

40948

Hacettepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TAY-SACHS HASTALIĞINDA  
HEKSOZAMİNİDAZ A  $\alpha$ -ALTBİRİM GENİNİN  
"SINGLE STRANDED CONFORMATIONAL POLYMORPHISM"  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Biyokimya Programı

Doktora Tezi

H. Asuman Özkara

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gönenç Ciliv

Ankara, 1994

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANİZASYON VE KÜTÜPHANE

Prof.Dr.Göneng Ciliz  
(Jüri Başkanı, Danışman)

Prof.Dr.Nurten Renda  
(Üye)

Prof.Dr.Türker Kutluay  
(Üye)

Doç.Dr.Hamdi Ögüş  
(Üye)

Doç.Dr.Kamer Kılınc  
(Üye)

# İÇİNDEKİLER

## KISALTMALAR

Sayfa no

### BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ	1
---------------	---

### BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER	3
II.1. Heksozaminidaz enziminin genetiği	3
II.2. Heksozaminidaz enziminin biyosentezi	5
II.3. Heksozaminidaz enziminin fonksiyonu	8
II.4. Tay-Sachs hastalığı ve tanısı	10
II.5. Heksozaminidaz eksikliğine neden olan mutasyonlar	12
II.6. Tay-Sachs hastalığında PCR yönteminin mutasyon tanımlanmasında kullanımı	15
II.6.1. Heterodupleks analizi	15
II.6.2. Restriksiyon enzim analizi	16
II.6.3. Allel spesifik oligonükleotid hibridizasyon	17
II.6.4. Allel spesifik amplifikasyon	17
II.6.5. Nadir görülen veya yeni mutasyonların analizi	18

### BÖLÜM III

ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	20
III.1. Maddeler	20
III.2. Aletler	20
III.3. Hasta grubu	21
III.4. Yöntemler	23
III.4.1. Serum Hex A tayini	23
III.4.2. Fibroblast kültüründe Hex A tayini	24
III.4.2.1. Homojenizasyon	24
III.4.2.2. Protein tayini	24

III.4.2.3. Hex A aktivitesi ölçümü	25
III.4.3. DNA izolasyonu	25
III.4.3.1. Tam kandan DNA izolasyonu	26
III.4.3.2. Lökositlerden DNA izolasyonu	26
III.4.4. DNA miktar tayini	27
III.4.5. SSCP analizi	27
III.4.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	27
III.4.5.2. Agaroz jel elektroforezi	28
III.4.5.3. Poliakrilamid jel elektroforezi	29
III.4.5.4. Otoradyografi	30
III.4.5.5. Otoradyografinin değerlendirilmesi	30
III.4.6. Bilinen mutasyonların analizi	30
III.4.6. DNA dizi analizi	31
<b>BÖLÜM IV</b>	
<b>BULGULAR</b>	34
IV.1. Heksozaminidaz A aktivitesi bulguları	35
IV.2. Bilinen mutasyonların analiz bulguları	36
IV.3. SSCP analizi bulguları	39
IV.4. DNA dizi analizi bulguları	51
<b>BÖLÜM V</b>	
<b>TARTIŞMA</b>	57
<b>ÖZET</b>	65
<b>SUMMARY</b>	67
<b>KAYNAKLAR</b>	69
<b>EK 1. Çözeltiler</b>	76
<b>EK 2. Hex A geninin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri</b>	79

## KISALTMALAR

<b>ASA</b>	Allel Spesifik Amplifikasyon
<b>ASO</b>	Allel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon
<b>bç</b>	baz çifti
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>GER</b>	Granüllü Endoplazmik Retikulum
<b>Hex</b>	Heksozaminidaz
<b>Hex A</b>	Heksozaminidaz A
<b>Hex B</b>	Heksozaminidaz B
<b>IVS</b>	intron
<b>kb</b>	kilobaz
<b>kD</b>	kilo Daiton
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SSCP</b>	Single Stranded Conformational Polymorphism
<b>4MUG</b>	4-Metilumbelliferil $\beta$ -D-glukozaminid

## BÖLÜM I

### GİRİŞ ve AMAÇ

Tay-Sachs hastalığı otozomal resesif geçişli bir lizozomal depo hastalığıdır. Biyokimyasal çalışmalar sonucu hastalığın nedeninin Heksozaminidaz A (Hex A) eksikliği olduğu bulunmuştur. GM2 gangliozidin - uç kısmındaki N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin birimini hidroliz eden bu enzimin tam veya kısmi eksikliğinde GM2 gangliozid özellikle nöronlarda birikmekte, hastalarda ilerleyici mental ve motor gerilik gelişmekte ve hastalık ölümlerle sonuçlanmaktadır (1).

Tay-Sachs hastalığı, toplum tarama programları Hex A aktivitesi ölçümü ile başlatılmış ilk insan genetik hastalığıdır ve ilk kez Ashkenazi-Musevi toplumunda tarif edilmiştir. Bu hastalık ile ilgili geniş çaplı toplum taramaları Kuzey Amerika'daki Musevi toplumunda 1970'lerde başlatılmış ve daha sonra farklı ülkelerde de sürdürülmüştür. Hastalık Ashkenazi-Musevi toplumunda 1/3.600 sıklığında görülmektedir. Bu oran, hastalığın normal toplumda görülme sıklığının yaklaşık 100 katıdır. Günümüzde taşıyıcı tarama programları ve prenatal tanı olanakları sayesinde bu hastalık için risk taşıyan toplumlarda yeni hastaların doğması tamamen önlenmiştir (2).

Son yıllarda bulunan yeni tekniklerle Tay-Sachs hastalığının DNA düzeyinde incelenmesi mümkün olmuş ve değişik toplumlarda Hex A geninde bulunan 40'dan fazla mutasyonun hastalığa nasıl neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Mutasyonların belirlenmesi, bugün tanılma amaçla

kullanılmaktadır. Gelecekte de gen tedavisi amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir (3).

Akraba evlilikleri oranının yaklaşık %21 olduğu ülkemizde çeşitli kalıtsal metabolik hastalıklar görülmektedir (4). Bu hastalıklardan biri olan Tay-Sachs hastalığının tanısı için serum ve lökositlerde Hex A tayini 1988 yılından itibaren Anabilim Dalımızda yapılmakta, 1990 yılından itibaren de şüpheli ailelerde enzimatik düzeyde prenatal tanısı yapılmaktadır.

Bu çalışmada bir ileri basamak olarak Hex A genini inceleyerek toplumumuzda hastalıktan sorumlu mutasyonları belirlemeyi amaçladık. Literatürde tarif edilmiş olan Tay-Sachs hastalığı ile ilgili 40'dan fazla mutasyonun büyük bir kısmının tek 'baz' değişikliği şeklinde olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada daha çok nokta mutasyonlarını saptamaya yönelik bir mutasyon tarama yöntemi olan "Single Stranded Conformational Polymorphism (tek zincir konformasyon değişikliği)" (SSCP) yöntemi kullanılmıştır.

---

\*Çalışma 91K120930 no'lu Devlet Planlama Teşkilatı projesi ile desteklenmiştir.

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

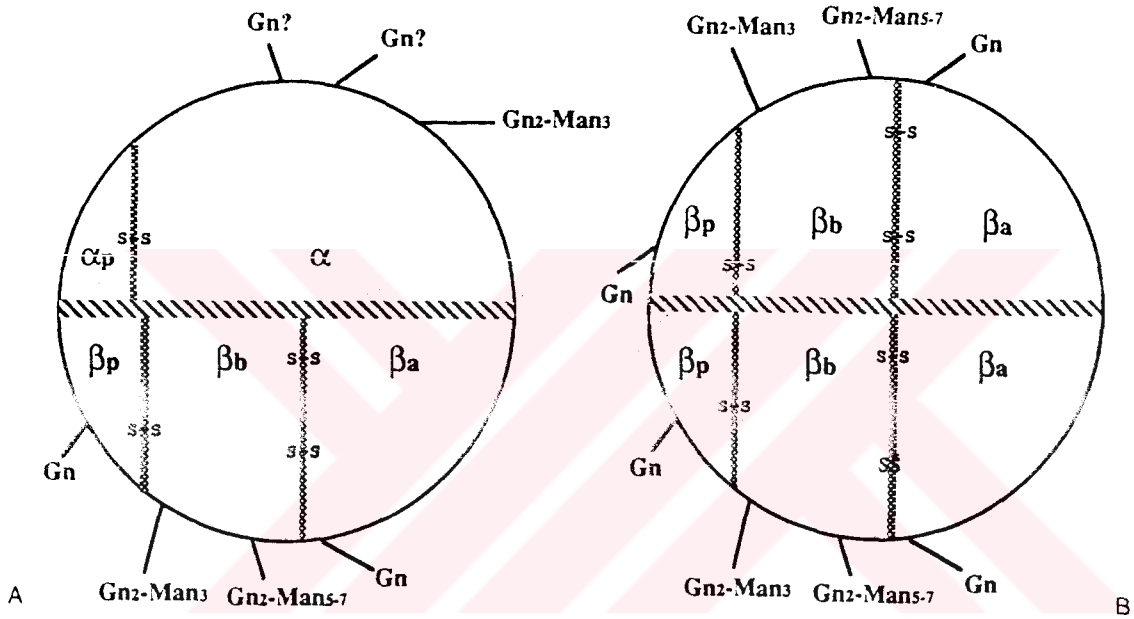
Heksozaminidaz (Hex) (EC 3.2.1.52), lizozomlarda bulunan 40'dan fazla enzimden biridir. Bu enzim glikoprotein, glikolipit ve glukozaminoglikan moleküllerinin ucunda bulunan  $\beta$ -bağlı N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamini hidroliz eder (1).

#### II.1. HEKSOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN GENETİĞİ

Memeli hücrelerinde Hex'ın iki temel izoenzimi vardır. Bunlar, asidik izoenzim Heksozaminidaz A (Hex A) ve bazik izoenzim Heksozaminidaz B (Hex B)dir. İzoenzimlerin altbirim kompozisyonu immünpresipitasyonla gösterilmiştir. Hex A, bir  $\alpha$  ve bir  $\beta$  altbirimden, Hex B ise iki  $\beta$  altbirimden oluşmuştur. Alfa-altbirim geni 15 numaralı,  $\beta$ -altbirim geni 5 numaralı kromozom üzerinde bulunmaktadır. Alfa-altbirim 54 kD büyüklüğündeki  $\alpha$ -peptidini;  $\beta$ -altbirim 27 kD'luk  $\beta_a$  ve 28 kD'luk  $\beta_b$  polipeptitlerini içerir.  $\beta_a$  ve  $\beta_b$  polipeptitleri disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlanmışlardır. Ayrıca  $\alpha$  ve  $\beta$  altbirimlerinde 7-12 kD'luk küçük peptitler vardır:  $\alpha_p$  ve  $\beta_p$  şeklinde gösterilirler. Bunlar  $\alpha$  ve  $\beta$  polipeptitlerin N-uçlarına yakındırlar ve disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlanmışlardır. Hex A'nın yapısı  $(\alpha\alpha)(\beta\beta\beta\beta)$ , Hex B'nin  $2(\beta\beta\beta\beta)$ dir. Basit olarak Hex A ( $\alpha\beta$ ), Hex B ise ( $\beta\beta$ ) olarak gösterilir (Şekil 1)(3). Biyokimyasal çalışmalar her iki izoenzimin de dimer yapıda olduğunu göstermiştir. Hex A ve Hex B genlerinin yapısal düzenlenmeleri de benzerdir. Her ikisi de 14 ekson ve 13 introna sahiptirler. Hex A geni 35 kb, Hex B geni 40 kb büyüklüktedir. mRNA oluşumu sırasında 13 introndan 12'si benzer bölgelerden ayrılır. Protein



sentezinin yapıldığı bölge, yaklaşık 1600 'baz' uzunluğundadır. Alfa ve beta altbirimlerinin cDNA ve aminoasit dizileri %60 benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bu genlerin ortak bir ata genden evrimleştikleri düşünülmektedir (5).



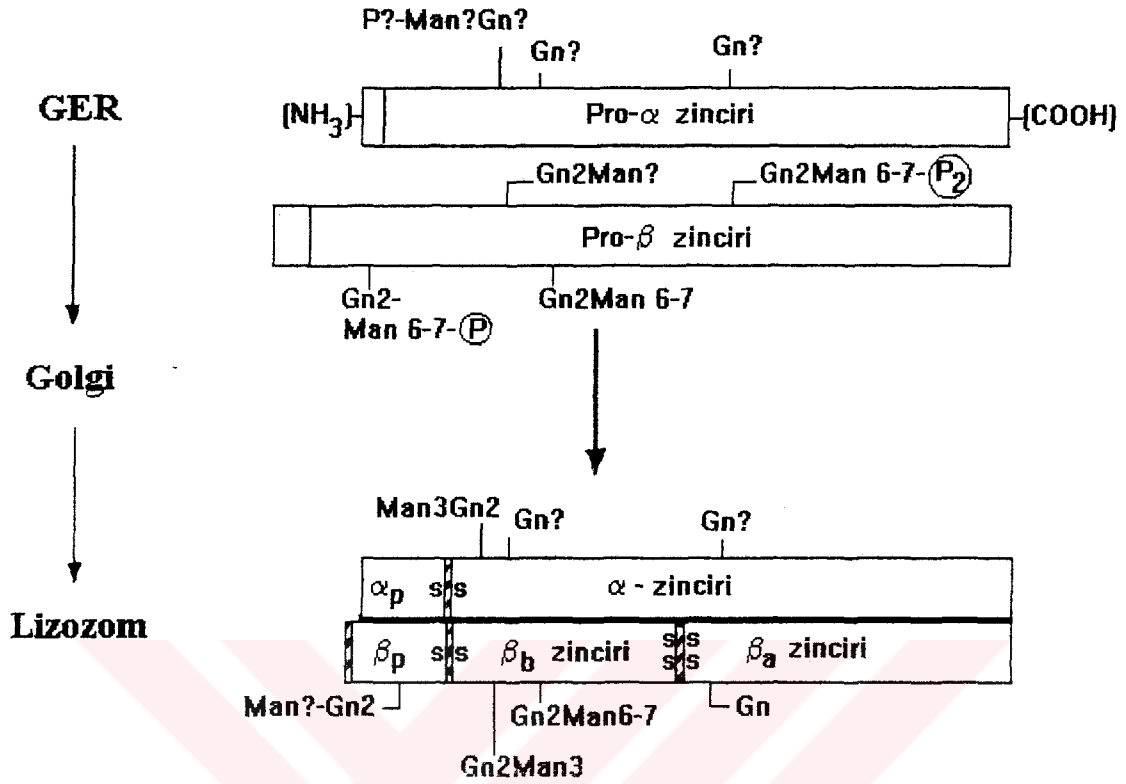
**Şekil 1- Hex A ve Hex B'nin yapıları.** Hex A  $\alpha$  ve  $\beta$ -altbirimlerden oluşan bir heterodimer, Hex B iki  $\beta$ -altbiriminden oluşan bir homodimerdir.  $\alpha$ -altbirimi, 7 kD ağırlığındaki  $\alpha_p$  ve 54 kD ağırlığındaki  $\alpha$  polipeptitlerinden oluşur.  $\beta$ -altbirim sırasıyla, 8, 27, 28 kD ağırlıklarındaki  $\beta_p$ ,  $\beta_a$  ve  $\beta_b$  polipeptitlerinden oluşmuştur. "Gn?"  $\alpha$ -polipeptitte potansiyel glikozillenme bölgelerini göstermektedir (3).

## II.2. HEKSOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN BİYOSENTEZİ

Hex, diğer lizozomal hidrolazlar gibi, **endoplazmik retikulumda (ER)** sentezlenir; **Golgide** posttranslasyonel değişikliğe uğrar. Bunu izleyerek ya **lizozomda** depolanır veya hücreden salgılanır (Şekil 2) (1, 3).

Sentezin ilk basamağı **granüllü ER'da** olur. Prepropolipeptitin amino ucunda bulunan hidrofobik sinyal peptit aracılığıyla polipeptit, ER lümenine girer.  $\alpha$  sinyal peptit 22 aminoasit uzunluğunda (6),  $\beta$  sinyal peptit 42 aminoasit uzunluğundadır (7). Sinyal peptitler ER'a girişte proteinden ayrılır. Protein sentezi tamamlandıktan sonra  $\alpha$  ve  $\beta$  polipeptitler ER'da belirli asparajin aminoasitleri üzerinden glikozillenirler. Alfa-altbirimin öncül şeklinin 3,  $\beta$ -altbirimin öncül şeklinin 5 potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır (8). Büyüyen polipeptite bir dolikol aracılığıyla mannozdan zengin bir parça, (Glc3Man9GlcNAc2) aktarılır. Bu parçadaki mannoz moleküllerinden üç glukoz molekülünün ayrılması, bir mannoz molekülünün kopması, polipeptit içi disülfid bağlarının oluşması ve pro- $\alpha$  ve  $\beta$ -zincirlerinin birleşimi ER'da olur. Bunların sonucunda katalitik olarak aktif pro-Hex oluşur (9).

Hex'ı da içeren lizozomal enzimlerin lizozoma ulaşabilmeleri için glikozil kısımlarında bulunan mannozlar üzerinden fosforillenmeleri gerekir. Bu fosfat grupları bir fosfotransferazın basamaklı etkisiyle poteine eklenirler. Önce belirli bir mannoz molekülü UDP-N-asetilglukozamin ile etkileşir, UMP ayrılır. Sonra  $\alpha$ -N-asetilglukozaminil fosfodiesteraz, N-asetilglukozamini de ayırır. Böylece fosfomannozil yapı oluşur. Bu reaksiyonlar **ER ve Golgide** olur (10, 11).



**Şekil 2- Hex A biyosentezinin şematik gösterimi.** Farklı organellerde  $\alpha$  ve  $\beta$  polipeptitlerin düzenlenmesi gösterilmektedir. Sinyal peptitler GER (Granüllü Endoplazmik Retikulum)'da ayrılır. Polipeptitler belirli asparajin aminoasitlerinden glikozillenirler (Gn). Muhtemel glikozillenme bölgeleri "Gn?" ile, fosforillenen oligosakkaritler "P" ile, fosforillenmesi muhtemel oligosakkaritler "P?" ile, oligosakkarit kısımları henüz tanımlanmamış yapılar "Man?" ile gösterilmiştir (3).

Dahms ve arkadaşları, fosfotransferazın lizozomal enzimlere özel bir ilgisi olduğunu ve diğer glikoproteinleri fosforillemediğini göstermişlerdir (12). Biyokimyasal ve kinetik veriler proteinlerin fosfotransferaza bağlanabilmek için ortak bir protein bölgesi içerdiklerini düşündürmektedirler. Böyle bir protein bölgesi henüz tanımlanmamıştır,

ancak fosfotransferazın proteini tanınmasında en az bir lizin aminoasitinin önemli rol oynadığı bilinmektedir (13).

Enzimin üzerinde oluşturulan fosfomannozil gruplarının Golgi'deki mannoz 6-fosfat reseptörlerine karşı büyük affinitesi vardır ve bu reseptörlerle birleşerek bir kompleks yaparlar. Protein-mannoz 6-fosfat reseptör kompleksi kalatrin kaplı keseciklerle Golgi'den salınır. Bunlar, ya varolan bir lizozomla birleşirler veya asitleşerek kendileri lizozom olurlar. Organelin asit ortamında reseptör-ligand kompleksi ayrılır. Salınmış reseptörler, yeni ligandlar bağlamak üzere tekrar Golgi organeline dönerler (13).

Hex, lizozomda önemli proteolitik ve glikozidik parçalanmaya uğrar. Oligosakkaritler lizozomal ortamda kalma süresine bağlı olarak, enzimlerden ayrılırlar. Örneğin,  $\beta$ -altbirimin 4. oligosakkarit yan zinciri asparajin bağlı N-asetilglukozamine indirgenir (14). Bu sırada protein düzenlemeleri de devam etmektedir. 67 kD luk öncül  $\alpha$ -altbirim, N-ucundan 7 kD luk parçaya ve 54 kD luk olgun polipeptite ayrılır. Bu da iki dizi arasında 16 veya 17 aminoasitlik bir parçanın ayrıldığını göstermektedir. Benzer bir şekilde 63 kD luk  $\beta$ -altbirim, ara dizilerin ayrılmasıyla  $\beta_p$ ,  $\beta_a$  ve  $\beta_b$  polipeptitlerine parçalanır (15, 16). Proteolitik olayın biyolojik nedeni açık değildir. Bu işlemler enzim aktivitesi için gerekli değildir. Çünkü öncül moleküllerin oluşturduğu enzim de katalitik olarak aktiftir. Kısmen parçalanmış enzimin lizozomal ortamda daha dayanıklı olması nedeniyle bu işlemin olduğu düşünülmektedir (1). Lizozomda Hex'in uğradığı en önemli değişiklik, altbirimlerin aktif enzimi oluşturmak üzere dimerizasyonudur. Tek başına ne  $\alpha$ , ne de  $\beta$  monomeri aktif değildir. Monomerler, homo- ve heterodimer izoenzimleri vermek üzere üç şekilde birleşebilirler (17); A izoenzimi ( $\alpha\beta$ ), B

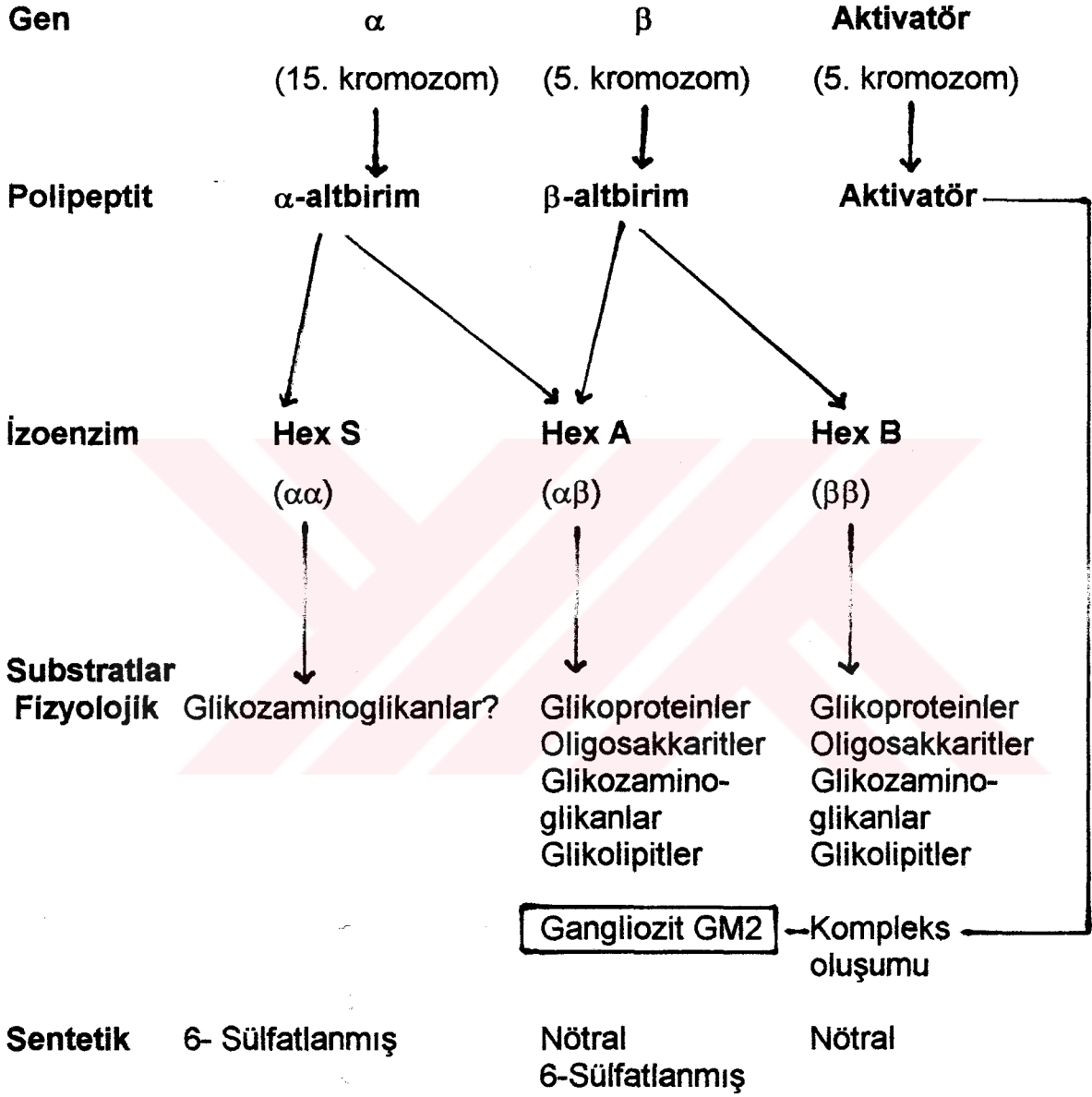
izoenzimi ( $\beta\beta$ ), S izoenzimi ( $\alpha\alpha$ ). Her iki altbirim de benzer aktif merkezler içerirler.  $\beta$ - altbirimin varlığı, oluşan dimerin dayanıklılığını artırır. En dayanıklıdan en az dayanıklıya doğru izoenzimlerin sıralaması Hex B ( $\beta\beta$ ) > Hex A ( $\alpha\beta$ ) >> HexS ( $\alpha\alpha$ ) şeklinde olur (1).

### II.3. HEKSOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN FONKSİYONU

Hex glikolipitler, glikoproteinler ve glukozaminoglikanların indirgen olmayan uçlarındaki glikozidik bağı parçalar. Bu bağı parçalanması ile  $\beta$ -N-asetilglukozamin veya  $\beta$ -N-asetilgalaktozamin molekülleri ayrılır. Hex A ve Hex B aynı substratları hidroliz edebilirler, fakat negatif yüklü substratları hidroliz etme yeteneğine yalnız Hex A sahiptir (18). Hex A'nın esas substratı GM2 ganglioziddir. Hex A, GM2 gangliozidin yanısıra keratan sülfat, kondroidin veya dermatan sülfatlardaki  $\beta$ -bağlı N-asetilglukozamin 6-sülfat gibi negatif yüklü substratları hidroliz edebilir (Şekil 3). Özgüllük sağlayan bu farklılığın,  $\alpha$ -altbirimde negatif yüklü yapay substratları bağlayabilen bir bölgenin varlığı yüzünden olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotez, N-asetilglukozamin 6-sülfat içeren yapay substratla yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Sülfatlı substratı Hex A hidroliz edebilirken Hex B edemez (19).

GM2 gangliozid, kendi hidrolizi için, "GM2 aktivatör" olarak bilinen bir glikolipit bağlayıcı kofaktöre ihtiyaç duyar (20). Bu kofaktör, GM2 gangliozidle 1:1 oranında bir kompleks oluşturur ve kompleks suda çözünür hale gelir. GM2 aktivatör, hem Hex A'nın substratı olan gangliozidi lizozoma gönderebilecek bir taşıyıcı protein olarak görev yapar, hem de Hex A ile ilişkiye girerek  $\alpha$ -altbirim aracılığıyla glikozidik

bağın parçalanmasını sağlar. GM2 aktivatör proteininin cDNA'sı izole edilmiştir; geni 5. kromozom üzerinde bulunur (21-23).



**Şekil 3- Heksozaminidaz sistemi.** GM2 gangliozidin parçalanması için herbiri ayrı gende kodlanmış üç polipeptite ihtiyaç vardır: A izoenziminin  $\alpha$  ve  $\beta$ -altbirimleri ve aktivatör protein (17).

## II.4. TAY-SACHS HASTALIĞI VE TANISI

İngiliz oftalmolog Warren Tay 1881'de ve Amerikalı nörolog Bernard Sachs 1890 yıllarında yeni bir hastalık tanımladılar. Hastalığın klinik bulgularının beyinde dejenerasyon, körlük ve motor fonksiyon kaybı olduğunu bildirdiler. Semptomlar yaşamın ilk 4-6 aylarında ortaya çıkıyor, hızla ilerliyor ve 3 veya 4 yaşında ölüme yol açıyordu (24).

Tay-Sachs hastalığındaki metabolik bozukluk 1939-1942 yıllarında gösterildi; esas olarak merkezi sinir sisteminde gangliozidlerin birikmesi olarak tanımlandı. 1962'de Tay-Sachs hastalığında biriken maddenin GM2 gangliozid olduğu gösterildi. Bu bileşiğin indirgen olmayan ucunda  $\alpha$ -N-asetilnöraminik asit ve  $\beta$ -N-asetilgalaktozamin bulunması nedeniyle hastalığa biyokimyasal olarak bir siyalidaz veya heksozaminidaz eksikliğinin yol açtığı düşünüldü. Daha sonra Hex Aktivitesi ile yapılan enzimatik çalışmalar, Hex A enziminin Tay-Sachs hastalığında eksik olduğunu gösterdi (24).

Yıllar süren biyokimyasal ve genetik çalışmalar sonucu, Tay-Sachs hastalığının (GM2 gangliozidoz), otozomal resesif geçişli bir lizozomal depo hastalığı olduğu; Hex A enziminin  $\alpha$ -altbirim genindeki bir mutasyon sonucu açığa çıktığı bulundu. Hex A aktivitesinin, bir mutasyon sonucu azalması veya eksikliğinde, enzimin doğal substratı olan GM2 gangliozid birikerek lizozomlarda şişme ve nöron fonksiyonlarında bozukluklara yol açmaktadır. Bunun sonucu ilerleyici tipte nörolojik dejenerasyon gelişmektedir (17).

Hex A enziminin eksikliği sonucu oluşan Tay-Sachs hastalığı, çeşitli yaşlarda ve değişik bulgularla ortaya çıkar. Klasik infantil tip,

hayatın 3-5. aylarında gelişme geriliği, körlük, göz dibinde (makulada) kiraz kırmızısı leke, konvülsiyon bulgularıyla başlar ve nörolojik bulguların ilerlemesi ile hasta 3-5 yaşlarında kaybedilir. Daha geç yaşlarda başlayan juvenil ve erişkin tiplerinde ise, klinik bulgular çok değişkendir: demans, konvülsiyon, nörolojik bozukluklar, distoni, akut psikoz tabloya hakim olabilir (17, 25).

Tay-Sachs hastalığı, dünyada toplum tarama programı uygulanmış ilk insan genetik hastalığıdır ve diğer genetik hastalıklar için örnek oluşturmuştur. Tanısal amaçla ve tarama programlarında Hex A'yı kantitatif olarak ölçmek için enzimatik yöntemler kullanılır. Bu amaçla serum, lökositler, fibroblast ve amniyon hücreleri gibi örnekler kullanılabilir. Hex A aktivitesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem, izoenzimlerin sıcaklığa dayanıklılık farklarını esas alan termolabil fraksinasyon yöntemidir. Hex B sıcaklığa daha dayanıklı iken Hex A 50° C'da aktivitesini kaybetmektedir. Substrat olarak, genellikle, yapay substrat olan 4-metilumbelliferon N-asetilglukozaminid (4MUG) kullanılır. Sonuçlar, açığa çıkan 4 metilumbelliferonun fluorometrede okunması ile değerlendirilir(17).

Enzim aktivitesinin tayininde, doğal substrat olan GM2 gangliozidin kullanılması daha uygun olabilir. Bunun için, GM2 gangliozidin postmortem beyin dokusundan ekstraksiyonu, N-asetilgalaktozamin, siyalik asit veya sfingozinin enzimatik veya kimyasal olarak işaretlenmesi gereklidir. Substrat hazırlamanın pahalı olması ve GM2 gangliozid kaynaklarının sınırlı olması bu yöntemin çok özel durumlarda kullanılmasına neden olmaktadır (24). Ayrıca selüloz asetat veya nişasta jel elektroforezi kullanılarak Hex A aktivitesi tayin edilebilir (26).



## II.5. HEX A EKSİKLİĞİNE NEDEN OLAN MUTASYONLAR

Tay-Sachs hastalığı, Hex A geninin klonlanmasından önce, yukarıda da söz edildiği gibi klinik fenotipleri ve biyokimyasal verilerle tanımlanabiliyordu. Rekombinant DNA tekniğinin bulunmasının ardından Hex geni klonlandı (5, 27); hemen ardından da intron/ekson birleşim yerlerinin çevresindeki diziler bulundu (28). Klonlanmış  $\alpha$ -cDNA'nın Ashkenazi-Müsvi ve Fransız-Kanada'lı hastalardan elde edilmiş DNA'lara prob olarak kullanıldığı Southern blot yöntemiyle, Tay-Sachs hastalığına neden olan mutasyonların ilki bulundu. Bu mutasyon, Fransız-Kanadalı hastalarda ekson 1 ve çevresindeki dizilerin kaybına neden olan 7,6 kb'lık bir delesyondur. Ashkenazi-Müsvi toplumundaki hastalardan alınan DNA örneklerinde bu mutasyon görülmedi (29).

1989 yılından sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği, DNA düzeyinde tarama ve tanıyı mümkün kılarak hastalıktan sorumlu diğer mutasyonların bulunmasına yardımcı olmuştur (18). PCR teknolojisinin mutant genlerin tanısı ve tanımlanmasında kullanılabilmesi için, genin protein sentezinde kullanılan bölümünün dizisinin ve ekson-intron sınırlarının bilinmesi gerekir. Ekson/intron kesim bölgelerindeki değişiklikleri tanımlayabilmek için intronların çevrelerindeki dizileri bilmek gerekir (24). Bu bilgilerle, Tay-Sachs hastalığı için yüksek risk taşıyan Ashkenazi-Müsvilerinde hastalığa neden olan mutasyonların %95-99'u tanımlanabilmiştir.

Ashkenazi-Müsvi kökenli infantil Tay-Sachs hastalarında en sık görülen mutasyonlar, ekson 11'de 4 'baz' çiftini (bç) içeren insersiyon mutasyonu (30), intron 12 ayrılma bölgesinde G→C transizyonudur. İlk mutasyon sözü edilen toplumdaki Tay-Sachs mutasyonlarının %81'ini

oluşturur (31, 32, 33); Avrupa'lı toplumlar arasında da en sık görülen mutasyondur ve bu nedenle bu konuda yapılacak çalışmalarda hastanın kökenine bakılmaksızın bu mutasyon araştırılmalıdır (24). İkinci mutasyon ise, Ashkenazi-Musevi toplumundaki Tay-Sachs mutasyonlarının %16'sını oluşturur (31, 32, 33). Aynı toplumda erişkin tip Tay-Sachs hastalığına en sık neden olan mutasyon, ekson 7'de G→A değişimi (31, 32, 33), dolayısıyla enzimde bir aminoasit değişimi (Gly269→Ser) yapan mutasyondur (34, 35, 36). Bu mutasyonlar, Musevi olmayan toplumlarda da görülmektedir. Değişik toplumlarda tek veya nadir görülen mutasyonlar da tanımlanmıştır (Tablo 1).

Bugüne kadar Hex A geninde 40'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (24). (Tablo 1) Şimdiye kadar saptanmış mutasyonların çoğunluğu, 7,6 kb'lık delesyon ve az sayıda nükleotidin delesyonu dışında, substitusyon ve insersiyon şeklindeki nokta mutasyonlarıdır.

**Tablo I. Hex A geninde bulunan mutasyonlar (24)**

Nükleotid değişiklikleri	Etnik grup	Ekson
Δ7.6 kb	Fransız-Kanadalı	Ekson 1
A1G	Zenci	Ekson 1
C9T	Zenci	Sessiz mutasyon, Tanımsal değil
G78A	İngiliz	Ekson 1
İntron 2+1 G→C	Kuzey Avrupalı	Ekson 2
İntron 2+1 G→A	Fransız	Ekson 2
C409T	Fransız, İrlandalı?	Ekson 3
GΔ436	Zenci	Ekson 4
İntron 4+5 G→A	Fransız	Ekson 4

Intron 4-1 G→T	Zenci	Ekson 5
TG $\Delta$ 477-478	İngiliz	Ekson 5
C508T	Fransız-Kanadalı	Ekson 5
G509A	Japon, Faslı Yahudi	Ekson 5
C532T	Çekoslovak	Ekson 5
G533A	Portekiz	Ekson 5
G533T	İngiliz	Ekson 5
G540G	Faslı Yahudi	Ekson 5
A $\nabla$ 547	Çinli	Ekson 5
G570A	Tunuslu	Ekson 5
C629T	Kuzey Afrikalı	Ekson 6
C739T	Panetnik	Ekson 7
G749A	Lübnanlı	Ekson 7
G772C	İskoç-İrlandalı	Ekson 7
G805A	Panetnik	Ekson 7
Intron 7+1 G→A	Fransız-Kanadalı	Ekson 7
TTC $\Delta$ 910-912 veya 913-915	Faslı Yahudi	Ekson 8
CT $\Delta$ 927-928 veya 929-930	Alman-İskandinavyalı	Ekson 8
GGA $\Delta$ 958-960 veya 961-963	İrlandalı	Ekson 8
G987A	İngiliz/ alman	Ekson 9
Intron 9+1 G→A	İrlandalı ve diğerleri	Ekson 9
Intron 9 $\Delta$ -8-12	Polonyalı	Ekson 10
C1177T	Fransız	Ekson 11
A1195G	Zenci	Ekson 11
G1260C	Alman	Ekson 11
TATC $\nabla$ 1277	Askenazi Musevileri	Ekson 11
G1306A	Zenci	Ekson 11
Intron 12+1 G→C	Ashkenazi Musevileri	Ekson 12
G1444A	İtalyan, Çinli	Ekson 13
T1453C	Çinli	Ekson 13
C1495T	Karışmış ırklar	Ekson 13
G1496A	İskoç-İrlandalı	Ekson 13
C $\Delta$ 1510	İtalyan	Ekson 13
C1510T	Mısırlı, Fransız	Ekson 13
G1511A	Lübnanlı	Ekson 13
G1518A	Belirlenmemiş	Ekson 13

$\Delta$  işareti delesyon,  $\nabla$  işareti insersiyon mutasyonunu göstermektedir.

## II.6. TAY-SACHS HASTALIĞINDA PCR YÖNTEMİNİN MUTASYON TANIMLAMASINDA KULLANIMI

Tay-Sachs hastalığında mutasyon saptanması amacıyla Hex A geninin 14 eksonu ve ekson/intron birleşim yerleri için en uygun PCR koşulları, Triggs-Raine ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (37). Tay-Sachs hastalığında PCR kullanılarak mutasyon saptanması için 4 analitik işlem kullanılmıştır. Bunlar, heterodupleks analizi, restriksiyon enzim analizi, allel spesifik oligonükleotid hibridizasyon ve allel spesifik amplifikasyondur. Nadir görülen veya yeni mutasyonların tanımlanması için ise, iki analitik yöntem ("single stranded conformational polymorphism" yöntemi ve "chemical cleavage of mismatched sites (kimyasal parçalama)" yöntemi) kullanılmaktadır (24).

### II.6.1. Heterodupleks analizi

Heterozigotlardan alınmış örneklerde, PCR'la çoğaltılmış DNA dizileri direk %8 poliakrilamid jel elektroforezine uygulanır. Normal ve mutant diziler, kendi aralarında hem homo, hem heterodupleks yapılar oluştururlar. İki veya daha fazla çiftlenmemiş 'baz' içeren heteroduplekslerin yanlış birleşmiş bölgeleri bu heteroduplekslerin poliakrilamid jel elektroforezinde daha yavaş hareket etmelerine neden olacaktır. Ayrıca DNA örnekleri bir restriksiyon enzimiyle de (Hae II) kesilerek (Hae II enziminin tanıma bölgesi 5' PuGCGC/Py 3' dür.) poliakrilamid jel elektroforezine uygulanır. Restriksiyon enzimi ile kesmenin nedeni normal ve mutant diziler arasındaki farkın ayırt edilebileceği yeteri kadar küçük parçalar elde etmektir. Heterodupleks analizi, Tay-Sachs hastalığında en sık görülen ekson 11'deki 4 bç'lik delesyon mutasyonunun saptanması için iyi bir yöntemdir. Bu mutasyon

için homozigot olanlarda, heterodupleks sinyali sadece amplifikasyondan önce hasta DNA'sı normal DNA ile karıştırılırsa görülebilir ve homozigotlara da tanı konulabilir. Hastanın mutasyon açısından homozigot olduğu ise restriksiyon enzim kesimiyle gözlenebilir (38).

### II.6.2. Restriksiyon enzim analizi

Bir mutasyon restriksiyon endonükleaz kesim bölgesinin kaybına veya yeniden oluşumuna neden olabilir. Bu durumlarda, PCR ile çoğaltılmış DNA bir restriksiyon enzimle kesilerek, jel elektroforezinde parçaların büyüklük farklarından mutant ve normal alleller ayırtedilebilir.

Bu yöntem intron 12 ayrılma bölgesi mutasyonunu tanımlamak için kullanıldı. G→C transizyonu mutant ailede Dde I kesim bölgesi yaratmaktadır (39, 40, 41). Dde I enziminin tanıma bölgesi 5'- C/TNAG - 3' dür. Restriksiyon enziminin (Dde I) normalde kesemediği DNA dizisi mutasyon sonucu enzim tarafından kesilir hale gelmekte ve poliakrilamid jel elektroforezinde normal örnekte tek bant, mutant örnekte ise 3 değişik büyüklükte bant görülmektedir.

Erişkin tip Tay-Sachs hastalığına en sık neden olan mutasyon (G805→A) EcoR II kesim bölgesinin kaybına neden olur (EcoR II 5'- /CCAGG -3' bölgesini tanır.). Ayrıca, bu özellik IVS 7+1 G→A (42), ve IVS 7+1 G→C (43) mutasyonlarında da görülür. Bu mutasyonların saptanmasında PCR'la çoğaltılmış normal DNA dizisi enzim tarafından kesilebilirken, mutant dizi kesilemez. Bu üç mutasyonun poliakrilamid jel elektroforezinde görünümü aynıdır. Bu yüzden restriksiyon enzim

analizinden sonra birbirlerinden ayırmak için Allel Spesifik Oligonükleotid hibridizasyon (ASO) yöntemiyle analiz edilmeleri gerekir.

### **II.6.3- Allel Spesifik Oligonükleotid hibridizasyon yöntemi (ASO)**

Bu metod dot blot olarak bilinir. Mutasyon tanı yöntemlerinin en yaygın kullanılanıdır. 20-30 bç'lik allel spesifik oligonükleotid sentezi ve işaretleme gerektirdiğinden pahalı bir yöntemdir. İşaretleme radyoaktif nükleotid veya biyotin ile yapılabilir. İşaretli normal ve mutant oligonükleotid probalar naylon veya nitroselüloz bir tabaka üzerine ultraviyole ışığı ile veya fırınlanarak sabitleştirilir. PCR ile çoğaltılmış DNA örnekleri tek zincirli hale getirilerek tabaka üzerine uygulanır. Normal örneklerde normal proba, heterozigotlarda hem normal hem mutant proba, homozigotlarda ise sadece mutant proba hibridizasyon olacaktır. Bu metodun kullanımı bilinen mutasyonlarla sınırlıdır. Ayrıca spesifik olmayan hibridizasyonlardan kaçınmak için çok titiz çalışmayı gerektirmektedir. ASO hibridizasyonunun özgüllüğü sayesinde tek baz farklılığı olan alleller ayrılabilir (44).

### **II.6.4- Allel spesifik amplifikasyon (ASA)**

Bu yöntem DNA dizisinde büyük delesyonlara (kb büyüklüğünde) neden olan mutasyonların PCR tekniği kullanılarak saptanması amacıyla geliştirilmiştir. Amplifikasyon için 3 primer gerekmektedir. Çünkü, DNA dizisindeki büyük kopukluklarda normal DNA, mutant DNA'yı amplifiye etmek için kullanılan primerlerle amplifiye edilememektedir. ASA yöntemi 7.6 kb'lık delesyon mutasyonunun tanısı için uygulanmıştır. 3 primer kullanılarak amplifikasyondan sonra mutant

ve normal alleller ayrılabilmiştir. PCR reaksiyonu sırasında bir primer 5' delesyon bölgesinin üstündeki intronik dizilere hibridize olurken, diğer ikisi alttaki dizilere bağlanan primerlerdir. Bunlardan biri, delesyona uğramış bölge içindeki dizileri tanır ve normal DNA kalıbından amplifikasyonu yönlendirir. İkincisi ise 3' ucundan delesyon bölgesine hibridize olur ve sadece kopmuş DNA kalıbından amplifikasyon ürünü yapar. Değişik büyüklükteki ürünler jel elektroforezinde hızla ayrılır. Aynı zamanda normal ve mutant ASO'lerle hibrid ürünler oluşturularak sonuçlar elde edilebilir. Bu yöntemle tek nükleotidde farklılığı olan alleller saptanamaz. Çünkü, amplifikasyonun yapıldığı düşük sıcaklık, primerlerin DNA kalıbına tek 'baz' hatasıyla hibridize olmasına neden olur (45).

#### **II.6.5. Nadir görülen veya yeni mutasyonların tanımlanması**

Yeni Tay-Sachs hastalığı mutasyonlarını taramada en ekonomik yaklaşım, bir mutasyon bölgesinin Hex A geninin hangi eksonunda bulunduğunu önceden belirlemektir. Bunun için kısmen kullanışlı iki yöntem bulunmuştur: "Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)" analizi (46) ve "Chemical Cleavage of mismatched sites (kimyasal parçalama yöntemi)" yöntemi (47).

SSCP, denature olmayan jelde tek zincirli parçalar arasında elektroforetik hareket farklılığını saptar. Farklı hareket, tek zincirli DNA parçalarının sekonder yapılarında değişik şekillerin oluşumuna bağlıdır. Bu nedenle, analizi yapılacak dizinin uzunluğu, sıcaklık, iyon konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı gibi durumlardan etkilenir. Hex A geni 35 kb büyüklüğünde bir gen olduğu için, bu teknik, son yıllarda yeni

mutasyonların gen içindeki yerinin önceden belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir nokta mutasyonu tarama yöntemidir. Tek 'baz' değişikliğinde bile, DNA tek zincirinin sekonder yapısı değişebileceğinden bu yöntemle elektroforetik olarak saptanma şansı yüksektir.

Kimyasal parçalama yönteminde (chemical cleavage of mismatched sites), mutasyon açısından heterozigot bireylerin eksonlarının radyoaktif PCR ile çoğaltılması sonucu mutant DNA tek ipliği ile normal DNA tek ipliği heterodupleksler oluştururlar. Mutasyonun olduğu bölgede, en azından tek 'baz' hatalı birleşecektir. Bu hatalı birleşmiş bölgeler kimyasal modifikasyondan etkilenirler. Hidroksilamin veya osmiyumtetroksitle yapılan bu tip modifikasyonlar yanlış birleşmiş bölgeden DNA zincirinin kırılmasını sağlar. Hidroksilamin Sitozin 'baz'ını, osmiyumtetroksit Timin 'baz'ını modifiye eder. Zincirler modifikasyon bölgelerinden piperidinle kimyasal olarak parçalanabilir. Piperidinle parçalamanın ardından parçalar denature edici poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilir.

Gen içinde mutasyona uğramış bölgeyi tanımlamak için hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, mutasyonun olduğu nükleotit(ler) tanımlamak için DNA dizi analizi yapmak gerekir. Çünkü, daha önce anlatılan bütün teknikler ya bilinen mutasyonu göstermeve ya da, eğer varsa, yeni mutasyonun gen içindeki yerini belirlemeye yarayan yardımcı yöntemlerdir. Bu yardımcı yöntemlere Hex A geninin büyüklüğü nedeniyle gerek duyulmaktadır. Mutasyonun DNA dizisinde nasıl bir değişiklik yaparak hastalığı ortaya çıkardığı ise ancak DNA dizi analizi ile gösterilebilir. Bu analizi yapmak için en sık kullanılan metod Sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemidir (48).



## BÖLÜM III

### ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### III.1. MADDELER

4-Metilumbelliferil-N-asetil $\beta$ -D-glukozaminid, 2'-deoksi 5'-trifosfat nükleotidler, Nonidet P-40, Fenol-kloroform-izoamilalkol karışımı, Gliserol, agaroz, akrilamid, bisakrilamid, TEMED, amonyum persülfat, xylene cyanole, ethidium bromür, bromofenol blue, formamide, Kodak X-omat film Sigma, ABD'den, 4-Metilumbelliferon Serva, Almanya'dan, Taq DNA polimeraz Promega ABD'den,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP Amersham, İngiltere'den, oligonükleotid primerler ve Hae II, Kpn I, Apa I restriksiyon enzimleri, 'sequencing kit' McGill Üniversitesi Montreal Çocuk Hastanesi Araştırma Enstitüsü, Kanada'dan sağlandı.

Deneylede kullanılan diğere tüm kimyasal malzemeler analitik safliktadır.

#### III.2. ALETLER

Thermocycler Thermolyne ABD'den, jel kurutucu ve mikrosantrifüj Hoeffler, Almanya'dan, DNA sequencing jel elektroforez cihazı BRL, Gibco, ABD'den, 4000 volt güç kaynağı ve transilluminator Consort, Belçika'dan, 20  $\mu$ l ve 200  $\mu$ l otomatik pipet ve pipet uçları Gilson, Fransa'dan sağlandı. Hex A aktivitesi tayini için Dubnoff metabolik çalkalayıcı, Aminco-Bowman spektrofluorometre, Coleman Junior II kolorimetre, IEC international tip klinik santrifüj kullanıldı.

### III.3. HASTA GRUBU

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Nöroloji bölümü ile diğer üniversite ve devlet hastanelerinde dejeneratif beyin hastalığı ön tanısı almış 4 hastanın (S.O, E.Y, M.K, A.D, E.D) serumlarında ve bir vakanın fibroblast hücre kültüründe (E.Y) Hex A aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesi hiç olmayan yani, Tay-Sachs hastalığı tanısı almış olan vakalardan S.O., annesi ve babası, E.Y., annesi ve babası, M.K., A.D ve E.D ile iki kontrol PCR-SSCP analizi ile hastalığa neden olan mutasyon açısından incelendi.

**S. O.:** Tay-Sachs hastalığı tanısı ile ölen bir kardeş öyküsü nedeni ile 40 günlükken Çocuk Nöroloji bölümüne başvuran erkek hasta, normal bir gebeliğin ardından spontan vaginal yolla doğmuş. Ailenin ikinci çocuğu imiş. İlk çocuk olan E.O. klinik bulguları ve serum Hex A aktivitesi tayini ile Tay-Sachs hastalığı tanısı almış ve 3 yaşında bronkopnömoniden ölmüş. Anne ile baba arasında birinci dereceden akrabalık vardır.

Serum Hex A düzeyi %0 olarak saptanan hastaya Tay-Sachs hastalığı tanısı konuldu. Bebekten kan alınarak lökositleri DNA çalışması için ayrıldı. (Aile muayeneyi reddettiği için daha sonra gelişen klinik bulgular verilememektedir.)

**E. Y.:** Hacettepe Çocuk Hastanesi'ne başvurduğu zaman 10 aylık olan erkek hastanın 5 aylıkken mental ve motor bozukluğu, hipotonisitesi başlamış. Anne-babası arasında akrabalık olmayan bir ailenin ikinci çocuğu imiş. 10 aylıkken yapılan fizik muayenesinde boyu 75 cm., ağırlığı 12 kg, baş çevresi 45 cm. olarak belirlenmiş. Belirgin

hipotonisite ve hiperakuzisi saptanmış. Göz dibi muayenesinde iki taraflı Japon Bayrağı görünümü varmış. Derin tendon refleksleri iki taraflı hipoaktifmiş. Organomegalisi yokmuş. Laboratuvar incelemesinde deri fibroblast hücre kültüründe Hex A aktivitesi %0 olarak saptanan hastaya Tay-Sachs hastalığı tanısı konuldu.

Heksozaminidaz A aktivitesi, Fakültemiz Tıbbi Biyoloji bölümünden sağlanan fibroblast kültür hücrelerinde tayin edildi.

**M.K.:** 9 aylıkken çevreye ilgisizlik, başını tutumama, oturamama yakınmaları ile İbn-i Sina Hastanesi Çocuk Nöroloji Bölümüne başvuran kız hastanın fizik muayenesinde derin tendon refleksleri canlı, iki taraflı babinski (+), göz dibinde Japon Bayrağı görünümü saptanmış. Hasta 6-7 aya kadar normalken sonra zamanla ilerleyen bir nörolojik gerileme göstermiş. Hiç oturamamış, çevresine ilgisizmiş. Ani seslere karşı irkilme reaksiyonu gösteriyormuş.

Anne-baba arasında ikinci dereceden akrabalık varmış. Serum Hex A aktivitesi %0 olarak saptanan hastaya Tay-Sachs hastalığı tanısı konuldu.

**A.D:** 14 aylıkken çevreye ilgisizlik, yürüyememe, konuşamama yakınmaları ile Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Nöroloji Polikliniği'ne başvuran kız hasta, 3300 g ağırlığında spontan vajinal yolla doğmuş. İlk aylarda gelişmesi normalken, 4 aylıktan itibaren başını tutamama ve sonraki aylarda da ilerleyici mental ve motor bozukluğu olmuş. Yapılan fizik muayenesinde gelişme geriliği, hipotonisite, göz dibinde iki taraflı Japon bayrağı görünümü, ani seslere karşı irkilme reaksiyonu varmış.

Anne-baba arasında ikinci dereceden akrabalık varmış. Serum Hex A aktivitesi %0 olarak saptanan hastaya Tay-Sachs hastalığı tanısı konuldu. Bu tanıyla izlenen hasta 3 yaşında öldü.

E.D: A.D.'nin kardeşi olan erkek hastaya, 3 aylıkken daha semptomları başlamadan serum Hex A aktivitesinin %0 bulunmasıyla Tay-Sachs hastalığı tanısı konuldu. Hasta daha sonraki aylarda kontrole gelmedi.

### **III.4. YÖNTEMLER**

#### **III.4.1. SERUM HEKSOZAMİNİDAZ A TAYİNİ**

Hex A ve B izoenzimleri sıcaklığa dayanıklılık farklarından yararlanılarak birbirinden ayrıldı. Hex B, sıcaklığa A'dan daha dayanıklıdır Enzim aktivitesi 4-Metilumbelliferil-N-asetilglukozaminin hidrolizi ile açığa çıkan fluoresan 4-Metilumbelliferon'un spektrofotometrede ölçümü ile saptandı. (49-52).

Hastalardan alınan 3 ml kan örneği, klinik santrifüjde +4°C'de 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, serumları ayrıldı ve enzim aktivitesi ölçülünceye kadar -20°C'da en fazla 15 gün saklandı. Serumlar Hex Aktivitesinin ölçüleceği gün çözüldü; ve 0,04 M sitrat-fosfat tamponu pH 4,4 ile 10 kez sulandırıldı. Kör tüpüne ve total aktivitenin ölçüleceği 3 tüpe 0,05 ml eklenip hemen -20°C'da donduruldu. Hex A'nın inaktive edilip Hex B'nin ölçüleceği başka 4 tüpe yine 0,05 ml sulandırılmış serum pipetlendi; 2 tanesi 50°C'de çalkalayıcıda 3 st, 2 tanesi de 4 st inkübe edildikten sonra -20°C'da donduruldu. Daha sonra 0,04 M sitrat-fosfat tamponu pH 4,4 içinde hazırlanmış 1 mM 4-Metilumbelliferil N-

asetil  $\beta$ -D-glukozaminidden 0,1 ml tüm tüplere pipetlendi ve 37°C'de bir st inkübe edildi. İnkübasyon, her tüpe 5 ml 0,17 M glisin-karbonat tamponu pH 9,9 eklenmesi ile sonlandırıldı. Floresans, 365 nm eksitasyon ve 448 nm emisyonunda Aminco-Bowman spektrofluorometrede okundu. Kör tüpüne, glisin-karbonat tamponu ardından substrat eklendi. Sonuçlar, nmol/ml/saat olarak ifade edildi ve iki izoenzimin totale göre yüzdesi hesaplandı.

Standart eğri, 0-10 nmol 4-Metilumbelliferonun 0,17 M glisin-karbonat tamponu pH 9,9 içinde hazırlanması ile çizildi

### **III.4.2. FİBROBLAST KÜLTÜRÜNDE HEX A TAYİNİ**

#### **III.4.2.1. Homojenizasyon**

İkinci pasaj kültür hücreleri üç kez dondurulup çözüldü. Her çözme işleminin ardından homojen görünüm elde edilinceye kadar tüpler vortekslendi. Bu işlemler sırasında örnekler buz içinde tutuldu, protein tayini yapıldı.

#### **III.4.2.2. Protein tayini**

Lowry ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, alkali ortamda bakır iyonları ile proteinlerdeki peptit bağları kompleksler oluştururlar. Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiği zaman bu kompleksler redüklenir ve tirozin, triptofan aminoasitleriyle birleşerek mavi-mor renk verirler. Oluşan rengin %75'i bakır komplekslerine bağlıdır. Renkli komplekslerin absorbansı 650-750 nm arasında ölçülür (53)

5-100  $\mu\text{g}$  protein içeren 0,15 ml örnek, 3 ml alkalen bakır çözeltisi (bkz. Ek 1.1) ile karıştırıldı. 15 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra, 0,3 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi (1:1 v/v Folin-Ciocalteu:su) eklendi; karıştırıldı ve 1 st oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan mavi-mor renk 750 nm'de kolorimetrede okundu. Kör tüpüne örnek yerine distile su kondu. Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı. Sonuçlar  $\mu\text{g/ml}$  olarak ifade edildi.

### III.4.2.3. Hex A aktivitesi ölçümü

Serum Hex A aktivitesi ile aynı esasa dayanır. Enzim tayininin yapılabilmesi için 0,1 ml hücre homojenatında 5-15  $\mu\text{g}$  protein olması gerekmektedir. İki tüpe 0,1 ml 5-15  $\mu\text{g}$  protein içeren örnek konduktan sonra bir tanesi  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Diğeri  $50^{\circ}\text{C}$ 'de 3 st çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra her iki tüp  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 st çalkalayıcıda 2 mM 4MUG (0,1 M sitrat-fosfat tamponu pH 4,5 içinde hazırlanmış) çözeltisinden 0,3 ml eklenerek inkübe edildi. Reaksiyon 3,6 ml 0,2 M glisin-NaOH tamponununun pH 10,8 eklenmesiyle durduruldu. Açığa çıkan 4-Metilumbelliferon 365 nm eksitasyon ve 448 nm emisyonunda spektrofotrometrede okundu.

Standart eğri, 0-10 nmol 4-Metilumbelliferon'un 0,2 M glisin-NaOH pH 10,8 tamponu içinde hazırlanması ile çizildi (54).

### III.4.3. DNA İZOLASYONU

S.O, E.Y, ile anne ve babalarının EDTA'lı tüpe alınmış 10 ml kan örneklerinden önce lökositler elde edildi ve sonra DNA izole edildi. M.K., A.D.ve E.D. vakalarında tam kan ile çalışılarak DNA elde edildi.

### III.4.3.1. Tam kandan DNA izolasyonu

EDTA'lı tüplere 10 ml kan alındı, karıştırıldı, çözelti 1 (bkz Ek 1.2) ile hacmi 20 ml'ye tamamlandı ve 240  $\mu$ l Nonidet P-40 eklendi (hücrelerin lizisi için). Birkaç kere alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi (çekirdekleri çöktürmek için). Süpernatant atıldı. \*Çökelek 400  $\mu$ l su ilavesi ile süspansiyon haline getirildi. 400  $\mu$ l'lik süspansiyon haline getirilmiş çekirdekler bir ependorf tüpüne pipetlendi. 40  $\mu$ l %10 SDS eklendi. İyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında yaklaşık 5 dk. beklendi. 400  $\mu$ l pH 8,0'e tamponlanmış fenol çözeltisi (bkz. Ek 1.3) eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı. Mikrofüjde 5 dk. maksimum hızda (14000 x g) santrifüj edildi. Üstteki sulu faz temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Fenol fazına 50  $\mu$ l su eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı. Mikrofüjde 5 dk. maksimum hızda santrifüj edildi. Sulu faz bir öncekine aktarıldı. Sulu faza eşit hacim (400  $\mu$ l) kloroform eklendi. İyice karıştırıldı. Fazları ayırmak için 14000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Sulu faz, temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Sulu faza 1/10 hacim (40  $\mu$ l) 3 M sodyum asetat tamponu pH 4,8 eklendi. Karıştırıldı. 2,5 hacim (900  $\mu$ l) soğuk %100 etanol eklendi. Karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dk. beklendi. 14000 x g'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. DNA çökeleğine 200  $\mu$ l %70 etanol eklendi. 5 dk. santrifüj edildi. Etanol atıldı. Çökelek oda sıcaklığında tüpler ters çevrilerek kurutuldu. DNA'lar kuruyunca -20°C'da çalışılincaya kadar saklandı (55).

### III.4.3.2. Lökositlerden DNA izolasyonu

EDTA'lı tüplere 10 ml kan alındı, iyice karıştırıldı. Bu kan 50 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 30 ml lizis tampon (bkz. Ek 1.4.) eklenerek karıştırıldı. 5-10 dk. buz içerisinde tutuldu. +4°C'de 2000 x g'de 10 dk.

santrifüj edildi. Süpernatant atılıp tüpün dibindeki lökositler tüpe hafif hafif vurarak kaldırıldı ve üzerine 10 ml lizis tampon eklenerek tekrar yıkandı. 2000 x g'de 10 dk. santrifüj edilip süpernatant atıldı. Sonra tam kandan DNA izolasyonundaki \* basamağından itibaren aynı işlemler uygulandı.

#### **III.4.4. DNA MİKTAR TAYİNİ**

Kurumuş olan DNA'nın üzerine 1 ml Tris-EDTA tamponu (bkz. Ek 1.5.) eklenerek 18 saat 37°C su banyosunda inkübe edildi. Uygun miktarlarda su ile sulandırıldı. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de absorbansı ölçülerek A 260/A 280 oranına bakıldı. Örnekteki DNA miktarı, 260 nm'de 50 µg DNA'nın 1 OD okuma vermesinden yararlanılarak hesaplandı (56).

#### **III.4.5. SINGLE STRANDED CONFORMATIONAL POLYMORPHISM PROTOKOLU (SSCP) (46)**

Bu yöntem beş basamaklıdır:

##### **III.4.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)**

'Baz' değişikliğini (point mutation) saptamak için **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)** ile <sup>32</sup>P işaretli çoğaltılmış DNA elde etmek (37);

Hex A geninin eksonları ve çevresindeki dizileri çoğaltmak için kullanılmış olan primer çiftler Ek 2'de (37) verilmektedir. Her PCR reaksiyon tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde 0,5 µg DNA, 1 µl



oligonükleotid primer A (0,5 µg/ml), 1 µl oligonükleotid primer B (0,5 µg/ml), 5 µl 10 x PCR tamponu (bkz. Ek 1.6.), her birinden 1 µl olmak üzere 10 mM dCTP, dGTP, dTTP, 0,5 µl 10 mM dATP, 0,5 µl α<sup>32</sup>P-dATP, 0,25 µl Taq DNA polimeraz (1,25 ü) bulunmaktaydı. Örnekler termocycler'da 5 dk. 80°C'da bekletildi ve hemen ardından oligonükleotid primer karışımı pipetlendi. Bu karışım üzerine 50µl 'mineral oil' pipetlendikten sonra örnekler her siklуста 94°C'da 30 sn denatürasyon, 60°C'da 30 sn primer yapışması (annealing) ve 72°C'da 1,5 dk zincir uzaması (extention) basamaklarını içeren 32 siklusa tabi tutuldu. Örnekler +4°C'da saklandı.

#### **III.4.5.2. Agaroz jel elektroforezi**

PCR ürünlerini, %2'lik Agaroz jel elektroforezine uygulayarak amplifikasyon ve kontaminasyon açısından kontrol etmek (56);

1xTBE (Tris-Borat-EDTA) (bkz. Ek 1.8.) tamponu içinde %2'lik agaroz jel hazırlandı. Elektroforez plağına döküldü. Hava kabarcığı olmamasına özen gösterildi. Jel donduktan sonra 5µl çoğaltılmış DNA örneği, 3µl loading (uygulama) tamponu (bkz. Ek 1.9.) ile karıştırıldı. Elektroforez tankı 1xTBE tamponu ile doldurulduktan sonra örnekler, jeldeki çukurlara uygulandı. 200 V'da bromofenol blue, jelin dibine gelinceye kadar (yaklaşık 1 st) elektroforeze devam edildi.

Elektroforez plağından çıkarılan jel etidyum bromür solüsyonu (bkz. Ek 1.10.) içinde 30 dk bırakılarak boyandı ve transilluminatör ile bantlar gözlemlendi.

### III.4.5.3. Poliakrilamid jel elektroforezi

32P işaretli DNA'nın, 95°C'da 3-5 dakika kaynatılarak tek zincir haline getirilmesinden (denatürasyonundan) sonra **poliakrilamid gel elektroforezine** uygulanması;

Elektroforez işlemi için nihai %6 akrilamid, %10 gliserol içeren poliakrilamid jel (bkz. Ek 1.11.) hazırlandı. Amonyum persülfat ve TEMED, jel dökülmeden hemen önce pipetlendi. Karıştırıldı. Hemen enjektöre çekilerek 31 cm x 38,5 cm boyutundaki 0,4 mm aralığı olan cam plaklar arasına döküldü. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Cam plaklar arasına dökülen jel 1,5 saat polimerizasyon için oda sıcaklığında bekletildi. 1,5 saat sonunda polimerize olmuş jel elektroforez tankına yerleştirildi. Örnek uygulama yerleri cam üzerinde işaretlendi.

Daha sonra çoğaltılmış DNA örneğinden 1  $\mu$ l alınıp 9  $\mu$ l su ile sulandırıldı. Bu sulandırılmış örneğin üzerine 10  $\mu$ l "sequencing stop" çözültisi (bkz. Ek 1.12.) eklenerek karıştırıldı. Karışım denatürasyon için 5 dk. 95°C'da tutuldu, buz içine yerleştirildi ve 2  $\mu$ l elektroforeze uygulandı. Kontrol olarak her eksonun çoğaltılmış DNA örneğinden 2  $\mu$ l, denatüre edilmeden nativ şekliyle elektroforeze uygulandı. Elektroforeze 200 V, 12 mA'de 18 saat devam edildi.

Elektroforez tamamlandıktan sonra cam plaklar arasından çıkarılan jel, bir filtre kağığına yapıştırıldı. Jel kurutucuda 80°C'da 30 dk. kurutuldu.

#### **III.4.5.4. Otoradyografi**

Kuru jel, karanlık odada, üzerine Kodak X-omat film kapatılarak 'intensifying screen' (yoğunlaştırıcı ekran) ile film kaseti içinde bir gece bırakıldı. Karanlık odada film banyo edilerek bantlar karşılaştırıldı.

#### **III.4.5.5 Otoradyografinin değerlendirilmesi**

Normal DNA, yukardaki yöntemle göre PCR'da çoğaltıldıktan ve 95°C'da 3-5 dk. denatüre edildikten sonra jel elektroforezine tabi tutulup otoradyografi yapıldığı zaman, otoradyografide nativ DNA'ya göre daha yavaş hareket eden 2 bant halinde görülür. Denatürasyon tam olmayacak olursa 2 taneden fazla bant da görülebilir.

Mutasyona uğramış bir DNA, bu yöntemle iki bant normal allelden, iki bant da mutant allelden gelmek üzere 4 bant vermelidir. Elektroforez koşullarına göre bantların sayısında değişiklikler olabilir. Aynı DNA tek zincirinin değişik sekonder yapıları oluşabileceğinden elektroforezde 'metastable conformers' diye adlandırılan ek bantlar görülebilir. Bu nedenle, değerlendirmede dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, tek tek bantları açıklamaya çalışmaktan çok, hasta ve kontrol bantları arasındaki farkı tespit etmektir.

#### **III.4.6. BİLİNER MUTASYONLARIN ANALİZİ**

**Ekson 11'deki 4bç insersiyon mutasyonu:** Ekson 11'in PCR ile çoğaltılmış DNA örneğinden 10 $\mu$ l alınarak üzerine 1 $\mu$ l Hae II restriksiyon enzimi eklendi. 37°C'de 3 st inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 2 $\mu$ l loading tamponu (bkz. Ek 1.9.) eklenerek restriksiyon enzimi ile kesilmiş

ve kesilmemiş her örnekten heterodupleks analizi için 10µl %8 poliakrilamid jel elektroforezine (bkz. Ek 1.13.) uygulandı. 200V'da 1,5 st elektroforez yapıldı. Bromofenol blue jelin ucuna gelinceye kadar elektroforeze devam edildi. Ardından jel cam plaklar arasından çıkarılarak etidyum bromür solüsyonunda (bkz. Ek 1.10.) 30 dk bekletildi ve transilluminatör altında bantlar gözlenerek fotoğrafı çekildi ve değerlendirildi (38).

**Kpn I kesim bölgesi mutasyonu:** Ekson 11'in PCR ile çoğaltılmış DNA örneğinden 10µl alınarak üzerine 1µl Kpn I restriksiyon enzimi eklendi. 37°C'de 3 st inkübe edildi. Inkübasyonun ardından 2µl loading tamponu (bkz. Ek 1.9.) eklenerek her örnekten 10µl %2 agaroz jel elektroforezine uygulandı. Ekson 11'in çoğaltılmış dizisi 169 bp büyüklüğündedir. Normal DNA'da Kpn I enzimiyle bu dizi kesilince 113 ve 56 bp'lik iki parça oluşur. Ekson 11'de G1260→C mutasyonu sonucu normalde varolan Kpn I kesim bölgesi kaybolmaktadır (57).

#### **III.4.7. DNA DİZİ ANALİZİ (48)**

SSCP'de kontrole göre farklı hareket eden bantların görülmesi halinde bir sonraki basamak, farklı harekete neden olan 'baz' değişikliğini (nokta mutasyonunu) saptamaktır. Bunun için ilgili DNA kısmı, dizi analizine tabi tutulur.

Bu çalışmada, elektroforezde, kontrol DNA'ya göre farklı yürümüş olan bantların görüldüğü eksonlar için DNA dizi analizi, **Sanger dideoksi zincir sonlandırılması** metodu kullanılarak yapıldı (48). Bu yöntemin esası, defektli DNA bölgesine uygun bir oligonükleotid primer, <sup>35</sup>S-dATP, 'sequenase' enzimi ve ayrı ayrı adenin, sitozin, guanin ve

timin nükleotidlerin deoksi ve dideoksi türevlerini içeren tüplerde DNA sentezini sağlamaktır. Nükleotidlerin dideoksi türevleri, deoksi türevlerinin analogu olduğundan DNA sentezi, ilgili nükleotidde durur. Böylece DNA bölgesi, küçük küçük parçalar halinde sentezlenmiş olur. Bu DNA parçalarının denatüran jel elektroforezine uygulanması ile elde edilen bantlarının hareket sırasına göre karşılaştırılması ile 'baz' değişiklikleri saptanabilmektedir.

Çoğaltılmış DNA'dan 25 $\mu$ l alınıp, 5 $\mu$ l loading tamponu (bkz. Ek 1.9) eklenerek, %5 denatüran olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde (bkz. Ek 1.14.) yürütüldü. Elektroforeze, 200 V'da 1 x TBE tamponu kullanılarak 1,5 st devam edildi. Elektroforez sonunda jel, 10 mg/ml etidium bromür içeren 1 x TBE tamponu içinde 30 dk. bekletildi. Daha sonra jel, ultraviyole ışığı altında incelendi ve DNA bantlarına uyan kısımlar bistüri ile kesilerek 0,5 ml Tris-EDTA tamponu (bkz. Ek 1.5.) içine aktarıldı, 37°C'da bir gece karıştırıldı. Ertesi gün 5 dk. 14000 x g'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı ayrıldı (400  $\mu$ l); bir kez fenol-kloroform (1:1 v/v) ve bir kez de kloroform (400  $\mu$ l) ile ekstre edildi. Ekstrakt, üzerine 1/10 hacim 3M sodyum asetat ve 2 hacim %99,5 etanol eklendikten sonra -20°C'da bir gece bekletildi. Ertesi gün +4°C'da 10 dk. 14000 x g'de santrifüj edildi ve çökmüş olan DNA soğuk %70 etanol ile yıkandı, santrifüj edildi ve kurutuldu. Kurutulmuş DNA 25-50  $\mu$ l su veya Tris-EDTA tamponu içinde çözüldü. Saflaştırılmış DNA'nın miktarını görmek için DNA, agaroz gel elektroforezine tabi tutuldu ve yine etidyum bromür ile boyandı. Elektroforez ile saflaştırılmış çift sarmal DNA'nın yarısı, bir tüpe pipetlendi ve üzerine uygun oligonükleotid primerden 140 ng eklendi, kurutuldu ve çökelek 6  $\mu$ l 'annealing' tamponu (bkz. Ek 1.15.) içinde çözüldü. Karışım 3 dk

kaynatıldı ve hemen buz içinde soğutuldu. 'Baz' dizi analizine kadar buz içinde tutuldu.

Tepkimeye başlarken deney tüpüne 4  $\mu$ l reaksiyon karışımı (1  $\mu$ l 0,1 M DTT, 1  $\mu$ l  $^{35}\text{S}$ -dATP (10  $\mu$ Ci, 1000 Ci/mmol), 2  $\mu$ l 'sequencing kit'indeki tampon ile 8:1 (v/v) oranında sulandırılmış 'sequenase' enzimi) eklenerek toplam hacim 10  $\mu$ l'ye tamamlandı.

Diğer taraftan dört ayrı tüpe 2  $\mu$ l dideoksi karışımlar (bkz. Ek 1.16.) pipetlendi (G, A, T, C) 37°C'da önceden ısıtıldı. Bunların herbirinin üzerine yukarıda hazırlanmış olan 10  $\mu$ l'lik karışımdan 2,4  $\mu$ l eklendi. 37°C'de 5 dk. inkübe edildikten sonra her tüpe 2  $\mu$ l 'chasing mix' (bkz. Ek 1.17.) eklendi ve tekrar 5 dk. 37°C'da inkübe edildi. Bu süre sonunda yine her tüpe 4,5  $\mu$ l 'stop' çözeltisi (sequencing kit) eklenerek reaksiyon durduruldu.

Reaksiyon karışımlarından 2  $\mu$ l, %6'lık denatüran poliakrilamid jele (sequencing jel) (bkz. Ek 1.18.) uygulanarak elektroforez yapıldı. Elektroforez 50 W 40 mA'de 2,5 saat yürütüldükten sonra jel, %5 asetik asit, %5 metanol içeren çözeltide 15 dk. fikse edildi, 80°C'da 2 saat jel kurutucuda kurutuldu ve X-omat film üzerine tatbik edilerek bir gece otoradyografiye tabi tutuldu.

A,C,G,T inkübasyon tüplerine uyan bantların pozisyonu, filmin alt kısmından başlayarak sıra ile değerlendirildi.

## BÖLÜM IV

### BULGULAR

Bu çalışmada Hex A geninin eksonları, ekson-intron birleşimleri ve eksonların yakınındaki intronik bölgelerin dizilerini kullanarak Tay-Sachs hastalığına neden olan mutasyonları PCR-SSCP yöntemi ile taramaya çalıştık. DNA analizi için 14 ayrı ekson ve çevresindeki dizileri, birbirinden bağımsız 14 ayrı PCR reaksiyonuyla çoğalttık. Mutasyon taraması, PCR ardından çoğaltılmış DNA ların tek zincirli hale getirilip uygun koşullarda (%6 poliakrilamid jel, %10 gliserol) elektroforezde yürütülmesi esasına dayanan SSCP yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemle, serum Hex A aktivitesi tayini ve klinik bulgularıyla Tay-Sachs hastalığı tanısı almış 5 Tay-Sachs hastası ve bu hastalardan 2 tanesinin (S.O, E.Y) anne ve babasında Hex A geninin 14 eksonu nokta mutasyonları açısından incelendi; bu hastalarda şüpheli görülen 2 eksonun DNA dizi analizi yapıldı. Ashkenazi-Musevilerinde en sık görülen ekson 11'deki 4 bç'lik insersiyon mutasyonu açısından 2 hasta (S.O, E.Y) ve anne-babaları, Kpn I kesim bölgesinde değişikliğe neden olan nokta mutasyonu açısından 1 hasta (E.Y) ve anne-babası incelendi.

#### IV.1. HEX A AKTİVİTESİ BULGULARI:

Total Hex ve % Hex A aktivitesi 4 hastada (S.O, M.K, A.D, E.D) serumda, 1 hastada (E.Y) fibroblast hücre kültüründe çalışılmıştır.

Serum Total Hex ve % Hex A düzeyleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo II. Serum heksozaminidaz düzeyleri**

<b>Vaka</b>	<b>Total Hex aktivitesi (nmol/ml/saat)</b>	<b>Hex A aktivitesi (%)</b>
S.O.	672	0
M.K.	300	0
A.D.	576	0
E.D.	711	0
Kontrol	297,9-625,4*	36-62
E.Y.**	1007,22***	0

\*Kontrol grubunu 5-12 yaş arası çocuklar oluşturmaktadır. 0-1 yaş arasında total Hex'in 1000 nmol/ml/st üzerinde olduğu bildirilmiştir.

\*\*E. Y.'nin değerleri fibroblast hücre kültüründe çalışılarak elde edilmiştir.

\*\*\*E. Y.'nin total hex. aktivitesi nmol/mg. protein/st birimindedir.

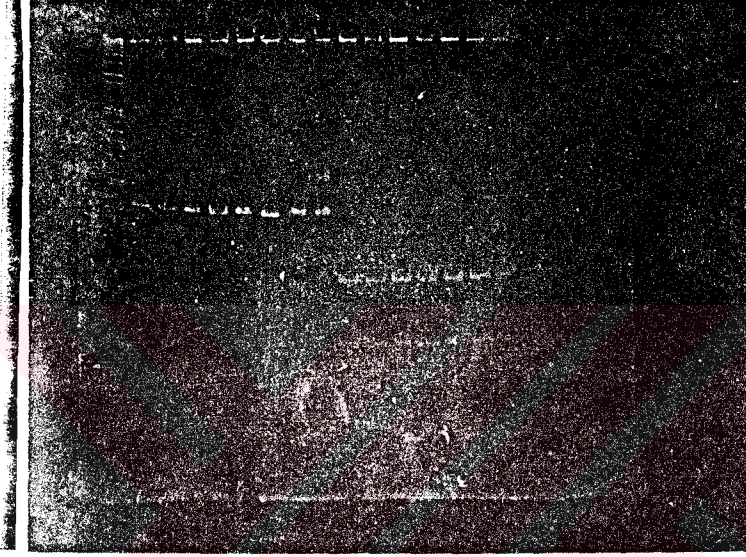


## IV.2. BİLİNER MUTASYONLARIN ANALİZ BULGULARI

İki hasta (S.O, E.Y) ve ailelerinin DNA örnekleri, Ashkenazi-Musevi toplumunda sık görülen ekson 11 4 bç insersiyon mutasyonu açısından heterodupleks analizi ile incelendi. Kpn I kesim bölgesinde değişikliğe neden olan nokta mutasyonu için de 1 hasta (E.Y) ve anne-babası restriksiyon enzim analizi ile incelendi.

Ekson 11 4 bç insersiyon mutasyonu için PCR ile çoğaltılmış ekson 11 DNA örneği Hae II restriksiyon enzimi ile kesilmeden ve kesildikten sonra %8 poliakrilamid jel elektroforezine uygulandı. Mutasyon varlığında normal ve mutant dizilerin oluşturacağı DNA, heterodupleks şeklinde olmaktadır. Bu heteroduplekslerin de poliakrilamid jel elektroforezinde yavaş hareket etmesi beklenir (Resim 1). Bu yöntemde PCR ile çoğaltılmış DNA örneğini restriksiyon enzimi ile kesmenin amacı, bantlar arasındaki büyüklük farkını ayırt edebileceğimiz yeteri kadar küçük parçalar elde etmektir. Hae II restriksiyon enzimi 5' PuGCGC/Py 3' dizisini tanımaktadır ve 276 bç büyüklüğündeki ekson 11'i 3 parçaya ayırmaktadır. S.O, E.Y ile anne ve babalarının, restriksiyon enzimi ile kesilmemiş örneklerinde heterodupleks oluşumu görülmemiştir (kolon 8'deki heterozigot örneklerle karşılaştırınız). Restriksiyon enzimi ile kesilmiş örneklerde de normal kontrol bantlarından farklı bantlar görülmemektedir. Bu nedenle, her iki hasta ve ailesi, ekson 11 4 bç insersiyon mutasyonu açısından normal olarak değerlendirilmiştir.

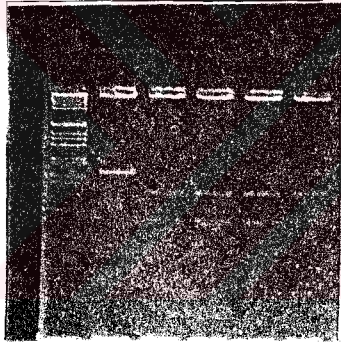
1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8



**Resim 1. Ekson 11 4 bç insersiyon mutasyonunun heterodupleks analizi ile incelenmesi.** İlk 8 kolonda, S.O annesi ve babası (kolon 1, 2, 3), E.Y annesi ve babası (4, 5, 6), normal kontrol (7) ve mutasyon açısından heterozigot kontrolün (kolon 8) ekson 11 PCR ürünleri, ikinci 8 kolonda örneklerin aynı sırayla Hae II restriksiyon enzimi kesimiyle elde edilmiş bantları görülmektedir. Restriksiyon enzimi ile kesilmemiş örneklerde 8. kolonda pozitif kontrolda heterodupleks oluşumu görülürken, hastalar ve anne babalarında tek bant görülmektedir. Restriksiyon enzim analiziyle de normal kontrolden farklı bir bant görülmemektedir. Elektroforez; %8 poliakrilamid jel kullanılarak, 200 V, 46 mA'de yapılmıştır. Örnekler etidyum bromür ile boyanmıştır.

Ekson 11'deki G1260→C değişikliği Kpn I restriksiyon enziminin tanıma bölgesini ortadan kaldırmaktadır. Kpn I enzimi 5' GGTAC/C 3' dizisini tanımaktadır. Mutasyon varlığında Kpn I'in tanıma bölgesindeki dizi GCTAC/C olmaktadır. Ekson 11'in PCR ile çoğaltılan dizisi 169 bç büyüklüğündedir. Normalde Kpn I enzimiyle bu dizi kesilince 113 ve 56 bç'lik iki parça oluşur. Ekson 11'de G1260→C mutasyonu sonucu Kpn I, ekson 11 dizisini parçalayamamaktadır. Resim 2'de PCR ile çoğaltılmış ekson 11 DNA örneklerinin (E.Y, anne ve babası) Kpn I enzimiyle kesilmiş olduğu görülmektedir. Bu nedenle bizim hastamızda Kpn I kesim bölgesi mutasyonunun olmadığı sonucuna varılmıştır.

1 2 3 4 5



**Resim 2. Ekson 11 Kpn I kesim bölgesinde değişikliğe neden olan mutasyonun restriksiyon enzim analizi ile incelenmesi.** Kpn I ile kesilmemiş normal kontrol ekson 11 PCR ürünü 1. kolonda, E.Y annesi ve babası ve normal kontrolün Kpn I ile kesilmiş DNA örnekleri sırasıyla 2, 3, 4 ve 5. kolonlarda görülmektedir. Örnekler Kpn I ile kesilebildiği için bu enzimin kesme bölgesinde değişikliğe neden olan bir mutasyonun hastamız ve ailesinde söz konusu olmadığı sonucuna varılmıştır. Elektroforez %2 Agaroz jelde 1xTBE tamponu kullanılarak yapıldıktan sonra örnekler etidyum bromür ile boyanmıştır. En soldaki numaralanmamış kolon çeşitli molekül ağırlığındaki DNA parçalarını göstermektedir.

### IV.3. SSCP ANALİZİ BULGULARI

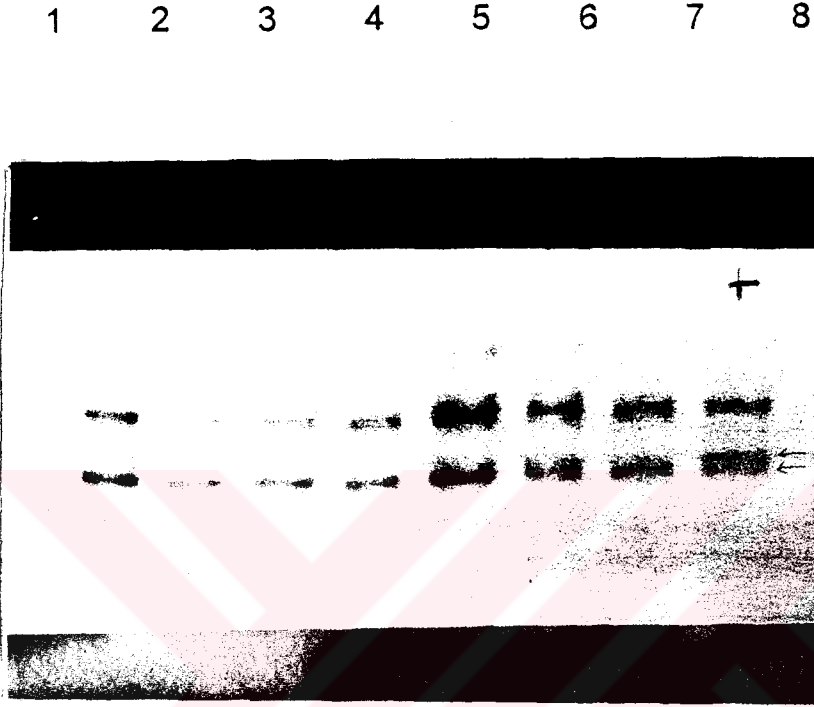
**Vaka S.O.-** 14 eksonun SSCP analizi ile incelenmesi sonucu otoradyografilerde ekson 5 dışında diğer eksonların verdiği bantlar, kontrol bantlarına uygunluk göstermiştir. Normal tek zincir konformasyonu gösteren eksonlar arasından seçilen ekson 6, 9 ve 11'in sonuçları, sırası ile, Resim 3, 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Bu vakanın annesine, babasına, kendisine ve normal kontrol ile ekson 5'te bir mutasyon açısından heterozigot olduğu bilinen kontrole (pozitif kontrol) ait ekson 5 SSCP analizi otoradyografi bulguları resim 6'da görülmektedir. Hastada okla gösterilen bandın kontrole göre daha yavaş hareket etmiş olduğu dikkati çekmektedir. pozitif kontrol vakasında da okla gösterilen bant iki çizgi halinde görülmektedir. Hastanın anne, babasında da aynı görünüm vardır. Böylece hastanın homozigot, anne ve babasının da heterozigot olduğu sonucuna varılmıştır.

1 2 3 4

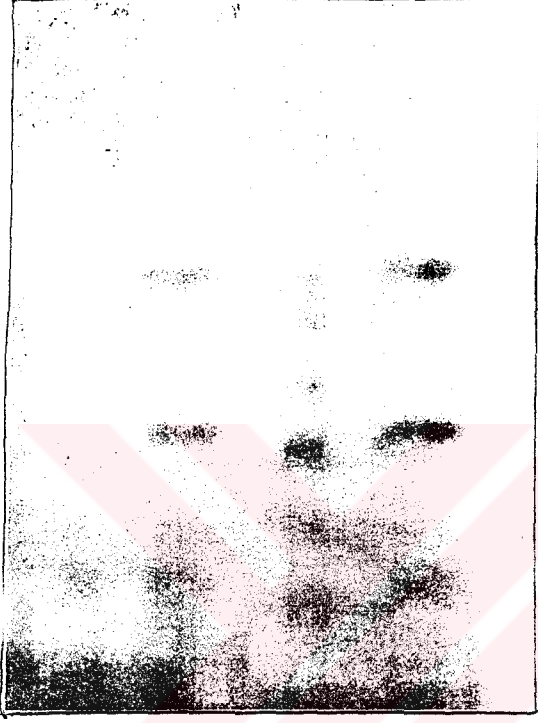


**Resim 3. Ekson 6 SSCP analizi otoradyografisi.** 1. kolonda denature edilmemiş normal kontrol ekson 6  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneği, 2, 3. ve 4. kolonlarda sırasıyla, S.O, E.Y ve normal kontrol örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hasta örnekleri, normal kontrollarla aynı tek zincir konformasyonuna sahiptirler. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

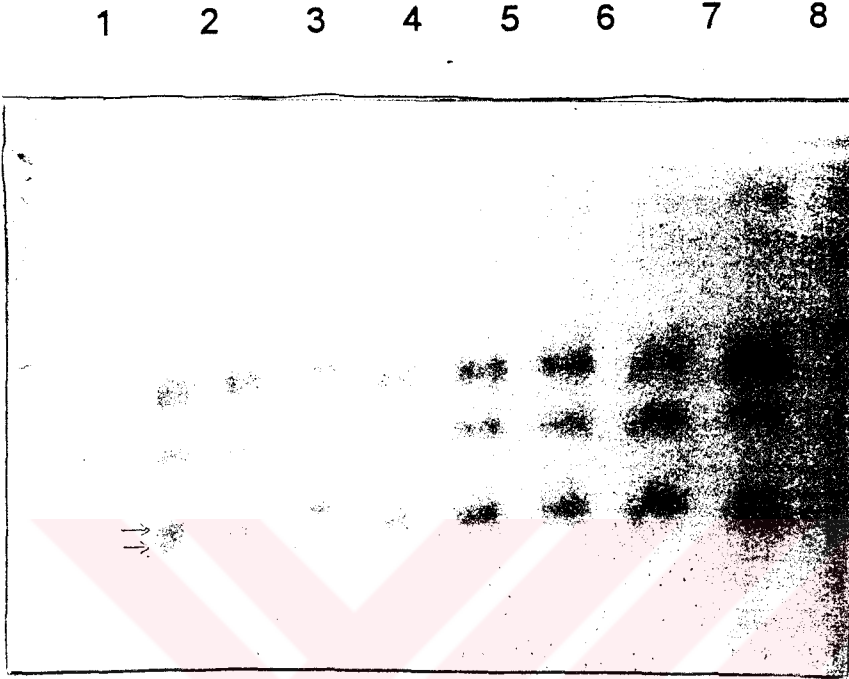


**Resim 4. Ekson 9 SSCP analizi otoradyografisi.** 1.kolonda S.O'nun annesi, 2. kolonda babası, 3. kolonda kendisinin, 4. kolonda E.Y, 5. kolonda annesi ve 6. kolonda babasının, 7. kolonda normal kontrolün, 8. kolonda ekson 9'da bir nokta mutasyonu açısından heterozigot hastanın ekson 9 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hastalar ve ailelerinde normal kontrolden farklı bant görülmezken, heterozigot kontrolda okla gösterilen yerde biri normal, diğeri de mutant zincire ait 2 bant görülmektedir. Elektroferez %5 poliakrilamid jel, 0,5xTBE tamponu ile 40 W, 2000V'da 3 st yapılmıştır.

1 2 3



**Resim 5. Ekson 11 SSCP analizi otoradyografisi.** S.O, E.Y ve normal kontrole ait  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları, sırasıyla, kolon 1, 2 ve 3'de görülmektedir. E.Y'nin normal kontrol DNA bantlarından farklı bir konformasyon gösterdiği dikkati çekmektedir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.



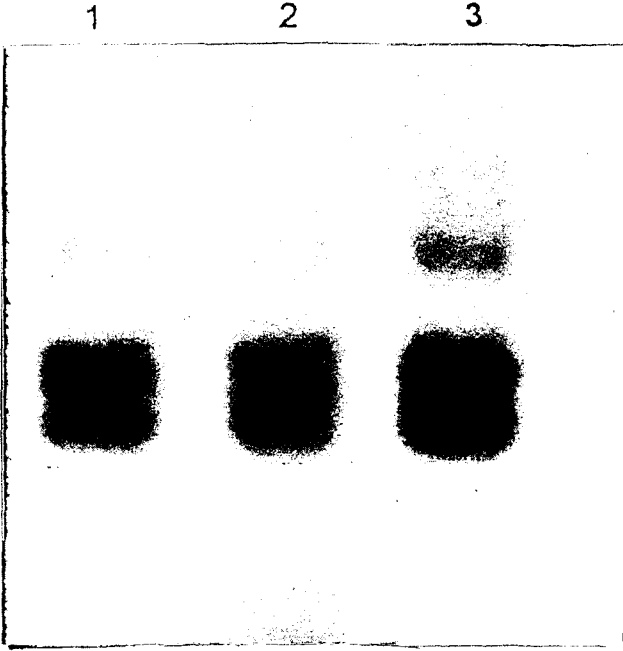
**Resim 6. Ekson 5 SSCP analizi otoradyografisi.** 1., 2. ve 3. kolonlarda sırasıyla S.O'nun annesi, babası ve kendisinin, 4., 5. ve 6. kolonlarda E.Y, annesi ve babasının, 7. kolonda normal kontrolün, 8. kolonda ise heterozigot kontrolün  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. E.Y ile anne ve babasının bantları normal kontrolle aynı iken S.O ve anne-babasının bantları farklı konformasyon göstermektedir. Anne ve babanın bantları heterozigot örneğin bantlarındaki gibi normal ve mutant zincirlere ait iki bant verirken (okla gösterilmiştir), S.O'nun bantları tek ve daha farklı bir konformasyondadır. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.



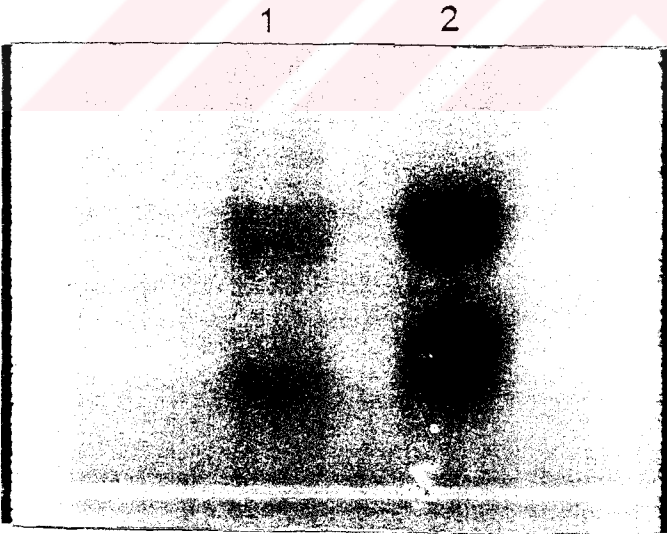
**Vaka E.Y.-** Bu vakanın SSCP analizi sonuçları, ekson 11 dışında diğer eksonların verdiği bantların, kontrol bantlarına uyduğunu göstermektedir. Normal tek zincir konformasyonu gösteren eksonlar arasından seçilen ekson 6 ve 9'a ait otoradyografiler sırası ile Resim 3 ve 4'de gösterilmektedir. Ekson 5 için aile çalışması bulguları ise Resim 6'da görülmektedir. Bu eksonların uygun primerlerle yapılan <sup>32</sup>P-PCR DNA ürünlerinin tek zincir konformasyonları normal kontrolden farklı gözükmemektedir.

Bu vakanın ekson 11 <sup>32</sup>P-PCR DNA ürününün poliakrilamid jel elektroforezindeki tek zincir konformasyonu, kontrol DNA'dan farklılık göstermektedir (Resim 5). Bu yüzden hastanın ekson 11'inde bir mutasyon olduğu düşünülmüştür.

**Vaka A.D.-** SSCP analizi sonucu normal kontrole göre farklı yürümüş bir bant görülmemiştir. Ekson 11, 14 ve 9'a ait otoradyografi sonuçları sırası ile, Resim 7 ,8 ,9'da görülmektedir.



**Resim 7. Ekson 11 SSCP analizi otoradyografisi.** A.D, E.D ve normal kontrola ait  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları, sırasıyla, kolon 1, 2 ve 3'te görülmektedir. Bantlar normal kontrollerle aynı patterni göstermektedir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.



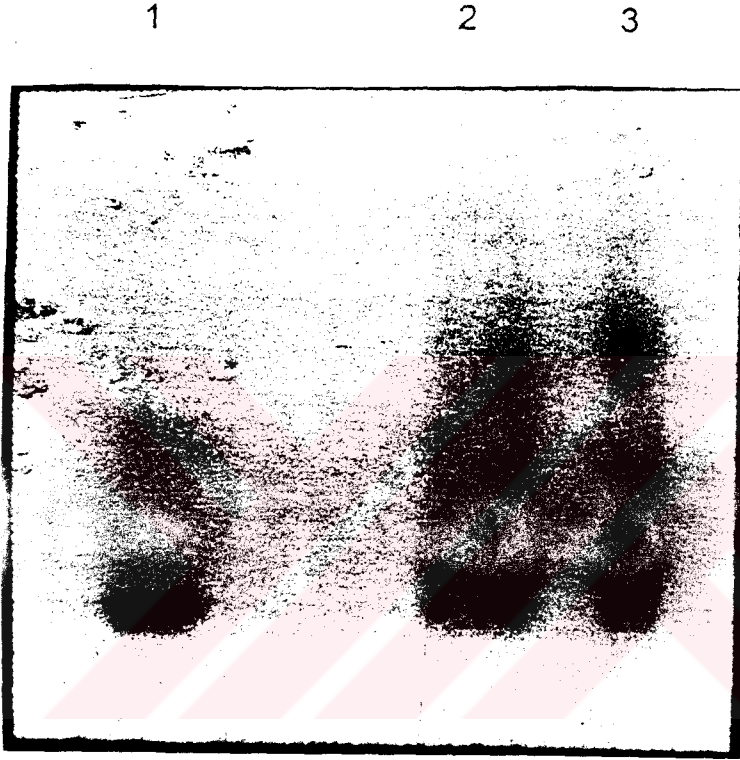
**Resim 8. Ekson 14 SSCP analizi otoradyografisi.** A.D ve normal kontrola ait  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları, sırasıyla, kolon 1 ve 2'de görülmektedir. Normal kontrollerle karşılaştırıldığında A.D'nin bantları farklılık göstermemektedir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.



**Resim 9. Ekson 9 SSCP analizi otoradyografisi.**

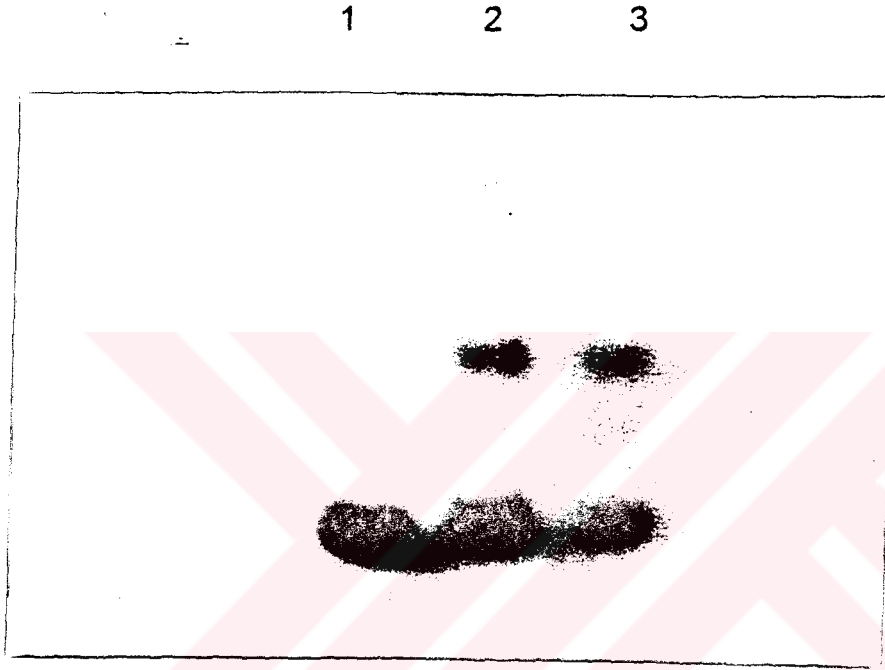
A.D, E.D ve kontrola ait  $^{32}\text{P}$ -PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları, sırasıyla, kolon 1, 2, 3 'de görülmektedir. Bantlar normal kontrollerle aynı patterni göstermektedir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

Vaka E.D- Bu vakaya ait normal eksonlardan ekson 11 ve 9'a ait otoradyografi bulguları sırası ile Resim 7 ve 9'da görülmektedir. Ekson 5'te normal kontrolden farklı yürümüş bir bant görülmüştür (Resim 10 ).

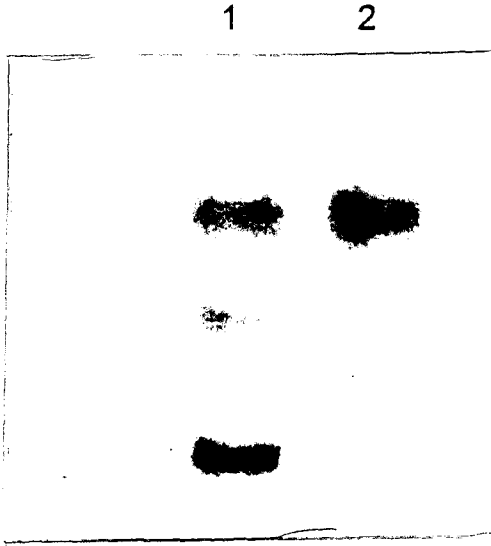


**Resim 10. Ekson 5 SSCP analizi otoradyografisi.** 1. kolonda denature edilmemiş normal kontrol ekson 5 DNA örneği, 2. ve 3. kolonlarda sırasıyla, normal kontrol ve E.D'ye ait ekson 5 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Normal kontrol DNA bantları ile karşılaştırıldığı zaman hasta bantlarından birinin farklı yürüdüğü görülmektedir. Bu hastada ekson 5'te DNA tek zincir konformasyonunu etkileyecek bir 'baz' değişikliği olduğu düşünülmüştür. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

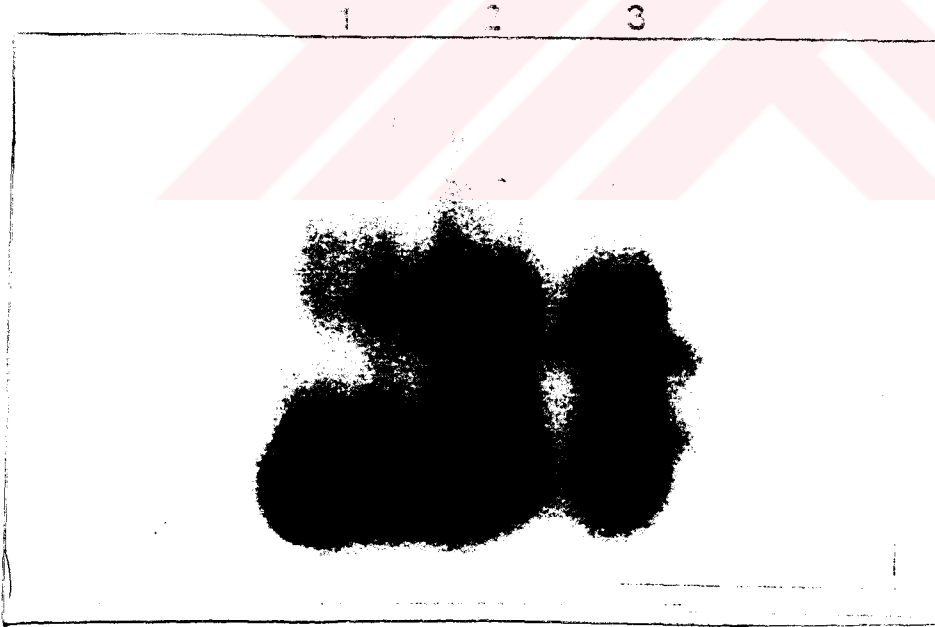
Vaka M.K.- SSCP analizi sonucu otoradyografide normal kontrole göre farklı bant saptanamamıştır. Ekson 5, 8, 9 ve 11'e ait sonuçlar, sırasıyla, Resim 11, 12, 13 ve 14'te gösterilmektedir.



**Resim 11. Ekson 5 SSCP analizi otoradyografisi.** 1. kolonda denature edilmemiş normal kontrol ekson 5 DNA örneği, 2. ve 3. kolonlarda sırasıyla, normal kontrol ve M.K'ya ait ekson 5 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hasta bantları normal kontrol bantlarından farklı değildir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

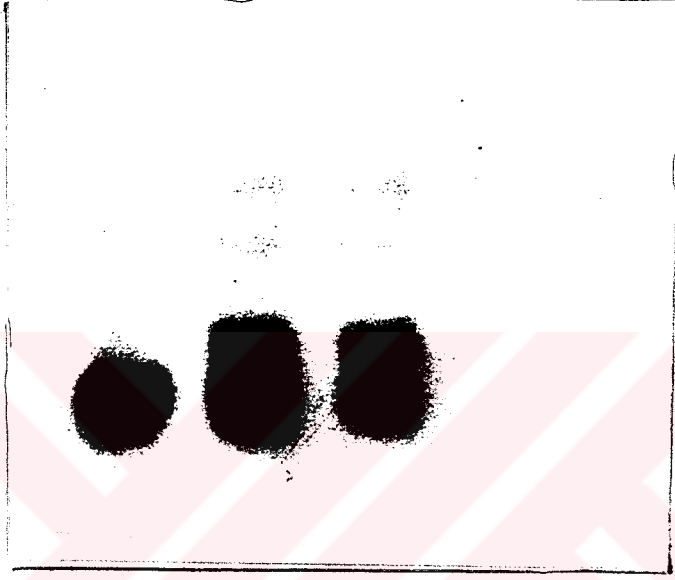


**Resim 12. Ekson 8 SSCP analizi otoradyografisi.** 1.kolonda normal kontrole, 2. kolonda da M.K'ya ait ekson 8 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hasta bantları kontrolden farklı değildir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.



**Resim 13. Ekson 9 SSCP analizi otoradyografisi.** 1. kolonda denature edilmemiş normal kontrol ekson 9 DNA örneği, 2. ve 3. kolonlarda sırasıyla, normal kontrol ve M.K'ya ait ekson 9 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hasta bantları normal kontrol bantlarından farklı değildir. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

1 2 3



**Resim 14. Ekson 11 SSCP analizi otoradyografisi.** 1. kolonda denature edilmemiş normal kontrol ekson 11 DNA örneği, 2. ve 3. kolonlarda sırasıyla, normal kontrol ve M.K'ya ait ekson 11 <sup>32</sup>P-PCR DNA örneklerinin tek zincir konformasyonları görülmektedir. Hasta bantları normal kontrol bantları ile aynı konformasyondadır. Elektroforez %6 poliakrilamid %10 gliserol içeren jelde (0,4mmx31cmx38,5cm), 1xTBE tamponu kullanılarak 200 V, 12 mA'de 18 st yapılmıştır.

#### IV.4. DNA DİZİ ANALİZİ BULGULARI

**Vaka S. O.** - SSCP analizi sonucu elde edilen otoradyografide ekson 5'te normal kontrol DNA bantlarından farklı yürümüş bantlar görülmesi sonucu ekson 5'in DNA dizi analizi Sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemi ile yapılmıştır. Dizi analizi sonucu IVS 5+1'e uyan donor kesim bölgesinde G→A değişikliği belirlenmiştir (Resim 15). Vakamızda normal DNA dizisindeki Guanin bandı yerine tek Adenin bandı görülmektedir. Bu yüzden hasta homozigot olarak değerlendirilmiştir. Yani, her iki allelindedeki Guanin 'baz'ı yerine Adenin 'baz'ı taşımaktadır. Oysa, anne ve babasında, Guanin bandının görülmesi gereken yerde, hem Adenin, hem de Guanin bandı vardır (Resim 16). Yani anne ve baba bir allellerinde doğru 'baz' Guanini, diğer allellerinde ise mutant 'baz' Adenini taşımaktadırlar. Dolayısıyla heterozigot olarak değerlendirilmişlerdir. Bu mutasyon literatürde ilk kez bu vaka ile tanımlanmıştır (60).

**Vaka E. Y.** - SSCP analizi sonucunda ekson 11'de farklı yürümüş bantların varlığı bu eksonun DNA dizi analizinin yapılmasını gerektirmiştir. DNA dizi analizi sonucu 5'-1177'inci 'baz' Sitozin'in diğer zincirdeki karşıtı olan Guanin 'baz'ı yerinde hem Guanin, hem de Adenin 'baz'ının bulunduğu görülmektedir. Yani vakamız bu mutasyon yönünden heterozigottur. Mutasyon Resim 17'de nokta ile gösterilmiştir. Vakamızın annesi de bu mutasyon yönünden heterozigot (Resim 18), babası normaldir (Resim 19). Bu mutasyon S. Akli ve ark. tarafından tanımlanmıştır ve 'dur' kodonu oluşturmaktadır (47).

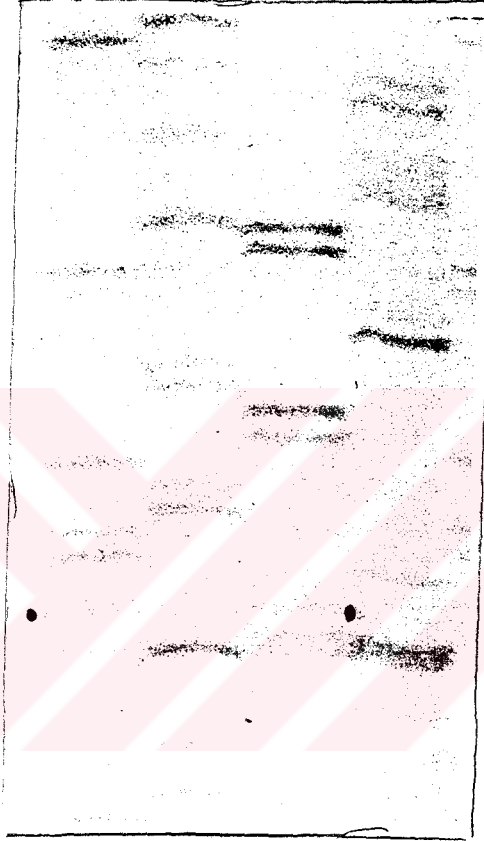


A C G T

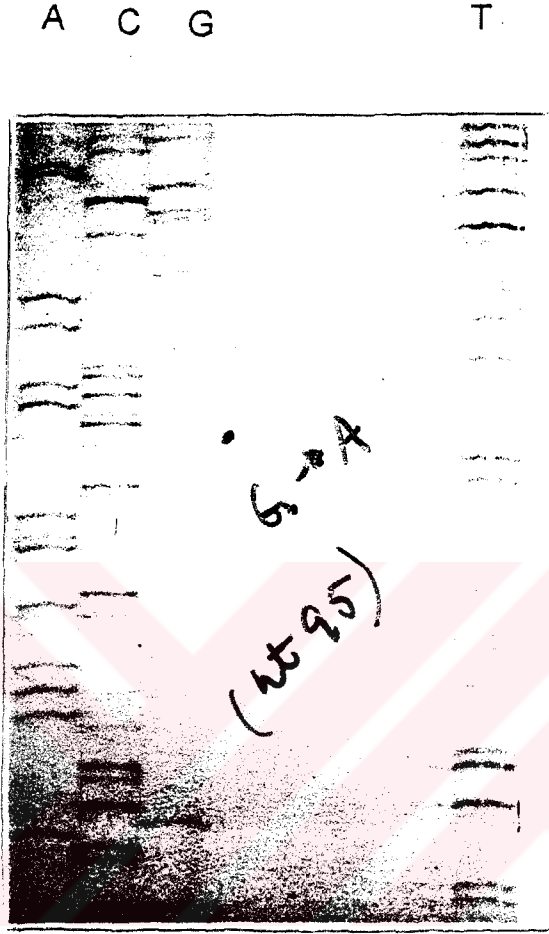


**Resim 15. Ekson 5 DNA dizi analizi (S.O). A-Adenin, C-Sitozin, G-Guanin, T-Timin 'baz'larını göstermektedir. Nokta ile gösterilen bölgede normal dizide olması gereken Guanin 'baz'ı yerine Adenin 'baz'ının geçtiği görülmektedir. Hasta bu mutasyon açısından homozigottur. Elektroforez %6 denatüran poliakrilamid jelde, 50 W, 40 mA'de 2,5 st'te yapıldı.**

A C G T

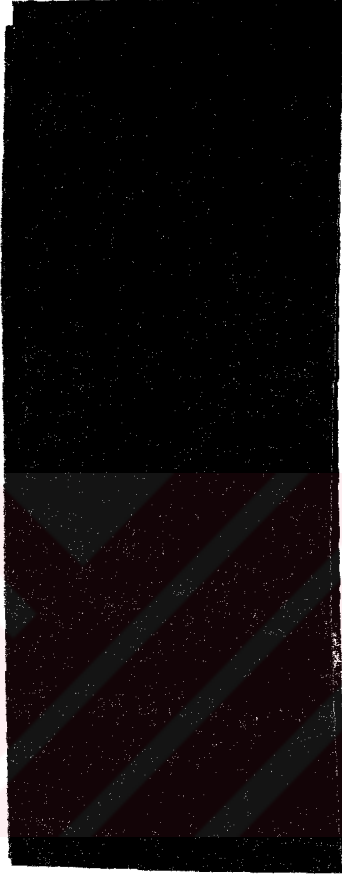


**Resim 16. Ekson 5 DNA dizi analizi (S.O'nun annesi). A-Adenin, C-Sitozin, G-Guanin, T-Timin 'baz'larını göstermektedir. Nokta ile gösterilen bölgede normal dizide olması gereken tek Guanin bandı yerinde hem Guanin hem de Adenin bandının olduğu görülmektedir. Hastanın annesi bu mutasyon açısından heterozigottur. Elektroforez %6 denatüran poliakrilamid jelde, 50 W, 40 mA'de 2,5 st'te yapıldı.**



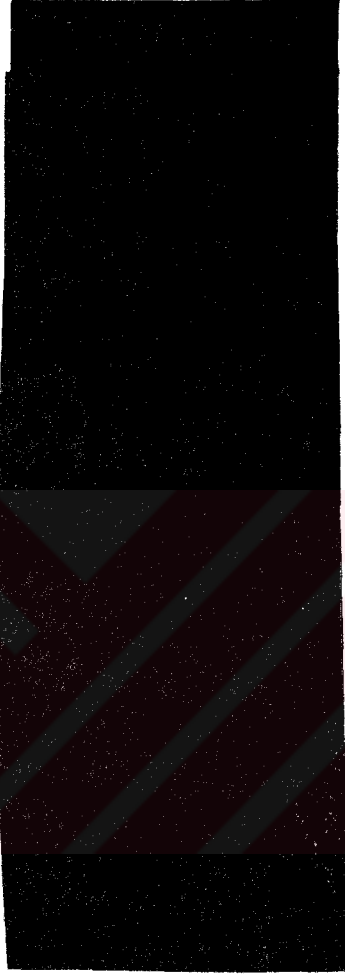
**Resim 17. Ekson 11 DNA dizi analizi (E.Y).** A-Adenin, C-Sitozin, G-Guanin, T-Timin 'baz'larını göstermektedir. Otoradyografide nokta ile gösterilen bölgede hem Guanin hem Adenin bandı vardır. Normal dizide bu bölgede tek Guanin bandı beklenmektedir. Hasta bu mutasyon açısından heterozigottur. Elektroforez %6 denaturan poliakrilamid jelde, 50 W, 40 mA'de 2,5 st'te yapıldı.

A C G T



**Resim 18. Ekson 11 DNA dizi analizi (E.Y'nin annesi).** A-Adenin, C-Sitozin, G-Guanin, T-Timin 'baz'larını göstermektedir. Otoradyografide nokta ile gösterilen bölgede hem Guanin hem Adenin bandı vardır. Normal dizide bu bölgede tek Guanin bandı beklenmektedir. Anne bu mutasyon açısından heterozigottur. Elektroforez %6 denatüran poliakrilamid jelde, 50 W, 40 mA'de 2,5 st'te yapıldı.

A C G T



**Resim 19. Ekson 11 DNA dizi analizi (E.Y'nin babası).** A-Adenin, C-Sitozin, G-Guanin, T-Timin 'baz'larını göstermektedir. Otoradyografide nokta ile gösterilen bölgede normal dizide olması gereken tek Guanin bandı vardır. Babanın ekson 11 DNA dizi analizi sonucu normaldir. Elektroferez %6 denatüran poliakrilamid jelde, 50 W, 40 mA'de 2,5 st'te yapıldı.

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA

Tay-Sachs hastalığı, Ashkenazi Musevi toplumunda sık görülen bir gangliozid depo hastalığıdır. Fakat, son yıllarda İtalyanlar, Fransızlar, İngilizler, Japonlar ve Tunuslular gibi Musevi olmayan etnik gruplarda da tanımlanmıştır. Üçüncü derece ve daha yakın akraba evliliklerinin yaklaşık %21 (4) olduğu ülkemizde, kalıtsal metabolik hastalıkların sık görülmesi beklenmektedir. Tay-Sachs hastalığının taşıyıcı sıklığını saptamak için ülkemizde şu ana kadar bir toplum taraması yapılmamıştır. Ancak 1988 yılında Anabilim Dalımızda başlatmış olduğumuz serum ve lökosit Hex A aktivitesi tayini ile nörodejeneratif hasta grubu içinde 350 vakadan 16 tanesinde Tay-Sachs hastalığı bulunmuştur. Bu 16 hastadan SSCP ve DNA dizi analizi yapılan iki tanesinde iki farklı mutasyonun bulunması Türk toplumunda Tay-Sachs hastalığı yönünden bir mutasyon çeşitliliği olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada tanımladığımız iki mutasyondan biri, Tay-Sachs hastalığından sorumlu literatürde tanımlanmış 40'dan fazla mutasyona eklenmiştir. Bu, intron 5 +1 donör kesim bölgesi mutasyonudur (Resim 16). +1 bölgesi, donör kesim bölgesinin değişmez iki 'baz'ından birini göstermektedir (58). Literatürde bugüne kadar Hex A geninin intron 2, 6, 7, 9 ve 12'sinde +1 donör kesim bölgesi mutasyonları tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar için yapılmış mRNA çalışmasında, mRNA'da kriptik bir bölgenin olduğu, bunun da ekson kaybı veya mRNA'nın tam kaybına neden olduğu gösterilmiştir (59). Bizim hastamızda da ekson/intron kesim bölgesinin aynı pozisyonunda bulunan bu mutasyonun, mRNA'da benzer değişikliklere neden olarak, hastada Tay-Sachs hastalığının

klirik ve enzimolojik bulgularını ortaya çıkardığı sonucuna varılabilir. SSCP analizi uyguladığımız diğer 4 hastanın ekson 5 otoradyografilerinde bu hastanın DNA bantlarına benzer tek zincir konformasyonuna rastlamamamız ve bu mutasyonun bugüne kadar başka hiçbir toplulukta da gösterilememiş olması bunun tek bir aile mutasyonu olabileceğini dşndrebilir.

İkinci bulduğumuz mutasyon, ekson 11'de C1177→ T değişimidir. Bu mutasyon Fransız kökenli bir hastada daha önce tanımlanmıştır; Arg<sup>393</sup> kodonunu (CGA), 'dur' kodonuna (TGA) evirmektedir. Bu mutasyon sonucu mRNA düzeyinin çok azaldığı, %1'in altına düştüğü gösterilmiştir (47). Bizim vakamız (Resim 17) ve annesi (Resim 18) bu mutasyon açısından heterozigottur; babasının ekson 11 DNA dizi analizi normal bulunmuştur (Resim 19). Bu mutasyonla birlikte hastada infantil Tay-Sachs hastalığı klinik ve laboratuvar bulgularına neden olan ikinci bir mutasyonun olabileceği (compound heterozygote) düşünülmüştür. Literatürde Tay-Sachs hastalığı için bu tür vakalar, ilk kez hastalığın B1 varyantında tanımlanmıştır; 7 hastadan 6'sının 'compound heterozigot' olduğu dşnlmş ve sadece birinde her iki mutasyon da gösterilebilmiştir (61, 62). Daha sonra infantil Tay-Sachs hastaları için de 'compound heterozigot'lar tanımlanmıştır. Ekson 5'te bir allelinde nokta mutasyonu (G509→A; Arg170→Glu) olan infantil Tay-Sachs'lı bir vakanın 'compound heterozigot' olabileceği bildirilmiştir. -heksozaminidaz genindeki diğer mutasyon tanımlanamamıştır (63). Yine Amerikalı zenci bir ailede de bir allelde intron 4/ekson 5 kesim bölgesinde infantil Tay-Sachs hastalığına neden olan G→T transversiyonu tanımlanmış, hastanın bu mutasyon için 'compound heterozigot' olduğu dşnlmş, diğer alleldeki mutasyon tanımlanamamıştır. Bu mutasyon için hastanın annesi ve erkek kardeşi

heterozigotken, babası ve kızkardeşi normal bulunmuştur (64). DNA düzeyinde 'compound heterozigot'lunun beklenen bir durum olduğu söylenmektedir. Normal olmayan allellerden iki tanesinin biraraya gelmesi klinik olarak hastada semptomları ortaya çıkarmaktadır. Bu tür durumlar Tay-Sachs hastalığında mutasyon saptamanın her zaman çok kolay olmadığını göstermekte, analizi yapan laboratuvarın bu alanda bilinen tüm teknolojilere sahip olsa bile yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Yeni bir mutasyonu saptamak bazen çok kısa sürede olabilmekte, bazen de yıllar gerektirmektedir.

SSCP analizi ile ekson 5'te normal kontrol DNA bantlarından farklı yürümüş bant görülen vakamızın (E.D, Resim 10) bu eksonda bir mutasyonu olduğu düşünülmüştür. Ekson 5'in DNA dizi analizinin yapılması ile hastada farklı tek zincir konformasyonuna neden olan mutasyonun belirlenmesi gerekmektedir. SSCP analizi ile hiçbir şüpheli eksonu saptanamayan diğer hastaların ise, hastalığa neden olan mutasyonlarının bulunabilmesi için diğer analiz yöntemleri ile değerlendirilmeleri gerekmektedir. Aşağıdaki bilgilerde sunulduğu gibi, SSCP analizi ile hastalığa etken mutasyonu %100 saptamak mümkün olamamakta, yöntemin duyarlılığını pekçok parametre etkilemektedir.

Bu çalışmada mutasyonları saptamak için kullanılan SSCP analizi, bir mutasyon tarama yöntemidir. Gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacıyla genin taranmasında en sık kullanılan metotlardan biridir ve direk dizi analizine çok güçlü bir alternatiftir. Bu teknikte, PCR ürünleri denatüre edilir ve "denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezine" uygulanır. Bu durumda, tek zincirli DNA'lar, zincir içi nükleotid çiftleşmeleri yoluyla stabil yapılar oluştururlar. Teorik olarak dizideki herhangi bir 'baz'



değişikliği, elektroforezde DNA bantlarının hareketinde bir kaymaya neden olur.

SSCP analizinin dezavantajları, radyoaktif madde gerektirmesi ve elektroforez için büyük jele ihtiyaç duyulmasıdır. Son 3 yıl içinde bu metodu radyoaktif madde kullanmadan yapabilmek için değişik DNA boyama yöntemleri ( etidyum bromür, gümüş boyama ) ile çalışmalar yapılmıştır (65-71). Ancak zincir içi radyoaktif sinyaller, çok küçük miktardaki DNA tek iplikçliğini göstermede, diğer boyama yöntemlerinden daha iyi sonuç vermektedir. Çok küçük miktarlardaki DNA örneklerinde zincir içi radyoaktif sinyaller güçlü olmasına rağmen, örnekleri SSCP analizi için elektroforeze uygulamadan önce mutlaka PCR ürününün saflığı yanısıra, çoğaltılmış DNA miktarını görmek amacıyla da agaroz jel elektroforezinin yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde silik görülen DNA bantları SSCP jelinde görülememektedir. Bu yüzden PCR'da beklenenden az çoğalmış eksonların örnekleri SSCP jeline daha fazla miktarda (1/10 dilüsyon yerine 1/5 dilüsyonda) uygulanmış ve ancak bu durumda radyoaktif sinyaller otoradyografide gözlenebilmiştir. Ancak jele uygulanan DNA konsantrasyonunun artması bantların rezolüsyonunu bozmaktadır (Resim 13).

SSCP analizi sonucu otoradyografide, normal kontrolün tek zincirli DNA'sı 2 bant halinde görülmelidir. Ancak zincir içi değişik bağlanmalar sonucu aynı zincirin farklı sekonder yapılar oluşturması ile "metastable conformers" denilen ek bantlar da görülebilir (46). Bu yüzden sağlıklı bir değerlendirme için normal kontrol SSCP bantları ile hasta örneğinin bantlarını karşılaştırmak gerekmektedir.

SSCP analizi, pekçok DNA dizisinde mutasyonları ve polimorfizmleri tanımlamak için büyük başarıyla kullanılmaktadır. Mutasyon saptamada SSCP'nin duyarlılığının yüksek olduğu rapor edilmiştir (72). Tay-Sachs hastalığında da SSCP analizi, mutasyon saptamada kullanılan diğer yöntemlerden (ör; heterodupleks analizi) daha duyarlı bir yöntemdir (37). Bununla beraber bazı değişiklikler SSCP analiziyle saptanamamaktadır. Çünkü, SSCP analizini elektroforez sırasındaki sıcaklık, elektroforez tamponunun konsantrasyonu ve jeldeki gliserol konsantrasyonu etkilemektedir. 17°C'nin altı ve 23°C'nin üstündeki sıcaklıklar DNA tek ipliğinin yarı stabil şekillerini bozabilmektedir (46, 73).

Analizi yapılacak olan DNA dizisinin büyüklüğü de SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Dizinin boyu küçüldükçe mutant dizilerin görülme şansı artmaktadır. 183 bç'lik bir parçada tek 'baz' değişikliklerinin %83'ü ve 307 bç'lik bir parçada %58'i saptanabilmiştir. Faktör 9 geninin 180-497 bç arasında değişen 9 parçasında yapılan taramada mutasyonların sadece %35'i gösterilebilmiştir (74).

Bir başka çalışmada (75), SSCP analizi, 29 ayrı fare globin geni promotor mutasyonlarını analiz etmek için kullanılmıştır. Amplifikasyon için değişik primerler kullanılarak farklı büyüklükte PCR ürünleri elde edilmiştir. 200 bç ve altındaki büyüklüklerde tek 'baz' değişiklikleri daha yüksek duyarlılıkla saptanabilmiştir. Örneğin, 212 bç'lik 2 globin geni parçasında tek 'baz' değişikliği yaklaşık %70 oranında bulunurken, 600 bç'lik bir parçada 29 mutasyondan sadece 1'i saptanabilmiştir. 155 bç'lik parçalarda da %97 ve %96 oranlarında tek 'baz' değişikliği gösterilmiştir. Bu oran 95-135 bç'lik parçalardakinden daha iyidir. SSCP'nin duyarlı olduğu DNA büyüklüğünün bir üst sınırı olduğu gibi bir de alt sınırı

olduğu düşünölmektedir. Alt sınır büyüklüğü tam olarak belirlenmemiştir. Fakat 95-115 bç'lik parçalarda iyi sonuçlar alınmıştır. 212 bç ve altındaki tüm parçalar için ortalama mutasyon saptama oranı %79'dur. Çok küçük parçalarda SSCP analizinin duyarlılığı, sekonder yapı oluşturmalarındaki güçlükler nedeniyle düşmektedir. Bir diğer çalışmada ise, 300-450 bç büyüklüğündeki parçalarda mutasyon saptamada duyarlılığın %67, 100-300 bç'lik parçalarda %89 olduğu belirtilmiştir (76). Çalışılan tüm mutasyonlar tek 'baz' değişiklikleridir. Hex A geninin 14 eksonunun PCR sonucu elde ettiğimiz DNA ürünlerinde beklenen 'baz' dizi büyüklükleri ekson 1 dışında 174-276 bç arasında değişmektedir (bkz. Ek 2). 502 bç büyüklüğündeki ekson 1'i iyi analiz edebilmek için Apa I restriksiyon enzimi ile kesmek gerekmiştir. Ekson 1 Apa I enzimiyle kesilince 335 ve 157 bç'lik iki parçaya ayrılmakta ve SSCP jelinde mutasyonu saptamak açısından duyarlılığı artırmaktadır.

SSCP'nin duyarlılığının aynı DNA parçasını değişik jel kompozisyonlarında çalışmakla arttığı gösterilmiştir (73). Bizim çalışmamızda da ekson 9'da standart SSCP koşullarında görölemediği bilinen bir nokta mutasyonu için değişik tampon konsantrasyonu (0,5 x TBE), jel kompozisyonu (%5 poliakrilamid) kullanılmış, elektroforez süresi de (2000 V'da 2 saat) değiştirilerek SSCP analizi uygulanmıştır (Resim 4).

Analizi yapılan DNA parçasının hangi bölgesinde mutasyon olduğu, 'baz' değişikliğinin özelliği (transizyon veya transversiyon) ve DNA parçasının 'baz' içeriği de SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Bu faktörlerin herbirinin DNA molekülünde sekonder yapıyı etkilemesi beklenmektedir. SSCP'nin duyarlılığı transversiyon veya transizyonlar için farklı bulunmamıştır. İki de benzer sıklıkta

saptanabilmektedir (sırasıyla %76 ve % 81). Yalnız G→T transversiyonları, tamamlayıcı dizideki C→A transversiyonlarından daha düşük sıklıkta (sırasıyla %57, %82) saptanabilmektedir (75).

Eksonların yan bölgelerindeki değişik nokta mutasyonlarını saptamak için yapılan çalışmada mutasyonlar değişik oranlarda duyarlılık ile tayin edilmiştir. Eğer mutasyon içeren yan bölge sekonder yapıya katılıyorsa, mutasyon bu bölgeyi bozmuş olacağından SSCP ile saptanması kolaylaşmaktadır. Eğer mutant bölgenin sekonder yapıyı oluşturmada rolü yoksa mutasyon saptanamayabilir. Ayrıca, pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Buna bağlı olarak da DNA'nın bazen esas, bazen de tamamlayıcı zinciri, mutasyonu diğerinden daha iyi göstermektedir (75). Bu hipotezlerin doğruluğu daha fazla çalışma ile desteklenmelidir.

Klasik biyokimya ve moleküler biyolojinin yeni teknikleri ile genetik analizler, daha ayrıntılı olarak Hex'ın biosentezi, işlenişi ve yapısını tanımlamaya, enzimin yokluğu veya kısmi eksikliğine neden olan mutasyonların nörodejeneratif hastalığa nasıl neden olduğunu anlamamıza yardımcı olmaktadır.

Bu yöntemlerden biri olan SSCP analizi, bizim çalışmamızda Tay-Sachs hastalığına neden olan iki mutasyonu saptamamıza yardımcı olmuştur. Tay-Sachs hastalığına neden olan tanımlanmış mutasyonların gelecekte gen tedavisi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Son 1 yıl içinde literatürde SSCP analizinin duyarlılığını artırmaya yönelik yukarda da anlatılmış olan çeşitli öneriler bulunmaktadır. Bizim açımızdan en önemli problem SSCP'nin radyoaktif madde gerektirmesi, dolayısı ile pahalı bir yöntem olması ve mutasyonu saptamada yetersiz kaldığı durumlarda

diğer yöntemleri kullanabilme şansımızın henüz olmamasıdır. Bu çalışma ile toplumumuzda nörodejeneratif hasta grubu içinde beklenenden daha sık görülen Tay-Sachs hastalığının DNA düzeyinde incelenmesi için ilk adım atılmış ve Anabilim Dalımızda bu teknolojiyi kullanabileceğimiz bir laboratuvar kurulmuştur; elde ettiğimiz sonuçlar, ülkemizde Tay-Sachs hastalığına neden olan mutasyonlar açısından bir çeşitlilik olabileceğini düşündürmektedir. Tüm çabalar glikosfingolipit metabolizmasındaki bir bozukluk sonucu ortaya çıkan ve yaşamın ilk 3 yılında ölümlerle sonuçlanan bu hastalığa, gen tedavisi uygulanıncaya kadar, toplumumuzda hastalıktan sorumlu mutasyonları belirlemek ve aynı zamanda ilgili ailelerde doğum öncesi tanı ve genetik danışmanlık amacıyla kullanabilmek içindir.

## ÖZET

İnfantil Tay-Sachs hastalığı, Heksozaminidaz A (Hex A) genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Bu mutasyonlar Hex A aktivitesinin tam kaybına yol açar. Bugüne kadar Hex A geninde 40'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bazı mutasyonlar, Ashkenazi-Musevileri ya da Fransız-Kanadalılar gibi belirli topluluklarda yüksek sıklıkta bulunurken, bazıları da farklı toplumlarda görülmektedir.

Bu çalışmada, infantil Tay-Sachs hastalığının tipik klinik ve enzimolojik bulguları bulunan 5 bebek ve 2 anne-baba Hex A geni yönünden incelendi. Hex A geninin 14 adet eksonu ve yan dizileri radyoaktif PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltıldıktan sonra "single stranded conformational polymorphism (SSCP)" yöntemi ile incelendi. Tek zincir konformasyon değişikliklerini görmek için denatüran ajan kullanılmayan poliakrilamid jel elektroforezinin ardından otoradyografi yapıldı. Otoradyografi sonucu iki hastada ekson 5'te, bir hastada da ekson 11'de farklı bir görüntü elde edilmesi üzerine bu iki eksonun "Sanger dideoksi zincir sonlanması" yöntemi ile DNA dizi analizi yapıldı. Ekson 5'te farklı bir görüntü elde edilen üçüncü hastanın DNA dizi analizi yapılamadı. DNA dizi analizi yapılan hastalardan birinde intron 5 donör kesim bölgesinde yeni bir nokta mutasyonu (IVS 5+1 G→A) saptandı. Hasta bu mutasyon yönünden homozigot bulundu. Birinci dereceden akraba olan anne ve babada yapılan aynı çalışmalar, bu mutasyon yönünden anne ve babanın heterozigot olduğunu gösterdi. Bu mutasyon literatürde ilk defa tanımlanmış oldu. Diğer hastada ekson 11'de C1177→T değişimi sonucu, Arg<sup>393</sup> kodonunun (CGA), dur kodonu olan TGA'ya dönüştüğü görüldü. Hasta bu mutasyon açısından heterozigot bulundu. Bu mutasyon daha önce literatürde tanımlanmıştır.

Amacımız toplumumuzda Tay-Sachs hastalığının DNA düzeyinde incelenmesi için bir başlangıç yapmaktır. Elde edilen sonuçlar Türkiye'de Tay-Sachs hastalığına neden olan mutasyonların çeşitli olabileceğini göstermektedir.



## SUMMARY

Infantile Tay-Sachs disease is caused by mutations in the Hexosaminidase A (Hex A) gene. These mutations result in the complete absence of Hex A activity. More than 40 distinct mutations have been identified so far concerning the Hex A gene. Some mutations are found in high frequency in specific population groups such as Ashkenazi-Jews or French-Canadians, while others are present in diverse populations.

Clinically and enzymatically diagnosed 5 infantile Tay-Sachs patients and 2 parents were investigated for the Hex A gene. Radioactive polymerase chain reaction (PCR) amplified products of all 14 Hex A exons and their flanking sequences were analysed by single-stranded conformational polymorphism (SSCP) protocol. Autoradiography was done after non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis to detect altered single-strand conformations. Different band migration pattern was found for two patients in the exon 5 and for another patient in the exon 11. Following a positive SSCP finding in the exon 5 and exon 11 PCR products, we sequenced the exons and the surrounding DNA region by "Sanger dideoxy chain termination" method. DNA sequence analysis of one of the patients who had different band pattern in exon 5 was not done. A new point mutation (IVS 5+1 G→A) in the intron 5 donor splice site was identified in one of the patients. This proband is homozygous and the parents, who are first cousins, are heterozygotes in respect of the mentioned mutation. This mutation was reported for the first time. Other patient's exon 11 had C1177→T substitution that resulted in change of Arg<sup>393</sup> codon (CGA) to TGA



which is a stop codon. This patient was found heterozygote for this mutation. This second mutation had been reported by Akli et al in 1991.

This study is the first step for investigation of Tay-Sachs disease at DNA level in Turkey. The results of this study indicated that the mutations which cause Tay-Sachs disease may be heterogeneous in Turkish population.



## KAYNAKLAR

- 1- Neufeld EF. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 10927-10930.
- 2- Mahuran DJ. The biochemistry of Hex A and Hex B gene mutations causing GM2 gangliosidosis. *Biochim Biophysica Acta* 1991; 1096: 87-94.
- 3- Neote K, Mahuran DJ, Gravel RA. Molecular genetics of  $\beta$ -hexosaminidase deficiencies. *Adv Neurol* 1991; 56: 189-207.
- 4- Başaran N, şaylı BS, Başaran A. Consanguineous marriages in the Turkish population. *Clin Genet* 1988; 34: 339-341.
- 5- Komeluk RG, Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, O'Dowd BF, Tropak M, Willard HF, Anderson M-J, Lowden JA, Gravel RA. Isolation of cDNA clones coding for the  $\alpha$ -subunit of human  $\beta$ -hexosaminidase. *J Biol Chem*, 1986; 261: 8407-8413.
- 6- Little LE, Lau MMH, Quon DVK, Fowler AV, Neufeld EF. Proteolytic processing of the  $\alpha$ -chain of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase, in normal human fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263: 4288-4292.
- 7- Neote K, Brown CA, Mahuran DJ. Translation initiation in the HEX B gene encoding the  $\beta$ -subunit of human  $\beta$ -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1990; 265: 20799-20806.
- 8- Sonderfeld-Fresko S, Proia RL. Synthesis and assembly of catalytically active lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase B, in a cell free system. *J Biol Chem* 1988; 263: 13463-13469.
- 9- Proia RL, d'Azzo A, Neufeld EF. Association of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits during the biosynthesis of  $\beta$ -hexosaminidase in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1984; 259: 3350-3354.
- 10- Varki A, Kornfeld S. Identification of a rat liver N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase capable of removing "blocking"  $\alpha$ -N-acetylglucosamine residues from phosphorylated high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 1980; 255: 8398-8401.
- 11- Sonderfeld-Fresko, Proia RL. Analysis of the glycosilation and phosphorylation of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase B, by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1989; 264: 7692-7697.

- 12- Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptor and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 1989; 264: 12115-12118.
- 13- Baranski TJ, Faust PL, Kornfeld S. Generation of lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 1990; 63: 281-291.
- 14- O'Dowd BF, Cumming D, Gravel RA. Isolation and characterization of the major glycopeptides from human  $\beta$ -hexosaminidase: their localization within the deduced primary structure of the mature  $\alpha$  and  $\beta$  polypeptide chains. *Biochemistry* 1988; 27: 5216-5226.
- 15- Hubbes M, Callahan J, Gravel R. The amino-terminal sequences in the pro- $\alpha$  and - $\beta$  polypeptides of human lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase A and B are retained in the mature isozymes. *FEBS Lett* 1989; 249: 316-320.
- 16- Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, Leung A, Gravel RA. Proteolytic processing of pro- $\alpha$  and pro- $\beta$  precursors from human  $\beta$ -hexosaminidase: Generation of the mature  $\alpha$  and  $\beta_a\beta_b$  subunits. *J Biol Chem* 1988; 263: 4612-4618.
- 17- Sandhoff K, Conzelmann E, Neufeld EF, Kaback MM, Suzuki K. The GM2 gangliosidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* 6th edition. New York: McGraw-Hill, 1989; 1807-1839.
- 18- Mahuran DJ, Triggs-Raine BL, Feigebbaum AJ, Gravel RA. The molecular basis of Tay-Sachs disease: Mutation identification and diagnosis. *Clin Biochem* 1990; 23: 409-415.
- 19- Kytzia H-J, Sandhoff K. Evidence for two different active sites on human  $\beta$ -hexosaminidase A. *J Biol Chem* 1985; 260: 7568-7572.
- 20- Li S-C, Li Y-T. An activator stimulating the enzymic hydrolysis of sphingoglycolipids. *J Biol Chem* 1976; 251: 1159-1161.
- 21- Schroder M, Kilma H, Nakano T. Isolation of cDNA encoding the human GM2 activator protein. *FEBS Lett* 1989; 251: 197-200.
- 22- Meier EM, Schwarzmann G, Fürst W, Sandhoff K. The human GM2 activator protein: a substrate specific cofactor of  $\beta$ -hexosaminidase A. *J Biol Chem* 1991; 266(3): 1879-1887.

- 23-** Klima H, Tanaka A, Schnabel D, Nakano T, Schröder M, Suzuki K, Sandhoff K. Characterization of full-length cDNAs and the gene coding for the human GM2 activator protein. *FEBS letters* 1991; 289(2): 260-264.
- 24-** Hechtman P, Kaplan F. Tay-Sachs disease screening and diagnosis: Evolving technologies. *DNA and Cell Biology* 1993; 12: 651-665.
- 25-** Navon R, Argov Z, Frisch A. Hexosaminidase A deficiency in adults. *Am J Med Genet* 1986; 24: 179-196.
- 26-** Benson PF, Fensom AH. *Genetic Biochemical Disorders*. Oxford University Press, Oxford. 1985: 81-149.
- 27-** Myerowitz R, Piekarz R, Neufeld EF, Shows TB, Suzuki K. Human  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -chain: coding sequence and the homology with the  $\beta$ -chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7830-7834.
- 28-** Proia RL, Soravia E. Organization of the gene encoding the human  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -chain. *J Biol Chem* 1987; 262: 5677-5681.
- 29-** Myerowitz R, Hogikyan ND. A deletion involving Alu sequences in the  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -chain gene of French Canadians with Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 1987; 262: 15396-15399.
- 30-** Myerowitz R. Splice junction mutation in some Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease: evidence against a single defect within this ethnic group. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3955-3959.
- 31-** Triggs-Raine BL, Feigenbaum ASJ, Natowicz M, Skomorowski M-A, Schuster SM, Clarke JTR, Mahuran DJ, Kolodny EH, Gravel RA. Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi Jewish: A comparison of DNA-based and enzyme-based tests. *N Eng J Med* 1990; 323: 6-12.
- 32-** Paw BH, Tieu PT, Kaback MM, Lim J, Neufeld EF. Frequency of three Hex A mutant alleles among Jewish and non-Jewish carriers identified in a Tay-Sachs screening program. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 698-705.
- 33-** Grebner EE, Tomczak J. Distribution of three  $\alpha$ -chain  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  mutations among Tay-Sachs carriers. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 604-607.

- 34-** Navon R, Proia RL. The mutations in Ashkenazi Jews with adult GM2 gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. *Science* 1989; 243: 1471-1474.
- 35-** Paw BH, Kaback MM, Neufeld EF. Molecular basis of adult onset and chronic GM2 gangliosidosis in patients of Ashkenazi Jewish origin: substitution of serine for glycine at position 269 of the  $\alpha$  subunit of  $\beta$  - hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2413-2417.
- 36-** Navon R, Kolodny EH, Mitsumoto H, Thomas GH, Proia RL. Ashkenazi-Jewish and non-Jewish adult GM2 gangliosidosis patients share a common genetic defect. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 817-821.
- 37-** Triggs-Raine BL, Akerman BR, Clarke JTR, Gravel RA. Sequence of DNA flanking the exons of the Hex A gene, and identification of mutations in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1041-1054.
- 38-** Triggs-Raine B, Gravel RA. Diagnostic heteroduplexes: Simple detection of carrier of a 4-bp insertion mutation in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 1990; 49:1041-1054.
- 39-** Arpaia E, Dumbrille Ross A, Maller T, Neote K, Tropak M, Troxel C, Stirling JL, Pitts JS, Bapat B, Lamhonwan AM, Mahuran DJ, Schuster SM, Clarke JTR, Lowden JA, Gravel RA. Identification of an altered splice site in Ashkenazi Tay-Sachs disease. *Nature* 1988; 333: 85-86.
- 40-** Myerowitz R, Costigan FC. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha chain of beta-hexosaminidase. *J Biol Chem* 1988; 263: 18587-18589.
- 41-** Ohno K, Suzuki K. Multiple abnormal beta-hexosaminidase alpha chain mRNAs in a compound heterozygous Ashkenazi Jewish patient with Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 1988; 263: 18563-18567.
- 42-** Hechtman P, Boulay B, De Braekeleer M, Andermann E, Melancon S, Laroche J, Prevost C, Kaplan F. The intron 7 donor splice site transition: A second Tay-Sachs disease mutation in French Canada. *Hum Genet* 1992; 96: 402-406.
- 43-** Fernandes M, Kaplan F, Natowicz M, Prenc E, Kolodny E, Kaback M, Hechtman P. A new Tay-Sachs disease B1 allele in exon 7 in two compound heterozygotes each with a second novel mutation. *Hum Mol Genet* 1992; 1:759-767.

- 44-** Chehab FF, Wall J. Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: A technology for carrier screening. *Hum Genet* 1992; 89: 163-168.
- 45-** Kaplan F, Boulay B, Bayleran J, Hechtman P. Allele-specific amplification of genomic DNA for detection of deletion mutations: Identification of a French-Canadian Tay-Sachs mutation. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 707-714.
- 46-** Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
- 47-** Akli S, Chelly J, Lacorte JM, Poenaru L, Kahn A. Seven novel Tay-Sachs mutations detected by chemical mismatch cleavage of PCR-amplified cDNA fragments. *Genomics* 1991; 11: 124-134.
- 48-** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
- 49-** Okada S, O'Brien JS. Tay-Sachs disease: Generalized absence of  $\beta$ -D-N-acetylhexosaminidase component. *Science* 1969; 165: 698
- 50-** O'Brien JS, Okada S, Chen A, Fillerup DL. Tay-Sachs disease: Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. *N Eng J Med* 1970; 283(1): 15
- 51-** Suzuki Y, Berman PH, Suzuki K. Detection of Tay-Sachs disease heterozygotes by assay of hexosaminidase A in serum and leukocytes. *J Pediatr* 1979; 78(4): 643
- 52-** Johnson WG, Mook G, Brady RO.  $\beta$ -hexosaminidase A from human placenta. *Methods in Enzymology* 1972; 28: 857-861.
- 53-** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265
- 54-** Suzuki K. Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. *Methods in Enzymology* 1987; 137: 727-763.
- 55-** Hoar DI, Haslam DB, Starozik DM. Improved direct molecular diagnosis and rapid fetal sexing. *Prenat Diagn* 1984; 4: 241-247.
- 56-** Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982

- 57-** Tanaka A, Punnett HH, Suzuki K. A new point mutation in the  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  subunit gene responsible for infantile Tay-Sachs disease in a non-Jewish Caucasian patient (a Kpn mutant). *Am J Hum Genet* 1990; 47: 567-574.
- 58-** Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL. Splice junctions, branch point sites, and exons: Sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods in Enzymol* 1990; 183: 252-278.
- 59-** Akerman BR, Zielenski J, Triggs-Raine BL. A mutation common in non-Jewish Tay-Sachs disease: Frequency and RNA studies. *Hum Mut.* 1992; 1: 303-309.
- 60-** Özkara HA, Akerman BR, Ciliv G, Topçu M, Renda Y, Gravel RA. A donor splice site mutation in a Turkish infant with Tay-Sachs disease. *Human Mutation* 1994; 4: (Basımda)
- 61-** Tanaka A, Ohno K, Suzuki K. Molecular genetics of GM2 gangliosidosis B1 variant. *J Neurochem* 1989; 52: S186D
- 62-** Tanaka A, Ohno K, Suzuki K. GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  gene abnormalities in seven patients. *Am J Hum Genet* 1990; 46:329-339.
- 63-** Nakano T, Nanba E, Tanaka A, Ohno K, Suzuki Y, Suzuki K. A new point mutation within exon 5 of  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  gene in a Japanese infant with Tay-Sachs disease. *Annals of Neurology* 1990; 27: 465-473.
- 64-** Mules EH, Dowling CE, Petersen MB, Kazazian Jr, Thomas GH. A novel mutation in the invariant AG of the acceptor splice site of intron 4 of the  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$ -subunit gene in two unrelated American black GM2-gangliosidosis (Tay-Sachs disease) patients. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1181-1185.
- 65-** Eric PH Yap, James O'd Mcgee. Nonisotopic SSCP detection in PCR products by Ethidium bromide staining. *Nucleic Acids Research* 1992; 8(2):
- 66-** Hongyo T, S.Buzard G, J. Calvert R, M. Weghorst C. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research* 1993; 21(16): 3637-3642.

- 67- Dockhorn-Dworniczak B, Dworniczak B, Brömmelkamp L, Büllers J, Horst J, W.Böcker W. Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Research* 1991; 19(9):
- 68- Neubauer A, Brendel C, Vogel D, Schmidt A, Heide I, Huhn D. Detection of p53 mutations using nonradioactive SSCP analysis: p53 is not frequently mutated in myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol* 1993; 67: 223-226.
- 69- Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism,(SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Research* 1990; 19(2): 405
- 70- Bassam BJ, Caetano-Annolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1991; 196: 80-83.
- 71- Oto M, Miyake S, Yuasa Y. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem.* 1993; 213: 19-22.
- 72- Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G. Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13: 389-394.
- 73- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 2766-2770.
- 74- Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. Dideoxy fingerprinting: a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 1992; 13: 441-443.
- 75- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-332.
- 76- Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM. Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutation Research* 1993; 288: 85-92.



## EK 1. ÇÖZELTİLER

- 1- Alkalen bakır çözeltisi** 50 ml 0,1 N NaOH içinde hazırlanmış %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> üzerine, 1 ml %1 sodyum veya potasyum tartrat içinde hazırlanmış % 0,5 CuSO<sub>4</sub>. 5 H<sub>2</sub>O karıştırılır.
- 2- Çözelti 1** 10 mM Tris-HCl pH 7,6  
10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 3- Tamponlanmış fenol** 1 kg fenol 160 ml distile su içinde 65°C su banyosunda 1-2 st içinde çözülür. %0,1 W/V hydroxyquinolene eklenir. Eşit hacimde 1M pH 8,0 Tris tamponu ile yıkanır, karıştırılır. Su fazı atılır. Tris tamponu ile yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanır. Her seferinde su fazı atılır. Daha sonra fenol buzdolabında saklanır.
- 4- Lizis tampon** 155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
10 mM KHCO<sub>3</sub>  
0,1 mM EDTA
- 5- Tris-EDTA** 100mM Tris  
1 mM EDTA pH 7,5
- 6- 10xPCR tamponu** 500 mM KCl  
100 mM Tris-HCl pH 8,3  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
%0,1 jelatin
- 7- 10xTBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu pH 8,3** 120 g Tris  
60 g Borat  
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- 8- 1xTBE tamponu pH 8,3** 10xTBE tamponununun 10 kez sulandırılması ile hazırlanır.

<b>9- Loading tamponu</b>	%0,05 bromofenol blue %15 Ficoll 400 %10 gliserol 1xTBE tamponu ile 1ml'ye tamamlanır.
<b>10- Etidyum bromür solüsyonu</b>	10 mg/ml stok etidyum bromürden 20µl alınıp 1xTBE tamponu ile karıştırılır.
<b>11- %6 poliakrilamid jel (%10 gliserol içeren)</b>	15 ml %30 akrilamid stok (%29 akrilamid, %1 bisakrilamid) 7,5 ml gliserol 7,5 ml 10xTBE tamponu 45 ml su 234 µl amonyumpersülfat (%20) 50 µl TEMED
<b>12- Sequencing stop solüsyonu</b>	%95 formamid %0,1 bromofenol blue %0,1 xylene cyanol
<b>13- %3 poliakrilamid jel</b>	16 ml %30 akrilamid stok (%29 akrilamid, %1 bisakrilamid) 6 ml 10xTBE 375 µl amonyum persülfat (%20) 40 µl TEMED Distile su ile 60 ml'ye tamamlanır.
<b>14- %5 poliakrilamid jel</b>	%30 akrilamid stok 16,6 ml 10xTBE 20,0 ml Distile su 62,7 ml %10 amonyum persülfat 0,7 ml
<b>15- Annealing tamponu</b>	40 mM Tris pH 7,5 25 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl içeren %10 DMSO

## 16- Dideoksi karışımlar

**Karışım G** 50 µl 1 M NaCl  
0,8 µl 0,1 M dCTP  
0,8 µl 0,1 M dTTP  
0,8 µl 0,1 M dGTP  
0,8 µl 10 mM ddGTP  
946,8 µl %10 DMSO

**Karışım T** 50 µl 1 M NaCl  
0,8 µl 0,1 M dCTP  
0,8 µl 0,1 M dTTP  
0,8 µl 0,1 M dGTP  
0,8 µl 10 mM ddTTP  
946,8 µl %10 DMSO

**Karışım C** 50 µl 1 M NaCl  
0,8 µl 0,1 M dCTP  
0,8 µl 0,1 M dTTP  
0,8 µl 0,1 M dGTP  
0,8 µl 10 mM ddCTP  
946,8 µl %10 DMSO

**Karışım A** 50 µl 1 M NaCl  
0,8 µl 0,1 M dCTP  
0,8 µl 0,1 M dTTP  
0,8 µl 0,1 M dGTP  
0,8 µl 0,1 mM ddATP  
946,8 µl %10 DMSO

## 17- Chasing mix

50 µl NaCl  
2,5 µl 0,1 M dCTP  
2,5 µl 0,1 M dTTP  
2,5 µl 0,1 M dGTP  
2,5 µl 0,1 M dATP  
940 µl %10 DMSO

## 18- Sequencing jel

60 g akrilamid  
3,16 g bisakrilamid  
500 g üre  
100 ml 10xTBE  
1 litreye distile su ile tamamlanır.

**EK 2. HEX A GENİNİN ÇOĞALTIMASI İÇİN  
KULLANILAN PRİMERLER**

<b>EKSONLAR VE PRİMER DİZİLERİ</b>	<b>Büyüklüğü (bç)</b>
1: A- CTCACCTGACCAGGGTCTCACGT B- CTCCTGATTGAACCGTAGTCCTA	502
2: A- GCTTCTAATGGCAGGTTGGCCGCA B- GCTCTTCTAAGACAGGGAACAGGA	174
3: A- GAATATCTGGTCTATAATCTGAG B- TGAGCAGGGACTGGGTTACTGCA	226
4: A- GCTCTGCTACATTGAGAACCTTCC B- CTAGGATTCTCAATATTGGGATCC	203
5: A- ATCTCCCTGTGCCCCCATAGTAA B- TGCTCCATCACCTAGAACTCTTA	229
6: A- TGAAACCGGAGAGACTGTGATG B- GCCACAGCCAGATTCAGACATTG	211
7: A- GCTAGCTTTCAGGAAGTGTGAACC B- TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT	221
8: A- ATGTATTTGTGACACTCATATGGG B- AGTAAGCAACTGATCAGGCCACAG	269
9: A- CAGGCATTAGGCTTTCAGGATGTT B- CAAGCAGGGCCTGACTCGGTATG	230
10: A- GTCTAGAACCCATCTGAGCTAAG B- AAGCCCAATCCAAACCAGGAGGA	237
11: A- CCAGGAATCTCCTCAGCTTTGTGT B- AGCCTCCTTTGGTTAGCAAGG	276
12: A- AGTTACCCCACCATCACCAGACTG B- TTGGGTCTCTAAGGGAGAACTCCT	203
13: A- ACCTTTGCAGGGAATACAGGGC B- TGTCTCCTCTCTAAGGGGTTTC	235
14: A- TGA CTGGTGTGAAAAGTGTGCTG B- CCTTTCTCTCCAAGCACAGG	273