

OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NA BAĞLI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

111532

FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA PAH GENİNDEKİ
MUTASYONUN VNTR İLE BAĞLANTISININ SAPTANMASI VE
Ddel ENZİMİ DİREKT MUTASYON ANALİZİ BULGULARI
İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Danışman : Prof. Dr. Nurettin BAŞARAN

111532

1996

OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NA BAĞLI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

**FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA PAH GENİNDEKİ
MUTASYONUN VNTR İLE BAĞLANTISININ SAPTANMASI VE
Ddel ENZİMİ DİREKT MUTASYON ANALİZİ BULGULARI
İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Dr.M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU

111532

Danışman : Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN

1996

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

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. M. Hamza Müslümanoğlu'nun Doktora Tezi olarak hazırladığı "Fenilketonürlü hastalarda PAH genindeki mutasyonun VNTR ile bağlantısının saptanması ve Ddel enzimi direkt mutasyon analizi bulguları ile karşılaştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye: Prof. Dr. İzzet Balınoğlu

17/10/1996
Üye: Prof. Dr. Selviye Diler

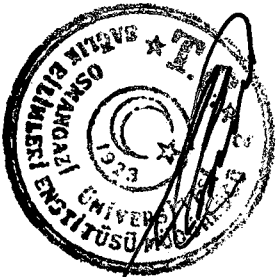
Üye: Prof. Dr. Mehmet Ögüt

Üye: Prof. Dr. Atilla Yılmaz

Üye: Prof. Dr. Alimettin Başaran

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/10/1996 gün ve 369/841 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ASLI GİBİDİR



Mehmet MUSMUL
Enstitü Sekreteri

Prof. Dr. Neşile TUNÇEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimi yaptığım süre boyunca ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde yol gösterip değerli bilgileriyle çalışmalarına katkıda bulunan hocam sayın Prof.Dr.Nurettin BAŞARAN'a, hasta akışındaki yardımlarından dolayı hocam sayın Prof.Dr.Ayşe Başaran'a, tüm çalışmalarım süresince maddi ve manevi her türlü yardımını gördüğüm hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e ve Yrd.Doç.Dr. Sevilhan ARTAN'a, tezle ilgili laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Bio.Naci ÇİNE'ye ve tüm DETAM çalışanlarına, bilim dalımız DNA laboratuvar çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı tüm GENTAM çalışanlarına ve Yrd.Doç.Dr. İrfan DEĞİRMENCI'ye, tezimin yazımı sırasında teşvik ve yardımlarını esirgemeyen Dr.Julide GENÇ'e ve Bio.Beyhan DURAK'a,

Bütün çalışmalarım boyunca maddi manevi yardımı yanımda bulduğum Sevgili'ye eşime ve çocuklarıma teşekkürü bir borç biliyorum...

ÖZET

Bu çalışmada, PKU tanısı konulmuş hasta bir çocuğa sahip 20 ailede, hasta çocuğun kardeşlerinin taşıyıcı olup olmadıklarını saptamak için PAH geni dışındaki VNTR polimorfizimlerinden faydalanarak alel segregasyonu yapılmıştır. Hastalarda IVS10nt546 mutasyonunun varlığını araştırmak için *Ddel* restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi yöntemi uygulanmıştır. DNA venöz kandan ekstrakte edilmiştir. Ekstragenik VNTR dizileri PCR kullanılarak amplifiye edilmiş ve alel segregasyonu yapmak için de PCR ürünü jelde yürütülmüştür. İnformatif ailelerde hasta çocuğun kardeşlerinin taşıyıcılığı tesbit edilmiştir. Yirmi aileden 18 tanesi informatif, 9 çocuk taşıyıcı ve 6 çocuk sağlam bulunmuştur. İnformatif ailelere prenatal tanı yapılabileceği bildirilmiştir.

Aynı hasta çocuklarda IVS10nt546 mutasyonuna yönelik olarak amplifiye edilen PAH geni PCR ürünü *Ddel* restriksiyon enzimi ile direkt mutasyon analizine tabi tutulmuştur. Toplam 40 aileden 12 sinde (%30) IVS10nt546 mutasyonu bulunmuştur. PAH-VNTR polimorfizimleri ile alel segregasyonu yapılamayan bir ailede hasta çocuğun IVS10nt546 mutasyonunu homozigot olarak taşıması, kardeşinin PKU taşıyıcısı olduğunu ortaya koymamızı sağlamıştır. Yalnız başına PAH-VNTR polimorfizimleri ile taşıyıcı tespiti başarısı %90 iken, *Ddel* restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi yöntemiyle birlikte kullanıldığında başarı oranı %95 e çıkmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Fenilketonüri, PAH geni, PCR, VNTR, *Ddel* enzimi,

SUMMARY

In this dissertation, allele segregation was performed utilizing VNTR polymorphisms outside the PAH gene in order to determine whether the siblings of a child who has been diagnosed with PKU are carriers. Blood samples from 20 children who had PKU and their parents as well as their siblings were studied. *Ddel* restriction enzyme direct mutation analysis technique was applied to determine whether the IVS10nt546 mutation existed in patients. DNA was extracted from the venous blood sample. The extragenic VNTR sequences were amplified using PCR, and the PCR product was run on the gel for allele segregation. With this process, it was determined whether a sibling of a sick child is a carrier in "informative" families. With this method, 18 families out of 20 were found to be "informative"; 9 children, carriers; 6 children, normal. It was concluded that the prenatal diagnosis was applicable to those informative families.

In the samples from the PKU patients, the PAH gene which was amplified by PCR regionally including the IVS10nt546 mutation. IVS10nt546 mutation was found in 12 alleles out of 40 (30 %) by digesting the PCR products with *Ddel* restriction enzyme. In a noninformative family, where the allele segregation with PAH-VNTR polymorphism failed, a sick child was found to carry IVS10nt546 mutation homozygote. This led to the conclusion that the sibling of the child was a PKU carrier. While the success rate in carrier determination was 90% with PAH-VNTR polymorphism alone, the rate increased to 95 % when *Ddel* restriction enzyme direct mutation analysis was used additionally.

KEY WORDS: Phenylketonuria (PKU), PAH gene, PCR, VNTR, *Ddel* restriction enzyme

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET

SUMMARY

ŞEKİLLER DİZİNİ

RESİMLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

SİMGE VE KISALTMALAR

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hiperfenilalaninemiler	3
2.2. Fenilketonüri	4
2.2.1. Fenilketonürinin Tarihçesi	4
2.2.2. Fenilalanin Metabolizması	5
2.2.3. Klinik Bulgular	6
2.2.4. Klasik Tanı Metodları	6
2.2.5. Tedavi	7
2.2.6. Fenilketonürinin Moleküler Genetiği	8
2.2.6.1.PAH Geninin Klonlanması	8
2.2.6.2. İnsan PAH Geninin Yapısı	9
2.2.6.3. PAH Genindeki Mutasyonlar	10
2.2.6.4. PAH Geninin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)	11
2.3. Prenatal Tanı	13
2.3.1. Direkt Mutasyon Analizine Bağlı Tanı	13
2.3.2. DNA Polimorfizmleri ve Aile Bağlantı Çalışmaları	14
2.3.2.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)	14
2.3.2.2. Aile Bağlantı Çalışmaları	14
2.3.2.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) ile Tanı	15
2.3.2.4. Değişken Sayıda Tandem Tekrarlar Polimorfizmleri (VNTR) ile Tanı	16
2.3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri	20
3.1.2. Kullanılan Gereçler	20
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	21
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. DNA İzolasyonu	22
3.2.1.1. Tuz (Amonyum asetat) Kullanarak DNA İzolasyonu	22
3.2.1.2 Fenol/Kloroform Kullanılarak DNA İzolasyonu	22
3.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü	24
3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR ile Amplifikasyonu	25
3.2.3.1. PAH-VNTR Lokusu İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları	25
3.2.3.2. PAH-IVS10nt546 Mutasyonuna Yönelik Amplifikasyon Şartları	25
3.2.3.3. PAH-VNTR Lokusu İçin Kullanılan Primer Dizileri	25
3.2.3.4. PAH-IVS10nt546 Mutasyonu İçin Kullanılan Primer Dizileri	26
3.2.3.5. PAH-IVS10nt546 Mutasyonu İçin Amplifiye Edilen PCR Ürününün <i>Ddel</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesim Şartları	26
3.2.3.6. Alel Segregasyonu	26
3.2.4. Kullanılan Çözeltiler	27
3.2.4.1. Tuz Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	27
3.2.4.1.1. Ana Çözeltileri Hazırlamak İçin Gerekli Olan Çözeltiler	27
3.2.4.1.2. İzolasyon İçin Gerekli Ana Çözeltiler	28
3.2.4.2. Fenol/Kloroform Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	29
3.2.4.2.1. Solüsyonlar	29
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri	30
3.2.5.1. Agaroz jel Elektroforezi	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	41
6.SONUÇ	44
KAYNAKLAR DİZİNİ	45
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.Hiperfenilalaninemilere Sebep Olan Enzim Blokları	3
Şekil 2.2 Fenilalanin ve Tirozin Metabolizması ile İlgili Enzimatik Bloklar ve Bu Bloklar Sonucu Oluşan Enzimatik Hastalıklar	5
Şekil 2.3. Fenilalanin Hidroksilaz Genindeki Restriksiyon Endonükleaz Enzimlerinin Kesim Bölgeleri Ve Ekzonların Lokalizasyonu	11
Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanarak Bir DNA Parçasının Çoğaltılmasındaki Aşamalar	18
Şekil 3.1. Alel segregasyonunun şematik olarak gösterilmesi	27
Şekil 4.1. Aile 1'e Ait Pedigri	33
Şekil 4.2. Aile 2'ye Ait Pedigri	34
Şekil 4.3. Aile 3'e Ait Pedigri	35
Şekil 4.4. Aile 7'ye ait Pedigri	36
Şekil 4.5. Aile 8'e Ait Pedigri	36

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 4.1. Aile 1 DNA larının Jeldeki Görünümü	33
Resim 4.2. Aile 2 DNA larının Jeldeki Görünümü	34
Resim 4.3. Aile 3 DNA larının Jeldeki Görünümü	35
Resim 4.4. Aile 7 ve Aile 8 DNA larının Jeldeki Görünümü	36
Resim 4.5. Hasta Çocuk DNA larının <i>Ddel</i> Enzimi ile Kesildikten Sonraki Görünümü	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Türk Populasyonuna ait Mutant PKU Alelleri Arasında Bazı Mutasyonların Dağılımı	11
Çizelge 2.2. Fenilalanin Hidroksilaz Geninde En sık Görülen Haplotiplerin Bazı Populasyonlardaki İnsidansları	12
Çizelge 4.1. PKU li Hasta Bir Çocuğa Sahip Ailelerde VNTR Polimorfizmi Taşıyıcı Tespiti Bulguları	39
Çizelge 4.2. PKU li Hasta Çocuklarda <i>Ddel</i> Enzimi ile Kesilen Aleller	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge/Kısaltma

A	Adenin
ASO	Alel Spesifik Oligonükleotid
C	Sitozin
cDNA	Komplementen DNA
cm	Santimetre
D	Dalton
dk	Dakika
dl	Desilitre
DNA	Deokiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
ddH ₂ O	Bidistile su
EDTA	Disodyum etilendiamintetraasetat
EEG	Elektroansefalografi
G	Guanin
HCl	Hidroklorik asit
KHCO ₃	Potasyum bikarbonat
lt	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
µg	Mikrogram

ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
mRNA	Ulak RNA
N	Normalite
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₄ Ac	Amonyum asetat
nm	Nanometre
OD	Optik Dansimetre
PAH	Fenilalanin Hidroksilaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKU	Fenilketonüri
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Rotation per minute
SDS	Sodyumdodesil sülfat
T	Timin
TAE	Trisasetikasit EDTA
u	Unit
UV	Ultraviyole
V	Volt
VNTR	Değişken Sayıda Tandem Tekrar

1.GİRİŞ

Bütün canlılar için en önemli yapısal ve fonksiyonel bir madde olan proteinler genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülleri tarafından denetlenmektedir. Hücre nükleusunda bulunan binlerce genin ürünü olarak binlerce çeşit protein meydana getirilmekte ve her bir protein ise spesifik bir fonksiyon görmektedir. Foksiyonu ve biyolojik aktivitesi ne olursa olsun bütün proteinler 20 standart aminoasitten meydana gelmiştir. Bu aminoasitlerden insan vücudunda sentezlenemeyen 8 tanesine esansiyel aminoasit ismi verilmiştir. Aminoasitler gerçek bir biyolojik aktiviteye sahip olmamasına karşın, polipeptit zincirlerine değişik kombinasyon ve diziler şeklinde girdikten sonra oluşturdukları proteinlere çok farklı aktivite kazandırırılar. Proteinlerin bir kısmı enzim aktivitesi, bir kısmı hormon aktivitesi, bir kısmı antikor aktivitesi ve diğer bir kısmı ise yapısal fonksiyon görmek üzere özelleşmişlerdir (25). Proteinlerde, dolayısı ile enzimlerde, kendi diziliş ve karakterlerini oluşturan genlerdeki başkalaşımilar sonucu ortaya çıkan farklılıklar, "kalıtsal metabolik hastalıklar" adı verilen bir grup hastalığın doğmasına sebep olmuştur. Kalıtsal metabolik hastalıkların hemen hemen hepsinin otozomal resesif kalıtmıli olması, başlama yaşı ve şiddetinin değişkenlik göstermesi, diğer pek çok kalıtsal hastalıkların aksine belli ölçülerde de olsa tedavi edilebilir olması bu hastalıkların ortak özelliklerini oluşturmaktadır (6).

Kalıtsal metabolik hastalıkların en önemilerinden biri fenilketonüri ("phenylketonuria", PKU) dir (56). PKU ile ilgili bilgilerimiz 1934 yılında, Asbjörn Fölling'in 10 ağır mental retardasyonlu ve postnatal hiperfenilalaninemisi olan hastaya kendi isimlendirdiği "Imbecillites phenylpyruvica" tanısını koymasıyla başlamıştır (72). Daha sonra 1946'da Penrose ve Quastel hastalığa fenilketonüri ismini vermişlerdir (71). Otozomal ressesif kalıtılan bu hastalıkta, fenilalanini tirozine çeviren fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin eksik ya da hiç sentezlenmediği tesbit edilmiştir. Böylece PAH enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşemeyen fenilalanin aminoasidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenillaktik asit, fenilasetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır (56).

PKU'nin ülkemizdeki sıklığı konusundaki yayınlar arasında farklılıklar olmakla birlikte ortalama 1/4500 olduğu bildirilmiştir (60). Diğer yandan, Akraba evliliklerinin %21.21 gibi yüksek değerlerde olduğu ülkemizde fenilketonüri gibi dramatik sonuçlar doğuran, otozomal resesif kalıtım yoluyla kalıtılan hastalıkların önemli bir sorun teşkil ettiği aşikardır (5). PKU tanısı klasik

tanı teknikleri ile ancak doğum sonrasında teşhis edilebilirken, başdöndürücü bir hızla gelişen moleküler tanı teknikleri ile bugün prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti yapılabilmektedir. PKU hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebileceğinden, tarama ve prenatal tanı teknikleri çok büyük önem arz etmektedir (72).

PKU'da prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti, PAH geni ekstragenik VNTR polimorfizmleri ile alel segregasyonu yapılarak gerçekleştirilebildiği gibi, mutasyonların PAH genindeki herhangi bir restriksiyon enzimi kesim bölgesini değiştirmesine bağlı olarak da yapılabilmektedir. Bu çalışmamızda:

1. PKU lu hasta bir çocuğa sahip ailelerde, VNTR dizileri PCR ile amplifiye edildikten sonra alel segregasyonu yapılarak informatif ailelerde taşıyıcı tesbitinin gerçekleştirilmesi,

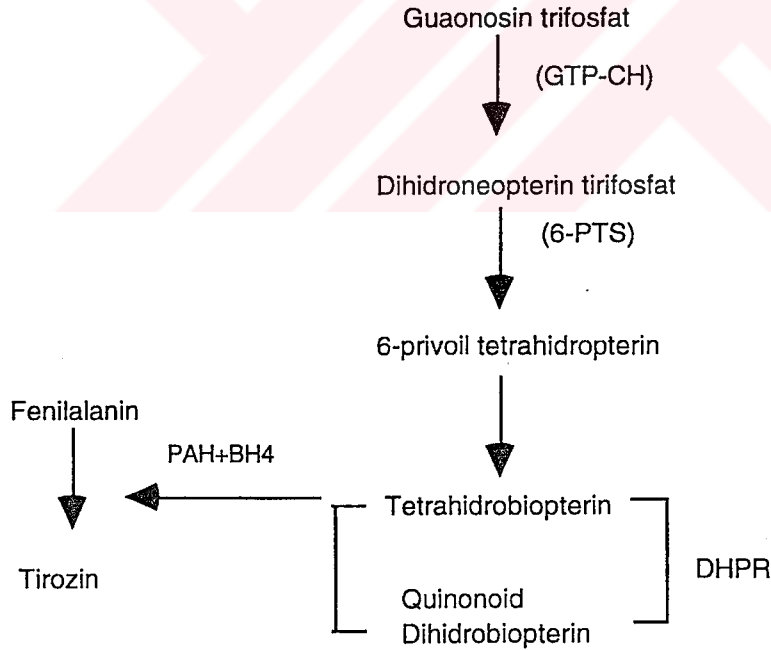
2. Aynı hasta grubunda *Ddel* restriksiyon enzimi kullanılarak direkt mutasyon analizi yöntemi ile IVS10nt546 mutasyonunun hastalarımızdaki sıklığının belirlenmesi ve taşıyıcı tesbitinin yapılması,

3. Ekstragenik VNTR dizileri PCR ile amplifiye edildikten sonra alel segregasyonu yapılarak informatif olmadığı gözlenen ailelerde, *Ddel* restriksiyon enzimi kullanılarak direkt mutasyon analizi yöntemi ile taşıyıcıların tesbit edilebilmesinin, taşıyıcı tesbit başarısını yükseltip yükseltmediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Hiperfenilalaninemiler

Fenilalaninin hidrosilasyonundaki bozukluklar sebebiyle ortaya çıkan, normal plazma fenilalanin değerinin sürekli yüksek olduğu durumlar "hiperfenilalaninemi" olarak isimlendirilmektedir (3). Normal bir hidrosilasyon reaksiyonunun meydana gelebilmesi için fenilalanin hidrosilaz (PAH), oksijen, L-fenilalanin ve kofaktör tetrahidrobiopterin (BH4) gereksinim vardır. Pterin kofaktörünün katalizör olarak fonksiyon görebilmesi için de dihidropteridin redüktaz (DHPR) ve indirgenmiş piridin nükleotidler gereklidir. 4 α -Karbinolamin dehidrataz da keza BH4 döngüsü için elzemdir. BH4 hidrosilasyon işleminin zorunlu bir ögesi olup, bunun sentez edilebilmesi için guanosine trifosfat siklohidrolaz (GTP-CH) ve 6-piruvoil tetrahidropterin sentetaz (6-PTS) gerekmektedir (72).



Şekil 2.1. Hiperfenilalaninemilere sebep olan enzim blokları.

Hiperfenilalaninemi, plazma fenilalanin miktarının 2mg/dl üzerinde değerlere ulaşması ile tanımlanır (7,8,9). Hidroksilasyon reaksiyonunda görev yapan enzimleri kodlayan loküslerdeki mutasyonların çok sayıda ve farklı farklı olması fenotipin de heterojen olmasına yolaçmaktadır (44). Hiperfenilalaninemiler PAH enzim aktivitesi ve plazma fenilalanin konsantrasyonlarına göre 3 gruba ayrılmaktadır:

1)PAH aktivitesi %1'in altında ve plazma fenilalanin seviyesi >20mg/dl olan; PHD I (Fenilalanin Hidroksilaz eksikliği) veya klasik PKU,

2)PAH enzim aktivitesi %1-3 arasında ve plazma fenilalanin seviyesi 10-20 mg/dl olan; PHD II (mild PKU),

3)Enzim aktivitesi %3 üzerinde ve plazma fenilalanin seviyesi <10 mg/dl olan ; PHD III veya geçici hiperfenilalaninemi.

Bu sınıflandırmanın dışında diğer bir literatürde ise, PAH enzim aktivitesinin yokluğu ya da yetersizliği fenilketonüri (PKU) diye isimlendirilirken, bu gruptakilerin fenilalanin plazma değeri 16.5 mg/dl üzerinde olarak tanımlanmaktadır. Fakat plazma fenilalanin seviyesinin 16.5 mg/dl altında olan ve klinik olarak mental retardasyon riskinin klasik PKU'ya göre daha düşük olduğu durumlar için ise non-PKU hiperfenilalaninemi denilmektedir (72).

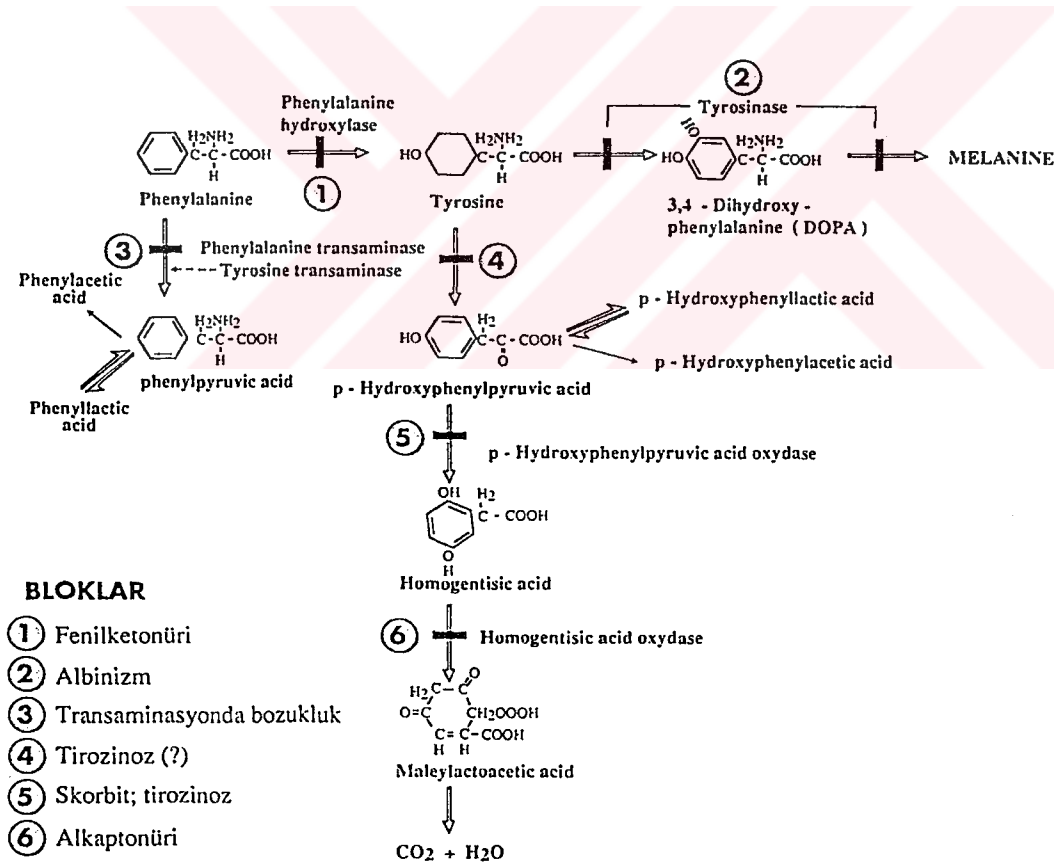
2.2.Fenilketonüri

2.2.1. Fenilketonürinin Tarihçesi

Fenilketonüri ile ilgili ilk bilgilerimiz 1934 yılında, Asbjörn Folling'in ağır mental retardasyonlu ve postnatal hiperfenilalaninemisi olan 10 hastaya, kendi isimlendirdiği "Imbecillitas phenylpyruvica" tanısını koymasıyla başlamıştır. Daha sonra 1946 da Penrose ve Quastel hastalığa bugün anılan "Fenilketonüri" ismini vermişlerdir (56,71). Bu hastalara uygulanan diyet tedavisi ile serum fenilalanin düzeyi düşük tutularak fizik ve mental bozuklukların önüne geçilebildiğinin görülmesi, PKU'nun tarihi seyri içerisinde önemli bir yer tutar. Fenilalaninin hidroksilasyonunu sağlayan PAH enzimi ve tetrahidrobiopterin'in bu enzimin kofaktörü olduğu bulunduktan sonra her ikisinin eksikliğinin de hiperfenilalaninemiye yol açmasına karşın, fenilketonüriyi moleküler yönden incelerken, ayrı ayrı genlerin bu bozukluklardan sorumlu olabileceği gündeme gelmiştir. 1980 li yıllara gelindiğinde, Woo ve arkadaşları rat karaciğerinden elde ettikleri cDNA ile insan PAH genini klonlamayı başarmışlardır (63).

2.2.2. Fenilalanin Metabolizması

Fenilalanin esansiyel bir aminoasittir. Normal kişilerde gıdalarla alınan fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz (PAH) enzimi ve bu enzimin kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH4) aracılığıyla tirozine dönüşür (40,69,72,84). Organizmada PAH enziminden başka, tirozin hidroksilaz ve triptofan hidroksilaz da kendilerine ait substratların aromatik halkalarının hidroksilasyon reaksiyonlarını BH4 kofaktörü ile katalizlerler. Pterine bağımlı hidroksilazlar iki oksijen atomundan birisini hidroksil grubu şeklinde substratlarına sokarken diğer bir oksijen atomunu da NADPH+H ile redükler ve H₂O oluşumunu sağlarlar. Eğer fenilalanin hidroksilaz geninde herhangi bir mutasyon meydana gelir ve bu PAH enzimi sentezinin azalmasına ya da hiç sentezlenmemesine yol açarsa, fenilalanin tirozine dönüşemeyeceği için vücutta birikmeye başlar. Biriken fenilalanin transaminasyonu ve dekarboksilasyonu sonucu oluşan fenil piruvik asit, fenil laktik asit ve fenilasetik asit metabolitleri hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek fizik ve mental bozukluklara yol açmaktadır (Şekil 2.2) (35,40,41,69).



Şekil 2.2. Fenilalanin ve tirozin metabolizması ile ilgili enzimatik bloklar ve bu bloklar sonucu oluşan enzimatik hastalıklar.

2.2.3. Klinik Bulgular

Bebeklerde PKU'nun en erken belirtilerinden birisi kusmadır. Kusmalar pilor stenozunu taklid edecek kadar şiddetli olabilir. Diğer erken belirti, idrarın ve terin içerdikleri fenilasetik, fenillaktik ve fenilpiruvik asitler nedeniyle fare gibi kokmasıdır. Tedavi edilmeyen vakalarda 4 üncü ay civarında sinir sistemi belirtileri ortaya çıkmaya başlar. Çocukların çoğunda ağır zeka geriliği saptanır. Tedavi görmeyen bebeklerin ilk yaş sonunda IQ larında yaklaşık 50 puanlık bir azalma olduğu tahmin edilmektedir. Ciddi hiperaktivite, çevresine ve kendine zarar verme, şizofrenoid ve otistik davranışlar yaygındır. Hipertonsite, çocukların yaklaşık %25 inde konvulsif nöbetler ve tremor, %50 den fazlasında da EEG anomalileri gözlenmektedir. Bütün bu nörolojik belirtilerin ortaya çıkma sebebi tek başına fenilalaninin birikmesi değildir. Biriken diğer metabolitler ve fazla miktardaki fenilalanin; tirozin, triptofon gibi aminoasitlerin hücre içerisine alımını bozarak, miyelinizasyonu engellemektedir. Biriken metabolitlerin diğer bir etkisinin de serebrosit, sülfatid, dopamin ve serotonin sentezlerini inhibe ettiği varsayımları ileri sürülmüştür (8,28,42,54,56,67,80,82,85).

Tedavi görmeyen hastalar sıklıkla şişman ve yakın akrabalarına kıyasla açık renklidirler. Fenilalanin birikimi nedeniyle pigmentasyon azalmasının, melanin sentezinin inhibisyonu sonucu geliştiği, aynı zamanda tirozin yetersizliğinin de pigmentasyon yetersizliğinde rolü olabileceği düşünülmektedir (56). Hayatlarının ilk yıllarında ekzematöz ve seboreik deri döküntülerine %20-40 oranında rastlanan bu hastalarda, koroner kalp hastalığı prevalansının da yüksek olduğu gösterilmiştir (85).

2.2.4. Klasik Tanı Metodları

Hastalığın şiddeti PAH yetersizliğinin derecesine bağlıdır. Normal kişilerde kan fenilalanin düzeyi 2mg/dl nin altındadır. Bu oran 4 mg/dl düzeyine çıktığında o kişiye hiperfenilalaninemi teşhisi konur. PKU'lu hastalarda kandaki fenilalanin miktarı 20 mg/dl civarında seyrederek (80).

Fenilketonüri bebek doğumda klinik olarak normaldir. Doğumdan sonra beslenmenin başlatılmasıyla plazma fenilalanin düzeyi yavaş yavaş yükselir. İdrarla fenilketonların atılması ise daha geç olur. Yeni doğanda kanda yükselmiş olan fenilalanin düzeyinin gösterilmesi için bir tarama testi olan Guthrie'nin bakteriyel inhibisyon testi kullanılır. İnceleme için yalnızca birkaç damla kapiller kan yeterlidir. Beslenmenin doğumdan hemen sonra başlatıldığı hasta bebeklerde kan fenilalanin düzeyi ilk 4 saatte Guthrie testini pozitif yapacak düzeylere yükselebilir. Ancak yabancı negatiflik olasılığını azaltmak için testin 3 günlük beslenme sonrasında yapılması uygundur. Guthrie testinin pozitif olduğu bebeklerde ilk haftadan sonra plazma fenilalanin düzeyi kromatografik yöntemlerle saptanarak hiperfenilalaninemi

doğrulanmalıdır. PKU'nun kesin tanısı :

- 1) Plazmada fenilalanin düzeyinin >20 mg/dl ve tirozin düzeyinin normal,
- 2) İdrarda fenilalanin metabolitlerinin (fenilpürivik, fenilasetik asit) artmış,
- 3) Diyetten çıkarılmış olan fenilalaninin yeniden verilmesi ile plazma düzeyinde yükselme,
- 4) Plazmada kofaktör tetrahidrobiopterin konsantrasyonunun normal olması kriterlerine dayanır. Tarama testi negatif olan yenidoğan bebekler, ailede hastalık öyküsü gibi şüpheli bir durum varsa doğumdan sonra 2-4 üncü haftalarda kan fenilalanin düzeyi ölçümleri ile yeniden değerlendirilmelidir (30,56).

Fenilketonların idrarda ilk saptanabildiği yaş, büyük farklılıklar gösterdiğinden bu yöntem ancak bir aylıktan büyük süt çocuklarında sağlıklı sonuç verir. İdrara %10'luk ferriklorürden birkaç damla damlatıldığında oluşan mavi-yeşil renk, idrarda fenilketonların varlığını gösterir. Testin en önemli sakıncası PKU'lu hastaların tümünde pozitif sonuç vermemesidir. Diğer taraftan aspirin ve fenotiazin alanlarda ve bazı aminoasidürik hastalarda da benzer renk değişikliği oluşabilir. Bu açıdan idrar testinin tanı değeri sınırlıdır. PKU'lu hastalarda idrarla atılan fenilpirüvikasit miktarıyla birlikte serum fenilalanin düzeyi çok yüksek olmasına rağmen çoğu PKU'lu yenidoğanın idrarında ferriklorür testinin haftalarca negatif kalmasının nedeni fenilalanini fenilpirüvik aside çeviren enzimin ortaya çıkmasındaki gecikmedir. Bu yüzden bebeklerdeki PKU taraması sadece bu teste dayandırılmamalıdır. Kilogram başına 100 mg aminoasit verilerek yapılan oral L-fenilalanin yükleme testinde kan fenilalanin düzeyleri normalin çok üstünde bir değerde pik gösterir. Bu esnada tirozinde herhangi bir yükselme olmaz. Eğer hasta yakından takip ediliyorsa yükleme testine klinik olarak ihtiyaç duyulmayabilir. Fenilalanin düzeyi sürekli 12-15 mg/dl nin üzerinde seyrediyorsa diyet tedavisine başlanmalıdır (8,30,54,70,72).

2.2.5. Tedavi

Tedavide amaç bir taraftan beyin zararını önlemek veya minimale indirmek, diğer taraftan diyetle hiperfenilalaninemiye yol açmayacak, ancak büyüme ve gelişme için yeterli olacak fenilalanini sağlamaktır. PKU'lu hastaların fenilalanininden kısıtlı diyet terapisinin mümkün olduğunca erken ve etkili yapıldığı takdirde normal bireylerden zeka gelişimi yönünden farksız olduğu gösterilmiştir.

Diyet özel bir formüle sahiptir ve fenilalaninden fakir olmasına karşılık fenilalanin dışındaki tüm aminoasitleri içeren tam bir besindir.

Beyin hasarına yol açan kan fenilalanin düzeyi kesin bilinmemekle birlikte genellikle 12 mg/dl altındaki değerlerin tehlikesiz olduğu kabul edilmektedir. Fenilalanin alımının aşırı

sınırlandırılması kemik değişiklikleri, anemi, laterji, döküntüler, ishal, büyüme ve gelişme geriliği gibi eksiklik belirtilerine neden olabilir. Diyetin normal büyüme ve gelişmeye yetecek miktarlarda fenilalanin içermesi ve serum düzeyinin 2-9 mg/dl arasında tutulması amaçlanır.PKU kesin tanısında fenilalanin düzeyi için üst sınır 20 mg/dl olmakla birlikte bu düzeyin 15 mg/dl bulunduğu bebeklerde, özellikle tirozin konsantrasyonu normal ve idrar testi pozitif ise mental geriliği önlemek açısından erkenden tedaviye başlanması gerekir. Fenilalaninin kısıtlandığı tüm bebekler 3-4 aylık olunca 2-3 gün normal besin verilmeli ve metabolik bozukluğun geçici ya da sürekli olduğuna karar verilmelidir. Diyet uygulanan çocuklarda kan fenilalanin düzeyinin yüksek bulunmasının en sık nedeni diyetin iyi uygulanmaması ve fazla miktarda fenilalanin verilmiş olmasıdır. Aşırı doku yıkımı da kana geçen fenilalanin miktarının artmasına neden olabilir. Diyetin sağladığı enerjinin yetersiz oluşu ve hastalıklar katabolizmayı arttıran durumlardır. Özellikle infeksiyon hastalıkları sırasında diyetle verilen fenilalanin miktarı yarıya indirilmelidir.

Tedaviye doğumdan hemen sonra başlanması idealdir. Bununla birlikte daha geç başlanan vakalarda da diyet tedavisi ile laterji ve hiperaktivitede gerileme gözlenmektedir.

Günlük fenilalanin alımının 30-60 mg arasında tutulması genellikle yeterlidir. Sık diyetin 6 yaş dolaylarına kadar devam ettirilerek kesilmesinin uygun olacağı söylenmekte ise de son çalışmalar bu hastaların bazılarında ilerleyici IQ düşmesi, öğrenme problemlerinde artma, dikkat dağılması, davranış bozuklukları geliştiğini ayrıca karakteristik küf kokusunun ve ekzamatöz lezyonların da oluşabileceği bildirilmiştir. Büyük çocuklarda diyet çocuk ve aile üzerinde psikolojik sorunlar yaşatmayacak şekilde ayarlanmaya çalışılmalıdır (8,31,32,42,50,54,55,70, 74,75,76).

2.2.6. Fenilketonürinin Moleküler Genetiği

2.2.6.1. PAH Geninin Klonlanması

Fenilalanin hidroksilaz (PAH) geninin klonlanması pozisyonel klonlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İnsan PAH cDNA sınıfın eldesini amaçlayan ilk çalışmalar, sıçan karaciğerinden polizom immünopresipitasyon tekniği ile saflaştırılarak PAH mRNA ları tarafından sentezlenen sıçan PAH cDNA klonları ile yapılmaya başlanmıştır(63). Elde edilen bu klonlar daha sonraları birçok insan PAH cDNA klonlarının, insan karaciğer cDNA kütüphanelerinden izolasyonu için özgün bir hibridizasyon probu olarak kullanılmıştır. Bu klonların en uzununu, 2448 bp uzunluğunda ve ph PAH247 olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca klonun 223'ncü pozisyonunda bir ATG başlangıç kodonu ile başlayan ve 1579 ncu pozisyonunda bir TAA terminasyon kodonu ile sonlanan açık bir okuma kalıbına sahip olduğu gösterilmiştir. Bu klon 452 amino

asitten oluşan ve tahmini olarak 51.862 D molekül ağırlığında bir proteini kodlamakta olduğu öngörülmüştür (65).

İnsan ve rodent cDNA dizeleri karşılaştırıldığında nükleotid ve aminoasit düzeyleri arasında büyük benzerlikler bulunmuştur. İki enzimin benzer aminoasit oranı %92 olarak belirlenmiştir.

İnsanda bağlantı analizi ile PAH lokusunun bulunması amacı ile yapılan ilk denemeler başarısız olmuştur. Önceleri fosfoglukomutaz lokusu (PGM-I) ve amilaz lokusları (AMY-1 ve AMY-2) ile orta kuvvette bir bağlantı gösterdiğini belirten bilgiler ışığında PAH'ın kromozom 1 de lokalize olduğu bulunmuştur. Fakat, bu sonuç fenilketonüri ailelerinde heterozigotların sınıflandırılması amacı ile daha gelişmiş metodlar kullanan başka çalışmalar tarafından desteklenmemiştir.

İnsan PAH cDNA sı PAH geninin kromozomal lokalizasyonunun bulunmasını sağlamıştır. Bu olay farklı insan kromozomları içeren insan/rodent hücre hibridlerinden elde edilen genomik DNA lar ile başarılmıştır. Bu hibrid hücre soyları southern blot ile incelendiğinde insan PAH lokusunun kromozom 12 ye lokalize olduğu bulunmuştur. Bu sonuç insan/hamster hücre hibridleri kullanan başka çalışmalar tarafından da desteklenmiştir. Daha sonra delesyon kromozom haritalamaları ve normal karyotipteki insan lenfoblastoid hücre soylarının metafaz kromozomlarının in situ hibridasyonu ile PAH lokusu 12 nci kromozomun q22-24.1 band bölgesine lokalize edilmiştir. PKU, PAH genindeki mutasyonlara bağlı olduğundan insan PKU lokusu PAH lokusudur (19,44,48,51).

Otozomal resesif geçiş gösteren PKU'nun görülme sıklığı toplumlara göre farklılık gösterir. Beyaz ırkta sıklığı 1/10.000 iken, ülkemizde yaklaşık olarak 1/4500, İsviçre popülasyonunda ise 1/30.000'dir. Sarı ırka mensup Çin'de hastalığın sıklığı 1/16.000, Japonya da da 1/119.000 dir. Taşıyıcıların oranı Türkiye'de 1/34, Japonya'da 1/173 ve Beyaz ırkın genelinde yaklaşık olarak 1/50 dir (19,44,60,61,69,86,87).

2.2.6.2. İnsan PAH Geninin Yapısı

İnsan PAH geni cDNA sı izolasyonu, PAH geninin yapısal organizasyonunun aydınlatılmasını da sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda, kozmid vektörler kullanılarak insan genomik DNA sı kütüphaneleri oluşturulmuş ve bu kütüphaneler insan PAH cDNA sı kullanılarak taranmıştır. Üst üste çakışan PAH genomik dizelerini içeren 4 kozmid izole edilmiştir. Bu klonların detaylı analizinde, insan PAH geninin ortalama 90kb uzunluğunda, 13 exon içeren, intron boyları 1 ile 23kb uzunluğunda değişen bir gen olduğu saptanmıştır. 6 ile

13 üncü exonlar arası genin 20kb lık bir parçası içine kümelenmişken, 1 ile 5 inci ekzonlar intronlar tarafından birbirilerinden ayrılmışlardır. Bunların en ufağı 3kb dan daha uzundur. PAH geninden transkribe edilen olgun mRNA yaklaşık olarak 2.4kb uzunluğundadır (19,44,69,72).

2.2.6.3. PAH Genindeki Mutasyonlar

PAH geninin büyük delesyonları PKU'nin majör sebebi değildir. Binlerce PKU kromozomunun analizi sonucunda delesyon tipi mutasyonların, farklı PKU mutasyon tipleri arasında sadece %12 sini oluşturduğu bulunmuştur. PAH geninin klonlanması ve dizisinin ortaya çıkarılmasından (48) günümüze kadar geçen sürede PAH geninde 200 ü aşkın mutasyon bulunmuştur (90). Bu mutasyonların görülme sıklıkları toplumlara göre farklılık göstermektedir . Sık rastlanan PAH geni mutasyonlarından birisi IVS10 nt546 mutasyonudur. Bu mutasyonun görülme sıklığı İspanya' da %20.3, Sicilya' da %15.1 ve ülkemizde %32 kadardır . P281L mutasyonu Yunanistan' da %10, İtalya' da %9 ve Hırvat toplumunda %12 sıklıkla görülmektedir. E280K mutasyon sıklığı, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa toplumlarındaki PKU hastaları arasında %5 dolaylarındadır. R158Q mutasyonunun ülkemizdeki PKU hastaları arasında görülme sıklığı %2.3 olup. Benzer olarak Yunanistan ve Sicilya'da da bu mutasyonun frekansı düşük olarak saptanmıştır. PKU alelleri arasında yeni gözlenen iki veya üç büyük delesyon, iki tek kodon delesyonu ve iki tek baz delesyonu saptanmıştır (1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,17,18,19,21,23,26,29,36,37,38,43,44,46,55,61,66,68,72,78,81).

En iyi tanımlanmış olan delesyon, yaklaşık 7kb uzunluğunda olup ekzon 3 ü ve PAH geninin flanking intron bölgesindedir. Bu mutasyon özellikle Yemen yahudilerinde daha yüksek frekansta görülmektedir (2). İkinci bir mutasyon da İskoçyalı PKU hastalarında tanımlanmıştır. Bu mutasyon PAH geninin 1 ve 2 nci ekzonlarını etkilemektedir. Bir çok Japon PKU ailesinin Southern analizleri ile taranması sonucunda bir 3 üncü büyük delesyon tanımlanmıştır. Bu delesyonun genin 3' ucunda olduğu sanılmaktadır (13,33,72).

PAH geni mutasyonlarının bazılarının ülkemizdeki PKU alelleri arasındaki görülme sıklıkları Çizelge 2.1.de verilmiştir (61).

PKU mutasyonlarından yaklaşık 50 tanesi nokta mutasyondur. Bunların 6 tanesi nonsense, 8 tanesi splicing ve geriye kalan 36 tanesi missense mutasyonlardır. Missense mutasyonların 12 sinin, mutajenik CpG dinükleotidlerinin metilasyonu ve bunu takiben deaminasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. Gen içindeki büyük delesyonların yanı sıra 2 tek kodon delesyonu ve 2 tek baz delesyonu da bulunmuştur. Şimdiye kadar gösterilen tek insersiyon, intron 10 daki bir missense mutasyonu tarafından indüklenen ve yeni bir kriptik kesim bölgesinin kullanılması ile karakterize 9 baz çiftlik bir çerçeve kayması mutasyonudur (IVS10nt546). PKU ile ilintili mutasyonların çoğunun ekzon 7 de görülmesine rağmen genin bu bölgesinin mutasyonlara açık bir bölge olduğu kanıtlanamamıştır. Ekzon boyunca ve

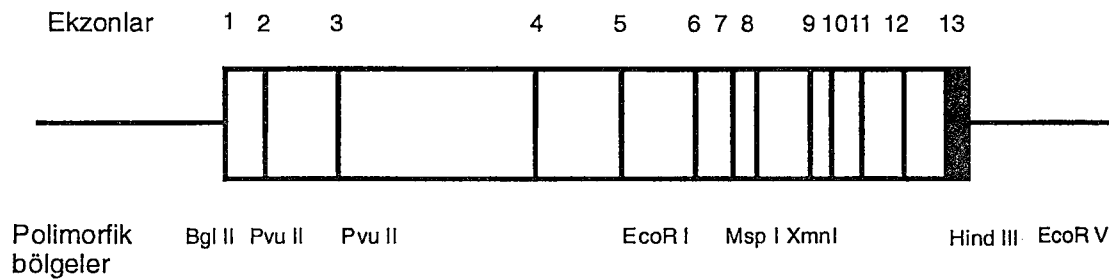
Çizelge 2.1.Türk popülasyonuna ait mutant PKU alelleri arasında bazı mutasyonların dağılımı

Mutasyon	Tüm Alellere Göre %
IVS10nt546	32
R261Q	6.8
R158Q	2.3
R252W	1.1
E280K	-
G272ter	-
TOPLAM	42

karakterine orantılı olarak yapılan mutasyon frekans hesapları, ekzon 7 nin PKU mutasyonları için bir hot-spot olduğu hipotezini desteklememektedir. Bu ekzonun dikkat çekmesinin nedeni fenilalaninin hidrosilasyonu için enzimin esas fonksiyonel bölgesinin ekzon 7 de kodlanmış olmasıdır (16,61,72).

2.2.6.4. PAH Geninin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

PAH geninin klonlanması ile genin yapısı iyice anlaşılmış ve genin içinde ya da yakınında tanımlanan polimorfik bölge kesimleri ile bir çok haplotipin meydana geldiği ortaya konmuştur. Bu polimorfizmlerin tesbiti için *Bgl*II, *Pvu*II, *Eco*RI (iki kesim bölgesi), *Msp*I, *Xmn*I, *Hind*III, *Eco*RV ve *Sph*I enzimleri kullanılmaktadır (Şekil 2.3) (7,10,11,15,19,22,27, 34,35,72,77,89). Bir çok durumda, bu RFLP lerden sorumlu nükleotid substitüsyonlarının



Şekil 2.3. Fenilalanin hidrosilaz genindeki restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgeleri ve ekzonların lokalizasyonu.

fenotipik bir etkisi bulunmamaktadır. Ama bazı hallerde polimorfik kesim bölgeleri geniş kodlayan kısmında yer almaktadır. Bu bölgelerdeki mutasyonlar sabit veya polimorfik fragmentlerin paternini değiştirmektedir.

Bu polimorfik bölgelerin fiziksel harita uzaklıkları ve standardize bağlantı dengesizlikleri arasındaki kaba ilişki, insan PAH geninde rekombinasyon için herhangi bir hot-spot tanımlamamıştır (72).

PAH genindeki bu RFLP ler mutasyonlarla sıkı bağlantı gösterirler (14,46). Bundan dolayı PKU ailelerinde RFLP ler normal veya mutant kromozomların geçişlerinin takibinde, doğum öncesi tanı ve taşıyıcı tanısında kullanılabilirler (52). Birçok farklı popülasyonda normal veya mutant kromozomlar üzerinde bu polimorfizmlerin frekansları tesbit edilmiştir. Avrupa popülasyonunda, tüm PKU ailelerinin %86 sının bir veya daha fazla bölge açısından heterozigot olduğu gösterilmiştir. Buna karşın doğulular için de bu frekanslar %32 olarak bildirilmiştir. Sonuçta RFLP lerin Asya popülasyonlarında taşıyıcı tanısı ve prenatal tanı için daha az yararlı olabileceği kanısına varılmıştır (72).

Çizelge 2.2. Fenilalanin hidroksilaz geninde en sık görülen haplotiplerin bazı popülasyonlardaki insidansları.

ÜLKELER	% H1	H2	H3	H4	H5	H6
Kuzey Avrupa						
Danimarka	18	20	38	13	0	6
Norveç	21	11	17	9	6	0
Batı Avrupa						
İskoçya	30	9	18	6	3	0
İsviçre	50	11	5	18	0	5
Doğu Avrupa						
Çekoslovakya	0	68	0	23	0	0
Polonya	9	57	2	11	2	5
Güney Avrupa						
İtalya	40	6	3	9	4	20
Türkiye	25	1	1	17	4	40

PAH konusundaki RFLP alellerinin spesifik bir paterni, tek (ünik) bir haplotip oluşturur.

Her bir RFLP bölgesi yüksek heterozigositi düzeyi sebebi ile oluşan farklı haplotipler, PAH eksikliği gösteren hiperfenilalaninemilerin genetik analizi için oldukça ayırt edici niteliktedir. Southern analizi ile 7 bölge dismorfik, 1 bölge (*Hind* III) ise multi aleliktir. Buna bağlı olarak bu 8 bölgede 384 haplotip tanımlanmaktadır (72). PAH lokusundaki haplotiplerin dağılımı toplumlara göre farklılık gösterir. Örneğin mutant haplotip 2-3 alelleri ve bu haplotipler ile ilişkili mutasyonlar, Alplerin kuzeyindeki Avrupa popülasyonunda sık gözükürken, güneyinde yaşayan popülasyonda düşük sıklıkta görülmektedir (44). Bunun yanısıra beyaz ırkta haplotip 1-4, normal ve mutant kromozomlar içinde en sık rastlanan haplotiplerdir. Beyaz ırkta haplotip 4 ile ilişkili beş farklı mutasyon, haplotip 1 ile ilişkili dört farklı mutasyon tanımlanmıştır (16,53,58,59). 1 ve 6 numaralı haplotiplerin ikisi birden Avrupa popülasyonundaki mutant kromozomların %80 ini oluşturur. Haplotip 3 orta ve kuzey Avrupa toplumlarında, haplotip 2 doğu Avrupa popülasyonunda, haplotip 6 ise güney Avrupa popülasyonunda mutant kromozomlar içerisinde en fazla görülenlerdir (10,43,57,73,77,79).

2.3. Prenatal Tanı

Genetik hastalıkların fetal dönemde kesin tanısını koymaya yönelik tekniklerin gelişmesi medikal genetik alanında büyük ilerlemelere olanak sağlamıştır. Ayrıca etkilenmiş aileler için yeni bir bakış açısı getiren bu teknikler genetik danışmanın ayrılmaz bir parçası durumuna gelmiştir. Prenatal tanıdaki ana ilke, tedavi imkanı bulunmayan, yaşam süresi kısa, ağır bedensel ve zihinsel özörlere yol açan hastalıklar için yüksek riski olan ailelerde, bu etmenleri gebeliğin erken evrelerinde tanımak varsa tedavi stratejilerini bu erken dönemlerde kurmak eğer yoksa ebeveynlerin rızası doğrultusunda, yasal süreler içerisinde gebeliğe son vermektir. Bu sayede aileye ve topluma tedavi, eğitim ve sosyal açılarından yük oluşturan hastalıklar önlenmiş, ailelere sağlıklı çocuklara sahip olma şansı tanınmış olmaktadır. Prenatal tanı ile fenilketonüri gibi tedavisi mümkün kalıtsal hastalıklar için erken tedavi imkanı doğmakta ve kalıtsal hastalıkların görülme sıklıkları değiştirilmekte ve topluma üretken bireylerin kazandırılması sağlanmaktadır. Prenatal tanı uygulamasında birinci aşama ailede bulunan genetik bir hastalığa sahip çocuğun tanısının kesin olarak konulması ve bu hastalık için ailenin sahip olduğu risk oranının belirlenmesidir. Bundan sonraki aşama, aile için hastalığın tipine uygun prenatal tanı yöntemini seçmektir. Gebelik meydana gelmeden önce prenatal tanı uygulaması planlanmalı, yapılması kararlaştırılan tüm testler hakkında aileye bilgilendirici genetik danışmanlık hizmeti verilmelidir. Prenatal tanı uygulamasının ardından aileye ikinci bir genetik danışmanlık hizmeti verilmeli, sonuç olumsuz ise aileye konu tüm detayları ile anlatılmalı, risk oranları açıklanmalı ve fetüs ile ilgili karar aileye bırakılmalıdır (4,6,20,83,88).

2.3.1. Direkt Mutasyon Analizine Bağlı Tanı

Kalıtsal hastalıkların tanısı için kullanılan en etkin yöntemlerden biri de hastalığa neden olan mutasyonun (ya da mutasyonların) direkt tesbitine dayalı tanı yöntemidir. Eğer ailede hastalığa neden olan mutasyon biliniyorsa hastalığın tanısı bu tip durumlarda oldukça kolay ve %100 lük bir kesinlikle yapılabilir. Hastalığa neden mutasyonlar, çoğunlukla nokta

mutasyonları ya da delesyonlardır. Bu gibi durumlarda hastalığa neden olan nokta mutasyon, bir restriksiyon enziminin tanıma bölgesini (yani enzimin kesim bölgesinin) değişmesine neden olabilir. Bu durumda enzim kesim bölgesini içeren gen bölgesi uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılır. Daha sonra çoğaltılmış DNA bölgesi ilgili restriksiyon enzimi ile kesilir ve jel elektroforezi ile incelenerek, enzimin kesim kesmemesine göre hastalığa neden olan mutasyonun varlığı anlaşılmaktadır (6).

Bazı kalıtsal hastalıklarda ise genin bir kısmının veya tamamının delesyona uğraması hastalığa neden olmaktadır. Meydana gelen bu tip mutasyonların tesbitinde delesyonlu bölgenin içine ya da her iki ucuna özgü seçilmiş primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan bölge direkt jelde incelenir. Sonuçta eğer çoğaltılan bölge delesyona uğramışsa, PCR sonrasında primerin komplementer olduğu bölgeye bağlı olarak ya hiç bir DNA parçası oluşmayacak, ya da normal uzunluktaki parçalara oranla daha kısa bir DNA parçası oluşacaktır.

2.3.2. DNA Polimorfizmleri ve Aile Bağlantı Çalışmaları

2.3.2.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Bir kromozom çiftinin iki üyesi arasında bulunan DNA baz sıralarındaki farklılıklar da genomik proplar kullanılarak ortaya konabilir. Bu tür baz farklılıkları, tüm kromozomlarda her 200-500 baz çiftlik (bp) kesimlerde sıklıkla görülebilir ve bunların çok büyük bir bölümünün herhangi bir klinik anlamı yoktur. Bununla beraber, bunların her birinin DNA molekülündeki o noktayı göstermesi bakımından klinik bir değeri olabilir. Bu farklılıkların ortaya konabilmesinde, her farklılık için spesifik prob ve restriksiyon enzimi kombinasyonuna ihtiyaç vardır. Restriksiyon enzimleri, yani endonükleazlar bütün bakterilerde bulunur. Bunlar viral enfeksiyonları önleme kabiliyetine sahip olduklarından yabancı DNA girişine karşı ilgili DNA kesimlerinde metilasyon yapmak suretiyle bir savunma mekanizması olarak işlev yapmaktadırlar. Bugün için 400 den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmış olup bunların 100 kadar değişik tanıma bölgeleri bulunmaktadır. Bu enzimlerin her biri ilk kez izole edildikleri bakterinin adını almakta ve her biri yalnızca spesifik DNA bölgelerini (tanıma bölgesi = "restriction site") 4-8 baz çiftlik uzunluktaki parçalar halinde kesmektedir. Bu parçaların uçları endonükleazın tipine göre küt ("blunt") ya da yapışkan ("sticky" ya da "cohesive") olarak adlandırılmaktadır (6,83,88).

2.3.2.2 Aile Bağlantı Çalışmaları

Aynı kromozom üzerinde bulunan genlere bağlı ("linked") genler, böyle genlerin oluşturduğu gruba bağlantı grubu ve bu olguya da bağlantı ("linkage") denir. Birbirine yakın, fakat ayrı ayrı loküslere yerleşmiş iki gen bağlı gen konumundadır. Bu iki loküsteki genler bağlantı nedeniyle gametlere bağımsız olarak değil de birlikte gitme eğilimi göstermektedirler.

İşte böyle bağlantı gösteren genler bağımsız tertiplenme ilkesine (Mendel'in ikinci ilkesi) uymayan bir sonuç ortaya koymaktadırlar. Eğer bir genin ilgili kromozom üzerindeki yeri biliniyorsa, bağlantı gösteren diğer genin bu kromozom üzerindeki yeri de hesaplanabilmektedir (6).

Aile bağlantı çalışmalarında biri marker ya da simge olarak kullanılan diğeri de sözkonusu hastalık ya da özellik için kullanılan iki loküs ele alınmaktadır. Bu tür çalışmalarda kişilerin hasta olup olmadıklarını ortaya koymak ve marker ya da simge özelliğine göre durumlarını saptamak üzere tüm aile bireyleri incelenmektedir.

Eğer hastalık ve marker loküsleri farklı kromozomlarda ise, bağımsız tertiplenme gerçekleşmekte olup, hastalık ile marker genleri gametlere ve dolayısıyla çocuklara birlikte geçtikleri kadar ayrı ayrı da geçmektedirler. Buna karşılık eğer hastalık ve marker loküsleri aynı kromozom üzerinde birbirine yakın olarak bulunuyorsa, bu durumda bağımsız tertiplenme gerçekleşmeyecektir. Böylece hastalık ve marker genleri, bir şans sonucu mayoz bölünme sırasında krosing-overle birbirlerinden ayrılmadıkları sürece her çocukta birlikte görülürler. Örneğin erkekteki tüm mayoz bölünmeler sırasında ortalama olarak 52 krosing-over oluşur ve her kromozomdaki krosing-over sayısı kromozomun uzunluğuna bağlı olmak üzere 1-6 arasında değişmektedir. Eğer aynı kromozom üzerindeki hastalık ve marker loküsleri birbirinden yeterince uzakta bulunuyorsa, o zaman bunlar arasında krosing-over oluşmakta ve rekombinant bireylerde iki loküs birbirinden ayrılarak yer alırken non-rekombinant ya da atasal bireylerde ikisi birlikte bulunmaktadır (6).

İki loküs arasındaki böyle bir uzaklıktan dolayı marker özellik gösteren rekombinant bireylerin sayısı ile yine marker özellik gösteren atasal bireylerin sayısı birbirine eşit, yani rekombinasyon fraksiyonu ya da rekombinant bireylerin oranı % 50 olmakta ve bu durum bağımsız tertiplenme ilkesini taklit eder şekilde kendini göstermektedir. Halbuki hastalık ve marker loküsleri arasındaki uzaklık azalır, krosing-over şansı da buna bağlı olarak düşmekte, rekombinant bireylerin sayısı azalmakta, rekombinasyon fraksiyonu küçülmekte ve bağımsız tertiplenmedeki karışıklık da artmaktadır. Bundan dolayı rekombinasyon fraksiyonu % 0 (iki loküs birbirine bitişik) ile % 50 (bağımsız tertiplenmeye eşdeğer) arasında değişmektedir (6).

2.3.2.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) ile Tanı

Hastalık etmeni olan majör mutasyonların tesbit edilemediği kalıtsal hastalıklarda mutant alellerin tesbiti ve prenatal tanı uygulamaları için DNA polimorfizmlerine ve bağlantı analizlerine dayalı incelemeler yapılmaktadır. İnsan genomunda tek baz çifti değişiklikleri çoğunlukla

polimorfizm adı verilen ve hastalığa neden olmayan nükleotid değişimleridir. Polimorfizmler DNA yı küçük parçalara keserek ayıran restriksiyon enzimlerinin özgün kesim bölgelerinin değişmesine neden olmaktadır. Bu durum sonucunda restriksiyon enzimlerine ait özgün kesim bölgeleri ya ortadan kalkmakta ya da belirli restriksiyon enzimlerine ait yeni özgün kesim bölgeleri ortaya çıkmaktadır. Eğer DNA molekülü bu tip bir restriksiyon enzimi ile kesilirse enzimin kesmesine (+) ya da kesmemesine (-) bağlı olarak sonuçta kişiden kişiye değişiklik gösteren farklı uzunlukta DNA parçaları ortaya çıkmaktadır. Bunlar *Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri* (RFLP) olarak isimlendirilmektedir. RFLP ler kuşaktan kuşağa geçerek kalıtılmakta olup kalıtsal hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Belirli bir RFLP için heterozigot olan yani iki kromozomu üzerindeki alelleri birbirinden ayırt edilebilen kişilere *informatif kişi* denmektedir.

RFLP ye dayalı tanının yapılabilmesi için başvuran ailenin bir hasta çocuğa sahip olması ve anne ile babanın informatif olması gerekmektedir. Restriksiyon enzimine ait kesim bölgesi PCR ile çoğaltılmakta ve amplifikasyon ürünleri uygun enzim ile kesilmektedir. Jel elektroforezi ile alellerin gösterilmesi sonucunda eğer aile informatif ise, anne ve babanın mutant alelleri, hasta çocuğun alellerinin incelenmesiyle ortaya konulmaktadır. Mutant aleller tesbit edildikten sonra fetusun ilgili gen bölgesi için de aynı RFLP incelemesi yapılarak fetusun alelleri tanımlanır ve prenatal tanı gerçekleştirilmiş olur (2,7,19,49,88).

2.3.2.4. Değişken Sayıda Tandem Tekrarlar Polimorfizmleri (VNTR: Variable Number of Tandem Repeats) ile Tanı

Bazı DNA polimorfizmlerinin temelinde çeşitli insersiyonlar, delesyonlar ve nükleotid değişimleri bulunmaktadır. İnsersiyon/delesyon polimorfizmlerinin özel bir grubu olan alelik fragment uzunluklarını, ilk defa 1980 yılında Wyman ve White tarafından açıklanmıştır. VNTR lar iki restriksiyon enzim kesim bölgesi arasında bulunmaktadır. Buna göre değişken sayıda tandem tekrar dizileri (VNTR) nin her biri 2-60 nükleotid uzunluğunda olup, bu loküste bulunan alellerdeki dizilerin tekrar sayısı 2 ile 40 arasında değişebilmektedir. İnsan genomunda bir çok farklı VNTR loküsü vardır ve bir kişinin VNTR loküsüne ait DNA fragmentlerinin motifi genellikle o kişi için tektir. RFLP lerin bu grubu oldukça değişken yapıdadır. Çünkü bu tip loküsler birden çok alel ile karakterize olmuşlardır. VNTR markerları genetik bağlantı analizi ve kimlik tesbiti için oldukça informatiftirler. Aile içinde genoma ait parçaların aktarılmasının takibinde ve kişiler arasında genetik farklılıkların ortaya konulmasında VNTR dizileri kullanılır. Yüksek oranda informatif olmalarından dolayı VNTR polimorfizmi prenatal tanı için sık kullanılan bir yöntemdir. VNTR ve RFLP analizleri arasındaki başlıca fark; RFLP analizinde polimorfizm enzim kesim bölgesini değiştirir ve alellerin farklılaşmasının temelini enzimin kesip kesmemesi oluşturur, fakat VNTR da polimorfik bölge bir tekrar dizisidir ve bu tekrarların sayısı kişiden kişiye farklılık gösterir.

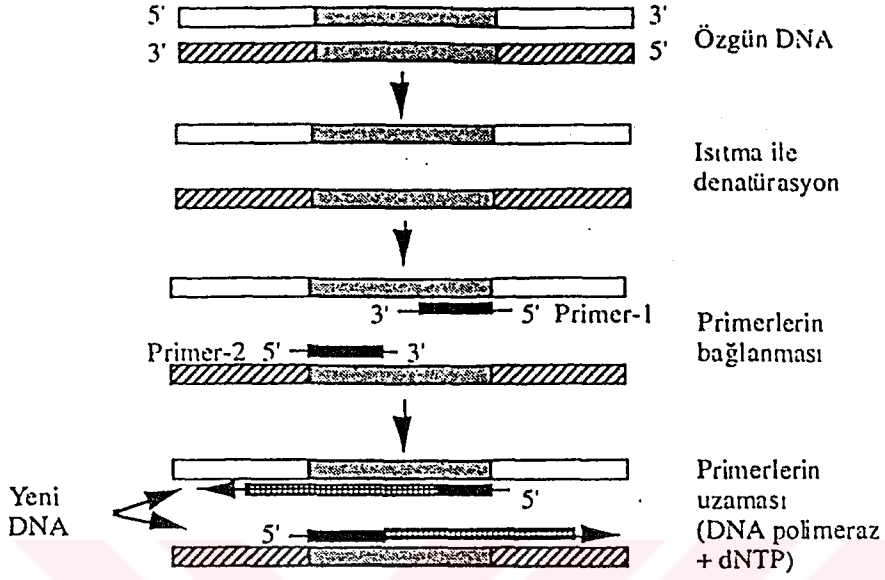
Bu nedenle VNTR incelemesi RFLP ye göre daha informatif olup prenatal tanıda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

VNTR analizine dayalı tanıda da RFLP ye dayalı tanıya benzer olarak tanın yapılabilmesi için, RFLP ye dayalı tanı yönteminde olduğu gibi VNTR a bağlı tanı yönteminin uygulanabilmesi için de başvuran ailenin hasta bir çocuğa sahip olması gerekmektedir. Genetik merkezine prenatal tanı için başvuran bir ailede anne, baba ve hasta çocuğun genotipi araştırılır. Burada VNTR bölgesi ilgili primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılıp amplifikasyon ürünleri direkt olarak jel elektroforezi yardımıyla incelenmektedir. Anne ve babanın sahip oldukları her iki kromozomlarının üzerinde bulunan alelleri birbirlerinden ayırt edilebiliyorsa ve hasta çocuğun VNTR analizi sonucunda ortaya çıkan allelerine dayanarak, anne ve babanın mutant alelleri tesbit edilebiliyorsa (yani aile informatif ise) prenatal tanı yapılabilmektedir. Fetusa ait ilgili VNTR bölgesi yine aynı yöntemle araştırılır ve sonuçta gözlenen aleller anne, baba ve hasta çocuğun alelleri ile karşılaştırarak prenatal tanı yapmaya karar verilebilir (6,24,62,88).

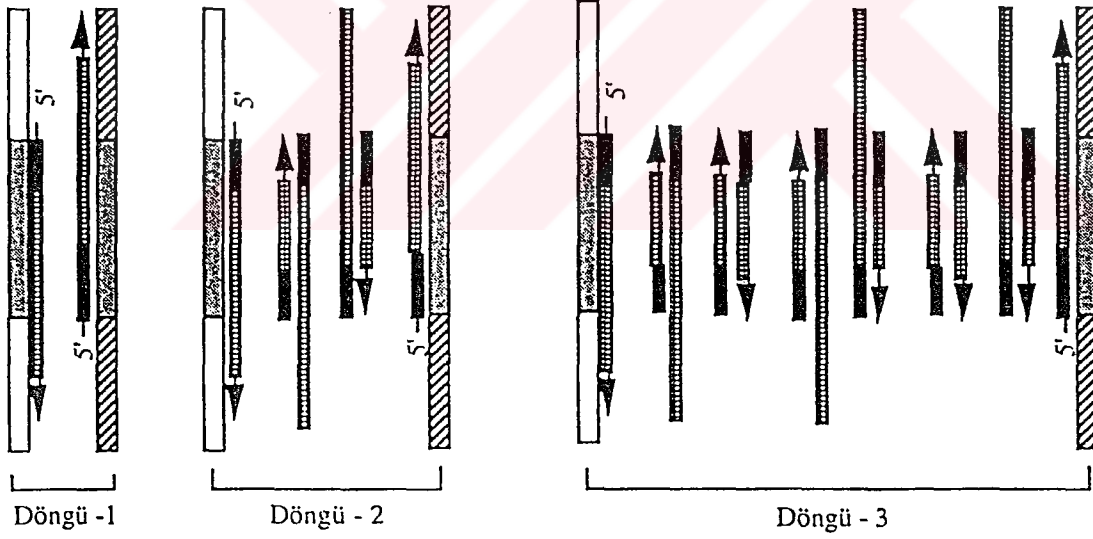
2.3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ("polymerase chain reaction", PCR) 1 µg dan daha az DNA örneğini istenilen miktarda çoğaltarak DNA analizinin saatlerle ifade edilen bir sürede yapılmasına olanak sağlamaktadır. Her PCR reaksiyonu için çoğaltılmasını istediğimiz genin iki ucuna özgü ve buradaki baz sıralarının tamamlayıcısı olan iki oligonükleotid primer (genellikle 18-20 baz uzunluğunda sentetik olarak hazırlanmış DNA yapısında parçacık) gerekmektedir. Bu primerler sayesinde lokalize edilen gen ya da DNA parçasının tekrar tekrar replikasyonu yapılarak büyük miktarlarda (yaklaşık 10^5 kat) elde edilmeleri mümkün olmaktadır (Şekil 2.4.). Tek-dallı olan oligonükleotid primerler, incelenen genin ısıtılmasıyla (denatürasyon) tek-dallı hale getirilen iki DNA parçası ile komplementer olarak birleşir ve DNA sentezini ortama konulan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP) 5'-3' yönünde, ısıya dayanıklı *Thermus aquaticus* dan saflaştırılmış Taq polimeraz enzimi etkisi altında başlamaktadırlar. Denatürasyondan sonra yeni sentezlenen DNA molekülleri, orijinal DNA parçasının tamamen aynı olup orijinal DNA parçası gibi primerlerle yeniden birleşebilmekte ve böylece DNA sentezi tekrarları için kalıp görevi görmektedirler. Ancak ilk oluşan DNA parçaları birer uçlarında primerleri hala bulundurulurlar ve bunların uzunlukları hedef DNA dizisinden daha fazladır. Üçüncü döngüden itibaren, özgün DNA ile özdeş olan ve iki uçları da primerlerle bağlanmış durumdaki komplementer baz sıralı, çift-dallı DNA ların ya da kısa parçaların sayısı uzun parçaların sayısını geçmektedir. 30-40 döngüden sonra, reaksiyon ortamında yalnızca kısa parçalar ortaya konabilir hale gelmekte ve uzun parçalar genellikle elimine olmaktadır. Teorik olarak PCR ile DNA nın çoğalması 2^n formülüne göre olmaktadır (buradaki n döngü sayısını göstermektedir) (6,66,83,88).

a)



b)



Şekil 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak bir DNA parçasının çoğaltılmasındaki aşamalar.

a) Polimeraz zincir reaksiyonunda ilk aşama (döngü 1). b) İlk üç döngü sonunda PCR ile elde edilen DNA parçaları (kısa parçalar, uzun parçalar)

PCR ile yapılan polimorfizm analizi Southern blot ile yapılan polimorfizm analizinden daha duyarlı ve daha hızlı sonuç vermesi bakımından bir üstünlüğe sahiptir. Dezavantajı ise amplifiye edilmek istenen DNA parçasının her ucu için spesifik bir proba gereksinim olmasıdır. Bir diğer önemli nokta da, eksojen orijinli DNA parçalarının karışması sonucu yanlış değerlendirmeleri önleme bakımından sık sık kontrol edilmesi gerektiğidir. PCR yöntemi saflaştırılmamış çok küçük genomik DNA parçalarını bile kullanarak istenilen miktarda yeni DNA oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin PCR amplifikasyonu için ağız çalkaması sonucu ortama düşen bukkal mukoza hücreleri, tek bir saç teli, bir spermium, bir lenfosit gibi tek hücrelerden fikse edilmiş patolojik örnekler, kurumuş kan damlaları, yeni-doğan taramalarında kullanılan Guthrie kartlarına kadar değişik kaynaklı pek çok materyal yeterli olabilmektedir (6,66).

Günümüzde mutasyonların ortaya konması amacıyla yapılan çalışmalar hızla ilerlemektedir. PCR ile amplifiye edilen tek-dallı normal ve mutant DNA arasında görülen heterodupleksler özel bir jelde (hidrolink jel elektroforezi) değişik elektroforetik hareketleri sayesinde ortaya konabilirler. Ayrıca PCR ile amplifiye edilen tek-dallı DNA'nın jel üzerindeki hareketi hem büyüklüğüne, hem de baz sırasına bağlı olduğu için tek-baz değişimleri parça hareketlerindeki farklılıklardan yararlanarak belirlenebilir (tek-dal konfirmasyon polimorfizm analizi) (6).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ:

3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında fenilketonüri tanısı konarak, kan fenilalanin düzeylerine bakılmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına gönderilen 14 aile (54 kişi) ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında tanısı konarak Deneysel Tıp Araştırma Merkezi Moleküler Tanı laboratuvarına taşıyıcı tesbiti için sevk edilen 6 aile (22 kişi) ile birlikte toplam 20 aile (76 kişi) den alınan venöz kandan elde edilen DNA larla gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Buz makinesi
Elektroforez için güç kaynağı
Hassas terazi
Pastör pipeti
Manyetik karıştırıcı (ısıtıcı)
Minijel elektroforez aleti
Mikrosantrifuj
MP4 Kamera sistemi
PCR aleti (thermal cycler)
pH metre
Pipet takımı
Soğutmalı santrifuj
Spektrofotometre
Su banyosu
UV transilüminatör
Vorteks
Mezür
Beher
Bidistile su cihazı
Deep-freeze

+

Mikrodalga fırın
UV gözlüğü
Shaker
Buzdolabı
Falkon tüpü
Ependorf tüpü

3.1.3.Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Agaroz (Sigma A-9539)
Amonyum asetat (Sigma A-1542)
Amonyum klorid (Sigma A-4514)
Asetik asit (Merck 849)
Borik asit (Sigma B-0252)
Bromfenolblue (Sigma B-5525)
dNTP seti (Boehringer Mannheim 1277 049)
EDTA (dihidrat) (Sigma ED2SS)
Etanol (95%) (Tekel)
Etidyum bromid (Sigma E-7637)
Proteinaz K (Sigma P-4914)
HCl (Merck 736)
Mineral yağ (Sigma M-5904)
Potasyum bikarbonat (Sigma P-9144)
Sodyum dodesil sülfat (loril sülfat) (BRL BD8211 Electrophoresis Grade)
Sodyum hidroksit (Merck Art.6462)
Sodyum klorid (Carlo Erba 368259)
Tris (Sigma T-1378)
Fenol (Merck 233)
Kloroform (Merck 335)
Parafilm
İzoamil alkol (Sigma I-1885)
İzopropanol (Carlo Erba 309505)
Sodyum sitrat (Carlo Erba 368057)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DNA İzolasyonu

3.2.1.1. Tuz (Amonyum asetat) Kullanarak DNA izolasyonu

- *Fenilketonürlü çocuklar, anne, baba ve varsa kardeşlerinden EDTA lı tüplere 10 ml venöz kan alınmıştır.
- *Bu kan falkon tüpüne boşaltılarak üzerine 1:3 oranında lysis buffer eklenmiş ve 15 dakika buz içerisinde tutulmuştur.
- *Buzda bekletilen tüpler 5 er dakika arayla elde birkaç kez çalkalanmıştır.
- *Buzdan alınan falkon tüpleri +4 derecede, 15 dakika 1500 rpm de santrifüj edilmiştir.
- *Supernatant dökülmüş, dipte kalan pelet tamamıyla süspansiyon edilmiştir.
- *Üzerine 15-20 ml lysis buffer ilave edilerek, +4 derecede 10 dakika 1500 rpm de santrifüj edilmiştir.
- *Süpernatant dökülmüş, dipteki pelet süspansiyon hale getirilmiştir.
- *Bunun üzerine %10 luk SDS den 500 µl, proteinaz K; 50 µl ve 9.4 ml WBL buffer eklenmiş, 56 derecelik su banyosunda bir gece inkübe edilmiştir.
- *İnkübasyon sonrası herbir mililitre solüsyon başına 0.37 ml 9.5 M Amonyumasetat eklenmiştir.
- *10 dakika elde iyice çalkanan tüpler, oda ısısında 25 dakika, 3000 rpm de santrifüj edilerek proteinler çöktürülmüştür.
- *Süpernatant başka bir tüpe aktarılmıştır.
- *Süpernatantın üzerine %99.5 luk absolu alkolden 1:2 olacak şekilde ilave edilmiştir. Böylece DNA nın presipite olması sağlanmıştır.
- *Tüp içerisinden bir çubuk vasıtasıyla alınan DNA %70 lik alkol içerisinde yıkanmıştır.
- *DNA, 2 dakika 14.000 devirde santrifüj edilmiş, eppendorf tüpünün dibine çöktürülmüştür.
- *Süpernatant dökülerek, tüp ağzı açık olarak bırakılmıştır.
- *Alkolu uçarak kuruyan DNA üzerine bidistile sudan 100-500 µl ilave edilerek 56 derece 1 saat bırakılmıştır.
- *Tamamen solüsyona geçen DNA, +4°C de saklanmıştır.

3.2.1.2. Fenol/Kloroform Kullanılarak DNA İzolasyonu

- *5-10 cc taze kan, Na-EDTA ile 1/10 oranında karıştırılarak alınmıştır. Eğer kan taze ise alınır alınmaz (Na-EDTA ile karıştırılmadan) falkon tüpüne boşaltılmıştır.
- *Üzerine retikülosit solüsyonundan 35cc ye ya da 50cc ye kadar doldurup,15 dakika,

5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Eğer, kan bekletilmiş ise falkon tüpüne aktarıldıktan sonra karışım (kan +Na-EDTA + retikülosit sol.) vortex ile fazla uzun olmamak şartıyla karıştırılmıştır.

*Retikülosit solüsyonu kanda bulunan çekirdekli ya da çekirdeksiz hücreler dışındaki bütün elemanlardan kanı temizlemek için kullanılmaktadır.

*Kan taze ise 3 kez, bekletilmiş ise aynı şartlar uygulanarak 4 kez retikülosit solüsyonu ile yıkamıştır. İyi bir yıkamanın gerçekleştiği, süpernatantın berrak hale gelmesi ile anlaşılmıştır.

*Her santrifüj sonunda süpernatant atılıp üzerine retikülosit solüsyonu eklenip tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Dipteki hücre peleti her yeni koyduğumuz retikülosit solüsyonu ile iyice karıştırılmıştır. Bu dipteki hücre peletinin tüpü alt-üst ederek yerinden ayırlamadığı durumlarda vortex cihazı kullanılmıştır.

*Kan yukardaki işlemlerden geçirildikten sonra hücre dışındaki kan komponentlerinden temizlenmiştir.

*Eritrosit ve diğer tüm hücrelerin sitoplazmalarını parçalayıp, nükleusunu elde etmek için lizisi sağlayan solüsyondan 35-50cc ye kadar falkon tüpüne eklenmiştir. Hücre metabolizmasını en aza indirip ortaya çıkan enzimlerin etkisini minimize etmek amacıyla falkon tüpü 3 saat kırık buz içerisinde bekletilmiştir.

*Daha sonra, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Süpernatant atıldıktan sonra 25 ml. ye kadar 1M STE solusyonundan 25 ml ye kadar konulup, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*4,5 ml 1M STE

250 µl %20'lik SDS,

50µl Proteinaz K ilave edilmiştir. Bu karışım 37.5°C de yaklaşık olarak 16 saat etüvde bırakılmıştır. %20 lik SDS hücrelerin yüzey membran gerilimini azaltıp, proteinlerin çözünürlüğünü artırmaktadır. Proteinaz K hücre çekirdeğini parçalayarak DNA nın etrafındaki proteinleri soluble hale getirmektedir. Çekirdek içerisinde bulunan bütün proteinleri parçalayıp sudaki çözünürlüklerini artırarak DNA yı açığa çıkartmaktadır. Bu nedenle proteinaz K tüpün dibine enjekte edilmelidir.

*Etüvden alınan tüp içerisinde yaklaşık 5cc lik bir materyal bulunmaktadır. Bunun üzerine 5cc fenol (1/1 oranında) ilave edilip, elde karıştırılmış, daha sonra 15 dakika, 5000 rpm de +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Bu adımdan sonra daima süpernatant çalışılmaktadır. Çünkü DNA süpernatantta, diğer şekilli elementler tüpün dibinde toplanmıştır. Fenolün proteinlere karşı afinitesi çok yüksek olduğundan, proteinlerle birleşerek onları çöktürmüştür. Böylece DNA nın saflaşması sağlanmıştır.

*Santrifüjden alınan tüp içerisinde iki faz gözlenmiştir. Fazlar arasında bulutvari bir kısım oluşmuştur. Bir pastör pipeti yardımıyla özellikle bulutvari kısımdan çekmemeye

- özen gösterilerek berrak süpernatanttan 4-5cc alınıp ayrı bir falkon tüpüne aktarılmıştır.
- *1/24 lük izoamil alkol/kloroformdan 1/1 oranında, yani 4-5cc ilave edilmiştir. Elimizdeki tüp hafifçe sallanarak karıştırılmış, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C'de santrifüj edilmiştir.
 - *Alkol DNA'nın kristalize yapı kazanmasına, kloroform ise proteinlerle birleşerek çökmelerine neden olmaktadır.
 - *Diğer taraftan
500 µl Na asetat 50 ml saf etanol,
50 ml saf etanol (1/100)oranında küçük bir behere konulmuştur.
 - *Santrifüj ettiğimiz falkon tüpünün üst kısmından 3-4 pastör pipeti kadar çekip ufak beherin içine boşaltıldığında DNA saf etanol/Na-asetat karışımına göre daha yoğun olarak görülmüştür. Pastör pipeti ile daha yoğun gözüken kısım çekilerek ependorf tüpüne aktarılmıştır
 - *Ependrof tüpü, 2 dakika, 12.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
 - *Santrifüjden çıkartılan tüpün içerisinde belli bir noktada DNA beyaz olarak görülmüştür.
 - *Supernatant, DNA avuçiçi tarafına gelecek şekilde tutularak dökülmüştür.
 - *%75 etonolden 1 ml konulup santrifüj edilmiş, böylece ortamdaki Na-asetat ortamdan uzaklaştırılmıştır.
 - *Supernatant, DNA avuç içerisinde gelecek şekilde dökülmüştür.
 - *Ependorf tüpünün ağzı açık bırakılarak DNA kurutulmuştur.
 - *Kurumuş DNA 200µl-500µl steril distile su ile çözülerek. DNA hazır hale getirilmiştir. Bu DNA +4°C de saklanmıştır.
 - *Ortalama olarak, 10ml kandan 250 µg DNA elde edilmiştir.

3.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü

- *Elde edilen DNA nın miktarı Optik Dansite değeri ölçülerek hesaplanır. Optik Dansite, 1ml sıvıda belli dalga boyundaki (DNA için 260 nm) ışığa 1 cm yol aldırın madde miktarına 1 O.D. denir. Çift iplikçik DNA için 50µg, tek sarmal için 40µg dir.
- *DNA ya spektrofotometrede bakabilmek için 990µl distile su +10µl DNA koyup 1ml ye tamalanmıştır. Okunan OD değerine göre hesaplama aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

50 µg DNA
X

1 OD.
Okunan OD değeri

X= Okunan OD değeri x 50 µg DNA

3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR İle Amplifikasyonu

PKU lu ailelerden elde edilmiş DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için 50 µl lik karışım hazırlanmıştır.

ddH ₂ O	18.8 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	5 µl
primer 1	10 µl
primer 2	10 µl
Taq pol	0.2 µl
DNA	1 µl

	50 µl

3.2.3.1. PAH-VNTR Lokusu İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları

92°C de 40 saniye denatürasyon

55°C de 40 saniye bağlanma

72°C de 40 saniye uzama

olmak üzere 35 döngü yapılmıştır. En sonunda ise 72°C de 10 dakika tutularak ürünün artırılması sağlanmıştır.

3.2.3.2. PAH-IVS1Ont546 Mutasyonuna Yönelik Amplifikasyon Şartları

94°C de 5 dakika

94°C de 30 saniye denatürasyon

57°C de 1 dakika bağlanma

72°C de 1 dakika uzama

Toplam 35 döngü yapılmıştır.

72°C de 10 dakika

PCR ürünü artırılması sağlanmıştır.

3.2.3.3. PAH-VNTR Lokusu İçin Kullanılan Primer Dizileri

Ailelerin PAH-VNTR polimorfizmi yönünden informatif olup olmadığını ortaya koyabilmek için Alexei A. Goltsov ve arkadaşlarının (24) insan fenilalanin hidrosilaz genindeki VNTR ile

mutasyonlar arasındaki birliktelikleri belirlemede kullandıkları primerlerden yararlanılmıştır. Primer 1 olarak, PAH geninin downstream ucunda bulunan ilk VNTR bölgesindeki 118 inci baz çiftinden başlamak üzere bu antisense dalın komplementeri olarak sentezlenen 5'-GCT TGA AAC TTG AAA GTT GC-3' oligonükleotid dizisi kullanılmıştır. Primer 2 olarak ise downstream ucunda bulunan son VNTR ünitesinin sense dalının 155 inci baz çiftinden itibaren komplementer olan 5'- GGA AAC TTA AGA ATC CCA TC-3' oligonükleotidi kullanılmıştır. Goltsov ve arkadaşlarının uyguladığı PCR reaksiyonu şartları uygulanmıştır.

3.2.3.4. PAH-IVS1Ont546 Mutasyonu İçin Kullanılan Primer Dizileri

Özgüç ve arkadaşlarının (60) fenilketonürlü 44 Türk hastada uygulamış oldukları *Ddel* ile IVS1Ont546 mutasyonuna yönelik direkt mutasyon analizi yöntemlerinden faydalanılarak 20 hasta çocuğa ait DNAlar PCR ile değerlendirilmiştir. Primer olarak 5'-TGC AGC AGG GAA TAC TGA TC-3' ve 5'-TAGACATTGGAGTCCACTCTC-3' oligonükleotid dizileri kullanılmıştır. PCR ürünleri *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir.

3.2.3.5. PAH-IVS1Ont546 Mutasyonu İçin Amplifiye Edilen PCR Ürününün *Ddel* Restriksiyon Enzimi İle Kesim Şartları

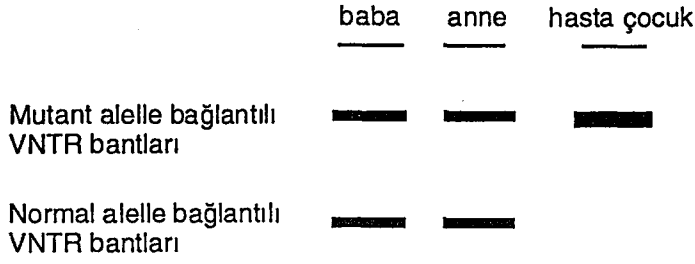
90 µl lik karışım hazırlanmıştır.

ddH ₂ O	-
Buffer	9 µl
Enzim	2 µl
Spermidin	2 µl
DNA	77 µl

	90 µl

3.2.3.6. Alel segregasyonu

VNTR polimorfizimlerinden yararlanarak alel segregasyonunun yapılması taşıyıcı tesbitine imkan tanır. Bunun için anne, baba ve hasta çocuğa ait DNA örneklerinin bulunması gereklidir. Uygun primerler kullanılarak amplifiye edilen VNTR polimorfizimleri PCR ürünü jelde yürütüldüğünde hasta çocuğun anne ve babasından aldığı bantlar ayırt edilebiliyorsa alel segregasyonu yapılır ve aile *informatif aile* olarak değerlendirilir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Alel segregasyonunun şematik olarak gösterilmesi

3.2.4. Kullanılan Çözeltiler

3.2.4.1. Tuz Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.2.4.1.1. Ana Çözeltileri Hazırlamak İçin Gerekli Olan Çözeltiler

0.5 M EDTA (pH 8.0) Çözeltisi

- *Disodium ethylenediaminetetraacetate 2 H₂O :186.1 g tartılarak beher içine konmuş,
- *ddH₂O ile 800 ml ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürülmüştür.
- *pH sı NaOH ile 8.0 e ayarlanmıştır. (20 g NaOH).
- *120 ° C de, 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

4M NaCl Çözeltisi

- *NaCl : 233.6g tartıldıktan sonra,
- *Mezür içine konulup, 800 ml ddH₂O ilave edilmiştir. Tamamen çözülene kadar manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılıp, ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır.
- *120 ° C de, 15 dk otoklavda sterilize edilip, oda ısısında saklanmıştır.

5M NaCl Çözeltisi

- *NaCl : 292.2g tartıldıktan sonra,
- *Mezür içine konulup, ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Tamamen çözülene kadar manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır.
- *120°C de, 15 dk otoklavda sterilize edilerek, oda ısısında saklanmıştır.

1M Tris Çözeltisi

- *Tris base: 121.1g tartılıp mezür içerisine konmuştur, üzerine,
- *HCl: 42 ml ilave edilerek,
- *ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürülmüştür.

1 M NaOH Çözeltisi

- *NaOH : 40 g tartılıp mezür içerisinde ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır.

3.2.4.1.2. İzolasyon İçin Gerekli Ana Çözeltileri

Kırmızı Kan Hücrelerini Parçalama Çözeltisi

- *KHCO₃: 1 g
- EDTA : 200ml (0.5 M lık EDTA dan alınır.)
- *Tartımları yapıp mezür içine konulmuş, ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır.
- *pH sı 1N NaOH ile 7.4 e ayarlanmıştır.
- *120°C de, 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.
- *+4 derecede saklanmıştır.

Beyaz Kan Hücrelerini Parçalama Çözeltisi (WBL)

- *NaCl (4M) : 10 ml
- EDTA (0.5M) : 20 ml
- *Direkt mezür içine konulup, ddH₂O ile 400 ml ye tamamlanmıştır.
- *120° C de, 15 dk otoklavda sterilize edilip, oda ısısında saklanmıştır.

9.5M NH₄Ac Çözeltisi

- *NH₄Ac : 73.226 g beher içine alınarak,
- *ddH₂O ile 100 ml ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürülmüştür.
(Manyetik karıştırıcınının ısı 40°C olmalıdır.)
- *0.22 mikron luk filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.
- *+4° C saklanmıştır.

%10 SDS Çözeltisi

*SDS : 10 g tartılmıştır.

*Dikkatlice beher içine alınıp SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek üzerine ddH₂O ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

*56 C de bekletilerek çözündürülmüştür. (Ya da iyice solusyona geçmesi için uzun bir süre (1-2 saat) manyetik karıştırıcı da çevrilmiştir.)

*0.22 mikron luk filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

*pH sı 7.2 ye ayarlanmış , oda ısısında saklanmıştır .

Proteinaz K Çözeltisi

1 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

50 x TAE Çözeltisi

*Tris base : 242 g

Glacial acetic acid :57.1 ml

EDTA (0.5M) : 100 ml

*Mezür içine aktarılıp, ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır .

*120 ° C de, 15 dk otoklavda sterilize edilerek, oda ısısında saklanmıştır .

3.2.4.2. Fenol/Kloroform Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.2.4.2.1. Solüsyonlar

5 x Retikülosit Tuz Çözeltisi

Sodyum Klorür : 686 mM

Potasyum Klorür : 25 mM

Magnezyum Klorür : 35 mM

Çözücü Çözelti (Lizat Hazırlama Çözeltisi)

Amonyum Klorür : 155.0 mM

Potasyum Bikarbonat : 10.0 mM

Disodyum EDTA .: 0.1 mM

ya da

Amonyum Klorür : 131.0 mM

Amonyum Bikarbonat : 0.9 mM

STE Çözeltisi

Sodyum Klorür : 100.0 mM

Tris HCl : 10.0 mM (pH 8.0)

EDTA (Disodyum tuzu) : 1.0 mM

Doymuş Fenol Hazırlanması

DNA özütlemesinde kullanılan doymuş fenolu hazırlayabilmek için:

*250 g kristal fenol 50 ml saf suda çözündürülmüştür.

*Üzerine 500 ml 1M Tris.HCl (pH 8.0) eklenip, karıştırılmıştır.

*Fazlar ayrıldıktan sonra su fazı alınmış ve bu işlem 2-3 kez tekrarlanmıştır.

*Su fazının pH sı 8.0 oluncaya kadar bu işlem sürdürülmüştür.

*Su fazı alınarak koyu renkli şişede saklanmıştır.

3.2.5. Agaroz Jel Elektforezi Çözeltileri

Etidyum Bromür

Stok 10 mg/ml olacak şekilde steril ddH₂O ile 10 ml hazırlanmıştır .

Agaroz Jel Yükleme Tamponu

*%0.25 bromfenol blue

*%30 glisserol olacak şekilde steril ddH₂O ile 10 ml hazırlanmıştır .

TAE (Stok-50 x) Solüsyonu

*1X0.04M Tris-asetat

*0.001M EDTA olacak şekilde steril ddH₂O ile 1 lt hazırlanmıştır .

*120 ° C de, 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir .

*

3.2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için %3 lük agaroz jeli hazırlanmıştır ve örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutulmuştur.

70 ml lik %3 lük agaroz jelin hazırlanması

*2.1 g agaroz tartılıp, bir beher içinde 70 ml ye tamamlanmıştır .

*Mikrodalga fırında kaynatılmıştır.

*Yaklaşık 60° C ye kadar soğutulduktan sonra üzerine konsantrasyonu 0.5 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenip karıştırılmıştır.

*Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenmiştir.

*Tankın benç tüzzerindeki dengesi ayarlanmıştır .

*Tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete dökülmüştür.

*Jel donduktan sonra tank 1XTAE çözeltisi ile doldurulmuştur.

*18 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2 µl 10X lik yükleme tamponundan konarak karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir (Her jelin bir kuyusuna markır yüklenmiştir).

*Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek örnekler 80-100 Voltta yürütülmüştür.

*Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV. altında incelenmiş ve jelin fotoğrafı çekilmiştir.

4. BULGULAR

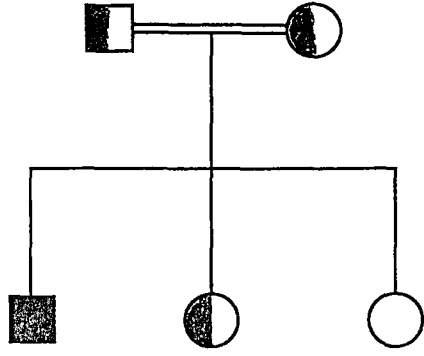
Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında fenilketonüri tanısı konarak, kan fenilalanin düzeylerine bakılmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına gönderilen 14 aile (54 kişi) ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında tanısı konarak Deneysel Tıp Araştırma Merkezi Moleküler Tanı laboratuvarına taşıyıcı tespiti için sevk edilen 6 aile (22 kişi) ile birlikte toplam 20 aile (76 kişi)'den alınan venöz kandan elde edilen DNA larla gerçekleştirilmiştir.

Anne, baba, hasta çocuk ve varsa kardeşlerden alınan kandan DNA lar elde edilmiştir. Bu DNA ların pürifiye olup olmadıklarını anlamak için spektrofotometrede 260nm/280nm oranlarına bakılmış ve oranın 1.8 civarında bulunması üzerine DNA ların temiz olduklarına karar verilmiştir.

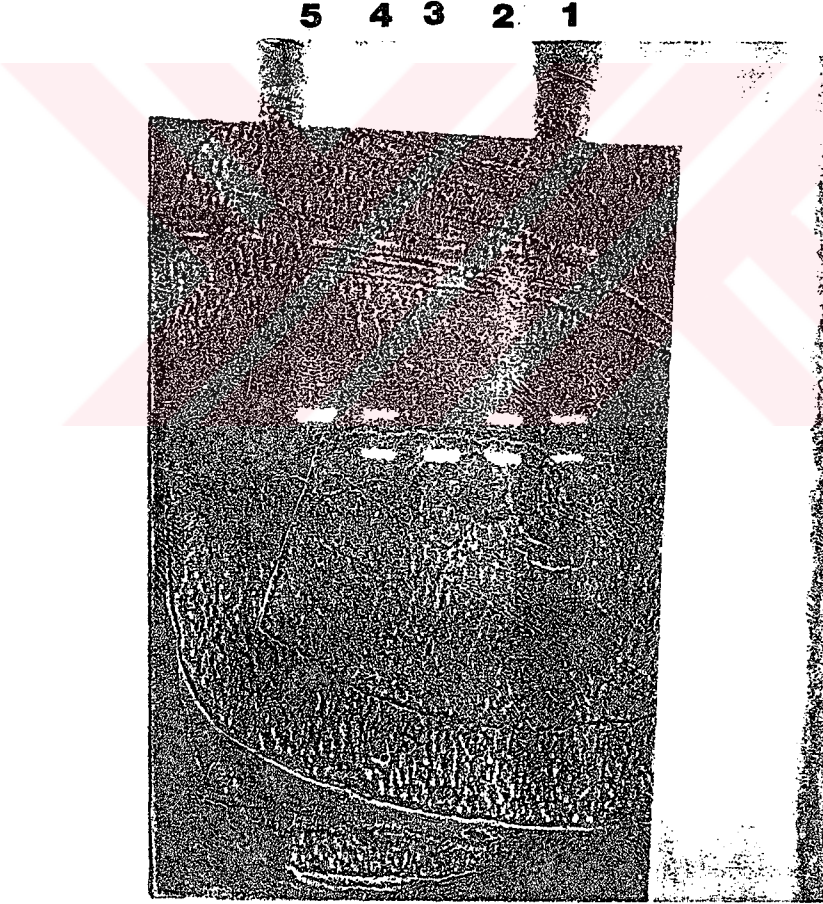
Ailelerin PAH-VNTR polimorfizmi yönünden informatif olup olmadığını ortaya koyabilmek için Alexei A. Goltsov ve arkadaşlarının (24) insan fenilalanin hidrosilaz genindeki VNTR ile mutasyonlar arasındaki birliktelikleri belirlemede kullandıkları primerlerden yararlanılmıştır.

PCR sonrası %3 lük agaroz jelde elde edilen görüntüden alel segregasyonu yapılarak anne, baba ve hasta çocuk hakkında bilgi edinilmiştir. Jelde izlenen görüntü hangi bantların normal alel, hangi bantların mutant alele uygun olduğu sonucunu vermiştir. Bu sonucun elde edildiği aileler *informatif aile*lerdir. Çalışmamızdaki 20 ailenin 18 i informatif aile olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Aile 1'de PAH-VNTR polimorfizm PCR uygulaması sonucunda elde edilen ürün %3 lük agaroz jelde yürütülmüş ve Resim 4.1 deki veriler elde edilmiştir. PAH-VNTR PCR ürünü, anne, baba ve çocuğa ait 13 üncü ekzon dışında bulunan VNTR tekrar sayılarının polimorfizm göstermesinden dolayı değişik bantlar vermiştir. Hasta çocuğun bir kardeşi taşıyıcı, bir kardeşi normaldir (Şekil 4.1).



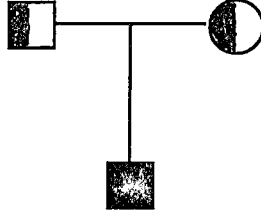
Şekil 4.1. Aile 1'e ait pedigrisi



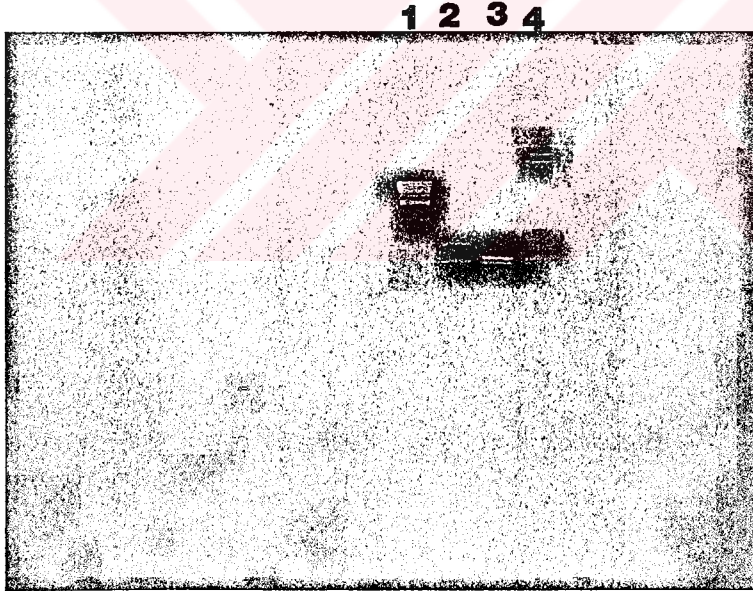
Resim 4.1. (Sağdan) Kuyu 1: Baba, kuyu 2: Anne, kuyu 3: PKU li çocuk, kuyu 4: Kardeş(taşıyıcı) ve 5: Kardeş(normal)

Aile 2'de PAH-VNTR polimorfizm PCR ürünü %3 lük agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntü Resim 4.2 de verilmiştir.

Aile informatif olup, bu bilgiler ışığında, aileye çocuk sahibi olmak isterlerse prenatal tanının mümkün olduğu bildirilmiştir.



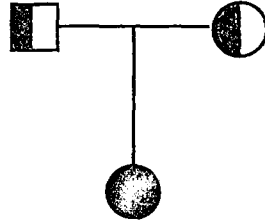
Şekil 4.2. Aile 2'ye ait pedigri



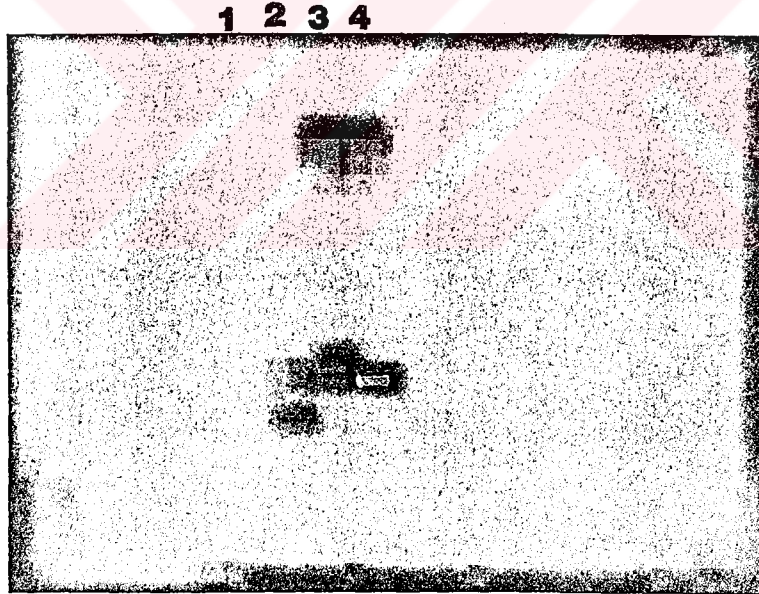
Resim 4.2. (Soldan) Kuyu 1: Marker(*BglI*,*HinfI* pBR328), kuyu 2: Baba, kuyu 3: Anne, kuyu 4: PKU li çocuk

Aile 3'te PAH-VNTR polimorfizm PCR ürünü %3 lük agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntü Resim 4.3 te verilmiştir.

Aile informatif olup (Şekil 4.3) doğacak olan kardeşlerde prenatal tanı yapılmasının mümkün olduğu aileye bildirilmiştir

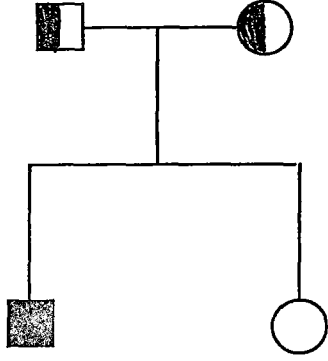


Şekil 4.3. Aile 3'e ait pedigr

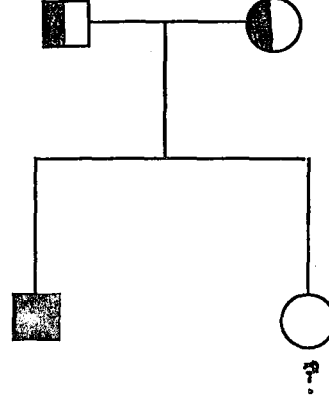


Resim 4.3. (Soldan) Kuyu 1: Marker(*Bgl*,*Hinf* pBR328), kuyu 2: Baba, kuyu 3: Anne, kuyu 4: PKU li çocuk

Aile 7 ve Aile 8'de yapılan PAH-VNTR polimorfizm PCR ürünü %3 lük agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntü Resim 4.4 te verilmiştir.



Şekil 4.4. Aile 7'ye ait pedigr



Şekil 4.5. Aile 8'e ait pedigr

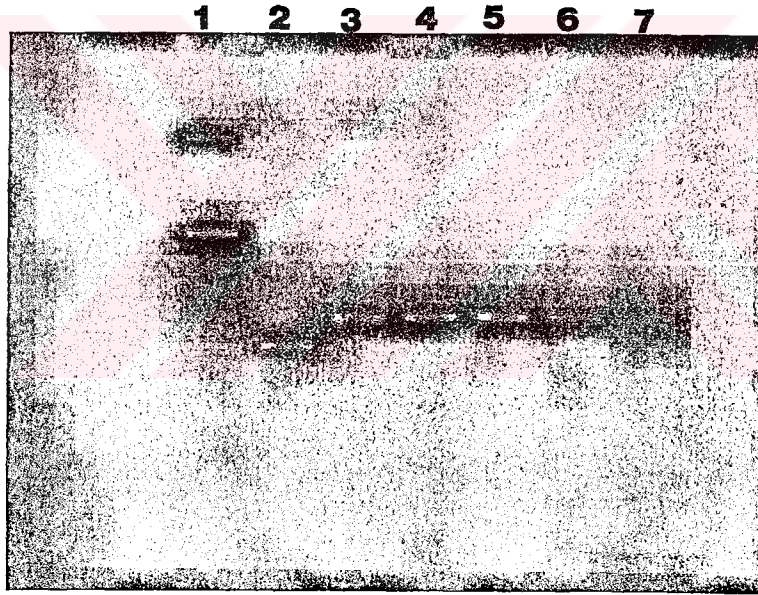


Resim 4.4. : (Soldan) Kuyu 1: Marker(*Bgl*,*Hin*I pBR328), Aile 7: Kuyu 2: Baba, Kuyu 3: Anne, Kuyu 4: Hasta, Kuyu 5: Kardeş (normal), Aile 8: Kuyu 6: Baba, Kuyu 7: Anne, Kuyu 8: Hasta, Kuyu 9: Kardeş (?).

Aile 7 informatiftir. Tekrar çocuk sahibi olmak isterlerse prenatal tanı yapılabileceği aileye bildirilmiştir.

Aile 8 de ise Anne, baba ve hasta çocuk bantlarının informatif olmadığı, bundan dolayı prenatal dönemde taşıyıcı ve hasta tesbitinin yapılamayacağı görülmüştür.

Özgüç ve arkadaşlarının (60) uygulamış oldukları *Ddel* ile IVS10nt546 mutasyonuna yönelik direkt mutasyon analizi yöntemlerinden faydalanılarak 20 hasta çocuğa ait DNAlar değerlendirilmiştir (Resim 4.5.). 2 ve 7 inci kuyucukta görülen bantlar PAH geni IVS10nt546 mutasyonuna yönelik PCR ürününün *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesildiğini göstermektedir.



Resim 4.5. *Ddel* ile kesim sonucu oluşan bantlar

Kuyu 1: Marker (X174 *Hae*III), kuyu 2: IVS10nt546 için homozigot PKU hastası, kuyu 3-4-5-6: IVS10nt546 mutasyonu taşımayan PKU hastaları kuyu 7: IVS10nt546 için heterozigot PKU hastası

PKU li hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak alel segregasyonu yapılmış ve taşıyıcı tesbiti gerçekleştirilmiştir. Yirmi aileden 18 i informatif aile olarak değerlendirilmiştir. İki aile ise noninformatif bulunmuştur. Toplam 16 kardeşten 9 tanesinin taşıyıcı, 6 tanesinin ise normal olduğu tesbit edilmiştir (izelge 4.2.).

Yirmi hasta çocuğun toplam 40 mutant alelinden 12 tanesinin (%30) IVS10nt546 mutasyonunu taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu çocuklardan 3 tanesi mutant alelleri homozigot olarak taşımakta olup, 6 tanesi ise IVS10nt546 mutasyonu yönünden heterozigottur.

VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak alel segregasyonu yapılması sonucu taşıyıcı tesbiti yapılabilme oranının %90 (20 aileden 18 tanesi informatif) olduğu, noninformatif ailelerden birinin hasta çocuğunun IVS10nt546 mutasyonunu homozigot taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu hasta çocuğun kardeşsinde taşıyıcı olduğu bu yolla saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Fenilketonürlü hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizmi taşıyıcı tesbiti bulguları

Aile No	Baba	Anne	Hasta Çocuk	Kardeş		Aile (VNTR Polimorfizmine Göre)		TOPLAM
				Taşıyıcı	Sağlam	İnfor- matif	Nonin- formatif	
1	1	1	1	1	1	+		5
2	1	1	1	-	-	+		3
3	1	1	1	-	-	+		3
4	1	1	1	-	1	+		4
5	1	1	1	1	-	+		4
6	1	1	1	1	-	+		4
7	1	1	1	-	1	+		4
8	1	1	1	-	-		-	3
9	1	1	1	1	-	+		4
10	1	1	1	1	-	+		4
11	1	1	1	-	1	+		4
12	1	1	1	-	-	+		3
13	1	1	1	-	-	+		3
14	1	1	1	1	-	+		4
15	1	1	1	1	-	+		4
16	1	1	1	-	1	+		4
17	1	1	1	-	-		-	3
18	1	1	1	-	-	+		3
19	1	1	1	1	1	+		5
20	1	1	1	1	-	+		4
Toplam	20	20	20	9	6	18	2	75

+

Çizelge 4.2. PKU'li çocuklarda Ddel enzimi ile kesilen aleller

Aile	PKU'li Çocuk Ddel Kesimi IVS10nt546 Mutasyonu		
	Alel	Alel	Toplam n=40 %
1	-	+	1
2	-	+	1
3	-	+	1
4			
5			
6			
7			
8	+	+	2
9			
10			
11			
12	+	+	2
13	+	+	2
14			
15			
16			
17			
18	-	+	1
19	-	+	1
20	-	+	1
TOPLAM	3	9	12 %30

5. TARTIŞMA

Kalıtsal metabolik hastalıklar grubuna giren fenilketonüri, hepatik fenilalanin hidrosilaz (PAH) enziminin eksikliğinden kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. Fenilalanin hidrosilaz enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşmeyen fenilalanin amino asidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitleri (fenilpirüvik, fenil laktik asit, fenil asetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır. PKU hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebilmektedir. Ülkemizde PKU insidansı 1/4500 dür. Moleküler genetikteki son gelişmeler sonucunda PKU bakımından riskli ailelerde doğum öncesi tanı verilmesi gündeme gelmiştir. Böylece fenilketonüri hastalığının tanısı çok erken dönemde konabilmekte ve hastalarda oluşabilecek hasar diyet tedavisiyle önlenebilmektedir.

PAH geninin klonlanması ile genin yapısı iyice anlaşılmış, genin içinde veya yakınında tanımlanan polimorfik bölge kesimleri ile birçok haplotipin meydana geldiği ortaya konmuştur. Bu polimorfizmlerin tespiti için *BglII*, *PvuII*, *EcoRI*, *MspI*, *XmnI*, *HindIII*, *EcoRV* ve *SphI* enzimleri kullanılmıştır. Birçok durumda, bu RFLP lerden sorumlu nükleotid subsitüsyonlarının fenotipik bir etkisi bulunmamaktadır. Ama bazı hallerde polimorfik kesim bölgeleri genin kodlanan kısmında yer almaktadır. Bu bölgelerdeki mutasyonlar sabit veya polimorfik fragmanların uzunluklarını değiştirmektedir. Bu polimorfik bölgelerin fiziksel harita uzunlukları ve standardize bağlantı disequilibriumları arasındaki kaba ilişki insan PAH geninde rekombinasyon için herhangi bir hot-spot tanımlanmamıştır. PAH geni üzerindeki mutasyonlar ile bu RFLP ler arasında sıkı bağlantı vardır. Bu nedenle PKU alellerinde RFLP ler normal veya mutanat kromozomların geçişlerinin takibinde, doğum öncesi tanı ve taşıyıcı tanısında kullanılabilirler. Birçok farklı popülasyonda normal veya mutant kromozomlar üzerinde bu polimorfizmlerin frekansları tespit edilmiştir. Genel Avrupa popülasyonunda, tüm PKU alellerinin %86 sının bir veya daha fazla bölge açısından heterozigot olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık doğulular içinde bu frekanslar %32 olarak bildirilmiştir. Dolayısıyla RFLP ler Asya popülasyonlarında taşıyıcı tanısı ve prenatal tanı için daha az yararlıdır.

Kalıtsal hastalıkların tanı ve taşıyıcı tespiti için kullanılan en etkin yöntemlerden biri de hastalığa neden olan mutasyonun direkt tespitine dayalı tanı yöntemidir. Eğer ailede hastalığa neden olan mutasyonun biliniyorsa hastalığın tanısı bu tip durumlarda oldukça kolay ve %100 lük bir kesinlikle yapılabilmektedir. Hastalığa neden olan nokta mutasyonu bir restriksiyon enziminin kesim bölgesini değiştiriyorsa, bu durumda enzim kesim bölgesini içeren gen bölgesi

PCR ile çoğaltılarak uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek elektroforez işlemi sonunda jelde incelenmektedir. Oysa, PAH enzimi yetersizliği gösteren hastalarda geniş bir klinik fenotip spektrumu olduğunu Scriver ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları Mendeliyen hiperfenilalaninemi adlı makalede ortaya koymuşlardır. Bu fenotipik varyasyon altta yatan moleküler düzeydeki heterojeniteyi ve dolayısıyla PAH mutant alellerinin çeşitliliğini göstermekte olduğunu ise Guldeberg ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları DDGE ile fenilketonüri mutasyonlarının tespiti ile ilgili makalede bildirmişlerdir. Danimarkalılar'da (Charhaborby ve arkadaşları 1987), Almanlar'da (Riess ve arkadaşları 1988; Lichter-Konecki ve arkadaşları 1988; Aulehla- Scholz ve arkadaşları 1988; Herrman ve arkadaşları 1986), Fransızlar'da (Rey ve arkadaşları 1988), Çinliler'de (Chen ve arkadaşları 1989), Türkler'de (Lichter-Konecki ve arkadaşları 1989; Stuhmann ve arkadaşları 1989) belirli haplotiplerle, fenilalanin hidroksilaz enziminin değişik derecelerde eksikliği arasında ilginç ve bilgi verici bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Özgüç ve arkadaşları, Türkiye'de 44 fenilketonürlü hastada çeşitli mutasyonları taramışlardır. Bu hastaların alellerinin %32 sinde IVS10nt546 mutasyonu bulmuşlar ve 11 hastada da haplotip 6 ile bu mutasyonların bağlantılı olduğunu ortaya koymuşlardır. Dworniczak ve arkadaşları; 1991de, Dasovich ve arkadaşları; 1991de, Kolaydjieva ve arkadaşları; 1991de, Eisensmith ve arkadaşları; 1992de, haplotip 6 kromozoları ile IVS10nt546 mutasyonu arasında özellikle Güney Avrupa populasyonlarında güçlü bir assosiyasyon bulunduğunu yayınlamışlardır. Ddel restriksiyon enzimi ile yapmış olduğumuz mutasyon analizlerinde 40 mutant alelin 12 sinin kesilmesi sonucu, alel frekansının %30 olduğu, dolayısıyla yukarıda adı geçen araştırmacıların çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Spesifik PAH mutasyonları ile RFLP haplotipleri arasında birçok populasyonda kuvvetli assosiyasyonlar olmakla beraber hem mutant haplotiplerin dağılımı hem de mutasyon/haplotip assosiyasyonları değişik etnik gruplarda farklı bulunmaktadır. Şimdiye kadar gözlenen en kuvvetli assosiyasyon sırasıyla haplotip 2, 3 ve 6 ile R408W, IVS12nt1, ve IVS10nt546 arasında olmuştur. Dilella ve arkadaşlarının 1986 da mutant haplotip 3 ile IVS12nt1 mutasyonu arasındaki assosiyasyon Danimarka populasyonu için kesin olup, mutasyon sadece bu haplotipte bulunmuştur ve mutant haplotip sadece bu mutasyonu taşımaktadır. Fakat Türkiye'de ve birçok Avrupa populasyonunda böyle bir bağlantı henüz tanımlanamamıştır.

Alexei Goltsov ve arkadaşları, 1992 yılında PAH genindeki mutasyonlarla VNTR lar arasında da bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Haplotip çalışmaları sırasında HindIIIrestriksiyon enziminin meydana getirdiği 4.0 kb, 4.4 kb, ve 4.2 kb lık fragmentleri içerisinde belli sayılarda VNTR lar bulunduğunu gözlemişlerdir. 4.0 kb lık fragment içerisinde 30 baz çiftlik tekrardan 3 adet, 4.4 kb lık fragment içerisinde ise 12 adet tekrar dizisi

bulunmaktadır. 4.2 kb lık fragment içerisinde ise bu tekrar dizisinden 6, 7, 8 ve 9 adet gibi değişik sayıda olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değişken sayıda tandem tekrarların her biriyle mutasyonlar arasında bir bağlantı olduğunun keşfi, RFLP ile mutasyonlar arasındaki ilişkinin tanı ve taşıyıcı tespitinde bilgi verici olmasından daha detaylı ve daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle biz de taşıyıcı tespitine yönelik 20 PKU ailesinde VNTR lardan yararlanmayı tercih ettik. VNTR polimorfizmlerinden faydalanarak alel segregasyonu analizleri sonucunda 18 ailenin taşıyıcı tespitini gerçekleştirebilmemiz, VNTR larla çalışılmasının %90 gibi bir sonuç verme yüzdesine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Yaptığımız çalışmada, IVS10nt546 mutasyonunun tespit edilmesine yönelik olarak, 20 hastanın DNA ları amplifiye edildikten sonra *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. 40 mutant alelden 12 tanesi (%30) kesilmiştir. VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak yapılan alel segregasyonu ile informatif olmayan 2 aileden birinin hasta çocuğunun iki mutant aleli de kesime uğramış ve bu hastanın IVS10nt546 mutasyonunu homozigot olarak taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu ailede prenatal tanı ve taşıyıcı tesbitinin mümkün olduğu görülmüştür. Bundan dolayı VNTR polimorfizimleri ile taşıyıcı tesbitinin yapılması yüzdesi çok yüksekse de *Ddel* ile direkt mutasyon analizinin de yapılmasının taşıyıcı tesbit yüzdesini artıracığı kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ

a. PKU li hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizmlerinden faydalanarak alel segregasyonu ile taşıyıcı tespiti gerçekleştirilmiştir. Yirmi aileden 18 i informatif aile olarak değerlendirilmiştir. İki aile ise noninformatif bulunmuştur. Toplam 16 kardeşten 9 tanesinin taşıyıcı, 6 tanesinin ise normal olduğu tespit edilmiştir.

b. Yirmi hasta çocuğun toplam 40 mutant alelinden 12 tanesinin IVS10nt546 mutasyonunu taşıdığı (%30) *Ddel* restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi ile tespit edilmiştir. Bu çocuklardan 3 tanesi mutant alelleri homozigot olarak taşımakta olup, 6 tanesi ise IVS10nt546 mutasyonu yönünden heterozigottur.

c. VNTR polimorfizmlerinden faydalanıp alel segregasyonu ile taşıyıcı tespiti yapılabilme imkanının %90 (20 aileden 18 tanesi informatif) olduğu, noninformatif ailelerden birinin hasta çocuğunun IVS10nt546 mutasyonunu homozigot taşıdığı *Ddel* restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi ile tespit edilmiştir. Bu hasta çocuğun kardeşinin de taşıyıcı olduğu aynı yöntemle saptanmıştır.

Dolayısıyla PKU li ailelerde her iki yöntem birlikte uygulandığında 20 aileden 19 unda taşıyıcı tespiti yapılabildiği görülmüştür. Tek başına VNTR uygulaması taşıyıcıların tesbitinde %90 sonuç verirken her iki yöntem bir arada uygulandığında bu oran %95 e çıkmıştır.

KAYNAKLAR

1. Apold, J., Eiken, H.G., Odland, E., Fredriksen, A., Bakken, A., Lorens, B., Boman, H.: A Termination Mutation Prevalent in Norwegian Haplotype 7 Phenylketonuria Genes. *Am.J. Hum. Genet.* 47:1002-1007, 1990.
2. Avigad, S., Cohen, B.E., Bauer, S., Schwartz, G., Frydman, M., Woo, S.L.C., Niny, Y., Shiloh, Y.: A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Letters to Nature*. Vol 344, 168-170, 8 March 1990.
3. Avigad, S., Kleiman, S., Weinstein, M., Cohen, B.E., Schwartz, G., Woo, S.L.C.: Compound Heterozygosity in Nonphenylketonuria Hyperphenylalanemia: The Contribution of Mutations for Classical Phenylketonuria. *Am.J. Hum. Genet.* 49:393-399, 1991.
4. Aydın, K., Prenatal Tanı Tedavi, Perspektif Yayın ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 1992
5. Başaran, N., Cenani, A., Şaylı, B.S., Özkınay, Ö., Artan, S., Seven, H., Başaran, A., Dinçer, S.: Consanguineous Marriages Among Parents of Down Patients. *Clin. Genet.*, 42:13-15, 1992
6. Başaran, N., Tıbbi Genetik Kitabı, Gözden Geçirilmiş ve Yenilenmiş 6 ncı Baskı, Bilim Teknik Kitapevi, Eskişehir, 1996
7. Berthelon, M., Caillaud, C., Rey, F., Labrune, P., Melle, D., Feingold, J., Frezal, J, Briard, M-L, Farriaux, J.P., Guibaud, P., Journal, H., Le Marec, B., Maurin, N., Nivelon, J.L., Plauchu, H., Saudubray, J-M., Tron, P., Rey, J., munnich, A., Lyonnet, S.: Spectrum of phenylketonuria mutations in Western Europe and North Africa, and their relation to polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum Genet.* 86:355-358, 1991.
8. Carson, N.A.J., Scally, B.G., Neil, D.W., Carrel, J.: Heterogeneity in Genetic Control of Phenylalanine Metabolism in Man. *Natur*, 218: 3677-3678, 1968.
9. Committee on Genetics. Newborn Screening Fact Sheet. *Pediatrics*, 83:449-464, 1989.
10. Daiger, S.P., Chakraborty, R., Reed, L., Fekete, g., Schuler, D., Berenssi, G., Nasz, I., Brdicka, R., Kamaryt, J., Pijactova, A., Moore, S., Sullivan, S., Woo, S.L.C.: Polymorphic DNA Haplotypes at the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus in European Families with Phenylketonuria (PKU). *Am. j. Hum. Genet.* 45:310-318, 1989.

- 11.Desviat, L.R., Perez, B., Ugarte, M.: Phenylketonuria in Spain: RFLP haplotypes and linked mutations. *Human Genetics*. 92:254-258, 1993.
- 12.Desviat, L.R., Perez, B., Lucca, M.D., Cornejo, V., Schmidt, B., Ugarte, M.: Evidence in Latin America of Recurrence of V388M, a Phenylketonuria Mutation with High In Vitro Residual Activity. *Am.J. Hum. Genet.* 57:337-342, 1995.
- 13.Dianzani, I., Camaschella, C., Saglio, G., Ferrero, G.B., Ramus, S., Ponzzone, Cotton, R.G.H.: Molecular analysis of contiguous exons of the phenylalanine hydroxylase gene: identification of a new PKU mutation. *J. Med. Genet.* 30:228-231, 1993.
- 14.Dilella, A.G., Marviut, J., Lidsky, A.S., Güttler, F., Woo, S.L.C.: Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature*. Vol.322, 799-803, 1986.
- 15.Dilella, A.G., Huang, W-M., Woo, S.L.C.: Screening for Phenylketonuria Mutations By DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. *The Lancet*. 497-499, 1988.
- 16.Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Kalaydjieva, L., Bartholome, K., Grudda, K., Horst, J. Aberrant Splicing of Phenylalanine Hydroxylase mRNA: The Major Cause for Phenylketonuria in Parts of Southern Europe. *Genomics*. 11, 242-246, 1991.
- 17.Eigel, A., Dworniczak, B., Kalaydjieva, L., Horst, J.: A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1. *Hum. Genet.* 87:739-741, 1991.
- 18.Eisensmith, R.C., Okano, Y., Dasovich, M., Wang, T., Güttler, F., Lou, H., Guldberg, P., Lichter-Konecki, U., Svensson, E., Hagenfeld, L., Rey, F., Munnich, A., Lyonnet, S., Cockburn, F., Connor, J.M., Pembrey, M.E., Smith, I., Gitzelmann, R., Steinmann, B., Apold, J., Eiken, H.G., Giovannini, M., Riva, E., Longhi, R., Romano, C., Cerone, R., Naughten, E.R., mullins, C., Cahalane, S., Özalp, I., Fekete, G., Schuler, D., Berencsi, G.Y., Nasz, I., Brdicka, R., Kamaryt, J., Pijackova, A., Cabalska, B, Boszkowa, K., Schwartz, E., kalinin, V.N., Jin, L., Chakraborty, R., Woo, S.L.C.: Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. *Am. J. Num. Gene.*51:1355-1365, 1992.
- 19.Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C.: Molecular Basis of Phenylketonuria and Related Hyperphenylalaninemias: Mutations and Polymorphisms in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Human Mutation*. 1:13-23, 1992.

20. Eisensmith, R.C., Goltsov, A.A., O'Neill, C., Woo, S.L.C.: A Simple, Rapid, and Highly Informative PCR-Based Procedure for Prenatal Diagnosis and Carrier Screening of Phenylketonuria. *Prenatal Diagnosis*, Vol. 14:1113-1118, 1994.
21. Eisensmith, R.C., Goltsov, A.A., O'Neill, C., Tyfield, L.A., Schwartz, E.I., Kuzmin, A.I., Baranovskaya, S.S., Tsukerman, G.L., Treacy, E., Scriver, C.R., Güttler, F., Guldberg, P., Eiken, H.G., Apold, J., Svensson, E., Naughten, E., Cahalane, S.F., Croke, D.T., Cockburn, F., Woo, S.L.C.: Recurrence of the R408W mutation in the Phenylalanine Hydroxylase Locus in Europeans. *Am. J. Hum. Genet.* 56:278-286, 1995.
22. Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C.: Updated listing of haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am. J. Hum. Genet.* 51:1445-148, 1992.
23. Friedman, P.A., Kaufman, S., Kang, E.S.: Nature of the Molecular Defect in Phenylketonuria and Hyperphenylalaninaemia. *Nature*. Vol. 240, 157-159, 1972.
24. Goltsov, A.A., Eisensmith, R.C., Konecki, D.S., Konecki, U.L., Woo, S.L.C.: Associations Between Mutations and a VNTR in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 51:627-636, 1992.
25. Gözükar, E.M., *Biyokimya Kitabı, Cilt 1, Evin Matbaası, Malatya, 1994.*
26. Guldberg, P., Romano, V., Ceratto, N., Bosco, P., Ciuna, M., Indelicato, A., Mollica, F., Meli, C., Giovannini, M., Riva, E., Biasucci, G., Henrkisen, K.F., Güttler, F.: Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: Implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in Southern Europe. *Human Molecular Genetics*, Vol. 2, 1703-1707, 1993.
27. Güttler, F., Ledley, F.D., Lidsky, A.S., Dilella, A.G., Sullivan, S.E., Woo, S.L.C.: Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenylalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*. Volume 110, 68-71, 1987.
28. Güttler, F. Impact of medical genetics concerning phenylketonuria: accomplishments, status and practical future possibilities. *Clinical Genetics*. 36:333-334, 1989.
29. Herrmann, F.H., Wolff, K., Wehnert, M., Seidlitz, G., Güttler, F.: Haplotype analysis of classical and mild phenotype of phenylketonuria in the German Democratic Republic. *Clinical Genetics*. 34:176-180, 1988.

- 30.Hilton, M.A., Sharpe, J.N., Hicks, L.G., Andrews, B.F.: A simple method for detection of heterozygous carriers of the gene for classic phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*. Volume 109, 601-604, 1986.
- 31.Holtzman, N.A., Dorts, M.D., Welgher, W., Mellits, E.D.: Termination of Restricted Diet in Children with Phenylketonuria: A Randomized Controlled Study. *The New England Journal of Medicine*. Vol.293, 11121-1125, 1975.
- 32.Holtzman, N.A., Kronmal, R.A., Doorninck, W.V., Azen, C., Koch, R.: Effect of Age at Loss of Dietary Control on Intellectual Performance and Behavior of Children with Phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine*. Volume 314, 593-598, 1986.
- 33.Huang, S-Z., Zhou, X-D., Ren, Z-R., Zeng, Y-T., Woo, S.L.C.: Prenatal Detection of an Arg-Ter Mutation at Codon 111 of the PAH Gene Using DNA amplification. *Prenatal Diagnosis*, Vol.10, 289-293, 1990.
- 34.Ivaschenko, T., Baranov, V.S.: Rapid and efficient PCR/STYI test For identification of common mutation R408W in phenylketonuria patients. *J. Med. Genet.* 30:153-154, 1993.
- 35.Jakubovic, A. : Phenylalanine Hydroxylating System in the Human Fetus at Different Developmental Ages. *Biochim Biophys Acta.* 237:469-471, 1971.
- 36.Jaruzelska, J., Matuszak, R., Lyonner, S., Rey, F., Rey, J., Filipowicz, j., Borski, K., Munnich, A.: Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J. Med. Genet.* 30:232-234, 1993.
- 37.John, S.W.M., Rozen, R., Laframboise, R., Laberge, C., Scriver, C.R.: Novel PKU Mutation on Haplotype 2 in French-Canadians. *Am. J. Hum. Genet.* 45:905-909, 1989.
- 38.Kalaydjieva, L., Dworniczak, B., Kremensky, I., Koprivarova, K., Dadeva, eB., Milusheva, R., Aulehia-Scholz, C., Horst, J.: Heterogeneity of mutations in Bulgarian phenylketonuria haplotype 1 and 4 alleles. *Clin Genet.* 41:123-128, 1992.
- 39.Kaufman, S.: Phenylalanine Hydroxylation Cofactor in Phenylketonuria. *Science*, Vol. 128, 1506-1507, 1958.
- 40.Kaufman, S.: Studies on the Mechanism of the Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.234, 2677-2682,1959.

41. Kaufman, S.: Metabolism of the Phenylalanine Hydroxylation Cofactor. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 242, 3934-3913, 1967.
42. Kaufman, S.: An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *The Journal of Pediatrics*. Volume 114, 895-900, 1989.
43. Konecki, D.S., Schlotter, M., Trefz, F.K., Lichter-Konecki, U.: The identification of two missense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. *Hum. Genet.* 87:389-393, 1991.
44. Konecki, D.S., Lichter-Konecki, U.: The phenylketonuria locus: Current Knowledge About Alleles and Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Various Populations. *Hum. Genet.* 87:377-388, 1991.
45. Konecki, U.L., Schlotter, M., Konecki, D.S.: DNA sequence polymorphisms in exonic and intronic regions of the human phenylalanine hydroxylase gene aid in the identification of alleles. *Hum. Genet.* 94:307-310, 1994.
46. Kozak, L., Dvorakova, D., Puackova, A., Kamaryt, J.: Haplotype Edistribution at the Phenylalanine Hydroxylase Locus in PKU Families from the Moravian Area of Czechoslovakia. *J. Inher. Metab. Dis.* 16:451-456, 1993.
47. Kuzmin, A., Eisensmith, R.C., Goltsov, A.A., Sergeeva, N.A., Schwartz, E. I., Woo, S.L.C.: Complete Spectrum of PAH Mutations in Tataria: Presence of Slavic, Turkic and Scandinavian Mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 3:246-255, 1995.
48. Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., Dilella, A.G., Robson, K.J.H., Woo, S.L.C.: Nucleotide Sequence Of Full-Length Complementary DNA Clone And Aminoacid Sequence Of Human Phenylalanine Hydroxylase, *Biochemistry*, 24: 556-566, 1985
49. Ledley, F.D.: Clinical application of genotypic diagnosis for phenylketonuria: theoretical considerations. *Eur J Pediatr.* 150:752-756, 1991.
50. Ledley, F.D., Grenett, H.E., Dilella, A.G., Kwok, S.C.M., Woo, S.L.C.: Gene Transfer and Expression of Human Phenylalanine Hydroxylase. *Science*, Vol.228, 77-79, 1985.
51. Lidsky, A.S., Law, M.L., Morse, H.G., Kao, F-T., Rabin, M., Ruddle, F.H., Woo, S.L.C.: Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol.82, 6221-6225, 1985.

- 52.Lidsky, A.S., Güttler, F., Woo, S.L.C.: Prenatal Diagnosis of Classic Phenylketonuria by DNA Analysis. *The Lancet*. 549-551, 1985.
- 53.Lyonnet, S., Caillaud, C., Rey, GF., Berthelon, M., Frezal, J., Rey, J., munnich, A.: molecular Genetics of Phenylketonuria in Mediterranean Countries: A mutation Associated with Partial Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 44:511-517, 1989.
- 54.Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. Phenylketonuria due to Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: An Unfolding Story. *BMJ*, 306:115-119, 1993.
- 55.Melnick, C.R., Kimberlee, M.A., Michals, R.D., Matalon, R.: Linguistic development of children with phenylketonuria and normal intelligence. *The Journal of Pediatrics*, Volume 98, 269-273, 1981.
- 56.Neyzi, O., Ertuğrul, T., *Pediatri Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1990.*
- 57.Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R.C., Steinmann, B., Gitzelmann, R., Woo, S.L.C.: Missense Mutations Associated with RFLP Haplotypes I and 4 of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 46:18-25, 1990.
- 58.Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R.C., Güttler, F., Woo, S. L.C.: Recurrent Mutation in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 46:919-924, 1990.
- 59.Okano, Y., Eisensmith, R.C., Güttler, F., Nonecki, U.L., Koneicki, D., Trefz, F.K., Dasovich, M., Wang, T., Henriksen, K., Lou, M.S.H., Woo, S.L.C.: Molecular Basis of Phenotypic Heterogeneity in Phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine*, 324:1232-1238, 1991.
- 60.Özalp, İ., Çoşkun, T., Tokatlı, A., Tokol, S., Özgüç, M., Köksal, G., Erdem, G., Yurdakök, M.: Neonatal PKU screening in Turkey: 7 years experience in a developing country. *Elsevier Screening*, 4,139-147,1995.
- 61.Özgüç, M., Özalp, İ., Çoşkun, T., Yılmaz, E., Erdem, H., Ayter, Ş.: Mutation Analysis in Turkish Phenylketonuria Patients. *J. Med. Genet.*, 30:129-130, 1993.
- 62.Özgüç, M.,Yılmaz, E.,Erdem, H.,Çoşkun, T., Tokatlı, A., Özalp, İ., Association Between Mutation and Variable Number Tandem Repeat Alleles in a Sample of Turkish Phenylketonuria[†] patients, *Inher. Metab. Dis.*, 17:373-374, 1994.

63. Robson, K.J.H., Chandra, T., MacGillivray, R.T.A., Woo, S.L.C.: Polysome Immuneoprecipitation of Phenylalanine Hydroxylase mRNA from Rat Liver and Cloning of its cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4701, 1982.
64. Robson, K.J.H., Beattie, W., James, R.J., Cotton, R.C.H., Morgan, F.J., Woo, S.L.C., MacGillivray, R.T.A.: Sequence Comparison of Rat Liver Phenylalanine Hydroxylase and its cDNA Clones. *Biochemistry*, 23:5671, 1982.
65. Rawn, J.D.: *Biochemistry (International Edition)* Neil Patterson Publishers, 1989.
66. Romano, V., Dianziani, I., Ponzone, A., Zammarchi, E., Eisensmith, R., Ceratto, N., Bosco, P., Indelicato, A.: Prenatal Diagnosis by Minisatellite Analysis in Italian Families with Phenylketonuria. *Prenatal Diagnosis*. Vol.14, 959-962, 1994.
67. Rosenblatt, D., Scriver, C.R.: Heterogeneity in Genetic Control of Phenylalanine Metabolism in Man. *Nature*. Vol 218, 677-678, 1968.
68. Rozen, R., Mascisch, A., Lambert, M., Laframboise, R., Scriver, C.R.: mutation Profiles of Phenylketonuria in Quebec Populations: Evidence of Stratification and Novel Mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 55:321-326, 1994.
69. Scriver, C.R., Clow, C.L.: Phenylketonuria: Epitome of human Biochemical Genetics. (First Parts) *The New England Journal of Medicine*. Vol.303, 1337-1341, 1980.
70. Scriver, C.R., Clow, C.L.: Phenylketonuria: Epitome of human Biochemical Genetics. (Second Parts) *The New England Journal of Medicine*. Vol.303, 1394-1400, 1980.
71. Scriver, C.R.: Phenylketonuria-Genotypes and Phenotypes. *The New England Journal of Medicine*. Vol.324, 1280-1281, 1991.
72. Scriver, C.R., Beaududet, A.L., Sly, W.S.: *Metabolic Basis of Inherited Diseases* (7th Edition) New York, McGraw-Hill, 1994.
73. Silvestre, D.D., Pandya, A., Roch, R., Groffen, J.: DNA Haplotype Analyses of Patients with Hyperphenylalaninemia. *Am.J. Hum. Genet.* 47:706-712, 1990.
74. Smith, I., Wolff, O.H.: Natural History of Phenylketonuria and Influence of Early Treatment. *The Lancet*. 540-544, 1974.

75. Smith, I., Lobascher, M.E., Stevenson, J.E., Wolff, O.H., Schmidt, H., Grubel-Kaiser, S., Bickel, H.: Effect of stopping low-phenylalanine diet on intellectual progress of children with phenylketonuria. *British Medical Journal*.2:723-726, 1978.
76. Smith, I., Beasley, M.G., Wolff, O.H., Ades, A. E.: Behavior disturbance in 8-year-old children with early treated phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*. Volume 112, 403-408, 1988.
77. Stuhmann, M., Riess, O., Mönch, I., Kurdoğlu, G.: Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Turkish phenylketonuria families. *Clinical Genetics*. 36:117-121, 1989.
78. Sullivan, S.E., Moore, S.D., Connor, J.M., King, M., Cockburn, F., Steinmann, B., Gitzelmann, R., Daiger, S.P., Woo, S.L.C.: Haplotype Distribution of the Human Phenylalanine Hydroxylase Locus in Scotland and Switzerland. *Am. J. Hum. Genet.* 44:652-659, 1989.
79. Svensson, E., vonDöbeln, U., Eisensmith, R.C?, Hagenfeldt, L., Woo, S.L.C.: Relation Between Genotype in Swedish Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia Patients. *Eur J. Pediatr.* 152:132-139, 1993.
80. Swaiman, K.F.: *Pediatric Neurology: Volume II*, The C.V. Mosby Company, 1989.
81. Synoidinos, T.J., Kanavakis, E., Kalegerakou, M., Souly, K., Tsangaraki, M.S., Katamis, C.: Preliminary Mutation Analysis in the Phenylalanine Hydroxylase Gene. In Greek PKU and HPA Patients. *Hum. Genet.*, 94:573-575, 1994.
82. Thompson, A.J., Smith, J., Brenton, D., Youl, B. D., Rylance, G., Davidson, D.C., Kendall, B. Lees, A.J.: Clinical Practice: Neurological Deterioration in Young Adults With Phenylketonuria. *The Lancet*. Vol 336,602-605, 1990.
83. Thompson, M.W., McInnes, R.R., Willard, H.F.: *Thompson&Thompson Genetics in Medicine (5th Edition)*, HBJ Saunders, 1992.
84. Udenfriend, S. Cooper, J.R.: The Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine. *J.Biol.Chem.*,194:503-511, 1952
85. Verkerk, P.H., Spronsen, F.J., Smit, G.P.A., Cornel, M.C., Kuipers, J.R.G., Verloove-Vanhorick, S.P.: Prevalence of congenital heart disease in patients with phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*. volume 119, 282-283,1991.

- 86.Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R., Huang, S-Z., Zeng, Y-T., Lo, W.H.Y., Woo, S.L.C.: Molecular Genetics of Phenylketonuria in Orientals: Linkage Disequilibrium between a Termination Mutation and Haplotype 4 of the Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Am.J. Hum. Genet.* 45:675-680, 1989.
- 87.Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R., Huang, S-Z., Zeng, Y-T., Lo, W.H.Y., Woo, S.L.C.: Identification of a Novel Phenylketonuria (PKU) Mutation in the Chinese: Further Evidence for Multiple Origins of PKU in Asia. *Am.J. Hum. Genet.* 48:628-630, 1991.
- 88.Watson, J.D., Witkowski, J., Gilman, M., Zoller, M.: *Recombinant DNA (2nd Edition)*, Scientific American Books, 1992.
- 89.Woo, S.L.C.: Collation of RFLP Haplotypes at the Human Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus. *Am.J.Hum.Genet.*, 43:781-783, 1988.
- 90.Zschocke, J., Graham, A.C.A., Carson, D.J., Nevin, N.C.: Phenylketonuria Mutation Analysis in Northern Ireland: A rapid Stepwise Approach. *Am. J. Hum. Genet.* 57:1311-1317, 1995.

ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladıktan sonra 1980 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesine girdi. 1986 yılında yüksek öğrenimini tamamlayarak mecburi hizmete gitti. 1990 yılına kadar Sağlık Bakanlığına bağlı kurumlarda görev yaptı. 1990 yılında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalında doktora öğrenimine başladı. 1992 yılında Tıbbi Genetik Bilim Dalı uzman kadrosuna atandı. Halen Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalında görevini sürdürmektedir. Evli ve 3 çocuk babasıdır.