

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENİLALANİN HİDROKSİLİZ ENZİM  
EKSİKLİĞİNE MOLEKÜLER GEN ANALİZLERİ  
METODUYLA TANI KONULMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Demet ALGAN**

**Tezi Yöneten  
Prof. Dr. Munis DÜNDAR**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2007  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENİLALANİN HİDROKSİLAZ ENZİM EKSİKLİĞİNE  
MOLEKÜLER GEN ANALİZLERİ METODUYLA TANI  
KONULMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Demet ALGAN**

**Tezi Yöneten  
Prof. Dr. Munis DÜNDAR**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT 06-04 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2007  
KAYSERİ**

**Prof.Dr.Munis DÜNDAR** danışmanlığında Demet ALGAN tarafından hazırlanan “**Fenilalanin Hidroksilaz Enzim Eksikliğine Moleküler Gen Analizleri Metoduyla Tanı Konulması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

06/08/2007

**JÜRİ**

**İmza**

Başkan :Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ

Üye : Prof. Dr. Munis DÜNDAR(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana destek veren ve çalışmalarımı yönlendiren kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na geldiğim günden beri her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a ve Yrd. Doç. Dr. Çetin SAATÇI'ye,

Hasta ve kaynak teminindeki yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ'ye,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki sayın hocalarım Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ, Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ ve Doç. Dr. Nurhan CÜCER'e,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Dr. Okay ÇAĞLAYAN ve tüm bölüm arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan canım aileme,

Her zaman, her konuda beni yalnız bırakmayan hayat arkadaşım Eyyup ÇOBAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

## FENİLALANİN HİDROKSİLİZ ENZİM EKSİKLİĞİNE MOLEKÜLER GEN ANALİZLERİ METODUYLA TANI KONULMASI

### ÖZET

Fenilalanin hidroksilaz (FAH) enzimi fenilalaninin tirozine hidroksilasyonunu katalizleyen hepatik bir enzimdir. FAH enzimi eksikliği sonucunda kanda, idrarda, beyinde ve diğer vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonda fenilalaninin ve metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit) birikir. Bu durum hiperfenilalaninemi (HFA) olarak bilinir. Normalin üzerindeki fenilalanin seviyeleri sinir sistemi hücrelerine toksiktir ve fenilketonüri (FKÜ) hastalarında beyin gelişimi ve fonksiyonunda geri dönüşümsüz anormalliklere neden olur. FKÜ, amino asit metabolizmasının en yaygın doğumsal hatalarından biridir.

İnsan genomunda FAH enzimi kodlayan gen 12q22-q24.1 kromozomunda yerleşir. Bu gen yaklaşık olarak 90 kb uzunluğunda olup ve 13 ekzon içerir. HFA' ya neden olan FAH geninde şu ana kadar 420' nin üzerinde mutasyon belirlenmiştir. Gen dizisinde küçük değişimlere neden olan 31 farklı polimorfizm tanımlanmıştır. FAH geninde meydana gelen mutasyonlar; yanlış anlamlı (missense), splice-site ve anlamsız (nonsense) mutasyonlar ile küçük delesyonlar ve insersiyonlardır.

Çok sayıdaki mutasyonlar yüzünden hastaların çoğu bileşik heterozigottur (compound heterozygosity). Bu durum hastalıkla ilgili fenotipik çeşitliliği açıklar. FAH eksikliği çevrenin ve genotipin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu yüzden FAH genotipi, fenotipin sağlam bir göstergesi olmayabilir. Bu mutasyonların sıklığı ve dağılımı farklı populasyonlarda analiz edilmiştir ve belirli etnik gruplar haricinde genel populasyonda baskın ya da yaygın FKÜ ilişkili mutasyonlar yoktur. Bu çalışma, FKÜ tanısı konmuş 11 hastada R261Q mutasyonunu belirlemek için yapılan Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) analizlerini ve bu hastaların kardeşlerinde taşıyıcılık tespiti için yapılan Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR) analizlerini içermektedir. R261Q mutasyonuna yönelik olarak çoğaltılan Fenilalanin Hidroksilaz (FAH) geni PCR ürünü Hinf I restriksiyon enzimi ile direkt mutasyon analizine tabi tutulmuştur. 11 ailenin hiçbirinde R261Q mutasyonuna rastlanmamıştır. VNTR dizileri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) kullanılarak çoğaltılmış ve PCR ürünü jelde yürütülmüştür. 11 aileden 4 tanesi informatif, 7 tanesi ise noninformatif bulunmuştur. Ancak yaptığımız çalışmada RFLP ve VNTR sonuçları uyum göstermediği için kardeşlerin taşıyıcı olup olmadıkları konusunda herhangi bir yorum yapılamamıştır.

**Anahtar kelimeler:** FKÜ (Fenilketonüri), Mutasyon, RFLP, VNTR, FAH (Fenilalanin hidroksilaz)

**TO DIAGNOSE THE PHENYLALANINE HYDROXYLASE ENZYME DEFICIENCY  
WITH THE METHOD OF MOLECULAR GENE ANALYSIS**

**ABSTRACT**

Phenylalanine hydroxylase (PAH) is a hepatic enzyme that catalyses the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine. The result of PAH deficiency phenylalanine and its metabolites (phenyl pyruvic acid, phenyl lactic acid, phenyl acetic acid) increase in the blood, urine, brain and other body fluids. This is known hyperphenylalaninemia (HPA). The abnormal levels of phenylalanine are toxic for nervous system cells and cause irreversible anomalies in brain development and function. PKU is a general inborn error of amino acid metabolism.

In the human genome the gene that codes PAH enzyme places chromosome 12q22-q24.1. This gene spans about 90 kb and contains 13 exons. More than 420 PKU mutations that cause HPA have been identified until now. Thirty-one different polymorphisms causing minor changes in the gene sequence have been identified. Mutations observed in the PAH gene include missense, splice-site and nonsense mutations, small deletions and insertions.

Due to the large number of mutations most of the patients are compound heterozygotes. This explains phenotypic variability observed in this disease. Phenylalanine hydroxylase deficiency is a 'multifactorial disorder' in that both environment and genotype are necessary causal components of disease. For this reason PAH genotype may not be a robust predictor of phenotype. The frequency and distribution of these mutations have been analyzed in different populations and there are no predominant or common PKU-associated mutations in the general population with the exception of certain ethnic groups.

This study contains the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis to determine R261Q mutation in PKU patients and Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis to determine carrier detecting. The Phenylalanine Hydroxylase (PAH) gene which was amplified by PCR to determine R261Q mutation was performed direct mutation analysis with Hinf I restriction enzyme. We didn't coincide R261Q mutation in any of the 11 patients. VNTR sequences were amplified using PCR and PCR product was run on the gel. With this method 4 families were found to be informative and 7 families were found to be noninformative out of 11. But in this study we couldn't comment whether the siblings are carrier because the result of VNTR and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis are not accord each other.

**Key words:** PKU (Phenylketonuria), Mutation, RFLP, VNTR, PAH (Phenylalanine hydroxylase)

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK .....	I
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ .....	VIII
KISALTMALAR .....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. FENİLALANİN HİDROKSİLAZ (FAH) ENZİMİ .....	2
2.2. HİPERFENİLALANİNEMİ (HFA) .....	3
2.3. HİPERFENİLALANİNEMİ TİPLERİ VE NEDENLERİ .....	5
2.3.1. Klasik Fenilketonüri (FKÜ) .....	6
2.4. HİPERFENİLALANİNEMİ'NİN SINIFLANDIRILMASI .....	6
2.5. FKÜ SIKLIĞI.....	7
2.6. KLİNİK BULGULAR .....	7
2.7. FKÜ TARAMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	9
2.8. MATERNAL FKÜ.....	11
2.9. FAH GENİ.....	12
2.10. FAH GENİNDE MEYDANA GELEN MUTASYONLAR .....	12
2.11. TEDAVİ.....	16
2.11.1. Klasik FKÜ İçin Tedavi .....	16
2.11.2. FKÜ Olmayan HFA İçin Tedavi .....	17
2.12. FKÜ HASTALARININ YİYEBİLECEĞİ BESİNLER.....	18
2.12.1. Fenilketonüri'li Çocuk Anne Sütü Almaya Devam Edebilir mi? .....	19
2.13. FKÜ HASTALARINDA MUTASYON TESPİTİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	19
2.13.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) .....	19
2.13. 2. Restriksiyon Enzimleri .....	20

2.13. 3. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP).....	21
2.13.4. Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar (VNTR).....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	23
3.1. GEREÇLER.....	23
3.2. YÖNTEMLER.....	23
3.2.1. Örneklerin Alınması.....	23
3.2.2. DNA İzolasyonu.....	23
3.2.2.1. Periferel Kandan DNA İzolasyonu.....	23
3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları .....	24
3.2.3.1. PCR.....	24
3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Elektroforezi .....	26
3.2.3.3. R261Q İçin RFLP .....	26
3.2.4. Çalışma Süresinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	26
3.2.4.1. Red Cell Lizis Solüsyonu .....	26
3.2.4.2. Cell Lizis Solüsyonu.....	26
3.2.4.3. Protein Presipitasyon Solüsyonu .....	26
3.2.4.4. % 70'lik Etanol .....	27
3.2.4.5. TE Tamponu .....	27
3.2.4.6. 10 x TBE Tamponu .....	27
3.2.4.7. % 1'lik Etidyum Bromür .....	27
3.2.4.8. %3'lük Agaroz Jel Hazırlanması .....	27
3.2.4.9. % 4'lük Agaroz Jel Hazırlanması .....	27
4.BULGULAR.....	28
4.1. PCR BULGULARI .....	28
4.1.1. VNTR Analizi İçin PCR Bulguları .....	28
4.1.2. RFLP İçin PCR Bulguları .....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	31
6. KAYNAKLAR .....	35
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



## TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<b><u>Sayfa no</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Normal plazma, idrar ve beyin-omurilik sıvısı fenilalanin düzeyleri .....	4
<b>Tablo 2.2.</b> Hiperfenilalaninemi tipleri.....	5
<b>Tablo 2.3.</b> Türkiye ve bazı ülkelerde fenilketonüri görülme sıklığı .....	7
<b>Tablo 2.4.</b> Fenilketonüri hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri .....	9
<b>Tablo 2.5.</b> Fenilketonüri taramasında kullanılan yöntemler .....	10
<b>Tablo 2.6.</b> HFA'lı/FKÜ'lü anne çocuklarında ken fenilalanin düzeylerine göre anomali sıklığı .....	11
<b>Tablo 2.7.</b> FAH geninde sık görülen haplotiplerin bazı Avrupa ülkelerindeki sıklığı.....	12
<b>Tablo 2.8.</b> FAH geninde meydana gelen mutasyonların sınıflandırılması .....	13
<b>Tablo 2.9.</b> FAH geninde meydana gelen bazı mutasyonlar .....	15
<b>Tablo 2.10.</b> FKÜ'lü hastaların diyet tedavisinde kullanılan ve fenilalanin içerikleri ihmal edilebilir sebze ve meyveler. ....	18
<b>Tablo 2.11.</b> Restriksiyon enzim örnekleri ve tanıdıkları diziler .....	21
<b>Tablo 3.1.</b> VNTR polimorfizmi ve R261Q mutasyonu için kullanılan primer dizileri .....	25
<b>Tablo 4.1.</b> FKÜ'lü hasta çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizmi taşıyıcı tespiti bulguları .....	29
<b>Tablo 4.2.</b> FKÜ'lü hasta çocuğa sahip ailelerde R261Q mutasyonu için yapılan RFL bulguları .....	30
<b>Şekil 2.1.</b> Fenilalaninin tirozine dönüştüğü metabolik yol.....	2
<b>Resim 4.1.</b> İnformatif olarak bulunan 1. ailenin VNTR ürününün % 3'lük agaroz jel görüntüsü .....	29

**KISALTMALAR**

- ATP** : Adenozin trifosfat
- DGGE** : Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
- DNA** : Deoksiribonükleik asit
- EDTA** : Etilendiamin-Tetraasetik Asit (Ethylenediamine-Tetraacetic Asit)
- FAH** : Fenilalanin Hidroksilaz
- FKÜ** : Fenilketonüri
- HFA** : Hiperfenilalaninemi
- PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonları (Polymerase Chain Reaction)
- RFLP** : Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- SDS** : Sodyum dodesil sülfat
- TBE** : Tris-Borik asit-EDTA
- TE** : Tris-EDTA
- VNTR** : Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

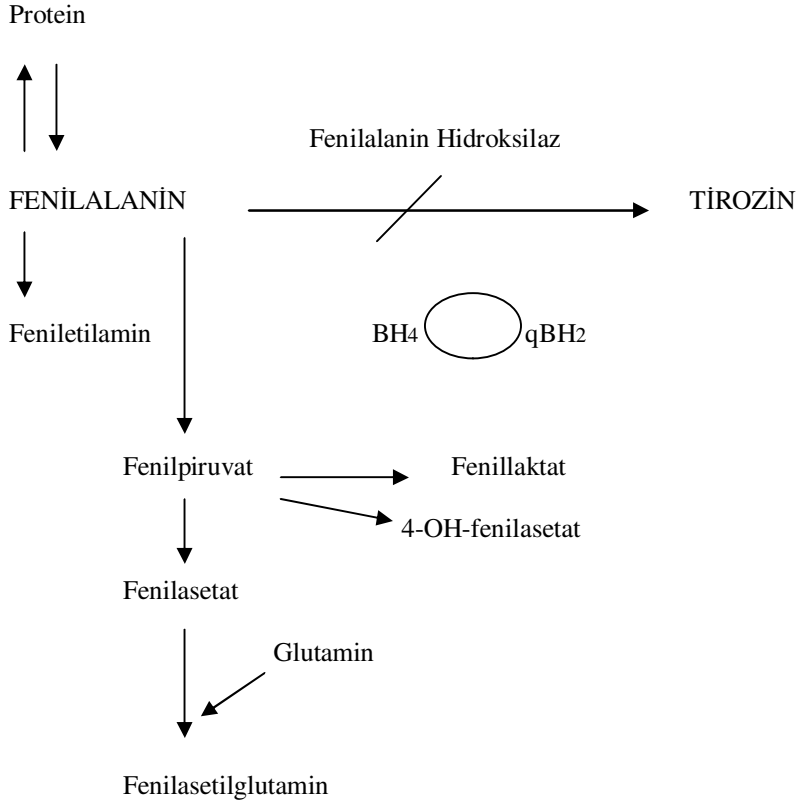
Fenilketonüri (FKÜ), fenilalanin hidroksilaz (FAH) enzimi eksikliğine bağlı kanda ve diğer vücut sıvılarında fenilalanin ve metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit)'nin artması ile karakterize otozomal resesif kalıtmımlı doğumsal metabolik bir hastalıktır. FAH esansiyel bir amino asit olan fenilalaninin metabolizması ile ilgili hepatik bir enzimdir. Enzimdeki eksikliğe FKÜ hastalığı ile ilişkili olan ve hiperfenilalaninemi (HFA) ile sonuçlanan FAH genindeki mutasyonlar neden olur. Normalin üzerindeki fenilalanin seviyeleri sinir sistemi hücrelerine toksiktir ve FKÜ hastalarında beyin gelişimi ve fonksiyonunda geri dönüşümsüz anormalliklere neden olur. FAH geni için 420'den fazla farklı mutasyon bildirilmiştir. Çeşitli FAH mutasyonları enzim aktivitesini farklı derecelerde azaltır.

Bu çalışmanın amacı, FKÜ tanısı konmuş 11 hastanın Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi; RFLP) ve Variable Number of Tandem Repeats (Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar; VNTR) moleküler yöntemlerini kullanarak kesin tanıları koymaktır. Bilgi verici (informatif) VNTR sonuçlarından yola çıkarak hastaların kardeşlerinin taşıyıcı olup olmadıklarını belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. FENİLALANİN HİDROKSİLİZ (FAH) ENZİMİ

FAH enzimi, fenilalaninin tirozine hidroksilasyonunu katalizleyen hepatik bir enzimdir (1, 2). Esansiyel bir aminoasit olan fenilalaninin % 75'i karaciğerde fenilalanin hidroksilazın katalitik etkisiyle geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüşür (Şekil 2. 1).



**Şekil 2.1.** Fenilalaninin tirozine dönüştüğü metabolik yol. FAH enzimi bloğu işaretlenmiştir (BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiyopterin, qBH<sub>2</sub>: quinonoid dihidrobiyopterin)

Fenilalanin beyinde norepinefrin, dopamin, epinefrin, adrenalin, tiroid hormon yapımı yanı sıra önemli nöropeptidlerin, somatostatin, vazopressin, melanotropin, adrenokortikotropik hormon, substans P, enkefalin, vazoaktif intestinal peptid, anjiyotensin II ve kolesistokinin yapımıyla da ilgilidir (3).

FAH enzimi eksikliği sonucunda kanda, idrarda, beyinde ve diğer vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonda fenilalanin ve metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit) birikir (4). Normalin üzerindeki fenilalanin seviyeleri sinir sistemi hücrelerine toksiktir ve FKÜ hastalarında beyin gelişimi ve fonksiyonunda geri dönüşümsüz anormalliklere neden olur (5). Fenilalanin bir tip teratojendir. Teratojenler gelişen fetusta doğumsal hastalıklara neden olan maddelerdir (6).

## **2.2. HİPERFENİLALANİNEMİ (HFA)**

Hiperfenilalaninemiler fenilalaninin tirozine dönüşümünü sağlayan FAH enzimi veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiyopterinin eksikliği sonucu ortaya çıkan heterojen bir grup hastalıktır.

Çocuklarda normal kan fenilalanin düzeyleri (ortalama 8 yaş dolayında)  $62 \pm 18$   $\mu\text{mol/L}$ , ergenlerde (ortalama 16 yaş dolayında)  $60 \pm 13$   $\mu\text{mol/L}$ , erişkinlerde normal kan fenilalanin düzeyleri ise  $58 \pm 15$   $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Ergen erkeklerin kan fenilalanin düzeyleri kızlarınkinden biraz daha yüksektir. Yenidoğan ve daha büyük çocuklarda normal kan fenilalanin düzeyleri erişkinlerdeki gibidir (Tablo 2.1). Kan fenilalanin düzeyi  $>2$  mg/dl ( $>120$   $\mu\text{mol/L}$ )'nin üzerinde bulunduğunda hiperfenilalaninemi varlığından söz edilebilir (3).

**Tablo 2.1.** Normal plazma ( $\mu\text{mol/L}$ ), idrar (nmol/mmol kreatinin) ve beyin-omurilik sıvısı ( $\mu\text{mol/L}$ ) fenilalanin düzeyleri

<b>Plazma</b>	
• Çocuklarda	26-98 $\mu\text{mol/L}$
• Ergenlerde	34-86 $\mu\text{mol/L}$
• Erişkinler	
➤ Kadınlarda	42-62 $\mu\text{mol/L}$
➤ Erkeklerde	46-74 $\mu\text{mol/L}$
<b>İdrar</b>	
• 0-1 ay	4-3 nmol/mmol kreatinin
• 1-6 ay	7-28 nmol/mmol kreatinin
• 6-12 ay	11-28 nmol/mmol kreatinin
• 1-2 yaş	10-31 nmol/mmol kreatinin
• 2-4 yaş	7-21 nmol/mmol kreatinin
• 4-7 yaş	6-26 nmol/mmol kreatinin
• 7-13 yaş	5-20 nmol/mmol kreatinin
• >13 yaş	2-19 nmol/mmol kreatinin
<b>Beyin-omurilik sıvısı</b>	
• Kadınlarda	10.8 (2.4-19.2) $\mu\text{mol/L}$
• Erkeklerde	12.5 (6.7-18.3) $\mu\text{mol/L}$

HFA, kan-beyin bariyeri ve hücre membranlarından aromatik ve diğer aminoasitlerin her iki yönlü geçişini kompetitif olarak engeller. Beyindeki yüksek fenilalanin düzeyi protein sentez hızını azaltır. Dendritik proliferasyonun erken dönemi ve miyelinizasyon etkilenir. Adenozin trifosfat (ATP) sülfirilaz inhibe olarak miyelin yıkımı artar. Tirozin ve triptofan hidroksilasyonunun kompetitif inhibisyonu ve intranöronal substrat konsantrasyonunun azalması sonucu serotonin, dopamin ve norepinefrin sentezi azalır (7).

### 2.3. HİPERFENİLALANİNEMİ TİPLERİ VE NEDENLERİ

Klinik ve fizyolojik fenotip çeşitlilik insandaki birçok doğumsal metabolik hataların özelliğidir. Tipik olarak yetersiz enzimin farklı seviyeleri ile hastalığın şiddetli ve hafif varyantları belirlenir. Normal populasyon taraması bazen klinik olarak ortaya konmayan daha hafif kusurları ortaya çıkarır. HFA'lar bu olgunun bir örneğidir (8).

HFA, plazma fenilalanin değerinin 2 mg/dl (120 µmol/L) üzerinde olmasıdır. Tablo 2'de primer ve sekonder hiperfenilalaninemi tipleri ve nedenleri verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Hiperfenilalaninemi Tipleri

1. Primer (kalıtsal)	2. Sekonder (edinsel)
<p><i>Fenilalanin hidroksilaz eksikliği</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ağır (klasik FKÜ)</li> <li>• Orta ağırlıkta hiperfenilalaninemi</li> <li>• Hafif hiperfenilalaninemi</li> </ul> <p><i>Biopterin metabolizması bozuklukları</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Guanozin trifosfat siklohidrolaz eksikliği</li> <li>• 6-piruvoyl- tetrahidropterin sentaz eksikliği</li> <li>• Dihidropteridin redüktaz eksikliği</li> <li>• Pterin karbinolamin dehidrataz eksikliği</li> <li>• Semiapterin redüktaz eksikliği</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maternal FKÜ</li> <li>• Tirozinemi</li> <li>• Geçici neonatal hiperfenilalaninemi</li> <li>• İlaça bağlı (metotreksat, trimetoprim)</li> <li>• Ağır enflamatuvar yanıt</li> <li>• Renal hastalık</li> <li>• Karaciğer hastalığı</li> </ul>

Primer hiperfenilalaninemiler, hidroksilaz enzimi eksikliğine ya da biyopterin metabolizması bozukluklarına bağlı otozomal resesif geçişli kalıtsal bozukluklardır. Bu bozukluklarda fenilalanini tirozine dönüştüren hidroksilasyon reaksiyonu yavaşlamıştır. Sonuçta kan ve diğer vücut sıvılarında fenilalanin konsantrasyonu ve fenilalanin/tirozin oranı artar. Normalde 0.6-1.5 olan fenilalanin/tirozin oranı primer hiperfenilalaninemilerde 3 ve üstü, heterozigot taşıyıcılarda ise 1.2-2.5 arası değerlerdedir. Ayrıca bu hastaların idrarlarında fenilketonlar ve fenilaminler gibi fenilalanin metabolitleri de bulunur. FKÜ terimi, basit kimyasal yöntemlerle idrarda fenilketonların kolay saptanabileceği, FAH enzimi eksikliğinin ağır şekilleri için kullanılmaktadır (7). FKÜ amino asit metabolizmasının en yaygın doğumsal hatalarından biridir (9).

### 2.3.1. Klasik Fenilketonüri (FKÜ)

Klasik FKÜ hepatic dokularda normal FAH aktivitesinin %5'i ya da daha azı eksprese olduğunda ortaya çıkar (4). Erken dönemde tanı konularak tedavinin başlatılmadığı çocuklarda ağır gelişme ve zeka geriliğine yol açan bir kalıtsal hastalıktır. Tedavisiz hastalarda kan fenilalanin düzeyi ilk haftalardan sonra 20 mg/dl üzerindedir (7).

### 2.4. HİPERFENİLALANİNEMİ'NİN SINIFLANDIRILMASI

Fazla fenilalanin beyin ve kognitif gelişim için toksik olabilir. Böylece herhangi bir HFA düzeyi fenilketonürik fenotip olarak adlandırılabilir ve bu yüzden HFA bu durumun oluşması için bir risk faktörü olabilir. Risk, HFA faktörüne bağlı olarak da değişiyor görüldüğünden çeşitli sınıflandırmalar ortaya çıkmıştır.

İlk sınıflandırma Kayaalp ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılmıştır (10):

**FKÜ:** En genel olanıdır ve fenilalanin konsantrasyonu yaklaşık 1000  $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Diyetle alınan fenilalanin toleransı günde 500 mg'dan azdır.

**FKÜ Olmayan HFA:** Birey normal diyetindeyken fenilalanin konsantrasyonu normalin üzerindedir. Fakat 1000  $\mu\text{mol/L}$ 'den azdır.

**Varyant FKÜ:** FKÜ ya da FKÜ olmayan HFA tanımına uymayan bireyleri içerir.

Başka bir sınıflandırmayı Guldberg ve arkadaşları 1998 yılında yapmıştır (11):

**Klasik FKÜ:** Klasik FKÜ'ye tam ya da tama yakın FAH enzim aktivitesi defekti neden olur. Hasta bireyler diyetle alınan fenilalaninin günde 250-350 mg'dan daha azını tolere edebilir. Diyet tedavisi olmayan birçok bireyde geri dönüşümsüz zeka geriliği görülür.

**Orta Derecede FKÜ:** Bu bireyler günde 350-400 mg fenilalanini tolere edebilir.

**Hafif FKÜ:** Bu bireyler günde 400-600 mg fenilalanini tolere edebilir.

**Hafif HFA:** Hafif HFA'lı küçük çocuklarda plazma fenilalanin konsantrasyonu normal diyetle 600  $\mu\text{mol/L}$ 'den daha azdır. Levy ve arkadaşlarının 1971 yılında ortaya koydukları hipotezi doğrulayan, Weglage ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada bazı bireylerin diyet tedavisine ihtiyacı olmayabileceğini göstermiştir (12).



## 2.5. FKÜ SIKLIĞI

Fenilketonürinin görülme sıklığı 1: 10000'dir. Ülkemizdeki sıklığı ise 1: 4500'dür (Tablo 2.3).

Her yıl ülkemizde 250-300 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır. Her 20-25 kişiden birinin hastalığı taşıyor olması ve ülkemizde akraba evliliklerinin yüksek oranda yapılması fenilketonürinin sık görülmesine neden olmaktadır (3).

**Tablo 2.3.** Türkiye ve bazı ülkelerde fenilketonüri görülme sıklığı

Ülke	Sıklık
Türkiye	1: 4500
U.S.A	1: 13000
U.K	1: 10000
Almanya	1: 9000
İrlanda	1: 6110
İtalya	1: 7000
Fransa	1: 18800
Çin	1: 20000
Japonya	1: 60000
Finlandiya	<1: 71000

## 2.6. KLİNİK BULGULAR

Hastalık konvülsiyonlar, mikrosefali, egzema ve skleroderma benzeri deri lezyonları, bazı hastalarda saç ve göz renginin açık olması ve özel bir idrar kokusu (küf kokusu) ile karakterizedir (3, 12, 13). Deri ve saçtaki hipopigmentasyon artan fenilalanin konsantrasyonu ile tirozin hidroksilazın kompetitif inhibisyonu yüzündendir. Tirozin hidroksilaz aktivitesinin inhibisyonu, tirozinin DOPA'ya dönüşümünü ve melanin oluşumunu önler. Böylece etkilenmiş ve tedavi edilmemiş bireyler mavi gözlü, kumral saçlı ve açık tenli olurlar (14, 15). Daha büyük çocuklarda hiperaktivite, otizm tarzında davranış bozuklukları, amaçsız hareketler, ritmik sallanma ve titreme görülebilir (16). Doğuştan kalp hastalıkları FKÜ 'de genel popülasyondan daha yaygındır (17). Hasta çocuk doğumda normaldir. Zeka geriliği yavaş yavaş gelişir ve ilk aylarda dikkati çekmez. En erken semptomu yenidoğan döneminde kusma olabilir. Katarakt ve beyinde

kalsifikasyonlar ile ilişkisi olabileceği düşünülmüşse de yeterli kanıt bulunamamıştır (Tablo 2. 4). Birçok çalışma gösteriyor ki FKÜ'li bireyler yüksek osteopeni insidansına sahipler (18, 19).

Tedavi edilmemiş fenilketonürlü çocuk ve yetişkin IQ'larının 40 olduğu ve sadece %4 ya da daha azının IQ'sunun 60'ın üzerinde olduğu bilinmektedir (14). Fenilketonürlü bireyler yaşamlarının ilk yılında tedavi edilmezlerse IQ'larında 50 puan azalma olduğu hesaplanmıştır (20).

Defektif miyelin oluşumuna, nörolojik anormalliklere ve zeka geriliğine neden olan mekanizma tam olarak bilinmiyor. Fakat fenilalanin ve ürünlerinin birikimi sonucu sinir sistemindeki metabolik yolların işleyişinde herhangi bir bozukluk ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (21).

FKÜ beyindeki ana nörotransmitterlerden biri olan dopamin üretimine de etki eder. Beyin, dopamini tirozin amino asidinden yapar. Diyetlerinde yeterli tirozin tüketmeyen FKÜ hastaları yeterli miktarda dopamin üretemezler. Beyindeki düşük dopamin seviyeleri (zayıflamış kognitif fonksiyon ile sonuçlanan) sinir hücreleri arasındaki normal iletişimi bozar ve bu zayıflamış mental fonksiyon ile sonuçlanır. Bazı çalışmalar gösteriyor ki FKÜ hastalarının sinir hücreleri de tirozini absorbe etmekte zorluk çekiyor. Bu anormallik, yeterli tirozin diyeti alan bazı hastaların neden hala öğrenme güçlüğü çektiğini gösteriyor (6).

Genel olarak altı ay civarında FKÜ'lü çocuğun akranlarından geri olduğu fark edilmeye başlanır. Fenilketonürlü çocukta baş kontrolü, oturma ve yürüme evreleri gecikir. Çocuk etrafla ilgisizdir (3).

FKÜ'li insanlar diğerleri ile iletişim kurmaktan çekinirler, sinirli görünürler ve depresyon belirtileri gösterirler. Bununla birlikte bazı hastalar kendilerini ifade edebilir, hiperaktif, konuşkan ve atılgan kişilik gösterebilir. İlginçtir ki FKÜ'li insanlar yalan söyleme, ağlama ve söz dinlememe gibi davranışları daha az gösterirler (6).

**Tablo 2.4.** Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri

Nörolojik	Mental retardasyon, amaçsız stereotipik hareketler, konvülsiyon, miyelin oluşumunda bozukluk
Baş	Mikrosefali
Deri	Açık renk, kuruluk, egzema, skleroderma benzeri lezyonlar
Saçlar	Açık renk
Gastrointestinal	Yenidoğan döneminde kusma
Gözler	Açık renk gözler, bazı vakalarda katarakt
Diğer	İdrarda küf kokusu
Radyolojik	Beyinde kalsifikasyon
Laboratuvar	Fenilalanin hidroksilaz eksikliği, Hiperfenilalaninemi, fenilpirüvik asidemi, idrarda hidroksifenilasetik asit, fenilpirüvik asit, fenilasetik asit ve fenilasetilglutamin atılımında artma

## 2.7. FKÜ TARAMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

1954 yılında Dr.Horst Bickel (Almanya) diyet ile fenilketonürinin olumsuz etkilerinin önlenebileceğini göstermiştir. Hastaların beyin hasarı gelişmeden önce tanımlanabilmeleri için bir teste gereksinim vardı. Tek geçerli test demir-3-klorür testi idi ve her vakada pozitif olarak bulunmuyordu. Dr.Robert Guthrie (A.B.D) 1965 yılında çok sayıda yeni doğan etkin taranmasına elverişli tarama testi geliştirmiştir.

Guthrie mikrobiyolojik analizi yüzlerce çocuğa kısa sürede uygulanabilmesi, özel bir aleti gerektirmemesi ve çok ekonomik olması nedeniyle 1960'lı yıllardan beri taramada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajları dikkate alınarak ülkemizde de ulusal fenilketonüri taraması Guthrie testi ile yapılmaktadır. Test *subtilus* basillerinin fenilalanin içermeyen bir kültür ortamında üreyememesi esasına dayanır. Besi yerine eklenen beta-tiyenilalanin kanda normalde bulunan fenilalanini bakterilerin kullanmasını engeller ve hiperfenilalaninemi olan bebeğin Guthrie kartı üzerine alınmış kan örneğinin çevresinde çapı kan fenilalanin düzeyi ile doğru orantılı olarak artan bir üreme alanı izlenir (3).

Proteinle beslenmeye henüz başlanmamış bile olsa FKÜ'de doğumdan sonra 4. saatte Guthrie testi pozitifleşir. Pozitiflik sınırı (cut-off değeri) 4 mg/dl olarak kabul edildiğinde, özellikle ilk 12 saatte alınan örneklerde yalancı pozitiflik oranı %33 kadar yüksek olabilir. Tarama örneğinin, yeterli protein alımından sonra yaşamın 48-72. saatinde alınması ve pozitiflik sınırının 2 mg/dl olarak kabul edilmesi ile yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik büyük ölçüde önlenebilir. İdeal olarak, doğumdan sonra ilk 24 saat içinde hastaneden taburcu edilen bebeklerde taramanın ilk iki hafta içinde tekrarlanması gerekir. Yenidoğan tarama sonucu pozitif çıkan, ileri değerlendirilmesi gereken vakalarda plazma fenilalanin ve tirozin düzeyleri kantitatif olarak belirlenir ve sekonder HFA nedenleri açısından ayırıcı tanı yapılır. Klasik FKÜ dışında primer HFA düşünülen vakalara biyopterin metabolizma bozukluğu ayırıcı tanısı için BH<sub>4</sub> yükleme testi uygulanır (7).

Teknolojik ilerlemelere paralel olarak yeni tarama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgünlüğü Tablo 2.5'te belirtilmiştir (3).

**Tablo 2.5.** Fenilketonüri taramasında kullanılan yöntemler

Test	Duyarlılık	Özgünlük	Tarama kapsama	Testin karmaşıklığı
Guthrie	Orta	Orta	Düşük	Düşük
Florometrik	Yüksek	Yüksek	Düşük	Orta
Enzimatik	Orta	Yüksek	Düşük	Orta
HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)	Yüksek	Yüksek	Orta	Yüksek
Kağıt veya ince tabaka kromatografisi	Düşük	Orta	Orta	Düşük
Ardışık kütle spektrometrisi	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek

## 2.8. MATERNAL FKÜ

Anneden fetusa aktif transport nedeniyle, fetusta amino asit düzeyi sistein dışında, annedekinden yüksektir. Maternal HFA'da, erken gebelik döneminden itibaren fetal/maternal fenilalanin oranı yüksektir. Plasental transportta fenilalanin diğer nötral amino asitlerle yarışa girerek fetusun büyümesini yavaşlatır, organların normal gelişimini engeller.

Hiperfenilalaninemik annelerden doğan çocukların %80'inden fazlasında düşük doğum tartısı, mikrosefali, dismorfik yüz görünümü, gelişme geriliği, kalp ve büyük damarları ilgilendiren doğuştan malformasyonlar gibi bulgular gelişmektedir. Özofagus atrezisi, trakeoözofageal fistül, bağırsak malrotasyonu, mesane ekstrofisi ve diğer ürogenital anomaliler, kolobom, katarakt, yarım damak-dudak gibi anomaliler daha nadirdir. Palpebral fissürlerde kısalık, epikantal kıvrım, filtrum kısalığı, yokluğu, alt dudak inceliği gibi dismorfik bulgular fetal alkol sendromuna benzemektedir. Fetusta anomali sıklığı, anne kan fenilalanin düzeyi ile ilişkilidir (Tablo 2. 6)(22).

**Tablo 2.6.** HFA'lı/FKÜ'lü anne çocuklarında, kan fenilalanin düzeylerine göre anomali sıklığı (23)

	Anne fenilalanin düzeyi (mg/dl)			
	20 mg/dl	16-19 mg/dl	11-15 mg/dl	3-10 mg/dl
Mental retardasyon	% 92	% 73	% 21	% 22
Mikrosefali	% 73	% 68	% 24	% 35
Doğumsal kalp hastalıkları	% 12	% 15	% 0	% 6
Düşük doğum tartısı	% 40	% 52	% 13	% 56

Maternal FKÜ'de, meydana gelebilecek anomalilerin önlenmesi için FKÜ'li anne adayları gebe kalmadan önce veya gebelik meydana gelmişse mümkün olduğunca erken düşük protein ve fenilalaninli sıkı diyetle dönmelidir. İlk trimester için protein alımı 75 gr/gün kadarken her trimester için yavaş olarak 15 gr/günlük artırım yapılabilir. Enerji alımı da yeterli olmalıdır. Kan fenilalanin düzeyleri 120-240 µmol/L arasında tutulmalıdır (3).

## 2.9. FAH GENİ

FKÜ otozomal resesif olarak kalıtılır. FKÜ'ye 12q22-q24.1 kromozomunda bulunan FAH genindeki mutasyonlar neden olur (24). Linsky ve arkadaşları ilk kez 1984'te FAH lokusunu 12. kromozomda ve 12q distal parçasında göstermişlerdir (25). FAH geni 13 ekzon içerir, 90 kb'dır ve 2.5 kb'lık mRNA'yı kodlar (26-29). FAH geninin normal ürünü 452 amino asit içeren FAH proteinidir (30).

## 2.10. FAH GENİNDE MEYDANA GELEN MUTASYONLAR

Uzunluğu 90 kb olan ve 13 ekzon içeren FAH geni 7 farklı restriksiyon enzimi kullanılmak suretiyle 9 farklı polimorfik bölge halinde incelenebilmektedir. Fakat mutasyonlar etnik farklılıklar göstermektedir. Örneğin R408W mutasyonu, Doğu Avrupa ülkelerinde bu hastalığa ilişkin tüm mutasyonların dörtte üçünü oluştururken İskoçya'da %24 dolaylarındadır. İntron 10'daki bir kesilme mutasyonu (IVS 10) ise Türklere görülen tüm mutasyonların %40 kadarını oluşturmaktadır (Tablo 2. 7).

**Tablo 2.7.** FAH geninde sık görülen haplotiplerin bazı Avrupa ülkelerindeki sıklığı

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

Son yıllarda FAH enziminin eksik olmadığı, fakat bunun yerine dihidropterin redüktaz ve dihidropterin sentetaz adlı iki enzimden birinde eksilme görüldüğü iki yeni FKÜ varyantı daha bulunmuştur. Bu iki enzim FAH enziminin kofaktörü olan tetrahidrobiopterin senteziyle ilişkilidir. Bu iki hastalık da klasik FKÜ'den daha ciddi hastalıklardır, zira iyi bir diyetle bile elde edilen sonuçlar pek başarılı olmamaktadır.

Türkiye'deki FKÜ mutasyonlarının büyük çoğunluğu (%40) haplotip 6 ile ilişkilidir ve bu haplotip Kuzey Avrupa ülkelerinde çok seyrek rastlanan bir haplotiptir (tablo 2.7). Ayrıca RFLP ile yapılan çalışmalar FAH geninin büyük bölümünün 1-4 haplotipleriyle ilişkili olduğunu da göstermiştir (31).

FAH geninde 420'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (En azından 385'i patojenik ve 27'si patojenik olmayan)(2). Gen dizisinde küçük değişimlere neden olan 31 farklı polimorfizm tanımlanmıştır. Bütün bu polimorfizmlerin, protein ürünü üzerindeki etkilerinin nötral olduğu tahmin edilmektedir (32). FAH geninde meydana gelen mutasyonlar; yanlış anlamlı, splice-site ve anlamsız mutasyonlar ile küçük delesyonlar ve insersiyonlardır (Tablo 2. 8) (33).

**Tablo 2.8.** FAH geninde meydana gelen mutasyonların sınıflandırılması

Mutasyon görülme yüzdesi	Genetik mekanizma
% 62	Yanlış anlamlı (missense)
% 13	Delesyon (özellikle küçük delesyonlar)
% 11	Splice
% 6	Sessiz (silent)
% 5	Anlamsız (nonsense)
% 2	İnsersiyon

Çok sayıdaki mutasyonlar yüzünden hastaların çoğu bileşik heterozigottur. Bu en azından kısmi olarak bu hastalıkta incelenen önemli fenotipik çeşitliliği açıklar. Her bir hastadaki FAH mutasyonlarının belirlenmesi hastalığın şiddetini önceden bildirmeye yardımcı olabilir (34-36). Mutasyona bağlı olarak bazı hastalar çok etkili bir şekilde FAH kofaktörü olan BH<sub>4</sub> ile muamele edilir (37-40).

FAH eksikliği çevrenin (fenilalaninin diyetle alımı) ve genotipin (FAH genindeki mutasyon) etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır (41). Çünkü her bir bireyin kişisel bir genomu vardır, benzer mutant FAH genotiplerinin benzer FKÜ fenotipleri yoktur. FAH genotipi fenotipin sağlam bir göstergesi olmayabilir (33).

FAH mutasyonlarına ek olarak, modifiye edici genler ve diğerk faktörler muhtemelen hastalık ekspresyonunun değışkenliğinden sorumludur (1, 2, 6). Bu mutasyonların sıklığı ve dağılımı farklı populasyonlarda analiz edilmiştir ve belirli etnik ve demografik gruplar haricinde genel populasyonda baskın ya da yaygın FKÜ ilişkili mutasyonlar yoktur (7, 42, 43).

FAH geninde meydana gelen bazı mutasyonlar Tablo 2. 9'da gösterilmiştir (18).



<b>Tablo 2.9.</b> FAH geninde meydana gelen bazı mutasyonlar	
Lokalizasyon	Mutasyon
Ekzon 1	47-48delCT
İntron 1	IVS+5G→C
Ekzon2	F39del, F39L, G46S, L48S, 165delT
İntron 2	IVS2+5G→C, [IVS2 13T→G;c.969A→G]
Ekzon 3	165T, R68S, D84Y, S87R, 194del, 194S, A104D
Ekzon 4	D145V
Ekzon 5	G148S, R158W, R158Q, Y166X
İntron 5	IVS5+1G→A
Ekzon 6	I174, R176X, V177L, 558delA, W187X
Ekzon 6	V190A, L194P, Y204X, P211T, 663-64del AG P225R, V2301, S231P
Ekzon 7	G239V, R241C, R241H, R243X, R243Q, V245A, A246V, R252G, R252W, R252Q, R261X, R261Q R261P, I269N, G272X, 822-32del , E280K, P281L
İntron 7	IVS7+1G→A, IVS7+5G→A
Ekzon 8	H285Y, S295X , R297H ,F299C , A300S
İntron 8	IVS8+1G→A, IVS8-7A→G
Ekzon 9	929-39del, L311P
Ekzon 10	F327L, 1024delG, G344S , G346R, L348V, S349P 1055delG, G352R ,Q355X
İntron 10	IVS10+3A→C, IVS10-11G→A, IVS10-3C→T IVS10-1G→A
Ekzon 11	T380M, Y386C, E390G, A395P, A395G, I194A→G
Ekzon 12	A403V, R408W, R408Q, Y414C, D415N, IVS12+1G→A
Ekzon 13	I355^56insA
İntron 8-11	Büyük delesyonlar

## 2.11. TEDAVİ

### 2.11.1. Klasik FKÜ İçin Tedavi

**Fenilalanin diyetinin kısıtlanması:** Genel olarak HFA'lar için tedavinin hedefi kandaki fenilalanin ve tirozin konsantrasyonunun normalleştirilmesidir ve böylece kognitif bozukluklar önlenir (44). 120-360 µmol/L (2-6 mg/dL) ya da 60-240 µmol/L (1-4 mg/dL) fenilalanin konsantrasyonları genel olarak güvenli kabul edilir (44, 45). Fenilalaninin diyetle alımının kısıtlanması doğumdan hemen sonra başlamalıdır ve en azından ergenlik dönemine kadar devam edilmelidir, belki de hayat boyu olmalıdır (46). řu açıktır ki, diyet özellikle çocukluk ağı boyunca sıkı takip edilmezse ve plazma fenilalanin konsantrasyonunun sıklıkla önerilen konsantrasyonun üzerine çıkmasına izin verilirse bazı zararlar kaçınılmazdır. Kısıtlı fenilalanin diyeti bireysel fenilalanin toleransına uyarlanır ve yaşı uygun protein ve enerji içerir. Diyet dikkatlice izlenmeli, böylece büyüme ve beslenme durumları etkilenmemelidir ve fenilalanin ya da tirozin eksikliği ortaya çıkarılmamalıdır. Diyet, büyüme, hastalık, aktivite gibi durumlara göre ayarlanmalıdır. Yeterli kalsiyum ve D vitamini alımı da önemlidir.

**Bebeklik Döneminde Tedavi:** Doğumdan hemen sonra bir fenilalaninden kısıtlı diyetle ve fenilalanin içermeyen formüle başlanmalıdır. Fenilalanin içermeyen formül ile birlikte emzirmeye devam edilmelidir. Tirozin ve toplam amino asitlerin alımı takip edilmelidir. 2 yaşın altındaki çocuklar en azından günde 25 mg kg/tirozin içeren 3 g/kg toplam amino asit alımına devam etmelidir. Kan amino asit konsantrasyonundaki iniş ıkışları en aza düşürmek için fenilalanin içermeyen formül tüketimi günün 24 saatine yayılmalıdır (47). Beyin gelişimi için de zararlı olan düşük kan fenilalanin konsantrasyonunun uzun süre devam etmesinden kaçınmak için önlemler alınmalıdır. Kan fenilalanin konsantrasyonunu kontrol amacıyla haftalık ya da iki haftada bir takipler yapılmalıdır (44).

**Çocukluk Döneminde Tedavi:** 2 yaşın üzerindeki çocuklar günde toplam 25 mg tirozin/kg içeren 2 g/kg amino asit tüketmelidirler. 7 yaşına kadar iki haftada bir takip edilmeli ve 7 yaşından sonra aylık kontrol yapılmalıdır.

**Ergenlik ve Yetişkinlikte Tedavi:** Ergenler ve yetişkinlerdeki tedavi tavsiyeleri çeşitlidir (48). Genel olarak yaşam için diyet tedavisine destek artar (49). Bazı alışmalar ergenlikteki sıkı diyete ara verilmesinin, plazma fenilalanin konsantrasyonu

1200  $\mu\text{mol/L}$ 'nin altında kaldığında yönetici olmayan fonksiyonları etkilemediğini belirtilmektedir (50). Bir başka çalışma gösteriyor ki, eğer 12 yaşından sonra diyetle ara verilirse IQ sabit kalır fakat diğer fonksiyonlar geriler. Fenilalaniniden kısıtlı diyeti bırakan yetişkinlerde dikkat süresinde azalma ve bilgi işleme yeteneğinde yavaşlık gözlenir. Aynı zamanda beyin elektriksel aktivitesinde hasar, kas tonusunda artma, kemik mineral içeriğinde azalma ve mental problemler ortaya çıkar.

### **2.11.2. FKÜ Olmayan HFA İçin Tedavi**

Plazma fenilalanin konsantrasyonu 600  $\mu\text{mol/L}$  (10 mg/dL)'nin altında olan FKÜ olmayan HFA'lı bireyler zihinsel, nörolojik ve nörofizyolojik zarar açısından FAH eksikliği olmayan bireylerden daha yüksek risk taşımazlar. Bazı uzmanlar tedavi olmamanın mantıklılığını tartışırken, diğerleri bu sınıftaki bireyler için diyet tedavisinin gereksiz olduğuna inanıyor (51, 52, 7). Bu gruptaki kızların, çocuk doğurma çağına geldiklerinde, yükselen maternal plazma fenilalanin konsantrasyonunun teratojenik etkileri için önlem almaları gerekir (51).

**FAH Eksikliği Olan Hamile Kadın:** Çocukluğunda ve ergenlik döneminde tedavi gören FAH eksikliği olan hamile kadınlar normal fiziksel ve zihinsel gelişime sahiptirler. Eğer kadının plazma fenilalanin konsantrasyonu yüksekse fenilalanin bir teratojen olduğu için onun rahim içi çevresi gelişen fetus için düşman olacaktır (53). FAH eksikliği olan kadınların plansız gebelikten korunmaları için güvenilir doğum kontrol metodları kullanmaları önerilmektedir.

FAH eksikliği olan, diyet yapmayan ve hamileliği planlayan kadınların gebe kalmadan önce bir fenilalaniniden kısıtlı diyetle başlamaları ve plazma fenilalanin konsantrasyonları birkaç ay boyunca 120 ve 360  $\mu\text{mol/L}$  arasında kalmalıdır (54). Gebe kaldıktan sonra devamlı olarak diyetisyen kontrolünde olmalı ve haftada ya da iki haftada bir plazma fenilalanin konsantrasyonunu ölçtürmelidir. Çünkü diyetle alınan fenilalanin ve protein gereksinimleri hamilelik boyunca çok değişir. Fetal büyümeye en uygun şartları sağlamak için normal kilo artışına ulaşmaya çalışmalılar (55, 56).

Fetusun yüksek maternal plazma fenilalanin konsantrasyonuna maruz kalmasından kaynaklanan anormallikler maternal HFA/FKÜ'nin sonucudur (57). Maternal HFA'nın şiddetine ve annenin diyetinin etkisiz kalmasına bağlı olarak fetusta doğumsal kalp hastalığı, intrauterin ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali ve zeka geriliği olur.

Bununla birlikte bazı çalışmalar gösteriyor ki tedavi görmezken plazma fenilalanin konsantrasyonu 400  $\mu\text{mol/L}$  (7 mg/dL)'den düşük olan FKÜ olmayan HFA olan kadınlar normal görünümde çocuk sahibi olabilirler (58, 59). Maternal plazma fenilalanin konsantrasyonu 120-360  $\mu\text{mol/L}$  (2-6 mg/dL) iken bebeklerin % 6'sı mikrosefali ile doğar ve % 4'ünde postnatal büyüme geriliği oluyor (60). Eğer maternal plazma fenilalanin konsantrasyonu 900  $\mu\text{mol/L}$  (15 mg/dL)'den yüksek olursa risk mikrosefali için % 85, postnatal büyüme geriliği için % 51 ve intrauterin büyüme geriliği için % 26 olur (60). Bu anormallikler için risk hem doza hem de zamana bağlıdır (60, 61). Böylece anormallik riskini azaltmak için hamilelik boyunca en uygun plazma fenilalanin konsantrasyonu sağlanmalıdır (62). Çalışmalar bu durumu desteklemektedir.

## 2.12. FKÜ HASTALARININ YİYEBİLECEĞİ BESİNLER

FKÜ hastalarının diyet tedavisinde kullanılan besinler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (3).

**Tablo 2.10.** FKÜ'li hastaların diyet tedavisinde kullanılan ve fenilalanin içerikleri ihmal edilebilir sebze ve meyvalar

<b>Sebzeler</b>		
Enginar	Yeşil fasulye	Lahana
Havuç	Karnıbahar	Kereviz
Salatalık	Marul	Soğan
Maydanoz	Biber	Bal kabağı
Domates	Şalgam	
<b>Meyvalar</b>		
Elma	Taze şeftali	Taze incir
Üzüm	Kivi	Kavun,karpuz
Portakal	Armut	Nar
Ayva	Çilek	

Fenilalanin ve aspartik asidin metil esterini içeren bir dipeptid türevi olan yapay tatlandırıcı 'aspartam'dan kaçınılmalıdır (3).

### **2.12.1. Fenilketonüri’li çocuk anne sütü almaya devam edebilir mi?**

FKÜ’li çocukların tedavilerinin yapıldığı birçok merkezde tıbbi besinlerin yanı sıra ölçülü miktarlarda normal çocuk mamalarının kullanılması tercih edilmektedir. Ancak normal çocuk maması yerine anne sütüyle de devam edilebilir ve böyle bir tedavi yaklaşımına ebeveynler tarafından uyum olasılığı daha yüksektir. Başlangıçta kan fenilalanin düzeyleri de dikkate alınarak ve sık aralıklarla kan fenilalanin düzeyleri ölçülerek öğünlerin birkaçında emzirme öncesi tıbbi besin verilir ve arkasından anne sütüyle bebek istedikçe beslemeye devam edilir (3).

## **2.13. FKÜ HASTALARINDA MUTASYON TESPİTİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

### **2.13.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ilgilenilen bir dizinin sınırsız miktarda oluşturulmasıyla klonlama için bir alternatiftir. PCR, seçici olarak birkaç saat içerisinde tek bir DNA veya RNA molekülünü birkaç milyon katına çoğaltılabilir. Bu, genetik hastalığın hem moleküler taramasında hem de moleküler analizinde devrim olmuştur. PCR, iki oligonükleotid ‘primer’ arasında bulunan bir DNA (hedef) parçasının enzimatik çoğaltılmasıdır. Bu primerler öyle düzenlenmiştir ki biri hedef dizinin bir tarafındaki DNA molekülünün bir zincirine karşıt, diğer primer de hedef dizinin zıt tarafındaki DNA molekülünün diğer zincirine karşıttır. Çünkü, her primerin 3’ ucu çoğalacak olacak hedef diziyi işaret eder ve hedef diziyi çevreler. Primerler, aralarında kalan diziyi DNA polimeraz ile sentez edilmesiyle uzatır. Primerler öyle bir şekilde düzenlenirler ki ; DNA’nın her iki yeni zinciri tamamlayıcı olarak ve etkili şekilde ikinci bir hedef dizi kopyasını oluşturur. Isı ayrılması, primerlerin hibridizasyonu ve enzimatik DNA sentezinin tekrarlanan döngüleri, hedeflenen DNA dizisinin üssel artışları (amplifikasyonu) ile sonuçlanır.

Özel olarak tasarlanmış PCR makinalarının kullanımı ile çoğalma işlemi, yalnızca birkaç dakika sürmektedir. Yalnızca birkaç saat içinde başlangıçtaki dizinin birkaç milyon kopyası elde edilebilir. Özgül dizilerin hızlı çoğaltılması, mutasyon analizi için DNA örneklerindeki özel genlerin klonlanmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılabilir.

PCR, DNA ve RNA örneklerinin analizi için, araştırma laboratuvarlarında, klinik moleküler tanı laboratuvarlarında, adli tıp ve kriminoloji laboratuvarlarında çok hızlı bir şekilde kullanılan standart bir metod haline gelmiştir. PCR, diğer nükleik asit analiz metotlarından daha hızlı, daha az masraflı, daha duyarlı ve daha az hasta materyali gerektiren bir metottur (63).

### **2.13.2. Restriksiyon Enzimleri**

Moleküler klonlamanın gelişmesindeki anahtar ilerlemelerden birisi, 1970'lerin başlarında bakteriyel restriksiyon endonükleazların keşfedilmesidir (63). Bu enzimler bütün bakterilerde bulunur. Bunların viral enfeksiyonları önleme kabiliyeti vardır ve dolayısıyla yabancı DNA girişine karşı ilgili DNA kesimlerinde metilasyon yapmak suretiyle bir savunma mekanizması olarak işlev yaparlar. Bu enzimlerin her biri ilk kez izole edildikleri bakterinin adını alırlar (31).

Restriksiyon endonükleazlar, DNA'daki özel çift iplikli dizileri tanırlar ve DNA'yı tanıma bölgesinden veya ona yakın yerlerden keserler. Örneğin; bir restriksiyon enzimi olan *EcoRI*, çift iplikli bir DNA molekülünü neresinden olursa olsun altı baz çiftlik özel bir diziyi 5'-GAATTC-3' tanır. Bu enzim, DNA'yı her zincirde G ve ona bitişik olan A arasında bir çentik açarak bölmektedir. Böylece uç noktalarında her biri dört bazlık tek zincirli iki DNA segmenti oluşur. Bu tür yapışkan uçlar, rekombinant DNA moleküllerinin oluşumundaki bağlanma reaksiyonları için yararlı olmaktadır. Diğer restriksiyon enzimler, her enzim için özgül olan farklı nükleotid dizilerini tanırlar. Günümüzde binden fazla enzim bilinmektedir ve en yaygın kullanılanlardan bazıları tablo 2.11'de listelenmiştir (63).

**Tablo 2.11.** Restriksiyon enzim örnekleri ve tanıdıkları diziler

Restriksiyon Enzimler	Kaynak	Tanıma dizileri*
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	5'-G <sup>^</sup> GATC C-3'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli RY 13</i>	3'-C CTAG <sup>^</sup> G-5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G <sup>^</sup> AATT C
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	C TTAA <sup>^</sup> G
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-cavarium</i>	GG <sup>^</sup> CC
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	CC <sup>^</sup> GG
<i>SstII</i>	<i>Streptomyces stanford</i>	A <sup>^</sup> AGCT <sup>^</sup> A
		T TCGA <sup>^</sup> A
		GC <sup>^</sup> GGCC GC
		CG CCGG <sup>^</sup> GG
		<sup>^</sup> GATC
		CTAG
		CC GC <sup>^</sup> GG
		GG <sup>^</sup> CG CC

\*Tüm tanıma dizileri *Bam HI*'de görüldüğü gibi 5'→3' yönünde verilmiştir. Her bir zincirdeki kesim bölgeleri küçük ok işareti ile gösterilmiştir.

Restriksiyon enzimlerin çoğu 4 veya 6 baz çiftinden oluşan tanıma bölgelerine sahiptir (Çok az bir kısmı daha uzun tanıma bölgelerine sahiptir). Genellikle bu diziler palindromlardır. Bu tanıma bölgesindeki bazların dizisi, her iki DNA zincirinde de aynı yönde 5'→3' yönünde okunurlar (63).

### 2.13.3. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Restriksiyon enzimleri, DNA'daki dizileri özgül olarak tanırlar ve sonuç olarak genomik DNA'da dizi değişiklikleri belirli kesim bölgeleri oluşturur veya onları yok eder (63). DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimi ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda parçalar oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu parçalar RFLP olarak adlandırılır. RFLP'ler birçok hastalıkta kalıtsal belirleyici olarak kullanılırlar. Yine eğer belirlenemeyen bir protine ilişkin genin kalıtımını incelenmek isteniyor ve gene bağlı olan RFLP'ler bulunuyorsa, ailede bir genin kalıtımını belirlemek için bu belirleyicilerden yararlanılır (64).

#### **2.13.4. Değişken Sayıdaki Ardışık Tekrarlar (VNTR)**

Minisatellit olarak da adlandırılır. VNTR bir dizi ardışık tekrarlayan dizilerden oluşur. Tekrarların boyutu onlarca baz çifti uzunluğunda olabilir ve belirli bir allelde onlarca ya da binlerce ardışık kopyalar vardır. Őu ana kadar insan genomunda yaklaşık 100 VNTR bölgesi biliniyor.

Bireylerde ardışık tekrar sayıları büyük değişkenlik gösterebilir. Tekrarlayan birim 2, 3 ya da 4 baz çifti ise STR (short tandem repeat) ya da mikrosatellit olarak adlandırılır. Daha uzunsa VNTR ya da minisatellit olarak adlandırılır. VNTR ilk defa 1985 yılında A. J. Jeffereys tarafından keşfedilmiştir (65).



## **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **3.1. GEREÇLER**

Çalışmada kullanılan demirbaş ve sarf malzemelerin listesi ek1 ve ek2'de verilmiştir.

### **3.2. YÖNTEMLER**

#### **3.2.1. Örneklerin Alınması**

Çalışmamızda Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümünden FAH enzim eksikliği tanısı ile takip edilen hastalardan ve onların anne-baba varsa kardeşlerinden kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. EDTA'lı 2 ml kan DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

#### **3.2.2. DNA İzolasyonu**

##### **3.2.2.1. Periferel Kandan DNA İzolasyonu**

1. EDTA'lı 2 ml kan alınarak falkon tüpüne aktarıldı. Kan üzerine 3:1 hacimde +4 °C'de saklanan Red Cell Lysis solüsyonu eklendi. Ara sıra alt üst edilerek 20 dakika oda ısısında bekletildi. Bu aşamada kırmızı kan hücreleri (eritrositler) parçalanmış oldu.
2. Sonra tüpler 2500 rpm'de 12 dakika santrifüj edildi. Böylece kırmızı kan hücrelerinin süpernatandan atılması sağlandı. Dip kısımda kalan çekirdekli kan hücrelerinden DNA izole edildi.

3. Dipteki pellet iyice vortekslendi. Üzerine ilk aşamadaki kan miktarı kadar yani 1 ml oda ısısındaki Cell Lizis solüsyonu eklendi. Tekrar vortekslenip homojenize olana kadar 37 °C’de etüvde inkübe edildi. Homojenizasyon yaklaşık 2 gün sürdü.
4. İnkübasyon sonrası homojenize olan çözelti yeniden vortekslendi. Üzerine 1:3 hacim protein presipitasyon çözeltisi (amonyum asetat) ilave edilip tekrar vortekslendi.
5. Bu çözelti 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısmı temiz bir tüpteki 1 hacim izopropanol üzerine alındı. Alt üst edildi. DNA bu aşamada gözle görülebilir hale gelir.
7. DNA’nın dipte çökmesi için 4000 rpm’de 8 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant atılıp, DNA 1 ml %70’lik etanol ile yıkandı ve yeniden 4000 rpm’de 8 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Dipte çöken DNA oda ısısında falkon tüpünün kapağı kapatılmadan kurumaya bırakıldı.
10. Kurutulan DNA üzerine çözülmesi için 200 µl distile su veya TE tamponu eklenerek ependorf tüpüne alındı.

### **3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları**

#### **3.2.3.1. PCR**

DNA’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)’nda çoğaltılması için aşağıda verilen PCR karışımları hazırlandı. VNTR polimorfizmi ve R261Q mutasyon analizi için ayrı olmak üzere bir karışım hazırlandı. Bu karışımlarda değişen sadece primer çiftleridir. Diğer parametreler değişmemektedir.

10 X PCR tamponu	5 µl
dNTP	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Primer-1	3 µl
Primer-2	3 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl
DNA	8 µl

Eklendi ve distile su ile toplam hacim 50 µl'ye tamamlandı.

Bu PCR tüpü içerisindeki karışım aşağıdaki programlarda belirtildiği gibi PCR'da amplifikasyon işlemine tabii tutuldu. Böylece istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

- **R261Q İçin PCR Programı**

94 °C'de 5 dk. denatüre edildi.

94 °C	30 sn.	↓	↑	35 döngü
56 °C	1 dk.			
72 °C	1 dk			
72 °C	10 dk	Uzama		

- **VNTR Polimorfizmi için PCR Programı**

94 °C 5 dk. Denatürasyon periyodu

94 °C	30 sn.	↓	↑	35 döngü
55 °C	1 dk.			
72 °C	1 dk			
72 °C	10 dk	Uzama		

**Tablo. 3.1.** VNTR polimorfizmi ve R261Q mutasyonu için kullanılan primer dizileri

<b>R261Q – R :</b> 5' CTC ACG GTT GGG TAT AC 3'
<b>R261Q – F :</b> 5' TCA TCC CAG CTT GCA CTG GT 3'
<b>VNTR – R :</b> 5' GGA AAC TTA AGA ATC CCA TC 3'
<b>VNTR – F :</b> 5' GCT TGA AAC TTG AAA GTT GC 3'

### 3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri % 3'lük agaroz jelde koşturuldu.

### 3.2.3.3. R261Q İçin RFLP

#### Enzim Muamelesi;

R261Q için PCR ürünü *Hinf I* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. Bunun için karışım aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Enzim buffer        2.5 µl

*Hinf I* enzimi        0.5 µl

PCR ürünü         15 µl

Distile su ile 25 µl'ye tamamlandı. 37 °C 'de bir gece inkübe edildi.

#### Elektroforez İşlemi;

Enzimle muamele edilmiş PCR ürünleri % 4'lük agaroz jelde koşturuldu. Mutant tip (R261Q) 254 bp'de tek bant gösterir.

### 3.2.4. Çalışma Süresinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

#### 3.2.4.1. Red Cell Lizis Solüsyonu

- 155 mM Amonyum Klorür
- 10 mM Potasyum Hidrojen Karbonat
- 1 mM EDTA

#### 3.2.4.2. Cell Lizis Solüsyonu

- 25 mM EDTA
- % 2 'lik SDS

#### 3.2.4.3. Protein Presipitasyon Solüsyonu

- 10 mM Amonyum Asetat

**3.2.4.4. % 70'lik Etanol**

- 70 ml saf Etanol
- 30 ml Distile su

**3.2.4.5. TE Tamponu**

- 10 mM Tris/HCl pH:8.0
- 1 mM EDTA

**3.2.4.6. 10 X TBE Tamponu**

- 108 gr Tris
- 55 gr Borik asit
- 7.31 gr EDTA tartılarak distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

**3.2.4.7. %1'lik Etidyum Bromür**

0.2 gr etidyum bromür hassas terazide tartılıp 20 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**3.2.4.8. % 3'lük Agaroz Jel Hazırlanması**

3 gr agaroz hassas terazide tartılarak 1 X TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı. Jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 °C 'ye kadar soğutulup içine 5 µl etidyum bromür eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü. Daha sonra kuyucukların oluşması için özel bir tarak takılarak donmaya bırakıldı.

**3.2.4.9. % 4'lük Agaroz Jel Hazırlanması**

4 gr agaroz hassas terazide tartılarak 1X TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı. % 3'lük agaroz jelin hazırlanmasındaki yol izlendi.

Çukurova bölgesinde yapılan çalışmada IVS10-11G→A mutasyonunun görülme sıklığı % 59 olarak bulunmuştur. Bu bölgede görülen ikinci en yaygın mutasyon olan R261Q mutasyonunun görülme sıklığı ise % 15.2 olarak bulunmuştur (69).

Brezilya'da yapılan başka bir çalışmada Minas Gerais'te R261Q mutasyonunun görülme sıklığının %16 , IVS10-11G→A mutasyonunun görülme sıklığının ise % 13.4 olduğu ileri sürülmektedir (1).

Ayrıca IVS10-11G→A mutasyonu % 30.8 sıklıkla Mısır'da en yaygın görülen FKÜ mutasyonudur. R261Q ise % 11.5 sıklıkta görülür (27).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki Türkiye'de en yaygın görülen FKÜ mutasyonu IVS10-11G→A'dır. R261Q mutasyonu ise % 7 sıklıkla bu mutasyonu takip eder. Yaptığımız çalışmada R261Q mutasyonu ile birlikte IVS10-11G→A mutasyonunu da çalışacaktık. Ancak primerlerde olan hata sonucu bu mutasyonu çalışamadık. Bu yüzden Türklerde daha az sıklıkla görülen R261Q mutasyonunu çalıştık. Hasta bulmada çektiğimiz güçlüklerden dolayı bu mutasyonu yalnızca 11 hastada çalışabildik. Hasta sayısının az olması ve Türklerde R261Q mutasyonunun görülme sıklığının düşük olmasından dolayı bu mutasyona rastlama şansımız oldukça düşük. IVS10-11G→A mutasyonunu çalışmış olsaydık hastalarda bu mutasyonu bulma ihtimalimiz daha yüksek olacaktı.

## **4. BULGULAR**

Bu çalışma için FKÜ tanısı konmuş 11 hastadan ve bu hastaların anne, baba, varsa kardeşlerinden kan örnekleri alınarak DNA elde edildi. Hasta çocukların 6'sı erkek 6'sı kız çocuğudur. Kız çocukları 2-14 yaş aralığındadır. Erkek çocukları ise 5-13 yaş aralığındadır.

### **4.1. PCR BULGULARI**

Hasta ve ailelerinden elde edilen DNA'lar PCR'da çoğaltıldıktan sonra % 3'lük agaroz jelde koşturularak değerlendirildi.

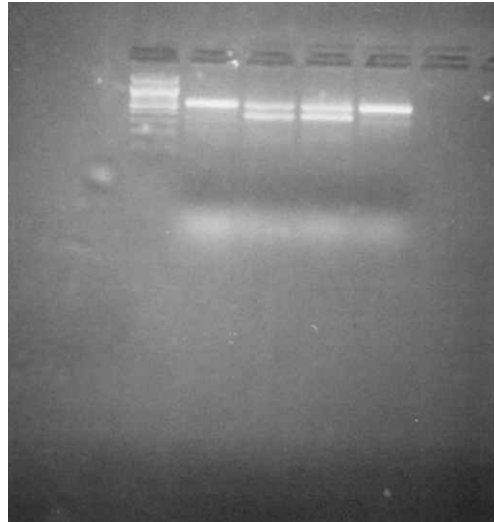
#### **4.1.1. VNTR Analizi İçin PCR Bulguları**

11 aileden 4 tanesinin VNTR sonucu informatif, 7 tanesinin VNTR sonucu ise noninformatif bulunmuştur (tablo 4.1). 1. aile için FAH-VNTR polimorfizm PCR uygulaması sonucunda elde edilen ürün % 3'lük agaroz jelde yürütülmüş ve resim 4.1'deki veriler elde edilmiştir.

**Tablo 4.1.** FKÜ'li hasta çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizmi taşıyıcı tespiti bulguları

Aile No	Baba	Anne	Hasta Çocuk	Kardeş			Aile (VNTR Polimorfizmine göre)	
				Sayısı	Taşıyıcı	Sağlam	İnformatif	Noninformatif
1	1	1	1	1			+	
2	1	1	1	1				+
3		1	1	3				+
4	1	1	2				+	
5	1	1	1	1				+
6	1	1	1					+
7	1	1	1					+
8	1	1	1					+
9	1	1	1	1			+	
10	1	1	1	2			+	
11	1	1	1	5				+

1 2 3 4 5



**Resim 4.1.** İnformatif olarak bulunan 1. ailenin VNTR ürününün % 3'lük agaroz jel görüntüsü. (1: Marker, 2: Hasta (600 bç), 3: Anne (600-400 bç), 4: Baba (600-400 bç), 5: Kardeş (600 bç))





## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalıtsal metabolik hastalıklar grubuna giren FKÜ, hepatik FAH enziminin eksikliğinden kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. FAH enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşemeyen fenilalanin ve onun metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır. FKÜ hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenmektedir (7).

Bu çalışma, FKÜ tanısı konmuş hastalarda RFLP moleküler yöntemini kullanarak R261Q mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının tespitini ve yine bu hastaların kardeşlerinin VNTR moleküler yöntemini kullanarak taşıyıcı olup olmadıklarının tespitini içermektedir.

FAH geninin klonlanması ile genin yapısı iyice anlaşılmış, genin içinde veya yakınında tanımlanan polimorfik bölge kesimleri ile birçok haplotipin meydana geldiği ortaya konmuştur (66). R261Q mutasyonu için biz *Hinf I* restriksiyon enzimini kullandık. Birçok durumda, bu RFLP'lerden sorumlu nükleotid değişimlerinin fenotipik bir etkisi bulunmamaktadır. Ama bazı hallerde polimorfik kesim bölgeleri genin kodlanan kısmında yer almaktadır. Bu bölgelerdeki mutasyonlar sabit veya polimorfik parçaların uzunluklarını değiştirmektedir. Bu polimorfik bölgelerin fiziksel harita uzunlukları ve standardize bağlantı eşitsizlikleri arasındaki kaba ilişki insan FAH geninde

rekombinasyon için herhangi bir hot-spot tanımlanamamıştır. FAH geni üzerindeki mutasyonlar ile bu RFLP'ler arasında sıkı bağlantı vardır. Bu nedenle FKÜ allellerinde RFLP'ler normal veya mutant kromozomların geçişlerinin takibinde, doğum öncesi tanı ve taşıyıcı tanısında kullanılabilirler. Birçok farklı populasyonda normal veya mutant kromozomla üzerinde bu polimorfizmlerin frekansları tespit edilmiştir. Genel Avrupa populasyonlarında, tüm FKÜ allellerinin % 86'sının bir veya daha fazla bölge açısından heterozigot olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık doğu ülkeleri içinde bu frekanslar % 32 olarak bildirilmiştir. Dolayısıyla RFLP'ler Asya populasyonlarında taşıyıcı tanısı ve prenatal tanı için daha az yararlıdır.

Kalıtsal hastalıkların tanı ve taşıyıcı tespiti için kullanılan en etkin yöntemlerden biri de hastalığa neden olan mutasyonun direkt tespitine dayalı tanı yöntemidir. Eğer ailede hastalığa neden olan mutasyon biliniyorsa hastalığın tanısı bu tip durumlarda oldukça kolay ve % 100'lük bir kesinlikle yapılabilmektedir. Hastalığa neden olan nokta mutasyonu bir restriksiyon enziminin kesim bölgesini değiştiriyorsa bu durumda enzim kesim bölgesini içeren gen bölgesi PCR ile çoğaltılarak uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek elektroforez işlemi sonunda jelde incelenmektedir. Oysa, FAH enzimi yetersizliği gösteren hastalarda geniş bir klinik fenotip spektrumu olduğunu Scriver ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları Mendelyen HFA adlı makalede ortaya koymuşlardır. Bu fenotipik varyasyon altta yatan moleküler düzeydeki heterojeniteyi ve dolayısıyla FAH mutant allellerinin çeşitliliğini göstermekte olduğunu ise Guldberg ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları Denatüre edici gradient jel elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE) ile FKÜ mutasyonlarının tespiti ile ilgili makalede bildirmişlerdir (66).

Alexei Goltsov ve arkadaşları 1992 yılında FAH genindeki mutasyonlarla VNTR'lar arasında da bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Bu VNTR'ların her biriyle mutasyonlar arasında bir bağlantı olduğunun keşfi, RFLP ile mutasyonlar arasındaki ilişkinin tanı ve taşıyıcı tespitinde bilgi verici olmasından daha detaylı ve daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır (67). Bu nedenle biz de taşıyıcı tespitine yönelik 11 FKÜ ailesinde VNTR'lardan yararlanmayı tercih ettik. Ancak yalnızca 4 aile informatif bulundu. Bulunan sonuçlara göre kardeşlerin de hasta olması gerekiyordu. Fakat yaptığımız çalışmada RFLP ve VNTR sonuçları uyum göstermediği için kesin bir yargıya varmamız yanlış olur.

Moleküler tanı yöntemlerinden olan DGGE ve Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (Single Strand Conformation Polymorphism; SSCP) yöntemleri bir ya da birkaç nükleotid kusuru taşıyan tek sarmallı DNA'nın hareket değişikliğine, Yanlış Eşleşmenin Kimyasal Kesimi (Chemical Cleavage of Mismatch; CCM) yöntemi ise bazlar arasında bir bozukluğun olup olmamasına göre ortaya konan kimyasal reaktiviteye bağlıdır. Bu yöntemler DNA baz dizisindeki gerçek değişiklikleri tanımlayamaz. Ancak yeni mutasyonların saptanmasında ön tarama yöntemi olarak kullanılır. Bu yöntemler gen içinde yer alan herhangi bir mutasyonun yalnızca varlığını belirler. Denatürasyonu yapılan DNA parçalarının birinde bir mutasyon varsa sekonder yapı değiştiğinden mutant parçanın jeldeki göçü normal DNA parçasına göre farklılık gösterir. Bu ön tanı işleminden sonra mutasyonu taşıyan DNA parçası baz dizi analizine tabi tutularak kesin tanımlanması yapılmalıdır (64).

Almanya'da yapılan bir çalışmada R261Q mutasyonunun Alman hastalarda görülme sıklığının % 5.8, Almanya'da yaşayan Türk hastalarda ise % 7.7 olduğu bildirilmiştir. Türklere görülme sıklığı % 38 olan IVS10-11G→A mutasyonunun Almanlarda görülme sıklığı ise % 4.1'dir. Almanya'da en yaygın görülen mutasyon olan R408W-H2 Balkan populasyonlarında da yaygındır fakat batı ve güneybatı Avrupa'da çok nadir görülür (68).

IVS10-11G→A Akdeniz ülkelerinde özellikle Türkiye'de en yaygın görülen mutasyondur. Bu mutasyon aynı zamanda Güney İtalya'da % 19 , Sicilya'da % 15, İspanya'da % 15 ve Portekiz'de % 11 sıklıkla en yaygın görülen FKÜ mutasyonudur (69).

Almanya'da yapılan başka bir çalışmada eski batı Berlin'de yaşayan Türklere en yaygın mutasyon olan IVS10-11G→A mutasyonunun görülme sıklığının % 57 olduğu bildirilmiştir (70).

İran populasyonunda görülme sıklığı % 7.1 olan R261Q mutasyonu FAH enziminin katalitik alt biriminde meydana gelen bir yanlış anlamlı (missense) mutasyondur. Türkiye'de görülme sıklığı yaklaşık olarak % 7'dir. Bu mutasyon ekzon 7'de *Hinf I* restriksiyon enziminin kesim bölgesinde kayba yol açar (71).

Çukurova bölgesinde yapılan çalışmada IVS10-11G→A mutasyonunun görülme sıklığı % 59 olarak bulunmuştur. Bu bölgede görülen ikinci en yaygın mutasyon olan R261Q mutasyonunun görülme sıklığı ise % 15.2 olarak bulunmuştur (69).

Brezilya'da yapılan başka bir çalışmada Minas Gerais'te R261Q mutasyonunun görülme sıklığının %16 , IVS10-11G→A mutasyonunun görülme sıklığının ise % 13.4 olduğu ileri sürülmektedir (1).

Ayrıca IVS10-11G→A mutasyonu % 30.8 sıklıkla Mısır'da en yaygın görülen FKÜ mutasyonudur. R261Q ise % 11.5 sıklıkta görülür (27).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki Türkiye'de en yaygın görülen FKÜ mutasyonu IVS10-11G→A'dır. R261Q mutasyonu ise % 7 sıklıkla bu mutasyonu takip eder. Yaptığımız çalışmada R261Q mutasyonu ile birlikte IVS10-11G→A mutasyonunu da çalışacaktık. Ancak primerlerde olan hata sonucu bu mutasyonu çalışamadık. Bu yüzden Türklerde daha az sıklıkla görülen R261Q mutasyonunu çalıştık. Hasta bulmada çektiğimiz güçlüklerden dolayı bu mutasyonu yalnızca 11 hastada çalışabildik. Hasta sayısının az olması ve Türklerde R261Q mutasyonunun görülme sıklığının düşük olmasından dolayı bu mutasyona rastlama şansımız oldukça düşük. IVS10-11G→A mutasyonunu çalışmış olsaydık hastalarda bu mutasyonu bulma ihtimalimiz daha yüksek olacaktı.

## KAYNAKLAR

1. Luciana Lara dos Santos, Myrian de Castro Magalhaes, Adriana de Oliveira Reis, Ana Lucia Pimenta Starling, Jose Nelio Januaria et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS 10nt11, V388M, R408W, Y414C and IVS 12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 5 (1): 16-23 (2006)
2. Luiz Carlos Santana da Silva, Tiago Santos Carvalho, Fernanda Britto da Silva, Liana Morari, Angela Aguirres Fachel et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism* 79 (2003) 17-24
3. Coşkun T. Amino asit metabolizması ve bozuklukları. Ankara, Alp ofset ve matbaacılık, 2003
4. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC: The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edn. McGraw-Hill: New York, 1995; vol. 1, pp 1015-1075
5. Smith I: Phenylketonuria. In: Hosking G, Murphy G (eds). *Prevention of mental handicap*. Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series 112. Royal Society of Medicine: London, 1987, pp 59-61

6. Marshall G, Letcher MA. Phenylketonuria. Health A to Z
7. Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediatri. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2002
8. Avigad S, Kleiman S, Weinstein M, Cohen BE, Schwartz G, et al. Compound heterozygosity in nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia: The contribution of mutations for classical phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 393-399
9. Eisensmith RC, Woo SLC: Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: Mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Mut.* 1992; 1: 13-23
10. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes : a metaanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 1309-17
11. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, et al. (1998). A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency : classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. [published erratum in *Am. J. Hum. Genet.* 1998 Oct; 63 (4): 1252-3] *Am. J. Hum. Genet.* 63:71-79
12. John J. Mitchell MD, Charles R Scriver MD. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Funded by the NIH. Developed at the University of Washington, Seattle
13. Haktan A, Aydın A, Bahat H, et al. Progressive systemic scleroderma in an infant with partial phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1989; 12:486
14. Stephen D. Cederbaum et al. Amino acid metabolism. In: David L. Rimoin, Michael Connor J, Reed E. Pyeritz. *Emery and Rimoin's principles and practice of Medical Genetics*, 3rd edition, 1996:1867-1869
15. Okano Y, Eisensmith RC, Butler F, et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 1991; 324:1232
16. Cowie V. Phenylpyruvic oligophrenia. *J Mental Sci* 1951; 97:505

17. Verkerk PH, Van Spronsen FJ, Smith GPA, et al. Prevalance of congenital heart disease in patients with phenylketonuria. *J Pediatr* 1991;119:282
18. Zeman J, Bayer M, Stepan J. Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1999; 88:1348-51
19. Perez-Duenas B, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho JA. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 2002; 91:899-904
20. Koch R, Blaskovics M, Wenz E, et al. Phenylalaninemia and phenylketonuria in heritable disorders of amino acid metabolism (ed. WL Nyhan). John Wiley and sons, New York; 1974:109
21. Hommes FA. On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem Med Metab Biol* 1991; 46:277-287
22. Smith I. and Brenton D. P. Hyperphenylalaninemia. In: J. Fernandes, J. -M. Saudubray, G. Van den Berghe. *Inborn metabolic diseases*, 2nd edition, Corrected second printing, New York, 1996: 147-160
23. Lenke RL, Levy HL. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *N Engl J Med* 1980; 303:1202-1208
24. Pronina N, Giannattasio S, Lattanzio P, Lugovska R, Vevere P and Korņejeva A. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Human Mutation in Brief # 585* (2003) on line
25. Özer I. Fenilketonüri örneğinde doğumsal metabolik hastalıklarda genel tedavi yaklaşımı. *Klinik Pediatri* 2004; 3 (1): 26-30
26. Scriver CR, Kaufman S (2001). The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D (eds) Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8 ed. McGraw-Hill, New York, Ch. 77
27. Effat L, Kuzmin A, Kasem N, Abdel Meguid N, Kotb S, et al. Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with PKU. *European Journal of Human Genetics* 1999; 7: 259-262



28. Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983; 306:151-155
29. DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1986; 25:743-749
30. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG . Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1382: 295-304
31. Gold RJ, Mag UR, Neal JL, Scriver CR . The use of biochemical data in screening for mutant alleles and in genetic counselling. *Ann Hum Genet* 1974; 37: 315-26
32. Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR. In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat* 1998; 11: 4-17
33. Mitchell JJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency . Funded by the NIH. Developed at the University of Washington, Seattle, 2007
34. Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida I, et al. Population genetics of hyperphenylalaninemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J. Med. Genet.* 1998; 35: 301-304
35. Benit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, et al. The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 1999; 68: 43-47
36. Pey AL and Martinez A. The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: An isothermal titration calorimetry study. *Mol. Genet. Metab.* 2005 (in press)
37. Bernegger C and Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol. Genet. Metab.* 2002; 77:304-313

38. Blau N and Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2004; 82: 101-111
39. Steinfeld R, Kohlschutter A, Ullrich K and Lukacs Z. Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004; 27:449-453
40. Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo M et al. Long term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 2004; 81: 137-139
41. Scriver CR and Waters PJ. Monogenic traits are not simple: Lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999; 15: 267-72
42. Popescu T, Blazkova M, Kozak L, Jebeleanu G, Popescu A. Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian phenylketonuric alleles. *Hum. Mutat.* 1998; 12: 314-319
43. Scriver CR, Waters PJ, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, et al. PAHdb:alows-specific knowledgebase, *Hum. Mutat.* 2000; 15: 99-104
44. Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P, Clemens PC, Monch E, et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 46-54
45. Koch R, Levy H, Hanley W, Matalon R, Rouse G et al (1996). Outcome implications of the international maternal phenylketonuria collaborative study (MPKUCS) : 1994. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1: 162-4
46. Pietz J, Dunckelmann R, Rupp A, Rating D, Meinck HM et al. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 824-30
47. Medical Research Council Working Party on FKU. Recommendations on the dietary management of PKU. *Arch Dis Child* 1993; 68: 426-7
48. Lee P. The adult patient with hereditary metabolic disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D (eds), Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assos

- eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. Online. McGraw-Hill, New York, 2004
49. Brenton DP, Tarn AC, Cabrera-Abreu JC, Lilburn M. Phenylketonuria: treatment in adolescence and adult life. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 93-6
  50. Griffiths P. Neuropsychological approaches to treatment policy issues in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 587-8
  51. Weglage J, Ulrich K, Pietsch M, Funders B, Zass R, Koch HG. Untreated non-phenylketonuric-HFA: Intellectual and neurological outcome. *Eur J Pediatr* 1996; 155 Suppl 1: 26-8
  52. Weglage J, Pietsch M, Feldmann R, Koch HG, Zschocke J, et al. Normal clinical outcome in untreated subjects with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatr Res* 2001; 49: 532-6
  53. Jardim LB, Palma-Dias R, Silva LC, Ashton-Prolla P, Giugliani R. Maternal HPA as a cause of microcephaly and mental retardation. *Acta Paediatr* 1996; 85: 943-6
  54. Koch R, Azen C, Friedman EG, Fishler K, Baumann-Frischling C, Lin T. Care of the adult with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; 155 Suppl 1:90-2
  55. Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon R, Rouse B, Trefz F, Guttler F, Azen C, Friedman E, Platt L, de la Cruz F. Maternal phenylketonuria: an international study. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 233-9
  56. Michals K, Acosta PB, Austin V, Castiglioni L, Rohr F, Wenz E, Azen C. Nutrition and reproductive outcome in maternal phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr* 1996; 155 Suppl 1: 165-8
  57. Lenke RR and Levy HL. Maternal PKU and HPA. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N Engl J. Med* 1980; 303: 1202-8
  58. Levy HL, Waisbren SE, Lobbregt D, Allred E, Leviton A, Koch R, Hanley WB, Rouse B, Matalon R, de la Cruz F. Maternal non-phenylketonuric mild hyperphenylalaninemia. *Eur J Pediatr* 1996; 155 Suppl 1: 20-5

59. Jardim LB, Palma-Dias R, Silva LC, Ashton-Prolla P, Giugliani R. Maternal HPA as a cause of microcephaly and mental retardation. *Acta Paediatr* 1996; 85: 943-6
60. Rouse B, Azen C, Koch R, Matalon R, Hanley W, de la Cruz F, Trefz F, Friedman E, Shifrin H. Maternal PKU collaborative study (MPKUCS) offspring: facial anomalies, malformations and early neurological sequelae. *Am J Med Genet* 1997; 69:89-95
61. Levy HL and Ghavami M. Maternal PKU: A metabolic teratogen. *Teratology* 1996; 53: 176-84
62. Rouse B and Azen C. Effect of high maternal blood Phe on offspring congenital anomalies and developmental outcome at ages 4 and 6 years: The importance of strict dietary control preconception and throughout pregnancy. *J Pediatr* 2004; 144: 235-9
63. Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard, Cornelius F. Boerkoel III, *Tıbbi Genetik*. Güneş Kitabevi, 2005: 44, 33-37
64. Solak M, Şengil AZ, Öztaş S. Rekombinant DNA teknolojisi temel ilkeleri ve uygulama alanları (yardımcı ders kitabı). Manisa, 1997 sf:123
65. Russell PJ. *Genetics*, 2001.
66. Müslümanoğlu H, Çine N, Özdemir M, Çilingir O, Başaran N ve ark. Fenilketonüri'de VNTR bağlantısı ve direkt mutasyon analizleri. *Kocatepe Tıp Dergisi Ocak* 2004; 5:19-24
67. Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, et al. Associations between mutations and a VNTR in the human PAH gene. *AM J. Hum. Genet.* 1992; 51: 621-636
68. Zschocke J, Hoffmann GF, Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet* 1999; 104: 390-398
69. Lüleyap HÜ, Alptekin D, Pazarbaşı A, Kasap A, Kasap H, et al. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenylalanine hydroxylase gene. *Mutation Research/Fundamental and*

Molecular Mechanisms of Mutagenesis Volume 601, Issues 1-2, 10 October 2006; Pages 39-45

70. Hennermann JB, Vetter B, Wolf C, Windt E, Bührdel P, et al. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: a characteristic molecular profile and 15 novel mutations. *Hum Mutat.* 2000; 15(3): 254-60
71. Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Volume 526, Issues 1-2, 15 May 2003; Pages 45-52

## **EKLER**

## **EK 1: Demirbaş Malzemeler**

- 1.** Etüv (NÜVE FN 500)
- 2.** Vorteks (MS1 Minishaker IKA ®)
- 3.** Santrifüj (Jouan)
- 4.** Hassas Terazı (Libror AEG-220)
- 5.** Derin Dondurucu (Arçelik)
- 6.** Buzdolabı (Profilo)
- 7.** Otomatik Pipet (Abimed Langenfeld)
- 8.** Saf Su cihazı (Millipore)
- 9.** PCR (PERKIN ELMER 9600)
- 10.** Elektroforez (BIOZYM TC)
- 11.** Mikrosantrifüj (Hettich EBA12)

## **EK 2: Sarf Malzemeler**

- 1.** Etanol (MERCK)
- 2.** Amonyum Klorür (SIGMA)
- 3.** Potasyum Hidrojen Karbonat (SIGMA)
- 4.** Ethylenediamine-Tetraacetic Asit (EDTA)
- 5.** Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)(MERCK)
- 6.** Amonyum Asetat (SIGMA)
- 7.** İzo-propanol (MERCK)
- 8.** Etidyum Bromid (SIGMA)
- 9.** PCR Tamponu (Fermentas)
- 10.** dNTP (LAROVA)
- 11.** MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)
- 12.** Taq DNA Polimeraz (Fermentas)
- 13.** Primerler (MWG-Biotech ve Bio Basic)
- 14.** Hinf I Restriksiyon Enzimi (Takara)
- 15.** Tris (SIGMA)
- 16.** Borik Asit (Riedel-de Haen)
- 17.** Agaroz (PeqLab)
- 18.** Ependorf Tüpleri
- 19.** PCR Tüpleri
- 20.** Distile Su
- 21.** Cam Malzemeler



## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Hatay'ın Dört Yol ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Dört Yol'da tamamladı. 1999 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2001 yılında Kıbrısta UNESCO tarafından düzenlenen Deniz Kaplumbağalarını Koruma Projesine katıldı. 2002-2003 öğretim yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümünde kurulması planlanan Entomoloji Müzesinde çalıştı. 2003 yılında Biyoloji bölümünden mezun olduktan sonra aynı yıl Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2004-2005 ve 2006-2007 eğitim-öğretim yıllarında Bünyan'da sözleşmeli İngilizce öğretmenliği yaptı.

**e-posta :** demko3@yahoo.com