. pozisyonunda yer alan

fenilalanin eksikliği ile sonuçlanan $\Delta F508$ mutasyonu dünya çapında kistik fibroz mutasyonlarının yaklaşık %70'ini oluşturur (KEREM ve ark., 1989; LEMNA ve ark., 1990). Bu mutasyonun farklı coğrafik bölgelerde dağılımı %30 ile %88 arasında değişmektedir (CF GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM, 1990). Avrupa'da bu mutasyonun görülme sıklığı güneydoğudan kuzeybatıya doğru bir artış gösterir (EUROPEAN WORKING GROUP ON CF GENETICS, 1990). Şekil 4'te normal alel ve $\Delta F508$ alelinde nükleotid dizisi (KEREM ve ark., 1990) verilmektedir.

508. amino asid
(fenilalanin)

Normal	ACCATTAAGAAAATATCAT	<u>C</u> TTTGGTGTTC
$\Delta F508$	ACCATTAAGAAAATATCAT	TGGTGTTC

Şekil 4. Normal alel ve $\Delta F508$ alelinde nükleotid dizisi.

$\Delta F508$ için homozigot olan bir kişinin tipik olarak klinik özellikleri pankreatik yetersizlik, çocuklukta başlayan ve gittikçe ilerleyen solunum ile ilgili problemler ile hayatın 30'lu yıllarında meydana gelen ölümdür. Hastalığı daha hafif olarak yaşayan kistik fibrozlu hastaların ya ciddi bir mutasyonu içeren alel ile az şiddetli mutasyonu içeren aleli, ya da iki az şiddetli mutasyonu içeren aleli taşıdığı görülür (KEREM ve ark., 1989).

1677delTA, yine kistik fibroz geninin 10. eksonunda iki nükleotidlik (-TA) delesyondan kaynaklanan bir mutasyondur. Delesyonun bir sonucu olarak proteinin okuma çerçevesi kayar ve 515. pozisyonda bitiş kodonu (TAG) meydana gelir (IVASCHENKO ve ark., 1991). Bu mutasyonun dünya çapında görülme sıklığı azdır.

Karadeniz bölgesinde bulunan ülkelerde (Gürcistan, Türkiye, Rusya, Bulgaristan, Yunanistan) görülme sıklığı ise çok daha fazladır. 1677delTA mutasyonunun Türkiye için genel bir mutasyon olduğu bulunmuştur (ANGELICHEVA ve ark., 1994; ONAY, 1994). 1677delTA mutasyonu için homozigot olan kistik fibrozlu hastalar, yüksek ölüm sıklığı oranıyla ilişkili ciddi bir fenotip gösterir ve bu mutasyonun meconium ileus riskinin artmasına sebep olma ihtimali vardır. Bebek ölümleri bu mutasyonda sık görülmektedir. Sağ kalan 1677delTA homozigot hastalarda pankreas yetersizliği ve akciğer rahatsızlığı görülmektedir (SANTIS ve ark., 1990).

Bu çalışmada $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonları, Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) kullanıldığı heterodupleks oluşum analizi tekniği ile saptanmıştır (ROMMENS ve ark., 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu, nükleotid dizisi bilinen bölgenin, sentezlenmiş bir çift oligonükleotid (primer) kullanılarak çok sayıda kopyasının çıkartılması prensibine dayanır (SAIKI ve ark., 1988). Tekrarlanan döngüler halinde üç farklı sıcaklık derecesi uygulanır. Çift zincirli DNA'nın denatürasyonunun sağlanması için 95°C , oligonükleotidlerin DNA'ya bağlanması için 55°C ve ortamda bulunan Taq DNA Polimeraz enziminin reaksiyonu kataliz ederek hedef DNA bölgelerini sentezlemesi için 72°C sıcaklıkları kullanılır (GRAUL, 1989). PCR ürünleri standart elektroforetik tekniklerle kolaylıkla ayırtedilebilmekte ve ultraviyole (UV) ışık altında gözlenebilmektedir.

Heterodupleks oluşum analizi tekniği, $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonları için heterozigot olan bireylerin kistik fibroz geninin 10. eksonunda bu mutasyonların da bulunduğu bölgeyi içeren 98 baz çiftlik bir bölgenin PCR ile çoğaltılan ürünlerinin, normal bireylerin aynı bölge için çoğaltılan ürünlerinden %12'lik poliakrilamid jel elektroforezinde farklı bantlar göstermesi esasına dayanır (ROMMENS ve ark., 1990). Bu mutasyonlar için homozigot olan hastaların PCR ürünleri ile normal bireylerin PCR ürünleri eşit miktarda karıştırılır. Bu karışım kısa bir süre

denatürasyon ve kısa bir süre renatürasyona tabi tutularak heterodupleks oluşum analizi gerçekleştirilir.

Bu çalışma, Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda kistik fibroz şüphesi ile ter testi yaptıran ve test değeri 40 mEq/L ve üzeri bulunan bebekler ve çocuklar ile onların ailelerinde yapılmıştır.



II. MATERYAL VE METOD

II. 1. Kistik Fibroz Tanısında Terde Klor Tayini

Bu çalışmada, çeşitli hastanelerden ter testi yaptırılması amacı ile Düzen Laboratuvarlar Grubu'na gönderilen kistik fibroz şüphesi olan bebekler ve çocuklara ter testi yapıldı. Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda ter testi 'The National Committee of Clinical Laboratory Standards' tarafından standardize edilen, uygulanması kolay ve rahat olan hatasız, doğru ve güvenilir sonuç veren bir metodla yapıldı.

II. 1. 1. Terlemenin Uyarılması

İyontoforez ile pilokorpin iyonları lokal olarak ter bezlerine transfer edilerek optimum uyarı sağladılar. İyontoforezi sağlayan lastik bandaj sistemi çocuğun ön kolunun iç yüzüne sarıldı ve iyontoforez başlatıldı. 1.5 mA akım 25 saniye aralıklarla 5 dakika süre ile otomatik olarak verildi. Uygulama yerinde 2.5 cm çaplı pembeleşme oluşması iyontoforezin başarılı olduğunu gösterdi. Bu pembelik 2-3 saat içinde kayboldu.

II. 1. 2. Ter Numunesinin Toplanması

Bir kez kullanılıp atılabilir plastik bir alet olan macroduct ter toplama sistemi lastik bandaj ile pilokarpin iyontoforezi ile terlemenin sağlandığı bölgeye tatbik edildi. Oluşan ter, yüzeyi çok az miktarda suda eriyen mavi renkli bir boya ile kaplı spiral tüp içerisinde ilerledikçe, oluşan mavi renk sayesinde toplanan terin miktarı gözle görülür hale geldi. 50 µl ter toplanması, analizin yapılabilmesi için yeterli sayıldı.

II. 1. 3. Toplanan Ter Örneğinin Analizi

Toplanan ter örneği spiral tüp aracılığı ile direkt olarak ter kondüktivitesi analizatörüne transfer edildi. Ölçüm hacmi 10 µl idi. Terin elektriksel kondüktivitesi ölçüldü ve netice mEq klorür/L olarak verildi.

II. 2. EDTA'lı Kan Materyali

Ter testi değeri 40 mEq/L ve üzeri çıkan bebekler ile çocuklardan ve aile bireylerinden en az 5 ml'lik EDTA'lı kan materyali toplandı.

II. 2. 1. EDTA'lı Kan Materyalinin Saklanması

Herbir bireyden alınan EDTA'lı kan materyali, genomik DNA izolasyonu 2-3 gün içinde yapılacaksa 4°C'de saklandı. Genomik DNA izolasyonu daha geç bir süre içinde yapılacaksa kan materyalleri -20°C'de saklandı.

II. 2. 2. Genomik DNA İzolasyonu

En az 5 ml'lik kan materyalleri K₂EDTA içeren özel vakumlu tüplere alındı. 5 ml'lik kan materyalleri 15 ml soğuk eritrosit parçalama tamponu (Tablo 1) ile 50 ml'lik tüpler içerisinde iyice karıştırıldı ve 15 dakika 4°C'de bekletildi. Bu süre içinde eritrositlerin zarları parçalandı. Örnekler 4°C'de 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj (HERAEUS, HFA 13,50 rotor) edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve içinde lökositleri içeren çökelti 5 ml eritrosit parçalama tamponu ile iyice vortekslenerek (NUVE, NM110) yıkandı. Bu işlem sonrasında örnekler 4°C'de 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve lökositleri içeren çökelti 1.5 ml hücre çekirdeği parçalama tamponu (Tablo 1) eklenerek iyice vortekslendi. Vorteks sonrası tüplere 200 µl steril destile su, 15 µl proteinaz K (20 mg/ml), ve 25 µl %10 SDS (w/v) (Tablo 1) ilave edildi. Örnekler 56°C'lik etüvde (NUVE) 3 saat veya 37°C'lik etüvde (NUVE) bütün bir gece bekletilerek inkübe edildi. Inkübasyon sonrası karışıma 2.5 ml steril destile su ve 2.5 ml doymuş NaCl (5 M) eklenerek iyice karıştırıldı. Tüpler 25°C'de 10000 devir/dakikada 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her bir tüpteki üst sıvı yeni 50 ml'lik tüplere aktarıldı.

Proteinleri içeren çökelti ise atıldı. DNA'yı içeren üst sıvıya iki hacim absolü etanol eklenerek DNA'nın iplikçik halinde çökmesi sağlandı. Çöken DNA mikropipet ucu ile steril 1.5 ml'lik tüplere transfer edildi. Her bireyin DNA'sı tüplere transfer edilirken pipet uçları değiştirildi. Tüplerdeki alkolün uçması beklendikten sonra, DNA'lar 300 µl Tris-EDTA tamponunda (Tablo 1) çözdürüldü.

Tablo 1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.

İsim	İçerik	Final Konsantrasyon
Eritrosit Parçalama Tamponu	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₂ EDTA	0.1 mM
Hücre Çekirdeği Parçalama Tamponu	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	Na ₂ EDTA	2 mM
	NaCl	400 mM
%10 SDS	Sodyum Dodesil Sülfat	%0.14
Tris-EDTA Tamponu	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	Na ₂ EDTA	0.1 mM

II. 3. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Miktar Tayini

İzole edilen genomik DNA miktar tayinini kantitatif olarak spektrofotometrik ölçümlerle ve kalitatif olarak mini jel metodu ile yapıldı.

II. 3. 1. Spektrofotometrik Ölçüm

Tris-EDTA tamponu ile yapılan 1/150'lik sulandırmaların UV-spektrofotometresinde (PHARMACIA, ULTRASPEC III) 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu aşağıdaki formül (MANIATIS ve ark., 1982) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Sulandırım Oranı}$$

DNA molekülünün saflığı, 260 nm dalga boyunda okunan absorbands değerinin 280 nm dalga boyunda okunan absorbands değerine oranından ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) hesaplandı (SAMBROOK ve ark., 1989).

II. 3. 2. Mini Jel Metodu

DNA'nın kalitatif miktar tayini %1'lik agaroz (w/v) jelde yapıldı. 1 gr agaroz tartılıp 100 ml 0.5 X TBE tamponunda (Tablo 2) ısıtıcıli magnetik karıştırıcıda (IKAMAG, PCT) kaynatılarak iyice eritildi. Tampon sıcaklığının yaklaşık 50-55°C'ye kadar soğuması beklendi ve DNA'nın UV ışığı altında görülebilmesi için 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenerek elektroforez kasedine döküldü. 20-30 dakika sonra donan jel, içinde 0.5 X TBE bulunan elektroforez tankına (GIBCO BRL, HORIZON 58) alındı. DNA'ların kuyulara çökmesini sağlamak için her DNA örneğinin 1 µl'si 9 µl 1 X elektroforez yükleme tamponu (Tablo 2) ile karıştırılarak 10 µl olacak şekilde jel kuyularına yükleme yapıldı. Jel 150 V'ta 15 dakika koşturuldu. UV ışık altında (FOTODYNE, FOTO/PREP) DNA miktarı gözlemlendi ve kontrol DNA örneği ile karşılaştırılarak kalitatif olarak DNA miktarı belirlendi.

Tablo 2. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

İsim	İçerik	Final Konsantrasyon
TBE Tamponu (5 X)	Trizma baz	445 mM
	Borik asit	445 mM
	Na ₂ EDTA (pH 8.0)	10 mM
Elektroforez Yükleme Tamponu (10 X)	Bromofenol mavisi	2.5 mg/ml
	%10 SDS	%1
	Gliserol	%87

II. 4. PCR Tekniği Kullanılarak Heterodupleks Oluşum Analizi

20 Türk kistik fibroz (KF) ailesinden birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 KF kromozomuna polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak heterodupleks oluşum analizi yapıldı.

II. 4. 1. Primerler

Çalışma sırasında BIOMETRA (Germany)'da sentezlenen heterodupleks amplifikasyon primerleri (Tablo 3) kullanıldı. Bu kullanılan primerlerin stok konsantrasyonu 100 pmol/ μ l idi.

Tablo 3. Heterodupleks amplifikasyon primerleri.

İsim	Dizi (5'.....3')
Primer 57	5'- GTT GGC ATG CTT TGA TGA CGC TTC -3'
Primer 58	5'- GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG GCA C -3'

Şekil 5'te kistik fibroz geninin 10. eksonunda bulunan, primer 58 ve primer 57'nin sınırladığı, Δ F508 ve 1677delTA mutasyonlarını içeren 98 baz çiftlik bölge gösterilmektedir.

10. ekson

ACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGAAGCTGGAGCCTTCAGAGGGTAA

AATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTAG

Primer 58

CCTGGGCACATTAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATA

TAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAG

Primer 57

Şekil 5. Primer 58 ve primer 57'nin sınırladığı, KF geninin 10. eksonunda bulunan üç baz çiftlik delesyondan meydana gelen $\Delta F508$ ve iki baz çiftlik delesyondan meydana gelen 1677delTA mutasyonlarının bulunduğu bölge olan 98 baz çiftlik fragment.

II. 4. 2. Enzim

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında, termofilik bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen yaklaşık 75°C sıcaklık ve pH 9.0'da en yüksek aktiviteyi gösteren Taq DNA polimeraz enzimi (Boğaziçi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında üretilen enzim) kullanıldı.

II. 4. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo 3'de gösterilen primer çifti kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonları aşağıda belirtilen bileşenlerin sırasıyla 0.2 ml'lik tüplere eklenmesi ve tüplerin PERKIN-ELMER 9600 THERMAL CYCLER cihazına yerleştirilmesiyle gerçekleştirildi.

Sırasıyla tüplere eklenen bileşenler:

- 18.3µl steril bidestile su
- 2.5 µl Taq Polimeraz inkübasyon tamponu, 10 X. [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.0, 25°C'de), %1 Triton X-100]. Final konsantrasyonu 1X.
- 1.5 µl 25 mM MgCl₂. Final konsantrasyonu 1.5 mM.
- 0.2 µl dNTP karışımı (25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP). Final konsantrasyonu 200 mM.
- 0.1 µl primer 57 (25 pmol/ µl).
- 0.1 µl primer 58 (25 pmol/ µl).
- 0.3 µl Taq Polimeraz enzimi (5 U/ µl).
- 2 µl genomik DNA (50 ng).

Her polimeraz zincir reaksiyonunda ΔF508 ve 1677delTA mutasyonları için heterozigot oldukları bilinen DNA örnekleri ile bu mutasyonlar için normal oldukları bilinen DNA örnekleri kontrol olarak kullanıldı. Son 0.2 ml'lik tüpe DNA dışında tüm bileşenler eklendi. Böylece polimeraz zincir reaksiyonunda kontaminasyon olup olmadığı tespit edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu PERKIN-ELMER 9600 THERMAL CYCLER cihazında belirtilen programda (Tablo 4) gerçekleştirildi. Kontrol DNA örnekleri, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde doktora öğrencisi olan Tuncer Onay'dan temin edildi.

Tablo 4. Heterodupleks oluşum analizi için kullanılan PCR programı.

Meth# 102		
Prog #	Isı (°C)	Zaman
1	94	4'
6 (30 döngü)	94	15"
	60	1'
7	60	5'
4	15	sürekli

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri, analizleri yapılana kadar -20°C'de saklandı.

II. 4. 4. Agaroz Jel Elektroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri, %2'lik agaroz jel kullanılarak analiz edildi. 2 gr agaroz tartılıp, 100 ml 0.5 X TBE tamponu (Tablo 2) içinde ısıtıcılı magnetik

kariştiricida kaynatılarak iyice eritildi. Tamponun sıcaklığının yaklaşık 50-55°C'ye dūřmesi beklendi. DNA'nın UV ışık altında gözlenebilmesi için 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenerek elektroforez kasedine döküldü. Yaklaşık 30 dakika sonra donan jel, içinde 0.5 X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına alındı (GIBCO BRL, HORIZON 58). Final hacimde 1 X olacak şekilde elektroforez yükleme tamponu (Tablo 2) eklenen 5 µl polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri jele uygulandı. Aynı anda jele 1 µl markerVIII (Boehringer Mannheim, 250 mg/ml) (Tablo 5) yüklendi ve ürünlerin 98 baz çifti uzunluğunda olup olmadığı kontrol edildi.

Tablo 5. Marker VIII.(%2'lik agaroz jelde görülen bant uzunlukları).

1114	
900	
692	
501	Tek bir bant görülür
489	
404	
320	
242	
190	
147	
124	
110	
67	
37	Tek bir bant görülür
34 (2X)	
26	
19	

Elektroforez 150 V'ta 25 dakika yapıldı. UV ışık altında (FOTODYNE, FOTO/PREP) gözlenen polimeraz zincir reaksiyonu sonucu meydana gelen bantlar fotoğraflandı. Resimler FOTODYNE CAMERA ile 667 polaroid filmi üzerinde çekildi.

DNA içermeyen polimeraz zincir reaksiyonu ürününde bant varlığı görülmediği için reaksiyonda kontaminasyon olmadığı tespit edildi.

II. 5. Heterodupleks Oluşum Analizi

Polimeraz zincir reaksiyon ürünlerinin heterodupleks oluşum analizleri %12'lik poliakrilamid jel elektroforezinde (%12 PAGE) (Tablo 6) değerlendirildi.

Tablo 6. %12'lik PAGE hazırlanması.

İçerik	Miktar
%30 Stok Akrilamid (%28.5 Akrilamid, %1.5 bis-akrilamid)	4 ml
5 X TBE Tamponu	2 ml
Destile su	3.75 ml
%10 Amonyum Persülfat	0.25 ml
TEMED	6 µl

Final hacimde 1 X olacak şekilde elektroforez yükleme tamponu eklenen kistik fibrozlu çocukların anne ve babalarının DNA'larına ait 10 µl polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri %12'lik PAGE'e yüklendi ve 1 X TBE tamponunda 150 V'ta 100 dakika yürütüldü. 100 dakika sonra elektroforez durduruldu ve jel üzerindeki bantların UV ışık altında gözlenebilmesi için poliakrilamid jeli 100 ml 1 X TBE tamponunda 10 µl etidyum bromid (10 mg/ml) içeren bir kaptaki 20 dakika bekletildi. UV ışık altında gözlenen bantlar fotoğraflandı. Resimler FOTODYNE CAMERA ile 667 polaroid filmi üzerine çekildi. ΔF508 veya 1677delTA mutasyonu için homozigot olan kistik fibrozlu çocukların mutasyonlarının %12'lik PAGE'de tespit edilmesi için heterodupleks oluşum analizi yapıldı. Hasta ve normal kişilerin polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri toplam 10 µl olacak şekilde eşit miktarda karıştırıldı (5 µl hasta kişinin PCR ürünü + 5 µl normal kişinin PCR ürünü). Bu karışıma ait ürünler denatürasyon için 94°C'de 5 dakika ve renatürasyon (yeniden birleşme) için 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Normal ve mutant aleller arasındaki eşleşme sonucu oluşan heterodupleksler %12'lik PAGE ile analiz edildi.

III. BULGULAR

III. 1. Heterodupleks Oluşum Analizi ile $\Delta F508$ ve 1677delTA Mutasyonlarının Tespiti

En az bir hasta çocuğu olduğu bilinen ve Düzen Laboratuvarlar Grubu'na çeşitli illerden gelen 20 Türk kistik fibroz ailesi çalışma kapsamına alındı. Bu ailelerden 4'ünde anne ve baba arasında akrabalık ilişkisi vardı. Diğer 16 ailede ise anne ve baba arasında akrabalık ilişkisi bulunmuyordu. Aralarında akrabalık ilişkisi bulunan ailelerin kistik fibroz kromozomu tek, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ailelerin ise kistik fibroz kromozomu çift olarak hesaplandı. Toplam 20 kistik fibroz ailesinde birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 kistik fibroz kromozomu çalışma kapsamına alındı. $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonlarının bulunduğu 98 baz çifti uzunluğundaki bölge PCR ile çoğaltılarak heterodupleks oluşum analizi ile incelendi. Toplam 20 aileden altısında ebeveynlerden birisinin veya her ikisinin $\Delta F508$ ya da 1677delTA mutasyonunu taşıdığı tespit edildi. Tablo 7'de bu mutasyonları taşıyan ebeveynler ve akrabalık ilişkileri verilmiştir.

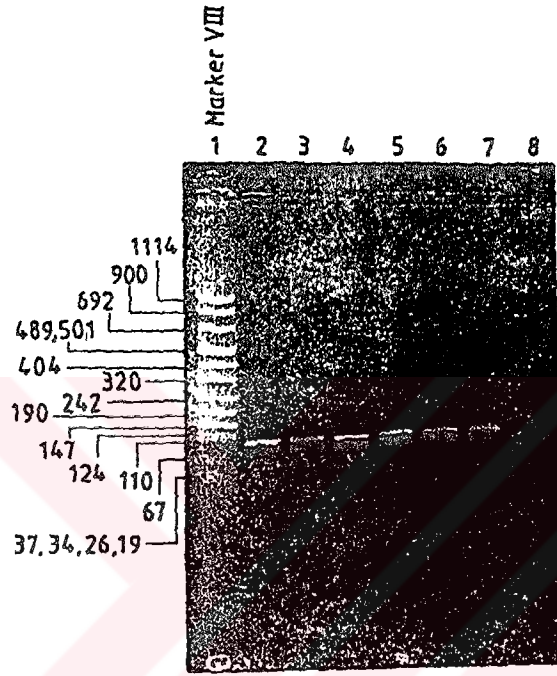
Şekil 6'da Normal/Normal; $\Delta F508$ /Normal; $\Delta F508$ / $\Delta F508$; 1677delTA/Normal; 1677delTA/? ve $\Delta F508$ /1677delTA genotiplerine sahip olan ve çalışma kapsamında yer alan çeşitli aile bireylerinden izole edilen DNA'ların, kistik fibroz geninin 10. eksonunda 98 baz çiftlik bölgeyi sınırlayan primer 58 ve primer 57 ile yapılan PCR çalışmaları sonucunda, %2'lik agaroz jelde, UV ışık altında görülen çoğaltılmış bantlar verilmiştir. DNA içermeyen PCR karışımının bant vermemesi PCR işleminde kontaminasyon olmadığını göstermektedir. %2'lik agaroz

jelde 98,96 ve 95 baz çifti uzunluğundaki bantları birbirinden ayırt etmek mümkün değildir. Bu sebeple, aile bireylerine ait PCR ürünleri heterodupleks oluşum analizi yapıldıktan sonra %12'lik PAGE'e yüklendi.

Tablo 7. 20 Türk kistik fibroz ailesinden $\Delta F508$ ya da 1677delTA mutasyonunu taşıyan ebeveynler ve birbiri ile olan akrabalık ilişkileri.

?: Bu çalışmada yer almayan kistik fibroz mutasyonu

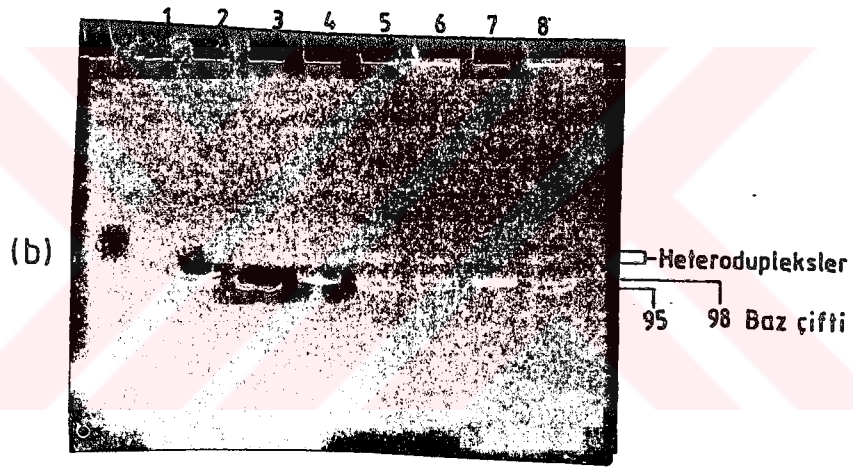
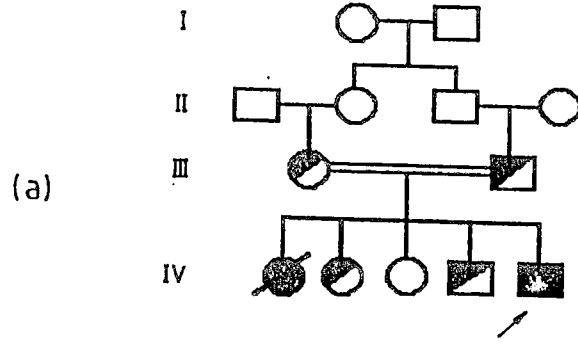
Aile numarası	Akrabalık ilişkisi	Ebeveynin mutasyonu
KF1	var	Anne : $\Delta F508$ Baba : $\Delta F508$
KF4	yok	Anne : $\Delta F508$ Baba : $\Delta F508$
KF6	yok	Anne : ? Baba : 1677delTA
KF11	yok	Anne : 1677delTA Baba : $\Delta F508$
KF18	yok	Anne : ? Baba : $\Delta F508$
KF19	yok	Anne : $\Delta F508$ Baba : ?



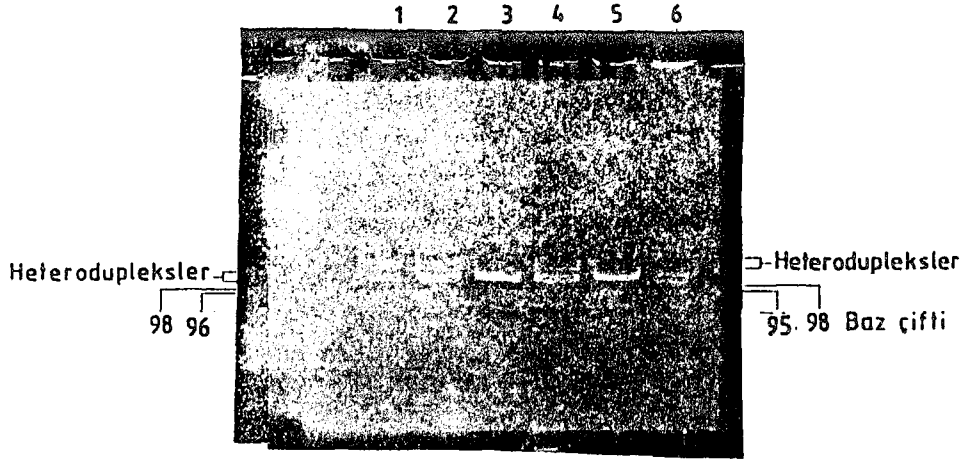
Şekil 6. Normal/Normal; Δ F508 /Normal; Δ F508 / Δ F508; 1677delTA/Normal; 1677delTA/? ve Δ F508 /1677delTA genotiplerine sahip bireylere ait DNA'ların primer 57 ve primer 58 ile çoğaltımı sonucu elde edilen PCR ürünlerini (2-7) ve DNA içermeyen PCR karışımını (8) gösteren %2'lik agaroz jeli.

Şekil 7'de KF1 ailesine ait soyağacı ve heterodupleks oluşum analizi ile $\Delta F508$ mutasyonunun varlığı gösterilmiştir. Birinci dereceden akraba olan anne ve babanın $\Delta F508$ mutasyonu taşıyıcısı ve hasta çocuğun bu mutasyon için homozigot olduğu bulundu. Hasta çocuğun PCR ürünü heterodupleks analizi yapılmadan %12'lik PAGE'e yüklendiği zaman tek bant varlığı görüldü. Tek bant görülmesinin sebebi, %12'lik PAGE'de , 95 baz çifti uzunluğundaki bantın(hasta çocuğun PCR ürünü) 98 baz çifti uzunluğundaki banttın (normal kontrol DNA'sına ait PCR ürünü) ayırt edilememesidir. Hasta çocuğun PCR ürünü ile normal kontrol DNA'sının PCR ürünü eşit volümde karıştırılıp heterodupleks analizi gerçekleştirilince %12'lik PAGE'de 4 bant varlığı görüldü ($\Delta F508$ mutasyonu için taşıyıcı olan bireylerde de heterodupleks yapıdan dolayı 4 bant varlığı görüldü). Hastanın bir kız ve bir erkek kardeşinin $\Delta F508$ mutasyonunu taşıdığı ve bir kızkardeşinin bu mutasyonu taşımadığı belirlendi.

KF6 ailesi 2 günlük kistik fibrozlu bir bebeğe sahipti. Daha önceden iki ölü bebekleri dünyaya gelmiş olan anne ve baba arasında akrabalık ilişkisi yoktu. Hasta bebek iki gün boyunca mekonyum yapamamıştı ve emme problemi vardı. Terde klorür testi 75 mEq/L olarak bulundu. Aile için yapılan heterodupleks oluşum analizi sonucu babanın 1677delTA mutasyonunu taşıdığı bulundu Hastanın annesi ise 1677delTA ve $\Delta F508$ mutasyonlarını taşımıyordu. Hastanın babadan 1677delTA mutasyonuna sahip aleli aldığı tespit edildi. Büyük bir olasılık ile anneden bu çalışma kapsamı dışında yer alan kistik fibroz mutasyonununun (?) alan bebeğin heterodupleks oluşum analizi sonucu 1677delTA mutasyonunu taşıdığı görüldü. Şekil 8'de KF6 ailesinin heterodupleks oluşum analizi verilmiştir.

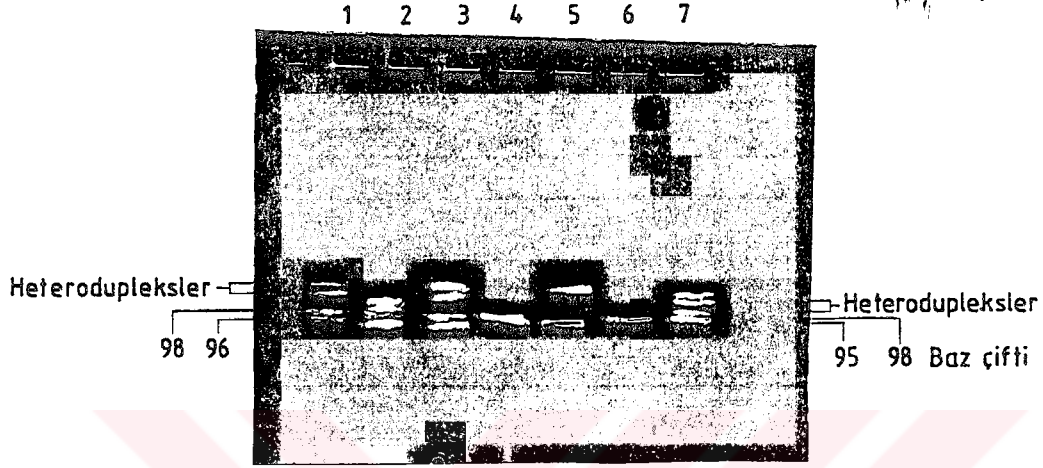


Şekil 7. a) KF1 ailesine it soy ağacı. b) $\Delta F508$ mutasyonunun heterodupleks oluşum analizi ile tespiti (PCR ürünleri %12'lik PAGE'de 150 V'ta 100 dakika analiz edildi). 1: Anne; 2: Baba; 3: Hasta (heterodupleks analizi yapılmamış PCR ürünü); 4: Normal/Normal kontrol DNA, 5: $\Delta F508$ taşıyıcısı kız kardeş; 6: $\Delta F508$ mutasyonu taşıyıcısı erkek kardeş; 7: $\Delta F508$ taşıyıcısı olmayan kız kardeş; 8: Hasta+Normal kontrol DNA



Şekil 8. KF6 ailesinin heterodupleks oluşum analizi.
1:1677delTA/Normal kontrol DNA; 2: Baba; 3: Anne; 4: Hasta; 5: Normal/Normal kontrol DNA ; 6: Δ F508 /Normal kontrol DNA

KF11 ailesinde, aralarında akrabalık ilişkisi olmayan anne ve babanın 6 yaşında kistik fibrozlu ve 9 yaşında sağlıklı iki kız çocuğu vardı. Solunum ve sindirim sistemlerinde rahatsızlığı olan hasta çocuğun terde klorür testi >100 mEq/L olarak belirlendi. Aile için yapılan heterodupleks oluşum analizi sonucu annenin 1677delTA mutasyonunu ve babanın Δ F508 mutasyonunu taşıdığı bulundu. Hastanın anne ve babadan mutasyon taşıyan alelleri aldığı, sağlıklı kız kardeşin ise bu mutasyonları taşımadığı tespit edildi. Şekil 9'da ailenin heterodupleks oluşum analizi verilmiştir.



Şekil 9. KF11 ailesinin heterodupleks oluşum analizi. 1: $\Delta F508$ /Normal kontrol DNA.; 2: Anne; 3: Baba; 4: Sağlıklı kızkardeş; 5: Hasta; 6: Normal/Normal kontrol DNA; 7: 1677delTA/Normal kontrol DNA.

III. 2. Türk Kistik Fibroz Ailelerinde $\Delta F508$ ve 1677delTA Mutasyonlarının Frekansı

Bu çalışma kapsamında yer alan 20 Türk kistik fibroz ailesinden, birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 6 kistik fibroz kromozomunda $\Delta F508$ mutasyonu tespit edildi. $\Delta F508$ mutasyonunun frekansının %16.6 (6/36) olduğu tespit edildi. 20 Türk kistik fibroz ailesinden, birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 2 kistik

fibroz kromozomunda 1677delTA mutasyonu tespit edildi. 1677delTA mutasyonunun frekansının %5.5 (2/36) olduğu tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. 20 Türk kistik fibroz ailesinin heterodupleks oluşum analizi.
n: Bu çalışmada yer alan ve birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan kistik fibroz kromozom sayısı.

Mutasyon	20 Türk kistik fibroz ailesi n = 36	Metod
$\Delta F508$	6/36 (%16.6)	Heterodupleks oluşum analizi
1677delTA	2/36 (%5.5)	Heterodupleks oluşum analizi

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kistik fibroz, dış salgı bezlerinde klor iyonu taşınımını düzenleyen 'kistik fibroz zar geçişini düzenleyen (CFTR) protein'i kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Tüm popülasyonu kapsayan mutasyon frekansı hakkında bilgi sahibi olmak, henüz etkili bir tedavisi olmayan bu hastalığın önlenmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Türk popülasyonunda ne yaygın kistik fibroz mutasyonları, ne de genetik bozukluğun frekansı net olarak bilinmemektedir. Bugüne kadar ülke çapında, kistik fibrozdan etkilenen ancak birkaç yüz aile rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Türk kistik fibroz ailelerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak heterodupleks oluşum analizi ile $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonlarının tespiti yapıldı. Heterodupleks oluşum analizi $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonlarının tespitinde kolay ve basit bir metoddur (ROMMENS ve ark., 1990).

Kistik fibroz geninin 10. eksonunda, çoğaltılan 98 baz çiftlik bölgede, $\Delta F508$ veya 1677delTA mutasyonları için heterozigot olan bireylerin PCR ürünlerine %12'lik PAGE'de bakılınca 4 bant varlığı görüldü. Bu 4 bantın birbirine olan uzaklığı $\Delta F508$ ve 1677delTA mutasyonlarında farklı olduğu için bu iki mutasyon birbirinden kolaylıkla ayırt edildi. Çoğaltılan 98 baz çiftlik bölgede 3 baz çiftlik ($\Delta F508$) veya 2 baz çiftlik (1677delTA) delesyonu homozigot olarak taşıyan kistik fibrozlu bir kişinin polimeraz zincir reaksiyonuna ait bantı ile bu bölgede herhangi bir delesyon taşımayan normal bir kişinin polimeraz zincir reaksiyonuna ait bantı arasındaki 2 baz çiftlik veya 3 baz çiftlik fark %12'lik PAGE'de net olarak belli olmamaktadır. Bunların arasındaki farkı ortaya koymak için heterodupleks oluşum analizi yapıldı. Homozigot bireye ait PCR ürünü ile normal bireye ait PCR ürünü eşit hacimde karıştırıldı. Bu

karışıma ait ürünler kısa bir süre denatürasyon ve kısa bir süre renatürasyon (yeniden birleşme) işlemine tabi tutularak heterodupleksler oluşturuldu. Normal ve mutant alellerin oluşturduğu heterodupleksler %12'lik PAGE ile analiz edildi.

Türkiye'de kistik fibroz geninde en sık rastlanan $\Delta F508$ mutasyonu, CFTR proteininin birinci nükleotid bağlanma bölgesinde (NBF1) 508. pozisyonda yer alan fenilalanin amino asidinin delesyonuna yol açan, genin 10. eksonundaki 1652 ve 1655. nükleotidleri arasındaki 3 baz çiftlik (-CTT) delesyondan kaynaklanmaktadır (KEREM ve ark., 1989). Bu araştırmada, 20 Türk kistik fibroz ailesinde birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 kistik fibroz kromozomu üzerindeki çalışmalar, bu mutasyonun frekansının %16.6 olduğunu gösterdi. Diğer çalışmalarda Türk popülasyonunda $\Delta F508$ mutasyonunun frekansı ortalama %30 (ÖZGÜÇ, 1994); %15 (ONAY, 1994); ve %15.5 (AKARSUBAŞI, 1995) olarak rapor edilmiştir. Frekans yüzdelerindeki farkın sebebi ya bölgesel farklılıklar ya da çalışmalarda az sayıda hastanın taranmasından kaynaklanmış olabilir.

Rapor edilen birkaç çalışma farklı popülasyonlarda $\Delta F508$ mutasyonunun dağılımındaki önemli farkı göstermektedir. Bu mutasyonun frekansı Danimarka'lılarda %87 (SHCWARDS ve ark., 1990); İngiliz'lerde %75-80 (MCINTOSH ve ark., 1990; SANTIS ve ark., 1990; SCHWARZ ve ark., 1990; WATSON ve ark., 1990); Kuzey Amerika'lılarda %75 (KEREM ve ark., 1989; LEMNA ve ark., 1990); İspanyol'larda %50 (ESTIVILL ve ark., 1989); İtalyan'larda %45-55 (CREMONESI ve ark., 1990; NOVELLI ve ark., 1990); Eskenazi Yahudi'lerinde %30 (LEMNA ve ark., 1990) ve Almanya'daki Türk'lerde %27 (HUNDERIESER ve ark., 1990) olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki bulgu, $\Delta F508$ mutasyonunun frekansının dağılımının kuzeybatıdan güneydoğuya doğru azaldığı hipotezini desteklemektedir. Bu mutasyon en çok Danimarka'da ve en az Türkiye'de görülmektedir.

1677delTA, klinik olarak ağır bir fenotip gösteren, genin 10. eksonunda 1677. pozisyonda 2 nükleotidlik (-TA) delesyondan kaynaklanan ve çerçeve kaymasına sebep olarak proteinin 515. pozisyonunda sonlanma kodonu (TAG) oluşumuna yol açan bir mutasyondur (IVASCHEKO ve ark., 1991). Bu mutasyon ilk olarak Ivaschenko ve arkadaşları tarafından birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 3 Gürcü ailesinde bulunmuştur. Karadeniz bölgesine özgü bu mutasyonun frekansı Gürcistan üzerinden Türkiye, Bulgaristan ve Kıbrıs'a doğru yavaşça azalmaktadır (ANGELICHEVA ve ark., 1994)

Bu çalışmada 20 Türk kistik fibroz ailesinden birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 kistik fibroz kromozomunda 1677delTA mutasyonu frekansının %5.5 olduğu bulundu. Türkiye ile ilgili daha önceki çalışmalarda kistik fibroz kromozomlarında 1677delTA mutasyonu frekansı %7.2 (ANGELICHEVA ve ark., 1994); %5.5 (ONAY, 1994); ve %4.5 (AKARSUBAŞI, 1995) olarak rapor edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında yer alan ve Türkiye'de en sık rastlanan $\Delta F508$ veya 1677delTA mutasyonlarına sahip kistik fibroz olgularının aile bireylerinde taşıyıcılık tanısı ve gerektiğinde doğum öncesi tanısı verilmesi mümkündür.

V. ÖZET

TÜRK KİSTİK FİBROZ AİLELERİNDE Δ F508 VE 1677delTA MUTASYONLARININ TARANMASI

Düzen Laboratuvarlar Grubu'na gelen 20 Türk kistik fibroz ailesinin birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 36 kistik fibroz kromozomu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak heterodupleks oluşum analizi ile incelendi. Hastalığa neden olan mutasyonların, olguların %16.6'sında Δ F508 ve %5.5'inde 1677delTA olduğu tespit edildi.

Bu çalışma kapsamında, heterodupleks oluşum analizi ile gerektiğinde 3 Türk kistik fibroz ailesine %100 kesinlikle ve 3 Türk kistik fibroz ailesine %100 kesinlikle fakat olguların %50'sinde doğum öncesi tanı verilebileceği belirlendi.

SUMMARY

THE SCREENING OF Δ F508 AND 1677delTA MUTATIONS IN TURKISH CYSTIC FIBROSIS FAMILIES.

Heteroduplex Formation Analysis of 36 unrelated cystic fibrosis chromosomes of 20 Turkish cystic fibrosis families who came to Düzen Laboratories Group revealed the presence of Δ F508 and 1677delTA mutations in 16.6 and 5.5 percent of cases respectively by using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

Our results indicated that in 3 CF families examined in this study upon request, prenatal diagnosis can be offered with 100% accuracy. In other 3 families, since only one CF allele was known prenatal diagnosis could only be offered in 50% cases by exclusion analysis.

VI. KAYNAKLAR

- AKARSUBAŞI, A. T. (1995): Analysis of Turkish Cystic Fibrosis Chromosomes. M. S. Thesis, Boğaziçi University.
- ANDERSON, D. H., (1938): Cystic Fibrosis of the Pancreas and Its Relation to Celiac Disease. A Clinical and Pathological Study, 56, 344-399.
- ANGELICHEVA, D., BOTEVA, K., JORDONOVA, A., KALAYDJIEVA, L., KUFARDJIEVA, A., TELATAR, M., AKARSUBAŞI, A. T., TOLUN, A., KÖPRÜBAŞI, F., AYDOĞDU, S., DEMİRKÖK, M., KURDOĞLU, G., DELTAS, C. D., GEORGION, C., IVANCHENKO, T., BARANOV, V., DEAN, M. (1994): Cystic Fibrosis Patients from the Black Sea Region: The 1677delTA Mutation. Human Mutation, 3, 353-357.
- BARANOV, V. S., GORBUNOVA, V. N., IVANCHENKO, T. E., SHWED, N. Y., OSINOVSKAYA, N. S., KASCHEEVA, T. K., LEBEDEV, MIKHAILOV, A. V., VAKHARLOVSKY, V. G., KUZNETZOVA, T. V. (1992): Five Year's Experience of Prenatal Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Former U.S.S.R. Prenatal Diagnosis, 12, 575-586.
- BOUE, A., MULLER, F., NEZELOF, C., OURY, J. F., DUCHATEL, F., DUMEZ, Y., AUBRY, M. C. AND BOUE, J. (1986): Prenatal Diagnosis in 200 Pregnancies with a 1-in-4 risk of Cystic Fibrosis. Human Genetics, 74, 288-297.

- CHOU, J. L., ROZMAHEL, R., TSUI, L.-C., (1991): Characterization of the Promoter Region of the CFTR Gene. *J. Biol. Chem.*, 266, 24471-24476.
- COHEN, L. F., DI SANT'AGNESE, P. A., FRIEDLANDER, J. (1980): Cystic Fibrosis and Pregnancy. A National Survey. *Lancet*, 2, 842.
- COLLINS, F. S. (1992): Cystic fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications. *Science*, 256, 774-779.
- CREMONESI, L., RUOCCO, L., SEIA, M., RUSSO, S., GIUNTA, A., RONCHETTO, P., FENU, L. (1990): Frequency of the $\Delta F508$ Mutation in a Sample of 175 Italian CF Patients. *Human Genetics*, 85, 400-402.
- CUNNINGHAM, J. C. (1991): An Introduction to Cystic Fibrosis for patients and Families. Fort Worth Cystic Fibrosis Center, Texas.
- DEAN, M., WILL, K., STUHRMANN, M., SCHMIDTKE, J. (1993): Alternative Splicing in the First Nucleotide Binding Fold of CFTR. *Human Molecular Genetics*, 2, 231-235.
- DI SANT'AGNESE, P. A. AND DAVIS, P. B. (1976): Research in Cystic Fibrosis. *New Eng. J. Med.*, 295, 481-485.
- ESTIVILL, X., CHILLON, M., CASALS, T., BOSCH, A., MORRAL, N., NUNES, V., GASPARINI, P. (1989): $\Delta F508$ Gene Deletion in CF in Southern Europe. *Lancet*, 2, 1404.

- GRAUL, A. I. (1989): Automated Gene Amplification Based on PCR Technique. *Drug News and Perspectives*, 2(2), 94-98.
- HUNDERIESER, J., BREMER, S., PEINEMANN, F., STUHRMANN, M., HOFFKNECHT, N., WULF, B., SCHMIDTKE, J. (1990): Frequency of the $\Delta F508$ Deletion in the CFTR Gene in Turkish CF Families. *Human Genetics*, 85, 409-410.
- HYDE, S. C., EMSLEY, P., HARTSHORN, M. J. (1990): Structural Model of ATP-binding Protein Associated with CF, Multidrug Resistance on Bacterial Transport. *Nature*, 346, 362.
- IVASCHENKO, T. E., WHITE, M. B., DEAN, M. AND BARANOV, V. S. (1991): A Deletion of Two Nucleotides in Exon 10 of the CFTR Gene in a Soviet Family with Cystic Fibrosis Causing Early Infant Death. *Genomics*, 10, 298-299.
- KEREM, B., ROMMENS, J. M., BUCHANAN, J. A., MARKIEWICZ, D., COX, T. K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M. AND TSUI, L.-C. (1989): Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*, 245, 1073-1080.
- KEREM, B., ZIELENSKI, J., MARKIEWICZ, D., BOZON, D., GAZIT, E., YAHAV, J., KENEDY, D., RIORDANI, J. R., COLLINS, F. S., ROMMENS, J. M., TSUI, L. C. (1990): Identification of Mutations in Regions Corresponding to the Two Putative Nucleotide (ATP)-Binding Folds of the CF Gene. *Med. Sciences*, 87,8447-8451.

- KOCH, C., HOIBY, N. (1993): Pathogenesis of Cystic Fibrosis. *Lancet*, 314, 1065-1069.
- LEMNA, W. K., FELDMAN, G. L., KEREM, B., FERNBACH, S. D., ZEVKOVICH, E. P., O'BRIEN, W. E., RIORDAN, J. R., COLLINS, F. S., TSUI, L.-C. AND BEAUDET, A. L. (1990): Mutation Analysis for Heterozygote Detection and the Prenatal Diagnosis of Cystic Fibrosis. *New Eng. J. Med.*, 322, 291-296.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1982): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- MCINTOSH, I., CURTIS, A., LORENZO, M L., KESTON, M., GILFILLAN, A. J., MORRIS, G., BROCK, D. J. H., (1990): The Haplotype Distribution of the $\Delta F508$ Mutation in CF Families in Scotland. *Human Genetics*, 85, 419-420.
- MCINTOSH, I., CUTTING, G. R. (1992): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and the Etiology and Pathogenesis of Cystic Fibrosis. *FASEB*, 6, 2775-2782.
- NOVELLI, G., GASPARINI, P., SAVOIA, A., PIGNATTI, P. F., SANGUIOLO, F., DAZLAPICCOLA (1990): Polymorphic DNA Haplotypes and $\Delta F508$ Deletion in 212 Italian CF Families. *Human Genetics*, 85, 420-421.
- ONAY, T. (1994): Studies on the Screening of Cystic Fibrosis Mutations in Turkish CF Families. M.S. Thesis, Bogazici Universitesi.

QUINTON, P. M. (1990): Cystic Fibrosis: A Disease in Electrolyte Transport. *FASEB J.*, 4, 2709-2717.

RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J. L., DRUMM, M. L., IANNUZZI, M. C., COLLINS, F. S. AND TSUI, L.-C. (1989): Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, 245, 1066-1073.

RIORDAN, J. R. (1993): The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Annual Rev. Physiol.*, 55, 609-630.

ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B., DRUMM, M. L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J. L., KENNEDY, D., HIDAKA, N., ZSIGA, M., BUCHWALD, M., RIORDAN, J. R., TSUI, L.-C. AND COLLINS, F. S. (1989): Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science*, 245, 1059-1065.

ROMMENS, J., KEREM, B., GREER, W. (1990): Nonradioactive Detection of the Major CF Mutation. *An. J. Hum. Genet.*, 46, 395.

ROSENFELD, M. A., YOSHIMURA, K., TRAPNELL, B. C., YONEYAMA, K., ROSENTHAL, E. R., DALEMANS, W., FUKAYAMA, M., BARGON, J., STIER, L. E., STRATFORD-PERRICAUDET, L., PERRICAUDET, M., GUGGINO, W. B., PAVIRANI, A., LECOCQ, J.-P. AND CRYSTAL, R. G. (1992): In vivo

Transfer of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene to the Airway Epithelium. *Cell*, 68, 143-155.

ROSENSTEIN, B. J. (1987): *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 15th. ed., 255-259.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, S. J., ERLICH, H. A. (1988): Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-491.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Appendixes. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Book 3, Second Edition*, 0-87969-309-6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., A. 10, E.5.

SANTIS, G., OSBORNE, L., KNIGHT, R. A., HUDSON, M. E. (1990): Independent Genetic Determinants of Pancreatic and Pulmonary Status in Cystic Fibrosis. *Lancet*, 336, 1081-1084.

SANTIS, G., OSBORNE, L., KNIGHT, R. A., RAMSAY, M., WILLIAMSON, R., HUDSON, M. E. (1990): CF Haplotype Association and the $\Delta F508$ Mutation in Adult British CF Patients. *Human Genetics*, 85, 424-425.

SCHWARDS, M., JOHANSEN, H. K., KOCH, C., BRANDT, N. J. (1990): Frequency of the $\Delta F508$ Mutation on the CF Chromosomes in Denmark. *Human Genetics*, 85, 427-428.

- SCHWARZ, M. J., SUPER, M., WALLIS, C., BEIGHTON, P., NEWTON, C., HEPTINSTALL, L. E., SUMMER, C. (1990): $\Delta F508$ Testing of the DNA Bank of the Royal Manchester Children's Hospital. *Human Genetics*, 85, 428-430.
- THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM (1990): Worldwide Survey of the $\Delta F508$ Mutation: Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am. J. Human Genetics*, 47, 354-359.
- TSUI, L.-C. (1992): The Spectrum of Cystic Fibrosis Mutations. *TIG*, 8(11), 392-398.
- WATSON, E. K., MAYALL, E. S., SIMOVA, L., THOMPSON, E. M., WARNER, J. O., WILLAMSON, R., WILLIAMS, C. (1990): The Incidence of $\Delta F508$ CF Mutation and Associated Haplotypes in a Sample of English CF Families. *Human Genetics*, 85, 435-436.
- WELSH, M. J. (1990): Abnormal Regulation of Ion Channels in CF Epithelia. *FASEB*, 4, 2718-2725.
- ZIELENSKI, J., ROZMAHEL, R., BOZON, D., KEREM, B., GRZELCZAK, RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M. AND TSUI, L.-C. (1991): Genomic DNA Sequence of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *Genomics*, 10, 229-235.

VII. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Ankara'da doğdum. 1984 yılında Sarıyer Orta Okulu'ndan mezun oldum. Lise öğrenimimi 1987 yılında Sarıyer Vehbi Koç Vakfı Lisesi'nde tamamladım. 1987 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1991 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Moleküler Biyoloji- Genetik Yüksek Lisans Programına girmeye hak kazandım. 1 Şubat 1992 tarihinde İstanbul Düzen Laboratuvarı'nda biyolog olarak çalışmaya başladım. Halen Düzen Laboratuvarı'nda biyolog olarak çalışmaktayım.

7-9 Eylül 1992 tarihleri arasında Haydarpaşa/İstanbul'da Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin düzenlediği 'Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tıptaki Uygulamaları' başlıklı kursa katıldım. Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Düzen Laboratuvarlar Grubu arasındaki TTGV-086 nolu ortak proje kapsamında 7 Mayıs 1994 tarihinden itibaren Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde moleküler genetik çalışmalara katılmaktayım.