

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

***PTPN11* GENİ MUTASYONLARININ NOONAN SENDROMLU
HASTALARDA TARANMASI**

FİLİZ BAŞAK CENGİZ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa Tekin

2006-ANKARA

ÖNSÖZ

Bilim adamı olmam için ilk adımlarımı attıran, tez çalışmamda belleğindeki tüm bilgileri bana aktarmaya çalışan, hayatımın sonuna kadar bilgi ve yeteneğine ihtiyaç duyacağım hocam Doç. Dr. Mustafa TEKİN' e, bilimsel çalışma şartlarında ülkemizdeki zorlukları bilen bu nedenle yardımlarını hiç esirgemeyen ve önümüzü açan Prof. Dr. Nejat AKAR' a, sıcak bir çalışma ortamını paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Uzman Biyolog Ece AKAR' a, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım çalışma arkadaşlarım Uzman Biyolog Duygu DUMAN' a, Biyolog Aslı SIRMACI' ya, Uzman Biyolog İdil ASLAN' a ve ismini sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik ailesine ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yaptığım çalışmalarda yardımlarını benden esirgemeyen Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Uzman Biyolog Buket DÖNMEZ'e çok teşekkür ederim. Bana verdiği koşulsuz destek ve sabır için biricik anneme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
İçindekiler	ii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
Ekler	viii
1. Giriş 1	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Noonan Sendromu	2
1.1.2. SHP-2 Proteini	2
1.1.3. Noonan Sendromunun Genetiği	5
1.1.4. <i>PTPN11</i> Genindeki Mutasyonların Noonan Sendromu Dışındaki Fenotipik Bulguları	9
1.1.5. Fenotipik Olarak Noonan Sendromuna Benzeyen Sendromların Genetik Özellikleri	9
1.1.6. Noonan Sendromu ve Lösemi	10
1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER	11
1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
1.2.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP)	13
1.2.3. DNA Dizi Analizi	14
1.2.4. DNA'nın Enzimatik Kesimi	15
1.2.5. Denatüre edici Yüksek-Basınçlı Sıvı Kromatografisi (DHPLC)	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	18
2.2. Kullanılan Yöntemler	18
2.2.1. DNA İzolasyonu	18
2.2.2. <i>PTPN11</i> Mutasyon Taraması	19
2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
2.2.2.2. PCR için Agaroz Jel Elektroforezi	20
2.2.2.3. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	21

2.2.2.4.Gümüş Boyama	22
2.2.2.5.DHPLC	23
2.2.2.6.DNA Dizi Analizi	25
2.2.2.7.PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi	26
2.2.2.8.EcoRV restriksiyon endonükleazı için Agaroz Jel Elektroforezi	26
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA	31
Özet	33
Summary	34
Kaynaklar	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin bazı
ACN	Asetonitril
Ala (A)	Alanin aminoasiti
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Arg (R)	Arginin aminoasiti
Asn (N)	Asparajin aminoasiti
Asp (D)	Aspartik asit aminoasiti
bç	Baz çifti
°C	Santigrat derece
Cys (C)	Sistein aminoasiti
DHPLC	Denatüre edici yüksek-basınçlı sıvı kromatografisi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
GDP	Guanozin difosfat
Glu (E)	Glutamik asit aminoasiti
Gln (Q)	Glutamin aminoasiti
Gly (G)	Glisin aminoasiti
gr	Gram
GTP	Guanozin trifosfat
His (H)	Histidin aminoasiyi
Ile (I)	İzolösün aminoasiti
kDa	Kilo dalton
Leu (L)	Lösün aminoasiti
Lys (K)	Lizin aminoasiti
M	Molar
Met (M)	Metionin aminoasiti
mg	Miligram
MgCl ²	Magnezyum klorür

ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
p	Kromozomun kısa kolu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe (F)	Fenilalanin aminoasiti
Pro (P)	Prolin aminoasiti
q	Kromozomun uzun kolu
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
Ser (S)	Serin aminoasiti
sn	Saniye
SSCP	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
TEAA	Trietamonyum asetat
Thr (T)	Treonin aminoasiti
Trp (W)	Triptofan aminoasiti
Tyr (Y)	Tirozin aminoasiti
Val (V)	Valin aminoasiti

ŞEKİLLER

- Şekil 1.** SHP-2 ptoteinin üç boyutlu yapısı.
- Şekil 2.** RAS-ERK sinyal yolu ve bağlantılı hastalıklar.
- Şekil 3.** PTPN11 geninin düzenlenmesi, SHP-2 proteinin bölgelerinin yapısı ve sık görülen mutasyonlar.
- Şekil 4.** 2-4, 7-9, 12-13. eksonların DHPLC cihazında “Navigator Software”da hesaplanan erime sıcaklıklarının grafikleri
- Şekil 5.** *PTPN11* geninde 3.eksonda c.188A>G ve c. 214G>T değişimlerini taşıyan olguların SSCP jel görüntüsü.
- Şekil 6.** *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c.188A>G değişimi, *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c. 214G>T değişimi ve *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c.172A>G değişiminin DNA dizi analizi sonuçları.
- Şekil 7.** *PTPN11* geninde 8. eksonda *EcoRV* enzimi ile yapılan RFLP sonuçları. M marker, 2-5,7,9-10,12-14 c.922A>G değişimi olmayan olgular; 6, 8 ve 11 heterozigot c.922A>G değişimi saptanan olgular.
- Şekil 8.** *PTPN11* geninde 3. eksonda ve 8. eksonda yapılan DHPLC sonuçları.

ÇİZELGELER

Çizelge 1. *PTPN11* geninde bulunan mutasyonlar ve bulunan mutasyonlarda kullanılan metodlar.

EKLER

Ek 1. *PTPN11* proteinin aminoasit dizisi

1. GİRİŞ

Noonan sendromu (NS), otozomal dominant olarak kalıtılan ve 1500 - 2500 doğumda görülen bir durumdur. NS'lu olguların yaklaşık %50'sinde *PTPN11* geninde mutasyonlar meydana gelmektedir.

Bu gende bugüne kadar çok sayıda mutasyon tanımlanması nedeniyle NS'a moleküler tanı konurken doğrudan DNA dizi analizi yapılması en uygun yöntem olarak görünmektedir. Ancak bu yöntemin maliyeti yüksektir ve klinik tanı amacıyla her hastaya uygulamak zordur. Bu çalışmada klinik olarak NS tanısı konan hastalarda SSCP ve DHPLC'nin rutin tanı yöntemi olarak kullanılıp kullanılamayacağı test edilmiştir. İçinde en çok mutasyon tanımlanan *PTPN11* eksonlarında bu tarama metodlarının duyarlılığı dizi analizi ile karşılaştırılmıştır ve NS'unda moleküler tanı incelemeleri için bir giriş protokolü oluşturulmuştur.

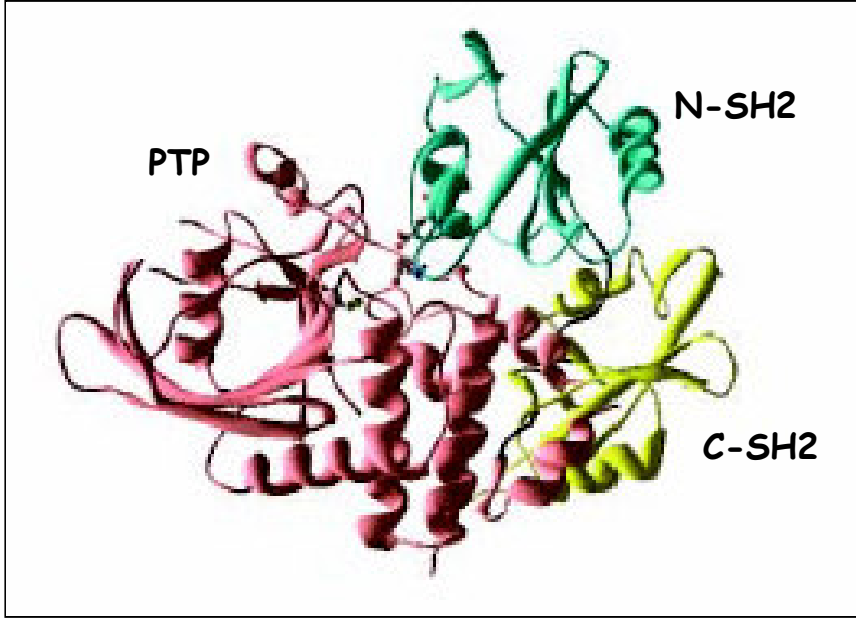
1.1.GENEL BİLGİLER

1.1.1. Noonan Sendromu

Noonan sendromu (NS- OMIM 163950) ilk defa 1968 yılında tanımlanmıştır. Klinik olarak yüzde sendroma özgü değişiklikler, boy kısalığı, yele boyun, göğüs deformitesi, konjenital kalp defektleri, kriptorşidizm, lenfatik displazi, öğrenme güçlükleri ile tanı konulmaktadır. Sendroma özgü tipik yüz şeklini ise hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, düşük ve arkaya dönük kulaklar ve geniş alın oluşturmaktadır. Kardiyak anomaliler hastaların %90'ında görülmektedir. Tipik kardiyak anomali valvuler pulmoner stenozdur ancak hipertropik kardiyomyopati başta olmak üzere farklı anomaliler bulunabilir. Bu sendrom otozomal dominant olarak kalıtılır ve 1/1500-1/2500 doğumda görülür (Tartaglia ve ark., 2002). NS'da lösemi ve diğer miyeloproliferatif hastalıklara karşı yüksek risk olduğu gösterilmiştir; solid tümörler de meydana gelebilmektedir (Maheshwari ve ark., 2002). Birçok otozomal dominant hastalıkta olduğu gibi, olguların önemli bir kısmında sporadik mutasyonlar meydana gelmektedir (Gelb ark., 2006).

1.1.2. SHP-2 Proteini

PTPN11 geni tarafından kodlanan SHP-2 proteini bir “non-reseptör protein tirozin fosfataz” (PTP) proteinidir ve amino uçta N-SH2 ve C-SH2, karboksi uçta ise PTP bölgeleri olmak üzere üç bölgeden meydana gelmektedir (Şekil 1) (Tartaglia ve ark., 2001).

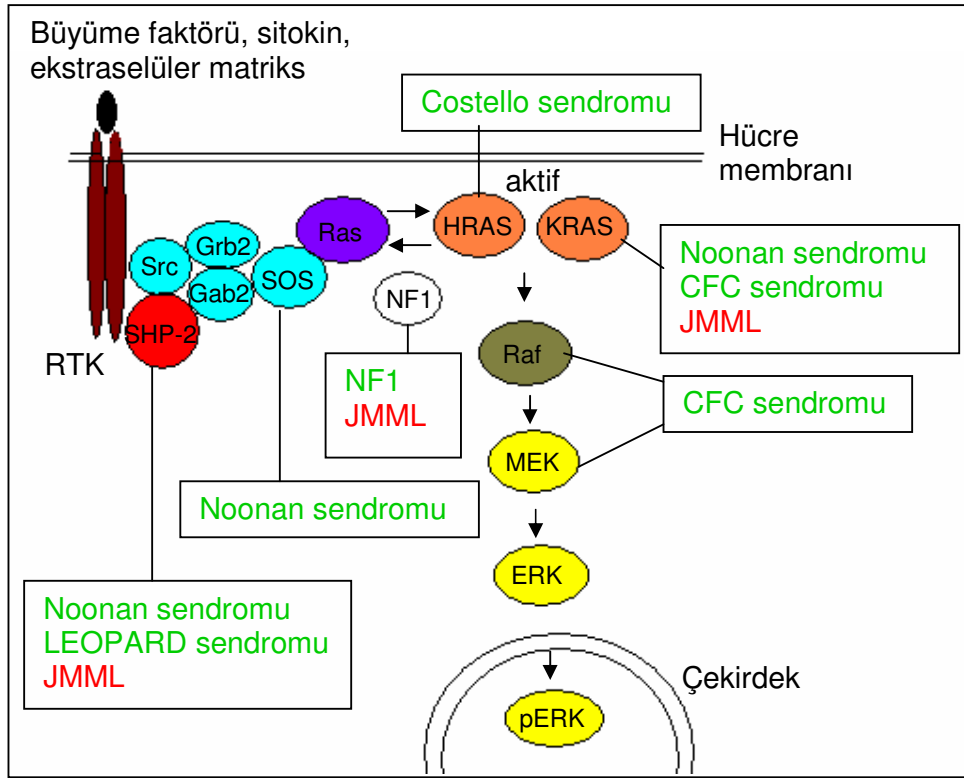


Şekil 1. SHP-2 proteinin üç boyutlu yapısı. N-SH2 bölgesi yeşil renkle, C-SH2 bölgesi sarı renkle, PTP bölgesi ise pembe renkle gösterilmiştir (Loh ve ark., 2004).

PTPN11 geni 12q24.1'de lokalize olmuştur, 15 ekson içermekte ve 593 amino asitten meydana gelmektedir (Ek 1). SHP-2 proteini büyüme faktörü, sitokin ve ekstrasellüler matriks reseptörlerinin sinyal iletim yolunda, hücre büyümesinin düzenlenmesinde, transformasyon, farklılaşma ve hücre göçünde anahtar molekül olarak görev yapmaktadır (Tartaglia ve ark., 2002; Bentires-Alj ve ark., 2004).

Birçok mutasyon, proteinin etkileşim yüzeyindeki amino asitlerin değişimlerine yol açmaktadır; bu amino asitler proteinin stabilize olmasını sağlamaktadır. Bu kritik amino asitlerde meydana gelen mutasyonlar SHP-2 proteininin aktif ve inaktif formları arasındaki dengeyi bozmaktadır (Musante ve ark., 2003). SHP2 proteininin inaktif formunda N-SH2 bölgesi PTP bölgesine bağlanmakta ve PTP bölgesinin katalitik bölgesi bloke edilmektedir, SHP2 proteinin aktif formunda ise N-SH2 bölgesi fosfopeptide bağlanmakta ve böylece katalitik bölge açılmaktadır (Bertola ve ark., 2004). C-SH2 bölgesi proteinin bağlanmasına ve spesifikliğine katkıda bulunmaktadır fakat aktivasyonunda direkt rol oynamamaktadır (Hof ve ark., 1998). *PTPN11* geninde meydana gelen mutasyonlar SHP-2 proteinine fonksiyon kazandırmakta ve tirozin fosfataz aktivitesini artırmaktadır (Lee ve ark., 2005).

PTPN11 geni kalp, iskelet kası, beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve pankreas gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır. SHP-2 proteini sitoplazmada yer almakta ve aktif hücre yüzeyi reseptörlerine, adezyon moleküllerine bağlanarak görev yapmaktadır. Bu protein RAS/MAPK yolunda aktivasyonu pozitif olarak regüle eder ve bu yolla birçok büyüme faktörü uyarılır ayrıca JAK/STAT sinyal yolunu da negatif olarak regüle eder (Şekil 2).



Şekil 2. RAS-ERK sinyal yolu ve bağlantılı hastalıklar. Bu yolda bulunan bir çok molekülde meydana gelen somatik mutasyonlar kansere neden olmaktadır, germ hücreleri mutasyonları ise NS ve klinik olarak benzer hastalıklara neden olmaktadır. RAS RAF'a bağlanır ve aktivasyonunu uyarır, RAF MEK'i aktive eder, MEK de ERK'i aktive eder. ERK gen ekspresyonu ile ekstraselüler sinyallerin cevabını düzenler ve proliferasyon, farklılaşma, ve apoptosizi regüle eder (Kratz ve ark., 2006, Niihori ve ark., 2006 ve Gelb ve ark., 2006' dan yararlanılarak çizilmiştir.).

SHP-2 proteini, RAS aracılı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunda gerekli bir bileşendir ve germ hücreleri ve somatik *PTPN11* mutasyonları RAS işlevlerinin kontrolünün kaybına neden olmaktadır. RAS proteinleri GDP/GTP düzenleyici moleküller anahtarlar ile sinyal akışını kontrol etmektedirler (Carta ve ark., 2006). RAS sinyalinde

görev yapan diğer proteinleri kodlayan genlerin de NS patogeneğinde rol oynadığı geçtiğimiz günlerde gösterilmiştir (Carta ve ark., 2006; Tartaglia ve ark., 2006).

1.1.3. Noonan Sendromunun Genetiği

PTPN11 genindeki mutasyonların büyük çoğunluğu N-SH2 bölgesi ve fosfotirozin fosfataz (PTP) bölgesinin etkileştiği bölgede toplanmıştır (Tartaglia ve ark., 2001). Bu mutasyonların çoğu yanlış anlamlı ve fonksiyon kazanımı sağlayan mutasyonlardır (Tartaglia ve ark., 2002).

Protein tirozin fosfatazlarda meydana gelen mutasyonlar kansere, otoimmün hastalıklara, inflamasyona ve gelişimsel hastalıklara neden olmaktadır (Bentires-Alj ve ark., 2004).

PTPN11 geninde görülen en sık mutasyon p.Asn308Asp değişimidir ve PTP bölgesinde yer almaktadır (Şekil 3). Daha önce bulunan p.Asn308Ser mutasyonundan dolayı 308. kodonunun sıcak nokta olduğu düşünülmektedir. N-SH2 ve PTP bölgesinde yer almayan farklı mutasyonlar da bulunmuştur. Bunlardan biri p.Asp106Ala 'dır. Asp106 N-SH2 ve C-SH2 bölgelerinin bağlandığı yerde bulunur ve bu değişimin N-SH2 bölgesinin esnekliğinde görevli olabileceği düşünülmüştür (Tartaglia ve ark., 2002).

Fragale ve ark.'na göre p.Asn308Asp, p.Ala72Ser, p.Ile282Val görülen en yaygın mutasyonlardır. Bu üç mutasyon sonucunda da fosfotirozil fosfataz aktivitesi artmaktadır. 72. konumdaki alanin ve 282. konumdaki izolösin aminoasitleri N-SH2 ve PTP bölgelerinde etkileşim yüzeyinde yer almakta ve SHP-2'nin konformasyonunda otoinhibitör olarak görev almaktadırlar (Fragale ve ark., 2004).

Bu güne kadar *PTPN11* geninde delesyon olarak bulunan ilk mutasyon del60Gly değişimidir. Bu mutasyonun bulunduğu hastada hem NS hem de juvenil miyelomonositik lösemi (JMML) bulunmaktadır. 60. konumdaki glisin N-SH2 bölgesinde yer alır ve N-SH2/PTP etkileşiminde doğrudan görev almaktadır. Bu nedenle bu amino asitin kaybı N-SH2/PTP bağlanma yüzeyini bozmaktadır. p.Thr42Ala mutasyonu ise yine N-SH2 bölgesinde yer alır. Bu mutasyon N-SH2/PTP bağlanma yüzeyinden uzakta bulunur

ancak tirozin fosfataz ile etkileşimde bulunduğundan önemli bir değişimdir (Yoshida ve ark., 2004).

del61Asp (181-183GATdel) değişimi *PTPN11* geninde NS'lu bir hastada bulunan ilk delesyondur. Bu delesyon PTP bölgesinin aktif bölgesinde yer almaktadır (Lee ve ark., 2005).

Tartaglia ve ark. *PTPN11* genindeki mutasyonların oluştuğu amino asitleri 6 grupta toplamıştır:

GrupI: N-SH2/PTP etkileşim yüzeyini açıp-kapan mutasyonlardır, katalitik olarak direkt rol oynamazlar. Bu bölgelerin proteinin aktif ve inaktif konformasyonları arasındaki dengeyi etkilediği tahmin edilmektedir. (T2, N58, G60, D61, Y62, Y63, E69, F71, A72, T73, F76, Q79, Q256)

GrupII: PTP bölgesinin etkilenme yüzeyindeki amino asitlerin katalitik olarak inaktif kalmasına katkıda bulunurlar. (Y279, I282, A461, G464, Q506, Q510)

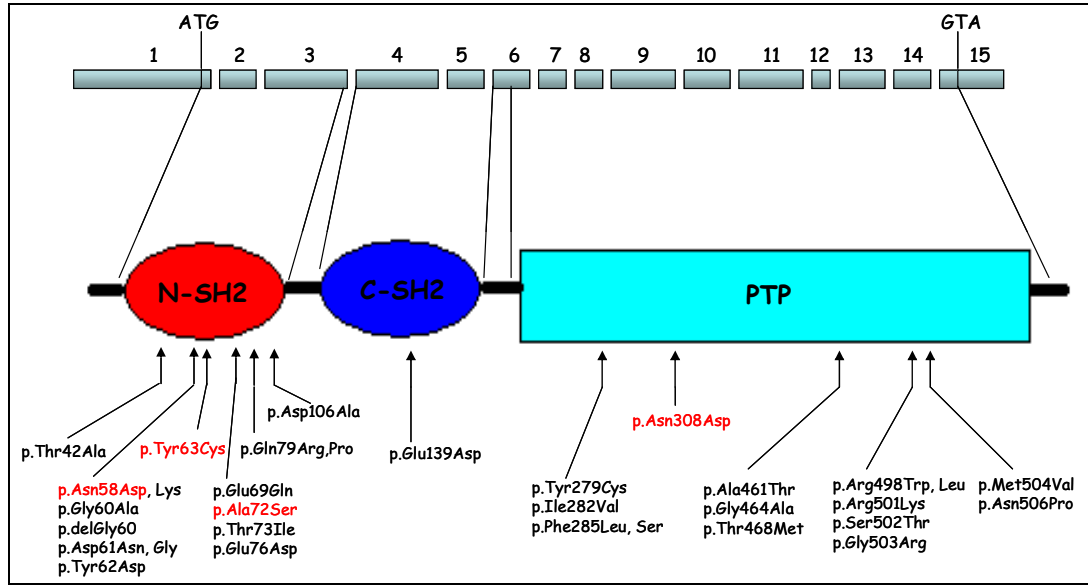
GrupIII: GrupII'de bulunan mutasyonlara benzerler ancak substratın spesifikliğinde görevli bölgelerdir. (G502, G503)

GrupIV: N-SH2/PTP etkileşimine önemli bir katkıları bulunmaz ancak PTP'nin yapısının korunmasında önemli role sahiptirler (F285, N308, I309, P491) ya da katalize katılarak rol oynamaktadırlar (T468, R498, R501, M504).

GrupV: Her iki SH2 bölgesinin de fosfopeptid bağlanma yarığında bulunan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar proteinin moleküler içi etkileşiminde görev yaparlar ve SHP-2'nin aktivasyonunu ve translokasyonunu kontrol etmektedirler. Bu mutasyonlar, fosfopeptid bağlanma bölgesinin spesifikliğini ve aktivitesini bozmaktadırlar (A42, L43, E149).

GrupVI: Bu gruptaki mutasyonlar her iki SH2 bölgesi ile etkileşime girer ve yönlendirme veya mobiliteyle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (D106, E110).

p.Thr411Met ve p.Leu560Phe mutasyonları yukarıda anlatılan grupların hiçbirine dahil edilememiştir. p.Thr411Met mutasyonu PTP yüzeyinde bulunur fakat N-SH2/PTP etkileşim yüzeyinden ve aktif bölgeden uzakta yer almaktadır. p.Leu560Phe ise C-terminal ucundaki proline zengin bölgede bulunmaktadır (Tartaglia ve ark., 2006).



Şekil 3. *PTPN11* geninin düzenlenmesi, SHP-2 proteinin bölgelerinin yapısı ve sık görülen mutasyonlar. Yukarıda genin kodlayan eksonları bulunmaktadır, altta ise proteinin yapısal bölgeleri ve bu bölgelerdeki mutasyonlar görülmektedir (Tartaglia ve ark.,2001, Gelb ve ark., 2006' dan yararlanılarak çizilmiştir).

İki yıl önce yapılan bir NS fare modelinde, fare embriyolarında p.Asp61Gly mutasyonu homozigot ise çok ağır kanamaya ve ödeme neden olduğu ve embriyonik dönemde ölümlerle sonlandığı görülmüştür. Bu mutasyon heterozigot ise embriyolar normal görülmekte ve yaşama şansları yükselmektedir (Araki ve ark., 2004).

Geçen yıl yapılan bir in vitro modelde ise primordial valvüler mezenşimal hücreler kullanarak *PTPN11* mutasyonlarından p.Gln79Arg' inin endokardiyal yastık hücrelerinde hücre büyümesini ve farklılaşmasını önemli derecede arttırdığı gösterilmiştir. Yabancıl tip SHP-2 bu etkilere sahip değildir (Krenz ve ark., 2005).

Bu yıl içinde transgenik meyve sinekleri kullanılarak bir model geliştirilmiştir. *Drosophila*'nın *PTPN11* homologu "*corkscrew (cws)*" dir. İki tane mutant *cws* alleli larval ölüme neden olmaktadır, p.Asn308Asp allelinin ekspresyonu ise kanatlarda ektopik damar oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Mutant *cws* genleri RAS/MAPK aktivasyonunu arttırmaktadır, bu artış çok önemlidir fakat oluşan fenotipleri anlamada yeterli değildir. Bu sinek modellerinden elde edilen bulgular ile memeli modellerinin test edilebileceği düşünülmüştür (Oishi ve ark. 2006).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Avrupa, Amerika ve Uzak Doğu Asya toplumlarında NS'lu olguların %30-50'sinde *PTPN11* geninde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu nedenle NS'lu diğer hastalarda farklı genlerde de çalışmalar yapılmaktadır. Bu genlerden biri *KRAS*' dir. *KRAS* geni 12p12.1 bölgesinde bulunur, 4 eksonu vardır ve 189 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır. Genel olarak, Ras proteinleri, aktif GTP veya inaktif GDP bağlayarak hücrede meydana gelen birçok biyokimyasal yolu regüle etmektedirler. Geçtiğimiz günlerde birbirinden bağımsız olarak farklı iki grup NS'na neden olabileceği düşünülen *KRAS* geninde mutasyon taraması yapmışlardır (Schubbert ve ark., 2006, Carta ve ark., 2006). Bu çalışmalar sonucunda *PTPN11* geninde mutasyon saptanamayan 212 NS'lu olgunun yedi tanesinde *KRAS* geninde dört farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu olgulardan birinde JMML ve kraniyosinostoz gelişmiştir ayrıca olguların iki tanesinde klinik özellikler Costello ve cardio-facio-cutaneous (CFC) sendromuna benzemektedir. Bu durum NS'lu olguların yaklaşık olarak %3'ünde *KRAS* geninde mutasyon olduğunu göstermektedir (Schubbert ve ark., 2006, Carta ve ark., 2006).

Carta ve ark. *KRAS* geninin B izoformunda geçtiğimiz günlerde iki farklı mutasyon göstermişlerdir. Her iki bölge de RAS proteininde kansere neden olan bölgeden uzakta yer aldığından NS patogenezi için farklı bir mekanizma olduğunu düşünmüşlerdir (Carta ve ark., 2006).

NS ile ilişkili olabileceği düşünülen diğer bir gen de *SOS1*'dir. İki farklı grup tarafından *PTPN11* ve *KRAS* genlerinde mutasyon saptanamayan NS'lu olgularda *SOS1* geninde mutasyon analizi yapılmıştır (Tartaglia ve ark., 2006; Roberts ve ark., 2006). *SOS1* geni 2p22.1 bölgesinde lokalize olmuştur, 23 ekson içerir ve 1333 aminoasitlik bir protein

kodlamaktadır. Bu protein RAS/MAPK yolunda reseptör tirozin kinaz (RTK) sinyalizasyonunda görev yapmaktadır. Bu reaksiyonda RAS-spesifik guanin nukleotit değişim faktörü (GEF) *SOS* tarafından katalizlenmektedir (Tartaglia ve ark., 2006). Tartaglia ve ark.'nın yaptığı çalışmada *PTPN11* ve *KRAS* genlerinde mutasyon saptanamayan NS'lu olguların %17'sinde Roberts ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise ~%20'sinde *SOS1* geninde mutasyon saptanmıştır (Tartaglia ve ark., 2006; Roberts ve ark., 2006).

1.1.4. *PTPN11* Genindeki Mutasyonların Noonan Sendromu Dışındaki Fenotipik Bulguları

PTPN11 geninin, NS geni olarak bulunuşu bu sendroma fenotipik olarak benzer bazı diğer hastalıkların genetik olarak çalışılmasına izin vermiştir. Bu sendromlardan birisi LEOPARD (Multiple *l*entigies, *E*lectrocardiographic conduction abnormalities, *O*cular hypertelorism, *P*ulmonary stenosis, *A*bnormalities of genitalia, *R*eterdation of growth, Sensorineural *d*eafness) sendromudur.

LEOPARD sendromunda cafe-au-lait lekeleri, yüz anomalileri ve kalp defektleri vardır ve NS'nun klinik özelliklerinin çoğunu paylaşmaktadır. LEOPARD sendromu olan dokuz, NS'lu ve birçok "cafe-au-lait" lekeleri olan iki hastada *PTPN11* mutasyonlarını taranmış ve 11 hastanın 10'nunda p.Tyr279Cys değişimi ve p.Thr468Met değişimi bulunmuştur (Digilio ve ark., 2002). Her iki mutasyon *PTPN11* geninde LEOPARD sendromlu hastalarda bugüne kadar rastlanan en yaygın mutasyonlardır. Ayrıca bugüne kadar bulunan mutasyonlardan üç tanesinin fosfataz aktivitesini düşürdüğü saptanmıştır (Gelb ve ark., 2006).

1.1.5. Fenotipik Olarak Noonan Sendromuna Benzeyen Sendromların Genetik Özellikleri

NS'a fenotipik olarak benzeyen diğer sendromlar Cardio-facio-cutaneus (CFC) sendromu, Costello sendromu (CS) ve Nörofibromatozis-Noonan sendromu (NFNS)'dur.

Bunlar benzer işlevleri olan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan gelişimsel hastalıklar olarak gruplandırılabilir (Carta ve ark., 2006).

CFC sendromu konjenital kalp defektleri, deri bulguları, NS'na benzer yüz özellikleri ve psikomotor gelişimsel gerilik ile klinik tanı konan bir sendromdur. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda CFC sendromu olan olgularda *PTPN11* geninde hiç bir mutasyona rastlanmamıştır (Baralle ve ark., 2003). Ancak SHP-2 proteininin de görev aldığı RAS/MAPK biyokimyasal yolundaki diğer genlerde mutasyon taraması yapılmış ve CFC sendromlu olgularda *KRAS*, *BRAF*, *MEK1* ve *MEK2* genlerinde mutasyonlar saptanmıştır (Nihori ve ark., 2006, Kartz ve ark., 2006, Gelb ve ark. 2006).

CS karakteristik dismorfik kraniofasiyal özellikler, ektodermal ve kas ve iskelete ait anomaliler, boy kısalığı ve gelişim geriliği ile karakterize edilir. Yüze ait özellikler ise çıkıntılı alın ile birlikte makrosefali, epikantal kıvrım, aşağı çekik palpebral fissürler, kısa burun, basık ve geniş burun kökü ve arkaya dönük kulaklar oluşturmaktadır. Kardiyak sorunlar değişik yapısal anomaliler, hipertropik kardiyomiyopati veya ritim bozukluğu olabilir (Tartaglia ve ark., 2003). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda CS'da *PTPN11* geninde hiç mutasyon tanımlanmamıştır. Fakat Aoki ve ark.' nın yaptığı çalışmada *HRAS* geninde yanlış anlamlı mutasyonlar tanımlanmıştır (Aoki ve ark., 2005).

NFNSF “cafe-au-lait” lekeleri, periferik nörofibromlar, Lisch nodülleri, aksiller çillenme, iskelet displazisi ve optik gliyomlar ile klinik tanı konan bir sendromdur. İlk defa 1985'de Allanson ve ark. NS ve nörofibromatozis tip1 arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Daha sonra Baralle ve ark. tarafından 6 tane NFNS 'lu olguda *PTPN11* geninde mutasyon analizi yapılmış fakat hiç mutasyon gösterilmemiştir (Baralle ve ark., 2003). Bu hastaların bir kısmında *NF1* geninin *KRAS* ile ilişkili bölgelerinde mutasyon tanımlanmıştır.

1.1.6. Noonan Sendromu ve Lösemi

Juvenil miyelomonositik lösemi (JMML) ve Akut lenfoblastik lösemi (ALL) NS'unda yaygın görülen iki lösemi türü olmasına rağmen olguların küçük bir kısmı bu

hastalıklardan etkilenmektedirler (Tartaglia ve ark., 2005). 2003'de Tartaglia ve ark. beş tane JMML ve NS'lu çocukta *PTPN11* geninde iki farklı mutasyon bulmuşlardır. Bu hastalardan dört tanesinde aynı mutasyon vardır, bu mutasyon p.Thr73Ile değişimidir (Tartaglia ve ark., 2003). Bunun üzerine NS olmayan JMML'li hastalarda somatik mutasyonlar taranmış ve yaklaşık %35'inde *PTPN11* geninde mutasyonlar gösterilmiştir. p.Asp61Tyr ve p.Glu76Lys değişimleri, NS'lu çocuklarda en yaygın mutasyon olan p.Asn308Asp değişiminden daha fazla fosfataz aktivitesi gösterdiğinden lösemi gelişimi için önemli mutasyonlar olarak tanımlanmışlardır. Diğer myeloid lösemilerde de olguların yaklaşık %11'inde *PTPN11* geninde mutasyon gösterilmiştir (Loh ve ark., 2004).

Tartaglia ve ark. yaptığı bir çalışmada ise 317 Akut Lenfoid Lösemi (ALL) hastasının 23'ünde *PTPN11* geninde mutasyonlar tanımlanmıştır. Toplam mutasyonların %35'i, 76. kodonda bulunur bu nedenle bu bölgenin sıcak nokta olduğu düşünülmüştür. p.Pro491Ile değişimi N-SH2/PTP etkileşim yüzeyinden uzakta bulunur fakat C-SH2 bölgesinin PTP bölgesine bağlanmasında görevli olduğundan önemli bir mutasyondur (Tartaglia ve ark., 2004).

Sonuç olarak somatik *PTPN11* mutasyonları JMML'lerin %35'inde, çocukluk miyelodisplastik sendromların %10'unda, akut lenfoblastik lösemilerin ~%7'sinde ve Akut Miyeloid Lösemilerin ~%4'ünde saptanmıştır (Bentires-Alj ve ark., 2004). Bu olguların büyük çoğunluğu pediatrik yaş grubundadır (Tartaglia ve ark., 2005).

1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, hedef DNA dizilerinin in-vitro koşullarda çoğaltılmasıdır. İlk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem bir dizi DNA polimeraz reaksiyonu içerdiğinden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılmaktadır (Akar, 1999).

PCR yöntemi, hızlı ve az miktarda DNA örneği ile çalışmaya olanak sağladığı için moleküler biyolojide, adli tıpta, evrim çalışmalarında ve pek çok alanda en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Yöntemin temeli, çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesinin iki ucunu özgül olarak tanıyıp bağlanabilen sentetik oligonükleotit primerler kullanılarak istenilen bölgenin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Akar, 1999).

PCR değişik sıcaklıklarda çalışan üç basamağın bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. İlk basamakta çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilir (denatürasyon). Bunlar yeni sentezlenecek DNA için kalıp işlevi görür. İkinci adımda sıcaklık düşürülerek primerlerin çoğaltılacak bölgenin iki ucunda yer alan kendi dizilerine özgül dizilere bağlanması sağlanır (annealing). Bu yapay oligonükleotit primerler, yeni sentezlenecek DNA için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. Üçüncü adımda sıcaklık DNA polimerazın optimum çalıştığı sıcaklığa getirilir. Polimeraz enzimi primerin 3' hidroksil ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesinin iki zincirli kopyasını oluşturur (polimerizasyon). Bu üç adım (çift iplikli DNA'nın tek iplikli hale getirilmesi, sentetik oligonükleotit primerlerin bağlanması, polimeraz enzimi ile zincirin uzaması) bir PCR döngüsünü oluşturur ve her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (sırasıyla 94°C - 98°C, 37°C - 65°C, 72°C); n döngü sonucu 2n sayıda ürün elde edilir. Her döngü, yeniden tek zincirli DNA oluşturmak üzere ısıtılarak başlar ve önceki döngü sonrası oluşmuş DNA molekülleri kalıp olarak işlev görür.

PCR reaksiyonu için; kalıp olarak kullanılacak DNA molekülü, çoğaltılması hedeflenen bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen, bu bölgedeki DNA dizisini tanıyıp bağlanabilen bir çift sentetik oligonükleotit primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP), DNA polimerazın çalışabilmesi için uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı gereklidir. Kullanılan oligonükleotit primerlerin seçimi sırasında primer dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan primer çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde primerin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak PCR'in olumsuz olarak

etkilenmesine neden olur. Primerlerin nükleotit içerikleri de rastgele olmalıdır, tekrarlayan diziler içermemelidir.

PCR reaksiyonu için *Thermus aquaticus*'dan izole edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir. Polimeraz enziminin fazla olması PCR ürününün arttırmadığı gibi fazla miktarda atık oluşmasına neden olur (Akar, 1999).

Kullanılan her bir deoksinükleotit trifosfatın (dNTP) konsantrasyonunun uygun olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. PCR reaksiyonunda kullanılan her bir dNTP aynı konsantrasyonda olmalıdır. dNTP' nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı yanlış primer eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerde çoğalmanın olmasına neden olur.

Kullanılan PCR tamponu farklı içeriklerde olabilir. Tampon içerisinde 10mM Tris, 50mM KCl, 1,5mM MgCl ve TritonX-100, Tween20 gibi iyonik deterjanlar bulunur. Mg² DNA polimerazın çalışmasını sağlayan en önemli faktör olup pozitif yükü sayesinde, negatif yüklü DNA molekülü arasına girerek primerlerin DNA molekülüne bağlanmasını kolaylaştırır. Fazla Mg² miktarı enzimin özgünlüğünü azaltırken, az miktarda olası enzimin aktivitesini düşürür (Akar, 1999).

1.2.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism)

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP) dir. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (Akar, 1999).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotit dizisine bağlı olarak belirli bir şekil alır. Bir baz değişimi DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner, 2002).

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA molekülleri yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilip, elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyonu işaret etmektedir.

SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte düşük maliyette mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bp civarında olması gerekmektedir (Akar, 1999). Teorik olarak SSCP ile 200 bp lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400 bp lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80 dir. İncelenen dizinin uzunluğu arttıkça SSCP' nin mutasyon belirleme yeteneği azalır. Ancak SSCP tekniğinin mutasyon belirleme yeteneği mutasyonun tek zincirli DNA' nın oluşturduğu konformasyonu ve elektroforetik hareketini nasıl etkilediğine bağlı olduğundan incelenecek dizinin ve mutasyonun özelliklerine bağlı olarak duyarlılıkta çok büyük değişiklikler gözlemlenmiştir (Öner, 2002).

1.2.3. DNA Dizi Analizi

DNA baz dizilerini saptanması için yöntemler, 1970'li yıllarının sonuna doğru geliştirilmiştir (Akar, 1999).

Sanger'in enzimatik yöntemi, dizi analizi yapılacak DNA parçasının 5'-3' yöndeki ipliğinin sentezini belirli bazlarda durdurma esasına dayanır (Lülecı ve ark., 2000). Dizi analizi yapılacak DNA parçasının sentezi için dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı; DNA polimeraz, DNA parçalarının görüntülenebilmesi için biri radyoaktif ya da florokrom boyalarla işaretli deoksinükleotit trifosfatları (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve dört dideoksinükleotit trifosfattan (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sadece birini içerir. Dideoksinükleotit trifosfatlar 3' OH⁻ grubu yerine H⁺ atomu içerir. Bu nedenle DNA sentezi dideoksinükleotit' in eklenmesi ile durdurulur ve farklı

uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Oluşan parçalar, elektroforez jelinde büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi ile görüntülenir.

1.2.4. DNA'nın Enzimatik Kesimi

DNA'nın enzimatik kesimi Restriksiyon Endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılır.

Restriksiyon Endonükleazlar

PCR ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan birisi, PCR ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir (Sanbrook J ve ark., 1989). RE' ler çift zincirli sarmal DNA moleküllerinde özel nükleotit dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini kesen enzimlerdir. Bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işleminin tanıma yerinde veya tanıma yerinin dışında başka bir özel dizide gerçekleştirirler. Kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur (Temizkan, 1999).

RE' ler bakterilerden izole edilirler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği için bu ismi almışlardır (Öner, 2002). Yabancı DNA girişine karşı ilgili DNA kesimlerinde metilasyon yapmak suretiyle bir savunma mekanizması olarak işlev yaparlar.

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Esas görevleri dışarıdan bakteriye giren bazı özel gen veya belirleyicileri taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır. Bu gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fordiester bağını keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar. Bu enzimlerin birçoğunun tanıdığı bölge palindromiktir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü olarak simetrik (Akar, 1999).

Aynı DNA dizisini tanıyıp kesebilen farklı RE'ler de vardır ve bunlar izoşizomer adlandırılır (Temizkan, 1999).

Restriksiyon Enzim Kesimleri

DNA'daki gen değişimleri, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesini yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden oluyorsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. RE kesimlemesi ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment-Length Polymorphisms; RFLP) olarak adlandırılır (Akar, 1999).

1.2.5. Denatüre edici Yüksek-Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography; DHPLC)

DHPLC yöntemi komplementer ipliklerin DNA çift zincirini oluşturmak için spesifik bağlanmasına dayanır. Eğer gende bir mutasyon oluşursa, bir DNA heterodupleksi (tam komplementer olmayan ipliklerin eşleşmesi) oluşur ve bağlanma daha gevşek olur. DNA çift zincirini denatüre etmek (eritmek) için yüksek sıcaklıklar kullanılabilir. Eğer bir mutasyon oluşursa, heterodupleksin erime ısısı, homodupleksinkinden daha düşük olacaktır. Kısmen erimiş DNA, mutasyon içermeyen erimemiş DNA homodupleksinden (tam komplementer ipliklerin eşleşmesi) kolayca ayırt edilebilir.

Bu sistemde analiz sırasında DNA fragmentinin miktarını ölçen bir ultraviyole (UV) dedektörü vardır. Ayırıştırılan fragmentler pik şeklinde izler veya bilinen jel-benzeri bantlar veya her ikisi halinde gözlenir. Bu sistem mutasyonun kendisini kimyasal veya fiziksel konformasyonel değişikliklerle görünür yapmasına yol açar.

Bir baz değişimi için heterozigot bireylerde yabancı tip DNA'nın, mutant DNA'ya oranı 1:1'dir. Böyle bir bireyden PCR ürünü 95°C' ye ısıtılıp, yavaşça soğutulduğunda, DNA iplikleri ayrılır ve rastgele üç türde karışım oluşturacak şekilde tekrar birleşirler. Böylece

bir mutant homodupleks, bir heterodupleks ve bir yabancı tip homodupleks meydana gelir. Aynı sonuç bir homozigot mutant DNA'sının ilk önce yabancı tip DNA ile karıştırılması ve daha sonra denatüre edilip, hibridizasyonun oluşmasına izin verilerek de elde edilebilir.

Mutant ve yabancı tip DNA iplikleri bir heterodupleks oluşturmak için tekrar birleştiklerinde, molekül fiziksel olarak değişir. Baz çifti eşleşmeme bölgelerinde bir balon oluşacak ve kısa bir tek zincirli DNA bölgesinin oluşumuna yol açacaktır. Bu yapısal değişiklik heterodupleksin homodupleks türlerden ayırt edilip, tespit edilmesinde kullanılabilir ve sonuç olarak DNA'daki değişimler tanımlanabilir.

Bu sistemde heterodupleks ve homodupleks türlerin ayrıştırılması, bir iyon-çiftleştirici ayıraçla dinamik bir anyon değiştiriciye dönüştürülmüş alkilenmiş (polisistren/divinilbenzen) partiküllerinden oluşan sabit faz kullanılarak elde edilir. Trietilamonyum iyonları sabit fazı kısmen kaplar, bu DNA moleküllerinin fragment boyutlarına göre ayrıştırılmasına izin verir. Pozitif yüklü çift zincirli moleküllerin (homodupleksler) kolon matriksiyle, heterodupleks türlerden daha güçlü etkileşimi vardır ve bu nedenle matriksde daha uzun süre alkonulurlar, bu da iki türün ayrışmasına yol açar.

Mutasyonlar, yabancı tip ve mutant DNA'nın hibridizasyonu ile oluşan heterodupleks ve homodupleks karışımına bağlı piklerin karakteristik bir profili olarak görüntülenir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Klinik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışma grubunu oluşturmak için fenotipik olarak NS tanısı almış hastaların kan örnekleri Ankara Üniversitesi Pediatrik Kardiyoloji ve Pediatrik Genetik bölümlerinden temin edilmiştir. Fenotipik bulgularıyla NS tanısı alan ve birbiriyle akraba olmayan 20 olgu çalışma grubuna alınmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalara çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair yazılı onam formu alınmıştır.

2.2. Kullanılan Yöntemler

2.2.1. DNA İzolasyonu

Araştırmaya katılan bireylerden 1cc 0,5 M Etilendiamintetraasetikasilikli (EDTA) (Sigma, ABD) tüp içerisinde 9 cc kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneği falkon tüpü içerisinde 25 cc RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] ile karıştırılarak 20 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra +4°C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülüp, pellet üzerine tekrar 25 cc RBC lizis solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Dipte kalan lökositler üzerine 1000 µl RBC lizis solüsyonu eklenmiş, bu karışımın 800 µl' si ependorf tüpüne alınarak stok olarak saklanmıştır. Geriye kalan 200 µl' lik karışım ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10' luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10Mm Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1mM EDTA (AppliChem, Almanya) pH:8] eklenerek bir gece 56°C' de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilmiştir. İkinci gün

1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Mecrk, Almanya), Kloroform (Mecrk, Almanya), İzomilalkol (Mecrk, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanmıştır. Buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiştir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10' u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95' lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenmiştir. Ependorf tüpü alt-üst edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C' de bir gece bekletilmiştir. Üçüncü gün +4°C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µl %70' lik alkol eklenmiş ve +4°C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alkol dökülmüş ve tüp kurumaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C' de bir gece bekletilerek DNA' nın çözülmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA +4°C' de saklanır.

2.2.2. *PTPN11* Mutasyon Taraması

Bu çalışmada mutasyon tarama yöntemi olarak PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-DHPLC ve PCR-DNA dizi analizi teknikleri kullanılmıştır. Tüm örneklerde *PTPN11* geninin sekiz eksonu (daha önce NS'da mutasyon olduğu gösterilen eksonlar) PCR-SSCP, PCR-DNA dizi analizi ve PCR-DHPLC ile taranmıştır. En sık rastlanan p.Asn308Asp mutasyonu PCR-RFLP ile doğrulanmıştır.

2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada *PTPN11* geninin 2-4, 7-9 ve 12-13. eksonları PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Bugüne değin bu eksonlar dışında çok az bölgede NS ile ilişkili mutasyonlar tanımlanmıştır. Yapılan PCR'da son konsantrasyonu 0,6 pikomol/µl olacak şekilde primer çiftleri kullanılmıştır. Diğer PCR bileşenleri; 10 mM Tris-HCl (25°C pH: 8,8), 50 mM KCl, son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde deoksinükleotittrifosfatlar [dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Fermentas, Litvanya)] ve 15 mM MgCl² dür. Toplam hacim 25 µl' ye ddH₂O ile tamamlanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci ekson 405 bç. olup,

F: 5' ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG 3'

R: 5' CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT 3'

Üçüncü ekson 353 bç. olup,

F: 5' AATCCGACGTGGAAGATGAG 3'

R: 5' AGACCGTCATGCAATTCTGA 3'

Dördüncü ekson 300 bç. olup,

F: 5' CAACATGAACCCATGTAGAGCTAAA 3'

R: 5' AAAATCACCCAAAGGTAACATC 3'

Yedinci ekson 234 bç. olup,

F: 5' AATGCTGATCCAGGCTTTTT 3'

R: 5' GAGAGGTGCTAGGAATCAAAATC 3'

Sekizinci ekson 199 bç. olup,

F: 5' TTTTCCTGAAGCAGTCCAG 3'

R: 5' GGATTTAAAATACAAAAATAGGCT 3'

Dokuzuncu ekson 357 bç. olup,

F: 5' GTAAGCTTTGCTTTTTCACAGTG 3'

R: 5' CTAAACATGGCCAATCTGACAT 3'

Onikinci ekson 250 bç. olup,

F: 5' GCTCCAAAGAGTAGACATTGTT 3'

R: 5' GACTGTTTTTCGTGAGCACTTTC 3'

Onüçüncü ekson 281 bç. olup,

F: 5' AACAACTTCATCCTGGCTCTG 3'

R: 5' TCAAAAGGAGAGCGTATCCAA 3'

primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR' da sıcaklık koşulları; 95°C' de 5 dk denatürasyon, 35 döngü olarak 95°C' de 1 dk denatürasyon, 3, 4, 7 ve 13. ekzonlar için 55°C' de, 9 ve 12. ekzonlar için 57°C' de, 2. ekson için 58°C' de, 8. ekson için 60°C' de birleşme, 72°C' de 1 dk uzama ve 72°C' de 7 dk son uzama olarak gerçekleştirilmiştir (Biometra, ABD).

2.2.2.2. PCR için Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz (Sigma, ABD) jel, değerlendirilecek PCR örneğinin baz çifti uzunluğuna göre belirli konsantrasyonlarda hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünleri %2' lik agaroz jelde

değerlendirilmiştir. Jel için 1 gr agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 50 ml total hacme tamamlanmıştır. TBE 1X solüsyonu, stok olarak hazırlanan TBE 5X solüsyonundan distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr Borik Asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacme tamamlanarak yapılmıştır. Agaroz istenilen konsantrasyonda hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) kaynatılmıştır. Üzerine 4 µl Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya) ilave edilmiştir. İyiçe karıştırıldıktan sonra jel tabağına (Biogen, ABD) dökülmüştür. Agarozun donması için 25-30 dk beklenmiştir. PCR ürünlerinden 5 µl alınıp Brom-fenol mavisi (Merck; Almanya) ile muamele edilerek jele yüklenmiştir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyon sonucu istenilen uzunluktaki doğru bölgenin çoğaltıldığı görülebilmesi için 18-20 µl kadar belirleyici (Φ X174 DNA/BsuRI(Hae III)) (Fermentas, Litvanya) PCR ürünleri ile birlikte jele yüklenmiştir. 90-100 volt akımda 30-50 dk yürütülmüştür (Biogen, ABD). Ultraviyole ışıktaki (Owl, ABD) incelenmiş ve görüntü analiz cihazında (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanmıştır.

2.2.2.3. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Bu çalışmada poliakrilamid jel %40' lık, 49:1 oranında hazırlanan akrilamid-bisakrilamid kullanılarak hazırlanmıştır. Bunun için 380 gr Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C' de ısıtılarak kimyasalların çözünmesi sağlanmış ve hacim distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr Borik Asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacme tamamlanarak yapılmıştır.

Jelin polimerleşmesi için kullanılan Amonyum Persülfat %10' luk olarak 1 gr Amonyum Persülfat (AppliChem; Almanya) distile su ile 10 ml' lik hacme tamamlanarak hazırlanmıştır.

SSCP jelinin döküleceği camlar distile su ile yıkayıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1 mm kalınlığında “spacer”ler yerleştirilmiştir.

- %40’ luk akrilamid-bisakrilamid stoğundan 12,34 ml,
- TBE 5X solüsyonundan 14 ml,
- distile sudan 43,66 ml

alınarak karıştırılmıştır. Karışım süzöldükten sonra vakum ile havası alınmış ve 0,6 ml %10’ luk Amonyum Persülfat ve 40 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökülmüştür. Jel dököldükten sonra 0,1 mm’ lik tarak camlar arasına takılarak örneklerin yükleneyeceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılmış ve camlar vertikal jel sisteminde (BioRad, ABD) yerleştirilmiştir. PCR ürünlerine yükleme boyası (Formamid, EDTA, Xyelene Cyanol, Brom-fenol mavisi, H²O; son konsantrasyonlar sırasıyla %95, 20 mM, %0,05, %0,005) eklenerek 95°C’ de 6-7 dk denatüre edilmiş ve jele yüklenmiştir. Sisteme tampon olarak TBE 1X solüsyonu ilave edilmiştir. Örnekler 130 volt akım altında, +4°C’ de baz çifti uzunluklarına göre 12-16 saat yürütölmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

2.2.2.4. Gümüş Boyama

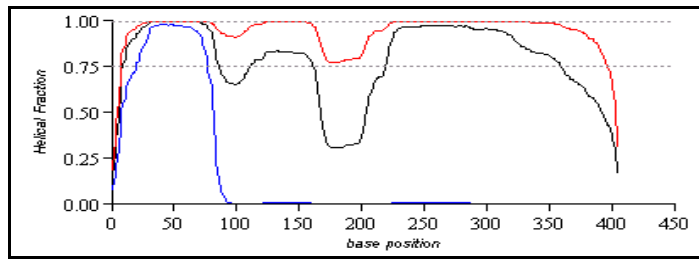
Gümüş boyama için %1’ lik gümüş nitrat, %15’ lik Sodyum Hidroksit (NaOH), %7,5’ lik Sodyum Bikarbonat solüsyonları kullanılmıştır. %1’ lik gümüş nitrat solüsyonu 5 gr gümüş nitrat (AgNO₃) (AppliChem, Almanya) distile su ile 500 ml’ ye tamamlanarak, %15’ lik sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu 150 gr sodyum hidroksitle distile su 1000 ml’ ye tamamlanarak, %7,5’ lik sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) distile su ile 1000 ml’ ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Elektroforez sonrası jel stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan %0,1’ lik gümüş nitrat solüsyonu ile 15 dk muamele edilmiştir. Daha sonra formaldehit ilave edilmiş %1,5’ lik sodyum hidroksit solüsyonu ile boyanmıştır. Jel %0,75’ lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile muamele edilerek boyama işlemi sonlandırılmıştır.

Gümüş boyama sonrası bant farklılığı gösteren örneklere DNA dizi analizi yapılmıştır.

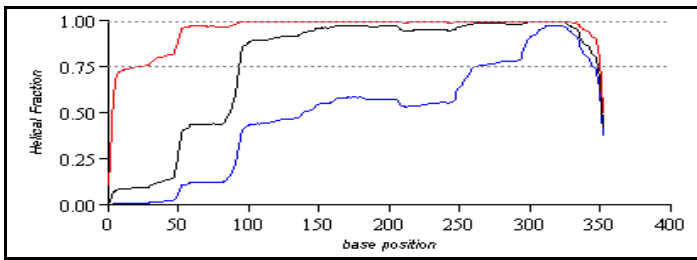
2.2.2.5. DHPLC

Bu çalışmada mutasyon analizinin yapılabilmesi için DHPLC cihazı kullanılmıştır (WAVE MD System, Transgenomic, ABD). PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yapılan kontrolünde, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görüldüğünde DHPLC ile mutasyon analizine gidilmiştir.

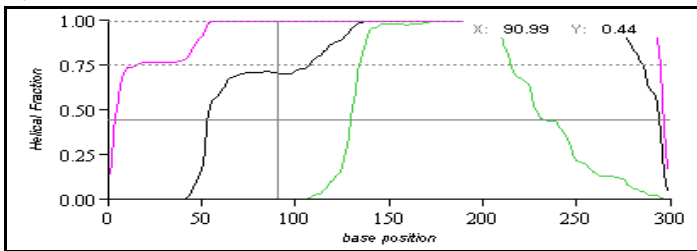
PCR ürünleri DHPLC cihazına yüklenmeden önce yüklenecek olan ürünün baz dizilerine göre erime sıcaklığı “Navigator” yazılımı ile hesaplanmıştır. Bu hesaplamada PCR ürününün tüm bölgelerinin %75-%100 oranında erimesi sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak PCR ürünlerinin tek sıcaklıkta tüm bölgeleri eremediğinden bazı eksonlar için iki ya da üç farklı sıcaklık hesaplanmıştır (Şekil 4). PCR ürünleri 95°C’de 5dk. denatürasyon ve 93°C’de 1dk. ve sonraki döngülerde 2°C düşülerek 1’er dk.’da toplam 28 döngüde renatürasyon gerçekleştirilmiştir. Her ekson için belirlenen erime sıcaklıklarında DHPLC cihazına yüklenmiştir. Örnekler 5µl olacak şekilde, %49,3 A solüsyonundan (0,1M TEAA), %50,7 B solüsyonundan (0,1M TEAA ve %25 ACN) ve 0,9 µl/dak akış hızında yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar “Navigator” yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonrası profil farklılığı gösteren örneklere DNA dizi analizi yapılmıştır.



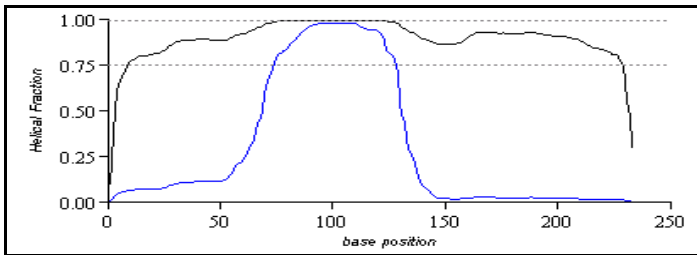
A.



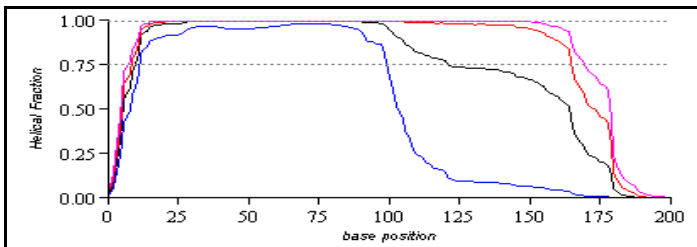
B.



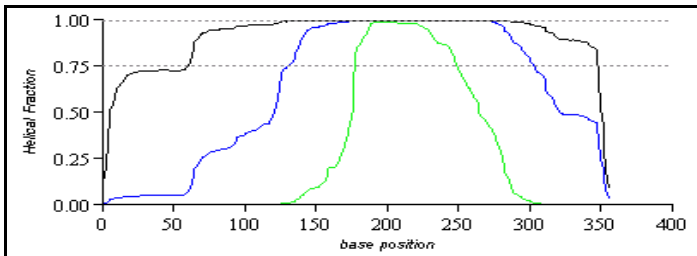
C.



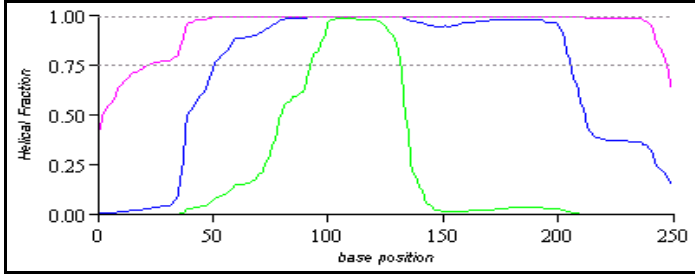
D.



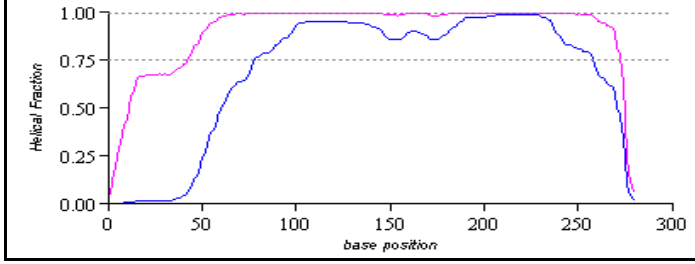
E.



F.



G.



H.

Şekil 4. *PTPN11* geninin 2-4, 7-9, 12-13. eksonlarının DHPLC cihazında “Navigator” yazılımında hesaplanan erime sıcaklıklarının grafikleri. A. 2.ekson için 56.4°C (Kırmızı), 57.3°C (Siyah), 58.7°C (Mavi)’deki erime sıcaklıkları. B. 3.ekson için 56,7°C (Kırmızı), 57,9°C (Siyah), 58,3°C (Mavi)’deki erime sıcaklıkları. C. 4.ekson için 52,3°C (Pembe), 56,5°C (Siyah), 59,2°C (Yeşil)’deki erime sıcaklıkları. D. 7.ekson 56,2°C (Siyah), 57,7°C (Mavi)’deki erime sıcaklıkları. E. 8. ekson için 55,5°C (Pembe), 56,5°C (Kırmızı), 57,5°C (Siyah), 58,7°C (Mavi)’deki erime sıcaklıkları. F.9. ekson için 55,0°C (Siyah), 56,0°C (Mavi), 59,0°C (Yeşil)’deki erime sıcaklıkları. G.12. ekson için 55.4°C (Pembe), 58.2°C (Mavi), 60.5°C (Yeşil)’deki erime sıcaklıkları. H. 13. ekson için 57.8°C (Pembe), 60.0°C (Mavi)’deki erime sıcaklıkları.

2.2.2.6. DNA Dizi Analizi

PCR yapıldıktan sonra pürifikasyon işlemi ile PCR işaretlenmesi için ürünler “cycle sequencing” denen bir döngüye sokulmuştur (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Beckman Coulter, USA). PCR bileşenleri; 12 µl premiks (her örnek için 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı, 2 µl ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP ve 1 µl polimeraz enzimi), 0,5-7 µl pürifiye edilmiş PCR ürünü ve 2 µl primerdir. PCR reaksiyonu sıcaklık koşulları 95°C’ de 1 dk denatürasyon, 30 döngü olarak 96°C’ de 20 sn, 50°C’ de 20 sn, 60°C’ de 4 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrası reaksiyonun sonlandırılması için örneklere 2 µl NaOAc (1,5 M), 2 µl EDTA (50 mM), 1 µl glikojen (20 mg/ml) ile hazırlanan solüsyon eklenmiştir. Bu işlemden sonra örnekler üzerine 60 µl %95’ lik soğuk etanol eklenerek +4°C’ de, 14000 rpm’ de 15 dk santrifüj edilmiştir (Micromaz RF, ABD). üst kısım dökülerek 200 µl %70’ lik soğuk etanol eklenmiş +4°C’ de, 14000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez

gerçekleştirildikten sonra örnekler liyofilizatör (Thermo, ABD) cihazında yüksek vakum altında bırakılarak kurutulmuştur. Bu işlemten sonra örnekler formamid eklenerek DNA dizi analizi cihazına yüklenmiştir (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD). Elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirilmiştir.

2.2.2.7. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimi

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yapılan kontrolünde, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görüldüğünde restriksiyon endonükleaz ile kesimlemeye gidilmiştir.

PTPN11 geninde c.922A>G (p.Asn308Asp) mutasyon taraması için kullanılan enzim *EcoRV* restriksiyon endonükleaz enzimidir. PCR ürünleri *EcoRV* (Promega, ABD) enzimi ile kesilmiştir. PCR ürünüde *EcoRV* enzimi için tek bir kesim noktası bulunmaktadır. *EcoRV* enzimi mutanti tanıyan bir enzimdir. Kesim yeri 5'...GAT/ATC...3' dizileridir. Kesim gerçekleşmişse 199 bç.' lik PCR ürünü, 124 bç.'lik ve 75 bç.' lik iki parçaya ayrılır. %3' lük agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirilmiştir (Owl Scientific, ABD).

12,5 µl hacimdeki PCR ürünleri, RE Tamponu ve her birey için 10 ünite/µl *EcoRV* olacak şekilde hazırlanan tampon-enzim karışımı ile muamele edilmiştir. PCR ürünü-enzim-tampon karışımı, enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C' de, 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.2.8. EcoRV restriksiyon endonükleazı için Agaroz Jel Elektroforezi

RE kesim sonuçları %3' lük agaroz jelde değerlendirilmiştir. Jel için 1,5 gr agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 50 ml total hacme tamamlanmıştır. TBE 1X solüsyonu, stok olarak hazırlanan TBE 5X solüsyonundan distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr Borik Asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacme tamamlanarak yapılmıştır. Agaroz istenilen konsantrasyonda

hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) kaynatılmıştır. Üzerine 4 µl Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya) ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra jel tabağına (Biogen, ABD) dökülmüştür. Agarozun donması için 25-30 dk beklenmiştir.

EcoRV enzimi ile kesim yapılmış PCR ürünlerine 5 µl Brom-fenol mavisi (Merck; Almanya) ile muamele edilerek yaklaşık 15-20 µl jele yüklenmiştir. Enzimle kesim ürünlerinin değerlendirilebilmesi için 18-20 µl kadar marker (ΦX174 DNA/BsuRI(Hae III)) (Fermentas, Litvanya), kesilmemiş PCR ürünü (Uncut) ve kesimlenmiş örnekler ile birlikte jele yüklenmiştir. 90-100 volt akımda 30-50 dk yürütülmüştür (Biogen, ABD). Ultraviyole ışıkta (Owl, ABD) incelenmiştir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflarır.

%3' lük agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirildiğinde; her iki allelde bu mutasyonu taşımayan (negatif) bireylerde kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde tek bir band (199 bç.), c.922A>G (p.Asn308Asp) mutasyonunu tek allelde taşıyan (heterozigot) bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde diğeri onun altında iki band (199 bç. / 124 bç. / 75 bç.) olduğu görülmüştür.

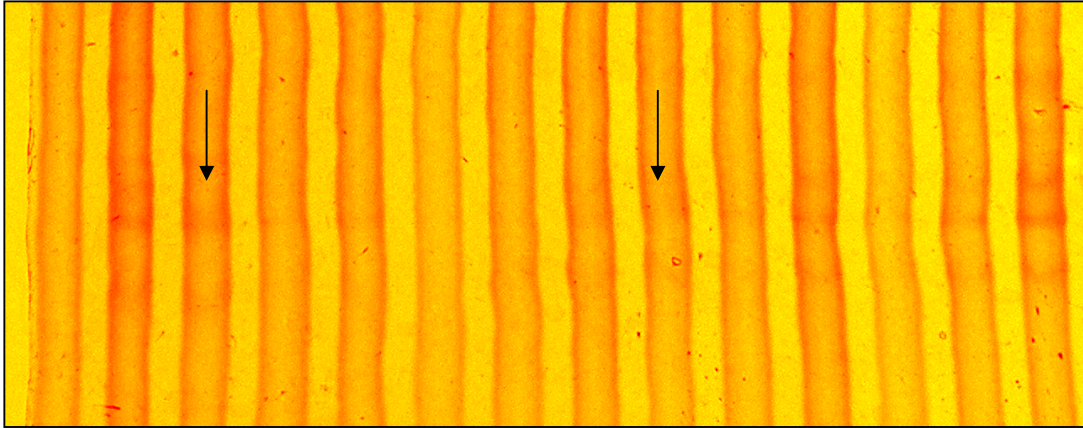
3. BULGULAR

PTPN11 geninde mutasyon taraması sonucu, üç olguda 8. eksonda c.922A>G (p.Asn308Asp) değişimi, bir olguda 3. eksonda c. 214G>T (p.Ala72Ser) değişimi, bir olguda 3. eksonda c.188A>G (p.Tyr63Cys) değişimi ve bir olguda 3. eksonda c.172A>G (p.Asn58Asp) değişimi heterozigot olarak saptanmıştır. DHPLC ile tüm mutasyonlar gösterilmiştir. Daha sonra 8. eksondaki p.Asn308Asp değişimi PCR-RFLP (*EcoRV* enzimi) ile doğrulanmıştır.

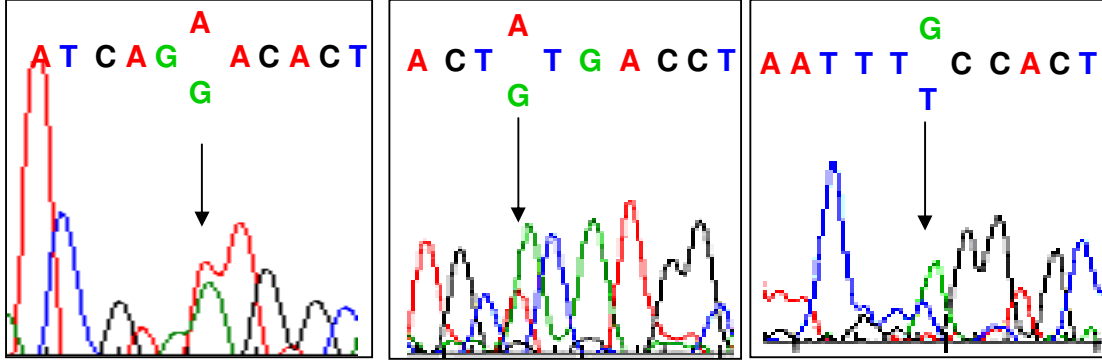
Çizelge 1. *PTPN11* geninde bulunan mutasyonlar ve bulunan mutasyonlarda kullanılan metodlar. + mutasyonun bulunduğu metodlar, - mutasyonun gösterilemediği metodlar.

Mutasyon	Ekson numarası	DNA dizi analizi	SSCP	DHPLC
p.Asn58Asp	3	+	-	+
p.Tyr63Cys	3	+	+	+
p.Ala72Ser	3	+	+	+
p.Asn308Asp	8	+	-	+

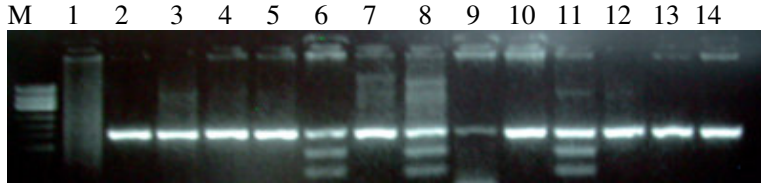
p.Ala72Ser, p.Tyr63Cys ve p.Asn58Asp değişimleri proteinin N-SH2 bölgesinde, p.Asn308Asp değişimi ise proteinin PTP bölgesinde meydana gelmiştir.



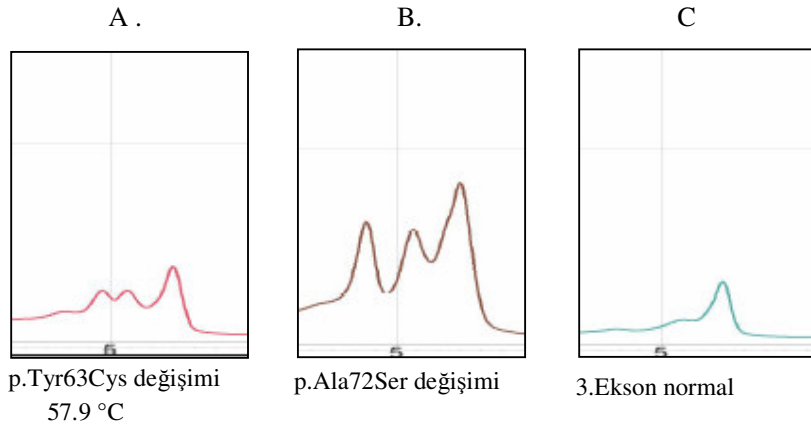
şekil 5. *PTPN11* geninde 3.eksonda c.188A>G ve c. 214G>T değişimlerini taşıyan olguların SSCP jel görüntüsü.

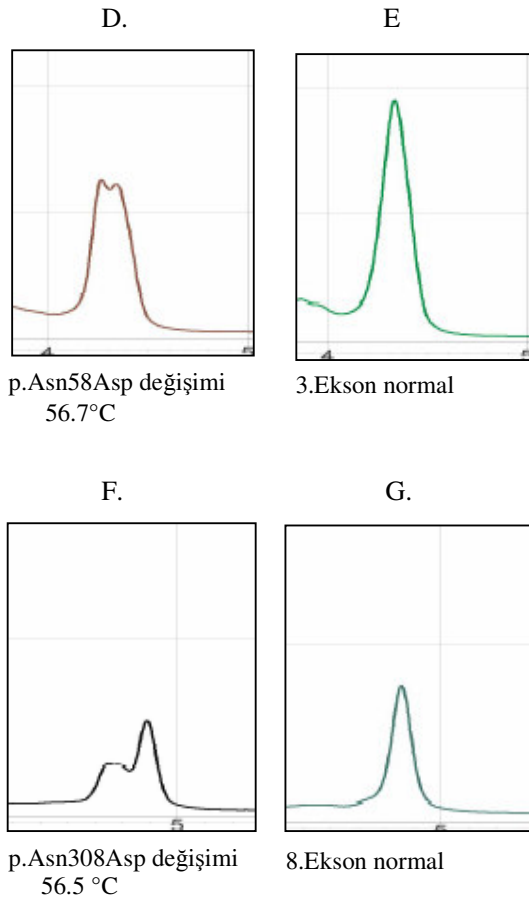


Şekil 6. *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c.188A>G değişimi, *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c. 214G>T değişimi ve *PTPN11* geninde 3. eksonda heterozigot c.172A>G değişiminin DNA dizi analizi sonuçları.



Şekil 7. *PTPN11* geninde 8. eksonda *EcoRV* enzimi ile yapılan RFLP sonuçları. M marker, 2-5,7,9-10,12-14 c.922A>G değişimi olmayan olgular; 6, 8 ve 11 heterozigot c.922A>G değişimi saptanan olgular.





şekil 8. *PTPN11* geninde 3. eksonda ve 8. eksonda yapılan DHPLC sonuçları. A. 3. eksonda heterozigot p.Tyr63Cys değişimi. B. 3. eksonda heterozigot p.Ala72Ser değişimi. C. 3. ekson normal profil görüntüsü. D. 3. eksonda heterozigot p.Asn58Asp değişimi. E. 3. ekson normal profil görüntüsü. F. 8. eksonda p.Asn308Asp değişimi. G. 8. ekson normal profil görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Bugüne kadar NS ile ilgili yapılan çalışmalarda *PTPN11* geninde 36 tane farklı mutasyon olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise daha önce Tartaglia ve ark. tarafından tanımlanan 63. konumdaki tirozinin sisteine dönüşmesi sonucu oluşan p.Tyr63Cys (c.188A>G), 72. konumdaki alaninin serine dönüşmesi sonucu oluşan p.Ala72Ser (c.214G>T) ve 308. konumdaki asparajinin aspartik asite dönüşmesi sonucu oluşan p.Asn308Asp (c.922A>G) mutasyonları saptanmıştır (Tartaglia ve ark., 2001). Ayrıca yine daha önce Zenker ve ark. tarafından tanımlanan 58. konumdaki asparajinin aspartik asite dönüşmesi sonucu oluşan p.Asn58Asp (c.172A>G) mutasyonu saptanmıştır (Zenker ve ark., 2004).

PTPN11 geninde bugüne kadar saptanan en yaygın mutasyon p.Asn308Asp değişimidir. Bu mutasyon SHP-2 proteinin PTP bölgesinde yer almaktadır. PTP bölgesi proteinin fosfataz aktivitesinden sorumlu bir bölgedir dolayısıyla burada meydana gelen bir değişiklik proteinin yapısını etkilemektedir. Tartaglia ve ark.'na göre p.Asn308Asp mutasyonu N-SH2/PTP etkileşimine katkıda bulunmaz ancak katalize katılarak rol oynamaktadır (Tartaglia ve ark., 2006). Asn308 N-SH2 ve PTP bölgelerinin etkileşim yüzeyinde bulunmaktadır (Musante ve ark., 2003).

Bu sendromda ikinci en yaygın görülen mutasyon ise p.Tyr63Cys değişimidir. p.Asn58Asp, p.Tyr63Cys ve p.Ala72Ser mutasyonlarının üçü de N-SH2 ve PTP bölgelerinin etkileşim yüzeyinde bulunmaktadır bu nedenle etkileşim yüzeyinin açılıp kapanmasından sorumlu mutasyonlardır. Bu bölgelerde proteinin aktif ve inaktif konformasyonları arasındaki dengeyi etkilediği düşünülmektedir (Musante ve ark., 2003, Tartaglia ve ark., 2006).

p.Ala72Ser değişimi 2003 yılında iki farklı grup tarafından diğer mutasyonlardan farklı olarak JMML' si olan hastalarda da gösterilmiştir (Tartaglia ve ark., 2003, Loh ve ark., 2003). 61,71,72 ve 76. kodonlardaki mutasyonlar SHP-2 proteinin aktivasyonunda on kat daha fazla aktivite gösterirler, bunlar lösemili (JMML, AML, ALL) hastalarda sık

görülen mutasyonlardır. NS'lu olgularda en yaygın mutasyonlar olan p.Asn308Asp ve p.Tyr63Cys'nin aktivasyonu 2-3 kat fazladır (Niihori ve ark., 2005).

Bu çalışmada klinik olarak NS tanısı alan hastalara moleküler olarak kolay tanı metodlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kullandığımız tanı yöntemlerinden PCR-DNA dizi analizi %100'e yakın bir duyarlılık gösterdiği için altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada bu yöntemle dört farklı mutasyon bulunmuştur. PCR-SSCP'nin bu çalışmadaki duyarlılığı 2/4 (%50)'tür. DHPLC ile ise dört mutasyon da tanımlanabildiği için duyarlılığı dizi analizine eşit bulunmuştur. SSCP'de incelenecek mutasyonun yapısı, PCR ürününün boyu, baz yapısı, ortam ısısı ve jelin yapısı gibi özellikler SSCP'nin duyarlılığının dizi analizine ulaşmasını engellemektedir. Bu çalışmada bazı eksonlarda PCR ürünü boylarını SSCP için ideal olmaması mutasyon bulma şansını azaltmış olabilir. Ancak en sık görülen p.Asn308Asp mutasyonunun SSCP için ideal şartlarda bile tanımlanamaması ve 3. eksonda iki mutasyon tanımlanırken bir başkasının tanımlanamaması klinik tanı amaçlı testlerde SSCP'nin kullanımının uygun olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan teknikler maliyetleri açısından değerlendirildiğinde ise SSCP'nin en uygun yöntem olduğu düşünülmektedir. Çünkü SSCP metodu ile bir hastada, bir ekson için mutasyon analizi yapıldığı zaman jel boyutuna göre değişmek üzere yaklaşık 15YTL, DNA dizi analizi yapıldığı zaman yaklaşık 50-70YTL ve DHPLC yapıldığı zaman her yükleme başına yaklaşık 10YTL maliyet olmaktadır.

Yaptığımız çalışma sonucunda NS'da mutasyon analizine 8. ve 3. eksonların DHPLC ile taranmasıyla başlanması, 8. eksonda farklılık görülürse RFLP ile p.Asn308Asp mutasyonunu öncelikle taranması, mutasyon bulunamaması durumunda *PTPN11* geninin diğer eksonlarının DHPLC ile taranması en uygun metod olarak bulunmuştur. Bu gende mutasyon bulunamayan hastalarda *SOS1* ve *KRAS* genlerinin taranması uygun olacaktır. Yine mutasyon bulunamazsa daha sonra tanımlanacak genlerde mutasyon olabileceği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- AKAR, N. (1999). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. İkinci Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp A.Ş. Yayınları.
- AOKI Y, NIIHORI T, KAWAME H, KUROSAWA K, OHASHI H, TANAKA Y, FILOCAMO M, KATO K, SUZUKI Y, KURE S, MATSUBARA Y. 2005. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet.* **37(10)**:1038-40.
- ARAKI, T., MOHI, M.G., ISMAT, F.A., BRONSON, R.T., WILLIAMS, I.R., KUTOK, J.L., YANG, W., PAO, L.I., GILLILAND, D.G., EPSTEIN, J.A., NEEL, B.G. 2004. Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat Med.*, **10(8)**:849-57.
- BARALLE, D., MATTOCKS, C., KALIDAS, K., ELMSLIE, F., WHITTAKER, J., LEES, M., RAGGE, N., PATTON, M.A., WINTER, R.M., FFRENCH-CONSTANT, C. 2003. Different mutations in the NF1 gene are associated with Neurofibromatosis-Noonan syndrome (NFNS). *Am J Med Genet A.*, **119(1)**:1-8.
- BENTIRES-ALJ M, PAEZ JG, DAVID FS, KEILHACK H, HALMOS B, NAOKI K, MARIS JM, RICHARDSON A, BARDELLI A, SUGARBAKER DJ, RICHARDS WG, DU J, GIRARD L, MINNA JD, LOH ML, FISHER DE, VELCULESCU VE, VOGELSTEIN B, MEYERSON M, SELLERS WR, NEEL BG. 2004. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* Dec **64(24)**:8816-20.
- BERTOLA DR, PEREIRA AC, DE OLIVEIRA PS, KIM CA, KRIEGER JE. 2004. Clinical variability in a Noonan syndrome family with a new PTPN11 gene mutation. *Am J Med Genet A.*, **130(4)**:378-83.
- CARTA C, PANTALEONI F, BOCCHINFUSO G, STELLA L, VASTA I, SARKOZY A, DIGILIO C, PALLESCHI A, PIZZUTI A, GRAMMATICO P, ZAMPINO G, DALLAPICCOLA B, GELB BD, TARTAGLIA M. 2006. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.*, **79(1)**:129-35.
- COOPER, G.M. 1997. The Cell A Molecular Approach. North America: Oxford University Pres.
- DIGILIO, M.C., CONTI, E., SARKOZY, A., MINGARELLI, R., DOTTORINI, T., MARINO, B., PIZZUTI, A., DALLAPICCOLA, B. 2002. Grouping of multiple-

- lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet.*, **71(2)**:389-94.
- FRAGALE, A., TARTAGLIA, M., WU, J., GELB, B.D. 2004. Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation. *Hum Mutat.*, **23(3)**:267-77.
- GELB BD, TARTAGLIA M. 2006 Noonan syndrome and related disorders: Dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. *Hum Mol Genet.* 15;15 Spec No 2:R220-6.
- HOF P, PLUSKEY S, DHE-PAGANON S, ECK MJ, SHOELSON SE. 1998. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell.*, **92(4)**:441-50.
- KRATZ CP, SCHUBBERT S, BOLLAG G, NIEMEYER CM, SHANNON KM, ZENKER M. 2006. Germline mutations in components of the ras signaling pathway in noonan syndrome and related disorders. *Cell Cycle* **5(15)**:1607-11.
- KRENZ M, YUTZEY KE, ROBBINS J. 2005. Noonan syndrome mutation Q79R in Shp2 increases proliferation of valve primordia mesenchymal cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. *Circ Res.* **97(8)**:813-20.
- LEE, W.H., RAAS-ROTSCHILD, A., MITEVA, M.A., BOLASCO, G., REIN, A., GILLIS, D., VIDAUD, D., VIDAUD, M., VILLOUTREIX, B.O., PARFAIT, B. 2005. Noonan syndrome type I with PTPN11 3 bp deletion: structure-function implications. *Proteins.*, **58(1)**:7
- LOH, M.L., VATTIKUTI, S., SCHUBBERT, S., REYNOLDS, M.G., CARLSON, E., LIEUW, K.H., CHENG, J.W., LEE, C.M., STOKOE, D., BONIFAS, J.M., CURTISS, N.P., GOTLIB, J., MESHINCHI, S., LE BEAU, M.M., EMANUEL, P.D., SHANNON, K.M. 2004. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood.*, **103(6)**:2325-31.
- LÜLEÇİ, M., SAKIZLI, M., ALPER, Ö. 2000. Renkli Genetik Atlası. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- MAHESHWARI M, BELMONT J, FERNBACH S, HO T, MOLINARI L, YAKUB I, YU F, COMBES A, TOWBIN J, CRAIGEN WJ, GIBBS R. 2002. PTPN11 mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. *Hum Mutat.*, **20(4)**:298-304.
- MUSANTE, L., KEHL, H.G., MAJEWSKI, F., MEINECKE, P., SCHWEIGER, S., GILLESSEN-KAESBACH, G., WIECZOREK, D., HINKEL, G.K., TINSCHERT, S., HOELTZENBEIN, M., ROPERS, H.H., KALSCHUEUR, V.M. 2003. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in

96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet.*, **11(2)**:201-6.

NIIHORI T, AOKI Y, OHASHI H, KUROSAWA K, KONDOH T, ISHIKIRIYAMA S, KAWAME H, KAMASAKI H, YAMANAKA T, TAKADA F, NISHIO K, SAKURAI M, TAMAI H, NAGASHIMA T, SUZUKI Y, KURE S, FUJII K, IMAIZUMI M, MATSUBARA Y. 2005. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet.* **50(4)**:192-202.

NIIHORI T, AOKI Y, NARUMI Y, NERI G, CAVE H, VERLOES A, OKAMOTO N, HENNEKAM RC, GILLESSEN-KAESBACH G, WIECZOREK D, KAVAMURA MI, KUROSAWA K, OHASHI H, WILSON L, HERON D, BONNEAU D, CORONA G, KANAME T, NARITOMI K, BAUMANN C, MATSUMOTO N, KATO K, KURE S, MATSUBARA Y. 2006. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet.* **38(3)**:294-6.

OISHI K, GAENGEL K, KRISHNAMOORTHY S, KAMIYA K, KIM IK, YING H, WEBER U, PERKINS LA, TARTAGLIA M, MLODZIK M, PICK L, GELB BD. 2006. Transgenic Drosophila models of Noonan syndrome causing PTPN11 gain-of-function mutations. *Hum Mol Genet.* **15(4)**:543-53.

ÖNER, C. 2002. Genetik Kavramlar. 6. Baskıdan Çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık.

ROBERTS AE, ARAKI T, SWANSON KD, MONTGOMERY KT, SCHIRIPO TA, JOSHI VA, LI L, YASSIN Y, TAMBURINO AM, NEEL BG, KUCHERLAPATI RS. 2006. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.*

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual.(2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Pres.

SCHUBBERT, S., ZENKER, M., ROWE, S.L., BOLL, S., KLEIN, C., BOLLAG, G., VAN DER BURGT, I., MUSANTE, L., KALSCHUEUR, V., WEHNER, L.E., NGUYEN, H., WEST, B., ZHANG, K.Y., SISTERMANS, E., RAUCH, A., NIEMEYER, C.M., SHANNON, K., KRATZ, C.P. 2006. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.*, **38(3)**:331-6.

TAKAHASHI I, UTSUNOMIYA M, INOUE K, TAKAHASHI T, NOZAKI J, WADA Y, TAKADA G, KOIZUMI A. 2006. A PTPN11 gene mutation (Y63C) causing Noonan syndrome is not associated with short stature in general population. *Tohoku J Exp Med.* **208(3)**:255-9.

TARTAGLIA M, MEHLER EL, GOLDBERG R, ZAMPINO G, BRUNNER HG, KREMER H, VAN DER BURGT I, CROSBY AH, ION A, JEFFERY S,

- KALIDAS K, PATTON MA, KUCHERLAPATI RS, GELB BD. 2001. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet.*, **29(4)**:465-8.
- TARTAGLIA, M., MEHLER, E.L., GOLDBERG, R., ZAMPINO, G., BRUNNER, H.G., KREMER, H., VAN DER BURGT, I., CROSBY, A.H., ION, A., JEFFERY, S., KALIDAS, K., PATTON, M.A., KUCHERLAPATI, R.S., GELB, B.D. 2002. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet.*, **30(1)**:123.
- TARTAGLIA, M., KALIDAS, K., SHAW, A., SONG, X., MUSAT, D.L., VAN DER BURGT, I., BRUNNER, H.G., BERTOLA, D.R., CROSBY, A., ION, A., KUCHERLAPATI, R.S., JEFFERY, S., PATTON, M.A., GELB, B.D. 2002. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.*, **70(6)**:1555-63.
- TARTAGLIA, M., NIEMEYER, C.M., FRAGALE, A., SONG, X., BUECHNER, J., JUNG, A., HAHLN, K., HASLE, H., LICHT, J.D., GELB, B.D. 2003. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet.*, **34(2)**:148-50.
- TARTAGLIA M, COTTER PD, ZAMPINO G, GELB BD, RAUEN KA. Exclusion of PTPN11 mutations in Costello syndrome: further evidence for distinct genetic etiologies for Noonan, cardio-facio-cutaneous and Costello syndromes. 2003. *Clin Genet.* **63(5)**:423-6.
- TARTAGLIA, M., MARTINELLI, S., CAZZANIGA, G., CORDEDDU, V., IAVARONE, I., SPINELLI, M., PALMI, C., CARTA, C., PESSION, A., ARICO, M., MASERA, G., BASSO, G., SORCINI, M., GELB, B.D., BIONDI, A. 2004. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood.*, **104(2)**:307-13.
- TARTAGLIA M, GELB BD. 2005. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **6**:45-68.
- TARTAGLIA M, MARTINELLI S, STELLA L, BOCCHINFUSO G, FLEX E, CORDEDDU V, ZAMPINO G, BURGT I, PALLESCHI A, PETRUCCI TC, SORCINI M, SCHOCH C, FOA R, EMANUEL PD, GELB BD. 2006. Diversity and Functional Consequences of Germline and Somatic PTPN11 Mutations in Human Disease. *Am J Hum Genet.* **78(2)**:279-90.
- TARTAGLIA M, PENNACCHIO LA, ZHAO C, YADAV KK, FODALE V, SARKOZY A, PANDIT B, OISHI K, MARTINELLI S, SCHACKWITZ W, USTASZEWSKA A, MARTIN J, BRISTOW J, CARTA C, LEPRI F, NERI C,

- VASTA I, GIBSON K, CURRY CJ, SIGUERO JP, DIGILIO MC, ZAMPINO G, DALLAPICCOLA B, BAR-SAGI D, GELB BD. 2006. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.*
- TEMİZKAN, G., YILMAZER, S., ÖZTÜRK, M., ARI, Ş., ERTAN, H., OLGUN, A., SARIKAYA, A.T., ARDA, N. 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM) Yayın No:1
- YOSHIDA, R., MIYATA, M., NAGAI, T., YAMAZAKI, T., OGATA, T. 2004. A 3-bp deletion mutation of PTPN11 in an infant with severe Noonan syndrome including hydrops fetalis and juvenile myelomonocytic leukemia. *Am J Med Genet A.*, **128(1)**:63-6.
- ZENKER M, BUHEITEL G, RAUCH R, KOENIG R, BOSSE K, KRESS W, TIETZE HU, DOERR HG, HOFBECK M, SINGER H, REIS A, RAUCH A. 2004. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr.* **144(3)**:368-74.

EKLER

```
1 MTSRWFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTG
61 DYYDLYGGEKFATLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPLNCADPTSERWFGHLSGK
121 EAEKLLTEKGKHSFLVRESQSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYD
181 VGGGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQKQPLNTRINAAEIESRVRELSKLAETT
241 DKVKQGFWEFEFTLQQQECKLLYSRKEGQRQENKNKNRYKNILPFDHTRVVLHDGDPNEP
301 VSDYINANIIMPEFETKCNNKPKKSYIATQGCLQNTVNDFWRMVFQENSRVIVMTKEV
361 ERGKSKCVKYWPDEYALKEYGVMRVRNVKESAAHDYTLRELKLSKVGQGNTERTVWQYHF
421 RTWPDHGVPSDPGGVLDLFLEEVHHKQESIMDAGPVVHCSAGIGRTGTFIVIDLIDIIR
481 EKGVDCDIDVPKTIQMVRSQRSGMVQTEAQYRFIYMAVQHYIETLQRRIEEEQSKSRKKGH
541 EYTNIKYSLADQTSGDQSPLPPCTPTPPCAEMREDSARVYENVGLMQQKQKSR
```

Ek1. *PTPN11* proteinin aminoasit dizisi. Mavi ve siyah renkle yazılı aminoasitler farklı eksonları, kırmızı renkle yazılı amino asitler ise eksonların birleşme yerlerini göstermektedir.