

59660

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE KİSTİK FİBROZİS
ΔF508 MUTASYONUNUN
MOLEKÜLER DÜZEYDE SAPTANMASI

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof.Güneş T. YÜREGİR

Dr. Tamer C. İnal
UZMANLIK TEZİ
ADANA/1997

Kistik fibroz hastalığı, Avrupa ve Amerika'da en sık görülen genetik hastalıklardan birisidir. Hastalığa neden olan mutasyon tipleri ve özellikleri çok iyi tanımlanmıştır. Ancak ülkemizde, hastalığın moleküler düzeydeki çalışmaları hakkında veriler son derece sınırlıdır. Kistik fibroz hastalığının en sık görülme nedeni olan $\Delta F508$ mutasyonunun ülkemizdeki sıklığını araştırarak, bu alandaki çalışmalara katkıda bulunduğumuz inancındayım. Ayrıca, bölümümüzde kurulmuş olan moleküler genetik laboratuvarında kalıtsal kan hastalıkları üzerine yapılan son derece başarılı çalışmalara yeni bir kapı açarak metabolizma hastalıkları genetiğine bir giriş yapmış olduğumuzu ümit ediyorum.

Çalışmalarım süresince, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve bilimsel düşüncüyü aşılayan tez danışmanım ve sevgili hocam Prof. Güneş T. Yüregir'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim süresince katkılarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tez çalışması sırasında, ortak çalışmanın en güzel örneklerini sergileyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Metabolizma Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Güler Özer hocama, öğretim üyesi Doç.Dr. Bilgin Yüksel'e, tez çalışmamı TF 94.E.51 ve TF 95.21 no'lu projeler ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğüne ve Araştırma Fonuna da ayrıca teşekkür ederim.

Dr. Tamer C. İnal

Adana/1997

İÇİNDEKİLER

I. Giriş ve Amaç.....	1
II. Genel Bilgiler	4
1.Tarihçe	4
2.Kistik Fibrozun Klinik Tablosu	6
2.1.Genel Bulgular	6
2.2.Solunum Sistemi	7
2.3.Gastrointestinal Sistem	7
2.4.Karaciğer	8
2.5.Endokrin Pankreas.....	8
2.6.Genitoüriner Sistem	8
2.7.Ter Bezleri	9
3.Genetik Özellikler.....	9
3.1.Genin izolasyonu ve yapısı	9
3.2.CFTR'in yapısı	11
3.3.Mutasyonlar.....	14
3.3.1. $\Delta F508$ mutasyonu	14
3.3.2. Diğer mutasyonlar	16
4.CFTR'in Görevi.....	21
5.CFTR Fonksiyon Bozukluğunun Moleküler Mekanizması	26
6.Genotip-Fenotip İlişkisi.....	29
7.Tarama Çalışmaları	32
III. Gereç ve Yöntemler	35
1. Araç ve Gereçler	35
1.1. Cihazlar.....	35
1.2. Kimyasal Maddeler.....	36
2. Örnek Toplama.....	37

3. Analiz Yöntemleri	37
3.1. Coulter Sayımı	37
3.2. Tam Kandan DNA Eldesi	38
3.3. PCR İle Gen Amplifikasyonu	42
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
3.3.2. 10 x PCR Tamponu	42
3.3.3. Primerler	44
3.3.4. Spermine + BSA	44
3.3.5. Reversed dNTP	44
3.3.6. Amplifikasyon Koşulları	44
3.3.7. PCR Programı	45
3.4. Elektroforez ve Yorumlama	46
3.4.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	46
3.4.2. Heteroduplex Oluşumu	48
3.5. Ter Testi	50
IV. Bulgular	51
V. Tartışma	61
VI.Sonuç	70
VII.Özet	71
VIII. Summary	72
IX.Kaynaklar	73

ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

Şekiller	Sayfa	Tablolar	Sayfa
Şekil 1	10	Tablo 1	44
Şekil 2	11	Tablo 2	45
Şekil 3	12	Tablo 3	47
Şekil 4	14	Tablo 4	51
Şekil 5	15	Tablo 5	52
Şekil 6	17	Tablo 6	52
Şekil 7	19	Tablo 7	53
Şekil 8	20	Tablo 8	54
Şekil 9	21	Tablo 9	55
Şekil 10	22	Tablo 10	60
Şekil 11	24	Tablo 11	62
Şekil 12	26	Tablo 12	65
Şekil 13	43		
Şekil 14	49		
Şekil 15	56		
Şekil 16	57		
Şekil 17	58		
Şekil 18	59		

GİRİŞ VE AMAÇ

Kistik Fibroz, primer olarak solunum yollarının kronik obstrüksiyonu ve sindirim bozukluğu ile karakterize, çocuk ve genç erişkinlerin multisistem kalıtsal bir hastalığıdır(73). Salgı yapan epitelin koyu kıvamlı salgı özelliğine atfen "Mukovizidozis" ve pankreatik kanalların bu salgı ile tıkanmasını takiben oluşan kistik yapılara bağlı olarak da "Pankreasın Fibrokistik Hastalığı" olarak da isimlendirilmiştir(98,106).

Ayrı bir hastalık tablosu olarak ilk detaylı klinik tanımlamasının 1938 yılında yapılmış olması ve hemen bunu takiben otozomal resesif kalıtım özelliğinin gösterilmiş olmasına rağmen hastalığın etyopatogenezinin büyük ölçüde aydınlatılması için yaklaşık yarım yüzyıl geçmiştir(80).

Moleküler genetik yöntemlerinin tıp alanında yaygın bir şekilde uygulamaya sokulması ile birçok hastalığın etyolojisi artık bir sır olmaktan çıkmıştır. Kistik Fibroz, Huntington Koresi, Duchenne tipi Kas Distrofisi, Nörofibromatozis ve Retinablastoma gibi uzun yıllardır bilinen fakat etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış hastalıklarda, genlerin klonlanması ve mutasyonların tanımlanması, bu tür hastalıkların daha iyi anlaşılmasında yeni ufuklar açılmasına olanak sağlamıştır(27).

Kistik Fibroz'un beyaz ırkda görülen en sık tek gen hastalığı olması ve erken dönemde fatal olarak seyretmesi hastalığa olan ilgiyi artırmıştır(52). Yaşam süresini sınırlayan en önemli etken akciğer hastalığı ve araya giren enfeksiyonlardır. Son yıllarda tedavideki gelişmeler sonucu ortalama yaşam süresi 10 yıldan , 30 yıla kadar yükselmiştir(63,105,106).

Kistik Fibroz hastalığında hasarlı genin bulunması, bugüne kadar bulunan diğer genlerden ilginç ve önemli bir farklılık göstermektedir. Hem iyon kanallarının yapısı ve kontrolü hakkında yeterli bilgiye sahip olunmaması, hem de klasik biyokimyasal yöntem ve gereçlerle hasarlı proteinin izole edilememesi, araştırmacıları alternatif bir yaklaşıma itmiştir. Pozisyonel klonlama adı verilen bir metodla ilk kez, hasarlı proteinden önce hasarlı gen izole edilmiş ve bu olay moleküler genetik açısından son yılların en büyük zaferi olarak değerlendirilmiştir (49,83,87,118).

Genin lokalizasyonunu takiben, ürettiği protein saptanmış ve bu polipeptidin klorid iyonunun hücre içine giriş ve çıkışını kontrol eden bir membran proteini olduğu gösterilerek CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) adı verilmiştir(83). Gen üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, genin 27 eksondan oluştuğu ve en sık gözlenen mutasyona ise, polipeptidin 508. pozisyonundaki fenilalanin aminoasidini kodlayan 3 baz çiftlik delesyonun sebep olduğu bulunmuştur. Bu mutasyon $\Delta F508$ olarak isimlendirilmiştir(49,83,87).

1993 yılında toplanan Kistik Fibroz Genetik Analiz Konsorsiyumu bugüne kadar gen üzerinde 384 mutasyon saptandığını belirlemiştir(19). Bu mutasyonların büyük bir kısmı sadece izole ailelerde gösterilmiş olmasına karşın, $\Delta F508$ mutasyonunun sıklığı ortalama olarak %67 gibi çok yüksek bir oranda saptanmıştır(109).

Türkiye'de de, tüm Avrupa'da olduğu gibi, özellikle en sık gözlenen $\Delta F508$ mutasyonunun sıklığı üzerine çalışmalar başlatılmıştır. Çukurova Bölgesi'nin yüzyıllar boyunca çeşitli devletlerin hüküm sürdüğü bir bölge olması, göç ve istilalara maruz kalması sonucu, farklı etnik grupları bünyesinde

barındıran heterojen bir toplum yapısı oluşmuştur. Bu heterojenite ise, farklı kalıtsal hastalıkların incelenmesine olanak tanımaktadır. Biz de bu çalışma ile ilk aşamada $\Delta F508$ mutasyonunun yöremizdeki sıklığını saptamak ve hastalığın genetik düzeyde ifade edilmesi ile tanıya yardımcı olmayı daha sonra da taşıyıcıların tesbit edilmesi, doğum öncesi tanı ve genetik danışmanlık gibi ileri aşamaları hedefledik.



GENEL BİLGİLER

1.Tarihçe

'Das kind sterbt bald wieder, dessen Stirne beim Kussen salzig schmeckt - Alnı öpüldüğünde ağza tuz tadı gelen çocuk bir süre sonra ölecektir'. Roland Busch, çok eski yıllardan beri söylenen bir Alman çocuk şarkısında geçen bu mısraya dikkat çekmiştir. Benzer ifadelere Fransız, Alman ve Danimarka folklorik şarkı ve şiirlerinde de rastlamak mümkündür. Bu tür çocukların lanetli olduğu ve vafiz edilmemeleri gerektiğini belirtir cümlelerle de karşılaşmıştır. Bugünkü bilgilerimizle değerlendirdiğimizde, bu tür iki veya daha fazla çocuğa sahip ailelerde, bahsedilen çocukların Kistik Fibroz olduklarını düşünmek kehanet sayılmamalıdır (98).

Kan gruplarını bulan Landsteiner, 1905 yılında ilk kez mekonyum ileusunu tanımlamış ancak bunun Kistik Fibroz ile ilişkisini bilememiştir. 1910 yılında, Archibald Garrod, bir İngiliz ailesinde, steatoresi olup bronkopnömoniden ölen bir grup çocuk tanımlamış ve 'doğumsal metabolizma bozukluğu' tanımını yapmıştır. Ayrıca muhtemel bir otozomal resesif geçiş saptamasında bulunmuştur(98).

1936 yılında, Fanconi, İsviçre'de yayınladığı bir makalesinde, bilinen klasik Çölyak hastalığından değişik özellikler gösteren ve pankreatik değişikliklerle seyreden farklı bir Çölyak Sendromu tanımlamıştır. Bundan iki yıl sonra, 1938'de, Dorothy Anderson, Kistik Fibroz hastalığını son derece doğru ve detaylı bir şekilde tartışmış ve hastalığın mekonyum ileusu ile ilişkisini, tedavi yaklaşımlarını ve pankreatik enzim uygulamasını açıklamıştır.

Anderson'un tek yanılıgısı, hastalığı vitamin A eksikliği ile ilgili bir bozukluk zannetmesi olmuştur(98). 1950 yılında ise Farber, koyu kıvamlı salgılardan yola çıkarak ilk kez 'Mukovizidozis' tanımlamasını kullanmıştır ve bu terim hala tıp dünyasında hastalığın diğer bir ismi olarak geçmektedir.

Kistik Fibroz hastalığının anlaşılmasında en önemli yıllardan birisi de 1951 yılı olmuştur. Bu tarihte New York'da korkunç bir sıcak dalgası olmuş ve Dr. Paul Di Sant'Agnese, Kistik Fibrozlu çocukların terlerinde sodyum ve klorid fazlalığını saptayıp hastalığın tanısı için önemini açıklamıştır. Bu önemli keşif Gibson ve Crook isimli iki araştırmacıyı harekete geçirmiş ve bugün hala Kistik Fibroz tanısında en önemli tanı metodlarından biri sayılan ter testi için pilokarpin iyontoforez ile ter toplama tekniğini geliştirmişlerdir(15).

Quinton'un, klorid reabzorbisyonundaki spesifik defekti göstermesi Kistik Fibroz araştırmalarında çok önemli bir basamağı oluşturmaktadır(116). Frizel ve Welsh'in hücre kültürü çalışmaları çok değerli in vitro modeller oluşturmuşsa da, laboratuvar hayvan modellerinin oluşturulamaması Kistik Fibroz çalışmalarını yavaşlatmıştır(116).

Kistik Fibroz hastalığının genetik alandaki gelişmeleri oldukça heyecan vericidir. Kistik Fibroz'a neden olan defektif genin bulunması ile, hastalığa kesin tanı konması, temel hücresele defektin aydınlatılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli adımlar atılmıştır(46).

Kistik Fibroz'un otozomal resesif karakterli herediter bir hastalık olduğu ilk kez 1952 yılında Carter tarafından belirtilmiştir. Yapılan uzun çalışmalar sonucunda, 1985'de, Lap-Chee Tsui, Kistik Fibroz'a neden olan defektif genin 7. kromozomda lokalize olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmacı, John Riordan ile birlikte, 1989 yılında, genin yapısını ve en sık gözlenen mutasyon tipi olan üç

baz çiftlik delesyonu göstermeyi başarmışlardır(49,83,87). Riordan genin ürettiği polipeptide CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ve en sık gözledikleri mutasyona ise $\Delta F508$ adını vermiştir. Bu sinonim, 1480 amino asitten oluşan proteinin 508. pozisyonundaki fenilalanin rezidünün delesyonuna atfen kullanılmıştır(49).

Bu tarihten itibaren gen üzerindeki çalışmalar özellikle yeni mutasyonların saptanması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi üzerine yoğunlaştırılmıştır. Bugüne kadar 300'ün üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. Genin izolasyonu ve major mutasyonunun belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmalardan dolayı Tsui, Riordan ve Collins, 1989'da Kuzey Amerika Kistik Fibroz Toplantısında Paul Di Sant'Agnese ödülüne layık görülmüşlerdir(98).

2. Kistik Fibrozun Klinik Tablosu

2.1.Genel Bulgular:

Yaşamın ilk günlerinde ve erken çocukluk çağında, hastalığın ortaya çıkışı üç değişik şekilde veya bunların kombinasyonu şeklinde olabilir. Birinci ve en tipik olanı, koyu kıvamlı ve tıkaç şeklini almış mekonyuma bağlı olarak gelişen, kusma ve abdominal şişkinlik ile seyreden mekonyum ileus tablosudur. İkincisi, yeterli gıda almasına karşın kilo alamama ve büyüme geriliği saptanmasıdır. Yağlı gaita; malabsorbsiyon ve pankreatik yetmezliğin bir göstergesi olarak değerlendirilmelidir. Üçüncü ortaya çıkış şekli ise, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Daha nadir görünüşler arasında rektal prolapsus, neonatal sarılık ve hiponatremi tablosu sayılabilir(73,114).

2.2.Solunum Sistemi:

Pulmoner tutulumun en belirgin semptomu öksürüktür. Öksürük başlangıçta kuru ve balgamsız iken, daha sonraları yumuşak ve balgamlı bir hal alır. Çıkarılan mukus genellikle purulandır. Hastalar uzun süre asemptomatik olabileceği gibi, yaşamın ilk haftalarından itibaren kronik öksürük gelişmesi ve sık pnömoni atakları geçirmeleri de olasıdır. Akciğer hastalığı ilerledikçe, wheezing, egzersize toleransın bozulması, nefes darlığı ve büyümede yavaşlama gelişir. Son olarak da kor pulmonale, solunum yetmezliği ve ölüm meydana gelir. Enfeksiyon etkenleri arasında en sık rastlananları Stafilokokkus aureus ve Pseudomonas aeruginosa'dır. Pseudomonas suşlarından P.cepacia, antibiyotik resistansından dolayı çok tehlikelidir(105).

Nazal obstrüksiyon ve rinore siktir. Nazal poliplerin de sıkça geliştiği bildirilmiştir(73).

2.3.Gastrointestinal Sistem:

Kistik Fibroz'un en belirgin gastrointestinal bulgusu pankreatik yetmezliğe bağlı gelişen malabsorbsiyondur. Hastaların ancak %15'inde hiçbir pankreatik yetmezlik bulgusuna rastlanmazken, geri kalan %85'inde ise ekzokrin pankreatik yetmezliğe bağlı sindirim bozukluğu gözlenir(15). Sık, bol hacimli ve yağlı dışkı oluşur. Yağlı ishale bağlı olarak, yağda eriyen vitaminlerin eksiklikleriyle ilintili bulgular ortaya çıkar. Vitamin K eksikliğine bağlı gelişen hipoprotrombinemi, kanama diyatezi ile sonuçlanabilir. Vitamin A eksikliğine bağlı gece körlüğü ve D vitamini eksikliğine bağlı olarak da kemik dansitesinde azalma bildirilmiştir. Riketz ise nadirdir. Diğer daha nadir görülen intestinal

bozukluklar arasında rektal prolapsus, volvulus ve distal intestinal tıkanma sendromu sayılabilir(114).

2.4.Karaciğer:

Kistik Fibroz'da en sık görülen karaciğer bozukluğu yağlı karaciğer tablosudur; fakat genellikle asemptomatiktir. Çok nadiren, erken çocukluk döneminde masif hepatik steatoza neden olabilir. İntrahepatik safra kanallarının lipit ve safra pigmenti ile tıkanması sonucunda biliyer siroz gelişen vakalar bildirilmiştir. Siroz gelişimine bağlı ikter, asit, ösafagiyal varisler ve kanamalar oluşabilir. Safra yollarında, anormal lipid kompozisyonu sonucunda kolelitiyazis vakaları bildirilmiştir (88).

2.5.Endokrin Pankreas:

Kistik Fibroz'lu hastaların yaşam süresi uzadıkça, diyabet ve komplikasyonları daha büyük bir problem teşkil etmeye başlamıştır. Yaklaşık % 8-10 Kistik Fibroz'lu hastada Diabetes Mellitus geliştiği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak hiperglisemi, glukozüri ve poliüri oluşur. Birçok vakada Diyabetik ketoasidoz gelişmez; ancak göz, böbrek ve diğer vasküler komplikasyonlar, hipergliseminin başlangıcından sonra 10 yıl veya daha fazla yaşayan hastalarda bildirilmiştir(73,114).

2.6.Genitoüriner Sistem:

Erkek hastaların yaklaşık %90'ı infertildir. Kadın hastalarda da fertilité oranı azalmıştır ancak çocuk sahibi olabilen birçok kadın Kistik Fibroz hastası

bildirilmiştir. Pulmoner hastalığı olmayan Kistik Fibroz'lu kadınlar gebeliği iyi tolere etmektedirler(114).

2.7. Ter Bezleri:

Ter ile çok fazla tuz kaybı, çocuklarda, özellikle gastroenterit ile birlikte olduğunda veya çok sıcak havalarda, tuz eksikliğine neden olabilir. Bu çocuklarda hipokloremik alkaloz gelişebilir. Anneler, çocuğun derisi üzerinde tuz pudralarının oluştuğundan bahsederler(73).

Diğer oluşabilecek bozukluklar arasında artropatiler, vaskülitler ve amiloidoz sayılabilir(114).

3. Genetik Özellikler

3.1. Genin izolasyonu ve yapısı:

Kistik Fibroz, tek gen mutasyonuna bağlı gelişen otozomal resesif bir hastalıktır(49,83,87). Hasta şahıslar, hasarlı genin iki anormal kopyasını taşırlar. Taşıyıcılar ise bir normal bir de anormal gen versiyonu içerirler ve asemptomatik olup herhangi bir hastalık için artmış risk grubu oluşturmazlar. Ancak Kistik Fibroz taşıyıcılarının klor sekresyonu ile seyreden diyarelere karşı dirençli oldukları gösterilmiştir(105). Kistik Fibroz fare modellerinde, heterozigotların kolera toksinine dirençli oldukları bildirilmiştir (30).

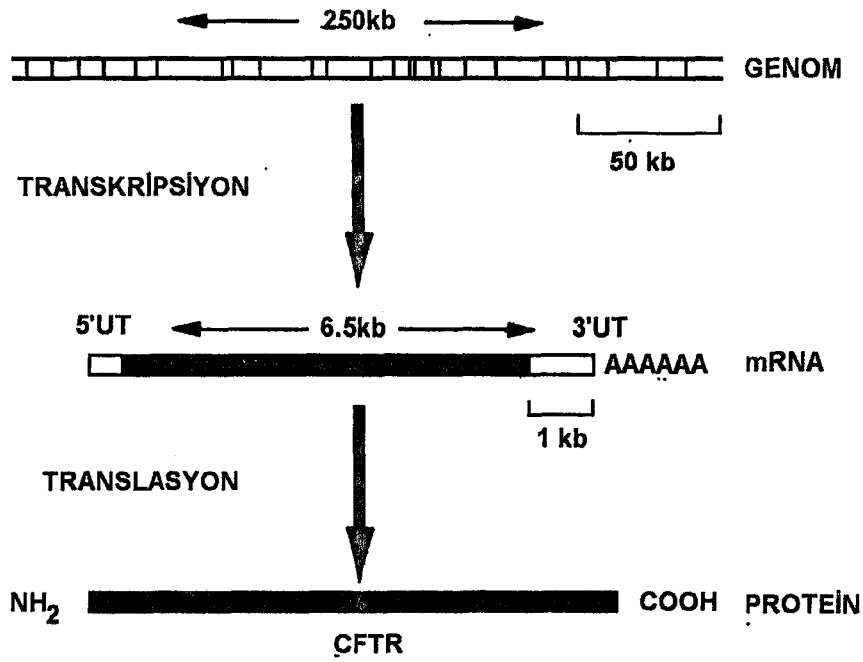
Hastalığın genetiği üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, pozisyonel klonlama tekniği ile Kistik Fibroz geni 7. kromozomun uzun kolunda band 31.1 bölgesinde izole edilmiştir(Şekil 1)(23,50,83).



Şekil 1. Kistik Fibroz lokusunun 7. Kromozomun uzun kolundaki fiziksel yerleşimi.

Genin yapısı, genomik DNA dizi analizi ile, tüm ekson ve intron geçiş alanları da dahil olmak üzere çalışılmış ve bu çalışma sonucunda uygun oligonükleotid primerleri test edilmiş ve belirlenmiştir(122).

Gen yaklaşık 250 kilobaz (kb) uzunluğundadır. 27 ekson ve bunların aralarına yerleşmiş ve kodlamaya katılmayan 26 introndan oluşmuştur. Haberci ribonükleik asidin (mRNA) uzunluğu ise yaklaşık 6.2 kb olup, 1480 aminoasitten oluşan polipeptidi kodlamaktadır. Genin ürettiği protein olan CFTR, bir membran proteini olup klor transportundan sorumludur (Şekil 2) (39,46).

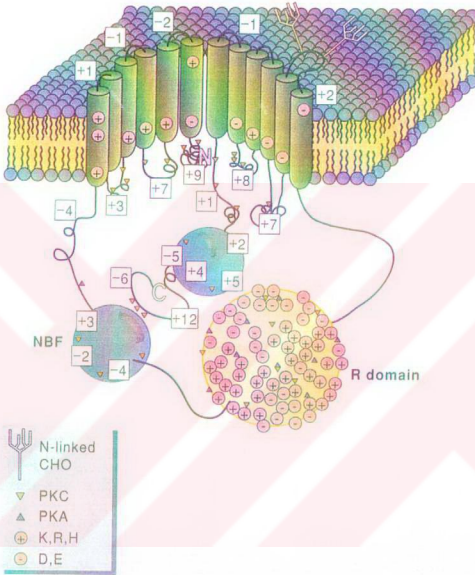


Şekil 2. Kistik fibroz geninin şematik gösterimi. Gen 250 kb uzunluğundadır. Transkripsiyondan sonra oluşan mRNA 6129 baz çifti uzunluğunda olup, 5' ve 3' translasyona uğramayan bölgeler içerir (UT). Protein, posttranslasyonel olarak 1480 aminoasitten oluşmuştur.

3.2. CFTR'ın Yapısı:

Hücre membranının görevi iç ve dış ortamlar arasında bir bariyer oluşturmaktır. Bu son derece özelleşmiş bir bariyer olup ortama ve gereksinime göre gerekli maddelerin hücre içine alınması ve gerekmeyenlerin hücre dışına atılmasına izin verici niteliktedir. Bu açıdan bakıldığında epitel hücre membranları özel bir öneme sahiptir; çünkü dış dünya ile de ilişki halindedir. Membran yapısında bu alışverişten sorumlu olan proteinler genel olarak kanallar, iyon değiştiriciler, kotransporterlar ve pompalar olarak

sınıflandırılabilir. CFTR polipeptidinin bir pompa mı yoksa kanal mı olduğu sorusu, bu alanda çalışanların karşısına çıkan önemli sorulardan birini oluşturmuştur(39,80). CFTR'in yapısı incelendiğinde, en karakteristik özelliği birbiri ardına sıralanan iki büyük motiftendir oluşmasıdır (Şekil 3)(123).



Şekil 3. CFTR'in yapısı. Silindirler membrana bağlı parçaları, mavi renkli küreler nükleotid bağlayıcı parçaları ve yüklü aminoasitlerden oluşan sarı renkli büyük küre ise düzenleyici bölgeyi (R domain) göstermektedir. Aminoasitlerin yükleri + veya - olarak işaretlenmiştir. İç ve dış yüzeydeki net yükler kareler içinde belirtilmiştir. Protein kinaz A veya C (PKA veya PKC) ile fosforilasyon alanları ve N-glikozilasyon (N-linked CHO) gösterilmiştir.

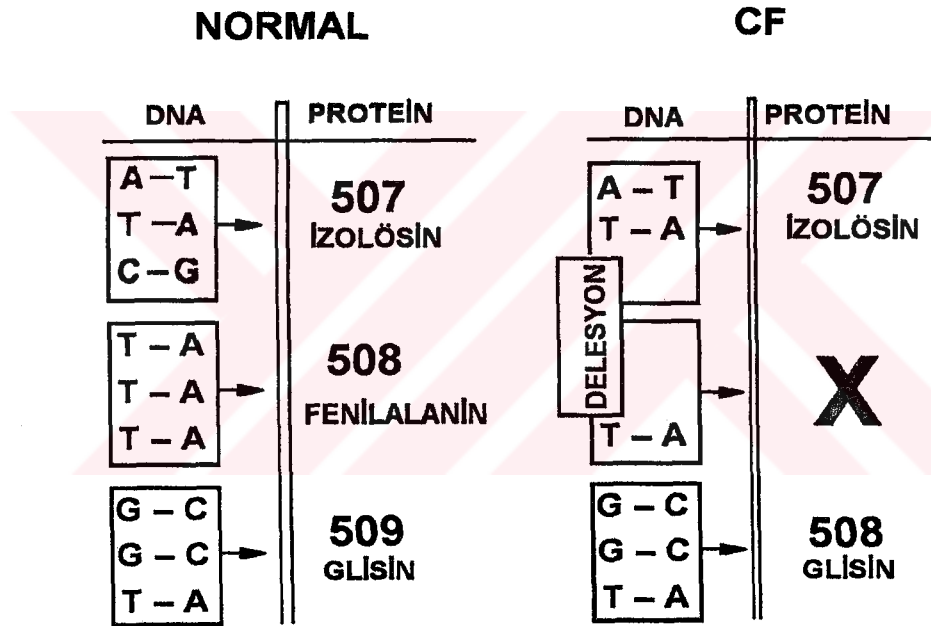
(K=Lizin; R=Arginin; H=Histidin; D=Aspartik asit; E=Glutamik asit).

Her bir motif, bir membrana gömülü parça ve bir de nükleotid bağlayıcı parçadan oluşmuştur. Bu iki motifi birbirine bağlayan bir diğer bölüme ise düzenleyici bölge (Reguluar Bölge- R domain) adı verilmiştir. Çoğunluğu hidrofobik aminoasitlerden oluşan membrana gömülü parça, altı adet transmembran segmentden (TM1-TM6) oluşmaktadır(59). Proteinin özellikle transmembran ve nükleotid bağlayıcı parçaları, birçok transport proteini ile ortak özellikler gösterdiğinden dolayı, CFTR da bu grup proteinler ailesine dahil edilmiştir. Bu aile içinde, multidrug resistans proteini, mayadaki α -faktör feromon eksport sistemi, hemolizin B ve adenilil siklaz sayılabilir(59,82). Transmembran ve nükleotid bağlayıcı parçalar ile bu proteinler arasında homoloji bulunmasına rağmen, CFTR'da bulunan düzenleyici parça, ailenin diğer üyelerinde bulunmamaktadır(46). CFTR, özellikle düzenleyici bölgesinde multipl fosforilasyon alanları içerir. Bu da CFTR'ın bir fosfoprotein olduğunu ve cAMP bağımlı protein kinaz için substrat rolü oynadığını göstermektedir(46). Protein in vivo olarak glikozillenmiştir ve SDS-poliakrilamid jelde moleküler ağırlığı 150 ile 180 kD arasında saptanmıştır. Bu durum jel koşullarına ve glikozilasyon durumuna bağlı olarak değişmektedir. Ancak CFTR'ın fonksiyonu için glikozilasyona ihtiyacı olmadığı gösterilmiştir(42).

3.3. Mutasyonlar:

3.3.1. $\Delta F508$ mutasyonu:

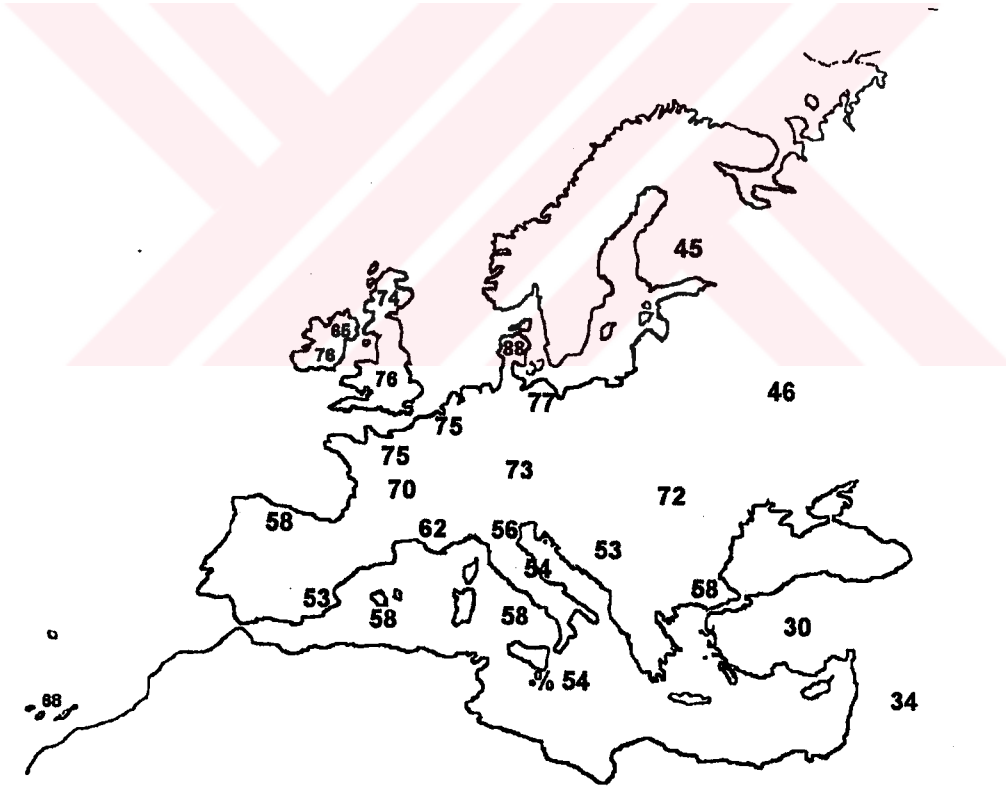
Kistik Fibroz geninde en sık rastlanan mutasyon, polipeptidin 508. pozisyonundaki fenilalanin amino asidinin kodlanamamasına neden olan 3 baz çiftlik bir delesyondur (Şekil 4)(87).



Şekil 4. $\Delta F508$ mutasyonu. Şematik olarak, 508. pozisyonundaki fenilalanin aminoasidinin kaybı ile sonuçlanan 3 baz çiftlik delesyon gösterilmiştir.

Kerem ve ark. Kanada'da yaptığı ilk orijinal çalışmada $\Delta F508$ sıklığını %68 bulmuşsa da, bunu takiben yapılan bir çalışmada Amerika'lı beyaz ırkda

bu oran %75 olarak bulunmuştur(106). 1990 yılında toplanan ilk Kistik Fibroz Genetik Analiz Toplantısında bu mutasyonun dünyadaki beyaz ırkdaki prevalansı %70 olarak belirlenmiştir. Hastaların yaklaşık %50'si $\Delta F508$ için homozigot, diğer yarısı ise bileşik heterozigot ($\Delta F508$ /diğer) olarak saptanmıştır(93,101). Hem $\Delta F508$ hem de diğer mutasyonların sıklığı bölgelere ve ırklara göre değişmektedir.Örneğin, Amerikalı beyazlarda $\Delta F508$ sıklığı %76 bulunmuşken, yine Amerikalı zenci popülasyonda bu oran %37 olarak saptanmıştır(60). Ayrıca, Kuzey Avrupa ülkelerinde, Güney ve Doğu Avrupa'ya oranla daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 5)(56).



Şekil 5. $\Delta F508$ mutasyonunun Avrupa'daki sıklığı.

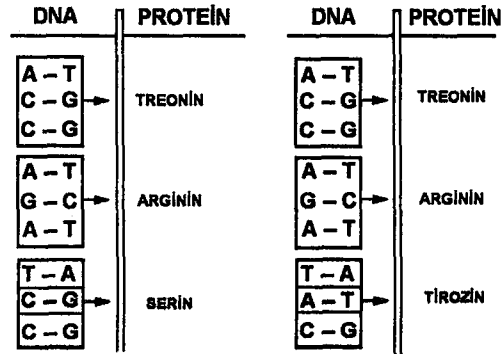
3.3.2.Diğer mutasyonlar:

$\Delta F508$ mutasyonundan başka, 11/4/1993 tarihi itibariyle, bugüne kadar 384 mutasyon tanımlanmıştır(19). Bu mutasyonlar; missense, nonsense, frameshift ve splice site mutasyonları şeklindedir(21,34,89,94,117).

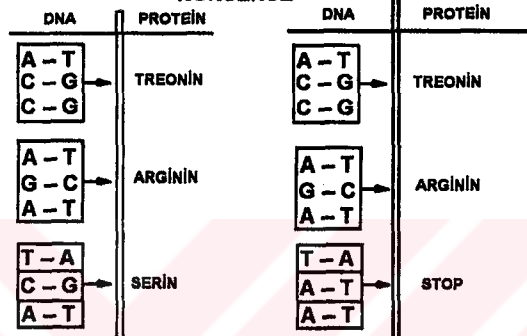
Missense mutasyonlar, bir baz değişimi sonucu oluşan amino asit substitusyonlarıdır. Nonsense mutasyonlarda ise, baz değişimi sonucu bir stop kodon oluşur ve üretilen polipeptid prematür kalır. Frameshift mutasyonlarında da bir veya daha fazla baz insersiyonu veya delesyonu olduğundan, mutasyon sonrasındaki baz sıralaması ve dolayısıyla üretilen polipeptid zincirindeki amino asit dizilimi değişecektir. Frameshift mutasyonlarında da prematür stop kodonu oluşabilmektedir(Şekil 6)(46).

MUTASYONLAR

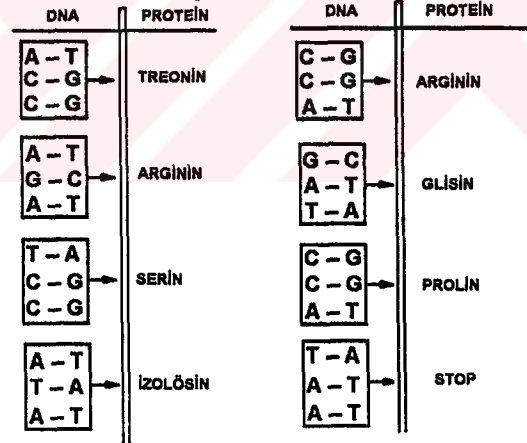
MİSSENSE



NONSENSE

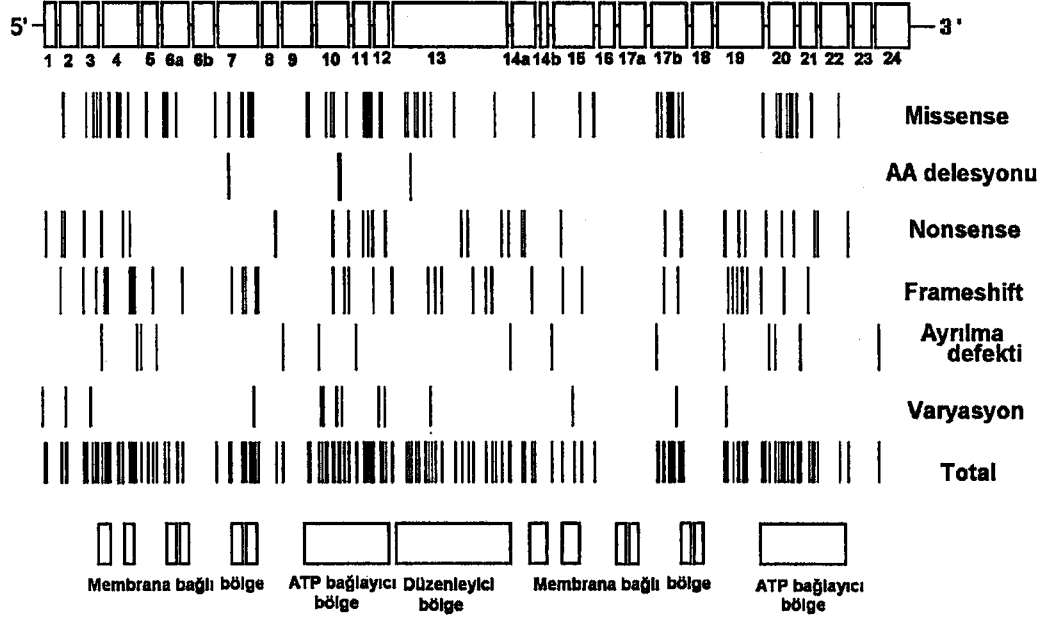


FRAMESHİFT MUTASYONU 1 BAZ ÇİFTİ DELESYONU



Şekil 6. Missense, nonsense ve frameshift mutasyonlarının şematik gösterimi. İlk sütunda normal, ikincide ise oluşan mutasyon ve değişime uğrayan aminoasitler gösterilmiştir.

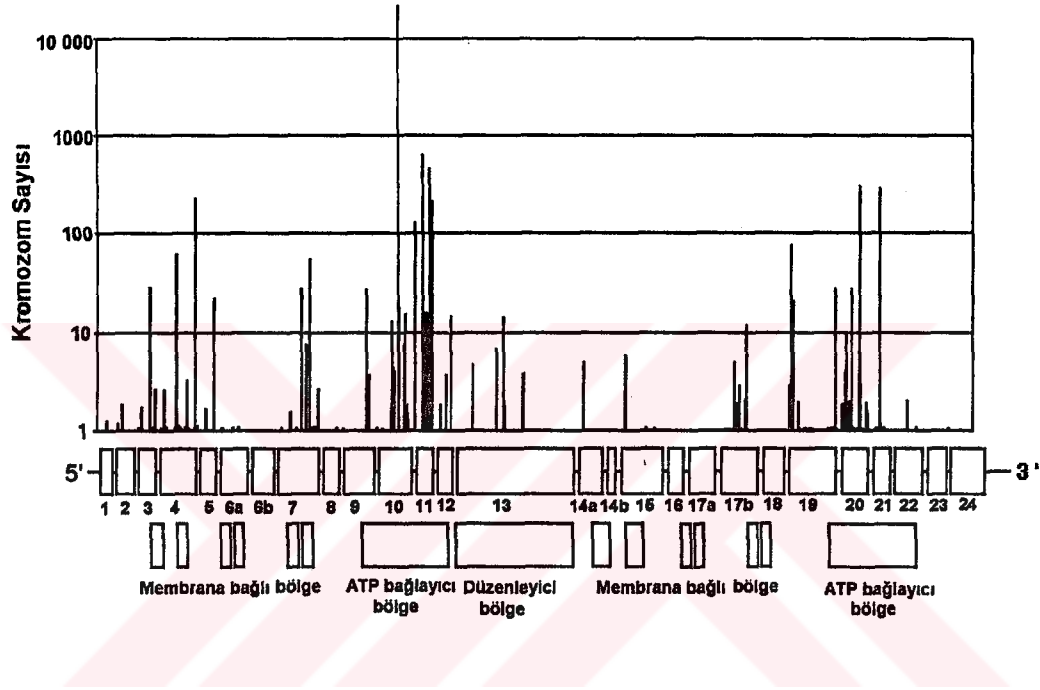
Hem nonsense mutasyonlar, hem de frameshift mutasyonlar erken stop kodonu oluşturmak suretiyle unstabil ve prematür protein sentezine neden olduklarından, bu tür mutasyonların oldukça ağır seyreden kistik fibroz vakalarında bulunması beklenirken, yapılan çalışmalar bunun tam tersi olduğunu göstermektedir. Bu tür mutasyonlar hafif seyreden olgularda gösterilmiştir(46). Bu bulgu, prematür proteinin bulunmasının, hatta proteinin hiç bulunmamasının öldürücü olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca, proteinin hiç bulunmamasının, yanlış fonksiyon gören bir protein bulunmasına oranla daha iyi olduğu sonucu da çıkmaktadır. Ancak nonsense mutasyonların her zaman benign seyredeceğinin bir kural olamayacağı İsrail'de yapılan bir çalışma sonucu ortaya çıkmıştır. İsrail'deki Askenazi Yahudilerinde en sık görülen mutasyon, bir nonsense mutasyon olan W1282X mutasyonudur. Genin 20. eksonundaki 3978. bazında G→A değişimi sonucunda, proteinin 1282. amino asidi olan triptofan (W) yerine prematür bir stop kodonu (X) gelmektedir ve bu hastaların son derece ağır seyrettiği bildirilmiştir (94). Mutasyonlara genel olarak bakıldığında %42'sinin missense, %21'inin nonsense, yaklaşık %10'unun splicing ve geri kalanlarının da bir veya iki baz delesyonu veya insersiyonu sonucu oluşan frameshift mutasyonlarından meydana geldiği ortaya konmuştur(Şekil-7)(18).



Şekil 7. CFTR geni üzerindeki mutasyonların dağılımı. Eksonlar, üstte numaralandırılmış kutular şeklinde gösterilmiştir. Alt kısımdaki kutular, proteinin fonksiyonel ünitelerini belirtmektedir. Herbir vertikal çizgi mutasyonun yerini işaret etmektedir. Benign aminoasit yer değişimleri, varyasyon olarak ayrı bir grupta toplanmıştır.

F508C (508. pozisyonda fenilalanin--sistein yer değişimi) ve I506C (506. pozisyonda izolösin--sistein yer değişimi) gibi benign seyirli mutasyonlar, varyasyon olarak değerlendirilmişlerdir(51). Bugüne kadar bildirilen en büyük delesyon, düzenleyici bölgeyi kodlayan 13. eksondaki 84 baz çiftlik delesyondur(18). Mutasyonların eksonlar üzerindeki dağılımı incelendiğinde, yoğunluğun daha çok nükleotid bağlayıcı bölgeleri kodlayan 9-12 ve 19-22 eksonlarda olduğu saptanmıştır. Özellikle birinci nükleotid bağlayıcı bölgeyi

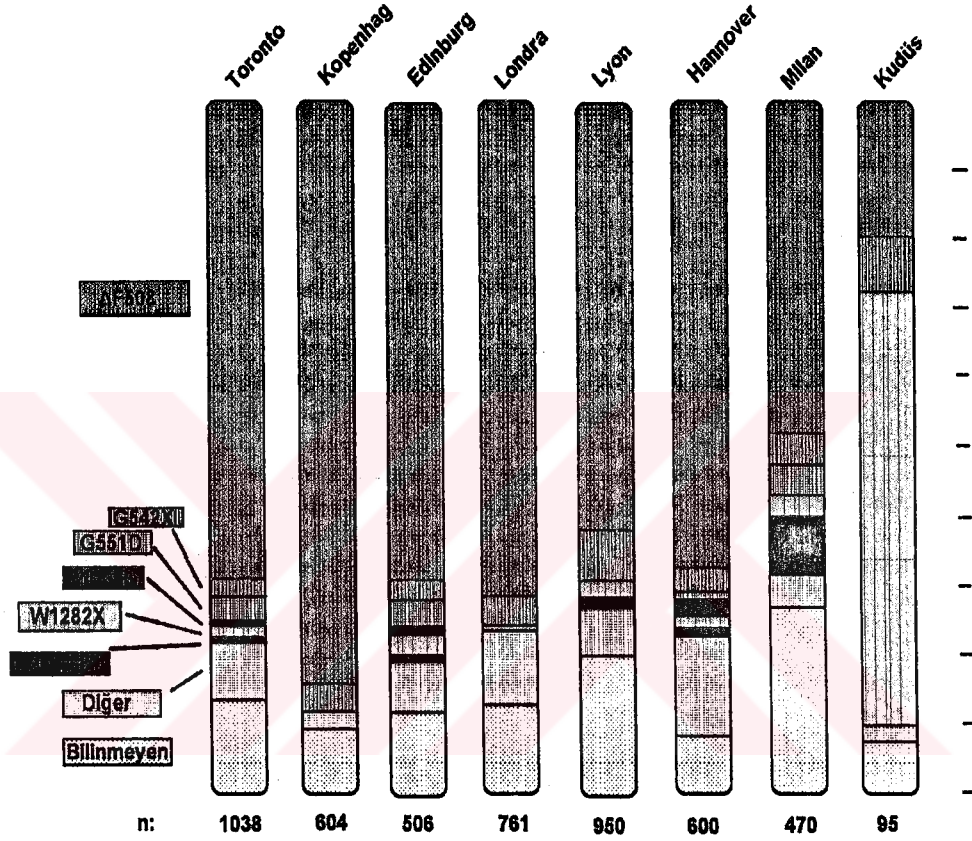
kodlayan 10. ve 11. eksonlar mutasyonların en sık gözleendiği alanları oluşturmaktadır (Şekil 8)(18).



Şekil 8. Kistik fibroz mutasyonlarının sıklığı ve lokalizasyonu. Histogramda, CFTR genindeki lokalizasyonlarına göre mutasyon sıklıkları gösterilmiştir.

Bir çok mutasyonun, dünyada sadece tek bir ailede gösterilebilmiş sporadik vakalar olması tarama çalışmalarını son derece zorlaştırmaktadır(39,67,78). C542X (542. pozisyondaki sistein stop kodonuna dönüşmüş), G551D (551. pozisyondaki glisin ile aspartik asit yer değiştirmiş), R553X (553. pozisyondaki arginin stop kodonuna dönüşmüş) ve N1303K

(1303. pozisyondaki asparagin ile lizin yer değiştirmiş) gibi bazı mutasyonlar ise %1 ile %3 arasında bir sıklığa sahip olup, taşıyıcı testlerinde önem kazanmaktadır(şekil 9)(18).

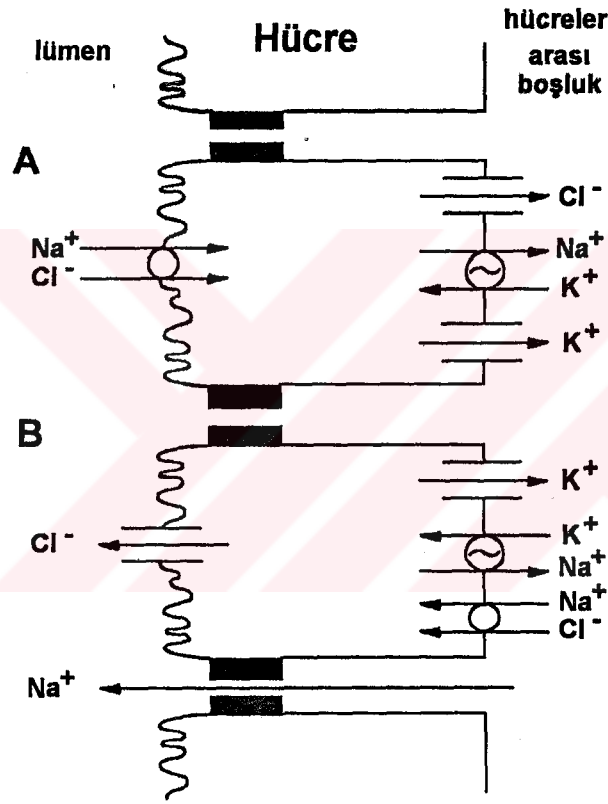


şekil 9. Sekiz farklı toplumda gözlenen mutasyonların rölatif sıklıkları.

4.CFTR'ın Görevi:

Kistik Fibroz'un solunum yolları, pankreas ve ter bezlerini içeren bir takım epitel hücrelerindeki yetersiz elektrolit transportuyla alakalı olduğu, yaklaşık 60 yıl önce hastalığı sistematik bir şekilde tanımlayan Dorothy Anderson'dan beri bilinmektedir(98). Pankreatik enzim yetmezliği, terde yüksek

tuz oranı ve ekzokrin bezlerde oluşan fibrotik morfolojik değişiklikler, Kistik Fibroz'un tuz transportu yapan epitelde bozukluk yaptığı düşüncesini pekiştirmiştir(4). Barsak ve ekzokrin bezler gibi salgı epitelinde sıvı ve elektrolit salgılanması, bazolateral membranda bulunan Na-K ATPaz'ın yanısıra, iyon kanalları ve kotransporterlarla sağlanır(Şekil 10)(29,52).



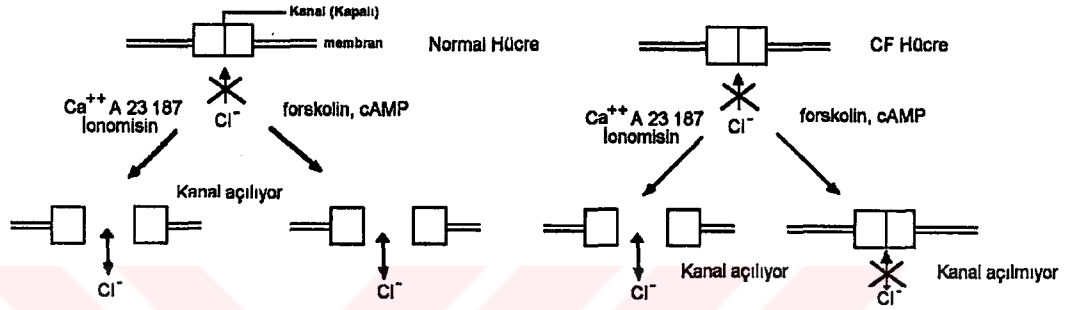
Şekil 10. NaCl absorpsiyonu (A) ve sekresyonu (B) yapan tipik bir hücrenin şematik modeli. Lümeneye bakan yüzü apikal, hücreler arası boşluğa bakan yüzü ise bazolateral membrandır. A: Bazolateral yerleşimli Na⁺ - K⁺ ATPaz, Cl⁻ ve K⁺ kanalı; Apikal yerleşimli olarak da Na⁺-Cl⁻ kotransporter'ı gösterilmektedir. B: Na⁺-Cl⁻ kotransporter'ı bazolateral membranda ve Cl⁻ kanalı ise apikal membranda yer almaktadır.

Tipik bir salgı hücresinde, bazolateral membranda bir K^+ kanalı, bir Na-Cl kotransporterı ve ek olarak bir de Na- K^+ pompası bulunur. Apikal membranda ise, tuz ve suyun kandan barsak lümenine salgılanmasına olanak tanıyan bir klor kanalı bulunur.

Bir absorbtif hücrede ise düzenlenme biraz farklıdır. Cl^- kanalı ile Na-Cl kotransporterı yer değiştirmiştir; böylece tuz absorpsiyonu bazolateral membran boyunca sağlanır. Bu durum gözönüne alındığında Kistik Fibroz'daki defektin bu tuz ve sıvı düzenleyici bölgede olduğu düşünülmüştür. Daha sonra Kistik Fibroz'daki ana patolojinin etkilenen organlardaki epitelyal klorid kanalının adrenerjik stimulusa yanıtızsızlığı olduğu gösterilmiştir. Solunum yolları epitelinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında, defektin apikal membranda lokalize olduğu bulunmuştur. Cl^- transportundaki benzer bozukluk, barsak ve rektum epitelinde de tesbit edilmiştir(61).

Hem normal hem de Kistik Fibroz'lu hastaların solunum yolu epitelinde, apikal membranda, klor kanallarının var olduğu ve gelişimin intrauterin hayatın 29. haftasından itibaren başladığı saptanmıştır(61). Böylece sorunun, proteinin mislokalisasyonu veya tamamen yokluğu gibi problemlerden kaynaklanmadığı anlaşılmıştır. Yine, hem sağlam hem de hasta grupta yapılan çalışmalarda, Cl kanallarının her iki grupta da Ca^{+2} ve iyonofor A-23187'ye cevap verdiği de gözlenmiştir. Ancak Kistik Fibroz'lu hastaların hücrelerinde Cl kanalı aktivitesi epinefrine yanıtızsız kalmıştır. Hasta hücrelerde ne cAMP ne de cAMP agonisti olan forskolin kanalları stimüle edememiştir. Yine ter bezlerinde yapılan bir çalışmada da, β adrenerjik uyarıya sekretuar yanıtızsızlık oluşurken, kolinerjik uyarıya, normal kişilerdekinden ayırt edilemeyecek düzeyde yanıt oluşmuştur.

Böylece ter bezi epitelinde de apikal klor kanallarının varlığı gösterilmiş ancak Kistik Fibroz'lu hastaların hücrelerinde, izoproterenol gibi β adrenerjik agonistlerce regülasyonda bir bozukluk olduğu ortaya konmuştur (Şekil 11)(33,115).



Şekil 11. Ca^{++} ve adrenerjik ajanların apikal klor kanalı üzerine etkisi. Normal hücre hem Ca iyonoforlarına hem de cAMP'ye yanıt vererek açılır. Kistik fibroz epitel hücresi ise cAMP agonistlerine yanıt vermez.

CFTR'daki spesifik bazı aminoasit rezidülerinin mutasyona uğraması sonucu, klor kanallarının özelliklerinin de değiştiği gösterilmiştir. CFTR, hidrofobik aminoasitlerden oluşan membrana gömülü parçası içinde altı tane yüklü aminoasit içerir. Bu yüklü aminoasit rezidülerinin türler arasında korunmuş olması, fonksiyon açısından çok önemli olduğunu göstermektedir. Bu rezidülerden bazik özellik gösteren dört aminoasit, asidik karakterli dört aminoasit ile yer değiştirdiğinde, kanal yapısında bozulmaya neden olmadığı,

ancak anyon geçirgenliğinde ve iletimin sağlanmasında değişiklikler olduğu saptanmıştır(2).

Bunun dışında, $\Delta F508$ mutasyonuna bağlı olarak, proteinin β katlanmış kağıt yapısının değiştiği ve bu değişim sonucu 1. NBB'nin adenin nükleotidlerine karşı affinitesinin değişmediği ancak bağlama kapasitesinin azaldığı saptanmıştır(103). Ayrıca, üre denatürasyon çalışmaları ile proteinin in vitro olarak dayanıklılığının azaldığı da gösterilmiştir(104).

Sonuç olarak, CFTR'in bir klor kanalı olduğunun ispatlanması, başka fonksiyonları olmadığı anlamına gelmez. CFTR'in başka görevleri de olabileceği üzerine yapılan tartışmalar iki temel görüşe dayandırılmaktadır. Bunlardan ilki, CFTR'in de bir üyesi olduğu ATPaz/ABC (ATP Bağlama Kaseti) transport ailesi, membranda, bazı substratların aktif transportunu gerçekleştirmektedir. CFTR'in da henüz belirlenememiş bir substratın aktif transportunu gerçekleştirebileceği uzak bir ihtimal değildir. İkincisi ise, kistik fibrozlu hastaların epitelinde, artmış sodyum reabsorpsiyonu, gliko-konjugatların sulfatlanmasında artma ve kanalların anormal regulasyonu gibi klor iletimi dışında bazı diğer bozuklukların fenotipik olarak saptanması, proteinin başka birtakım görevlerinin de olabileceğinin göstergesidir(84).

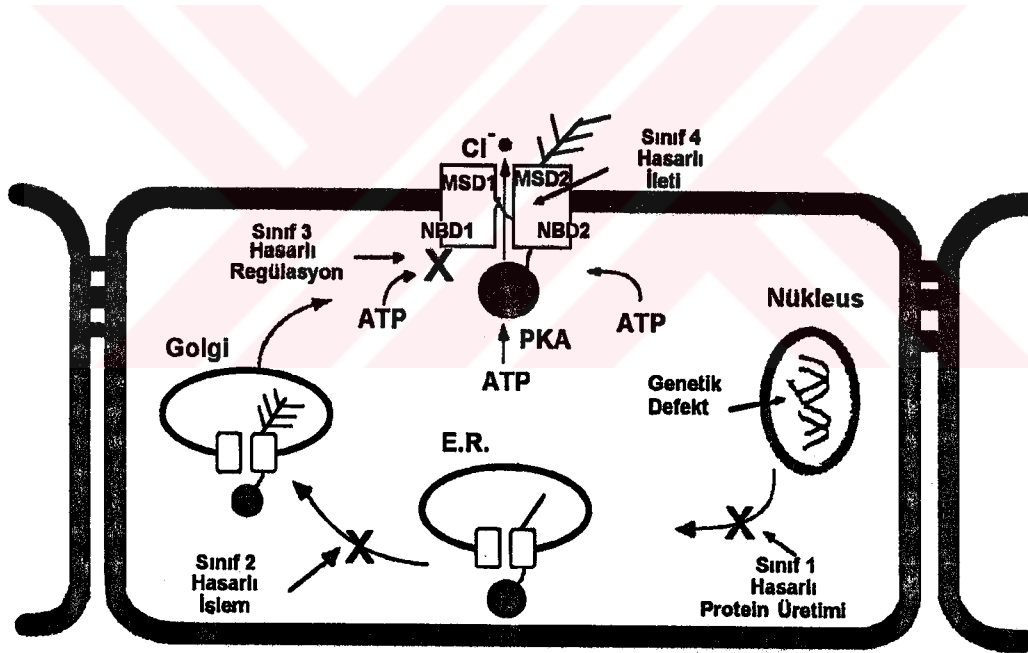
Bazı çalışmalarda, CFTR'in membranda endositoz ve ekzositoz olayına katkıda bulunduğuna ilişkin veriler elde edilmiştir. Yine, üzerinde henüz yeterli çalışma yapılmamış olmasına karşın, endositik klatriin ile kaplı veziküllerin CFTR içermesi, proteinin hücre membranındaki bu tür olayları da etkileyebileceğini göstermektedir(114).

CFTR klorür kanallarının kontrolünün düzenlenmesi, fonksiyonu açısından çok önemlidir. Bu kontrol iki temel mekanizma ile sağlanmaktadır:

fosforilasyon ve hücre içindeki nükleotidler(33). CFTR üzerinde bulunan düzenleyici bölge, fosforilasyon için uygun alanlar içerir. İki adet bulunan nükleotid bağlayıcı parça da, ATP ile ilişkiye girebilecek bölgeler bulundurur(29). Cl⁻ iletimi fazla olan ter kanalı hücrelerinde yapılan çalışmalarda, iletimin sağlanabilmesi için hücre içi ATP konsantrasyonunun normal düzeylerde (yaklaşık 5 mM) bulunması gerektiği gösterilmiştir(79).

5.CFTR Fonksiyon Bozukluğunun Moleküler Mekanizması:

CFTR'da fonksiyon bozukluğuna neden olan mutasyonlar 4 ana grupta toplanmıştır (Şekil 12)(113):



Şekil 12. Bir epitelyal hücrede CFTR'ın biyosentezi ve fonksiyonu.

MSD: Membrana bağlı parça; NBD: Nükleotid bağlayıcı parça

ER: Endoplazmik Retikulum; PKA: Fosforilaz Kinaz A

Glikozilasyon alanları dallı yapılar olarak gösterilmiştir.

I.Grup: Protein Sentez Bozukluğu

Splice site, frameshift veya nonsense mutasyonlar, prematür sonlandırma sinyaline neden olurlar. R553X gibi bazı nonsense mutasyonlarda unstabil mRNA oluşur ve protein tesbit edilemez. Bazı diğer mutasyonlar sonucu, olması gerekenden daha kısa veya yeni bir aminoasit dizilimine sahip anormal proteinler oluşur. Bu tür çok az veya hiç fonksiyon görmeyen proteinler de genellikle unstabildir ve hücre içi mekanizmalar ile hızla yıkılırlar. Genin promotor bölgesinde henüz hiçbir mutasyon gösterilememiştir(113).

II.Grup: Proteinin Post-translasyonel İşlemlerinde Bozukluk

Bu tür bozukluğa yol açan mutasyonlar, CFTR'ın hücre membranındaki doğru lokalizasyonda bulunmasını engeller. En sık görülen $\Delta F508$ mutasyonu da bu gruba dahildir. $\Delta F508$ mutasyonu sonucu, CFTR'ın glikozilasyonu tam olarak gerçekleşemez. Konuyla ilgili ilk çalışmalarda aksine bulgular saptanmış olmasına karşın, $\Delta F508$ mutasyonunda, CFTR'ın solunum yolları ve ter bezleri epitel hücrelerinde yanlış lokalizasyon gösterdiği ispatlanmıştır. Sebep olarak da, mutasyon sonucu, proteinin uygun yere yönlenmesi için gerekli konformasyonunun engellenmesi gösterilmiştir(71).

III.Grup: Regülasyon Bozukluğu

CFTR klor kanalının açılıp kapanmasının düzenlenmesinde, nükleotid bağlayıcı parça ile hücre içi ATP etkileşiminin çok önemli rolü vardır. G551D gibi bazı mutasyonlarda kanalın fonksiyonun çok azaldığı, S1255P

mutasyonunda ATP'nin uyarıcı etkisi daha az olduğu ve G551S, G1244E ve G1349D gibi mutasyonlarda da yine kanal fonksiyonunda değişimler olduğu gözlenmiştir. Regülatuvar parçada da bazı missense mutasyonlar gösterilmiş olmasına karşın, bu sıklık proteinin diğer bölgelerine oranla çok azdır ve fonksiyonda belirgin kayba neden olmamaktadır(73,84).

IV.Grup: İletimin Bozulması

Membrana gömülü parçalar por yapısını oluştururlar ve bu bölgede de bazı missense mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Özellikle bu bölgede yer alan arginin aminoasidinin mutasyonu sonucu normal proteine oranla iletimde azalma tesbit edilmiştir: Normal CFTR > R347P > R117H > R334W.

Bu sınıflama, mutasyonların etki mekanizmalarının anlaşılması ve yeni saptanacak mutasyonların ne tür sonuçlarla ortaya çıkabileceğinin belirlenmesinde son derece faydalıdır. Ancak, II. Grubun nükleotid bağlayıcı parça mutasyonlarını içerdіği belirtilmiş olmasına karşın, mebrana gömülü parça ve regülatuvar parçada oluşan bazı mutasyonların da mislokalizasyona yol açabileceği akıldan çıkarılmamalıdır. Bu durumda, vurgulanması gereken nokta, bir mutasyonun birden fazla anomaliye neden olabileceğidir. ΔF508 mutasyonu hem mislokalizasyona hem de regülasyon bozukluğuna neden olabilmektedir(Grup II ve III)(113).

6.Genotip-Fenotip İlişkisi:

Genotip-fenotip ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar, CFTR'ın fonksiyonunun daha iyi anlaşılması, tanının kolaylaşması, prognoz tayini ve tedavinin yönlendirilmesi açısından son derece faydalıdır. Ancak bu hastalığa ait bazı faktörlerden dolayı bir o kadar da güçtür. Bu faktörlerden ilki, hastalığın bir çok organ sistemini tutması ve semptomların hastalar arasında pek çok farklılıklar sergilemesidir. İkincisi, belirli bir organ tutulumuyla seyreden hastalarda bile, çevresel etkenlere bağlı olarak farklı seyirlerin gözlenmesidir. Özellikle akciğer tutulumu ile seyreden kistik fibroz hastalarında değişik derecelerde fonksiyon kaybı gözlenebilmektedir(106). Üçüncü bir faktör, birçok hastanın birleşik heterozigot olması sonucu, klinik prezentasyonun hangi mutasyona bağlı olduğunun saptanmasındaki güçlüktür. Ayrıca, bazı hastalarda CFTR geni üzerinde birden fazla mutasyon oluşabilmektedir. Son olarak da, bazı tür mutasyonların, bir diğer mutasyon etkisini baskılamasıdır. Bir çalışmada, R553M ve daha az oranda R553Q mutasyonlarının $\Delta F508$ 'in mislokalisasyon ve fonksiyonel bozukluk etkilerini düzelttiği gösterilmiştir(113).

Almanya'da 346 kistik fibroz hastasından elde edilen genetik ve biyokimyasal verilere göre yapılan fenotip-genotip çalışmasında iki önemli sonuca varılmıştır. Bunlardan birincisi, hastalıkta yaşam süresinin uzun olması, en azından bir hafif seyirli mutant alele sahip olmakla mümkündür. İkincisi ise $\Delta F508$ mutasyonu ile pankreatik yetmezlik arasında sıkı bir ilişki gösterilmesidir(97).

Tüm bu olumsuzluklara karşın, yine de, organ tutulumuna bakılarak bir sınıflama yapmak mümkündür:

Akciğer Tutulumu: Pulmoner hastalığın şiddeti ile mutasyon tipi arasında ilişki saptayabilme çalışmaları genellikle olumsuz sonuçlanmıştır. $\Delta F508/\Delta F508$, $\Delta F508/\text{diğer}$ ve $\text{diğer}/\text{diğer}$ şeklindeki gruplar arasında yapılan korelasyon çalışmaları, belirgin farklılık olmadığı şeklinde sonuçlanmıştır. Ancak, pankreatik fonksiyon gözönüne alındığında, genellikle pankreatik açıdan yeterlilik gösteren grubun, pulmoner hastalığının da hafif seyir gösterdiği saptanmıştır. Bu duruma en güzel örnek ise R117H mutasyonudur(8). Bronkoskopi ile elde edilen bronşiyal epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, klinik olarak kistik fibroz düşünülmeyen ve ter testi sonuçları normal sınırlarda olan 78 hastanın CFTR geninin mRNA transkriptleri çalışılmıştır. Hastaların 4'ünde, 9. eksonun çeşitli oranlarda delesyona uğradığı ve buna rağmen kistik fibroz bulgusu vermediği saptanmıştır(11). Beslenme durumu ile akciğer fonksiyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir(28). Yine, ter testi < 40 mmol/L olan Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz'lu (ABPA) 11 hastanın CFTR geni analizi sonucu, 1 hastanın $\Delta F508/R347H$ birleşik heterozigot ve 5 hastanın ise heterozigot (4 tanesi $\Delta F508$ ve biri R117H) olduğu saptanmış ve $\Delta F508$ mutasyonu ile ABPA arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır(69).

Pankreatik Tutulum: Kistik fibroz'lu hastaların yaklaşık %15'inde pankreatik fonksiyonlar normaldir. Pankreatik yeterlilik ile seyreden bu grup

kistik fibroz hastalarında, pulmoner fonksiyonlardaki bozukluğun daha hafif seyirli olduğu, ter elektrolit konsantrasyonlarının daha düşük saptandığı ve yaşam sürelerinin pankreatik yetmezlikle seyredenlere oranla daha uzun olduğu gösterilmiştir(107). 538 vakalık bir seride, hastaların %87'sinde pankreatik yetmezlik sonucu steatore gözleendiği ve bu hasta grubunun ortalama yaşam süresinin 16 yıl olduğu gösterilmiştir. Hastaların %13'ünün normal pankreatik fonksiyon gösterdiği, bunlardan sadece birinin çalışma sırasında öldüğü ve bu grupta ortalama yaşam süresinin 26 yıl olduğu bildirilmiştir(53).

Genel bir kural olarak, nonsense, frameshift, splice site ve birçok missense mutasyonları, "şiddetli" seyreden hastalık grubuna girmekte ve fenotipik olarak pankreatik yetmezlikle seyretmektedir.

Mekonyum İleusu: Küçük bir hasta serisinde yapılan bir çalışmada, G542X mutasyonu ile mekonyum ileusu arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır(53). Ancak, bu daha geniş bir seride yapılan başka bir çalışmada onaylanmamıştır(101). Homozigot $\Delta F508$ olgularda %14.5 ve $\Delta F508/G542X$ birleşik heterozigotlarda ise %23.8 mekonyum ileusu tablosuna rastlanmıştır. Ayrıca, mekonyum ileuslu doğan bebeklerde ileride pankreatik yetmezlik gelişme riski çok yüksektir. Mekonyum ileusunun, pankreatik yetmezliğin şiddetli bir formu olduğu vurgulanmıştır(49). G551D/ $\Delta F508$ birleşik heterozigot olgular ile $\Delta F508$ homozigotların klinik seyirleri arasında belirgin bir fark bulunmamasına rağmen, ilk grupta mekonyum ileus riskinin çok daha az olduğu belirlenmiştir(37).

Terde Klorür Düzeyleri: Bugüne kadar çalışılmış mutasyonların hemen hemen tümünde ter testi yüksek bulunmuştur. Geniş bir seride yapılan çalışmada, ter testi değerleri 100 mmol/L üzerinde saptanmıştır(101).

Hastalığın bu 4 majör ortaya çıkış şekli dışında ayrı bir öneme sahip bir mutasyon da R117H mutasyonudur. Eğer bir allelde R117H mutasyonu, diğerinde de "şiddetli" klinik tabloya neden olan bir mutasyon varsa, erkek hastalarda fenotipik olarak konjenital bilateral vas deferens yokluğu, kız çocuklarda ise, ya tamamen normal ya da kronik sinüzit fenotipi ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle R117H mutasyonu saptandığında, Özellikle erkeklerde infertilite açısından önemli olduğundan, dikkatle değerlendirilmesi gerekmektedir(8).

Sonuç olarak, fenotip-genotip çalışmalarında, genotipik bilginin özellikle pankreatik fonksiyon açısından prognostik önem taşıdığı yorumu yapılabilir.

7.Tarama Çalışmaları:

Avrupa kökenli beyaz ırkta taşıyıcı sıklığı ortalama 1:25 (%4) tir(35,70,96). Eğer hem anne hem de baba taşıyıcıysa, hasta çocuk doğma olasılığı 1:4 tür. Taşıyıcılık oranının bu kadar sık olması, hem genel popülasyonda hem de neonatal dönemde tarama yapılmasını gündeme getirmiştir. Ancak bugüne dek, gen üzerinde 384 mutasyon saptanmış olması ve bu rakamın her sene artış göstermesi, tarama çalışmalarında en büyük zorluğu oluşturmaktadır.

$\Delta F508$ ve diğ er sık mutasyonların incelenmesi ile taşıyıcı saptama oranı %90'lara yaklaşmış sa da, Amerikan İnsan Genetiğ i Derneğ i, populusyonda genel bir tarama yapılmasını tavsiye etmemiş, fakat pilot ç alışmaların yapılabileceğ ini belirtmiş tir. Aynı dernek ve bazı diğ er araştırmacılar, taşıyıcı testlerinin kistik fibroz aile öyküsü bulunanlara uygulanmasını önermiş tir(31,96). Taşıyıcı testlerinden önce populusyonda $\Delta F508$ dışında sık görülen mutasyonların saptanması gerekmektedir. Bu arada hastalık hakkında toplumun bilinçlendirilmesi, anketler düzenlenmesi, bir tarama planı hazırlanması, danışmanlık merkezlerinin kurulması ve programa dahil edilen grupta oluşması muhtemel psikolojik ve sosyal sonuçların değ erlendirilmesi gerekmektedir(55,93,111,119). Tarama ç alışmalarında, ilk başlarda immünoreaktif tripsinojen ve haplotip ç alışmaları yapılmakta iken, genin izolasyonundan sonra, doğ rudan mutasyon ç alışmaları yapılmaya başlanmış tir(40). Mutasyon saptanmasında metod seç imi de son derece önemlidir. Seç ilcek metodun güvenilir, duyarlı, spesifik ve ucuz olması tercih edilir. Kistik fibroz mutasyon analizleri için kullanılan standart metodlar arasında, PAGE ile delesyon tayini, PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, iç aretlenmiş allel spesifik oligonükleotidler (ASO), ARMS ve Reverse Dot Blot Hibridizasyon sayılabilir (24,68,74,75,99,110). Denatüran gradiyent jel elektroforezi (DGGE) ile, gen üzerindeki mutasyonun hangi eksonda lokalize olduğ u saptanabilir ve bu yöntemle tüm gen taranabilir(67).

Tarama ç alışmaları genel populusyona yönelik olmaktan başka, neonetal (43,81,95) ve prenatal (7,65,66) dönemde de yapılabilir. Homozigotların, yenidoğ an döneminde teş his edilmiş olmasının prognozu nasıl

etkileyeceği konusunda henüz yeterli sayıda çalışma yoktur. Ancak, erken tanı, infeksiyonla mücadele ve beslenmede başarı şansını artıracaktır(43). Yine de tarama çalışmasının olumlu ve olumsuz sonuçları çok iyi değerlendirilmelidir(64). Taşıyıcıların neonatal dönemde saptanmasının diğer bir önemi ise, aile için uyarıcı özellik taşıması ve böylece annenin sonraki gebeliklerinde prenatal tanıya imkan vermesidir(43).



GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Araç ve Gereçler:

1.1. Cihazlar:

1. Coulter Counter	Coulter T-890
2. Soğutmalı masa üstü santrifüj	Eppendorf centrifuge 5403
3. UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
4. Mikrosantrifüj	Fisher 235 B
5. Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus
6. Speed Vac Konsantratör	Savant SVC 100H
7. Elektroforez Tankı	Sigma-Aldrich Techware
8. Derin Dondurucu	Bosch
9. Kar Makinası	Scotsman AF-10
10. Polaroid Kamera	MP4 Land Camera
11. Su Banyosu	
12. Etüv	
13. Analitik Terazı	Mettler AJ 100
14. pH metre	Beckman Century SS 1
15. Otomatik pipet	Gilson 20,100,200,1000 µl

1.2. Kimyasal Maddeler:

1. Proteinaz K
2. Deoksi Adenozin Trifosfat
3. Deoksi Sitozin Trifosfat
4. Deoksi Guanozin Trifosfat
5. Deoksi Timidin Trifosfat
6. Taq Polimeraz
7. Spermina
8. Bovin Serum Albumin
9. Primerler
10. Akrilamid
11. Amonyum Persülfat
12. Etidyum Bromid
13. TEMED

Diğer tüm kimyasal maddeler analar kalitesinde olup, Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

2. Örnek Toplama:

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Metabolizma Polikliniğine başvurup, klinik bulguları ve ter testi sonuçları ile kistik fibroz düşünülen hastalardan EDTA'lı tüplere 5 ml kan örneği alındı. Örneklerin toplanması sırasında hasta çocukların ebeveynlerinin doldurması için bir form hazırlandı. Bu formlarda hastanın adı, soyadı, cinsiyeti ve yaşı gibi kimliklendirmeye ait bilgilerin yanısıra, klinik seyir ve ter testi sonuçları da yer almaktaydı. Pediatrik Metabolizma Bölümünden başka, Kadın Doğum Servisinden de kan örnekleri gönderildi. Kadın Doğum Servisine prenatal tanı için başvuran iki çiftin $\Delta F508$ taşıyıcılığı açısından taraması yapıldı. Anabilim Dalımıza ulaşan örneklerin Coulter Counter ile hematolojik değerleri belirlendikten sonra lökosit DNA'ları izole edildi. Tarama çalışması, Biyokimya Anabilim Dalı tarafından talasemi taraması için toplanmış, hematolojik parametreleri normal sınırlarda olan kan örneklerine uygulandı.

3. Analiz Yöntemleri:

3.1. Coulter Sayımı:

Prensip:

Hücrelerin geçişi sırasında oluşan elektrik potansiyelindeki değişimleri ölçmek suretiyle hücre sayımı yapılır. Elektrik iletimine olanak sağlayan bir sıvı içinde bulunan iki platin elektrod arasından düzenli ve sabit bir akım geçer. Hücreler önce dilüe edilir ve oluşan süspansiyon sabit bir hızla emilir. Dar bir haznedan teker teker geçebilen hücreler potansiyel enerji farkını değiştirir(6).

MCV (Mean Corpuscular Volume), hacim-yükseklik ölçümü ile saptanır.

Hematokrit, MCV ve kırmızı hücre sayısından hesaplanır:

$$\% \text{ hematokrit} = \text{Kırmızı hücre sayısı} \times \text{MCV}$$

MCH (mean corpuscular hemoglobin) ve MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) de hesaplanarak bulunur:

$$\text{MCH (pg)} = \frac{10 \times \text{Hb}}{\text{Eritrosit Sayısı}}$$

$$\text{MCHC (g/dl)} = \frac{100 \times \text{Hb}}{\text{Hematokrit}}$$

EDTA'lı tüplerdeki kan birkaç kez alt-üst edilir. Coulter T-890 cihazı otomatik olarak belirli bir miktar kanı emer ve sonuçlar bir yazıcı yardımıyla kağıda aktarılır.

3.2. Tam Kandan DNA Eldesi:

Prensip:

Tam kandaki eritrositler hipotonik lizis çözeltisi ile patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositler ayrıştırılır. Sodyum klorür-tris-EDTA (STE) çözeltisi ile lökosit pelleti süspansiyon edilerek sodyum dodesil sülfat (SDS) ve Proteinaz K eklenmesiyle hücre zarları ve proteinler hidroliz edilir. Bir gece inkübasyondan sonra proteinler ve hücre artıkları fenol-kloroform ile uzaklaştırılarak DNA purifiye edilir. Daha sonra soğuk saf etanolde çöktürülmek suretiyle genomik DNA elde edilir(121).

Ayırıcılar:

1. Retik Salin Çözeltisi

NaCl 40.9 g

KCl 1.85 g

MgCl₂.6H₂O 7.1 G

Distile su ile litreye tamamlanır.

2. Lizis Çözeltisi (Günlük Hazırlanır):

131 mM NH₄Cl 7.14 g/L

0.9 mM NH₄HCO₃ 0.07 g/L

Distile su ile litreye tamamlanır.

3. STE Çözeltisi:

0.1 M NaCl 5.844 g

0.05 M Tris 6.057 g

1 mM EDTA 0.3722 g

Distile su ile litreye tamamlanır. NaOH veya HCl kullanılarak pH 7.4'e ayarlanır.

4. Proteinaz K Çözeltisi:

25 mg proteinaz K, pH'sı 7.4 olan 10 mM'lık 2.5 ml Tris içerisinde çözülür ve -20 °C'de saklanır.

5. Fenol:

İçinde %0.1 hidroksi kinolin içeren 200 mM Tris pH:8.5 tamponu hazırlanır. 1000 g fenol 500 ml saf suda çözülür ve tris tamponu ile eşit hacimde karıştırılır. İyice çalkalandıktan sonra fazlar ayrışincaya kadar bekletilir. Tamponun pH'sı ölçülür. pH 8'in altında ise tampon dökülerek yeni tampon eklenir. Aynı işleme pH 8.0 oluncaya kadar devam edilir. Buzdolabında saklanır.

6. Fenol/Kloroform : 1:1 hacimde

7. TE Solüsyonu:

10 mM Tris 1.2114 g

1 mM EDTA 0.3722 g

pH:7.4'e ayarlanır.

Yöntem:

1. EDTA'lı tüpe 5 ml kan alınır.
2. 15 ml'lik tüpe aktarılarak üzerine eşit miktarda 1 x retik salin eklenir.
3. 2500 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilir.
4. Supernatan aspire edilir. Beyaz küre tabakasının aspire edilmemesine dikkat edilmelidir.
5. 1 x retik salin ile yıkama işlemi üç kez tekrar edilir.
6. Günlük hazırlanmış lizis solüsyonu ile eritrositler patlatılır. Oda ısısında 5-10 dakika yavaşça karıştırılır.
7. 4°C ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
8. Supernatan atılır ve lizis işlemi üç kez tekrar edilir.
9. Dipteki lökosit pelleti, 5 ml STE içerisinde süspansiyon edilir ve parçalanır. İçine 1/20 oranında %20'lik SDS ve 100 µl proteinaz K eklenerek 37°C'de bir gece bekletilir.
10. Ertesi sabah solüsyon visköz bir hal alır. Eğer lökositler tam parçalanmamışsa iki saat daha inkübasyonda bırakılır.
11. Eşit hacimde fenol eklenir.
12. Yavaş bir şekilde 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir.
13. 4°C ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
14. Altta kalan visköz faz pastör pipetiyle atılır.

15. 2.5 ml fenol ve 2.5 ml kloroform eklenir.

16. Yavaş bir şekilde 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 4°C ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

17. Altta kalan vizköz faz pastör pipetiyle atılır.

18. 5 ml kloroform eklenir. Yavaş bir şekilde 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 4°C ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

19. Üstteki sıvı faz %95'lik soğuk etanol içine dökülür ve DNA'nın derhal hava kabarcıkları şeklinde presipite olduğu gözlenir.

20. DNA %70'lik etanol içine aktarılarak yıkanır. 2 dakika santrifüj edilir.

21. Alkol dökülür; içinde kalan az miktar ise speed vac'a konarak uçurulur.

22. DNA pelleti üzerine bir miktar TE eklenerek 37°C'de bir gece inkübe edilir. DNA tamamen çözününce 10 µl'si 590 ml saf su ile karıştırılıp 260 nm'deki absorbansı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanır.

$$\text{OD}_{260} \times \text{Sulandırma oranı} (60) \times 40 = \mu\text{g/ml}$$

Hazırlanan DNA'nın 280 nm'deki absorbansı da ölçülerek, OD260/OD280 oranından verimi kontrol edilir. Verimin 1.5 dan daha yüksek olması istenir.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) İle Gen Amplifikasyonu:

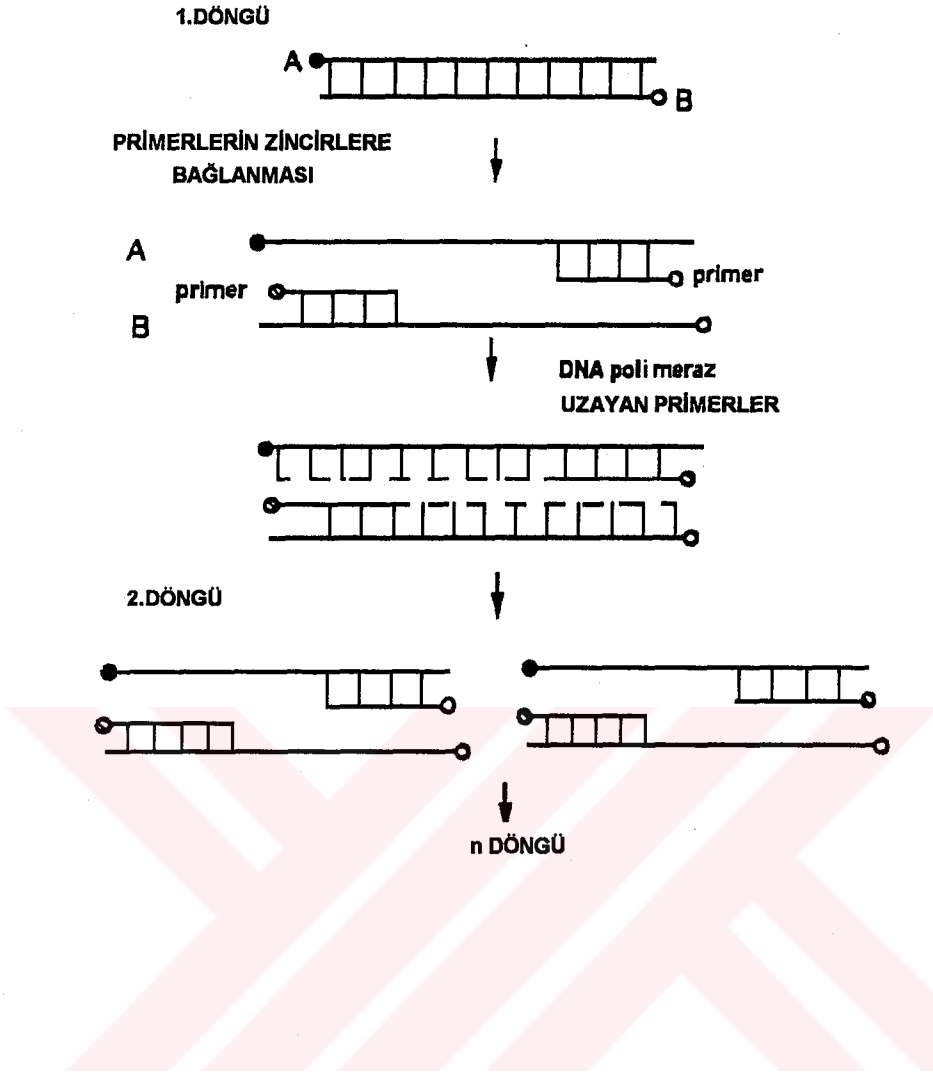
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Prensip:

Yöntemin temeli, genomik DNA'da çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine komplementer bir çift sentetik primer kullanarak, sınırlandırılan DNA dizisinin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. İlk aşamada, DNA'nın iki zinciri yüksek ısıda birbirinden ayrılır. İkinci aşamada, sıcaklık düşürülerek primerlerin, DNA üzerinde uygun alana bağlanması sağlanır. Üçüncü aşama da ise Taq Polimeraz enzimi ile, bu primerlerden başlayarak yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesi gerçekleşir. Bu işlem 25-30 kez tekrarlandığında, DNA'nın bu iki primer ile sınırlandırılan bölgesi, yaklaşık bir milyon kez çoğaltılmış olur (2^n n= döngü sayısı)(Şekil13)(90,94).

3.3.2. 10 x PCR Tamponu :

Tris Hcl pH 8.8	670 mM
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	40 mM
Amonyum Sülfat (NH_4SO_4)	166 mM
β -Merkaptoetanol	100 mM
Bovin Serum Albumin	1 mg/ml
Steril redistile su içinde	10 ml



Şekil 13. Polimeraz zincir reaksiyonu(PCR). Amplifiye edilmek istenen hedef DNA bölgesi çift sarmalli DNA olarak gösterilmiştir: A zinciri ve ona komplementer olan B zinciri. 1. döngüde, DNA denatüre edilir ve kısa oligonükleotid primerlerin yapışması sağlanır. Taq polimeraz, primerin uzamasını sağlar ve hedef DNA bölgesinin iki kopyası oluşur. 2.döngüde, 1. döngü sonucunda oluşan DNA'lar denatüre olur ve 1. döngü tekrarlanır. Böylece hedef DNA'nın 4 kopyası oluşturulmuş olur. n döngü sonucunda 2^n kadar DNA oluşur.

3.3.3. Primerler(122):

Tablo 1. Kistik fibroz 10. ekson amplifikasyonunda kullanılan primerlerin baz dizisi

Primer	Oligonükleotid Dizisi
10i5	5' GCAGAGTACCTGAAACAGGA 3'
10i3	3' CATTACAGTAGCTTACCCA 5'

3.3.4.Spermine + BSA:

0.5 mM Spermina

1 mg/ml BSA

3.3.5.Reversed dNTP:

A (Adenin) → 200 µm

C (Sitozin) → 200 µm

G (Guanin) → 200 µm

T (Timin) → 150 µm

3.3.6.Amplifikasyon Koşulları:

Her örnek için 100 µl olacak şekilde, çalışılacak örnek sayısına göre PCR karışım havuzu hazırlanır(Tablo 2)(102). Karıştırılıp, kısa bir santrifüj işleminden sonra her bir örnek tüpüne bu havuzdan 95 µl pipetlenir. Daha sonra tüplere

5'er μ l spermina + BSA, 0.3 μ l Taq polimeraz ve 1 μ g konsantrasyonda DNA eklenir. Karıştırılıp santrifüj edilir. Amplifikasyona başlamadan önce tüp içeriğinin buharlaşmasını önlemek amacıyla 1'er damla mineral oil damlatılır. Ardından PCR programı uygulanarak amplifikasyon başlatılır.

Tablo 2. Amplifikasyon tüplerinin çözelti konsantrasyonları.

Çözelti	Miktar
10 x Cetus	10 μ l
10i5 Primer 1	3 μ l
10i3 Primer 2	1.5 μ l
Reverse dNTP	1 μ l
Redistile su	80 μ l

3.3.7. PCR Programı:

95°C de 7 dakika süreyle ön denatürasyon yapılır. Amplifikasyon programının bir döngüsünde;

94°C de 30 saniye	Denatürasyon
55°C de 30 saniye	Yapışma (Annealing)
72°C de 1 dakika	Uzama (Extension)

aşamaları bulunmaktadır. 30 döngü tamamlandıktan sonra, amplifikasyon ürününün görüntülenmesi aşamasına geçilir(122).

3.4. Elektroforez ve Yorumlama:

Poliakrilamid jelde yürütülen örnekler, etidium bromid içinde 2-3 dakika bırakılır ve daha sonra distile su içine konarak fazla boyanın çıkması beklenir. Ultraviyole lamba ile oluşan bantlar izlenir. UV ışık altında polaroid kamera ile deney sonucu görüntülenir ve oluşan bantlar değerlendirilir.

3.4.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):

Prensip:

Akrilamid monomerleri, çapraz bağlayıcılar yardımıyla kovalent olarak birbirine bağlanıp uzun zincirler oluşturarak polimerize olurlar. En sık kullanılan çapraz bağlayıcı N,N'-Metilen bisakrilamiddir. Poliakrilamidin polimerizasyonu amonyum persulfat ile başlatılır ve N,N,N',N'-tetrametilendiamid (TEMED) ile katalize edilir.

Ayırıklar:

1. Akrilamid Stok Solüsyon: 100g akrilamid ve 2.7g bisakrilamid bir miktar saf suda çözülür ve 250 ml ye saf su ile tamamlanır.

2. Tris-Borat-EDTA (TBE x 10) Tamponu:

1 M Tris (baz) 121.1g

1 M Borik Asit 61.83g

0.1 M 200 ml EDTA

1 Litreye arık su ile tamamlanır ve pH=8.0'e ayarlanır.

3. Amonyum Persulfat (APS):

4. TEMED:

Yöntem:

Kalınlığı 3mm, boyutları 10x10 olan bir çift cam, deterjan ile çok iyi yıkandıktan sonra etil alkolden geçirilir. Camlardan yuvarlak kenarlı olana özel lastik şerit takılarak, iki cam kıskaçlarla birbirine tutturulur. Camların arasına, kenarlara gelecek şekilde, 0.5 mm kalınlığındaki "spacer" lar yerleştirilir. Camların üst kısımları farklı uzunlukta olup, jel dökerken uzun olan kısım zemine 45° açı oluşturacak şekilde eğilir ve hazırlanan jel iki cam arasına dökülerek doldurulur. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilir. Jel dökülür dökülmez tarak yerleştirilir. Bir miktar jel, bir ependorf tüpüne alınarak donup donmadığı kontrol edilir. Jelin donduğundan emin olduktan sonra, iki cam arasına sıkıştırılmış olan lastik şerit dikkatlice çıkartılır. Elektroforez tankı, 1 x TBE tamponu ile doldurulur. Camlar tanka dikey olarak yerleştirilir ve tamponla ıslanması sağlanarak, kuyuları zedelemeyen, tarak çıkartılır. Kuyular, tamponla yıkanarak jel artıklarından temizlenir.

Jel Hazırlanması:

Jel, akrilamid konsantrasyonu %8 olacak şekilde hazırlanır(Tablo 3).

Tablo 3. %8'lik poliakrilamid jelin içeriği.

Çözelti	Miktar
Arik Su	7 ml
10 x TBE	1 ml
Akrilamid Stok	2 ml
Amonyum Persulfat	100 µl
TEMED	10 µl

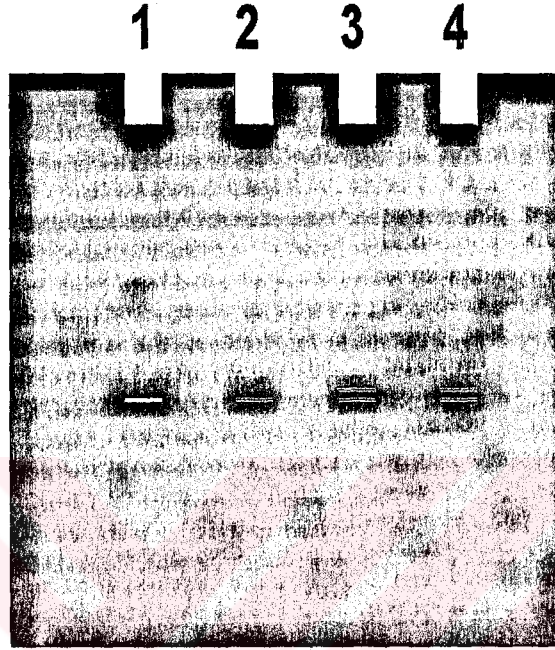
Her bir kuyuya amplifiye DNA'dan 20 μ l ve 1.5 μ l xylencyanol boyası karıştırılarak aplike edilir. 150 Volt'ta 1 saat yürütülür. Daha sonra, 2-3 dakika etidyum bromid içinde ve 15 dakika saf suda bekletilerek, UV lamba altında oluşan bantlar izlenir.

3.4.2. Heteroduplex Oluşumu:

Mutasyon taramasında kullandığımız heteroduplex analiz yöntemi ilk kez 1989 yılında farelerde Y geni çalışmaları sırasında ortaya konmuş ve delesyon/insersiyon mutasyonlarının saptanmasında son derece faydalı olduğu gösterilmiştir(72). Rommens, yöntemi, Δ F508 mutasyonunu göstermeye yönelik kullanmış ve 1990 yılında yayınlamıştır(86).

Δ F508 mutasyonunu içine alan 100 baz çiftlik bir bölgenin çoğaltılması, homozigotlarda 97 baz çiftlik bir parçanın çoğaltılması ile sonuçlanır. Birbirinden çok az farklı iki DNA parçasının jel elektroforezi ile ayrıştırılması mümkün değildir. Fakat normal ve Δ F508 homozigot olan örnekler birbirleriyle karıştırılıp tekrar amplifiye edilirse, tam uyuşmayan baz çiftleri içeren heterodupleksler oluşmakta ve farklı bir elektroforetik özellik göstermektedir. Normal örnek ve homozigot olduğu düşünülen örnek karıştırılıp, amplifiye edildikten sonra, PAG üzerinde yürütülür. Tek bandın görülmesi normal, çift bandın varlığı ise homozigot Δ F508 taşıyan kistik fibroz hastalığına işaret eder. Taşıyıcı durumunda ise, PCR ürünü hem normal hem de Δ F508 taşıyan parçaların

oluşumuna neden olacağından doğrudan çift bant gözlenir. Radyoaktivite içermemesi ve kolay uygulanabilir oluşu en önemli avantajdır(Şekil 14).



Şekil 14. Poliakrilamid jel'de heteroduplexlerin şematik görünümü. 1. Normal olgu; 2. Homozigot olgu; 3. Heterozigot olgu; 4. Homozigot DNA ile normal DNA karıştırılarak oluşan heteroduplex bantlar.

$\Delta F508/F508C$ birleşik heterozigot olgularda da, $\Delta F508$ heterozigotlarda olduğu gibi, heteroduplexlerin oluşabildiği, fakat oluşan bu bantların farklı oldukları saptanmış ve ayırımın dikkatle yapılması gerekliliği vurgulanmıştır(57).

3.5. Ter Testi:

Pilokarpin iyontofrez tekniği ile toplanan terde, klorür miktarının ölçülmesi esasına dayanır. 35 mmol/L üzerindeki değerler yüksek kabul edilir(41).



BULGULAR

Çalışma süresince, toplam 101 kromozom üzerinde $\Delta F508$ mutasyonu tarandı. İncelenen 101 kromozomdan 43 tanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda klinik olarak Kistik Fibroz tanısı konmuş çocuklardan temin edildi. 8 kromozom ise, daha evvel Kistik Fibroz nedeniyle çocukları ölmüş olan ve prenatal tanı olanaklarını araştıran 4 çiftten elde edildi. Ayrıca genel olarak taşıyıcılık oranı hakkında fikir vermesi amacıyla, Kistik Fibroz hastalığı ile ilgili herhangi bir şikayeti bulunmayan 50 çocuktan da kan örnekleri toplanarak $\Delta F508$ mutasyonu tarandı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışılan kan örneklerinin sayısı ve alındığı yerlere göre dağılımı.

	Sayı (n)	Kaynak
Kistik Fibroz Tanısı Konmuş Olgular	43	Pediyatrik Metabolizma
Prenatal Tanı Başvurusu	8	Kadın-Doğum Polikliniği
Heterozigot Taraması	50	Biyokimya Anabilim Dalı

Kistik Fibroz tanısı konmuş çocukların yaşları 3 aylık ile 14 yaş arasında değişmekteydi. Hastalığın otozomal resesif kalıtılmasından dolayı ailelerin akrabalık düzeyleri de incelendi. Hasta çocukların ailelerinde %32 oranında yakın ve uzak akrabalık saptandı (Tablo 5).

Tablo 5. Kistik Fibroz hastalarının yaş, cinsiyet ve akrabalık oranları.

	n	YAŞ		AKRABALIK n(%)
		Ortalama (SD)	Dağılım	
ERKEK	31	7.2 ± 4.4	4ay-14yaş	9(29)
KIZ	12	4.7 ± 3.7	3ay-11yaş	5(42)
TOPLAM	43	6.5 ± 4.3	3ay-14yaş	14(32)

Kliniğe başvuran hastalar Kistik Fibroz'un en sık görülen semptomları olan sık akciğer enfeksiyonu, büyüme-gelişme geriliği ve malabsorbsiyon tablosu ile gelmişlerdir. Bu semptomların bir veya birkaçı birarada bulunabilmektedir(Tablo 6).

Tablo 6. Kistik Fibroz'lu hastaların klinik görünüşleri.

	n	%
Sık Akciğer Enfeksiyonu	20	46
Büyüme-Gelişme Geriliği	11	26
Kronik İshal	8	19
Sık Akciğer Enfeksiyonu + Kronik İshal	4	9
TOPLAM	43	100

Klinik olarak şüphelenilen Kistik Fibroz hastalarına en az iki kere olmak üzere ter testi uygulanmıştır. İyontoforetik stimülasyon ile elde edilen terde ölçülen klor değerinin referans aralığı 5-35 mEq/L dir. Kistik Fibroz'lu hastaların yaklaşık %98'inde yüksek değerler elde edilmektedir(41). Hastaların ter testi sonuçlarının diagnostik olarak alt sınırı 50 mEq/L olarak belirlenmiştir. Hastaların ter testi sonuçlarının, klinik prezentasyonlarına göre ortalama ve standart sapmaları tabloda özetlenmiştir(Tablo 7).

Tablo 7. Kistik Fibroz tanısı konmuş hastaların ter testi sonuçları.

KLİNİK FORM	TER TESTİ SONUCU x ± SD (mEq/L)
Sık Akciğer Enfeksiyonu	74.3 ± 19.6
Büyüme-Gelişme Geriliği	72.1 ± 20.7
Kronik İshal	72.8 ± 18.5
Genel Ortalama	73.1 ± 20.4

Bölümümüze gönderilen kanların lökositlerinden DNA eldesi işleminden önce rutin bir işlem olarak Coulter Counter ile hematolojik parametreleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir. Referans aralıklar o yaş grubuna aittir.

Tablo 8. Kistik Fibroz tanısı konmuş çocukların hematolojik değerlendirmeleri.

	x ± SD	Min	Max	Referans Aralık
Hb (g/dl)	11.8 ± 1.3	9.1	13.8	11-15
Rbc x 10 ^{12/L}	4.45 ± 0.65	4.03	5.18	3.9-5.1
Hct %	38 ± 3.8	31.1	48.5	31-43
MCV (fl)	83.3 ± 7.1	71.3	100.2	68-90
MCH (pg)	25.9 ± 2.9	19.6	32.6	24-32
MCHC (g/dl)	31.1 ± 2.0	27.2	34.4	32-37
WBC x 10 ^{9/L}	8.1 ± 2.5	4.7	17.0	4-13.5

Örneklerin DNA'ları fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile izole edildikten sonra, 260 nm dalga boyunda DNA konsantrasyonu ve 280 nm dalga boyunda ise protein konsantrasyonlar ölçülerek DNA yoğunluğu ve verimi ölçülmüştür. Elde edilen bulgular tablo 9 da gösterilmiştir.

Tablo 9. DNA izolasyonu ile elde edilen konsantrasyonlar.

Hastalar	O.D. ₂₆₀	O.D. ₂₈₀	O.D ₂₆₀ /O.D. ₂₈₀	Konsantrasyon (µg/ml)
1.H.T	0.238	0.125	1.90	286
2.O.A.	0.122	0.074	1.65	146
3.T.T	0.147	0.106	1.38	176
4.A.S	0.146	0.107	1.36	175
5.M.Ç.	0.132	0.100	1.32	158
6.A.K.	0.192	0.136	1.41	230
7.A.K.	0.203	0.142	1.42	244
8.İ.S.	0.176	0.095	1.85	211
9.M.A.	0.175	0.120	1.46	210
10.N.A.	0.125	0.089	1.40	150
11.M.Ü.	0.171	0.128	1.33	205
12.A.G.K.	0.173	0.106	1.63	208
13.B.C.	0.238	0.151	1.58	285
14.D.Ç.	0.172	0.112	1.54	206
15.M.C.K.	0.174	0.109	1.59	208
16.İ.Y.	0.238	0.159	1.50	286
17.A.Ş.	0.174	0.113	1.53	208
18.S.G.	0.225	0.153	1.47	270
19.H.T.	0.277	0.177	1.57	332
20.M.B.	0.397	0.246	1.61	476
21.M.E.K.	0.181	0.123	1.47	217
22.E.P.	0.225	0.149	1.51	270
23.A.A.	0.260	0.153	1.70	313
24.H.T.	0.203	0.142	1.43	244
25.A.K.	0.287	0.202	1.42	345
26.V.Y.	0.156	0.104	1.50	187
27.N.A.	0.266	0.191	1.39	319
28.A.K.	0.240	0.170	1.41	288
29.E.Y.	0.350	0.262	1.34	420
30.M.A.	0.277	0.198	1.40	332
31.A.B.	0.268	0.178	1.51	322
32.M.B.	0.235	0.170	1.38	282
33.H.T.	0.566	0.402	1.41	679
34.A.E.B.	0.592	0.386	1.53	652
35.S.A.	0.156	0.115	1.48	187
36.M.O.	0.170	0.110	1.55	204
37.M.Ç.	0.117	0.072	1.62	141
38.O.K.A.	0.146	0.105	1.40	175
39.E.B.	0.120	0.073	1.64	144
40.T.Ö.	0.215	0.145	1.48	258
41.D.Ö.	0.132	0.112	1.30	158
42.V.A.	0.203	0.138	1.47	244
43.B.Ş.	0.207	0.147	1.41	248

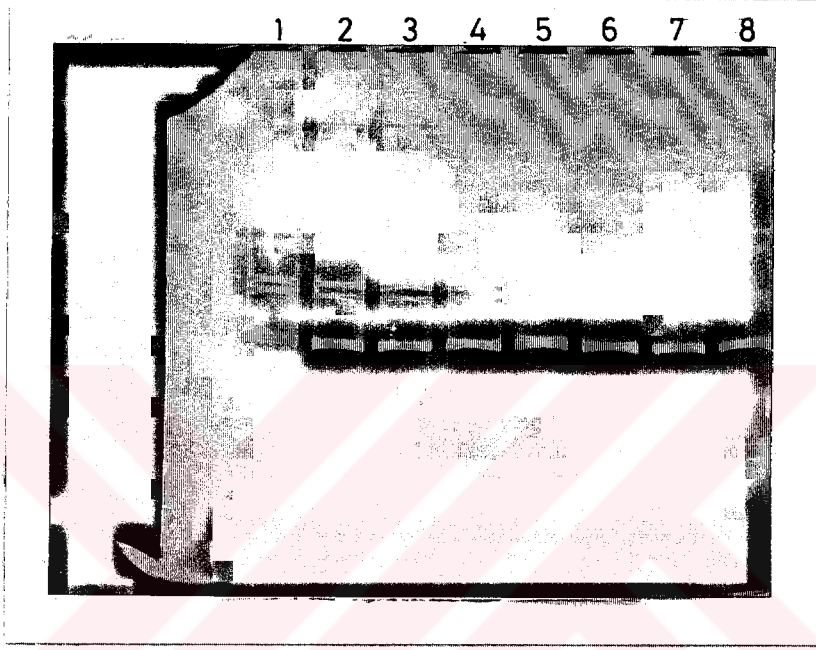
2 yıl önce, mekonyum ileuslu doğan ve 3 aylıkken ölen çocuk öyküsü bulunan F.Ö.-K.Ö. çiftinin yapılan $\Delta F508$ mutasyon taramasında her ikisinin de heterozigot olduğu tesbit edildi(Şekil 15).



Şekil 15. F.Ö.- K.Ö. çiftinin $\Delta F508$ mutasyon tarama sonucu. 1. Normal DNA
2. Homozigot kontrol DNA; 3. Heterozigot kontrol DNA; 4. F.Ö.; 5. K.Ö.

Şekil 15' de görüldüğü gibi, hem F.Ö. hem de K.Ö.'nün amplifiye DNA'ları poliakrilamid jelde yürütüldüğünde, heterozigot olduklarını belirten heteroduplex bantlara rastlanmıştır. Aileye , daha sonraki gebelikler için prenatal tanı önerilmiştir.

Pediatric polikliniğinde klinik ve ter testi ile Kistik Fibroz tanısı konan iki çocuk hastada ise, birer allelerinde $\Delta F508$ mutasyonunu taşıdıkları belirlendi(Şekil 16).

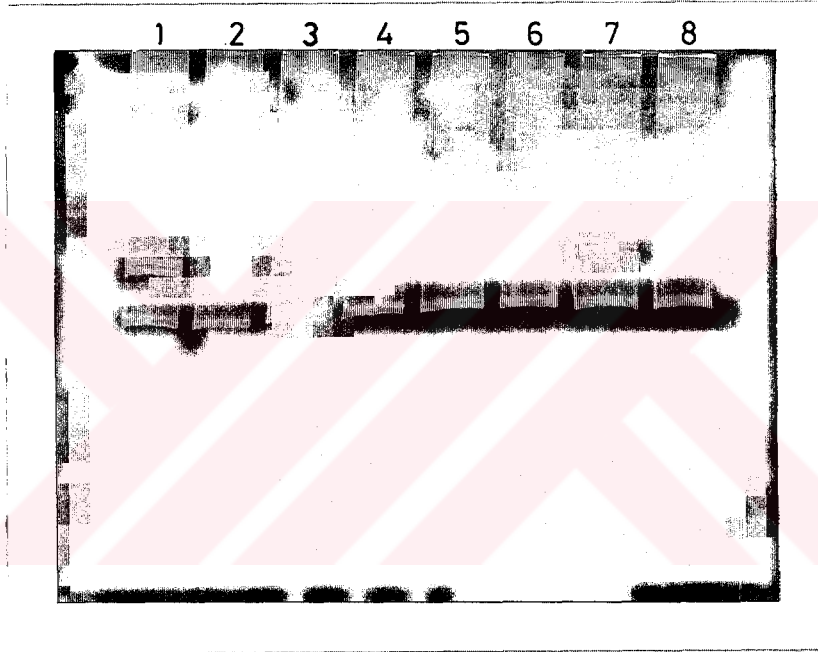


Şekil 16. İki kistik fibroz hastasında heteroduplexlerin görünümü.

1. Heterozigot kontrol; 2. A.S.; 3. M.Ç.; 4. M.Ç.+ Normal DNA
- 5,6,7 ve 8 $\Delta F508$ mutasyonu içermeyen olgular.

A.S. ve M.Ç. de heteroduplexlerin görülmesi, $\Delta F508$ taşıyıcısı olduklarını belirtir. Ancak, klinik bulguları göz önüne alındığında, bu olguların birleşik heterozigot olduklarını düşünmek daha doğrudur. Tek bant veren olguların DNA'ları, daha sonra, normal olduğu bilinen bir DNA ile karıştırılarak tekrar yürütülmüş ve heteroduplexlerin oluşmadığı gözlenmiştir.

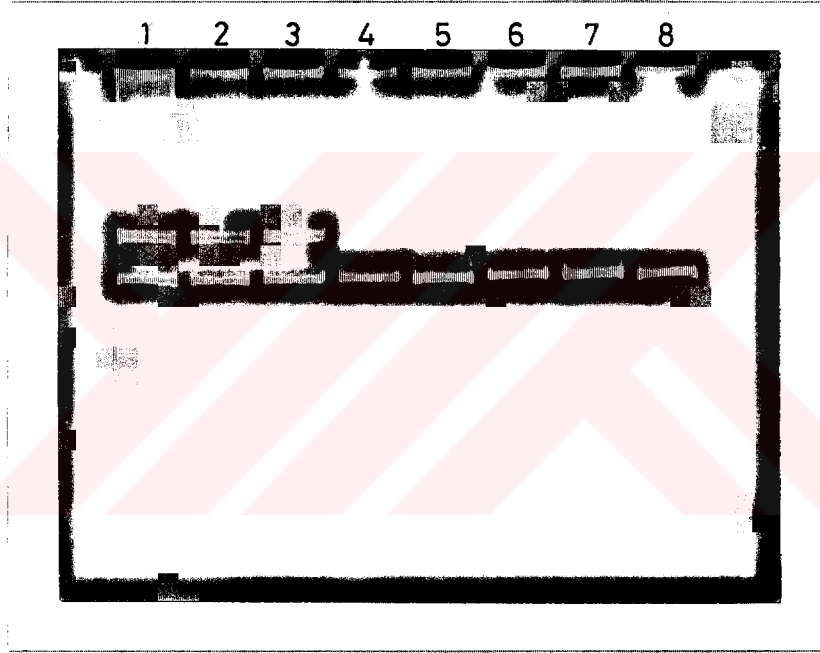
Çalışılan tüm kromozomlar arasındaki tek $\Delta F508$ homozigot olgu olan S.G. nin DNA'sı ilk önce tek bant vermiş; normal bir DNA ile karıştırılıp tekrar yürütüldüğünde ise heteroduplex oluşum gözlenmiştir(Şekil 17).



Şekil 17. Normal DNA ile karıştırılarak elde edilen heteroduplexlerin görünümü.

1. Heterozigot kontrol; 2. Homozigot kontrol; 3. Homozigot kontrol + Normal DNA; 4,5,6 ve 8 Normal olgular; 7. Homozigot hasta

Homozigot olduğu ispatlanan S.G. nin anne ve babası da $\Delta F508$ açısından araştırıldı ve her ikisinin de $\Delta F508$ taşıyıcısı olduğu gösterilerek tanı ispatlandı(Şekil 18).



Şekil 18. Homozigot olgunun anne ve babasında heteroduplexlerin görünümü.

1. Heterozigot kontrol; 2. Anne; 3. Baba; 4,5,6,7 ve 8 Normal olgular.

43 çocuk ve 8 erişkinden elde edilen DNA'lar çalışıldığında, sonuç olarak toplam 7 heterozigot ve 1 homozigot olgu saptandı. $\Delta F508$ sıklığı çalışılan 51 kromozomda % 15.7 olarak belirlendi(Tablo 10).

Tablo 10. Çalışılan örneklerde $\Delta F508$ mutasyonu sıklığı.

	HETEROZİGOT n(%)	HOMOZİGOT n(%)	TOPLAM n(%)
Pediatric Hastaları n=43	2 (4.7)	1 (2.3)	3 (7.0)
Prenatal tanı başvurusu n=8	5 (62.5)	---	5 (62.5)
TOTAL n=51	7 (13.7)	1 (2.0)	8 (15.7)

Tarama amacıyla çalışılan 50 kromozomun hiç birinde $\Delta F508$ mutasyonuna rastlanmadı.

TARTIŞMA

Kistik Fibroz'un Avrupa ve Amerika'lı beyaz ırkda gözlenen en sık genetik hastalık olması ve %4 gibi yüksek bir taşıyıcılık sıklığı göstermesi, hastalığı, üzerinde en sık çalışma yapılan genetik hastalıklardan birisi haline getirmiştir. Özellikle 1989 yılında hastalığa sebep olan hasarlı membran proteinini kodlayan genin bulunması ile, Avrupa'nın hemen hemen tüm merkezlerinden hastalığın sıklığı ve mutasyonları hakkında bilgiler yayınlanmaya başlamıştır. Tüm mutant kromozomların %67'sini oluşturan $\Delta F508$ mutasyonunun Avrupa haritası çıkarılmıştır(100,102).

1990 yılında Avrupa'nın 35 merkezinden gelen sonuçlar Human Genetics dergisinde özel bir sayı olarak yayınlanmış ve bu mutasyonun dağılımı üzerine tartışmalar başlamıştır. Türkiye'de Kistik Fibroz'un genetiği üzerine yapılan çalışmalar son derece kısıtlı olduğundan, Türk popülasyonundaki $\Delta F508$ sıklığını saptamak üzere, Almanya'da yaşayan Türklere bir çalışma yapılmış ve sıklık %27 olarak bulunmuştur(44). Sonraki yıllarda Boğaziçi Üniversitesi Biyoloji Bölümünün yaptığı çalışmada toplumumuzdaki $\Delta F508$ sıklığı %15 olarak saptanmıştır(77). Bizim bulduğumuz %15.7 oranı da bu veriyi desteklemektedir. Ancak Avrupa'daki sıklık incelendiğinde, $\Delta F508$ mutasyonunun çok daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Her ne kadar Avrupa'nın güney-doğusuna doğru, sıklıkta bir azalma söz konusu ise de, bize en yakın komşu ülkeler olan Yunanistan ve Bulgaristan'da sıklık sırasıyla %54 ve %56'dır(3,47). $\Delta F508$ sıklığının Avrupa'daki merkezlere göre dağılımı Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Avrupa'nın çeşitli merkezlerindeki $\Delta F508$ sıklığı ve taranan kromozom sayıları(108).

MERKEZLER	$\Delta F508$ SIKLIĞI(%)	KROMOZOM SAYISI
Yunanistan	54.1	105
Belçika (Brüksel)	76.0	83
İspanya (Madrid)	50.0	194
Fransa (Paris)	67.0	124
Güney Fransa	64.0	235
Belçika (Liege)	78.0	107
İtalya (Milano)	53.4	175
İrlanda (Dublin)	76.0	88
Portekiz	52.0	46
Almanya (Eski Doğu)	62.0	194
Hollanda	77.0	190
İngiltere (Londra)	71.5	144
Almanya (Türk Pop.)	27.0	30
İspanya (Malorka)	66.0	75
Bulgaristan	56.0	96
Finlandiya	45.0	40
Sardinya	57.0	42
İsrail	32.0	46
Çek Cum.	67.0	167
İskoçya	73.0	108
İtalya (Verona)	42.0	424
Almanya (Frankfurt)	77.3	400
İtalya (Torino)	50.0	20
Rusya	45.0	29
İngiltere (Londra)	70.0	54
Hollanda (Amsterdam)	76.0	152
Danimarka	86.8	304
İngiltere-Manchester	78.5	214
Güney İtalya	54.0	102
Fransa (Paris)	72.5	258
Yugoslavya	39.5	38

Tablo incelendiğinde, 9 ülkenin verilerinin 50'den az kromozom çalışmasından elde edilmiş olduğu gözlenmektedir. Bizim de çalışmamızda taradığımız 51 kromozom, sıklık açısından bir fikir vermektedir. Örnek sayısının artırılmasının sıklık yüzdesini ne şekilde etkileyeceği konusu tartışmalıdır. Örneğin, Londra'da iki farklı grup tarafından yapılan çalışmalarda, bir grup, 54 kromozom çalışarak $\Delta F508$ sıklığını %70 olarak bulurken, diğer grup, 144 kromozom çalışmış ve %71.5 bulmuştur. İki grubun bulguları arasında önemli bir farklılık gözlenmemektedir(38,91). Daha kuzeyde bulunan İskoçya'da ise sıklık %73'dür(62). Diğer taraftan İspanya'nın iki farklı bölgesinde yapılan çalışmalarda, Malorka grubu, 75 kromozomda %66 sıklık saptarken, Madrid grubu 194 kromozom çalışmış ve sıklığı %50 olarak bulmuştur(9,85). Aradaki büyük farklılık, bölgesel ve etnik değişkenliğe bağlanırken, örnekleme sayısının da önemli olabileceği vurgulanmıştır(85). Bu bulguyu destekleyen bir diğer örnek ise, İtalya'da, Milano ve Verona arasındaki çalışılan kromozom sayısı ve saptanan sıklıklardaki farklılıklardır(16,76). Tüm bu verilere rağmen farkların, çalışılan örnek sayısından daha çok, bölgesel farklılığa bağlı olduğu görüşü ağır basmaktadır(108).

$\Delta F508$ mutasyonunun Avrupa'daki dağılımı incelendiğinde, Kuzey ve Orta Avrupa'da, sıklığın büyük bir homojenlik gösterdiği, Güney ve Doğu Avrupa'ya doğru ise bir azalma olduğu gözlenmektedir. Belçika'nın iki ayrı merkezinden birbirine çok yakın sonuçlar gelirken, Güney ve Kuzey Fransa arasında da belirgin bir farklılık saptanmamıştır(5,10,12,14). İrlanda ve Hollanda'da %77 oranında bir sıklık gözlenirken, eski Doğu Almanya'da %62 ve Portekiz'de %52 olarak bulunmuştur(20,22,32,36). Avrupa genelinde sıklığın ortalama %70 oluşuna istisna olarak, sıklığın çok yüksek olduğu Danimarka

(%86.8) ve şaşırtıcı oranda düşük olduğu Finlandiya (%45) verilebilir(48,92,102).

İsrail 'de $\Delta F508$ sıklığı bir çalışmada %32 (54), Askenazi Yahudilerinde yapılan diğer bir çalışmada ise sadece %22 bulunurken, bir başka mutasyon, W1282X mutasyonu, %60 gibi çok yüksek bir oranda saptanmıştır(94). Bu nedenle W1282X mutasyonu, İsrail tipi mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Türkiye'de de $\Delta F508$ 'in beklenenden daha az olması, Türk tipi bir mutasyonun da olabileceği kuşkusunu akla getirmektedir. Nitekim, Boğaziçi grubunun 1677delTA mutasyonunu %6.25 bulması bu görüşü desteklemektedir(77).

Mutant CFTR allellerinin, yaklaşık %90'ının pankreatik enzim yetmezliği ile seyrettiği, ancak %10'unun malabsorbsiyon sendromu göstermediği fenotip-genotip çalışmaları sonucu belirlenmiştir(101,109). Bu oranı belirleyen, altta yatan mutasyon tipidir. Örneğin, R117H/ $\Delta F508$ birleşik heterozigot olgularda, sadece %13 olgunun pankreatik yetmezlik gösterdiği, %87'sinin ise normal pankreatik enzim salgıladığı saptanmışken, diğer hiçbir mutasyon tipinde %6'dan fazla pankreatik yeterlilik gösterilememiştir(101). Bizim çalışmamızda ise, hastaların sadece %28'inde pankreatik yetmezlik bulguları saptanması, yine, henüz bilinmeyen bir Türk tipi mutasyonu işaret etmektedir.

Prenatal tanı için başvuran ve $\Delta F508$ mutasyonunu taşıdıkları tesbit edilen iki ailenin, mekonyum ileusu tablosu ile ölmüş çocuklarının olması, $\Delta F508$ mutasyonu ve mekonyum ileusu arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir. Bu ilişki başka çalışmalarda da vurgulanmıştır(49,101). Mekonyum ileusu olan geniş bir hasta grubunda yapılacak genetik bir çalışma, bu konuya büyük oranda ışık tutacaktır.

Hastalığın tanısında kuşkusuz ki en önemli kriterlerden birisi ter testinin yüksekliğidir. Kistik Fibroz olgularının %98'inde ter testi yüksek saptanmaktadır(41). Ancak ter testi diğer bazı hastalıklarda da yüksek çıkabilmektedir(Tablo 12).

Tablo 12. Ter testinin yüksek sonuç verdiği diğer hastalıklar.

Adrenal Yetmezlik
Familiyal Hipoparatiroidizm
Ektodermal Displazi
Nörojenik Diabetes İnsipidus
Hipotiroidizm
Mukopolisakkaridozlar
Familiyal Kolestaz
G6PD Eksikliği
Bazı Renal Hastalıklar

Bu nedenle, bir takım çalışmacılar Kistik Fibroz genetik çalışmaları için ter testi alt sınırını 70 mEq/L olarak alırken(58), diğer bazı çalışmacılar ise 60 mEq/L' yi sınır olarak kabul etmişlerdir(17).

Birer allellerinde $\Delta F508$ mutasyonu taşıdığı saptanan 2 olguyu, heterozigot olarak belirtmek yerine, klinik bulgular ve ter testleri sonuçlarının ışığı altında, birleşik heterozigot olarak değerlendirmek daha doğrudur. $\Delta F508$ /Diğer şeklinde gösterilebileceği gibi, diğer allellerinde bilinmeyen bir mutasyon taşıyor olmaları kuvvetle olasıdır.

Tarama amaçlı seçtiğimiz 50 çocuğun hiçbirinde taşıyıcılık saptayamadık. Bunun en önemli sebeplerinden birisi tarama yapılan örnek sayısının yetersiz olmasıdır. Sağlıklı bir sonuç alabilmek için bu sayının çok daha fazla olması gerekmektedir. Hasta olgularda bile $\Delta F508$ oranının Avrupa'ya oranla düşük olması da bir diğer sebeptir. Çalışmamız sonucunda, $\Delta F508$ dışındaki mutasyonların da araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. İsrail'de, 5 mutasyon çalışması ile, Kistik Fibroz kromozomlarının %97'si çözümlenmiştir. 424 kişilik bir tarama grubunda, bu 5 mutasyonun taranması ile heterozigot sıklığı 1:29 (%3.5) bulunmuştur(1). Buna karşın Fransa'da, 40 farklı mutasyon çalışılarak, Kistik Fibroz kromozomlarının ancak %91.2 si çözümlenebilmiştir(13).

Tarama çalışmalarında seçilecek hedef populasyon konusunda genel bir görüş birliği bulunmamaktadır. İngiltere'de, genel pratisyenlere yöneltilen bir ankette, tarama için en uygun zaman sorulmuş; katılımcıların %39'u evlenmeden önce veya aile planlaması sırasında yanıtını verirken, %33'ü ise doğum sırasında olması gerektiğini belirtmiştir(112). Yine İngiltere'de yapılan bir çalışmada, antenatal kliniğe başvuran 4348 kadına tarama testi uygulanmış ve taşıyıcı sıklığı İsrail'dekinin aynısı, 1:29 bulunmuştur(66).

$\Delta F508$ mutasyonunu saptamak için heteroduplex analiz yöntemi, rölatif olarak kolay, hızlı ve spesifik olması açısından avantajlıdır. Ancak, birden fazla mutasyon taraması için en uygun yöntemin Reversed Dot Blot Hibridizasyon yöntemi olduğu gösterilmiştir(8). Basit, hızlı, güvenilir, ucuz ve radyoaktif madde içermiyor olması, tarama çalışmalarında en çok tercih edilen yöntem olmasını sağlamıştır. Reversed Dot Blot Hibridizasyon yöntemi ile 1 gün içerisinde 8 mutasyon birden taranabilmektedir. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında, bu yöntemin çok hızlı sonuç verdiği açıktır. Yöntemin kurulabilmesi için taraması düşünülen DNA yörelerine özgü allel spesifik oligonükleotidler temin edilmelidir. Ayrıca, hibridizasyonun gerçekleşeceği özel aktive edilmiş membranlar gerekmektedir. Taranan mutasyon sayısı ve birim fiyat hesaplandığında, bu yöntemin diğerlerine oranla daha ucuz olduğu gösterilmiştir(8). Biz de bölümümüzde, bu yöntemi kurma çalışmalarını başlatmış bulunmaktayız. ARMS yöntemi de tarama çalışmalarında kullanılabilir(74).

Tarama çalışmalarının neonatal dönemde yapılması, erken tanı açısından yararlıdır. Hastalığın radikal bir tedavisinin olmaması, erken tanının nasıl bir yarar sağlayacağı konusunda tartışmalar başlatmışsa da, enfeksiyonlarla daha bilinçli mücadele ve pankreas enzim replasmanı ile yaşam süresi uzatılabilmektedir(43).

Genetik tarama testlerinden başka, kan örneği emdirilmiş filtre kağıtlarında, immunoreaktif tripsinojen testi de kullanılmaktadır. Ancak bu test daha çok bir ön eleme testi olarak uygulanmaktadır. 106 000 yenidoğanı içeren çok büyük çaplı bir çalışmada, immunoreaktif tripsinojen testinin %90 oranında yanlış pozitif sonuç verdiği saptanmıştır(95).

Standart tedavi yaklaşımları tamamen semptomatiktir; antibiyotikler, göğüs fizyoterapisi ve egzersizleri, bronkodilatatörler, beslenmenin düzenlenmesi ve komplikasyonların tedavisi bunlar arasında sayılabilir. Çok yeni tedavi yöntemleri arasında da, akciğer transplantasyonu, Pseudomonas suşlarına karşı pasif immünizasyon ve gen tedavisi bulunmaktadır(25,26,120).

Her ne kadar gen tedavisi çalışmalarında çok önemli adımlar atılmışsa da, hastalığın henüz radikal bir tedavisi yoktur. Transjenik farelerde yapılan çalışmalarda, vektör olarak lipozomlar kullanılarak iyon transport defekti düzeltilebilmiştir. Bu çok önemli gelişmeye rağmen, gen tedavisinin insanlar üzerinde uygulanması zaman alacaktır(45).

Gen üzerinde bugüne kadar 384 mutasyon saptanmış olması prenatal tanı uygulamasını zorlaştırmaktadır. Ancak, anne ve babada bilinen mutasyonlar saptanırsa, uygulama mümkün olur. Bize başvuran bir çiftte yaptığımız çalışmada, babanın $\Delta F508$ taşıyıcısı olduğunu göstermemize rağmen, annedeki mutasyonu saptayamadık. Böyle bir durumda prenatal tanı uygulanır ve fetusun analizi sırasında babadan kalıtılan $\Delta F508$ alleli saptanırsa, çocuğun %50 hasta, %50 de taşıyıcı olabileceği sonucu çıkar ve karar verilmesi imkansız bir sonuç doğurur. $\Delta F508$ mutasyonu saptanmaz ise çocuğun doğmasında sakınca yoktur. Henüz kesin tedavisi bilinmeyen bu ve benzeri genetik hastalıklarda, topluma özgü mutasyonların belirlenip, prenatal tanının yaygınlaştırılması, hastalık prevalansının azaltılmasında tek çözüm olarak görünmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile $\Delta F508$ 'in yöremizdeki sıklığını belirlemekten başka, ilerideki çalışmalarımıza ışık tutacak çok önemli bilgiler de edindik:

1. $\Delta F508$ dışındaki mutasyonların araştırılarak Türk tipi mutasyonun belirlenmesi gerekliliği;
2. Yeni yöntemler kurarak birçok mutasyona birarada bakabilme olanağının sağlanması;
3. Taşıyıcı sıklığını belirlemek için örneklerin sayısının artırılması;
4. Hastalığın topluma daha iyi duyurulması için çalışmalar başlatılması;
5. Kistik Fibroz için başlatılan bu çalışmanın, toplumumuzda sık görülen Fenilketonüri, Duchen Kas Distrofisi gibi diğer genetik hastalıklara örnek teşkil ederek kısa zamanda bu hastalıkların da genetik tanısına gidilmesi;
6. Hasta bireylere genetik danışmanlık verebilecek birimlerin kurulması;
7. Prenatal tanı merkezleri kurarak hasta doğacak çocukların engellenmesi.

SONUÇ

1. Toplam 101 kromozom $\Delta F508$ mutasyonu açısından incelenmiştir.
2. Klinik olarak kistik fibroz tanısı konan 43 çocuğun $\Delta F508$ mutasyon taraması sonucunda 2 heterozigot ve 1 homozigot olgu tesbit edilmiştir.
3. Ailelerinde kistik fibroz öyküsü bulunan 4 çiftten elde edilen 8 kromozomun $\Delta F508$ mutasyon taraması sonucunda 5 heterozigot olgu saptanmıştır.
4. $\Delta F508$ mutasyon sıklığı %15.7 olarak bulunmuştur.
5. Taşıyıcılık sıklığını saptamak üzere, ailelerinde kistik fibroz öyküsü bulunmayan 50 çocukta yapılan çalışmada ise $\Delta F508$ mutasyonuna rastlanmamıştır.
6. Heteroduplex analiz yöntemi ile $\Delta F508$ mutasyonunun saptanması rutine sokulmuştur.
7. Prenatal tanı için zemin hazırlanmıştır.
8. Tarama çalışmaları için ön çalışma yapılmıştır.
9. Kistik fibroz hastalığının moleküler tanısı için gerekli ileri yöntemlerin kurulması çalışmaları başlatılmıştır.

ÖZET

Kistik Fibroz beyaz ırkta en sık gözlenen, ağır seyirli ve otozomal resesif özellik gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Kistik Fibroz'a neden olan gen, 7. kromozomun uzun kolunda, 31.1 bölgesinde yerleşmiştir. Hastalığın esas patolojik mekanizması, ekzokrin bezlerdeki fonksiyon bozukluğu olup çok değişken klinik bulgular ve komplikasyonlarla seyrederek. Kistik Fibroz'a neden olan $\Delta F508$ mutasyonu tüm mutasyonların yaklaşık %70'inden sorumluya da, bugüne kadar gen üzerinde 400'e yakın baz değişimleri saptanmıştır.

Pediatric kliniğinden elde edilen kanların hematolojik değerlendirmesi Coulter Counter ile yapıldı. Daha sonra, tam kandan izole edilen DNA'lar uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve ürün, poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Jel, etidium bromidde boyandıktan sonra oluşan bantlar ultraviyole ışık altında gözlemlendi.

Klinik bulguları ve ter testi sonuçlarına göre Kistik Fibroz tanısı konmuş hastalardan elde edilen toplam 51 kromozomda $\Delta F508$ mutasyonu tarandı. 51 kromozomun 8'inde bu mutasyona rastlandı ve sıklık %15.7 olarak belirlendi.

Ayrıca, sağlıklı kişilerden elde edilen 50 kromozom üzerinde $\Delta F508$ taşıyıcılık sıklığı araştırıldı. Taranan hiç bir kromozomda $\Delta F508$ taşıyıcılığına rastlanmadı.

Anahtar Sözcükler:

Kistik Fibroz, heteroduplex, PCR, $\Delta F508$, taşıyıcılık sıklığı, poliakrilamid jel elektroforezi.

SUMMARY

Cystic fibrosis is a complex, inherited disorder and is the most common severe autosomal recessive disease in white populations. The gene responsible for cystic fibrosis is located on the long arm of human chromosome 7, region q31.1. Dysfunction of exocrine glands appear to be the major pathogenic mechanism and is responsible for a wide and variable group of clinical manifestations and complications. Although the major mutation causing cystic fibrosis, $\Delta F508$, accounts for almost 70% of mutant chromosomes screened, almost 400 sequence alterations have so far been identified in the gene.

Samples obtained from the Paediatrics Clinic, were analyzed haematologically by Coulter Counter. Then, DNA extracted from the whole blood were amplified by the polimerase chain reaction (PCR) using specific primers and run in the polyacrilamide gel electrophoresis. The heteroduplexes were stained by ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

A total of 51 chromosomes were screened for $\Delta F508$ mutation who were diagnosed as cystic fibrosis depending upon their clinical findings and sweat test results. The $\Delta F508$ deletion in the cystic fibrosis membrane conductance regulator (CFTR) was found in 8 out of 51 chromosomes with a frequency of 15.7%. Also, 50 chromosomes obtained from healthy subjects were analized to determine the carrier frequency. None of the chromosomes screened were carrying the $\Delta F508$ mutation.

Key Words: Cystic fibrosis, CFTR, $\Delta F508$, heteroduplex, PCR and carrier screening.

KAYNAKLAR

1. Abeliovich D, Lavon IP, Lerer I, Cohen T, Springer C, Avital A, Cutting GR: Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. **Am J Hum Genet** 1992; 51:951-956.
2. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ: Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. **Science** 1991; 253:202-205.
3. Balassopoulou A, Loukopoulos D, Kollia P, Devoto M, Adam G, Arvanitakis S, Hadjisevastou: Cystic fibrosis in Greece: typing with DNA probes and identification of the common molecular defect. **Hum Genet** 1990; 85:393-394.
4. Beaudet AL: Genetic testing for cystic fibrosis. **Ped Cli N Am** 1992; 39:213-228.
5. Bonduelle M, Lissens W, Malfroot A, Dab I, Liebaers I: The deletion F508 is the major gene mutation in a representative Belgian cystic fibrosis population. **Hum Genet** 1990; 85:395-396.
6. Brozovic M, Henthorn J: Investigation of abnormal haemoglobins and thalassemia. In Dacie JV, Lewis SM (eds), **Practical Haematology**, 8th ed, Hong Kong, ELBS with Curchill Livingstone 1994; pp:249-286.
7. Carey WF, Nelson PV, Raymond S, Morris CP: Cystic fibrosis prenatal diagnosis: confirmation of an equivocal microvillar enzyme result by direct analysis of the common gene mutation. **Prenat Diagn** 1990; 10:613-616.

8. Chehab FF, Wall J: Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. **Hum Genet** 1992; 89:163-168.
9. Chillion M, Nunes V, Casals T, Gimenez FJ, Fernandez E, Benitez J, Estivill X: Distribution of the dF508 mutation in 194 Spanish cystic fibrosis families. **Hum Genet** 1990; 85:396-397.
10. Chomel JC, Haliasson A, Tesson L, Kaplan JC, Kitzis A: Frequency of the major mutation in French CF patients. **Hum Genet** 1990; 85:397-398.
11. Chu CS, Trapnell BC, Curristin SM, Cutting GR, Crystal RG: Extensive posttranscriptional deletion of the coding sequences for part of nucleotide binding fold 1 in respiratory epithelial mRNA transcripts of the CFTR gene is not associated with the clinical manifestations of CF. **J Clin Invest** 1992; 90:785-790.
12. Claustres M, Desgeorges M, Kjellberg P, Bellet H, Damaillé J, Ramsay M: Cystic fibrosis typing with DNA probes and screening for dF508 deletion in families from Southern France. **Hum Genet** 1990; 85:398-399.
13. Claustres M, Laussel M, Desgeorges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, Damaillé J: Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene : 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in Southern France. **Hum Mol Genet** 1993; 2:1209-1213.
14. Cochaux P, Geffel RV, Baran D, Poncin J, Vassart G: Prevalence of the dF508 deletion of the cystic fibrosis gene in Belgian patients. **Hum Genet** 1990; 85:400.

15. Collins FS: Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. **Science** 1992; 256:774-779.
16. Cremonesi L, Ruocco L, Seia M, Russo S, Giunta A, Ronchetto P, Fenu L, Romano L, Devoto M, Romeo G, Ferrari M: Frequency of the $\Delta F508$ mutation in a sample of 175 Italian cystic fibrosis patients. **Hum Genet** 1990; 85:400-402.
17. Cutting GR, Curristin SM, Nash E, Rosenstein BJ, Lerer I, Abeliovich D, Hill A, Graham C: Analysis of four diverse population groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutations occur in common among Caucasians. **Am J Hum Genet** 1992; 50:1185-1194.
18. Cutting GR: Spectrum of mutations in cystic fibrosis. **J Bioenerg Biomembr** 1993; 25:7-10.
19. Cystic fibrosis mutation data: Privileged communication prepared for members of the CF Genetic Analysis Consortium. 11/4/1993.
20. De Arce MA, Mulherin D, McWilliam P, Lawler M, FitzGerald MX, Humphries P: Frequency of deletion 508 among Irish cystic fibrosis patients. **Hum Genet** 1990; 85:403-404.
21. Dörk T, Fislage R, Neumann T, Wulf B, Tümmler B: Exon 9 of the CFTR gene: splice site haplotypes and cystic fibrosis mutations. **Hum Genet** 1994; 93:67-73.

22. Duarte A, Barreto C, Pinto LM, Tavares MC, Amil J, Pinto M, Chieira ML, Castedo S, Lavinha J: Cystic fibrosis in the Portuguese population: haplotype distribution and molecular pathology. **Hum Genet** 1990; 85:404-405.
23. Estivill X, Casals T, Nunes V: Genetic Analysis of Cystic Fibrosis. In Tsui LC (ed.): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed., New York, Plenum Press, 1991; pp.31-38.
24. Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G, Little S: Development, multiplexing, and application of ARMS test for common mutations in the CFTR gene. **Am J Hum Genet** 1992; 51:251-262.
25. Fiel SB: Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. **Lancet** 1992; 341:1070-1074.
26. Flotte TR: Prospects for virus-based gene therapy for cystic fibrosis. **J Bioenerg Biomembr** 1993; 25:37-42.
27. Fong C: Molecular diagnosis of genetic diseases. **Pediatr Ann** 1993; 22:304-310.
28. Fried MD, Durie PR, Tsui LC, Corey M, Levison H, Pencharz PB: The cystic fibrosis gene and resting energy expenditure. **J Pediatr** 1991; 119:913-916.
29. Fuller CM, Benos DJ: CFTR. **Am J Physiol** 1992; 263:267-286.

30. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ: Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. **Science** 1994; 266: 107-109.
31. Gilbert F: Is population screening for cystic fibrosis appropriate now? **Am J Hum Genet** 1990; 46:394-395.
32. Grade K, Will K, Sziibor R, Gedschold J, Brückner R, Bauer I, Giermann K, Gorki H, Hein J, Brell U, Coutelle C: First analysis of the F508 deletion in cystic fibrosis patients from the GDR. **Hum Genet** 1990; 85:406-407.
33. Guggino WB: Outwardly rectifying chloride channels and CF: a divorce and remarriage. **J Bioenerg Biomembr** 1993; 25:27-35.
34. Guillermit H, Fanen P, Ferec C: A 3' splice site consensus sequence mutation in the cystic fibrosis gene. **Hum Genet** 1990; 85:450-453.
35. Haan EA: Screening for carriers of genetic disease: points to consider. **Med J Aust** 1993; 158:419-421.
36. Halley DJJ, Veeze HJ, Sandkuyl LA, Swaay EW, Damme NHM, Deelan WH, Niermeijer MF: The mutation dF508 on Dutch cystic fibrosis chromosomes: frequency and relation to patients age at diagnosis. **Hum Genet** 1990; 85:407-408.
37. Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Cutting JR: Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly→Asp at codon 551 and the Δ F508

mutation are clinically indistinguishable from $\Delta F508$ homozygotes except for decreased risk of meconium ileus. **Am J Hum Genet** 1992; 51:245-250.

38.Harris A, Beards F, Mathew C: Mutation analysis at the cystic fibrosis locus in the British population. **Hum Genet** 1990; 85:408-409.

39.Harris A: Cystic fibrosis gene. **Br Med Bull** 1992; 48:738-753.

40.Heeley AF, Bangert SK: The neonatal detection of cystic fibrosis by measurement of immunoreactive trypsin in blood. **Ann Clin Biochem** 1992; 29:361-376.

41.Henderson AR, Tietz NW, Rinker AD: Gastric, Pancreatic and Intestinal Function. In Burtis CA, Ashwood ER (eds): **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 2nd ed., Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1994; pp.1617-1620.

42.Higgins CF: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). **Br Med Bull** 1992; 48:754-765.

43.Holtzman NA : What drives neonatal screening programs? **N Eng J Med** 1991; 325:802-804.

44.Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maaß G, Tümmler B: Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. **Hum Genet** 1990; 85:409-411.

45. Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AEO: Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. **Nature** 1993; 362:250-255.
46. Iannuzzi MC: Cystic Fibrosis: Genetics. In Davis PB (ed): **Cystic Fibrosis**. New York, Marcel Dekker Inc., 1993; pp.1-27.
47. Kalaydjieva L, Antov J, Bronzova J, Vladimirova V, Horst J: Molecular data on cystic fibrosis in Bulgaria. **Hum Genet** 1990; 85:412-413.
48. Kere J, Savilahti E, Norio R, Estivill X, Chapelle A: Cystic fibrosis mutation dF508 in Finland: other mutations predominate. **Hum Genet** 1990; 85:413-415.
49. BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. **Science** 1989; 245:1073-1079.
50. Klinger KW, Stanislovitis P, Merrill J, Horn GT: Molecular and Genetic Analysis at the CF Locus. In Tsui LC (ed.): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed., New York, Plenum Press, 1991; pp.39-44.
51. Kobayashi K, Knowles MR, Boucher RC: Benign missense variations in the cystic fibrosis gene. **Am J Hum Genet** 1990; 47:611-615.
52. Krauss RD, Rado TA: Review: Current approaches to the molecular and physiological basis of cystic fibrosis. **Am J Med Sci** 1989; 298:334-341.

53. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P: Genetic determination of exocrine pancreas function in cystic fibrosis. **Am J Hum Genet** 1992; 50: 1178-1184.
54. Lerer I, Cohen S, Chemke M, Sanilevich A, Rivlin J, Golan A, Yahav J, Friedman A, Abeliovich D: The frequency of the $\Delta F508$ mutation on the cystic fibrosis chromosomes in Israeli families: correlation to CF haplotypes in Jewish communities and Arabs. **Hum Genet** 1990; 85:416-417.
55. Loader S, Caldwell P, Kozyra A, Levenkron JC, Boehm CD, Kazazian HH, Rowley PT: Cystic fibrosis carrier population screening in the primary care setting. **Am J Hum Genet** 1996; 59:234-247.
56. Lucotte G, Loirat F: A more detailed map of the cystic fibrosis mutation $\Delta F508$ frequencies in Europe. **Hum Biol** 1993; 65:503-507.
57. Macek M, Ladanyi L, Bürger J, Reis A: Missense variations in the cystic fibrosis gene: Heteroduplex formation in the F508C mutation. **Am J Hum Genet** 1992; 51:1173-1174.
58. Macek MJ, Vavrova V, Böhm I, Stuhmann M, Reis A, Duspivova R, Macek M, Sperling K, Krawczak M, Schmidtke J: Frequency of the $\Delta F508$ mutation and flanking marker haplotypes at the CF locus from 167 Czech families. **Hum Genet** 1990; 85:417-418.
59. Manavalan P, Smith AE, McPherson JM: Sequence and structural homology among membrane-associated domains of CFTR and certain transporter proteins. **J Protein Chem** 1993; 12:279-290.

60. McColley SA, Rosentein BJ, Cutting GR: Differences in expression of cystic fibrosis in blacks and whites. **AJDC** 1991; 145: 94-97.
61. McGrath SA, Basu A, Zeitlin PL : Cystic fibrosis gene and protein expression during fetal lung development. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1993; 8:201-208.
62. McIntosh I, Curtis A, Lorenzo ML, Keston M, Gilfillan AJ, Morris G, Brock DJH: The haplotype distribution of the dF508 mutation in cystic fibrosis families in Scotland. **Hum Genet** 1990; 85:419-420.
63. McIntosh I, Cutting GR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. **FASEB J** 1992; 6: 2775-2782.
64. Meerman GJ, Dankert JE: Pros and cons of neonatal screening for cystic fibrosis. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 83-95.
65. Mennie ME, Compton ME, Gilfillan A, Liston WA, Pullen I, Whyte DA, Brock DJH: Prenatal screening for cystic fibrosis: psychological effects on carriers and their partners. **J Med Genet** 1993; 30:543-548.
66. Mennie ME, Gilfillan A, Compton M, Curtis L, Liston WA, Pullen I, Whyte DA, Brock DJH: Prenatal screening for cystic fibrosis. **Lancet** 1992; 340:214-216.
67. Mercier B, Ragueneas O, Estivill X, Morral N, Kaplan GC, McClure M, Grebe TA, Kessler D, Pignatti PF, Marigo C, Bombieri C, Audrezet MP, Verlingue C, Ferec

- C: Complete detection of mutations in cystic fibrosis patients of Native American origin. **Hum Genet** 1994; 94:629-632.
68. Miedzybrodzka ZH, Yin Z, Kelly KF, Haites NE: Evaluation of laboratory methods for cystic fibrosis carrier screening: reliability, sensitivity, specificity, and cost. **J Med Genet** 1994; 31:545-550.
69. Miller PW, Hamosh A, Macek M, Greenberger PA, MacLean J, Walden SM, Slavin RG, Cutting GR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Am J Hum Genet** 1996; 59:45-51.
70. Mitchell J, Scriver CR, Clow CL, Kaplan F: What young people think and do when the option for cystic fibrosis carrier testing is available. **J Med Genet** 1993; 30:538-542.
71. Morris AP, Cunningham SA, Frizzell RA: CFTR targeting in epithelial cells. **J Bioenerg Biomembr** 1993; 25:21-26.
72. Nagamine CM, Chan K, Lau YFC: A PCR artifact: Generation of heteroduplexes. **Am J Hum Genet** 1989; 45:337-339.
73. Nelson WN: Cystic Fibrosis. In Nelson WN (Ed): **Textbook of Pediatrics**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1992; pp:1106-1116.
74. Newton CR, Summers C, Schwarz M, Graham A, Heptinstall LE, Super M, Anwar R, Smith JC, Markham AF: Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. **Lancet** 1989; 30:1481-1482.

75. Ng ISL, Pace R, Richard MV, Kobayashi K, Kerem B, Tsui LC, Beaudet AL: Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations. **Hum Genet** 1991; 87:613-617.
76. Novelli G, Gasparini P, Savoia A, Pignatti PF, Sangiuolo F, Dallapiccola B: Polymorphic DNA haplotypes and dF508 deletion in 212 Italian CF families. **Hum Genet** 1990; 85:420-421.
77. Onay T, Topaloğlu Ö, Gökgöz N, Kayserili H, Başaran S, Çıkuğraş H, Söylemez Y, Akçakaya N, Apak M, Kırdar B: DNA Analysis of Cystic Fibrosis in Turkish Population. In Özer N (ed): **12th National Congress of Biochemistry Abstract Book**. İstanbul, Şafak Matbaacılık San., 1994; p.55.
78. Porst FC, Bonardot AM, Gilly R, Chazalette JP, Mathieu M, Bozon D: Mutation analysis in 600 French cystic fibrosis patients. **J Med Genet** 1994; 31:541-544.
79. Quinton PM, Reddy MM : Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding. **Nature** 1992; 360:79-81.
80. Quinton PM: Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. **FASEB J** 1990; 4:2709-2717.
81. Ranieri E, Ryall RG, Morris CP, Nelson PV, Carey WF, Pollard AC, Robertson EF: Neonatal screening strategy for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis. **BMJ** 1991; 302:1237-1240.

82. Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dutel S, Sun SZ: The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) super family. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 19-29.
83. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. **Science** 1989; 245:1066-1072.
84. Riordan JR: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Annu Rev Physiol** 1993; 55:609-630.
85. Roig BJ, Bouy BS, Taillandier A, Serre JL, Antich J, Bellon J, Boue J, Boue A: Genotyping of the Spanish cystic fibrosis population at the dF508 mutation site and RFLP linked loci. **Hum Genet** 1990; 85:410-411.
86. Rommens J, Kerem B, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P: Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. **Am J Hum Genet** 1990; 46:396-397.
87. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JR, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS: Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. **Science** 1989; 245:1059-1065.

88. Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes JC, Nussle D, Megevand A, Lasalle R: Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis. **N Eng J Med** 1977; 297:1301-1305.
89. Saba L, Leoni GB, Meloni A, Faa V, Cao A, Rosatelli MC: Two novel mutations in the transmembrane domain of the CFTR gene in subjects of Sardinian descent. **Hum Mol Genet** 1993; 2:1739-1740.
90. Saiki RK: Amplification of genomic DNA. In Innis MA, Gelford DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): **PCR Protocols: A Guide to methods and applications**. New York, Academic Press Inc., 1990; pp.13-20.
91. Santis G, Osborne L, Knight R, Ramsay M, Williamson R, Hodson M: Cystic fibrosis haplotype association and the dF508 mutation in adult British CF patients. **Hum Genet** 1990; 85:424-425.
92. Schwartz M, Johansen HK, Koch C, Brandt NJ: Frequency of the dF508 mutation on cystic fibrosis chromosomes in Denmark. **Hum Genet** 1990; 85:247-428.
93. Shickle D, Harvey I: 'Inside-out', back-to-front: a model for clinical population genetic screening. **J Med Genet** 1993; 30:580-582.
94. Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, Rivlin Y, Tal A, Seret H, Yaar L, Kerem E, Kerem B: Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. **Am J Hum Genet** 1992; 50:222-228.

95. Spence WC, Thomas JP, Orenstein DM, Naylor EW: Neonatal screening for cystic fibrosis: addition of molecular diagnostics to increase specificity. **Biochem Med Metab Biol** 1993; 49:200-211.
96. Statement of American Society of Human Genetics on cystic fibrosis carrier screening. **Am J Hum Genet** 1992; 51:1443-1444.
97. Stuhmann M, Dörk T, Kiawczak M, Dueck M, Banholzer U, Domagk J, Hoffknecht N, Posselt HG, Reis A, Schlösser M, Tretz F, Wagner M, Wahn U, Wulf B, Schmitke J, Reiss J, Tümmler B: Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis patients. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 97-103.
98. Super M: Milestones in cystic fibrosis. **Br Med Bull** 1992; 48:717-737.
99. Taylor GR: Rapid screening for $\Delta F508$ deletion in cystic fibrosis. **Lancet** 1989; 30:1345-1346.
100. The cystic fibrosis genetic analysis consortium : Worldwide survey of the $\Delta F508$ mutation- Report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. **Am J Hum Genet** 1990; 47:354-359.
101. The cystic fibrosis genotype-phenotype consortium: Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. **N Eng J Med** 1993; 329:1308-1313.
102. The European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics: Origin and diffusion of the major CF mutations in Europe. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 63-74.

103. Thomas PJ, Pedersen PL: Effects of the $\Delta F508$ mutation on the structure, function, and folding on the first nucleotide-binding domain of CFTR. **J Bioenerg Biomembr** 1993; 25:11-19.
104. Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Sondek J, Hulihan JM, Pedersen PL: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **J Biol Chem** 1992; 267:5727-5730.
105. Tizzano EF, Buchwald M: Cystic fibrosis: Beyond the gene to therapy. **J Pediatr** 1992; 120:337-349.
106. Tsui LC, Buchwald M: Biochemical and Molecular Genetics of Cystic Fibrosis. In Harris H, Hirschhorn K (eds): **Advances in Human Genetics**. New York, Plenum Press, 1991; pp. 153-266.
107. Tsui LC, Rommens J, Kerem B, Rozmahel R, Zielenski J, Kennedy D, Markiewicz D, Plavsic N, Chou JL, Bozon D, Dobbs M: Molecular genetics of cystic fibrosis. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 9-16.
108. Tsui LC: Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. **Hum Genet** 1990; 85:391-392.
109. Tsui LC: The spectrum of cystic fibrosis mutations. **Trend Genet** 1992; 8:392-398.

110. Vidaud M, Fanen P, Martin J, Ghanan N, Nicolas S, Goossens M: Three point mutations in the CFTR gene in French cystic fibrosis patients: identification by denaturing gradient gel electrophoresis. **Hum Genet** 1990; 85:446-449.
111. Watson EK, Mayall ES, Lamb J, Chapple J, Williamson R: Psychological and social consequences of community carrier screening programme for cystic fibrosis. **Lancet** 1992; 340:217-220.
112. Watson EK, Williamson R, Chapple J: Attitudes to carrier screening for cystic fibrosis: a survey of health care professionals, relatives of sufferers and other members of the public. **Br J Gen Pract** 1991; 41:237-240.
113. Welsh MJ, Smith AE: Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell** 1993; 73:1251-1254.
114. Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL: Cystic Fibrosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. 7th ed., New York, McGraw-Hill Inc., 1995; pp.3799-3876.
115. Welsh MJ: Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia. **FASEB J** 1990; 4:2718-2725.
116. Welsh, Anderson MP, Rich DP, Ostengaard LS, Gregory RS, Chang SH, Smith A: Cystic Fibrosis, CFTR, and Abnormal Electrolyte Transport. In Davis PB (ed): **Cystic Fibrosis**. New York, Marcel Dekker Inc., 1993; pp.29-52.
117. White MB, Amos J, Hsu JMC, Gerrard B, Finn P, Dean M: A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. **Nature** 1990; 344:665-667.

118. Williamson R: Cystic Fibrosis - A strategy for the future. In Tsui LC (Ed): **The Identification of the CF (Cystic Fibrosis) Gene**. 1st ed, New York, Plenum Press, 1991; pp. 1-7.
119. Wilford BS, Fost N: The cystic fibrosis gene: Medical and social implications for heterozygote detection. **Jama** 1990; 263: 2777-2783.
120. Wolff JA: Gene therapy- a primer. **Pediatr Ann** 1993; 22:311-321.
121. Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A: **Temel ve Klinik Biyokimya'da İleri Teknoloji Yöntemleri**. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Adana, 1995; s.45-47.
122. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem BS, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC: Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. **Genomics** 1991; 10:214-228.
123. Zubay G: DNA Manipulation and Its Applications. In Kane K, Johnson M, Padden S (eds): **Biochemistry**. Dubuque, Wm.C.Brown Inc., 1993; pp.787-788.