

T. C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK TANI LABORATUVARINA BAŞVURAN X'e BAĞLI  
MÜSKÜLER DİSTROFİLİ AİLERDE MUTASYON ANALİZİ**

Arş. Görv. Selda ŞİMŞEK

118824

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

118824

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Turgay BUDAK

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DİYARBAKIR

2002

Selda Şimşek'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Genetik Tanı Laboratuvarına Başvuran X'e Bağlı Müsküler Distrofili Ailelerde Mutasyon Analizi" isimli bu tez .....25.11.2002..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek baŐarılı bulunmuştur.



Jüri BaŐkanı

Prof. Dr. Turgay BUDAK



Jüri yesi,

Prof. Dr. ALI KELLE



Jüri yesi

Doç. Dr. Biygl IŞIK

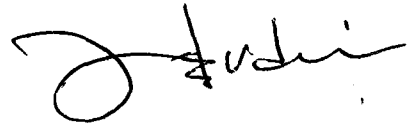


Jüri yesi

Yrd. Doç. Dr. M. Nail AŐP

Jüri yesi

Yrd. Doç. Dr. Servant ErdiŐ



## TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında olanak sağlayan, tenkit ve katkıları ile çalıőmamı doğru yönlendiren, destek ve bilgilerini esirgemeyerek bu alanda bana bir ufuk açan Ana Bilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sayın Prof.Dr. Turgay BUDAK'a,

Değerli bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan hocalarım Sayın Prof.Dr. Ali KELLE ve Sayın Yrd.Doç.Dr. M.Nail ALP'e,

İlgi ve güleryüzle her türlü desteğinden faydalandığım Sayın Doç.Dr. M.Emin Erdal'a, deneyim ve becerisi ile çalıőmamın her aşamasında birebir yardımcı olan Sayın Dr. Selahattin Tekeő'e,

Sabır ve hoşgörü ile bana katlanan çalışma arkadaşlarımlın tümüne ve en nihayet sevgili aileme gösterdikleri büyük özveriden ötürü çok teőekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. X Kromozomal Resesif Kalıtım.....	2
2.2. X Kromozom İnaktivasyonu.....	4
2.3. Duchenne ve Becker Müsküler Distrofi'nin Klinik Özellikleri.....	5
2.4. DMD'de Delesyon Analizi.....	8
2.5. Delesyon Taşıyıcılarının Tespiti.....	9
2.6. DMD Geni ve Distrofin Proteini.....	10
2.7. DMD'nin Moleküler Genetiği.....	12
2.8. Reading Frame Teorisi.....	13
2.9. DNA'da Ortaya Çıkan Mutasyon ve Mutasyon Çeşitleri.....	13
2.10. Mutasyonun Durumuna Göre Uygulanan Tanı Yöntemleri.....	16
2.10.1. Direkt Analiz Yöntemleri.....	17
2.10.2. İndirekt Analiz Yöntemleri.....	18
2.10.3. DNA'da Yeni Mutasyon Tarama Çalışmaları.....	21
2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	23
3. Materyal ve Metod.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. DNA İzolasyon Tamponları.....	27
3.1.2. DNA Amplifikasyon Tamponları.....	28
3.1.3. Agarose Jel Elektrophorez Tamponları.....	28
3.1.4. Restriksiyon Enzimleri.....	29
3.1.5. Poliakrilamid Jel Elektrophorez Tamponları.....	30
3.2. Metod.....	31
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon Yöntemi.....	31
3.2.2. DNA Amplifikasyonu.....	31
3.2.3. Agarose Jel Elektrophorezi.....	39

3.2.4. PCR-RFLP Analizi.....	40
3.2.5. PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi).....	41
4. Bulgular.....	43
5. Tartışma.....	53
6. Kaynaklar.....	57



# TABLO LİSTESİ

Sayfa

<b>Tablo 1.</b> Protein Seviyesinde ya da Kodon Üzerinde Meydana Gelen Etkiye Göre Mutasyon Örnekleri.....	16
<b>Tablo 2.</b> Multipleks I Gen Amplifikasyon Primerleri.....	34
<b>Tablo 3.</b> Multipleks II Gen Amplifikasyon Primerleri.....	35
<b>Tablo 4.</b> Polimorfik Bölgelerin PCR Yöntemi ile Analizinde Kullanılan Primer Dizileri.....	36
<b>Tablo 5.</b> Hastalarda Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi Kullanılarak Tespit Edilen Delesyonlar.....	44
<b>Tablo 6.</b> PCR-RFLP Analiz Sonuçları .....	52

# ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. X Kromozomal Resesif Kalıtım Kalıbı Gösteren Pedigri Örneği.....	3
Şekil 2. Distrofin Proteini.....	11
Şekil 3. Distrofin Glikoprotein Kompleksi... ..	11
Şekil 4. Multipleks I Gen Amplifikasyon Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemi Sonucu Oluşan Ürünlerin Bazılarının Elektroferez Sonucu Oluşan Görüntüsü.....	45
Şekil 5. Multipleks II Gen Amplifikasyon Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemi Sonucu Oluşan Ürünlerin Bazılarının Elektroferez Sonucu Oluşan Görüntüsü.....	45
Şekil 6. pERT 87-15/Xmn I Bölgesine Ait 740 bp'lik PCR Ürünü.....	47
Şekil 7. pERT 87-15/Bam HI Bölgesine Ait 226 bp'lik PCR Ürünü.....	47
Şekil 8. pERT 87-8/Taq I Bölgesine Ait 155 bp'lik PCR Ürünü.....	48
Şekil 9. I 38/Taq I Bölgesine Ait 2500 bp'lik PCR Ürünü.....	48
Şekil 10. pERT 87-15/Xmn I Bölgesine Ait 740 bp'lik PCR Ürününün <i>Xmn</i> I Enzimi İle Digestiyonu.....	50
Şekil 11. pERT 87-15/Bam HI Bölgesine Ait 226 bp'lik PCR Ürününün <i>Bam</i> HI Enzimi İle Digestiyonu.....	50
Şekil 12. pERT 87-8/Taq I Bölgesine Ait 155 bp'lik PCR Ürününün <i>Taq</i> I Enzimi İle Digestiyonu.....	51
Şekil13. I38/Taq I Bölgesine Ait 2500 bp'lik PCR Ürününün <i>Taq</i> I Enzimi ile Digestiyonu .....	51

## KISALTMALAR

<b>ARMS</b>	Amplification Refactory Mutation System (Allele Özgü Amplifikasyon Yöntemi )
<b>BMD</b>	Becker Muscular Dystrophy (Becker Kas Distrofisi)
<b>bp</b>	Base Pair (Baz çifti)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine (Sığır Serum Albumini)
<b>CCM</b>	Chemical Cleavage of Mismatch Method
<b>cDNA</b>	Complementary DNA (Komplementer DNA)
<b>CPK</b>	Creatin Phosphokinase (Kreatin Fosfokinaz)
<b>DGC</b>	Dystrophin Glycoprotein Complex (Distrofin Glikoprotein Kompleksi)
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<b>DMD</b>	Duchenne Muscular Dystrophy (Duchenne Kas Distrofisi)
<b>dNTP</b>	Deoxynucleotides (Deoksinükleotidler)
<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acide (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)
<b>EKG</b>	Elektrokardiogram
<b>EMG</b>	Elektromiyogram
<b>F</b>	Forward (5'...)
<b>HDA</b>	Heterodubleks Analizi
<b>kb</b>	Kilobase (Kilo baz)
<b>kD</b>	Kilo Dalton
<b>mRNA</b>	Messenger RNA (Mesajcı RNA)
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
<b>Pb</b>	Brain Promotor (Beyin Promotörü)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis
<b>Pm</b>	Muscle Promotor (Kas Promotörü)
<b>PTT</b>	Protein Truncation Test
<b>R</b>	Reverse (3'...)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmentinin Parça Uzunluk Polimorfizmi)



---

<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (Sodyum Dodesil Sülfat)
<b>SSCP</b>	Single Strand Conformation Polymorphism (Tek Zincirli DNA'nın Yapı Polimorfizmi)
<b>SSR</b>	Single Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
<b>TBE</b>	Tris Borate EDTA (Tris Borat EDTA)
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeats (Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmi)



# ÖZET

## GENETİK TANI LABORATUVARINA BAŞVURAN X'e BAĞLI MÜSKÜLER DİSTROFİLİ AİLELERDE MUTASYON ANALİZİ

**Selda SİMSEK**

Duchenne ve Becker müsküler distrofi (DMD/BMD), distrofin genindeki mutasyonlardan kaynaklanan, X'e bağlı resesif nöromüsküler düzensizliklerdir. Bu mutasyonların çoğunluğu (yaklaşık olarak % 60) PCR analizi ile tespit edilebilen çeşitli büyüklüklerdeki gen içi delesyonlardır.

On farklı aileye ait 30 DMD ve 10 BMD hastası iki ayrı multipleks gen amplifikasyon seti kullanılarak delesyon için incelenmiştir. İki ayrı gen amplifikasyon setinin birlikte kullanılması ile hastaların % 38'inde delesyon tespit edilmiştir. Delesyon tespit edilen hastalar arasında multipleks II gen amplifikasyon setinin multipleks I'den daha fazla bilgilendirici olduğu görülmüştür.

Hastaların taşıyıcı olma riski bulunan 66 bayan akrabası, distrofin genindeki pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/ Bam HI, pERT 87-8/Taq I ve I 38/Taq I polimorfizimleri için PCR-RFLP analizi ile incelenmiştir. Risk altındaki kadınların % 91 (60 bayan) inin bu dört polimorfik RFLP'lerin en azından biri için heterozigot olduğu bulunmuştur.

Bütün bu sonuçların DMD/BMD için prenatal tanı programlarının planlanmasına katkı sağlayacağını umuyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Duchenne/Becker Müsküler Distrofi, Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Restriksiyon Enziminin Parça Uzunluk Polimorfizmi, Delesyon, Taşıyıcılık Taraması, Polimorfizm.

# SUMMARY

## MUTATION ANALYSIS WITH X LINKED MUSCULAR DYSTROPHY FAMILIES REFERRED TO GENETICS DIAGNOSTIC LABORATORY

**Selda SIMSEK**

Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (DMD/BMD) are X linked recessive, neuromuscular disorders that result from mutations in the dystrophin gene. The majority of this mutations ( approximately 60 %) are intragenic deletions, which can be determined by PCR analysis.

Thirty DMD and ten BMD patients from ten different families have been screened for deletions, using two separate multiplex gene amplification sets. The application of multiplex II gene amplification set in conjunction with multiplex I gene amplification set determined deletions in 38 % of the cases. The informativeness of multiplex II gene amplification set was found to be higher than that of multiplex I set among the patients with deletion.

Sixtysix female relatives of patients, who were at risk of being carrier, have been screened for pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/ Bam HI, pERT 87-8/Taq I and I 38/Taq I polymorphisms within the dystrophin gene by PCR-RFLP analysis. We found that 91 % (60 female) of all females at risk were heterozygous for at least one of these four RFLPs.

We hope that; all these results may be useful for planning prenatal diagnosis programmes for DMD/BMD.

**Key Words :** Duchenne/Becker Muscular Dystrophy, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism, Deletion, Carrier Detection, Polymorphism.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son otuz yıl içinde biyoteknolojinin gelişmesi, insan kas dokusu ile ilgili bilgilerin artmasını ve daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Özellikle moleküler biyolojik çalışmalar, kas hastalıklarında çok büyük ilerlemelere yol açmıştır. Pek çok hastalık ile ilgili gen izole edilmiş, kromozomal lokalizasyonları gösterilmiştir. Bu yeni bilgiler ile; tanı, prognoz, taşıyıcıların saptanması, prenatal tanı ve tedavi için yeni stratejiler geliştirilmiştir (1).

Progresif kas zayıflığı ile karakterize edilen ve X'e bağlı resesif özellikli bir nöromüsküler düzensizlik olan Duchenne Müsküler Distrofi (2) ile ilgili ilk bulgular 1851 yılında Edward Meryon tarafından bildirilmiştir (3,4). Bununla birlikte Meryon'dan on yıl sonra Guillaume Benjamin Amand Duchenne, mikroskop ile yaptığı hastalıklı kas çalışmaları ile düzensizliğin patolojik progresyonunun ve klinik özelliklerinin kapsamlı olarak açıklanmasını sağlamıştır. Çocukluk döneminin en şiddetli ve en yaygın müsküler distrofisi olarak bilinen bu distrofi, Duchenne' in ismini almıştır (4). Duchenne Müsküler Distrofi'nin klinik olarak benzer fakat daha hafif seyreden formu olan Becker Müsküler Distrofi ise (5) 1955 yılında Becker ve Keiner tarafından tanımlanmıştır (6) ve diğer distrofi tiplerinden kesinlikle ayrı olduğu Peter Emil Becker tarafından gösterilmiştir (1).

Duchenne ve Becker müsküler distrofiye (DMD/BMD) neden olan mutasyonların yaklaşık olarak % 60'ı çeşitli büyüklüklerdeki gen içi delesyonlardan, % 6'sı duplikasyonlardan ve geri kalanı ise nokta mutasyonları, mikrodelesyon/insersiyonlardan kaynaklanmaktadır (7,8). Bu sebeple bir ailede DMD/BMD'nin delesyonlardan kaynaklandığının belirlenmesi ile doğum öncesi tanının %100 bir kesinlik ile verilebilmesine olanak sağlanmaktadır (9).

Bu çalışmanın amacı; laboratuvarımıza baş vuran DMD ailelerinde, Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği ile, distrofin genindeki delesyonların belirlenmesi ve aile bireylerinde taşıyıcılık taramasının yapılmasıdır.

Bu değerlendirme sonucunda; yremizdeki DMD sıklığını, delesyon mutasyonu oranını ve taşıyıcıların sıklığını ortaya koymak ve risk altındaki ailelere sağlıklı çocuk sahibi olmaları konusunda yardımcı olabilmek imkanlarının doğacağına inanıyoruz.

## 2.GENEL BİLGİLER

İnsan, iki hücreli durumundan ölümüne kadar olan sürede hem kalıtsal hem de çevresel etkenlerin etkisi altında bulunmaktadır. Kalıtsal ve çevresel etkenler hemen hemen her hastalık ve nitelik ile birlikte etkileşim gösterirler; fakat bazı hastalıklarda tümüyle kalıtsal özellikler etkinken, bazı hastalıklarda da çevresel etkenler etkindir. Hastalık ya da niteliklerin bu yayılışının iki ucu arasında, kalıtsal ve çevresel etkenlerin birlikte fakat değişik oranlarda etkili olduğu pek çok hastalık bulunmaktadır (10).

Kalıtsal hastalıklar etiyojilerindeki kalıtsal etkenin türüne göre üç gruba ayrılabilir. Bunlar; 1-Tekli mutant genlere bağlı olanlar, 2- Poligenik olanlar ve 3-Kromozomal olanlardır. Tekli mutant genlere bağlı olan hastalıklar, Mendel kurallarına uyar biçimde davranırlar ve belirli kalıtım kalıpları gösterirler ve bu kalıtım kalıpları genetik etmenleri inceleme yöntemleri ile ortaya konabilir (10,11).

Bilindiği gibi insanda 46 tane kromozom bulunmaktadır; bunlardan 44 tanesi otozomal kromozomlar, geriye kalan iki tanesi de kadında XX ve erkekte XY biçiminde bulunan cinsiyet kromozomları ya da gonozomal kromozomlardır. Buna göre insandaki kalıtım biçimleri; Otozomal dominant, otozomal resesif, X kromozomal dominant, X kromozomal resesif ve Y kromozomal kalıtım olarak sınıflandırılır (10). Bu kalıtım biçimlerinden; DMD ve BMD'nin X'e bağlı resesif özellikli nöromüsküler düzensizlikler olması nedeniyle, sadece X kromozomal resesif kalıtımın kalıbını kısaca açıklayacağız.

### 2.1. X KROMOZOMAL RESESİF KALITIM

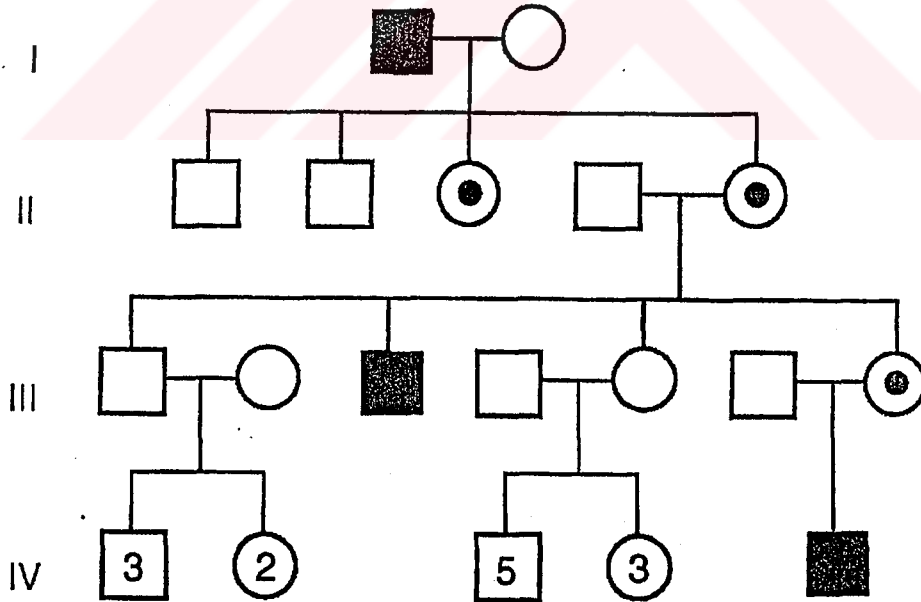
Cinsiyet kromozomları yönünden erkekler bir X ve bir Y kromozomuna sahipken, kadınlarda iki tane X kromozomu vardır. X kromozomu üzerindeki genlerin çoğu Y

kromozomu üzerinde bulunmaz bu nedenle erkekler X'e bağlı genlerin sadece bir tek kopyasına sahiptir. ( Böyle erkeklere hemizigot denir.) Bu nedenle X kromozomundaki gen ister dominant ister resesif etkili olsun erkeklerde daima kendini gösterir (10,12).

X kromozomu üzerindeki resesif etkili mutant bir gen için heterozigot (taşıyıcı) olan bir kadının normal bir erkek ile evlilik yapması ile; kız çocuklarının yarısı normal yarısı taşıyıcı, erkek çocuklarının ise yarısı hasta yarısı sağlam olur (10,11).

Hasta erkek normal kadınla evlenirse; baba Y kromozomunu oğullarına, X kromozomunu kızlarına vereceği için erkek çocukları normal ancak kız çocukları taşıyıcı olur (10,11).

Hasta erkek taşıyıcı kadınla evlenecek olursa; kızların yarısı hasta yarısı taşıyıcı, erkeklerin ise yarısı hasta yarısı sağlam olur (10). Şekil-1'de X Kromozomal resesif kalıtım kalıbı gösteren bir pedigrî örneği görülmektedir (11).



Şekil 1. X Kromozomal Resesif Kalıtım Kalıbı Gösteren Pedigrî Örneği.

X kromozomal resesif hastalıkların kalıtım biçimi genellikle oblik bir nitelik gösterir, ancak pek çok ailede sporadik de olabilir yani aile üyelerinin yalnızca birinde ortaya çıkabilir. Bu durumda anne oblik taşıyıcı durumunda değildir. Böyle çocuklu ailelerin üçte birinde hastalık taze mutasyonla oluşmuş olabileceği gibi, geriye kalan üçte ikisinde annenin taşıyıcılığı sözkonusudur. Taşıyıcılık testleri yapılarak annenin gerçekten taşıyıcı olup olmadığı öğrenilebilir (10).

## 2.2. X KROMOZOM İNAKTİVASYONU

Kadınlarda iki X kromozomu, erkeklerde ise bir X ve bir Y kromozomu bulunmaktadır. Bu durum yani kadında iki tane X kromozomunun bulunması ilk bakışta, bu kromozom üzerindeki genlerle üretilen proteinlerin ve dolayısıyla ilgili özelliklerin erkeklerden bir kat daha fazla olacağı izlenimini vermektedir. Oysa X kromozomu üzerindeki genlerin oluşturduğu nitelikler bakımından kadın ve erkek arasında bir fark bulunmamaktadır. Bu durum 1960'larda Mary Lyon tarafından açıklanmaya çalışılmış ve kendi adıyla anılan **Lyonizasyon Hipotezi** ile şu şekilde özetlenmiştir (10,11,12) :

1. Memelilerin dişi embriyolarında bulunan iki adet X kromozomundan birisi fonksiyonel olarak inaktif duruma gelerek X kromatinini oluşturur. Bu inaktivasyon olgusu fertilizasyondan sonraki 12. günden itibaren trofoblastta, 16. günden itibaren embriyoda görülmeye başlar.
2. Lyonizasyon tamamen rastgeledir. Yani her hücredeki lyonizasyon olgusu, komşu hücredekinden bağımsızdır. Bir kısım hücrelerde maternal kökenli X kromozomları inaktive olurken, bir kısım hücrelerde de paternal kökenli X kromozomları inaktive olur. İnaktivasyonun anne ve baba kökenli X kromozomlarındaki oranı % 50'dir.
3. İnaktivasyon olgusu yalnızca somatik hücrelerde görülür. İnaktivasyona uğrayan X kromozomu, yavru hücrelerde inaktif olarak geçer .

İnaktivasyon için X kromozom seçimi normalde rastgeledir ancak inaktivasyonun rastgele olmadığı durumlarda vardır; Örneğin X'e bağlı resesif bir düzensizlik için homozigot olmadığı halde, bu düzensizliğin belirtilerini hasta erkeklerdeki gibi gösteren bazı kadınlar

vardır (12). Bu duruma ' **Manifesting Heterozygote** ' da denilmektedir (11). Başka bir örnekte sadece bir tek X kromozomuna sahip olan Turner Sendromlu (45,X) kadınlarda görülür. Böyle kadınlar X'e bağlı genler için hemizigottur ancak aynı zamanda DMD gibi X'e bağlı resesif bir düzensizliğide taşıyorsa, bir tek X kromozomuna sahip olduğu için bu hastalığın klinik özelliklerindeki gösterir (12,13).

X kromozomlarından bir tanesinin yapısal olarak anormal olduğu durumlarda selektif olarak bu X kromozomu inaktif duruma geçer. Ancak dengeli X-otozom translokasyonlarında inaktivasyon rastgele olmadan kendini gösterir ve selektif olarak normal olan X kromozomu inaktive olur (10).

### **2.3. DUCHENNE VE BECKER MÜSKÜLER DİSTROFİ'NİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ**

Müsküler distrofi terimi, hastalığın temel kriterleri olan primer kas dokusu tutuluşuna bağlı, anormal kas güçsüzlüğü ve atrofi olan bir grup genetik hastalık için kullanılmaktadır (1,14). Yani müsküler distrofi bir tek hastalık değildir ve araştırmacılar yaklaşık yirmi değişik tip distrofi bulunduğunu bildirmektedir (1). Kalıtım kalıbı, düzensizliğin başlama yaşı, özel iskelet kas tiplerini içermesi ve kapsamlı progresyonu müsküler distrofilerin farklı tiplerinin sınıflandırılması için kullanılmıştır (14). Distrofi tiplerinin tanınmasında temel klinik bulgu her ne kadar belirli kas gruplarının tutulmasına dayanırsa da, distrofilerin erken döneminde sadece bir grup kasda güçsüzlük olması ve hastalığın daha sonraki dönemlerinde güçsüzlüğün vücudun değişik bölgelerine yayılması distrofilerin tipi konusunda kesin tanıya varmakta güçlük yaratır. İşte bu sebeplerden ötürü müsküler distrofilerin sınıflandırılmasında klinik bulguların yanında histolojik, elektrofizyolojik ve moleküler biyolojik yöntemler gibi yardımcı incelemelerinde bulunması gerekir (1).

Müsküler distrofilerin en sık rastlanan formu olan Duchenne Müsküler Distrofi (6,15,16), kas gücünün progresiv kaybı ile karakterizedir. Çoğunlukla erkek çocuklarda görülür çünkü X kromozomuna bağlı resesif bir özellik olarak kalıtılır (12,17).



Duchenne Müsküler Distrofi, yaklaşık 3500 erkek doğumda bir görülür. Semptomlar genellikle yaşamın erken yıllarında farkedilir. Hasta çocukların çoğunda motor gelişiminde gecikme vardır ve bunların yaklaşık yarısı 18. aydan önce yürüyemez . Hastaların koşma yeteneği azalır ve merdiven çıkmada güçlük görülür. Bacaklarının üzerine tırmanarak doğrulurlar (Pozitif Gowers belirtisi). Kaslarda güçsüzlük ve atrofi, pelvik kaslarda başlar ve anterior tibial gruba yayılır. Daha sonra üst ekstremitte kasları tutulur. Kas güçsüzlüğü genellikle simetrik ve progresyon gösterir (1,6,12,18,19).

Karın öne, omuzlar geriye doğru çekildiğinden lordozda artma görülür. Proksimallerdeki güçsüzlük nedeniyle hasta iki yana sallanarak yürür. Buna ördekvari yürüyüş ismi verilir. Skapula alata oluşur (1,6). Baldır kaslarında bağ ve yağ dokusunun artmasıyla psödöhipertrofi görülür (1,6,12,19).

Duchenne müsküler distrofi hastaların üçte birinde ılımlı mental gerilik ortaya çıkabilir. Bu mental bozukluk kas güçsüzlüğü ile paralellik göstermez ve progresiv değildir (1). Mental retardasyondan sorumlu olabileceği düşünülen bir beyin promoteri (Pb) vardır ve mental reterdasyon görülen DMD'li hastalarda, genotip-fenotip korelesyonu ile ilgili yapılacak daha ileri çalışmalar bu noktanın açıklığa kavuşturulmasında yardımcı olabilir (20).

Hastaların %80 'inde kardiyomiyopati gelişir. Klinik bulgu olarak kalpte büyüme, değişik disritmiler ve taşikardi vardır (1) ve EKG ve EKO değişiklikleri görülür (6).

Hastaların çoğu 9 - 12 yaş civarlarında yürüyemez hale gelir ve genellikle 20 yaşından önce (nadiren 25 yaşına kadar yaşarlar) pnömoni, solunum yetmezliği ve kardiyak yetmezlik gibi sebepler ile kaybedilirler (4,6,19).

Kadınlarda ise DMD'nin başlama yaşı ve şiddeti, çarpık inaktivasyonun derecesine bağlıdır. X kromozomu inaktivasyonunda mutant DMD allelini taşıyan X kromozomu hücrelerin çoğunda aktif ise DMD gelişir, fakat normal DMD allelini taşıyan X kromozomu hücrelerin çoğunda aktif ise, DMD'nin ya çok az septomu görülür ya da hiç görülmez (11).

Becker Müsküler Distrofi ise 30 000 erkekte bir görülen, DMD'nin daha benign ve allelik formudur (5,21). Başlama yaşı 5-15 dir, fakat 3. ve 4. dekatta da başlayabilir. Hastalığın başlama dönemindeki bulgular Duchenne Müsküler Distrofi' ye benzerse de Becker Müsküler Distrofi hastalarının %90'ında ilk bulgu 5 yaşından sonra ortaya çıkar. Seyri her zaman yavaş progresivdir, fakat bazen aile içindeki bireyler arasında bile değişkenlik gösterebilir (1). DMD ve BMD de düzensizliğin progresyonunda önemli derecede çeşitlilik vardır (11); DMD'li hastaların çoğunluğu 12 yaşından önce tekerlekli sandalyeye bağlanmaya başlarken, BMD'li hastaların çoğunluğu 16 yaşına kadar yürütebilir (20). 13 ve 16 yaşları arasında yürüyemez hale gelen hastalar ise intermediate grup olarak adlandırılır (20,22).

Görülüyorki BMD, DMD den daha az sıklıkla görülür fakat diğer müsküler distrofi tiplerinden daha sık görülür. Müsküler distrofi spektrumunun bir ucunda ileri Duchenne tipi, diğer ucunda ise klasik Duchenne distrofisinden daha iyi seyreden ve uzun yaşayan Becker müsküler distrofisi bulunan erkekler görülür (1).

Serum Kreatin Fosfokinaz (Serum Creatine Phosphokinase, CPK) enziminin artan seviyesi, kas hastalığının bir göstergesi olabilir. CPK; iskelet kası, kalp ve beyinde bulunan bir enzimdir ve kas hücreleri tahrip olduğunda bu enzim seruma sızar (12). Duchenne ve Becker müsküler distrofilili hastalarda CPK seviyesi yüksek oranda artar (1,4,6,12). Bu yükseklik doğumdan hemen sonra bile görülebilir. Ancak normal bebeklerde bile doğumun birinci haftasına kadar yüksek CPK bulunabileceğinden, DMD şüphesi olan bebeklerde bu aktivitenin ölçülmesi için 2-3 hafta beklenmelidir (1). Serum kreatin kinaz enziminin ölçülmesinden sonra en önemli tanı yöntemlerinden birisi kas biyopsisidir. DMD'de immünohistokimyasal tekniklerle boyanan kas liflerinin periferinde distrofin bulunmadığı, BMD'de ise normalden az bulunduğu görülür (1,4). Diğer bir tanı yöntemi ise Elektromiyografik (EMG) incelemelerdir. Sinir iletim çalışmaları ve elektromiyografik bulgular DMD'yi , klinik olarak benzerlik gösteren dejeneratif ve enflamatuvar çocukluk nöropatilerinden ayırmada yardım eder. Elektrokardiogram (EKG), ultrasonografi ve kompütörize tomografi lokalize kas güçsüzlüğünün gösterilmesi açısından önemli olan diğer incelemelerdir (1).

DMD öldürücü bir hastalıktır ve bugün için bilinen tıbbi tedavisi yoktur. Ancak genel olarak sağlığın korunması, egzersiz, fizik tedavi-rehabilitasyon, ortopedik ve cerrahi olanaklarla deformitelerin önlenmesi ve solunum fonksiyonunun korunması gibi değişik yönlerde olumlu yaklaşımlar bulunmaktadır (1,6,11,19).

#### 2.4. DMD'DE DELESYON ANALİZİ

Duchenne ve Becker Müsküler Distrofili hastaların yaklaşık olarak %60'ı delesyonlardan kaynaklanmaktadır (23). DMD geninde delesyon ve duplikasyon tespiti için geleneksel olarak cDNA problemlerini kullanan Southern blotting yöntemi kullanılmıştır (23,24,25). Ancak delesyonların çoğunluğunun, distrofin geninde delesyonların en sık görüldüğü iki bölgede (hotspot) kümelenmiş olması nedeni ile daha sonra multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi geliştirilmiştir (26). Her iki yöntemde delesyonların tespitinde kullanılmasına karşılık multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi Southern blotting yöntemine kıyasla daha hızlı ve randımanlı çalışan kullanışlı bir yöntemdir (23,26).

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ilk olarak Chamberlain tarafından DMD'nin tanısında kullanılmıştır. Bu yöntemle ilk olarak altı ayrı primer çifti aynı reaksiyon tüpünde bir arada kullanılarak, altı ekzon (ekson 8, 17, 19, 44, 45, 48) bir defada amplifiye edilmiş ve hastaların %37'sinde delesyon mutasyonu görülmüştür (26). Daha sonra yine Chamberlain tarafından üç eksonun (ekson 4, 12, 51) daha ilavesi ile bu oran % 80'e çıkarılmıştır (27). Beggs tarafından dokuz ayrı eksonun (ekson 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60 ve kas promoteri) daha ilavesi yapılarak hastaların %98'inde delesyon mutasyonu tespit edilmiştir (28). Daha sonra Abbs tarafından eksonlar, 5' ucunda (Pm, ekson 3, 4, 6, 8, 13, 19) ve 3' ucunda (ekson 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60) olarak iki multipleks seti şeklinde gendeki lokalizasyonlarına göre bir arada toplanmış ve yine tespit edilebilir delesyonların sıklığı % 98 olarak görülmüştür (23). Bütün bunlara ek olarak beyin promoter bölgesi, ekson 16, 20, 21, 22, 29, 32, 34, 41, 42 ve 46' ya ait primerlerinde ilavesi ile 30 ekson 3 multipleks reaksiyonu şeklinde amplifiye edilmiş ve delesyon sıklığının diğer çalışmalar ile benzer olduğu gösterilmiştir (29).

## 2.5. DELESYON TAŞIYICILARININ TESPİTİ

Duchenne ve Becker müsküler distrofi'de genetik danışmanın en büyük zorluklarından birisi taşıyıcılığın tespit edilmesidir. Çünkü taşıyıcı bir annenin kız çocuklarının %50 risk ile taşıyıcı olma ihtimali vardır ve bu çocukların taşıyıcılık statülerinin ne olduğunun çoğu zaman tespit edilmesi gerekmektedir (12). DMD ve BMD'li hastaların 2/3'si taşıyıcı bir anneden (oblik taşıyıcı), geri kalan 1/3' ise yeni mutasyonlardan oluşur (30). Taşıyıcılık tespiti yapılırken germinal mozaizm'de göz önünde bulundurulmalıdır (31,32). Çünkü DMD'de, annenin germinal mozaizm olma riskinin % 10' un üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Sporadik vakaların tümünde anne birden fazla ocuk istediği zaman germinal mozaizm durumu akıldan çıkarılmamalıdır (33).

Serum kreatin fosfokinaz enzim seviyesinin ölçülmesi, taşıyıcılık tespitinin belirlenmesinde çoğu zaman kullanılan bir testtir. Bununla birlikte aynı bireyde değişik zamanlarda ölçüldüğünde bile değişik sonuçlar elde edilebilir ve yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir (12,34). DMD/BMD' den sorumlu olan genin tanımlanması ve gen ürününün (distrofin proteini) belirlenmesinden sonra prenatal tanı ve taşıyıcılık tespitinin daha doğru yapılabilmesi için biyokimyasal ve moleküler teknikler geliştirilmiştir (34). cDNA probları kullanılarak, Southern blotting tekniği ile yapılan ve otoradyografi sinyaline göre normal ve taşıyıcı bireyi tespit eden dozaj analizleri (35), RFLP bölgelerini tespit eden DNA probları ile önce uygun restriksiyon endonükleaz enzimler ile kesilip daha sonra Southern blotting tekniği ile hibridizasyonu yapılarak taşıyıcıları tespit etmeye alışan RFLP analizleri (36,37,38), SSCP (tek zincirli DNA'nın yapı polimorfizmi) analizi (39), PCR yöntemi kullanılarak, Southern blotting'den daha hızlı ve kolay bir şekilde yapılan PCR-RFLP analizleri (7,33,40,41), delesyona uğrayan veya uğramayan eksonlara spesifik floresan olarak işaretlenmiş primerlerin kullanılmasıyla yapılan kantitatif PCR analizi ile PCR ürününün otomatik olarak dozajının belirlenmesi (34), polimorfik dinükleotid tekrar bölgelerini (STR) içeren primerler kullanılarak yapılan bağlantı analizleri (42,43) bu yöntemlerden bazılarıdır.

## 2.6. DMD GENİ VE DİSTROFİN PROTEİNİ

DMD geninin en önemli özelliği onun bu güne kadar tanımlanan en büyük gen olmasıdır (44). Sitogenetik olarak tespit edilebilen düzensizliklerin analizi ve genetik bağlantı analizleri ile yapılan çalışmalar; bu gen loküsünün, Xp21'de lokalize olduğunu ortaya çıkarmıştır. DMD'nin daha az şiddetli ve daha seyrek görülen formu olan BMD'nin de aynı loküste bulunduğu görülmüştür (45).

DMD geninin 2300 kb büyüklüğünde olduğu yani X kromozomunun %1,5'ini kapsadığı düşünülmektedir (11,46). DMD geninin total 79 eksonu kapsadığı bugün bilinmektedir ancak ekson yapısı henüz tam olarak tanımlanmamıştır (47). Bununla birlikte 7 dokuya spesifik promoter ile kompleks bir yapı oluşturmaktadır (11). Ayrıca bir beyin promoteri vardır ve beyinde mevcut distrofin proteininin üretiminde ikinci bir bölge olan ve kas promoterinin 5'- ucuna lokalize olan bu bölgenin, DMD hastalarında ki mental reterdasyondan sorumlu olabileceğine işaret edilmektedir (20).

DMD geninin 14 kb'lık mRNA'sı, distrofin proteinini kodlar. Distrofin geninin ürünü olan bu protein, 427 kD büyüklüğündedir ve 3685 amino asitten oluşmuştur (11;44,48). Distrofin proteininin amino (N-) ucunda bir aktin bağlama bölgesi vardır. Bu bölge  $\beta$ -spektrin ve  $\alpha$ -aktinin içeren aktin bağlayan proteinlerin büyük bir ailesine fonksiyon ve dizi olarak benzerdir. Distrofin proteininin integral bölgesi, her biri yaklaşık olarak 109 amino asit olan 24 benzer tekrarı içeren, uzun çubuk şeklinde üçlü bir helikstir. Bu bölgeden sonra kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) bağlayan 150 amino asitlik sisteinden zengin bir bölge bulunmaktadır. Karboksil (C-) uçta ise 420 amino asitlik bir bölge vardır. Bu bölgenin diğer membran proteinleri ile iletişimi sağladığına inanılmaktadır (12,49). Distrofin proteini Şekil-2'de görülmektedir (11).

İmmünohistokimyasal çalışmalar ile distrofin proteini, tüm kasların plazma membranında ve bazı nöronlarda bulunmuştur ve tüm hücre tiplerinde statik ve dinamik hücresel süreçte yapısal bir rol oynadığı görülmüştür (49).

5' ————— Distrofin cDNA ————— 3'

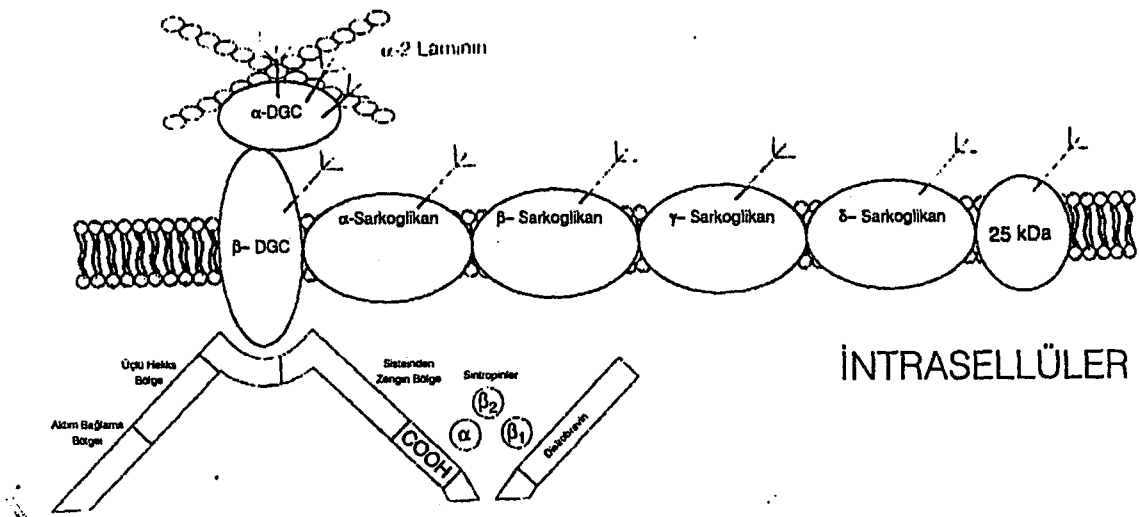


Şekil 2. Distrofin Proteini

Distrofin Glikoprotein Kompleks (Dystophyn Glycoprotein Complex, DGC) ise; ekstrasellüler matriks ve F-aktin hücre iskeleti arasında yapısal bir bağlantı formu olan, periferal ve integral membran proteinlerinden oluşan multisubüniteli bir komplekstir. Distrofin proteininin identifikasyonu ve daha sonra distrofin-glikoprotein kompleksinin karakterizasyonu büyük bir buluştur ve müsküler distrofinin moleküler patogenezinin açıklığa kavuşturulmasında bugüne kadar atılan en önemli adımdır (14).

Şekil 3'de görüldüğü gibi distrofin proteininin NH<sub>2</sub>- ucu direk olarak F-aktin ile, COOH- ucu ise diğer DGC subkompleksi ile interaksiyonu sağlar (11,14).

EKSTRASELLÜLER



Şekil 3. Distrofin Glikoprotein Kompleksi ( DGC)

Kasın fonksiyonu ve stabilitesi için DGC kompleksinin en önemli rolü, miyofibril kontraksiyonu esnasında plazma membranına mekaniksel destek sağlamasıdır. Ayrıca son bulgular DGC'nin hücrel iletişiminde bir rol oynayabileceğini desteklemiştir (14).

DGC'nin diğer proteinlerini oluşturan genlerde meydana gelecek olan bir mutasyon, Limb Girdle müsküler distrofi vb. gibi başka müsküler distrofi tiplerinin oluşmasına sebep olabilir (11,14).

Western-blot çalışmaları, DMD li erkeklerin kas biyopsilerinde distrofin proteininin total yokluğunu ortaya çıkarmıştır. BMD'li erkeklerde ise DMD nin aksine kalitatif ya da kantitatif olarak (ya da her ikisi birden) anormal distrofin vardır veya bazı hastalarda ise çok az miktarda normal distrofin bulunmaktadır (12).

Özellikle BMD'li hastalarda yapılan çalışmalar, değişik miktarlarda ve farklı moleküler ağırlıklarda distrofin proteini sentezlenmesi ile BMD'nin klinik fenotipinin çok daha fazla heterojen olduğunu göstermiştir (25). Distrofinin aktine bağlandığı amino uçta meydana gelen delesyonların şiddetli BMD formuna sebep oluğu gösterilmiştir. Bu da bölgenin proteinin fonksiyonu ve stabilitesi için çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Sisteinden zengin bölge ve C- terminal bölgenin bir kısmı, distrofin proteininin stabilitesini sürdürebilmesi için esastır. BMD' li hastalarda C- terminal ucun her zaman olması fakat DMD'li hastaların çoğunda ise bulunmaması bu görüşü desteklemektedir (24,25). Proteinin üçlü heliks şeklindeki tekrar bölgesindeki çok geniş delesyon ve duplikasyonların DMD ile değil BMD ile sonuçlanması bu bölgenin molekülün sadece boyutunu sağladığı ve proteinin fonksiyonunda minimal etkisi olduğunu düşündürmektedir (25).

## 2.7. DMD'NİN MOLEKÜLER GENETİĞİ

DMD ve BMD'ye distrofin geninde meydana gelen mutasyonlar sebep olur (25). Bu mutasyonların yaklaşık olarak %60-65'i delesyonlardan, %5-6'sı duplikasyonlardan ve geri kalanı ise nokta mutasyonları, mikrodelesyon/insersiyonlardan kaynaklanmaktadır (7,8).

Delesyonların büyüklüğü ve lokalizasyonu oldukça heterojendir buna rağmen delesyonların kümелendiği iki hotspot bölge (delesyonların sık görüldüğü iki bölge) vardır (50,51). Delesyonların büyük çoğunluğu üçlü heliks şeklindeki bölgenin distal kısmında (ekson 45-53 ) toplanmıştır, bu bölgeye majör hotspot denir. Diğer bölge ise amino uçta (ekson 7 civarında) toplanmıştır ve bu bölgeye minör hotspot denir (25,50).

Bütün bu bilgilere rağmen delesyonların oluşmasındaki moleküler mekanizma (ya da mekanizmalar) henüz bilinmemektedir. Ancak genin yaklaşık olarak %0.5'i eksonlardan oluştuğu için hemen hemen bütün delesyonların intronlarda oluşması beklenir. İntronik diziler genetik kaymanın bir sonucu olarak popülasyon farklılıklarını toplamış olabilecekleri için delesyon oluş mekanizmalarının anlaşılması için popülasyon çalışmaları umut verici olmuştur (50). Farklı popülasyonlarda intronik diziler farklılık göstereceği için intronlardaki delesyon kırılma noktalarının dağılımında farklı olacaktır ancak intron 44, 49 ve 53 de meydana gelen kırılma noktaları istatistiksel olarak daha fazladır (52).

## **2.8. “ READING FRAME ” TEORİSİ**

Distrofin geninde meydana gelen mutasyonların büyüklüğü ve lokalizasyonu ile düzensizliğin şiddeti arasında açık bir şekilde korelasyon görülmez. Bu durumu açıklamak için Monaco ve ark. “Reading Frame” teorisini önermiştir. Bu teoriye göre DMD’ ye neden olan mutasyonlar, mRNA’nın translasyonel okuma çerçevesini bozar ve böyle hastalarda distrofin proteini üretilmez. Fakat BMD’ye sebep olan delesyon ve duplikasyonlar ile mRNA’nın translasyonel okuma çerçevesi devam eder ve böyle hastalarda azalan miktarda, yarı fonksiyonel olan distrofin proteini üretilir. Bu kuralı destekleyen bir çok araştırma vardır fakat istisnalarda olmuştur (22,25,53).

## **2.9. DNA’DA ORTAYA ÇIKAN MUTASYON VE MUTASYON ÇEŞİTLERİ**

Normal şartlar altında DNA molekülü; protein kılıfla sarılmış ve çift sarmalı oluşturan bazlarla birbirine sıkıca tutunmuş, oldukça stabil bir durumdadır. Fakat in vivo olarak; fiziksel ya da kimyasal ajanlar, metabolizma ürünü olan serbest radikaller, alkali ajanlar tarafından ya



da replikasyon sırasında oluşan kusurlar sebebiyle birtakım değişikliğe uğrayabilirler. İşte organizmada gen rekombinasyonunun dışında DNA’da meydana gelen değişikliklere “Mutasyon” denir. Ayrıca genel olarak; kromozomun yapı ve sayısındaki değişiklikler ya da genlerin yapısında oluşan fiziksel ve kimyasal değişmelerin hepsi için Mutasyon (Başkalaşım) terimi kullanılmaktadır (54).

Mutasyonlar, hem somatik hem de germline hücrelerde ortaya çıkar. Germline mutasyonlar bir kuşaktan diğerine devam ederek geçerler ve bunlar kalıtsal hastalıklardan sorumludurlar (55).

Mutasyonları değişik yayınlarda farklı şekilde sınıflandırılmaktadır fakat genel olarak üç kategoride toplanabilirler. Bunlar:

1. Gen mutasyonları: DNA molekülünde gen düzeyinde ortaya çıkan değişikliklerdir.
2. Kromozom mutasyonları: Mikroskopik olarak belirlenebilen yapısal değişikliklerdir.
3. Genom mutasyonu: Kromozom sayılarında görülen artma ya da eksilmeler olarak tanımlanır (11,54,55).

Yukarıda ki sınıflandırmadan başka DNA’da gözlenen mutasyonlar yapı ve etkilerine göre kabaca dört grupta toplanabilir. Bunlar:1-Uzunluk mutasyonları, 2-Nokta mutasyonları, 3-Tersine mutasyonlar, 4-Baskılayıcı mutasyonlardır (54).

1. Uzunluk Mutasyonları :Genetik materyalde meydana gelen artma ya da eksilmeler sonucu ortaya çıkan mutasyonlardır. Bu mutasyonların üç türü bulunmaktadır.

a)Eksilme ya da aradan çıkma (Delesyon) : Kromozomun herhangi bir segmentinin kaybolması ile oluşan genetik madde eksilmesidir.

b) Artma (Duplikasyon) : Kromozomun herhangi bir segmentinin iki katına çıkmasıyla oluşan mutasyondur .

c) Araya girme (İnsersiyon) : Bir ya da daha çok sayıdaki nükleotidin fazladan gen yapısına girmesiyle oluşan mutasyondur .

2. Nokta Mutasyonları : Bir gende bir nükleotid düzeyinde meydana gelen ve genin kromozom üzerindeki yerini değiştirmeyen mutasyonlardır. Nokta mutasyonlarında bir nükleotid baz başka bir nükleotid bazla yer değiştirir. Bir gende meydana gelen nokta mutasyonları; DNA seviyesinde ve protein seviyesinde kodonlar üzerinde bıraktığı etkiye göre iki şekilde incelenir .

A) DNA seviyesinde mutasyonlar:

a) Karşılıklı geçiş ( transisyon türü substitüsyon ) : Bir pirimidin (T, C) bazının başka bir pirimidin bazı ile veya bir pürin (A, G) bazının başka bir pürin bazı ile yer değiştirmesi şeklinde oluşur.

b) Çaprazlama geçiş ( transversiyon türü substitüsyon ) : Bir pürin bazı ile bir pirimidin bazının ya da bir pirimidin bazı ile bir pürin bazının yer değiştirmesi şeklinde oluşur.

B) Protein seviyesinde ya da kodonlar üzerinde bıraktıkları etkiye göre mutasyonlar :

a) Sessiz mutasyon (Silent mutasyon) : DNA baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda değişikliğe neden olur. Sonuçta aminoasit sırası değişmediğinden yani aynı aminoasit için bu aminoasiti taşıyan diğer kodon olduğundan sentezlenen proteinin özelliği değişmez. Örneğin; AGG kodonu CGG kodonu olarak değişmesine rağmen, her iki kodon da **Arginin** amino asitini kodladığı için proteinin özelliği değişmez (Tablo 1).

b) Yanlış anlamlı mutasyon (Missense mutasyon) : Gende bir baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım mRNA kodonunda da bir değişiklik oluşturur ve sonuç olarak farklı bir aminoasit taşınmasına neden olur. Bu da protein molekülünde yapısal değişikliğe sebep olur (Tablo 1).

c) Anlamsız mutasyon (Nonsense mutasyon) : Protein sentezini sonlandıran stop kodonunun kodlanmasına sebep olan ve protein sentezini yarıda bırakan mutasyondur. Proteinin yapısal kısmı oluşmadan protein sentezi durdurulur. Örneğin; Glisin aminoasitini kodlayan CAG kodonunun, stop kodonu olan UAG kodonuna dönüşmesi (Tablo 1).

d) Çerçeve kayması (Frameshift) mutasyonu : Bir gende üç baz çiftinden daha az veya daha çok, küçük delesyonlar şeklinde gerçekleşen mutasyon türüdür. Bu mutasyon sonucunda

mRNA'daki okuma çerçevesinde olan değişiklik sebebi ile önemli kusurlar ortaya çıkabilir (Tablo 1).

**Tablo 1 . Protein Seviyesinde ya da Kodon Üzerinde Meydana Gelen Etkiye Göre Mutasyon Örnekleri.**

DNA Baz Dizisi	mRNA Dizisi	Aminoasit Dizisi	Mutasyon Türü
CTA TTC CGA ACA	GAU AAG GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys	Normal dizi
CTA TTT CGA ACA	GAU AAA GCU UGU	Asp-Lys-Ala-Cys	Silent
CTA CTC CGA ACA	GAU GAG GCU UGU	Asp-Glu-Ala-Cys	Missense
CTA ATC CGA ACA	GAU UAG GCU UGU	Asp-Stop	Nonsense
CTA TTT CCG ACA	GAU AAA GCU UGU	Asp-Lys-Gly -Cys	Frame-shift

3. Tersine Mutasyonlar : Mutant fenotiplerden yabancı tiplerin ya da yabancı tiplerden mutant fenotiplerin oluşmasına neden olan mutasyonlardır. Yabancı tiplerden anormal fenotipleri oluşturan mutasyonlara **ileri mutasyonlar**, anormal fenotiplerden yabancı fenotipleri oluşturan mutasyonlara ise **geri mutasyonlar** adı verilir.

4. Baskılayıcı Mutasyonlar : Bir gende ilk oluşan mutasyondan ayrı bir yerde ortaya çıkan ve ilk mutasyonun etkisini tersine çeviren ikinci mutasyona baskılayıcı mutasyon adı verilir.

a)Gen içi baskılayıcı mutasyonlar (Intragenic supressor mutations ) : Aynı gen içinde bir başka nükleotidin değişmesi ile oluşan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar sonucunda DNA üzerindeki kodonlar değişecek ve yeni bir kayıt sırası ortaya çıkmış olacaktır.

b)Gen dışı baskılayıcı mutasyonlar (Extragenic supressor mutations ) : DNA molekülünde mutasyona uğramış genden başka bir gende oluşan mutasyona gen dışı baskılayıcı mutasyon denir.

## 2.10. MUTASYONUN DURUMUNA GÖRE UYGULANAN TANI YÖNTEMLERİ

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler, kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik yeni yöntemlerin gelişmesine sebep olmuştur. Bu yöntemler; direk yöntemler ve indirek yöntemler olmak üzere başlıca iki başlık altında toplanmaktadır. Direkt yöntemler kalıtsal hastalıkların moleküler temeli bilindiği (mutasyonu bilinen) durumlarda fakat indirek yöntemler moleküler defektin bilinmediği durumlarda kullanılır. İndirek yöntemler kullanılırken prenatal tanı ve taşıyıcılığın belirlenmesi için informatif kişi ve pedigrî analizinde gerek duyulmaktadır (54).

### 2.10.1. Direkt Analiz Yöntemi :

Rekombinant DNA teknolojisinde bir tek gendeki bozukluktan kaynaklanan ve bozukluğun yapısı moleküler düzeyde tanımlanmış olan düzensizliklerde mutasyonların doğrudan belirlenmesi işlemi Direkt Gen Analizi olarak adlandırılır. Direkt analiz yöntemi incelenilen bir kalıtsal hastalık açısından; hasta, taşıyıcı ve sağlam fenotiplerin belirlenmesine ve ayrıca taşıyıcı taramalarına imkan verdiği için, hem doğum öncesi tanı hem de popülasyon taramalarında başarıyla kullanılmaktadır (54).

a) Delesyon Analizleri : DNA'daki küçük delesyonlar PCR ile, büyük delesyonlar Southern blot yöntemi ile ve daha büyük delesyonlar (0.5-10 Mb uzunlukta) ise Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile incelenir (54,56).

b) Nokta Mutasyonu Analizleri : Nokta mutasyonları kalıtsal hastalıklara sebep olmaları açısından delesyonlara oranla daha sık görülür. Nokta mutasyonları hem heterojen hem de çok küçük değişmeler oldukları için tanınmaları daha zordur. Bu mutasyonların analizinde PCR yaygın olarak kullanılmaktadır (54).

c) Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) Problarla Mutasyon Analizi : Meydana gelen spesifik bir mutasyon, herhangi bir restriksiyon enzimin kesim bölgesine rast gelmiyor ise mutasyona uğrayan ve PCR ile çoğaltılan bölge, ASO problemleri (17-30 nükleotid ) ve Dot blot

hibridizasyon uygulanarak hibridizasyon yapılabilir. Çoğaltılan ve incelenecek olan DNA örnekleri Dot blot cihazı kullanılarak bir vakum altında membranlara aktarılır. ASO problemlerinden biri normal, diğeri ise mutant dizi ile komplementerlik gösterir. <sup>32</sup>P ya da kimyasal ajanlarla işaretli ASO problemleri hedef DNA dizisi ile hibridizasyona sokulur. Hibrid DNA parçaları naylon membran üzerinde siyah noktalar halinde görülür. Hibridize fragmentlerin otoradyografi ile belirlenmesinden sonra mutasyon içeren alleller belirlenerek ve hibridizasyon olup olmadığına bakılarak; homozigot, heterozigot ve normal bireyler belirlenir (54,57).

d) Allele Özgü Amplifikasyon Yöntemi ile Mutasyon Analizi (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) : Allele spesifik oligonükleotid problemlerle hibridizasyon yöntemine alternatif ve PCR tabanlı bir mutasyon tarama yöntemidir. Bu yöntemin uygulanması sırasında yaygın mutasyonlarla karakterize patolojilerin moleküler düzeyde tanınması yapılabilmektedir. Bu yöntem ile in-vitro gen amplifikasyonunda kullanılacak olan primerler üç çeşittir. Bunlardan birincisi yaygın primer, diğeri ilgili gen için olası ve yaygın mutasyonlardan birini içeren primer ve üçüncüsü ise normal gen için dizayn edilen primerdir. Mutant ve normal primerler yaygın primerler ile aynı tüpte, iki ayrı primer seti kullanılarak (yaygın/normal ve yaygın/mutant) PCR gerçekleştirilmekte ve ürünler elektroforetik olarak kontrol edilmektedir (54,57).

ARMS yöntemi dot blot yöntemine göre daha kısa sürede sonuç alması ve radyoizotop kullanılmaması gibi nedenlerle avantajlı gibi görülmektedir. Ancak ARMS yönteminde bilinen yaygın mutasyonlardan yola çıkılarak sonuç alındığı için bilinmeyen mutasyonların tanınmasında sıklıkla başvuru olan bir yöntem değildir (54)

### **2.10.2. İndirekt Analiz Yöntemi :**

Restriksiyon enzim teknolojisindeki ilerlemeler ve 1500 civarında Restriksiyon enziminin bulunması, çok sayıda marker loküslerin belirlenmesine imkan sağlamıştır. DNA yapıları ve özellikle protein kodlamayan ve önemli regülatör fonksiyonu bulunmayan DNA bölgeleri kişiden kişiye farklılık gösterir. Bu durumda kişiler arasında restriksiyon enzim ile kesilme sonucu oluşan DNA fragmentlerinde büyük varyasyon olması beklenir. Ancak

yapılan çalışmalarda yapısal loküslerdeki normal varyasyon miktarının çok küçük olduğu gözlenmiştir. İnsan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız, kalıtsal varyasyonlar vardır. Yani bir bireyin genomu her 100-200 nükleotid de 1-2 baz değişimi içermekte fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol açmamaktadır. İnsan genomundaki bu değişikliklere DNA polimorfizmi denir. Polimorfizm örnekleri Mendeliyen kurallara uygun olarak kalıtılırlar. Polimorfizm örnekleri çoğu zaman intronlarda yer alır. Ancak bu değişimler bazen hastalığa neden olan bir genin içinde veya çok yakınında yer alabilirler. Bu durumda polimorfizmin kalıtımı bize hastalığın tanısı için yardımcı olur (54).

İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak üç grupta değerlendirilebilir;

a) Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi ( Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP ) : İlk RFLP tanımı, Kan ve Dozy (1978) tarafından yayınlanmıştır. 1980'de Botstein, White, Skolnic ve Davis insan genomunda tüm genlerin haritalanması için RFLP kullanımını önerdiler .Bunu takip eden çok kısa bir sürede insan genomunun RFLP'ye dayalı bir haritası çıkarılmış oldu (55).

DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanan DNA polimorfizmleri; eğer bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve bu parçalar da analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara **Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)** denir (55).

RFLP analizinin temeli, anne ve babanın iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomunun birbirinden ayırt edilmesine ve aile içinde daha önceden bulunan hasta bir çocuk yardımı ile hangi kromozomun mutasyona uğramış alleli taşıdığına saptanmasına dayanır. Eğer bir birey RFLP için heterozigot ise bu bireye bilgilendirici denir ve dolayısıyla kromozomların nesilden nesile geçmelerini incelemek mümkün hale gelir. RFLP analizinde iki kromozom birbirinden gen içinde veya gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması (+) ya da bulunmaması (-) ile ayrılır. Analizin kesinliği kullanılan polimorfik işaretin, hastalık

loküsüne yakınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalık loküsüne mümkün olduğunca yakın gen içi işaretlerin kullanımı tanının kesinliğini %99'a kadar artırır. Kullanılan genetik işaret ve hastalık loküsü birbirine ne kadar yakınsa rekombinasyon olasılığı o kadar küçüktür ve bu da analiz için avantajdır (54,55).

Homolog kromozomlar, mayoz bölünme esnasında birleşirlerken rekombinasyon denilen parça değişimi olayı gerçekleşir. RFLP genden ne kadar uzakta ise, rekombinasyon olasılığı o kadar artar. Rekombinasyon ünitesi centimorgandır (TH Morgan'a atfen). Bir gene 5cM uzaklıktaki bir işaretleyicinin genetik danışmada kullanılabileceği genel olarak kabul edilir (54,55).

RFLP analizinde çok farklı teknikler kullanılmakla birlikte başlıca iki temel teknik uygulanmaktadır. Bunlardan birisi Southern tekniği, diğeri ise PCR tekniğidir. PCR tekniğinde Southern tekniğine kıyasla daha az miktarda genomik DNA kullanılır ve daha kısa sürede biter (55).

b) Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) : DNA üzerinde ardışık tandem tekrarlayan diziler içinde yer alan, 30-60 baz çiftlik kısa dizilerdir. Bu polimorfizm örnekleri tekrarlayan dizide oluşan varyasyonlarla ortaya çıkar. VNTR'ler RFLP'lere göre daha informatif belirleyicilerdir (54,58).

VNTR loküslerinin tiplendirilmesinde ilk kullanılan yöntemler Southern blot analizine dayalı DNA yöntemleridir, ancak günümüzde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılmaktadır (56).

c) Basit Dizi Tekrarları ( Simple Sequence Repeats, SSR ) : SSR loküsleri, VNTR loküsleri gibi gen içinde şifrelenmeyen dizilerdir ve genellikle kromozomların subtelomerik bölgelerine yerleşmişlerdir. Bunlar da genom içinde dağınık halde bulunurlar ve genetik olarak VNTR'lere benzerler fakat SSR'lerin tekrar birimlerinin uzunluğu 2-5 bp arasındadır. DNA molekülünde yer alan bu basit dizi tekrarları çok küçük diziler olduğu için yalnızca PCR analizi ile tanımlanabilir. SSR örnekleri basit diziler içinde yer alan tekrarlar olması

nedeniyle polimorfik yapıya sahiptirler. Örneğin (AC)<sub>n</sub> tekrarları gibi. Bir SSR içeren DNA molekülünün amplifikasyonu, değişken büyüklükte fragmentler üretir (54,58).

### **2.10.3. DNA'da Yeni Mutasyon Tarama Çalışmaları :**

DNA'da yeni oluşan mutasyonların gösterilmesinde bazı değişik metodlar geliştirilmiştir. Bunlardan DGGE, SSCP ve CCM yöntemleri; DNA baz dizisindeki gerçek değişiklikleri tanımlayamaz ancak yeni mutasyonların saptanmasında ön tarama yöntemi olarak kullanılır. Bu yöntemler, gen (ekson) içinde yer alan herhangi bir mutasyonun yalnızca varlığını belirler. Denatürasyonu yapılan DNA fragmentlerinin birinde bir mutasyon varsa, sekonder yapı değiştiği için mutant fragmentin jeldeki göçü normal fragmente göre farklılık gösterir. Bu ön tanı işleminden sonra mutasyonu taşıyan fragmentin baz dizi analizi uygulanarak kesin tanımlanması yapılır (54,56).

a) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE farklı DNA moleküllerinin birbirinden ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Aralarında tek bir baz farklılığı olan DNA molekülleri bile bu yöntemle birbirlerinden ayrılabilirler. DGGE ile 1000 baz çifti uzunluğunda DNA fragmanları incelenebilir, ancak ideal olarak 500 baz çifti veya daha az sayıdaki fragmanların incelenmesi önerilmektedir (56).

DGGE metodu ile mutasyon analizinin temeli DNA'nın denatürasyonuna yani sarmalın birbirinden ayrılma esasına dayanır. Yöntemin dayandığı en önemli ilkelerden biri dubleksin bir ucunun erimeye başladığı andan itibaren elektroforetik mobilitenin önemli oranda azalmaya başlaması durumudur. Düşük erime noktalarındaki bir nokta mutasyonu dublekslerin açılmasını etkilemektedir. Dolayısıyla bu diziler denatüre edici ajan oranı basamaklı bir şekilde artan jelde, elektroforetik olarak ayırt edilmektedir. Homodubleksler ve heterodublekslerin erime noktası farklı olduğundan, elektroforetik olarak normal ve mutant homodubleksler ile heterodubleksler birbirinden rahatlıkla ayırt edilebilecektir (54,56,57,58).

DGGE, ilgili mutasyon bakımından heterojen bir yapıya sahip olan toplumlarda moleküler patolojilerin aydınlatılmasında ve kanser genetiğinde farklılaşmasının tesbitinde



sıklıkla kullanılan PCR'a dayalı bir methodur. Bu yöntemin dezavantajı, incelenen DNA fragmentinin 500 baz çiftinden küçük olmasındadır (54).

b) Single Strand Conformation Polymorphism ( SSCP ) : SSCP, tek zincir DNA'nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (ikincil yapının) oluşmasına ve poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon içeren DNA molekülü tek bir baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir yapı oluşturacağından nondenatüre jel elektroforezinde normalden farklı yerlerde bantlar gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek bu yöntem ile karşılaştırıldığında normalden farklı bant(lar)ın bulunması örnekte mutasyonun varlığını göstermektedir (56,57,58,59).

SSCP analizi, mutasyon analizi için olduğu kadar polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılan bir yöntemdir. SSCP analizinin duyarlılığı % 35-100 arasında değişir. Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri, incelenen DNA fragmentinin uzunluğudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa, tekniğin duyarlılığında düşme olur. SSCP yöntemi karmaşık bir yöntem olmadığı ve çok fazla sofistike araç-gerece dayanmadığı için oldukça önemli avantajlara sahiptir. Bu avantajlara ek olarak radyoaktif işaretlemenin yanı sıra çoğunlukla floresan işaretli primerlerin ya da gümüş boyanın kullanılmasında yöntemin yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Ancak mutasyonun tam yerinin saptanamaması, tetkik edilen DNA fragmentinin büyüklüğünün sınırlı olması, jel sonuçlarının yorumlanma güçlüğü ve ısı-iyon derişimi gibi faktörlerin optimize edilmesindeki güçlükler SSCP yönteminin dezavantajları olarak değerlendirilmektedir (54,56,59).

c) Chemical Cleavage of Mismatch Method (CCM) : Mutasyonun yaklaşık olarak yerinin belirlenmesi ve taranan amplifiye DNA'da birden fazla mutasyonun olup olmadığının test edilmesi için oldukça yaygın bir yöntem olan, yanlış eşleşme yöntemi İki şekilde uygulanır (54,56,57).

İlk uygulanma şeklinde mutant ve normal tip RNA heterodublekslerinin RNaz enzimi ile kesilmesi ve ürünlerin elektroforezde izlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde normal RNA ve test edilen RNA hibridize edildikten sonra RNaz enzimi ile muamele edilerek

elektroforeze alınır. İkinci uygulama şeklinde ise yanlış eşleşmeler enzimlerle değil, kimyasal maddelerle kesilerek mutasyon belirlenir. Bu yöntemde RNA değil DNA hibridleri kullanılmaktadır. Yöntemin temeli yanlış eşleşme yapmış bazlarla özel kimyasalların reaksiyona girerek, bu bazların piperidinle kesilebilir hale geçmesi temeline dayanır. Timin ve sitozin bazlarının yanlış eşleşmeleri durumunda sırasıyla tekroksid/piperidin ve osmiyum hidroksilamin/piperidin ile kesilir. Sonuç olarak adenin ile guaninin de karşı anlamlı dizilerinde timin ve guanin dönüşümü olacağından mutasyonlar tespit edilebilmektedir (54,56).

d) Heterodubleks Analiz (HDA) Yöntemi : Optimizasyon, uygulanabilirlik ve sonuçların değerlendirilmesi açısından heterodubleks analizi SSCP'ye benzemektedir ve onunla benzer avantaj ve dezavantajları taşımaktadır. Nokta mutasyonlarının taranmasında SSCP ve HDA yöntemlerinin birlikte kullanılması, yöntem dezavantajlarını ortadan kaldırmakta ve yaklaşık % 95'lere varan oranda mutasyon tanımlanması yapılabilmektedir. Heterodubleks analizinde normal ve mutant DNA moleküllerinin ısı ile denatüre edilip, tekrar renatürasyonu ile heterodubleks molekülleri oluşur. Denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerde heterodubleks ve homodubleks moleküller farklı mobiliteler gösterdiklerinden mutant DNA tanımlanması yapılabilmektedir (54,56,57).

e) Protein Truncation Test (PTT) Yöntemi : Bu yöntem PCR'ın transkripsiyon ve translasyon ile kombinasyonuna dayalıdır ve bu yöntemde *in vitro* RNA ve protein sentezi yapılmakta, sentez edilen protein SDS-PAGE'deki mobilitesi dikkate alınarak sonuca gidilmektedir. Diğer yöntemlere göre daha az sıklıkla kullanılan bu yöntem rutin amaçtan çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır ve mutant gen-mutant ürün karşılaştırması açısından uygun bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (54,60).

## 2.11. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( Polimerase Chain Reaction, PCR ) yöntemi, ilk kez 1985'de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda, tanıda yeni bir çığır açmıştır. ABD'de Henry A. Erlich, Kerry Mullis,

Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir ve bu buluşundan dolayı Kerry Mullis 1993 yılı nobel kimya ödülüne hak kazanmıştır (55).

Poimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi, bir organizma veya mutant gene ilişkin normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA'nın *in vitro* çoğaltılmasına imkan veren bir yöntemdir. Yani PCR bir çeşit *in vitro* klonlamadır. PCR uygulamasının amacı, az miktardaki bir materyalde özgül bir gen ya da gen bölgesini çoğaltmak ve daha detaylı incelemeler için yeterli genetik materyali sağlamaktır (54,55).

PCR yönteminin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'in gerçekleşebilmesi için ortamda ;

- 1- DNA örneği,
- 2- Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik oligonükleotid primer,
- 2- dNTP'ler (A,T,G,C),
- 3- Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
- 4- Uygun pH ve iyon koşullarını ( $Mg^{+2}$ ) sağlayan tampon karışımı olmalıdır (54,55,56).

Reaksiyondaki her döngü 3 evreden oluşmaktadır. Bu evreler; denatürasyon evresi, primer bağlanması (annealing) evresi ve primerlerin uzaması (extension) evresidir (54,55,58).

1- Denatürasyon evresi : Bu evrede çoğaltılmak istenen çift sarmallı DNA, sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmallı hale getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için uygulanabilecek fiziksel ve kimyasal yöntemler olmasına karşın 95-100 °C ye kadar ısıtmak en basit ve etkin bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Tipik denatürasyon süreleri 95 °C'de 30sn. ya da 97 °C'de 15 sn. dir. Eğer örnekte çoğaltılmak istenen genetik materyal RNA ise; önce revers transkriptaz enzimi ile DNA kopyası oluşturulur, sonra bu kopya primere kalıplık eder.

2- Primer bağlanması (annealing) evresi : Primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotid, denatürasyon evresinde elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile hibridize olur. Primerler, orijinal (hedef) DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Bu nedenle primer (öncü ) olarak adlandırılmıştır. PCR uygulamalarında kullanılan primerler, minimum 17-19 nükleotidden oluşmuş oligomerlerdir. Uygulamada genellikle 0.1-0.5  $\mu$ M arası primer konsantrasyonları optimal değerler olarak kabul edilir. Her bir primer, örnekteki orijinal DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısı ve çoğaltılacak olan DNA bölgesine özgüdür. Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60  $^{\circ}$ C' ye düşürülür. Primer eşleşmesi ve bağlanması için gerekli olan ısı ve süre amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluğuna bağlıdır. Eşleşmenin sonuç verdiği deney ortamı ısısı 55-72  $^{\circ}$ C iken 0.2  $\mu$ M. Primer konsantrasyonunda eşleşme için birkaç saniyelik süre yeterlidir.

3- Primerlerin uzaması (extension) ve amplifikasyon evresi : Annealing tamamlandıktan sonra primer, hibridleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim DNA sentezi için daha yüksek optimum ısıya (  $T_{opt}$  ) sahiptir. DNA kalıbının yapısına bağlı olarak Taq polimeraz enzimi, enzim molekülü başına saniyede 150 nükleotide yaklaşan spesifik aktivite ile 75-80  $^{\circ}$ C arasında  $T_{opt}$  'a sahiptir. Nükleotidleri orijinal DNA sarmalına orijinal komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak görev yaparlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75  $^{\circ}$ C 'de ısı uygulanır. 72  $^{\circ}$ C 'de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72  $^{\circ}$ C 'de bir dakikalık uzama süresi 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir.

PCR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan otomatik aletler (thermocycler) geliştirilmiştir. PCR uygulamalarında üç evre bir döngü olarak kabul edilir. Bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı " n " olarak kabul edilirse;  $2^n$  çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir.

PCR'ın kullanım alanları şunlardır ;

- 1- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında,
- 2- Prenatal tanıda,
- 3- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında,
- 4- Adli tıpta,
- 5- Onkogenesisin araştırılmasında,
- 6- Probe'ların oluşturulması, klonlama ve gen ekspresyon araştırmalarında,
- 7- DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- 8- Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- 9- Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılmasında,
- 10- İnvitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyonun gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanmasında,
- 11- DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir (55).

Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu : Bu tür PCR yönteminde, değişik sayıda primer çiftleri aynı ortamda kullanılır. Özellikle büyük genlerin analizlerinde, spesifik baz değişimlerini veya delesyon ve insersiyonları incelemek için kullanılabilir. Bu PCR uygulaması; emek, zaman, maliyetten tasarruf sağlar ve kontaminasyon riskinide minimale indirir. İlk kez Duchenne Müsküler Distrofi' de başarı ile uygulanan Multipleks PCR yöntemi, bugün değişik hastalıkların tanısında uygulama alanı bulmuştur (27,54,55,56).

### 3. MATERİYAL VE METOD

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Noroloji AB.D. ve Çocuk Sağ. ve Hastalıkları A.B.D'ına başvuran, 10 farklı aileye ait, klinik ve laboratuvar bulguları sonucu DMD tanısı almış 30 hasta birey ve BMD tanısı konmuş 10 hasta bireyde delesyon mutasyonu araştırılmıştır. Ayrıca bu 40 hastanın anne, teyze, kız kardeşleri gibi ulaşabildiğimiz 66 bayan akrabası taşıyıcılık analizi için değerlendirilmiştir.

#### 3.1. MATERİYAL

##### 3.1.1. DNA İzolasyon Tamponları :

###### Liziz Tamponu (Reaktif A) pH 8.0

10 mM TRİS-HCL (Sigma)

320 mM Sucrose (Sigma)

5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma)

Otoklav edilir

%1 Triton-X 100 (Sigma) eklenir, +4 °C' de saklanır.

###### Reaktif B pH 8.0

400 mM TRİS-HCL

60 mM EDTA (Sigma)

150 mM NaCl (Sigma)

Otoklav edilir

%1 SDS eklenir (Sigma), oda ısısında saklanır.

###### Sodium Perchlorate

5 M Sodium Perchlorate (MERCK)

Otoklav yapılmaz, oda ısısında saklanır.

### 3.1.2. DNA Amplifikasyon Tamponları :

#### 10x PCR Tamponu (MBI Fermentas)

750 mM tris-HCl (pH 8.8, 25 °C de)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

%0.1 Tween 20

-20 °C' de saklanır.

Taq DNA Polimeraz Enzimi (MBI Fermentas) : -20 °C' de saklanır

#### dNTP Karışımı (pH 7.4)

2 mM dATP (Sigma)

2 mM dTTP (Sigma)

2 mM dCTP (Sigma)

2mM dGTP (Sigma)

-20°C' de saklanır.

Magnesium Chloride (MBI Fermentas) : 25mM, -20°C' de saklanır.

Amplifikasyon Primerleri : Multipleks I gen amplifikasyon primerleri Tablo 2'de, Multipleks II gen amplifikasyon primerleri Tablo 3'de ve polimorfik bölgelere ait primerler Tablo 4'de sunulmuştur.

Formamide (Sigma) Oda ısısında saklanır.

Distile Su (Sigma): Oda ısısında saklanır.

Mineral Oil (Sigma): Oda ısısında saklanır.

### 3.1.3. Agarose Jel Elektroforez Tamponları :

#### 10 X TBE Elektroforez Tamponu

90 mM Tris-Borate (Sigma)

10 mM Sodium-EDTA pH 8:3 (MERCK)

Otoklav edilir, oda ısısında saklanır. 1X TBE ve 0.6 X TBE olarak kullanılır.

6X Yükleme Tamponu (Sigma)

Bromphenol blue (%0.25 w/v)

Xylene cyanole FF (% 0.25 w/v)

Sucrose (%40 w/v)

2-8 °C'de saklanır.

Etidium Bromür (Amresco) : 10 mg/ml konsantrasyonlu solüsyon, koyu renk bir şişede oda ısısında saklanır.

100 bp Moleküler Marker (Amresco): Baz çiftleri; 3000, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. -20 °C' de saklanır.

50 bp Moleküler Marker (Sigma): Baz çiftleri; 3147, 2647, 900, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 100, 50. -20 °C' de saklanır.

ΦX174 DNA Marker Hae III (Sigma) : Baz çiftleri; 3538, 1078, 872, 603, 310, 281-271, 234, 194, 118, 72. -20 °C' de saklanır.

### 3.1.4. Restriksiyon enzimleri

Xmn I Enzimi ( Pdm I ) (MBI Fermentas) : -20 °C'de saklanır

Xmn I Enzim Buffer (MBI Fermentas)

33 mM Tris-acetate (pH 7.9)

10 mM Magnesium Acetate

66 mM Potassium Acetate

0.1 mg/ml BSA

-20 °C'de saklanır.

Bam HI Enzimi (MBI Fermentas): -20 °C'de saklanır.



Bam HI Enzim Buffer (MBI Fermentas)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM MgCl<sub>2</sub>

100mM KCl

% 0.02 Triton X-100

0.1 mg/ml BSA

-20 °C'de saklanır.

Taq I Enzimi (MBI Fermentas) : -20 °C'de saklanır.

Taq I Enzim Buffer (MBI Fermentas)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM NaCl

0.1 mg/ml BSA

-20 °C'de saklanır.

**3.1.5. Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları**

%40'lık Akrilamid Stok Solüsyonu (19:1) : 19 akrilamid (Sigma) : 1 bisakrilamid (sigma) +4 °C'de saklanır, filitre edilerek kullanılır.

%40'lık Akrilamid Stok Solüsyonu (29:1) : 29 akrilamid : 1 bisakrilamid +4 °C'de saklanılır, filitre edilerek kullanılır.

% 12'lik Poliakrilamid Jel Tamponu :

Akrilamid-bisakrilamid %40	18 ml
10 X TBE	6 ml
Amonyum persülfat (% 10) (Sigma)	200 µl
TEMED (Sigma)	30 µl
Distile su	36 ml

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon Yöntemi

Hücre Preperasyonu : 5-10 ml kan, sodyum-EDTA' lı tüplere alındı. Santrifüj 4°C için ön soğutmaya hazırlandı. 50 ml' lik polypropylene santrifüj tüplerine kan örnekleri aktarıldı ve üzerine 40 ml liziz tamponu (Reaktif A) eklendi. Elle hafifçe iki dakikalık bir süre için karıştırıldı. 4°C ye ayarlanmış santrifüjde 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Hücrelere zarar vermeden süpernatant döküldü.

Hücre Lizisi : Tüplere 2 ml Reaktif B eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücre çöktellerinin karışması sağlandı. Bu süspansiyon 15 ml'lik kapaklı polypropylen tüplerine aktarıldı.

Deproteinizasyon : Her bir tüpe 5M' lik Sodyum Perklorat' tan 500 µl eklendi. Tüpler kan döndürme (rotary mix) cihazına kondu ve oda ısısında 15 dakika karışması sağlandı. Daha sonra 65 °C' lik sıcak blokta 30 dakika inkübe edildi.

DNA Ekstraksiyonu : Her bir tüpe daha önceden -20 °C' de bulunan Kloroform' den 2ml eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında rotary mix'e konarak karışması sağlandı ve 1400 xg' de 10 dakika santrifüj edildi.

DNA Presipitasyonu : DNA içeren faz (üstteki berrak tabaka) plastik pastör pipetleri kullanılarak 15 ml' lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. DNA içeren volümün iki katı kadar soğuk etanol (önceden soğutulmuş) ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak DNA' nın presipite olması sağlandı. Plastik öze yardımı ile presipite olan DNA alındı ve 3-5 dakika dışarda bekletilerek kuruması beklendi. Daha sonra DNA' nın bulunduğu plastik öze kesilerek 1.5 ml' lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 200 µl distile su konuldu.

### 3.2.2. DNA Amplifikasyonu

#### Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmaya 10 aileye ait klinik olarak DMD veya BMD tanısı almış 40 hasta birey alındı. Hastalara ait DNA'lar Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyonun yapılması için genin 5' ucu ve merkezine yakın delesyon yönünden sıcak bölgede bulunan 19 primer çifti kullanıldı. Delesyon analizinde kullanılan primerler Multipleks I (Ekson 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48,51) ve Multipleks II (promoterr bölge, ekson 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60) olarak iki ayrı grup şeklinde işlem yapıldı (26,27,28,61).

#### Multipleks I için PCR ortamı:

Final volüm 50 µl olacak şekilde;

Distile su.....	9.5 µl
10XPCR Buffer.....	5 µl
dNTP Mix (2 mM).....	10 µl
Primer F (her bir ekson için).....	1 µl
Primer R (her bir ekson için).....	1 µl
MgCl <sub>2</sub> .....	6 µl
Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....	0.5 µl
Genomik DNA.....	1µl

#### Multipleks II için PCR ortamı:

Final volüm 50 µl olacak şekilde

Distile su.....	7.5 µl
10XPCR Buffer.....	5 µl
dNTP Mix (2 mM).....	10 µl
Primer F (her bir ekson için).....	1 µl
Primer R (her bir ekson için).....	1 µl
MgCl <sub>2</sub> .....	6 µl
Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....	0.5 µl
Genomik DNA.....	1µl

Reaksiyonu buharlaşmadan korumak için tüplere alınmış PCR karışımının üzerine ince bir tabaka şeklinde mineral oil kondu ve DNA bu yağ tabakasını geçecek şekilde PCR karışımına en son eklendi. Multipleks I ve Multipleks II için yukarıdaki şekilde PCR reaksiyonları hazırlandı ve her ikisinde aynı PCR şartlarında otomatik bir Thermal Cycler (Techne Cyclogene) kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

PCR şartları:

94 °C	5 dak.	1 döngü
94 °C	48 sn.	
60 °C	48 sn.	30 döngü
72 °C	3 dak.	
72 °C	7 dak.	1 döngü

Çalışmamızda her hangi bir kontaminasyon olup olmadığını anlamak için negatif kontrol olarak içine DNA bırakılmayan bir PCR karışımı hazırlandı ve böylece kontaminasyon riski de test edildi. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda DNA kontaminasyonu hiç görülmedi. Ayrıca delesyonların doğru değerlendirilmesi amacıyla kontrol olarak sağlıklı bir bireye ait DNA kullanıldı.

Örnekler Agarose jel elektroforezi yapılana kadar +4 °C' de saklandı.

**Tablo 2.** Multipleks I Gen Amplifikasyon Primerleri.

Ekson	Primer Dizisi	PCR Ürünü
4F 4R	5' -TTG TCG GTC TCC TGC TGG TCA GTG -3' 5'- CAA AGC CCT CAC TCA AAC ATG AAG C-3'	196 bp
8F 8R	5'-GTC CTT TAC ACA CTT TAC CTG TTG AG-3' 5'-GGC CTC ATT CTC ATG TTC TAA TTA G-3'	360 bp
12F 12R	5'-GAT AGT GGG CTT TAC TTA CAT CCT TC-3' 5'-GAA AGC ACG CAA CAT AAA GAT ACA CCT-3'	331 bp
17F 17R	5'-GAC TTT CGA TGT TGA GAT TAC TTT CCC-3' 5'-AAG CTT GAG ATG CTC TCA CCT TTT CC-3'	416 bp
19F 19R	5'-TTC TAC CAC ATC CCA TTT TCT TCC C-3' 5'-GAT GGC AAA AGT GTT GAG AAA AAG TC-3'	459 bp
44F 44R	5'-CTT ATC CAT ATG CTT TTA CCT GCA-3' 5'-TCC ATC ACC CTT CAG AAC CTG ATC T-3'	268 bp
45F 45R	5'-AAA CAT GGA ACA TCC TTG TGG GGA C-3' 5'-CAT TCC TAT TAG ATC TGT CGC CCT AC-3'	547 bp
48F 48R	5'-TTG AAT ACA TTG GTT AAA TCC CAA CAT G-3' 5'-CCT GAA TAA AGT CTT CCT TAC CAC AC-3'	506 bp
51F 51R	5'-GAA ATT GGC TCT TTA GCT TGT GTT C-3' 5'-GGA GAG TAA AGT GAT TGG TGG AAA ATC-3'	388 bp

**Tablo 3. Multipleks II Gen Amplifikasyon Primerleri.**

Ekson	Primer Dizisi	PCR Ürünü
PmF PmR	5'-GAA GAT CTA GAC AGT GGA TAC ATA ACA AAT GCA TG-3' 5'-TTC TCC GAA GGT AAT TGC CTC CCA GAT CTG AGT CC-3'	535 bp
3F 3R	5'-TCA TCC ATC ATC TTC GGC AGA TTA A-3' 5'-CAG GCG GTA GAG TAT GCC AAA TGA AAA TCA-3'	410 bp
6F 6R	5'-CCA CAT GTA GGT CAA AAA TGT AAT GAA-3' 5'-GTC TCA GTA ATC TTC TTA CCT ATG ACT ATG G-3'	202 bp
13F 13R	5'-AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA AT-3' 5'-CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G-3'	238 bp
43F 43R	5'-GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG-3' 5'-ATA TAT GTG TTA CCT ACC CTT GTC GGT CC-3'	357 bp
47F 47R	5'-CGT TGT TGC ATT TGT CTG TTT CAG TTA C-3' 5'-GTC TAA CCT TTA TCC ACT GGA GAT TTG-3'	181 bp
49F 49R	5'-GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG-3' 5'-GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C-3'	439 bp
50F 50R	5'-CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T-3' 5'-TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G-3'	271 bp
52F 52R	5'-AAT GCA GGA TTT GGA ACA GAG GCG TCC-3' 5'-TTC GAT CCG TAA TGA TTG TTC TAG CCT C-3'	113 bp
60F 60R	5'-AGG AGA AAT TGC GCC TCT GAA AGA GAA CG-3' 5'-CTG CAG AAG CTT CCA TCT GGT GTT CAG G-3'	139 bp

### Polimorfik Bölgelerde Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hasta bireylerin anne ve kız kardeşlerine ve ayrıca ulaşabildiğimiz diğer bayan akrabalarına ait DNA'lar, taşıyıcı olabilme olasılıkları göz önüne alınarak dört polimorfik bölge (pERT 87-15/XmnI, pERT 87-15/BamHI, pERT 87-8/TaqI ve I38/TaqI) açısından incelendi. Bu bölgelerin her biri için ayrı bir PCR işlemi yapıldı. Bu dört polimorfik bölgenin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile analizinin yapılabilmesi için gerekli primer dizileri tablo 4'de verilmiştir (7,40,62).

**Tablo 4.** Polimorfik Bölgelerin PCR Yöntemi ile Analizinde Kullanılan Primer Dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi	PCR ürünü
PERT 87.15/XmnI/F PERT 87.15/XmnI/R	5'-GAC TGG AGC AAG GGT CGC C-3' 5'-CTG ATG AAC AAT TTC CCT TTC ATT CCA G-3'	740 bp
PERT 87.15/BamHI/F PERT 87.15/BamHI/R	5'-CTG ATC AGG ATC CAG TAA CGG AAA GTG C-3' 5'-CTG ATG AAA TAA TTC TGA ATA GTC ACA AAA AG-3'	226 bp
PERT 87.8/TaqI/F PERT 87.8/TaqI/R	5'-GTC AGT TGG TCA GTA AAA GCC-3' 5'-CAG ATC AGT CGA CCA ATT AAA ACC ACA GCA G-3'	155 bp
138/TaqI/F 138/TaqI/R	5'-ATT CAG CAG GGG GTG AAT CGG A-3' 5'-GTT GTA AGT TGT CTC CTC TTT GC-3'	2500 bp

1 - pERT 87-15/XmnI bölgesi için PCR ortamı :

Final volüm 50 µl olacak şekilde

Distile su.....29.5µl

10XPCR Buffer.....5 µl

dNTP Mix (2 mM).....5 µl

Primer F .....0.5 µl

Primer R .....0.5 µl

MgCl<sub>2</sub>.....5 µl

Formamide.....2 µl

Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....0.5 µl

Genomik DNA.....2 µl

PCR Şartları :

94 °C	4 dak.	1 döngü
94 °C	40 sn.	
51 °C	40 sn.	37 döngü
65 °C	4 dak.	
72 °C	7 dak.	1 döngü

2 - pERT 87-15/BamHI bölgesi için PCR ortamı :

Final volüm 50 µl olacak şekilde

Distile su.....	29.5µl
10XPCR Buffer.....	5 µl
dNTP Mix (2 mM).....	5 µl
Primer F .....	0.5 µl
Primer R .....	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> .....	5 µl
Formamide.....	2 µl
Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....	0.5 µl
Genomik DNA.....	2 µl

PCR Şartları :

94 °C	4 dak.	1 döngü
94 °C	48 sn.	
60 °C	48 sn.	35 döngü
72 °C	3 dak.	
72 °C	7 dak.	1 döngü

3 - pERT 87-8/Taq I bölgesi için PCR ortamı :

Final volüm 50 µl olacak şekilde

Distile su.....	29.5µl
10XPCR Buffer.....	5 µl



dNTP Mix (2 mM).....5 µl  
Primer F .....0.5 µl  
Primer R .....0.5 µl  
MgCl<sub>2</sub>.....5 µl  
Formamide.....2 µl  
Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....0.5 µl  
Genomik DNA.....2 µl

PCR Şartları :

94 °C 4 dak. 1 döngü  
94 °C 48 sn.  
61 °C 48 sn. 35 döngü  
72 °C 3 dak.  
72 °C 7 dak. 1 döngü

4 - I 38/Taq I bölgesi için PCR ortamı :

Final volüm 50 µl olacak şekilde

Distile su.....26.5µl  
10XPCR Buffer.....5 µl  
dNTP Mix (2 mM).....10 µl  
Primer F .....0.5 µl  
Primer R .....0.5 µl  
MgCl<sub>2</sub>.....5 µl  
Taq DNA Polimeraz (2-5unit/µl).....0.5 µl  
Genomik DNA.....2 µl

PCR Şartları :

95 °C 5 dak. 1 döngü  
95 °C 30 sn.  
61.5 °C 2 dak.15 sn. 30 döngü  
62 °C 10 dak.  
72 °C 7 dak. 1 döngü

Hazırlanan PCR ortamlarının tümünde reaksiyonu buharlaşmadan korumak için tüplere alınmış, PCR karışımının üzerine ince bir tabaka şeklinde mineral oil konmuş ve DNA bu yağ tabakasını geçecek şekilde PCR karışımına en son eklenmiştir. Ayrıca her PCR karışımında kontaminasyon riskini değerlendirmek için DNA konulmamış bir negatif kontrol hazırlanmıştır. Yapılan PCR işlemlerinin hiç birinde multipleks polimeraz zincir reaksiyonunda olduğu gibi kontaminasyona rastlanmamıştır. Amplifikasyon yukarıda verilen PCR şartlarında Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örnekler Agarose jel elektroforezi yapılabildiği kadar +4 °C de saklanmıştır.

### 3.2.3. Agarose Jel Elektroforezi :

Amplifikasyonu yapılan Multipleks I ve II PCR ürünleri, %2'lik Agarose jelde değerlendirilmiştir. Polimorfik bölgeler için ise pERT 87-15/BamHI ve pERT 87-8/TaqI bölgesine ait amplifikasyonu yapılmış PCR ürünleri %2'lik Agarose jelde, pERT 87-15/XmnI ve I38/TaqI bölgesine ait amplifikasyonu yapılmış PCR ürünleri %1'lik agarose jelde izlenmiştir.

#### Agarose Jelin Hazırlanması :

%2'lik Agarose jel : 2 gr. Agarose 100ml 1 X TBE (pH 8.3) tamponunda çözüldü.

%1'lik Agarose jel : 1 gr. Agarose 100ml 1 X TBE (pH 8.3) tamponunda çözüldü.

%1'lik NuSieve jel: 1 gr.NuSieve Agarose (3 NuSieve : 1 Standart) 100 ml 1XTBE (pH 8.3) tamponunda çözüldü.

Agarose jel 1XTBE tamponunda kaynatılarak hazırlandı ve daha sonra 60-65 °C' ye kadar soğutuldu. Düz bir zemin üzerinde dengeli olması sağlanarak bırakılmış plak üzerine taraklar yerleştirildi ve jel bu plağa bir kerede döküldü. 15-20 dakika donması için beklendi.

Tarağı dikkatli bir şekilde çıkarılan plak, 1XTBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. 8 µl PCR ürününü, 2 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılarak sıra ile jel üzerindeki kuyucuklara aplikasyon yapıldı. Agarose jel bu tampon içerisinde yaklaşık olarak

45-60 dakika 90 voltta yürütüldü. Ethidium bromide ile boyanan jel, UV transillüminatör üzerinde izlenerek değerlendirildi ve daha sonra fotoğrafları çekildi.

Doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için jelin ilk kuyucuğuna DNA size marker yüklendi.

### 3.2.4. PCR-RFLP Analizi

Hasta bireylerin anne ve kız kardeşleri gibi bayan akrabalarının pERT 87-15/XmnI, pERT 87-15/BamHI, pERT 87-8/Taq I ve I 38/Taq I polimorfik bölgeleri açısından değerlendirilmesi; PCR ürününün Restriksiyon Enzim Digestiyonu ile gerçekleştirildi. Bunun için her bölge için ayrı ayrı olacak şekilde amplifikasyonu yapılan PCR ürünlerinin uygun restriksiyon enzimleri ile digestiyonu yapıldı.

#### Restriksiyon Enzim Digestiyonu :

pERT 87-15/ XmnI bölgesi için; XmnI enzimi buffer ile 2X olacak şekilde dilue edildi ve bu karışım (2µl) 8 µl PCR ürününe eklendi. 18 saat 37 °C'de inkübe edildi.

pERT 87-15/BamHI bölgesi için; BamHI enzimi buffer ile 2X olacak şekilde dilue edildi ve bu karışım (2µl) 8 µl PCR ürününe eklendi. 18 saat 37 °C'de inkübe edildi.

pERT 87-8/TaqI bölgesi için; Taq I enzimi buffer ile 2X olacak şekilde dilue edildi ve bu karışım (2µl) 8 µl PCR ürününe eklendi. 3 saat 65 °C'de inkübe edildi.

I 38/TaqI Bölgesi; Taq I enzimi buffer ile 2X olacak şekilde dilue edildi ve bu karışım (2µl) 18 µl PCR ürününe eklendi. 3 saat 65 °C'de inkübe edildi.

İnkübasyon süresi bittiğinde enzim aktivitesini sonlandırmak için 5 dakika -20°C'de tutuldu. Digestiyonu yapılan ürünler elektroforez işlemine kadar +4 °C'de bekletildi. pERT 87-15/XmnI ve I 38/Taq I bölgesine ait digestiyon ürünleri %2'lik NuSieve jelde

değerlendirildi. PERT87-15/BamHI ve pERT 87-8/Taq I bölgesine ait digestiyon ürünleri %12'lik poliakrilamid jelde değerlendirildi (7,40).

### 3.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

pERT87-15/Bam HI bölgesine ait digestiyon ürünleri 19:1 %12'lik poliakrilamid jelde, pERT 87-8/Taq I bölgesine ait digestiyon ürünleri ise 29:1 %12'lik poliakrilamid jelde değerlendirildi.

Boyutları 10X10 olan bir çift cam, deterjan ile çok iyi yıkandıktan sonra etil alkol ile silindi. Camların arasına kenarlara gelecek şekilde 1 mm kalınlığında "spacer" lar yerleştirildi ve iki cam kısıkaçlarla birbirine tutturuldu. Materyal kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan jel, camların üst kısımları farklı uzunlukta olduğu için uzun olan kısım zemine 45° açı oluşturacak şekilde eğilerek iki cam arasına döküldü. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi ve jel dökülür dökülmez tarak yerleştirildi. Bir miktar jel bir ependorf tüpüne alınarak jelin donup donmadığı kontrol edildi. Jel donduktan sonra elektroforez tankı 0.6XTBE tamponu ile dolduruldu ve camlar tanka dikey olacak şekilde yerleştirildi. Tarak dikkatli bir şekilde jelden çıkarıldı. Oluşan kuyular tamponla yıkanarak jel artıkları temizlendi.

Restriksiyon enzimi ile digestiyonu yapılmış PCR ürününden 5 µl, 2 µl jel loading ile karıştırılarak her bir kuyuya ayrı ayrı aplik edildi. İlk kuyuya DNA size marker yüklendi. 150 volt akımda yaklaşık olarak sekiz saat +4 °C'de yürütüldü ve daha sonra gümüş boyama yöntemi ile boyanarak değerlendirildi.

#### Gümüş Boyama Yöntemi :

Gümüş boyamada kullanılacak solüsyonlar ;

Solüsyon 1 : % 10 etanol-% 0.5 asetik asit solüsyonu.

Solüsyon 2 . % 0.1 Gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) solüsyonu.

Solüsyon 3 : Taze hazırlanmış % 1.5 Sodyum hidroksit (NaOH) ve % 0.15 Formaldehit solüsyonu.

Solüsyon 4 : % 0.75 Sodyum karbonat solüsyonu.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra iki cam birbirinden ayrıldı ve jel temiz bir kaba alındı. Solüsyon 1’de 3 dakika süre ile yavaş yavaş karıştırılarak fikse edildi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi ve solüsyon 2 içine alınarak 15 dakika boyanması sağlandı. Sürenin bitiminden sonra bu solüsyon tekrar kullanılmak üzere boş bir şişeye alındı ve +4°C’de saklandı. Jel bekletilmeden distile su ile yıkandı ve taze hazırlanmış solüsyon 3’de 20 dakika inkübe edilerek bantlar görünür hale getirildi. Daha sonra jel solüsyon 4’te 10 dakika bekletilerek fikse edildi. (Böylece boyanan jelin uzun süre saklanması mümkün olur.) Boyanan jel ışık altında değerlendirildi ve fotoğrafı çekildi.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmaya birbirleriyle akraba olmayan 10 farklı aileye ait; klinik ve laboratuvar bulguları sonucu DMD veya BMD tanısı konmuş toplam 40 hasta birey ve onların anne, teyze, kız kardeşleri gibi ulaşabildiğimiz 66 bayan akrabası alınmıştır.

Hasta bireylere ait DNA'lar multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak amplifiye edilmiş ve distrofin genindeki delesyon mutasyonları araştırılmıştır. Bu amaç ile PCR amplifikasyonu için distrofin genindeki delesyonların en sık rastlandığı iki bölgede (iki hotspot) bulunan 19 eksona ait primerler kullanılmıştır. Multipleks I ile 4, 8, 12, 17,19, 44, 45, 48, 51 nolu eksonlara ait primerler ve Multipleks II ile Pm, , 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60 nolu eksonlara ait primerler kullanılmıştır Multipleks I gen amplifikasyon primer seti ve Multipleks II gen amplifikasyon primer seti kullanılarak iki ayrı PCR işlemi yapılmıştır. Böylece Multipleks I gen amplifikasyon primer seti ile 9 ekson ve Multipleks II gen amplifikasyon primer seti ile bir promoter bölge ve 9 ekson bir defada amplifiye edilmiştir.

Bu değerlendirme sonucunda; Tablo 5'te görüldüğü gibi; aynı ailenin bireyleri olan 1 ve 2 numaralı hastalarda ekson 48, 49, 50, 51 ve 52 olmak üzere 5 ekson delesyonu, 3-12 nolu başka bir ailenin hasta bireylerinde ekson 43 delesyonu ve 13-15 nolu başka bir ailenin hasta bireylerinde ise ekson 3, 4, 6, 8, 12, 13 olmak üzere 6 ekson delesyonu tespit edilmiştir. Promoter bölgede ve ekson 17, 19, 44, 45, 47 ve 60'da delesyon görülmemiştir.

Multipleks I ve Multipleks II primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda tespit edilen delesyonlar, gende delesyonların sık görüldüğü 5' (ekson 2-22) ve sentral (ekson 43-52) bölgelerinde bulunmuştur.

**Tablo 5.** Hastalarda Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi Kullanılarak Tespit Edilen Delesyonlar.

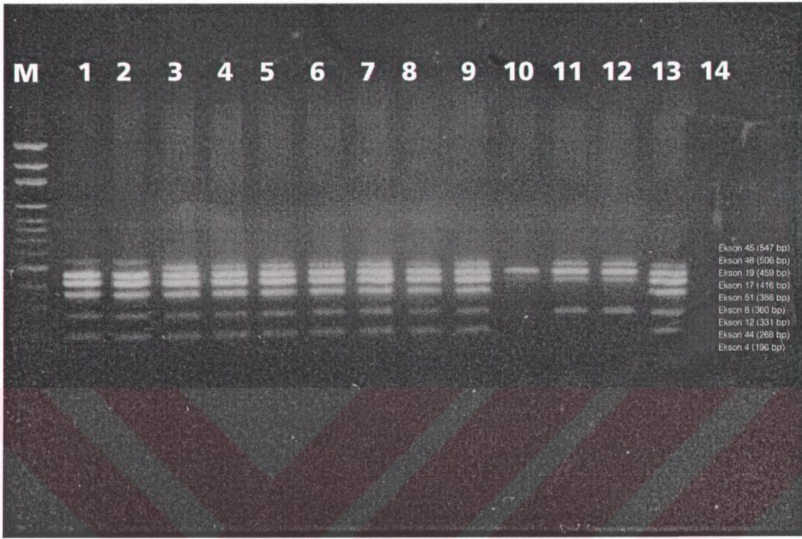
Hasta Numarası	Delesyona Uğrayan Eksonlar	
	Multipleks I	Multipleks II
1 <sup>a</sup>	48,51	49,50,52
2 <sup>a</sup>	48,51	49,50,52
3 <sup>b</sup>	-	43
4 <sup>b</sup>	-	43
5 <sup>b</sup>	-	43
6 <sup>b</sup>	-	43
7 <sup>b</sup>	-	43
8 <sup>b</sup>	-	43
9 <sup>b</sup>	-	43
10 <sup>b</sup>	-	43
11 <sup>b</sup>	-	43
12 <sup>b</sup>	-	43
13 <sup>c</sup>	4,8,12	3,6,13
14 <sup>c</sup>	4,8,12	3,6,13
15 <sup>c</sup>	4,8,12	3,6,13

<sup>a</sup> : Aynı ailede bulunan hasta bireyler,

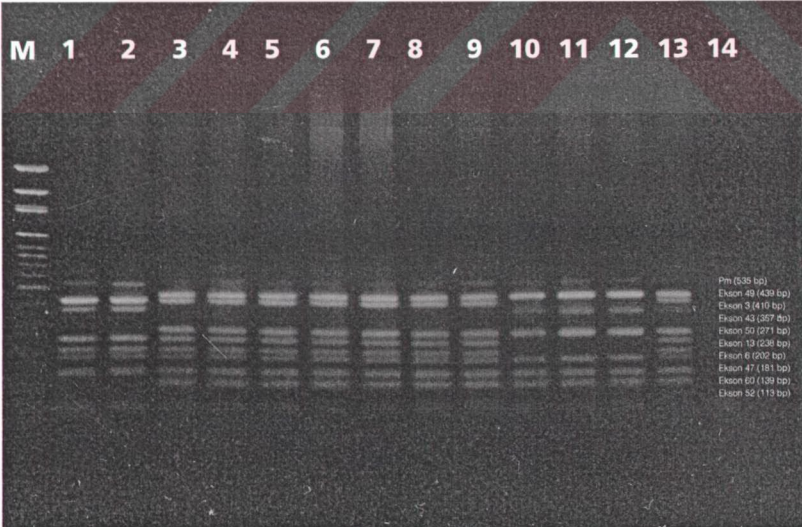
<sup>b</sup> : Aynı ailede bulunan hasta bireyleri,

<sup>c</sup> : Aynı ailede bulunan hasta bireyleri ifade etmektedir.

Multipleks I gen amplifikasyon primer seti tek başına kullanıldığında 40 hastanın 5'inde (%13), Multipleks II primer gen amplifikasyon primer seti tek başına kullanıldığında ise 15'inde (%38) delesyon görülmüştür. İki multipleks primer seti bir arada kullanıldığında ise yine 40 hastanın 15'inde delesyon görülmüştür ancak bazı hastalarda delesyona uğrayan ekson sayısı artmıştır. Multipleks I ve Multipleks II primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda oluşan ürünlerin bazılarının elektroforez sonuçları Şekil 4 ve Şekil 5'de görülmektedir.



Şekil 4. Multipleks I Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemi Sonucu Oluşan Ürünlerin Bazılarının Elektroferez Sonucu Oluşan Görüntüsü. M: DNA Moleküler Marker(100 bp Moleküler Marker), 1,2: Ekson 48, 51 Delesyonu, 10-12: Ekson 4,8,12 Delesyonu, 13 : Sağlıklı Kontrol Bireyi, 14 : Negatif Kontrol.

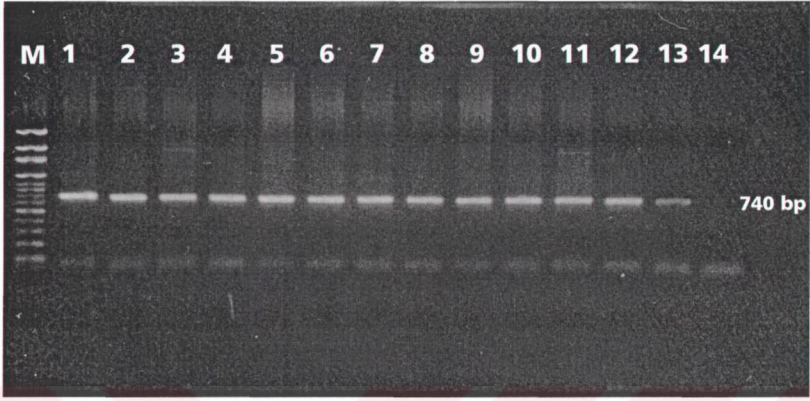


Şekil 5. Multipleks II Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemi Sonucu Oluşan Ürünlerin Bazılarının Elektroferez Sonucu Oluşan Görüntüsü. M: DNA Moleküler Marker(100 bp Moleküler Marker), 1,2: Ekson 49,50,52 Delesyonu, 3-9: Ekson 43 Delesyonu, 10-12: Ekson 3,6,13 Delesyonu , 13 : Sağlıklı Kontrol Bireyi, 14 : Negatif Kontrol.

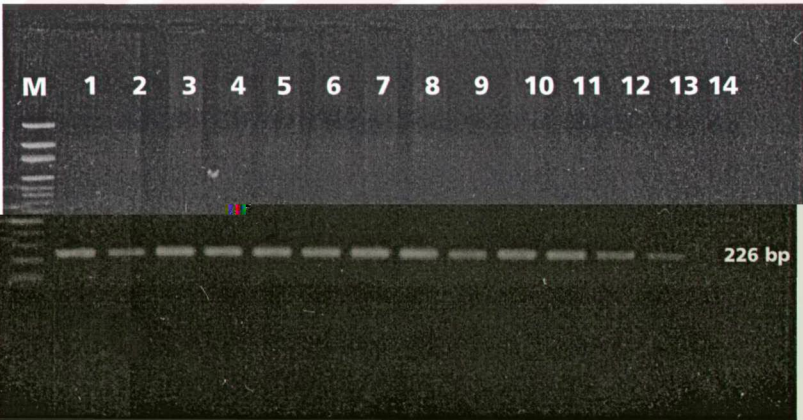


Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile yapılan analiz sonucunda herhangi bir eksonunda delesyon tespit edilen ve edilmeyen hastaların bayan akrabalarının tümü, pERT 87-15/XmnI, pERT87-15/BamHI, pERT87-8/Taq I ve I 38/Taq I bölgeleri açısından PCR-RFLP analiz yöntemi kullanılarak taşıyıcılık yönünden incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle bu bölgeler, uygun primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir.

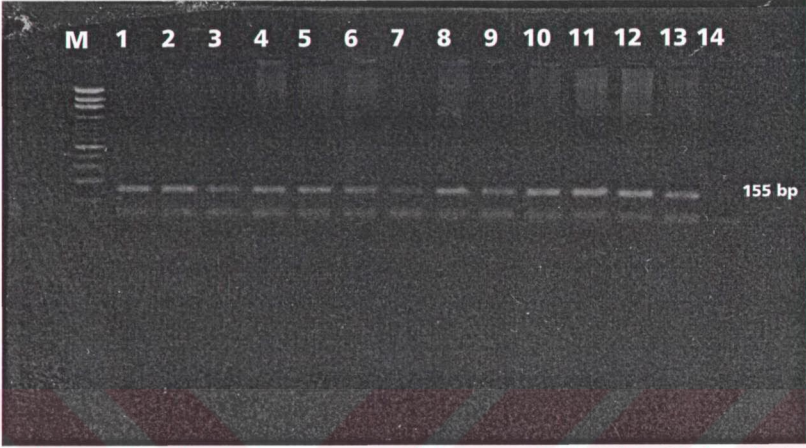
Amplifikasyon sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde; pERT 87-15/XmnI bölgesi için 740 bp'lik, pERT 87-15/BamHI bölgesi için 226 bp'lik, pERT 87-8/Taq I bölgesi için 155 bp'lik ve I 38/Taq I bölgesi için 2500 bp'lik PCR ürünü elde edilmiştir. PCR ürünlerinin bazıları şekil-6, 7, 8, 9 da görülmektedir.



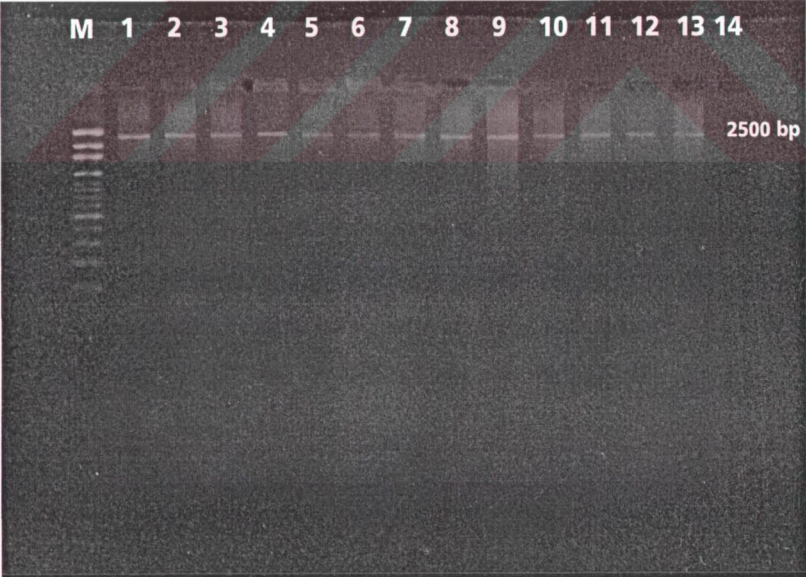
Şekil 6. pERT 87-15/Xmn I Bölgesine ait 740 bp'lik PCR ürünü. M: Moleküler Marker (100 bp Moleküler Marker), 1-13: PCR Ürünü, 14: Negatif Kontrol



Şekil 7. pERT 87-15/ Bam HI Bölgesine ait 226 bp'lik PCR ürünü. M: Moleküler Marker (100 bp Moleküler Marker), 1-13: PCR Ürünü, 14: Negatif Kontrol



Şekil 8. pERT 87-8/Taq I Bölgesine ait 155 bp'lik PCR ürünü. M: Moleküler Marker (100 bp Moleküler Marker), 1-13: PCR Ürünü, 14: Negatif Kontrol



Şekil 9. I 38/Taq I Bölgesine ait 2500 bp'lik PCR ürünü. M: Moleküler Marker (100 bp Moleküler Marker), 1-13: PCR Ürünü, 14: Negatif Kontrol

Dört ayrı RFLP bölgesi için amplifikasyonu gerçekleştirilen PCR ürünlerinin, uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak digestiyonu gerçekleştirilmiştir. pERT 87-15/XmnI bölgesine ait PCR ürünlerinin *XmnI* enzimi, pERT 87-15/Bam HI bölgesine ait PCR ürünlerinin *Bam* HI enzimi, pERT 87-8/TaqI bölgesine ait PCR ürünlerinin *Taq* I enzimi ve I 38/Taq I bölgesine ait PCR ürünlerinin *Taq* I enzimi kullanılarak digestiyonu yapılmıştır.

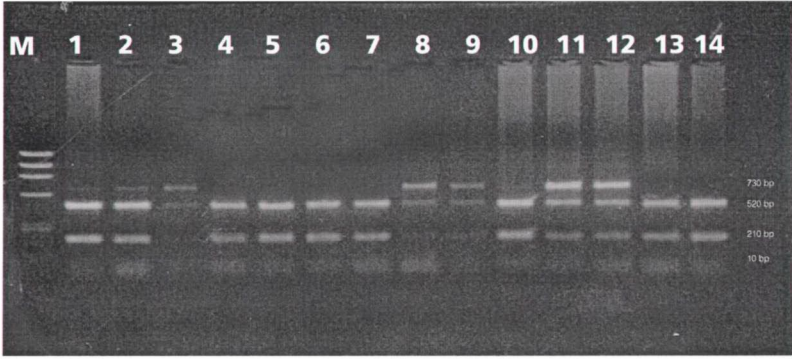
Restriksiyon enzim ile yapılan digestiyon sonucunda eğer enzimin kesim bölgesi varsa allel " + " olarak, yoksa " - " olarak gösterilmektedir. Böylece RFLP yöntemi ile polimorfik DNA dizisi bakımından homozigot +/+, -/- veya heterozigot +/- kişiler belirlenebilmektedir. Bu durum göz önüne alındığında;

pERT 87-15/XmnI bölgesinin 740bp'lik PCR ürünü için; 730bp+10bp (- allel) veya 520bp+210bp+10bp (+ allel) (40),

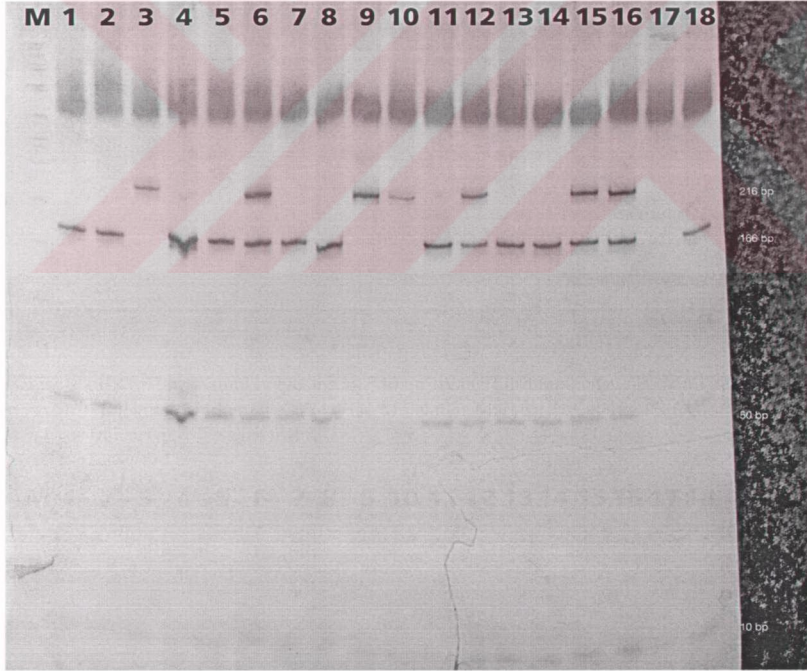
pERT 87-15/Bam HI bölgesinin 226bp'lik PCR ürünü için; 216bp+10bp (- allel) ya da 166bp+50bp+10bp (+ allel ) (40),

pERT 87-8/TaqI bölgesinin 155bp'lik PCR ürünü için; 145bp+10bp (- allel) ya da 74bp+71bp+10bp (+ allel) (40),

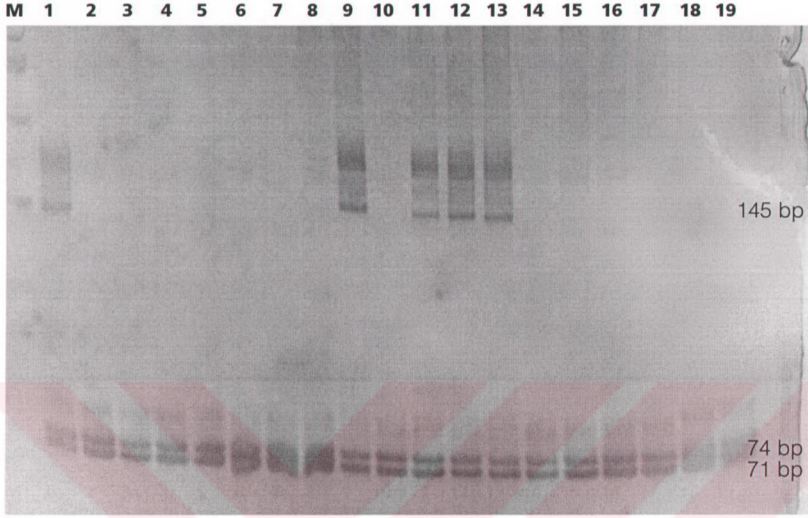
I 38/Taq I bölgesinin 2500bp'lik PCR ürünü için; 1600bp+520bp+380bp (+ allel) ya da 2500 bp'lik (- allel), **elde edilmiştir** (62).



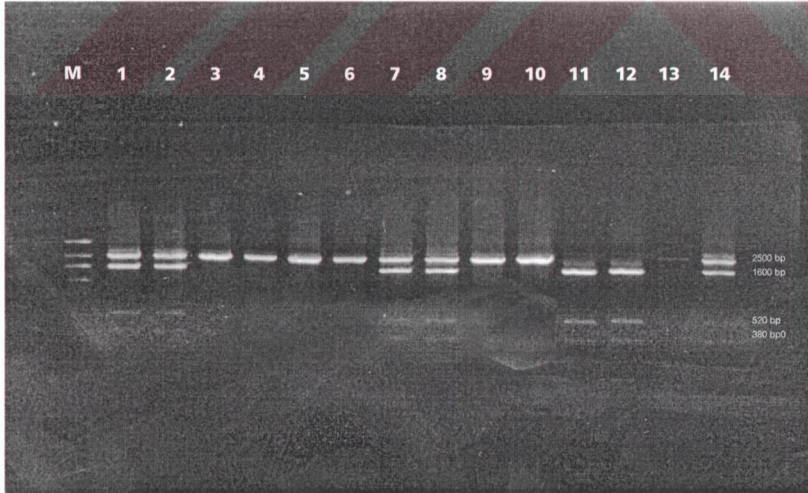
Şekil 10. pERT 87-15/*Xmn* I bölgesine ait 740 bp'lik PCR ürününün *Xmn* I enzimi ile digestiyonu. M : Moleküler Marker (ϕX 174 Hae Moleküler Marker) 1-3, 8-12: +/- Genotip, 4-7,13:+/+ Genotip, 14: Sağlıklı Birey.



Şekil 11. pERT 87-15 / *Bam* HI Bölgesine ait 226 bp'lik PCR ürününün *Bam* HI enzimi ile digestiyonu. M : Moleküler Marker ( 50 bp Moleküler Marker), 1,2,5,7,8,11,13,14 : +/+ Genotip, 4,6,12,15,16: +/- Genotip, 3,9,10: -/- Genotip, 18 : Sağlıklı Kontrol :



Şekil 12. pERT 87-8 / Taq I Bölgesine ait 155 bp'lik PCR ürününün *Taq* I Enzimi ile Digestiyonu. M: Moleküler Marker (ϕX174 Hae Moleküler Marker), 1,9,11-13:+/- Genotip , 2-8,10,14-18:+/+ Genotip, 19 : Sağlıklı Kontrol.



Şekil 13. I 38 / Taq I Bölgesine ait 2500 bp'lik PCR ürününün *Taq* I Enzimi ile Digestiyonu. M: Moleküler Marker (1000 bp Moleküler Marker), 1,2,7,8,12:+/- Genotip, 3-6,9,10,13:-/ Genotip 14 : Taşıyıcı Kontrol.

Taşıyıcı olma ihtimali bulunan toplam 66 bayanda PCR-RFLP ile yapılan analiz sonucunda tablo 6’ da görüldüğü gibi; pERT 87-15/XmnI ve pERT 87-15/Bam HI bölgesi için 9 kişi +/+, 51 kişi +/- ve 6 kişi -/- olarak bulunmuştur. pERT 87-8/Taq I bölgesi için 40 kişi +/+, 24 kişi +/- ve 2 kişi -/- olarak ve I 38/Taq I bölgesi için 11 kişi +/+, 38 kişi +/- ve 17 kişi -/- olarak bulunmuştur.

**Tablo 6 . PCR-RFLP Analiz Sonuçları.**

RFLP Bölgesi	+/+	+/-	-/-	Toplam
PERT 87-15/XmnI	9	51	6	66
PERT 87-157BamHI	9	51	6	66
PERT 87-8/Taq I	40	24	2	66
I 38 / Taq I	11	38	17	66

Bu değerlendirme sonucunda; taşıyıcı olma ihtimali bulunan bayanların tümünde pERT 87-15/Xmn I bölgesinin *Xmn* I enzimi ile tek başına digestiyonu yapıldığı zaman heterozigotluk oranı %77, pERT 87-15/Bam HI bölgesinin *Bam* HI enzimi ile tek başına digestiyonu yapıldığında yine %77, pERT 87-8/Taq I bölgesinin *Taq* I enzimi ile tek başına digestiyonu yapıldığında %36 ve I 38/Taq I bölgesinin *Taq* I enzimi ile tek başına digestiyonu yapıldığında %57 olarak bulunmuştur. Hastaların bayan akrabalarının tümü pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/Bam HI ve pERT 87-8/Taq I bölgelerinin her üçü için değerlendirildiğinde heterozigotluk oranı % 83 (55 bayan) olarak bulunmuş ve buna I 38/Taq I bölgeside eklendiği zaman bu oran % 91’e (60 bayan) yükselmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Duchenne ve Becker müsküler distrofi; distrofin genindeki mutasyonların sebep olduğu, allellik ve X'e bağlı resesif nitelikli nöromüsküler düzensizliklerdir (22). Bu mutasyonların yaklaşık olarak % 60-65'inin çeşitli bykllerdeki gen içi delesyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu delesyonlar Southern blotting ve PCR gibi moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir (9).

Bu çerçevede bir ailede DMD/BMD'nin delesyonlardan kaynaklandığının tespit edilmesi ile doğum öncesi tanının % 100 bir kesinlikle konulabilmesine olanak sağlanmaktadır (9). Bu amaçla klinik olarak DMD veya BMD tanısı almış 40 hastada delesyon analizi yapılmıştır ve hasta kişilerin ulaşılabilen aile bireyleri (66) taşıyıcılık yönünden incelenmiştir.

Amplifikasyon için gende delesyonların en sık rastlandığı iki bölgede bulunan primer dizileri kullanılmıştır. Tablo 2 ve 3'te verilen primer dizileri Multipleks I ve Multipleks II olmak üzere iki ayrı set şeklinde hazırlanmış (26, 27, 28) ve iki ayrı PCR reaksiyonu halinde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Hastaların % 38'inde delesyon tespit edilmiştir.

Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ilk olarak Chamberlain ve arkadaşları tarafından 1988 yılında DMD/BMD'nin tanısında delesyon mutasyonlarını tespit etmek için kullanılmıştır. Bu yöntemle önce altı ayrı ekson bölgesine ait, altı çift primer aynı reaksiyon tüpünde bir arada kullanılmış ve hastaların %37'sinde delesyon mutasyonu grlmştir (26). Daha sonra yine Chamberlain tarafından üç eksonun daha ilavesi ile bu oran % 80'e çıkarılmıştır (27). Bu dokuz primer çiftine Beggs tarafından dokuz ayrı ekson ve bir kas promoteri olmak üzere 10 farklı primer çiftinin daha ilavesi yapılarak hastaların %98'inde delesyon mutasyonu tespit edilmiştir (28). Daha sonra Abbs tarafından eksonlar, 5' ucunda ve 3' ucunda olmak üzere iki multipleks seti şeklinde gendeki lokalizasyonlarına göre bir arada toplanmış ve yine tespit edilebilir delesyonların sıklığı % 98 olarak bulunmuştur (23). Bundan sonrada multipleks PCR yöntemini kullanarak distrofin genindeki delesyonları tespit etmeye yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan Claustres ve arkadaşları Güney Fransa'da



DMD/BMD li ailelerde yapmış oldukları çalışmada Beggs'in primerlerini kullanarak delesyon sıklığını %92 olarak bulmuşlardır (65). Daha sonra Niemann-Seyde ve arkadaşları yine Beggs'in primer dizilerini kullanarak delesyon sıklığını % 60 olarak bildirmişlerdir (66). Bütün bunlara ek olarak Covone ve arkadaşları, Beggs'in primer dizilerine ek olarak beyin promoter bölgesi ve 10 eksona ait primerlerinde ilavesi ile 30 eksonu 3 multipleks reaksiyonu şeklinde amplifiye etmiş ve delesyon sıklığının diğer çalışmalar ile benzer olduğunu ( % 63) rapor etmişlerdir (29). Singh ve arkadaşları Beggs'in primer dizilerini kullanarak Kuzey Hindistan' da DMD/BMD'li ailelerde yaptıkları araştırmada delesyon sıklığını % 73 olarak tespit etmişlerdir (67). Kwiatkowska ve arkadaşları ise 22 eksona ait primer dizilerini kullanarak delesyon oranını % 55 (8) ve Werneck ve arkadaşları'da 20 eksona ait primer dizileri kullanarak % 87.50 olarak belirtmişlerdir (44).

DMD/BMD'de görülen delesyon mutasyonları ile ilgili olarak ülkemizde yapılan çalışmalarda ise; Çağlayan, DMD geninde delesyonların sık rastlandığı iki bölgesinde bulunan 10 eksona ait primer dizilerini çoğaltarak, hastaların % 51'inde delesyon tespit etmiştir (63). Gökgöz ve arkadaşları ise yaptıkları çalışma ile 18 eksona ait primer dizisi kullanarak hastaların % 52'sinde delesyon tespit etmişler ve delesyon tespit edilen hastalarda Türk toplumu için Multipleks II gen amplifikasyon sisteminin Multipleks I'e göre daha fazla bilgi verici olduğunu bildirmişlerdir (9). Battaloğlu ve arkadaşları ise Multipleks I ve II primerlerini kullanarak delesyon sıklığını % 57 olarak tespit etmişlerdir (33). Daha sonra tekrar Battaloğlu ve arkadaşları hem Southern blotting yöntemini hemde PCR yöntemi birden kullanarak delesyon sıklığını % 61 olarak bulmuşlardır (64). Erdem ve arkadaşları ise Southern blotting yöntemi ile cDNA problemleri kullanarak hastaların % 47'sinde delesyon tespit etmişlerdir (2). Dinçer ve arkadaşları 15 eksona ait primer dizileri kullanarak hastaların % 65'inde delesyon tespit etmişlerdir (22). Öngüt ve arkadaşları'da Türkler , Avrupalılar, Kuzey Hintliler ve Hindistan'da bulunan diğer Hintliler olmak üzere dört popülasyondan alınan DMD/BMD hastalarında distrofin geninde görülen delesyon örneklerini karşılaştırmışlar ve bu dört popülasyonda yaygın olarak gözlemlenen spesifik delesyonların sıklıklarının önemli istatistiksel farklar göstermediğini bildirmişlerdir (50). Erdal ve arkadaşları ise Multipleks I ve II primerlerini kullanarak 36 DMD/BMD hastasının 4'ünde bir veya daha fazla ekson delesyonu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların çoğunda Türk toplumunda ekson 45-52 arasındaki delesyon sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir (9, 33, 50, 61, 64). Bizim

çalışmamızda bu sonuca uygun olmakla birlikte delesyon oranı daha düşük tespit edilmiştir. Bu durum ise delesyon tespit edilmemiş olan hastalarda hastalığın nedeninin, incelediğimiz eksonlar dışındaki eksonlarında mutasyonlardan (delesyon, nokta mutasyonu veya duplikasyon gibi mutasyonlardan) yada incelediğimiz hasta popülasyonunun küçüklüğünden de kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Klinik bulguları sonucu DMD veya BMD tanısı almış 10 farklı aileye ait toplam 40 hasta birey delesyon yönünden incelendikten sonra, delesyon tespit edilen ve edilmeyen bu hastaların tümünün ulaşabildiğimiz 66 bayan akrabası pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/Bam HI, pERT 87-8/Taq I ve I 38/Taq I bölgeleri açısından PCR-RFLP analizi yapılarak taşıyıcı olma olasılıkları araştırılmıştır. Bu analiz sonucunda heterozigotluk oranı; pERT 87-15/Xmn I bölgesinin tek başına %77, pERT 87-15/Bam HI bölgesinin tek başına yine %77, pERT 87-8/Taq I bölgesinin tek başına %36 ve I 38/Taq I bölgesinin tek başına %57 olarak bulunmuştur. Hastaların bayan akrabalarının tümü pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/Bam HI ve pERT 87-8/Taq I bölgelerinin her üçü için değerlendirildiğinde heterozigotluk oranı % 83 olarak bulunmuş ve buna I 38/Taq I bölgeside eklendiği zaman bu oran % 91'e yükselmiştir.

İlk olarak Roberts ve arkadaşları pERT 87-15/Xmn I, , pERT 87-15/Bam HI, pERT 87-8/Taq I bölgelerini PCR-RFLP analizi ile incelemiş ve çalıştıkları bayanların % 70'inin bu üç RFLP bölgesinin en azından biri için heterozigot olabileceğini bildirmişlerdir (40). Fassati ve arkadaşları , pERT 87-15/Bam HI ve pERT 87-8/Taq I bölgesine ek olarak farklı iki bölgenin daha PCR-RFLP analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra kompetitive PCR ile 13 aileden 34 kadının % 99 oranında taşıyıcı olma riski olan 7'sinin taşıyıcı olduklarını ortaya koymuşlardır (68). Kwiatkowska ve arkadaşları ise PCR-RFLP analizi ile pERT 87-15/Xmn I, pERT 87-15/Bam HI, pERT 87-8/Taq I bölgelerini değerlendirmiş ve taşıyıcılık tespiti için çalıştıkları kadınlarda bu bölgelerin % 2.4 bilgilendirici olduğunu bildirmişlerdir (8). Ülkemizde ise Battaloğlu ve arkadaşları ise PCR-RFLP analizi ile pERT 87-15/Xmn I, , pERT 87-15/Bam HI, pERT 87-8/Taq I bölgelerini ve polimorfik CA tekrar dizilerini incelemiştir. İnceledikleri 79 ailede; 25 kadının taşıyıcı olduğunu, 37 sini taşıyıcı olmadığını ve 3'ünün durumunun ise tespit edilemediğini bildirmişlerdir (33). Yine Battaloğlu ve arkadaşları 3 polimorfik CA dizisi ve 10 RFLP bölgesine ait cDNA problemleri kullanarak 81 Türk ailesinde taşıyıcılık statüsünü % 95 olarak belirlemişlerdir (64). Gökgöz ve arkadaşları

ise PCR-RFLP analizi ile pERT 87-15/Xmn I, , pERT 87-15/Bam HI, pERT 87-8/Taq I bölgelerini incelemiş ve risk altındaki annelerin yaklaşık olarak % 70'inin bu bölgelerden enazından biri için bilgi verici olduğunu bildirmişlerdir (7). Yapılan RFLP analizi sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar ülkemizde ve dünyadaki literatürler ile uyumlu bulunmuştur.

DMD/BMD tanısı almış hasta ailelerinde yapılan bu çalışma, taşıyıcı olma riski bulunan kadınlara büyük fayda sağlamıştır. Ancak distrofin geninin çok büyük olduğu ve rekombinasyon oranında çok yüksek olduğu (% 12) göz önüne alındığında yüksek derecede polimorfik özelliğe sahip olan kısa tekrar bölgelerinin (STR)'nin de incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



## KAYNAKLAR

1. Tunçbay T., Tunçbay E., Kas Hastalıkları II.Cilt, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını No:152 ; 2000: 667-732.
2. Erdem H., Ayter Ş., Özgüç M., Topçu M., Topaloğlu H., Reda Y., Deletion Analysis of Duchenne Muscular Dystrophy. The Turkish Journal of Pediatrics, 1993; 35:15-21.
3. Emery A., Duchenne Muscular Dystrophy or Meryon's Disease. The Lancet, 2001; 357: 1529.
4. Jay V., Vasjar J., The Dystrophy of Duchenne. The Lancet, 2001; 357: 550-552.
5. Baumbach L.L., Chamberlain J.S., Ward P.A., Farwell N.J., Caskey C.T., Molecular and Clinical Correlations of Deletions Leading to Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. Neurology, 1989; 39:456-474.
6. Oğul E., Sadıkoğlu S., Bora İ., Zarifoğlu M., Turan Ö.F., Bakar M., Temel ve Klinik Nöroloji, Bursa:Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1996: 343-349.
7. Gökgöz N., Kuseyri F., Topaloğlu H., Apak M.Y., Kırdar B., Screening of Deletions and RFLP Analysis in Turkish DMD/BMD Families by PCR. Clinical Genetics, 1993; 43:261-266.
8. Kwiatkowska J., Lisiecka D., Sowinska J., Marszal E., Widera E.E., Ciesielski T., Przymusiak A.S., Nuc P., Chlebowska H., Zimowski J., Zgorzalewicz B.G., Slomski R., Deletion Screening and Carrier Detection in Duchenne Muscular Dystrophy in Polish Population Via Direct Analysis of DNA and RNA Transcripts. Biochimie, 1997; 79:439-448.

9. Gökğöz N., Topçu M., Kuseyri F., Renda Y., Apak S., Apak M.Y., and Kırdar B., Screening of Deletions in Turkish Duchenne-Becker Muscular Dystrophy Patients by Using Two Separate Multiplex Gene Amplification Systems. *Doğa-Tr.J.of Medical Sciences*, 1992; 16: 113-123.
10. Başaran N., *Tıbbi Genetik Ders Kitabı*, Bursa:Güneş&Nobel Tıp Kitapevleri; 1999:85-101.
11. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F., Thompson&Thompson *Genetics in Medicine*, United States of America: W.B. Saunders Company; 2001.
12. Korf R.B., *Human Genetics: A Problem-Based Approach*, United States of America: Blackwell Science; 2000:139-180.
13. Quan F., Janes J., Toth-Fejel S., Johnson D.B., Wolford J.K., Popovich B.W., Uniparental Disomy of The Entire X Chromosome in a Female with Duchenne Muscular Dystrophy. *Am.J.Hum.Genet.*, 1997; 60:160-165.
14. Cohn R.D., Campbell K.P., *Molecular Basis of Muscular Dystrophies*. *Muscle&Nerve*, 2000; 23:1456-1471.
15. Peterlin B., Zidar J., Meznaric-Petrusa M., Zupancic N., Genetic Epidemiology of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy in Slovenia. *Clinical Genetics*, 1997; 51:94-97.
16. Essen A.J.V., Busch H.F.M., Gerard j:te Meerman., and Leo P.ten Kate., Birth and Population Prevalence of Duchenne Muscular Dystrophy in The Netherlands. *Human Genetics*, 1992; 88:258-266.
17. Bushby K.M.D., Hill A., Steele J.G., Failure of Early Diagnosis in Symptomatic Duchenne Muscular Dystrophy. *The Lancet*, 1999; 353:557-558.

18. Passerge E., Color Atlas of Genetics. New York:Thieme Medical Publishers; 1995 :320-323.
19. Moser H., Duchenne Muscular Dystrophy: Pathogenetic Aspects and Genetic Prevention. Human Genetics, 1984; 66:17-40.
20. Covone A.E., Lerone M.,Romeo G., Genotype-Phenotype Correlation and Germline Mosaicism in DMD/BMD Patients with Deletions of The Dystrophin Gene. Human Genetics, 1991; 87:353-360.
21. Simard L.R., Gingras F., Delvoye N., Vanasse M., Melançon S.B., and Labuda D., Deletions in The Dystrophin Gene: Analysis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients in Quebec. Human Genetics, 1992; 89:419-424.
22. Dinçer P., Topaloğlu H., Ayter Ş., Özgüç M., Taşdemir H.A., Renda Y., Molecular Deletion Patterns in Turkish Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients. Brain&Development, 1996; 18:91-94.
23. Abbs S., Yau S.C., Clark S., Mathew C.G., Bobrow M., A Convenient Multiplex PCR System for The Detection of Dystrophin Gene Deletions: A Comparative Analysis with cDNA Hybridisation Shows Mistypings by Both Methods. J.Med. Genet. 1991; 28:304-311.
24. Koeing M., Beggs A.H. Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T., Meng G., Müller C.R., Lindlöf M., Kaariainen H., The Molecular Basis for Duchenne Versus Becker Muscular Dystrophy: Correlation of Severity with Type of Deletion. Am.J.Hum.Genet. 1989; 45:498-506.
25. Beggs A.H., Hoffman E.P., Snyder J.R., Arahata K., Specht L., Shapiro F., Angelini C., Sugita H., and Kunkel L.M., Exploring The Molecular Basis for Variability Among Patients with Becker Muscular Dystrophy: Dystrophin Gene and Protein Studies. Am.J.Hum.Genet. 1991; 49:54-67.

26. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., and Caskey C.T., Deletion Screening of The Duchenne Muscular Dystrophy Locus Via Multiplex DNA Amplification. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16:11141-11156.
27. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., and Caskey C.T., Multiplex PCR for The Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York London, 1990:272-281.
28. Beggs A.H., Koeing M., Boyce F.M., and Kunkel L.M., Detection of 98% of DMD/BMD Gene Deletions by Polymerase Chain Reaction. *Human Genetics*, 1990; 86:45-48.
29. Covone A.E., Caroli F., and Romeo G., Screening Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients for Deletions in 30 Exons of The Dystrophin Gene by Three-Multiplex PCR. *Am.J.Hum.Genet.* 1992; 51:675-677.
30. Cole G.C., Coyne A., Hart K.A., Sheridan R., Walker A., Johnson L., Hodgson S., and Bobrow M., Prenatal Testing for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *The Lancet*, February 6. 1988: 262-265.
31. Bakker E., van Broeckhoven Ch., Bonten E.J., van de Vooren M.J., Veenema H., van Hul W., van Ommen G.J.B., Vandenberghe A., and Pearson P.L., Germline Mosaicism and Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Nature*, 1987; 329:554-556.
32. Darras B.T., and Francke U., A Partial Deletions of The Muscular Dystrophy Gene Transmitted Twice by An Unaffected Male. *Nature*, 1987; 329:556-558.
33. Battaloğlu E.S., Telater M., Deymeer F., Serdaroğlu P., Özdemir C., Kuseyri F., Apak M.Y., and Tolun A., Carrier Detection by DNA Analysis in Duchenne Muscular Dystrophy Families. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 1992; 34:79-92.

34. Schwartz L.S., Tarleton J., Popovich B., Seltzer W.K., and Hoffman E.P., Fluorescent Multiplex Linkage Analysis and Carrier Detection for Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 1992; 51:721-729.
35. Mao Y., and Cremer M., Detection of Duchenne Muscular Dystrophy Carriers by Dosage Analysis Using The DMD cDNA Clone 8. *Human genetics*, 1989; 81: 193-195.
36. Bakker E., Goor N., Wrogemann K., Kunkel L.M., Fenton W.A., Majoor-Krakauer D., Jahoda M.G.J., van Ommen G.J.B., Hofker M.H., Mandel J.L., Davies K.E., Willard H.F., Sandkuyl L., Essen A.J., Sachs E.S., and Pearson P.L., Prenatal Diagnosis and Carrier Detection of Duchenne Muscular Dystrophy with Closely Linked RFLPs. *The Lancet*, March 23. 1985; 655-658.
37. Forrest S.M., Cross G.S., Thomas N.S.T., Harper P.S., Smith T.J., Read A.P., Mountford R.C., Geirsson R.T., and Davies K.E., Effective Strategy for Prenatal Prediction of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *The Lancet*, December 5. 1987;1294-1926.
38. Ward P.A., Hejtmancik J.F., Witkowski J.A., Baumbach L.L., Gunnell S., Speer J., Hawley P., Tantravahi U., and Caskey C.T., Prenatal Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy: Prospective Linkage Analysis and Retrospective Dydtrrophin cDNA Analysis. *Am.J.Hum.Genet.* 1989; 44:270-281.
39. Richards R.I., and Friend K., Determination of Duchenne Muscular Dystrophy Carrier Status by Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Deleted Regions of The Dystrophin Locus. *J.Med Genet.* 1991; 28:856-859.
40. Roberts R.G., Cole C.G., Hart K.A., Bobrow M., and Bentley D.R., Rapid Carrier and Prenatal Diagnosis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Nucleic Acids Research*, 1989; 17 :811.



41. Zeng Y.T., Chen M.J., Ren Z.R., Qiu X.K., and Huang S.Z., Analysis of RFLPs and DNA Deletions in The Chinese Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *J.Med.Genet.* 1991; 28:167-170.
42. Clemens P.R., Fenwick R.G., Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Andrade M de., Chakraborty R., and Caskey C.T., Carrier Detection and Prenatal Diagnosis in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Families, Using Dinucleotide Repeat Polymorphism. *Am.J.Hum.Genet.* 1991; 49:951-960.
43. Chaturvedi L.S., Srivastava S., Mukherjee M., Mittal R.D., Phadke S.R., Pradhan S., and Mittal B., Carrier Detection in Non-deletional Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Families Using Polymorphic Dinucleotide (CA) Repeat Loci of Dystrophin Gene. *Indian J.Med.Res.* 2001; 113:19-25.
44. Werneck L.C., Scola R.H., Maegawa G.H.B., and Werneck M.C.M., Comparative Analysis of PCR-Deletion Detection and Immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients. *American Journal of Medical Genetics*, 2001; 103:115-120.
45. Koeing M., Hoffman E.P., Bertelson J., Monaco A.P., Feener C., and Kunkel L.M., Complete Cloning of The Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomic Organization of The DMD Gene in Normal and Affected Individuals. *Cell*, 1987; 50:509-517.
46. Den Dunnen J.T., Grootsholten P.M., Bakker E., Blondin L.A.J., Ginjaar H.B., Wapenaar M.C., van Paassen H.M.B., van Broeckhoven C., Pearson P.L., and van Ommen G.J.B., Topography of The Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene: FIGE and cDNA Analysis of 194 Cases Reveals 115 Deletions and 13 Duplications. *Am.J.Hum.Genet.* 1989; 45:835-847.

47. Roberts R.G., Coffey A.J., Bobrow M., and Bentley D.R., Exon Structure of The Human Dystrophin Gene. *Genomics*, 1993; 16:536-538.
48. Koeing M., Monaco A.P., and Kunkel L.M., The Complete Sequence of Dystrophin Predicts a Rod-Shaped Cytoskeletal Protein. *Cell*, 1988; 53:219-228.
49. Ahn.A.R. and Kunkel L.M., The Structural and Functional Diversity of Dystrophin. *Nature Genetics*, 1993; 3:283-290.
50. Önengüt S., Kavaslar G.N., Battaloğlu E., Serdaloğlu S., Deymeer F., Özdemir C., Calafell F., and Tolun A., Deletion Pattern in The Dystrophin Gene in Turks and a Comparison with Europeans and Indians. *Ann.Hum.Genet.* 2000; 64:33-40.
51. Alcántara M.A., García-Cavazos R., Hernández U.E., Gonzáles-del Angel A., Carnevale A., and Orozco L., Carrier Detection and Prenatal Molecular Diagnosis in a Duchenne Muscular Dystrophy Family without any Affected Relative Available. *Annales de Génétique*, 2001; 44:149-153.
52. Danieli G.A., Mioni F., Müller C.R., Vitello L., Mostacciuolo M.L., and Grimm T., Patterns of Deletions of The Dystrophin Gene in Different European Populations. *Human Genetics*, 1993; 91:342-346.
53. Gillard E.F., Chamberlain J.S., Murphy E.G., Duff C.L., Smith B., Burghes A.H.M., Thompson M.W., Sutherland J., Oss I., Bodrug S.E., Klamut H.J., Ray P.N., and Worton R.G., Molecular and Phenotypic Analysis of Patients with Deletions within The Deletion-Rich Region of The Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene. *Am.J.Hum.Genet.* 1989; 45:507-520.
54. Solak M., Bağcı H., Şengil A.Z., Öztaş S., Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayın No:5, Ankara : Teknik Hazırlık Baskı; 2000: 74-135.

55. Akar N., Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş. Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar No:5, Ankara, 1995: 20-162.
56. Grompe M., The Rapid Detection of Unknown Mutations in Nucleic Acids. *Nature Genetics*, 1993; 5:111-117.
57. Prosser J., Detecting Single-Base Mutations. *Tibtech*, 1993; 11:238-246.
58. Aksoy K., Kayrın L., Tuli A., Atilla G., İnal T.C., Yalın E., Tanıda DNA Teknikleri, Adana. 1995:15-79.
59. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., and Sekiya T., Detection of Polymorphism of Human DNA by Gel Electrophoresis As Single-Strand Conformation Polymorphisms. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86:2766-3770.
60. Roest P.A.M., Roberts R.G., Sugino S., Van Ommen G.J.B., and Den Dunnen J.T., Protein Truncation Test (PTT) for Rapid Detection of Translation-Terminating Mutations. *Human Molecular Genetics*, 1993; 2: 1719-1721.
61. Erdal M.E., Neyal M., Yılmaz M., Barlas İ.Ö., Duchenne/Becker Kas Distrofili Hastalarda Distrofin Genindeki Delesyonların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Moleküler Analizi. *Ç.Ü.Tıp Fakültesi Dergisi*, 2001; 26:157-161.
62. Ünlü S., Prenatal Diagnosis and Improvement of The Carrier Identification in Duchenne Muscular Dystrophy Families. Boğaziçi University, Master of Science. 1993.
63. Çağlayan S.H., Screening of Deletions in Duchenne Muscular Dystrophy Gene Locus Using Polymerase Chain Reaction. *Doğa-Tr.J.of Medical Sciences*, 1991; 15:435-443.
64. Battaloğlu E., Teletar M., Deymeer F., Serdaroğlu P., Kuseyri F., Özdemir C., Apak M., and Tolun A., DNA Analysis in Turkish Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Families. *Human Genetics*, 1992; 89:635-639.

65. Claustres M., Tuffery S., Chevron M.P., Jozelon M.P., Martinez P., Echenne B., and Demaille J., Molecular Deletion Patterns in Families from Southern France with Duchenne/Becker Muscular Dystrophies. *Human Genetics*, 1991; 88:179-184.
66. Niemann-Seyde S., Slomski R., Rininsland F., Ellermeyer U., Kwiatkowska J., and Reis J., Molecular Genetic Analysis of 67 patients with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Human Genetics*, 1992; 90:65-70.
67. Singh V., Singh S., Mishra S., Chaturvedi L.S., Pradhan S., Mittal R.D., Mittal B., Proportion and Pattern of Dystrophin Gene Deletions in North Indian Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients. *Human Genetics*, 1997; 99:206-208.
68. Fassati A., Tedeschi S., Bordoni A., Amboni P., Curcio C., Bresolin N., and Scarlato G., Rapid Direct Diagnosis of Deletions Carriers of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. *The Lancet*, 1994; 344:302-303.

TC YÖNETİMİNİN MÜHÜRÜ  
DOKÜMANTASYON BİRİMİ