

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ
MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ

BİRSEN CEVHER
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

1996

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ
MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ

BİRSEN CEVHER

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

PROF.DR.MERAL SAKIZLI

İZMİR

1996

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ
MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Meral SAKIZLI

Gül Güner

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Gül GÜNER

Birsen Cevher

BİRSEN CEVHER

N. Atabay

Jüri Üyesi

Doç.Dr. Neşe ATABEY

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

1996

İÇİNDEKİLER

Özet	1
İngilizce Özet	11
Sekül Notları	1
Tablo İçerisi	2
Kısaltmalar	3
"NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ" isimli bu tez 15.02.1996 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.	8
NF1 Gen Ürünü ve Ras Proteinleri	11
NF1 Mutasyonları ve Tümör Supresör NF1	14
RNA İzolasyonu	23
Reverse Transcription-PCR/RT-PCR	25
SSCP	25
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Gen Tanımlama	25
NATÜREL METOD	25
Doç. Dr. Gül GÜNER	25
Jüri Üyesi	25
Prof. Dr. Meral SAKIZLI	25
Jüri Başkanı	25
Doç. Dr. Neşe ATABEY	25
Jüri Üyesi	25
A. Dekstranla Lenfosit Ayırımı	38
B. Fitalele Lenfosit Ayırımı	38
Lenfositten RNA İzolasyonu	38
RNA Elektroforezi	39
Reverse Transcription-PCR	40
PCR Reaksiyonları	41
SSCP Analizi	44
Görünür Boyama	45
Solüsyonlar	46
SONUÇLAR	48
TARTIŞMA	55
REFERANSLAR	58

ÖZET

İÇİNDEKİLER

Anahtar Kelimeler

Özet	i
İngilizce Özet	ii
Şekil listesi	1
Tablo listesi	2
Kısaltmalar	3
Giriş ve Amaç	5
GENEL BİLGİLER	7
NF1 Geni	8
NF1 Gen Ürünü ve Ras Proteinleri	12
NF1 Mutasyonları ve Tümör Supressör NF1	14
RNA İzolasyonu	23
Reverse Transcription-PCR(RT-PCR)	25
SSCP	25
Poliakrilamid Jeller İçin Yüksek Rezolüsyonlu Gümüş Boyama	33
MATERYEL ve METOD	35
Dokudan RNA İzolasyonu	35
Lenfosit Ayırım İşlemi	37
A.Dekstranla Lenfosit Ayırımı	37
B.Fikolle Lenfosit Ayırımı	38
Lenfositten RNA İzolasyonu	38
RNA Elektroforezi	39
Reverse Transcription-PCR	40
PCR Reaksiyonları	41
SSCP Analizi	44
Gümüş Boyama	45
Solüsyonlar	46
SONUÇLAR	48
TARTIŞMA	55
REFERANSLAR	58

ÖZET

Anahtar Kelimeler

NF1, SSCP, p21ras, Nörofibromin

NF1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ MUTASYONLARININ

SSCP ANALİZİ

BİRSEN CEVHER

Nörofibromatozis 1 hastalığına neden olan NF1 gen ürünü Nörofibrominin GTPaz ailesi içindeki p21 Ras proteinleri ile etkileştiği gösterilmiştir. Nörofibromin üzerinde GAP(GTPase Activating Protein) ile benzer diziye sahip bir bölge açıklanmıştır. Nörofibromin ve GAP'ın her ikisi de Ras yoluyla sinyal iletiminde görevlidir. Ras-GAP proliferatif sinyali iletirken, Nörofibromin farklılaşma sinyali oluşturmaktadır. NF1 hasta tümörlerinde(Shwannomalar) Nörofibromin kaybının Ras aktivasyonuna neden olduğu ve bu hücrelerde Nörofibrominin Ras'ın önemli bir "negatif düzenleyicisi" olduğu gösterilmiştir.

In our study, we aimed to detect 45-48 exon mutations of NF1 gene downstream of p21. We used SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analysis. In our study, we aimed to detect 45-48 exon mutations of NF1 gene downstream of p21. We used SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analysis. Araştırmamızda, NF1 geninin 3' ucuna yakın bölgedeki 45-48. Ekzonları içeren bölge üzerinde mutasyon taramayı amaçladık. Mutasyon saptama hassasiyetinin oldukça yüksek olduğu bilinen SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism) analizini tarama için uygun bir yöntem olarak seçtik. Poliakrilamid jellerde bantları görüntülemek için oldukça sık kullanılan radyoaktif metod ile çalışma yerine, daha güvenli çalışma imkanı sağlayan ve ucuz bir metod olan "Gümüş Boyama" metodunu kullandık. Sağlıklı bireylerin ve 3 NF1 hastasının lenfositleri ile 7 tümoral kolon dokusunun RT-PCR ürünlerinin SSCP analizinde, mutant bir NF1 alleli saptadık.

SUMMARY

Key Words

NF1, SSCP, p21ras, Neurofibromin

DETECTION of NF1 GENE 3' END UTR REGION MUTATIONS by

RT-PCR SSCP

BİRSEN CEVHER

It has been shown that von Recklinghausen Neurofibromatosis is caused by interaction of NF1 gene product (Neurofibromin) with p21ras proteins among GTPase family. Neurofibromin has sequence homology with GAP (GTPase Activating Proteins) and they both has function in signal transduction by Ras pathway. Ras-GAP transduces proliferative signal while way neurofibromin putatively produces differentiation signal. Lack of neurofibromin expression in Shwannomas of NF1 patient causes increase in the potential ras neoplastic activity by negative ras regulation.

In our study, we aimed to detect 45-48 exon mutations of NF1 gene downstream 3' end. We used SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) technique due to the reason that it has high accuracy in detecting point mutations. Again we preferred sensitive "Silver Staining" because of its low cost and simplicity to using radioactivity in our polyacrilamide gels. 19 Normal, 3 NF1 leucocyte and 7 colon tumours were studied by RT-PCR SSCP and we only detected one mutant NF1

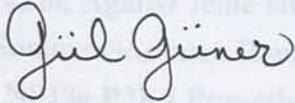
SEKİL LİSTESİ

1. NF1 Transkripsiyon Bölgesi	8
2. NF1 Geninin 17 Nükleotid Üzerindeki Yerköşmesi, 17L1 Problem ve EV12 ve NF1-62 Aday Genlerinin Yerköşmeleri	10
3. NF1 cDNA'sı	10
4. Farklı Dokularda NF1 Ekspresyon Sinyalleri	11
5. p21 Rasın Aktivasyonu ve İndüksiyonu	12
6. GAP ve GEF ile Homoloji Tanımlanan Proteinlerin Bölümleri	13

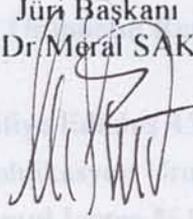
TUTANAK

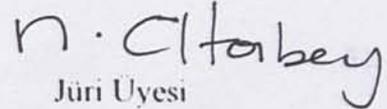
"NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ" konusunda Yüksek Lisans öğrencisi **Birsen CEVHER** tezini savunması için Lisans Üstü Öğretim Yönetmeliği'nin 9. / 21. maddesi uyarınca Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 24.01.1996 tarih ve 2/6 sayılı kararı ile oluşturulan jürümüz 15.02.1996 tarihinde saat 10.00'da toplanarak aşağıda belirtilen şekilde iş bölümü yaptıktan sonra adayın tez savunmasını dinlemiştir. Yönetmelik gereğince adaya tezi ile ilgili sorular yöneltilmiş ve tartışmalardan sonra adayın **"NÖROFİBROMATÖZ 1 GENİ 3' UCU UTR BÖLGESİ MUTASYONLARININ SSCP ANALİZİ"** konulu Yüksek Lisans Tezinin **BAŞARILI** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Meral SAKIZLI



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Gül GÜNER





Jüri Üyesi
Doç. Dr. Neşe ATABEY

ŞEKİL LİSTESİ

1. NF1 Translokasyon Bölgesi.	8
2. NF1 Geninin 17.Kromozom Üzerindeki Yerleşimi, IF10 ile 17L1 Probları ve EVI2 ve NF1-c2 Aday Genlerinin Yerleşimleri.	10
3. NF1LT cDNA'sı.	10
4. Farklı Dokularda NF1 Ekspresyon Sinyalleri.	11
5. p21 Ras'ın Aktivasyon ve İnaktivasyonu.	12
6. GAP ve GAP ile Homoloji Gösteren Proteinlerin Bölgeleri.	13
7. Norofibromin ve GAP'ın Hücre Büyüme ve Farklılaşması Üzerindeki Etkisi.	15
8. NF1'in Kısmi Genomik Yapısı ve Belirlenmiş Olan Dokuz Ekzonu Gösterilmektedir. Ok Yönleri Transkripsiyon Yönünü Belirtmektedir.	19
9. RT-PCR'in Şematik Gösterimi.	25
10. SSCP Analizi.	32
11. NF1 Primerlerinin Yerleşimleri.	42
12. %1'lik Formaldehitli Agaroz Jelde Yürütülmüş Olan RNA'ların 18S ve 28S rRNA Bantları.	49
13. %1 5'luk Agaroz Jelde Yürütülmüş Beta Aktin ve İlk NF1 RT-PCR Amplifikasyon Bantları.	50
14. %2'lik Agaroz Jelde NF1 RT-PCR Ürününün Reamplifikasyonu Sonucu Gözlenen Bantları.	51
14a. NF1'in P2K3 Primerleri ile Amplifiye Edilmiş 45-48 Ekzonlarını İçeren 356 bp'lik Amplifikasyon Ürünü	51
15. NF1 RT-PCR Ürünlerinin %5 Gliserol İçeren %10'luk Poliakrilamid Jeldeki SSCP Analizi.	53

TABLO LİSTESİ

1. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünün NF1 İçin Belirlemiş Olduğu Kriterler
2. NF1 Geninin İntron ve Ekzon Bölgelerinin Uzunlukları.
3. RT Reaksiyonda Kullanılan Maddeler ve Miktarları.
4. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Maddeler ve Son Konsantrasyonları.
5. NF1 Geni İçin PCR ve RT-PCR Ürünlerinin Beklenen Uzunlukları.
6. Gümüş Boyamada Kullanılan Madde Miktarları ve Boyama Süreleri.
7. Lenfosit, normal ve Tümoral Dokulardan İzole Edilmiş RNA'ların Safılık Deger Aralıkları(O.D260/O.D280).

GTPase Ganosine Three Phosphatase (GTP'den GDI'ye hidrolyzi sağlayan enzim)

GAP GTPase Activating Protein (GTPaz enzimini aktive eden protein)

IRA Inhibitory Regulators of the RAS-cyclic AMP pathway (RAS-ye AMP yolu düzenleyicilerinin inhibitörü)

NF1 GRR NF1-GAP Related Domain (NF1'in GAP ile ilgili bölgesi)

CML Chronic Myeloid Leukemia (Kronik Myeloid Lezemi)

SSCP Single Strand Conformation Polymorphism (Tek İplik Konformasyonel Polimorfizm)

ASCA Allele Specific Restriction Analysis (Allele özel sınırlama analizi)

MDS Myelo Displastik Sendrom

TBR Translocation Breakpoint Region (Translokasyon kırılma bölgesi)

MPS Myelo Proliferatif Sendrom

SDS : Sodium dodecyl sulfate(Sodyum dodezil sulfat)

KISALTMALAR: :Sodium isothiocyanate(Guanidinnitrat isotiyosiyanat)

NF1 :Neurofibromatoz I Saline (Fosfat tamponu)

NF1-c2 :NF1 candidate gene (NF1 aday geni) (3-N Morfolino propansulfonik asit)

NF1LT :NF1 Long Transcript (NF1 gen transkripti) (gen-PCR)

WBC :White Blood Cell (Beyaz Kan Hücresi)

GTPaz :Guanosine Three Phosphatase (GTP'den GDP'ye hidrolizi saglayan enzim)

GAP :GTPase Activating Protein (GTPaz enzimini aktive eden protein)

IRA :Inhibitory Regulators of the RAS-cyclic AMP pathway(RAS-cyc AMP yolu düzenleyicilerinin inhibitörü).

NF1 GRD :NF1-GAP Related Domain (NF1'in GAP ile ilgili bölgesi).

CML :Chronic Myeloid Leukemia(Kronik Myeloid Lösemi).

SSCP :Single Strand Conformation Polymorphism(Tek Iplik Konformasyonel Polimorfizm).

ASRA :Allele Spesific Restriction Analysis (Allele özgül restriksiyon analizi)

MDS :Myelo Displastic Sendrom.

TBR :Translocation Breakpoint Region(Translokasyon kırılma bölgesi)

MPS :Myelo Proliferatif Sendrom.

- SDS** :Sodium dodecyl sulfate(Sodyum dodesil sülfat).
- GITC** :Guanidinium isothiocyanate(Guanidinium isotiyosiyanat).
- PBS** :Phosphate buffered Saline (Fosfat tamponu).
- MOPS** :3-N Morpholino propanesulfonic acid (3-N Morfolino propansülfonik asit)
- RT-PCR** :Reverse Transcription-PCR (Ters transkripsiyon-PCR)
- DEPC** :Diethylpyrocarbonate(Dietil pirokarbonat).
- MMLV-RT** :Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase(Moloney Fare Lösemi Virusu-Reverse Transkriptaz enzimi).
- PAH** :Phenylalanine Hydroxylase(Fenil Alanin Hidroksilaz).
- DGGE** :Density Gradient Gel Electrophoresis (Dansite Gradient Jel Elektroforezi)

LGİRİŞ ve AMAÇ:

Periferel Nörofibromatozis veya von Recklinghausen Hastalığı olarak adlandırılan Nörofibromatozis1 (NF1), otozomal dominant kalımlı bir hastalıktır(1). Etnik ayırım gözetmeksizin 1/3000 sıklıkla görülür(2). 1987 yılında NF1 lokusunun 17 kromozomun uzun kolunda, sentromere yakın yer aldığı bulunmuştur(3). 56 Ekzondan oluşan bu genin 13 kb'lık bir transkripti vardır(4,5). İnsan NF1 cDNA'sı 2818 aa'lık büyük bir "Open Reading Frame" vermektedir(6).

Son zamanlarda, GTPaz ailesinin üyesi olan p21ras proteinlerinin, NF1'e sebep olan gen ürünü ile (Nörofibromin) etkileştiği gösterilmiştir(7). p21 Ras proteinlerine, fibroblast ve epital gibi belli tip memeli hücrelerini transörme edebilirler. Feokromasitoma ve Shwann hücreleri gibi hücrelerde, farklılaşma ve büyümenin durmasına sebep olabilirler(8). İnsan kanserlerinin %30'undan fazlasında mutant p21 Ras proteinlerine rastlandığına dair yayımlar vardır(8).

p21ras proteinleri yüksek afiniteyle guanin nükleotidlerine bağlanır ve zayıf bir intrinsik GTPaz aktivitesine sahip olur. Bu proteinler aktif GTP bağlı form ve inaktif GDP bağlı formlar arasında dönüşüm yaparlar. p21ras proteinlerinin GTPaz aktivitesinin varlığı GAP (GTPase Activating Protein) ile açıklanmış, GAP'ın normal p21ras GTPaz aktivitesini önemli derecede uyardığı gösterilmiştir(9).

NF1'in moleküler klonlaması yapılırken, GAP ve IRA proteinleri ile benzer sekanslara sahip bir bölge açıklanmıştır (GRD = GAP Related Domain)(10). NF1-GRD, maya, E.coli veya böcek hücrelerinde eksprese olduğu zaman, p21ras GTPaz aktivitesine uyarma kapasitesine sahiptir(8).

Nörofibromin ve GAP'ın ikisinin de, incelenen farklı tip hücrelerde sürekli olarak eksprese edildikleri belirlenmiştir. Bu iki protein, Ras'dan downstream sinyal iletimi ile

ilgilidir. Ras-GAP proliferatif sinyali iletmesine ragmen, Nörofibromin farklılaşma sinyali oluşturmaktadır(11).

Nörofibrominin Ras'ın en büyük negatif düzenleyicisi olarak görüldüğü Shwann hücrelerinde Ras'ın kaybı veya inaktivasyonu, farklılaşma yolunun blokajı ile sonuçlanır ve Ras'ın inaktivasyonu, normal proliferasyona sebep olur(12).

NF1'in tümör süpresör fonksiyonunun gösterimi, NF1 hastalarının tümörlerinin (Shwannoma) biyokimyasal analizi ile yapılarak, bu hücrelerin önemli derecede azalmış veya saptanamayacak seviyelerde Nörofibromine sahip oldukları ve predominant olarak GTP bağlı formunun bulunduğu gösterilmiştir(11). Nörofibrominin kaybı Ras'ın aktivasyonuna neden olur. Bu durum Shwann hücrelerinde Nörofibrominin, Ras'ın önemli bir negatif regülatörü olduğunu düşündürür(13). NF1 hastası olmayan bireylerde yapılan çalışmalarda, sporadik gelişen tümörlerde NF1 lokusunda somatik mutasyonların bulunması, bu genin tümör süpresör gen olacağı düşüncesini desteklemektedir(13). Ayrıca, Nörofibrominin CRD bölgesinde aminoasit değişimi, kolon kanseri, miyelodisplastik sendrom ve astrositomada da gösterilmiştir(13). Bugüne kadar Southern Blot veya SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism=Tek İplik Konformasyonel Polimorfizm) gibi farklı metodlar ile, NF1 geninde 54 mutasyon tanımlanmıştır (14). Bu mutasyonların çoğu CRD bölgesinde tanımlanmıştır.

Araştırmamızda normal ve tümoral kolon dokularında ve lenfositte, NF1 geninin ekspresyonunu ve bu genin 3'UTR(Untranslated Region) bölgesinde mutasyon taramayı amaçladık. Normal ve tümoral doku örnekleri ile lenfositten RNA izolasyonunu takiben Reverse Transcription (RT= Ters Transkripsiyon) reaksiyonu ile cDNA sentezi ve uygun primerler kullanarak istenilen bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) reaksiyonunun kontrolü olarak beta aktin primerleri kullanıldı. Amplifikasyonu sonrası, non-denature poliakrilamid jelde denature edilmiş amplifikasyon ürünleri yürütülerek non-radyoaktif SSCP analizi ile mutasyon araştırması yapıldı. Jel, gümüş nitrat ile boyanarak sonuçlar değerlendirildi.

II. GENEL BİLGİLER

Neurofibromatozis 1 hastalığı, ilk olarak 1882'de von Recklinghausen tarafından tanımlanmıştır. Otozomal dominant bir hastalık olan NF1, 1×10^{-4} olarak hesaplanmış mutasyon sıklığı ile insan hastalıkları arasında en yüksek orana sahip olanlardan biridir(15). Oldukça değişken görünümlere sahip olup, klinik tanısı nörofibromlar,cafe-au-lait spotlar (kahverengi lekeler),irisin Lish nodülleri ve daha az sıklıkla kemik deförmiteleleri ve öğrenme güçlüğü gibi semptomların bulunup bulunmamasına göre yapılmaktadır(16).

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünün (NIH) NF1 için belirlemiş olduğu kriterler Tablo 1'de verilmiştir (17).

Tablo1: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünün NF1 için belirlemiş olduğu kriterler(17)

- 1-Altı veya daha fazla cafe-au-lait maküller(Puberte öncesi hastalarda 5mm'den ve puberte sonrası hastalarda 15mm'den büyük).
- 2-İki veya daha fazla nörofibrom veya bir pleksiform nörofibrom.
- 3-Aksilla veya inguinal bölgede çillenme.
- 4-Optik gliom.
- 5-İki veya daha fazla Lish nodülü.
- 6-Belirli bir kemik lezyonu.
- 7-NF1 için verilen kriterlere sahip birinci dereceden akrabasının bulunması

Tüm etnik guruplardaki NF1'e rastlanma sıklığının yaklaşık olarak 1/3000 olduğu bildirilmiştir(2). NF1 geni 56 eksondan oluşan yaklaşık 300 kb'lik bir gendir(4,5).

(B) NF1 Transkripsiyon bölgesinin ayrılması

(E) Exon11 bölgesi, D) Exon17 bölgesi

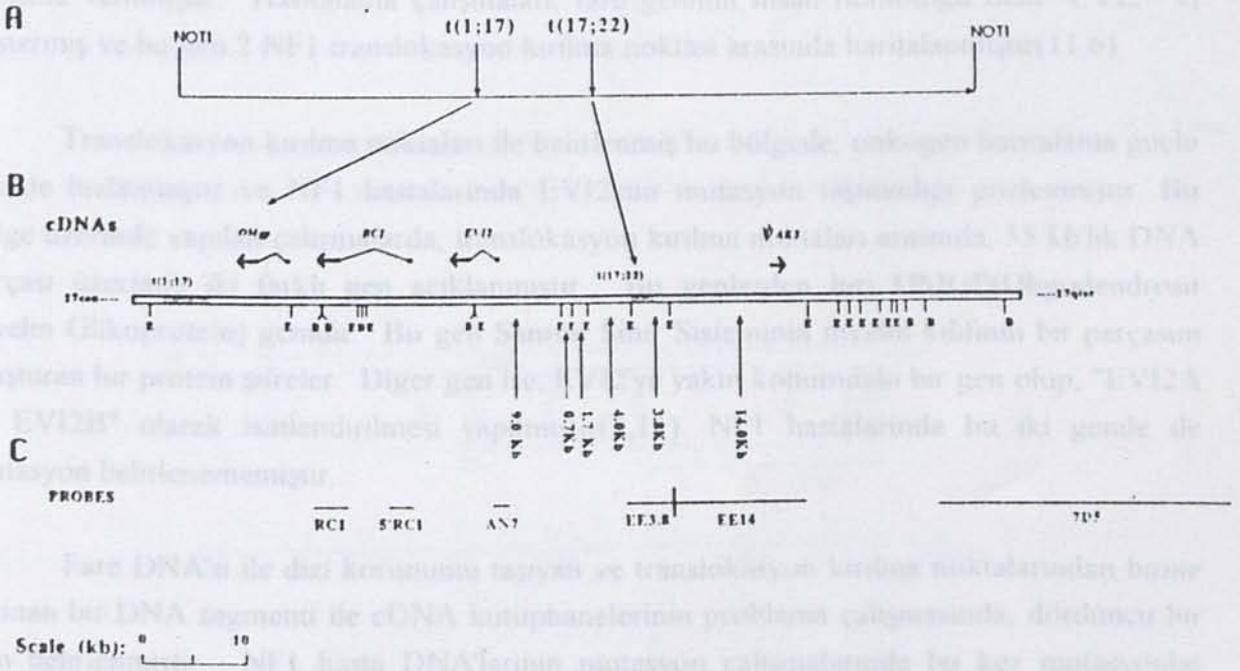
(C) NF1 eksonlarında kullanılmayan bazı parçaları NF1 geni bölgesi haritasına göre gösteren

II.1. NF1 GENİ:

NF1 geninin belirlenmesindeki ilk basamak "genetic linkage" (Gen Bağlantı Analizi) olmuştur. Bu analiz ile 1987 yılında NF1 lokusunun 17. Kromozomda bulunduğu gösterilmiştir(6,11,17).

1989'da O'Connell ve ark.,1987'de White ve ark. bu lokusun kromozomun uzun kolunda, sentromere yakın yer aldığını bulmuşlardır(11).

Yapılan çalışmalarda NF1'li iki hastanın birinde t(1;17) başka bir hastada t(17;22) translokasyonları saptanmış, kromozomdaki kırılma noktasının her iki olguda da 17q11.2'ye rastladığı belirlenmiştir(6,17)(Şekil1).



Şekil 1: NF1 translokasyon bölgesi(6 Nolu referanstan modifiye edilerek hazırlandı)

(A) NF1 Translokasyon bölgesinde uzanan NotI PFGE(Pulse Field Gel Electrophoresis) fragmanı.

(B) NF1 Translokasyon bölgesinin ayrıntısı.

(E:EcoRI bölgesi, B:BamHI bölgesi).

(C) NF1 delesyonlarında kullanılmış olan problemlerin NF1 gen bölgesi haritasına göre konumları

Gen haritalama çalışmalarında, genin konumu 17q11.2'de, yaklaşık 3 cMorgan'lık bir bölgede olduğu saptanmıştır(6,11).

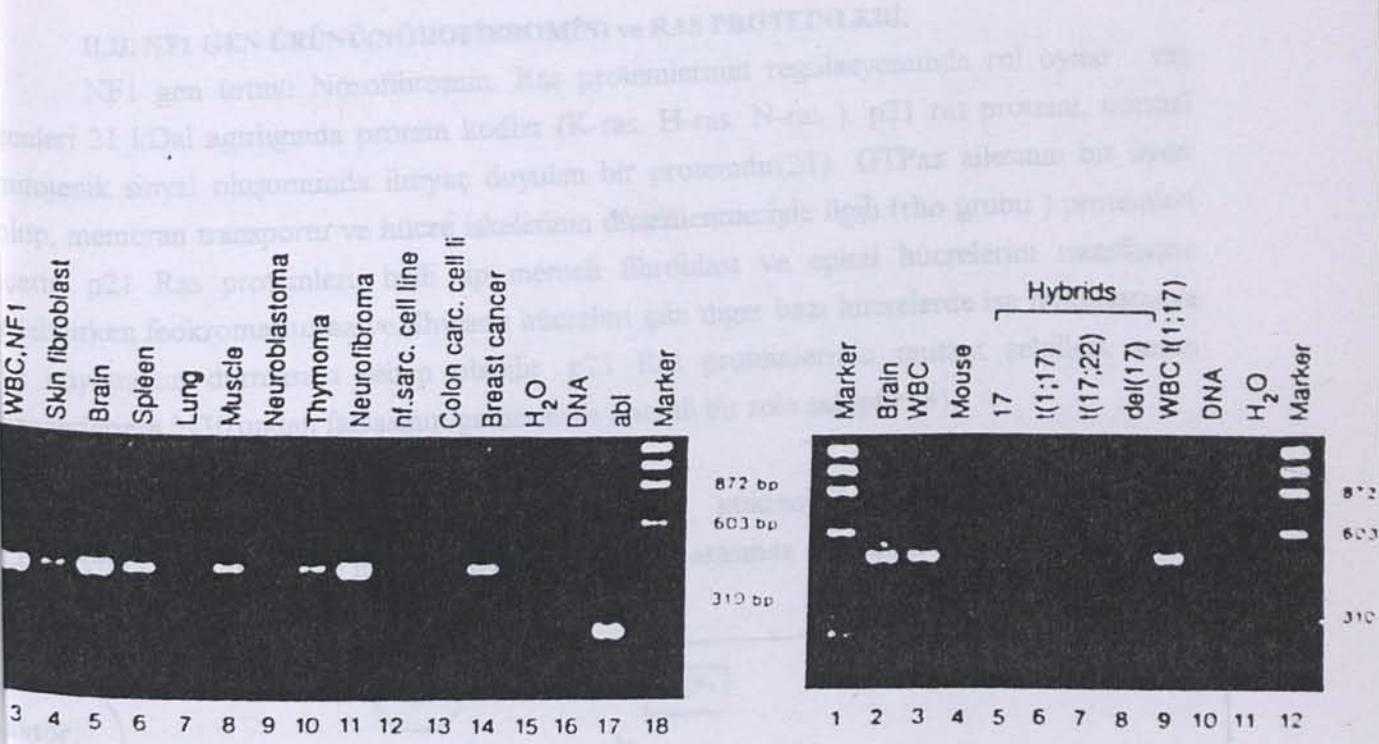
NF1 geninde translokasyona sahip iki NF1 hastasının DNA örneklerinden "pulsed-field jel analizi" ile, translokasyon kırılma noktaları fiziksel olarak saptanmıştır. Bu bölge için, 17. kromozomun proksimal uzun kolunu içeren probler kullanarak yapılan çalışmalarda; yaklaşık 600 kb uzunlukta bir fragman belirlenmiştir. Bu fragmanın büyük bir olasılıkla NF1 genini içerdiği kanısına varılmıştır(11).

Bu çalışmalar sürerken yeni bir gelişme olmuş, 1988'de retroviral yönetimli lokemogenesisle ilgili olduğu gösterilen "Evi-2 geni", 11.Kromozomda haritalanmıştır. Bu genin insan akut promyelositik lösemilerinde ilgili olduğu gösterilen bir translokasyon kırılma noktası ve farzedilen NF1 genini taşıyan insan 17.Kromozom bölgesine homolog olduğu kanısına varılmıştır. Haritalama çalışmaları, fare geninin insan homologu olan "EVI2" 'yı göstermiş ve bu gen 2 NF1 translokasyon kırılma noktası arasında haritalanmıştır(11,6)

Translokasyon kırılma noktaları ile belirlenmiş bu bölgede, onkogen haritalama güçlü şekilde hızlanmıştır ve NF1 hastalarında EVI2'nin mutasyon taşımadığı gözlenmiştir. Bu bölge üzerinde yapılan çalışmalarda, translokasyon kırılma noktaları arasında, 55 kb'lık DNA parçası üzerinde iki farklı gen açıklanmıştır. Bu genlerden biri OMGP(Oligodendrosit Myelin Glikoprotein) genidir. Bu gen Santral Sinir Sisteminin myelin kılıfının bir parçasını oluşturan bir protein şifreler. Diğer gen ise, EVI2'ye yakın konumdaki bir gen olup, "EVI2A ve EVI2B" olarak isimlendirilmesi yapılmıştır(2,11). NF1 hastalarında bu iki gende de mutasyon belirlenememiştir.

Fare DNA'sı ile dizi korunumu taşıyan ve translokasyon kırılma noktalarından birine uzanan bir DNA segmenti ile cDNA kütüphanelerinin problama çalışmasında, dördüncü bir gen belirlenmiştir. NF1 hasta DNA'larının mutasyon çalışmalarında bu kez mutasyonlar saptanmış ve bu aday genin NF1'den sorumlu gen olduğu gösterilmiştir(Şekil 2)

NF1 hem de NF1 olmayan), NF1 deri fibroblastları, dalak, kas, timoma, akciğer, nöroblastom ve NF1 nörofibrosarkom hücre hattı ve meme kanserini de içine alan Northern blot çalışmalarında sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4).



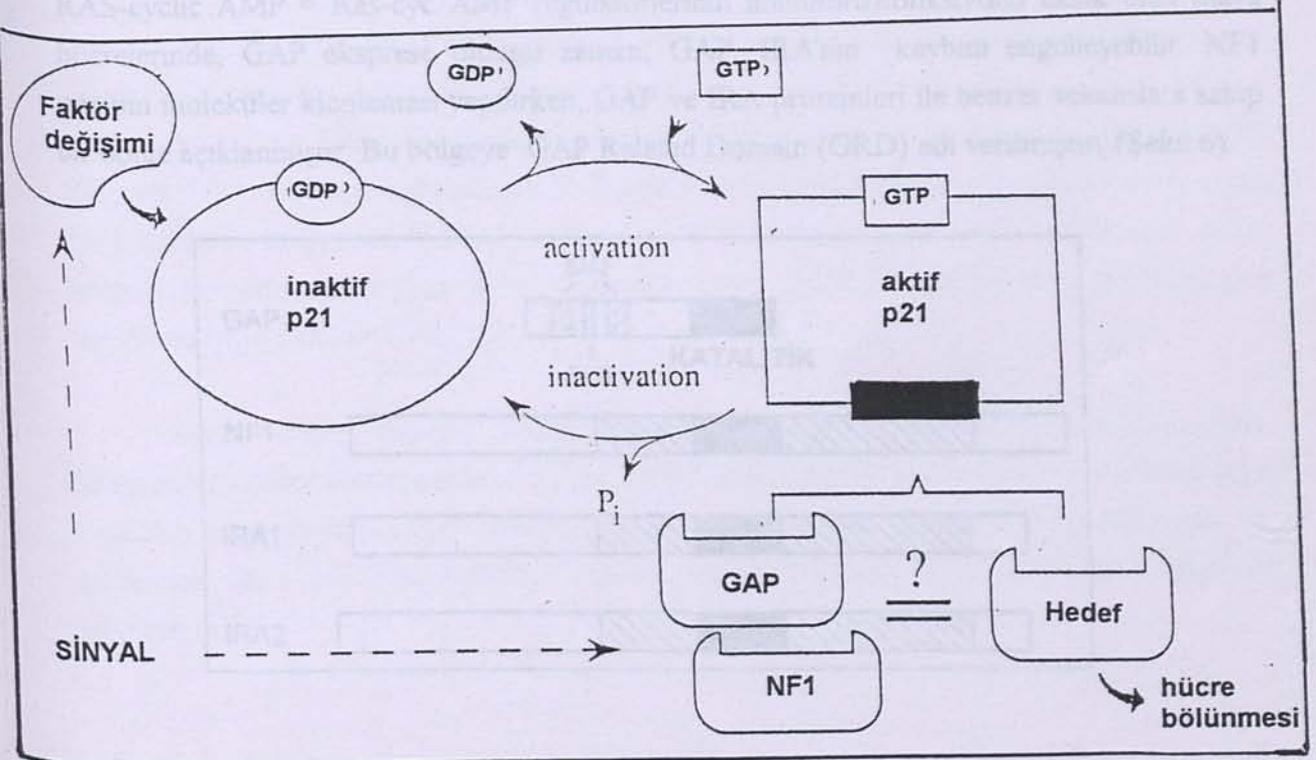
Şekil 4.: Farklı dokularda NF1 ekspresyon sinyalleri(6).

Diger ekspresyon deneylerinde, kolon, tiroid, paratroid, adenom lenfoma, endometrial karsinom, K562 eritrolökemia hücreleri ve normal deri fibroblastlarında da NF1'in eksprese olduğu görülmüştür(19). Farklı hücre hatlarında, ekspresyonu gösterildiği için, NF1LT'in her hücre türünde ve sürekli olarak eksprese edildiği düşünülmektedir(19,20).

İLİL NF1 GEN ÜRÜNÜ(NÖROFİBROMİN) ve RAS PROTEİNLERİ:

NF1 gen ürünü Nörofibromin. Ras proteinlerinin regülasyonunda rol oynar. ras genleri 21 kDal ağırlığında protein kodlar (K-ras, H-ras, N-ras). p21 ras proteini, normal mitojenik sinyal oluşumunda ihtiyaç duyulan bir proteindir(21). GTPaz ailesinin bir üyesi olup, membran transportu ve hücre iskeletinin düzenlenmesiyle ilgili (rho grubu) proteinleri içerir. p21 Ras proteinleri, belli tip memeli fibroblast ve epitel hücrelerini transforme edebilirken feokromasitoma ve Shwann hücreleri gibi diğer bazı hücrelerde ise farklılaşmaya ve büyümenin durmasına sebep olabilir. p21 Ras proteinlerinin mutant şekilleri, insan kanserlerinin %30'undan fazlasının gelişiminde önemli bir role sahiptir (8).

p21 Ras proteinleri yüksek afiniteyle guanin nükleotidlerine bağlanır ve hücrede aktif GTP bağlı formlar ve inaktif GDP bağlı formlar arasında dönüşüm yaparlar (Şekil 5).

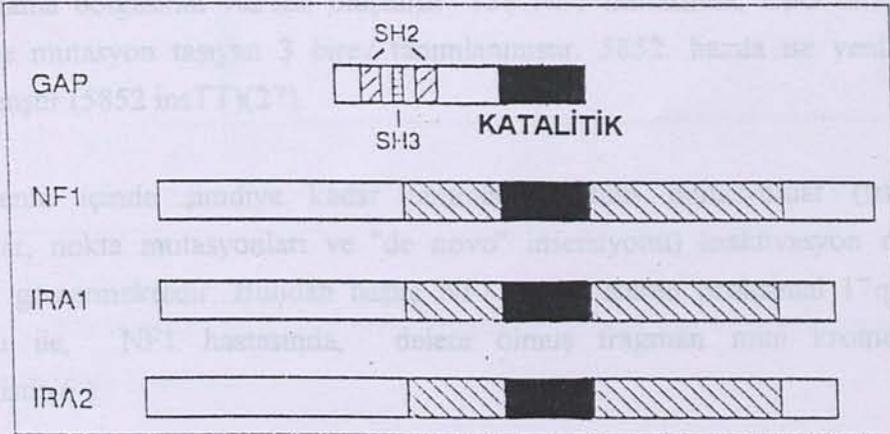


Şekil 5. p21 Ras'ın aktivasyon ve inaktivasyonu(9 nolu referanstan modifiye edilerek hazırlandı).

similasyonu için gereklidir. Nörofibromin, IRA1 ve IRA2 gibi proteinler benzer GRD içerir, ancak SH2 ve SH3 bölgeleri yoktur (9). Nörofibromin'in inaktive edilerek inaktivasyonu

GTP'nin GDP'ye dönüşümünü yürüten Guanin Nükleotid Serbestleştirici Proteinler (Guanin Nükleotid Releasing Proteins = GNRPs) ve GTP'nin GDP'ye hidrolizini sağlayan GTPaz Aktive Edici Proteinler (GTPase Activating Proteins = GAPs) gibi düzenleyici proteinlerine bağlıdır(8).

Xenopus yumurtalarında normal ve mutant p21 Ras proteinlerinin GTPaz aktivitelerinin varlığı, GAP ile açıklanmıştır. GAP, normal p21 Ras GTPaz aktivitesini önemli derecede uyarır. Fakat onkojenik mutantlarda etki göstermez. GAP, 120 kDal'luk sitoplazmik bir proteindir. Mutant p21 Ras proteini, GAP'ın enzimatik aktivitesine dirençlidir. GAP'ın 1/3 C terminali, GTPaz aktivitesini hızlandırıcı özelliğe sahiptir. GAP'ın bu bölgesi, *S.cerevisiae*'daki Ras proteinlerinin negatif regülatörlerini şifreleyen maya IRA1 ve IRA2 genlerinin bir segmentine homologdur(22,9). IRA (İnhibitory regulators of the RAS-cyclic AMP = Ras-cyc AMP regülatörlerinin inhibitörü)fonksiyonu eksik olan maya hücrelerinde, GAP eksprese olduğu zaman, GAP, IRA'nın kaybını engelleyebilir. NF1 geninin moleküler klonlaması yapılırken, GAP ve IRA proteinleri ile benzer sekanslara sahip bir bölge açıklanmıştır. Bu bölgeye GAP Related Domain (GRD) adı verilmiştir((Şekil 6).



Şekil 6.: GAP ve GAP ile homoloji gösteren proteinlerin bölgeleri.src homoloji bölgeleri 2 ve 3 (SH2 ve SH3). GAP'ın amino bölgesindedir. GAP'ın 350 aa'lık karboksü ucu (Siyah bölge) p21 ras'ın GTPaz

stimülasyonu için gereklidir. Nörofibromin. IRA1 ve IRA2 gen ürünleri benzer GRD içerir, ancak SH2 ve SH3 bölgeleri yoktur (9 Nolu referanstan modifiye edilerek hazırlandı).

GRD. NF1 proteininin merkezi bölgesi olup, 360 aa'lık büyüklüğe sahiptir. 21 ve 27a eksonlarından şifrelenir(23,24,25). NF1-GRD. E.coli. maya veya böcek hücrelerinde eksprese olduğu zaman, p21 Ras-GTPaz aktivitesini uyarma kapasitesindedir. Bundan başka NF1-GRD, p21 Ras'a GAP' tan daha sıkı şekilde bağlanır(26,8).

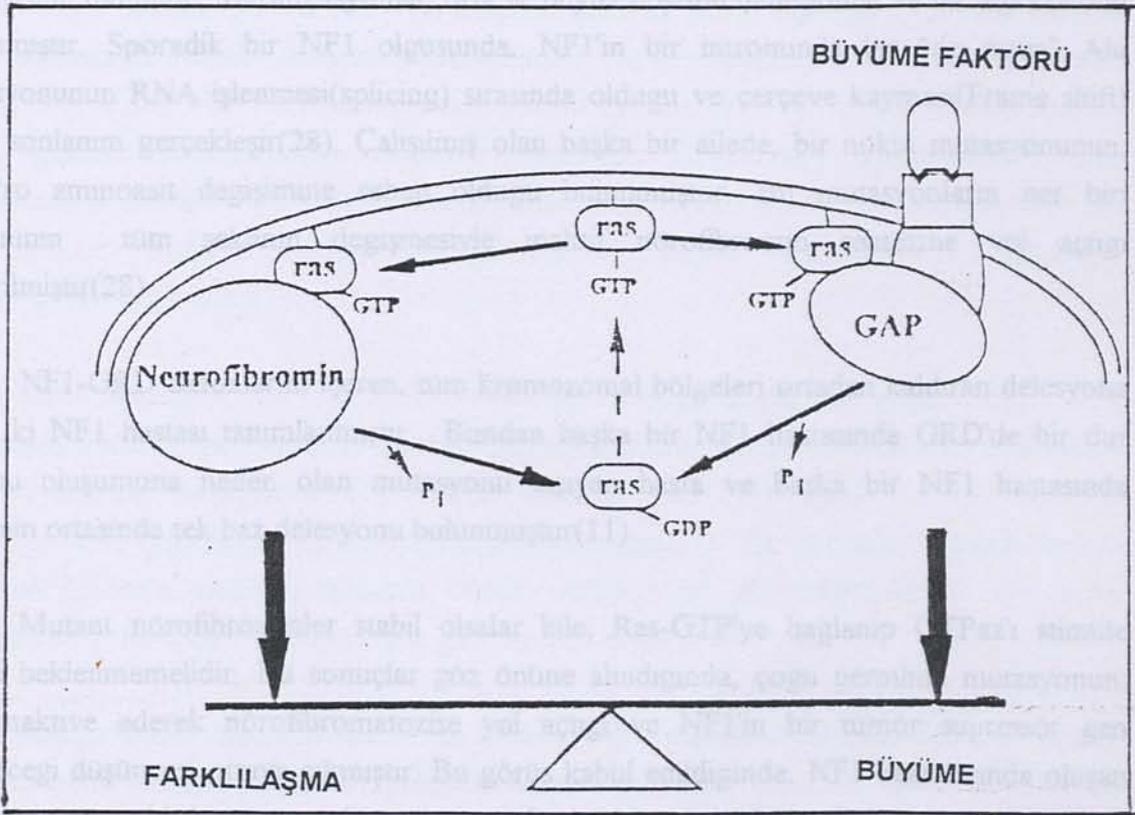
Nörofibromatozisin gelişiminde Ras proteinlerinin ve NF1'in rolü ve memeli p21 ras'ının regülasyonunu açıklamak üzere, bakteride eksprese olmuş NF1-GRD proteinine karşı antikolar oluşturulmuştur. Bu antikolar özellikle insan ve fare hücrelerinde 280 kDal'luk bir proteini tanıır(22). NF1 gen ürünü olarak belirlenmiş olan bu proteinin bazı biyokimyasal özellikleri tanımlanmıştır. İnsan NF1 cDNA'sının 2818'lik büyük bir open reading frame gösterdiği bulunmuştur(6).

IIIII. NF1 MUTASYONLARI ve TÜMÖR SUPRESSÖR NF1 :

1992'de NF1-GRD'nin korunmuş bölgesinde, somatik ve germline mutasyonların bulunduğu tanımlanmıştır(27). Heterodubleks ve SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism) ile diğer eksonlarda da yeralan birkaç mutasyon tanımlanmıştır. İki ailede 31. eksonda 5842. bazda tekrarlayan bir C-T nokta mutasyonu bildirilmiştir. Otuz birinci ekson NF1 kodlama bölgesinin %2'sini oluşturur. 158 NF1 hastasında, CpG dinükleotidi tekrar bölgesinde mutasyon taşıyan 3 birey tanımlanmıştır. 5852. bazda ise yeni bir insersiyon tanımlanmıştır (5852 insTT)(27).

Genin içinde şimdiye kadar tanımlanmış tüm mutasyonlar (translokasyonlar, delesyonlar, nokta mutasyonları ve "de novo" insersiyonu) inaktivasyon mekanizmasıyla uygunluk göstermektedir. Bundan başka NF1 genini içeren proksimal 17q parçasının bir delesyonu ile, NF1 hastasında, delete olmuş fragman mini kromozom şeklinde belirlenmiştir(6).

NF1'in tümör supressör fonksiyonunun gösterimi, NF1 hastalarının tümörlerinin (Shwannomalar) biyokimyasal analizi ile yapılmıştır. Bu hücrelerin önemli derecede azalmış veya saptanamayacak ve predominant olarak GTP bağlı formda nörofibromine sahip olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, Shwann hücrelerinde nörofibrominin, Ras'ın önemli bir "negatif düzenleyici" si olduğunu düşündürür. Bunun kaybı Ras'ın aktivasyonuna yol açar. Bu hücreler Ras aktivitesinin regülasyonunda defekte sahiptir. Nörofibromin ve Ras-GAP'ın her ikisi Ras'dan downstream sinyal oluşumuyla ilgilidir. Ras-GAP proliferatif sinyali iletmesine rağmen, nörofibromin farklılaşma sinyali oluşturur(11,13) (Şekil 7).



Şekil 7.: Nörofibromin ve GAP'ın hücre büyüme ve farklılaşması üzerindeki etkisi(11 nolu referanstan modifiye edilerek hazırlandı).

NF1'in bir tümör supressör gen olabileceği düşüncesi. NF1 hastası olmayan bireylerden. sporadik tümörlerde. bu lokusta somatik mutasyonların bulunmasından kaynaklanır. Nokta mutasyonları koion kanseri. myelodisplastik sendrom ve astrositomada bulunmuştur. Bunların hepsinde. nörofibrominin GRD (GAP Related Domain) bölgesinde aminoasit değişimi belirlenmiştir. Mutant proteinin. invitro GAP aktivitesinin de önemli derecede azaldığı görülmüştür(13). NF1 hastalarının DNA'larında NF1 geni protein kodlama bölgelerinin tümünde. translokasyonlar. orta ve büyük boyutlu delesyonlar ve bir dur kodonu saptanmıştır. Sporadik bir NF1 olgusunda. NF1'in bir intronunda bir "de novo" Alu insersiyonunun RNA işlenmesi(splicing) sırasında olduğu ve çerçeve kayması(Frame shift) erken sonlanım gerçekleşir(28). Çalışılmış olan başka bir ailede. bir nokta mutasyonunun. Leu-Pro aminoasit değişimine sebep olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonların her biri proteininin tüm şeklinin değişmesiyle inaktif nörofibromin sentezine yol açtığı gösterilmiştir(28).

NF1-GRD eksonlarını içeren, tüm kromozomal bölgeleri ortadan kaldıran delesyona sahip iki NF1 hastası tanımlanmıştır. Bundan başka bir NF1 hastasında GRD'de bir dur kodonu oluşumuna neden olan mutasyonu taşıyan hasta ve başka bir NF1 hastasında GRD'nin ortasında tek baz delesyonu bulunmuştur(11).

Mutant nörofibrominler stabil olsalar bile, Ras-GTP'ye bağlanıp GTPaz'ı stimüle etmesi beklenmemelidir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, çoğu germline mutasyonun. geni inaktive ederek nörofibromatozise yol açtığı ve NF1'in bir tümör supressör gen olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Bu görüş kabul edildiğinde. NF1 hastalarında oluşan tümörlerin en az bir kısmının gelişmesi sırasında. kalan normal NF1 allelinin inaktive olması beklenmelidir. Allelin kaybı bir inaktivasyon mekanizmasıdır ve saptamak nispeten kolaydır.

NF1 hastalarının malign ve benign tümörlerinde 17. kromozom üzerinde NF1 gen bölgesinin heterozigosite kaybı çalışılmıştır. Şimdiye kadarki tüm çalışmalar nörofibromalarda 17. kromozom boyunca heterozigosite kaybını saptamada başarısız kalmıştır (11). Bununla birlikte NF1 hastalarının bazı malign tümörlerinin analizinde tüm 17. kromozom boyunca veya 17p'de heterozigosite kaybı gösterilmiştir (29). 17p'de, p53 tümör süpresörünün normal bir allelinin kaybının tümör ilerlemesine katılabileceği ve kromozom kaybına neden olabileceğinden ötürü bu bulgular daha az anlam taşımıştır. Bununla birlikte NF1 hastalarının diğer malign tümörlerinde 17q'ya spesifik heterozigosite kaybı gösterilmiştir. Çalışmalar, NF1 hastaları arasında bir astrositom ve birkaç nörofibrosarkomda 17q'ya spesifik heterozigosite kaybını göstermiştir (29). NF1 hastalarındaki bazı feokromositomalarda 17q'ya spesifik heterozigosite kaybı bulunmuştur. Bu sonuçlar, her iki NF1 allelinin inaktivasyonunun NF1'le beraber birkaç malignansinin gelişimine katılabileceğini düşündürür(11).

Karsinogenez ile NF1'in direk olarak ilgili olduğuna dair en güçlü bulgu, NF1 hastalarının nörofibrosarkom çalışmalarıyla sağlanmıştır. Bu malign tümörlerden elde edilen hücre hatlarında, nörofibromin seviyesinin azaldığı, Ras GTP arttığı ve bu durumun hücrelerde aşırı çoğalmaya neden olduğu bildirilmiştir(8,7). Bu sonuçlar nörofibrominin fonksiyon kaybının tümör gelişiminde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu hücre tiplerinde NF1, bir tümör süpresör gen gibi hareket etmektedir.

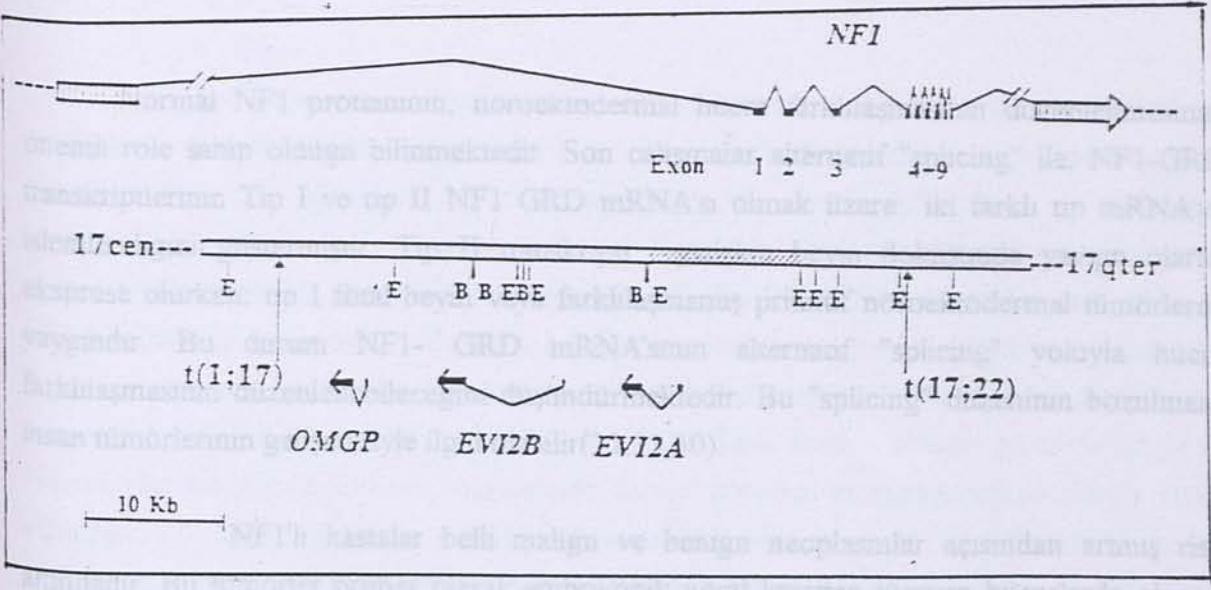
Malign beyin tümörlerinden Astrositom, NF1 hastaları arasında yüksek sıklıkta gözlenmektedir. Anoplastik astrositomlu NF1 hastası olmayan hastaların tümör DNA'larının GRD'deki bir eksonunun taranması sonucunda nokta mutasyonlarının varlığı tanımlanmıştır(11). Bir tümörde, 1423. kodonda NF1 GRD'de AAG-CAG (Lys -Gln)'ye dönüşmüştür. Bu pozisyondaki Lys'nin GAP ile ilgili proteinlerde tekrarlanıyor olması, bunun normal NF1 fonksiyonu için önemli olduğunu göstermektedir. Astrositomdaki mutant NF1-GRD proteini, normal afinite ile Ras GTP'ye bağlanır. Fakat bu proteinin Ras GTP'yi stimüle etme yeteneği önemli derecede bozulmuştur(11).

Yukarıda verilen astrositoma örneğinde, mutasyon bulunan eksonun tarama çalışmasında, 22 kolonik adenokarsinomanın birinde yine 1423. kodonda(Lys 1423 kodonu) somatik mutasyon açıklanmıştır. Bu mutasyonla 1423. kodonda Lys-Glu değişimi olur. Aynı mutasyona, 28 myelodisplazi olgusundan birisinde de rastlanmıştır. Mutant NF1 proteinin Ras-GTP'ye normal afinite ile bağlandığı ve GTP'az aktivitesinde önemli derecede azalma gösterdiği saptanmıştır(11).

CML(Kronik Myelositik Lösemi)'de ras genlerinde nokta mutasyonları nadir olmasına rağmen, NF1-GRD'nin somatik mutasyonunun, değişmiş "splicing" ile ras sinyal iletiminde bozukluğa yol açması olasıdır. CML'li hastalarda ve KML hücre hatlarında; NF1-GRD'de ve ras geninde, SSCP ve ASRA (Allel Spesifik Restriksiyon Analizi) ile nokta mutasyonu taranmıştır. NF1-GRD'de Lys 1423'de bulunan nokta mutasyonu; kolon kanseri, anaplastik astrositom, MDS ve NF1'li bir ailede rapor edilmiştir. Bu kodonu içeren ekson, Li ve arkadaşları tarafından "FLR ekson" olarak adlandırılmıştır. Bu ekson, NF1-GRD'nin 1/7'sini oluşturur. PCR-SSCP Analizi ile, CML hastalarının genomik DNA'ları, bu FLR eksonundaki mutasyon yönünden taranmıştır. Bu bölgedeki Lys 1423. mutasyonu, ASRA ile incelenmiştir. Akut Miyeloid Lösemide vakaların %20-60'ında, MDS'de %40'ında, CML 'de ise vakaların %0.3'ünde mutasyon saptanmıştır(30).

Birçok hücre tipinde nörofibromin, Ras GTP seviyelerinin önemli bir düzenleyicisidir. Somatik NF1 inaktivasyonlu hücrelerde Ras-GTP'nin konsantrasyonunda artma görülür. Kolon kanserleri sıklıkla aktive olmuş K-ras p21 içerir ve NF1 mutasyonları bu hücre tiplerinde hızlı çoğalma nedenidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar NF1 lokusu üzerinde yeni bir bölge belirlemiştir: TBR (Translocation Breakpoint Region). Bunun bir kromozom kırılma noktası olduğu ve delesyonlarla kesilebildiği gösterilmiştir(31). Bulgular TBR bölgesinin NF1 geni içerisinde olduğunu desteklemektedir (Şekil 8).



Şekil 8.: NF1'in kısmi genomik yapısı ve belirlenmiş olan dokuz eksonu gösterilmektedir. Ok yönleri transkripsiyon yönünü belirtmektedir(18 Nolu referanstan modifiye edilerek hazırlandı).

72 NF1 hastasının DNA'larında PCR amplifikasyonu, SSCP Analizi ve baz dizi analizi yapılarak SSCP jelinde 6 hastada varyant bant açıklanmış ve 60-65 kontrol setinde varyant bant gözlenmemiştir. Eger bu 6 varyant NF1 ile ilgisiz popülasyon polimorfizmine bağlı olarak oluşsa idi bu olasılık 0.05'den az olacaktı. Olasılığın yüksek olması, baz çiftindeki değişikliklerin gerçekten TBR bölgesindeki NF1 mutasyonları olduğu hipotezini destekler. TBR geni transkriptinin 4 kb'lik sekansı genomik DNA sekansı ile karşılaştırılmıştır. Bu dizi içerisinde Splice sınırlarının ve büyük bir "open reading frame" in belirlenmesi, bu bölgenin NF1 içerisinde sentromere doğru 5' ucunda yer aldığını göstermiştir(31,18).

NF1-GRD bölgesinde yapılan mutasyon çalışmalarında, bu bölgedeki fonksiyon kaybının, ras genlerinin mutasyonlarında ortaya çıkan sonuç gibi bir sonuca yol açabileceği görülmüştür. Her iki durumda da, Ras sinyal iletiminde sürekli uyarıya neden olabilir. Hematolojik malignansilerdeki prevalansı bilinmemekle beraber, miyelodisplastik sendromlu bir hastada NF1-GRD'de bir nokta mutasyonu saptanmıştır(31).

Normal NF1 proteininin, nöroektodermal hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rolü sahip olduğu bilinmektedir. Son çalışmalar alternatif "splicing" ile, NF1-GRD transkriptlerinin Tip I ve tip II NF1 GRD mRNA'sı olmak üzere iki farklı tip mRNA'ya işlendiğini göstermiştir. Tip II transkripti, yetişkin beyin dokusunda yaygın olarak ifade edilirken; tip I fetal beyin veya farklılaşmamış primitif nöroektodermal tümörlerde yaygındır. Bu durum NF1-GRD mRNA'sının alternatif "splicing" yoluyla hücre farklılaşmasının düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bu "splicing" düzeninin bozulması, insan tümörlerinin gelişmesiyle ilgili olabilir(32,33,30).

NF1'li hastalar belli malign ve benign neoplasmlar açısından artmış risk altındadır. Bu tümörler primer olarak embriyonik nöral krestten türeyen hücrelerde oluşur. NF1'li çocuklar özellikle prelökemik miyelodisplastik ve miyeloproliferatif sendrom gibi olgunlaşmamış hemopoetik hücrelerin düzensiz klonal proliferasyonu ile karakterize olan hastalıklara yatkındırlar(30). Nörofibrosarkom ve bunun hücre hatlarının incelenmesinde yapısal heterozigosite kaybı, GTPaz aktive edici proteinlerinin invitro aktivitesinde azalma ve Ras-GTP seviyesinde artış gözlenmiştir. 17.kromozomda heterozigosite kaybı bulunan fibrosarkomda, 200 kb'lık bir NF1 delesyonu saptanmıştır(33).

NF1'li yetişkinlerde, AML veya prelökemi açısından risk artışı gösterilmemiştir. Bu gözlemler, erken çocukluk süresince miyeloid hücrelerinin çoğalmasında, nörofibromin aktivitesinin önemli olmadığını gösterir. Nörofibrominin, miyeloid hücrelerinin büyüme kontrolünde önemli rolü vardır. Çocukluk çağı MPS'de görülen anormal hücre çoğalmasının, hiperaktif Ras proteinlerinden kaynaklandığını düşündürür(30).

Malign miyeloid hastalıklarda, aktive olmuş ras mutasyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır. Nöral krest hücrelerinde Ras proteinleri aracılığıyla sinyal iletimi, proliferasyondan çok farklılaşmayı sağlar.

Tablo2:NF1 Geninin İnter ve Ekson Bölgelerine Uzunlukları(11)

NF1 gen ürünü olan Nörofibrominin karakterizasyonu, NF1 gen ürünü belirleyen poliklonal antiserumlarla yapılmıştır(34). Jel elektroforezindeki mobilitesine göre Nörofibromin, 250 kDal.'luk bir proteindir(35.11.19). Antinörofibromin ve antitübülin antikori ile double-indirek immünflöresan işaretleme ile, nörofibrominin sitoplazmik mikrotübüllerle birlikte olduğu gösterilmiştir(35.10). Bu 250 kDal.'luk protein, tüm doku ve hücre hatlarında saptanmıştır. Bununla beraber ekspresyonun beyin, dalak ve böbrekte en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. Son çalışmalarda beyinde nörofibromin ekspresyonunun diğer dokulara oranla 5-10 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir(35). Nöron, glia, miyelinsiz Schwann hücrelerinde de nörofibromin ekspresyonunun olduğu rapor edilmiştir. N-etil-N-nitrozüre (ENU) ile indüklenmiş hamster nörofibroma modeli kullanılarak immünobloting, immünohistokimyasal çalışmalar ve NF1 gen ürününe karşı antikor kullanarak bu proteinin, özellikle normal ve neoplastik hücrelerde lokalize olduğu belirlenmiştir(35).

Bütün bu gen ekspresyonu çalışmalarında öncelikle hücrel RNA'nın ekstrakte edilmesi ve amaca uygun olarak cDNA eldesi, Northern-hibridizasyon gibi yöntemlerde kullanılmak üzere işlemlenmesi gerekmektedir.

13	2002	250	0.49	38	6859	141	8.14
18	2991	123	2.00	43	7395	158	1.70
19	3114	201	0.53	44	7553	123	0.33
20	3315	182	0.12	45	7676	131	0.30
21	3497	212	2.20	46	7807	101	1.30
22	3709	162	0.15	47	7908	143	1.70
23	3871	240	4.00	48	8051	47	0.30
23a	4111	63	6.00	48a	8096	217	7.00
24	4111	159	0.75	49	8315	54	0.30
25	4270	98	1.80		8315	139	1.70

Tablo2:NF1 Geninin İtron ve Ekzon Bölgelerinin Uzunlukları(11).

RNA İZOLASYONU

Ekzon	cDNA (kb)	uzunluk (bp)	İtron (kb)	Ekzon	cDNA (kb)	uzunluk (bp)	İtron (kb)
1	1	60	>40	26	4368	147	1.27
2	61	144	?	27	4515	258	>40
3	205	84	?	28	4773	433	1.90
4	289	366	0.22	29	5206	341	2.50
5	655	76	0.83	30	5547	203	4.10
6	731	158	0.50	31	5750	194	1.45
7	889	174	0.40	32	5944	141	0.15
8	1063	123	0.30	33	6085	280	0.40
9	1186	75	0.13	34	6365	215	0.15
10	1261	381	2.50	35	6580	62	0.06
11	1642	80	0.54	36	6642	115	0.62
12	1722	280	1.20	37	6757	102	1.80
13	2002	250	0.49	38	6859	141	6-14
14	2252	74	0.24	39	7000	127	?
15	2326	84	1.30	40	7127	132	0.96
16	2410	441	0.75	41	7259	136	2.10
17	2851	140	0.75	42	7395	158	1.70
18	2991	123	2.00	43	7553	123	0.35
19	3114	201	0.53	44	7676	131	0.20
20	3315	182	0.12	45	7807	101	1.30
21	3497	212	2.20	46	7908	143	1.70
22	3709	162	0.15	47	8051	47	0.30
23	3871	240	4.00	48	8098	217	?
23a	4111	63	6.00	48a	8315	54	?
24	4111	159	0.75	49	8315	139	
25	4270	98	1.60		3		

RNA İZOLASYONU

mRNA izolasyonu, moleküler biyolojik araştırmalarda kullanılan en temel yöntemlerden birisidir. Örneğin: invitro protein sentezleyen sistemlerde, mRNA preparasyonlarının karakterize edilmesi; hormonlara cevap veya büyüme ve gelişme sırasında oluşan gen ekspresyonu değişikliklerini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Alternatif olarak mRNA, cDNA moleküllerinin sentezi için bir kalıp gibi kullanılabilir(36).

Fenol ekstraksiyonu ile birlikte etanol presipitasyonu, RNA izolasyonunda kullanılan en yaygın tekniklerden birisidir. Bu metod, guanidin temelli metodlardan daha kolay ve hızlı olmasına rağmen, RNA molekülleri daha fazla risk altındadır.

İkinci yaygın metod, proteinleri degrade eden proteinaz K ve hücreleri parçalayıcı bir deterjan olan SDS (Sodyum Dodesil Sulfat)'ın kullanımudur. Bu metod da subsellüler fraksiyonların hazırlanmasında uygun değildir.

Tüm ekstraksiyon yöntemlerinde, hücre ve dokulardan, degrade olmamış ribonükleik asitin izolasyonu üç basamaktan oluşur:

- 1-Endojen nükleazların inhibisyonu,
- 2-RNA'nın deproteinizasyonu,
- 3-RNA'nın homojenatta bulunan diğer komponentlerden fiziksel ayrımı.

Birçok denatüran, izolasyon için kullanılabilir. Guanidinium thiocyanate ve chlorid en etkin protein denatüranlarıdır(37).

1- Nükleazların inaktivasyonu, protein denatürasyonunun kinetik etkisiyle paraleldir. Nispi etki sırasıyla; Guanidinium thiocyanate > Guanidin hydrochloride > Üre.

REVERSE TRANSCRIPTION- POLİMERASE CHAIN REACTION

2- İnamoleküler disülfit-protein bağlarını kırmada, dithiothreitol veya 2-merkaptoethanol gibi bir redüktan ile denatürasyon artırılır. Ribonükleazın kompetitif inhibitörlerinin veya diethyl pyrocarbonate (DEPC) gibi kimyasal inaktivatörlerin ilavesi denatürasyonu arttırmaz. RNA izolasyonunda fenol ekstraksiyonuna bir alternatif olarak, guanidin hydrochloride solüsyonlarında homojenizasyon, ucuz ve kullanışlı bir methoddur. Guanidinium thiocyanate, çok yüksek RNAaz içerikli örnekler için deproteinize edici ajan olarak seçilir. RNA'ya nükleolitik hasar vermeden, etkin protein denatürasyonu, tam ve hızlı bir homojenizasyon gerektirir.

3- RNA, guanidinium solüsyonunda ayrıldığında, yukarıdaki birinci ve ikinci basamaklar tamamlanmış, RNA'nın homojenattaki diğer makromoleküler komponentlerden fiziksel ayrımı basamağı kalmıştır. Bunun için de birkaç ayırım metodu mevcuttur.

Başlıca iki bölüme ayırabiliriz:

A-Çözünürlüğe dayalı seçici seperasyon hazırlanması,

B-Ultrasantrifüj ile yoğunluğa dayalı seçici sedimantasyon yapılması.

Seçici presipitasyon, etanol veya lityum klorid kullanılarak yapılmaktadır. Guanidinium solüsyonlarından seçici presipitasyonlar kantitatif olmayabilir. Homojenattaki komponentleri de çeşitli şekillerde etkileyebilir. Genel olarak homojenattaki RNA konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman daha ciddi problemlere yol açabilmektedir. Çok dilüe RNA solüsyonları, ne etanolle ne de lityum klorid ile çökmez. Ligament gibi inatçı dokular, ameliyatla çıkarılmış tümörler gibi yeniden elde edilemeyecek örnekler veya çok dilüe RNA solüsyonlarında; RNA'nın kantitatif elde edilmesi için, cesium chloride dansite gradientinde santifügasyon yöntemi seçilmelidir(37).

Homojenattaki diğer komponentlerinden uygun yöntemlerle ayrılan RNA'daki incelenen hedef bölge uygun primerler ve Reverse Transkriptaz kullanılarak DNA'ya dönüştürülebilir(cDNA).

Şekil 9: RT-PCR'in Şematik Gösterimi.

REVERSE TRANSCRIPTION- POLIMERASE CHAIN REACTION

HUCRE VEYA DOKU

RNA İZOLASYONU

cDNA SENTEZİ

gene özgü priming

oligo-dT priming

random hexamer priming

PCR Amplifikasyonu

sense (5') primer

1.Siklüs

hedef cDNA

2.Siklüs

antisense (3') primer

3.Siklüs

Hedef Sekansın Geometrik Amplifikasyonu

Şekil 9: RT-PCR'ın Şematik Gösterimi.

RT-PCR kullanarak RNA transkriptlerinin ortaya çıkarılmasının, gen ekspresyonu çalışmaları için hızlı, hassas ve semikantitatif bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır(38). RT reaksiyonu için:

1. Oligo (dT),
2. Random heksamer,
3. Antisense primer (3' primer) olmak üzere üç tip primer kullanılmaktadır.

Bu primerlerden biri kullanılarak ilk iplik cDNA sentezi yapılır.

Oligo dT primerleri, uzun 3'untranslated bölgeler için sıklıkla etkisizdir(39). Primer uzaklığı arttıkça RT etkinliği azalır. Random heksamer reaksiyonları, bu primerlerden en etkin olanıdır. En yüksek amplifiye olmuş ürün miktarına ulaşırır. Noonon ve Roninson 1988'de random heksamer yaklaşımının en yüksek hedef sekans amplifikasyonu sonucunu verdiğini bulmuşlardır(40).

PCR ile ilgili bazı şartlar;

-Primerin fazla miktarları genellikle ekstra amplifiye olmuş ürünler verir.5 pmol primer çifti, en iyi ve temiz amplifikasyonu verir.

-PCR'da her dNTP'nin konsantrasyonu 0.2 mM'ı aşmamalıdır.0.02mM kadar az miktar da PCR'da çalışabilir.

-Trifosfat konsantrasyonunun 0.2 mM'dan fazla olması yanlış inkorporasyon oranı veya Taq polimeraz için mutasyon sıklığını artırır.

-Mg²⁺ konsantrasyonu da önem taşımaktadır.Bazı nükleik asit bufferları 1 mM EDTA içerir ve fazla olan Mg'un dışında kelat oluşturur. Genel olarak, serbest Mg konsantrasyonu yaklaşık 2 mM'da tutulmaya çalışılmalıdır.

SINGLE -PCR siklüs sayısı az tutulmalıdır. Fazla siklüs sayısı daha çok nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşumuna yol açar. Bununla birlikte, fazla amplifikasyon siklüsü, kontaminasyon problemlerine sebebiyet verebilir. İstenmeyen hedef sekansların oldukça az miktarlarının varlığı, yanlış pozitifliklere yol açabilir.

-Genellikle 1 µg stoplazmik RNA, nadir mRNA sekanslarının (1-10 kopya/hücre) amplifikasyonu için yeterlidir. Tipik olarak memeli hücrelerinde, her hücre stoplazması başına yaklaşık 10 pg RNA içerir. 1 µg RNA yaklaşık 100.000 hücreden elde edilebilir (1 µl yaklaşık 100.000 hücreyi temsil eder). 1 µg'da hedef sekansın sayısı muhtemelen 100.000'den fazladır ve kolaylıkla amplifiye edilmelidir.

-PCR primerlerinin uzunluğu yaklaşık 18-22 baz büyüklüğünde seçilmelidir. G ve C içeriği çok fazla veya düşük olmamalıdır. Eger ökaryotik mRNA'larda çalışma yapılıyorsa ayrı ekzonlardan elde edilmiş primerler kullanılmaya çalışılmalıdır.

-Eger çalışılmakta olan gen intron içermiyor veya bakteriyel mRNA, ya da RNA virüsü ise, RNA'nın DNase muamelesi iyi bir RT-PCR sonucu elde etmek için yararlı olabilir(40).

-Günümüzde RT-PCR tekniği tek hücreden bile mRNA kantitasyonu gibi çok zor çalışmalarda bile çeşitli modifikasyonlar ile rahatça kullanılabilir özellik kazanmıştır(38).

mRNA'dan sentezlenen cDNA ekzon bölgelerdeki mutasyonlarının taranması için çok iyi bir kaynaktır.

SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM (SSCP)

DNA'daki polimorfizmleri ve gen dizisindeki mutasyonları saptamak için, DNA'daki baz değişimini belirlemek önem taşımaktadır. Genomik farklılığın bir kısmı DNA dizisindeki tek baz değişikliğine bağlı olduğundan dolayı sekans polimorfizmleri veya mutasyonları tararken tek baz değişimlerini saptayacak nitelikteki duyarlı tekniklerin kullanımına gereksinim vardır. Son yıllarda tek baz değişimini saptamak için değişik teknikler tanımlanmıştır. Bunlar:

1. Sıcaklık

2. Polimer konsantrasyonu

3. RNase cleavage. (RNase aktivitesi)

4. Kimyasal cleavage. (kimyasal reaktifler)

DGGE (Denature Gradient Gel Electrophoresis).

Heterodubleks analizi.

En yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri, kolaylığı açısından SSCP analizi olmuştur(41). Bu teknik non denatüre şartlar altında, spesifik sekansa ve tek iplikli DNA molekülü analizi temeline dayalıdır (42).

1989 formamidi

Orita ve arkadaşlarının 1989 yılında SSCP analizini tanımladıktan sonra; küçük hücreli akciğer kanserlerinde, PAH lokusunda ve insulin reseptör geninde ve p53 genini de içine alan farklı sistemlerdeki mutasyonları belirlemek amacıyla kullanılmıştır (42).

100-500 bp'lik DNA fragmanlarında SSCP analizi ; DGGE, RNase cleavage ve osmium tetrokside ve hidroksylamine ile DNA heterodubleksinin kimyasal kesimi gibi daha zor metodlar ile karşılaştırıldığında tek nükleotid değişiminin saptanmasında oldukça hassastır. Moleküller tek baz değişimi ile farklılaşarak ayrı yapılar kazanabilir ve nondenatüre poliakrilamid jel üzerinde farklı şekilde göçedebilir(43). Tek iplikli DNA'nın göçündeki değişikliklerin, bunların katlanmış yapılarındaki değişimlere bağlı olduğu düşünülmektedir(44). Bu tekniğin, polimorfizmler ve çoklu mutasyonların taranması için uygun olduğu kanıtlanmıştır(45). SSCP'nin PCR ile amplifiye olmuş 200 veya daha kısa boydaki DNA moleküllerindeki sekans değişimlerini saptamada en hassas metod olduğu bildirilmiştir(46).

Birkaç elektroforetik parametrenin iplik yapısının derecesini etkilediği

belirlenmiştir. Bunlar,

Hayashi. 300-450bp uzunlugundaki fragmanlarda mutasyon saptama oranını %67, 100-300bp uzuniugundaki fragman için de %89 olarak rapor etmiştir(47). 155bp'li fragmanlarda en yüksek hassasiyet %96-97 olarak gozienmiştir. 212bp'lik ve daha küçük fragmanlardaki SSCP hassasiyeti %79 olarak goziemienmiştir(48). SSCP'nin Gliserollü(%5-10) +4 C'de veya giisroisüz oda sıcaklığında olmak üzere iki ayrı kullanımı vardır (49).

DNA konsantrasyonu.

Tek iplikli DNA'nın yapısını etkileyecek dört parametre mevcuttur.

1. Sıcaklık.
2. Poliakrilamid konsantrasyonu.
3. Elektroforez tamponunun iyonik gücü.
4. Kullanılıyorsa gliserol konsantrasyonu.

0.5 x TBE kullanılarak yapılan jellerde ve %5 gliserol kullanıldığında daha keskin bantlar elde edildiği görülmüştür(50). PCR ürünleri 10 x SSCP boyası ile karıştırılır. Bu boyanın içinde:

- %95 formamid,
- 20mM EDTA,
- %0.05 bromfenol blue,
- %0.05 xylene cyanol bulunmaktadır.

Süspanse edilen DNA, 95 °C'de 10 dakikada denatüre edilip derhal buza daldırılır. Nondenatüre poliakrilamid jele yüklenir.

SSCP'deki temel sorunlardan ilki, tekrar edilebilirliği olmuştur. Sıcaklık, güç, uzaklık ve zaman gibi yürüme şartlarındaki ufak değişikliklerin bile, mutant DNA sekanslarının görelî hareketlerini değiştirebildiği varsayımı üzerine, SSCP analizinin birkaç kez tekrarlanması önerilmiştir. Güç ve sıcaklık gibi belirli şartlar değiştiği zaman, paternin değiştiği bununla beraber şartlar sabit tutulduğu takdirde, SSCP'nin her zaman aynı paterni verdiği gözlenmiştir(45).

Birkaç elektroforetik parametrenin iplik ayırımının derecesini etkilediği bulunmuştur. Bunlar;

Birkaç elektroforetik parametrenin iplik ayrımının derecesini etkilediği bulunmuştur. Bunlar:

Yürütme sıcaklığı.

Denatüranlar.

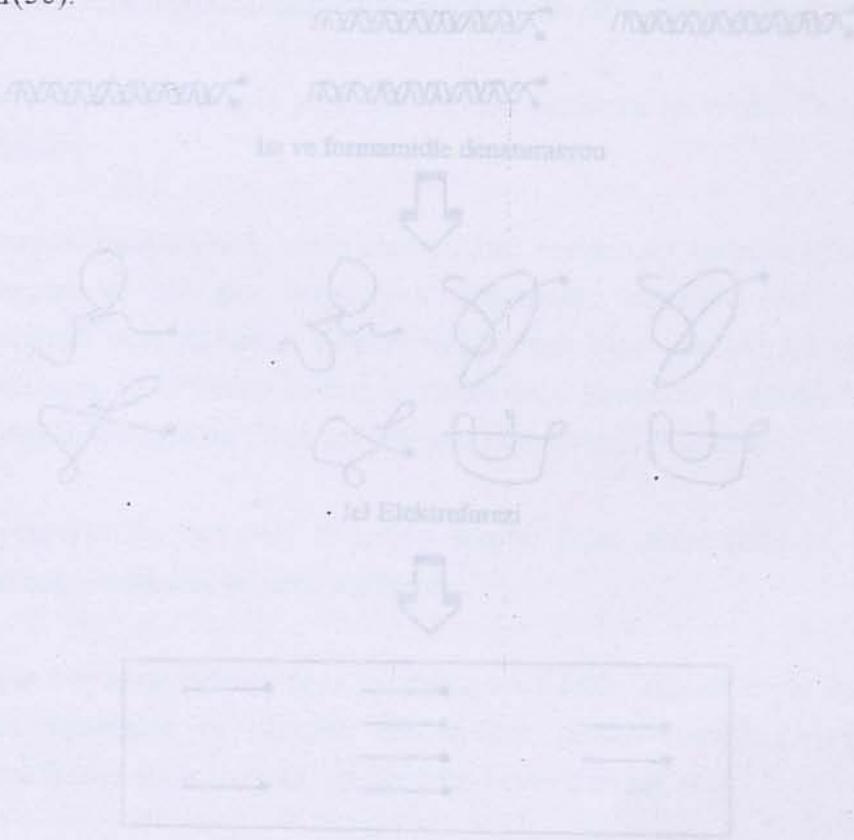
DNA konsantrasyonu.

Poliakrilamid jel konsantrasyonudur.

Orjinal SSCP metodunda, radyoaktif işaretli PCR ürünü oluşturmak üzere radyoaktifle işaretli PCR primerleri veya nükleotidler kullanılır. Sonradan dilüe edilerek, ısıyla denatürasyonun ardından 40x20 cm'lik nondenatüran jelde elektroforez yapılır. SSCP bantları otoradyografiden sonra gözlenir. Radyoaktifle çalışma hassas olmasına rağmen zaman alıcıdır. Isıya bağlı yapısal değişikliklerden kaçınmak için jel düşük voltajda genellikle tüm gece yürütülmelidir. Jel sıcaklığı, SSCP bant rezolüsyonunu ve tekrar edilebilirliğini etkileyen en önemli patern olduğundan, jel ısısının kontrolü için, termostatik olarak kontrol edilen sirkülatörlerden yararlanır.

SSCP analizi için nonizotopik protokoller tanımlanmıştır. SSCP bantları direkt olarak etidyum bromid ile boyama ile gözlenebilir ve kolaylıkla jelden kesilip, yeniden amplifikasyon ve sekanslama yapılabilir (45). Gümüş boyama da SSCP'de kullanılan non radyoaktif metodlardan biridir. Gümüş boyama, etidyum bromid ile karşılaştırıldığında; standart gümüş boyama metodu hem çift hemde tek iplikli DNA'yı daha hassas şekilde görebilmemizi sağlar. Etidyum bromid tek iplikli DNA'ya zayıf bağlanır (48). SSCP analizinde, güçlü bir denatüran olan metilmerkür (CH₃H₉OH) kullanarak, DNA parçasında kısmi denatürasyondan doğan artefaktlardan kurtulmayı sağlayarak bant paternindeki karışıklığı azalttığı gözlenmiştir. Bu modifikasyon gerçek nokta mutasyonu SSCP bandının güvenilir şekilde belirlenmesine yolaçmış ve yeni bir nonradyoaktif SSCP tekniği geliştirmiştir (48).

SSCP analizinin, "splice bölge" anomalilerini de içine alan tek baz değişikliklerinin belirlenmesi, thrombastenik fenotipe neden olan defektlerin karakterize edilmesi için çok uygun bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. Bu yöntemin sağladığı avantaj; sekanslama için az miktarda DNA ya ihtiyaç duyulmasıdır. Belli bir eksonun analizi, çok sayıda hasta örneğinde aynı zamanda yapılabilir. Anormal bir fragman belirlendiği zaman, nükleotid sekansı saptanır. Fragmanlar 300bp'den az olduğundan dolayı, tüm sekanslama tek bir reaksiyonda gerçekleştirilir(50).



Sekil 10: SSCP Analizi

Mutant bir gen veya polimorfizmi test etmek için, kontrol ve test örneklerinden elde edilmiş olan PCR ürünlerinin, formamidic birlikte ısıyla denatürasyonu yapılır. Tek iplikçi hale getirilmiş olan bu örnekler nondenatüre poliakrilamid jele yüklenir. Tek baz değişimi nükleik asitini geçişini kesin olarak değişireceğinden dolayı, bu yöntemde mutasyon saptama hassasiyeti oldukça yüksektir(55).

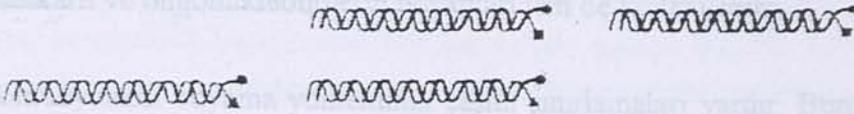
POLIAKRILAMİD JELLER İÇİN YÜKSEK REZOLÜSYONLU GÜMSÜ BOYAMA

SSCP (Tek-İplikcikli Konformasyonel Polimorfizm)

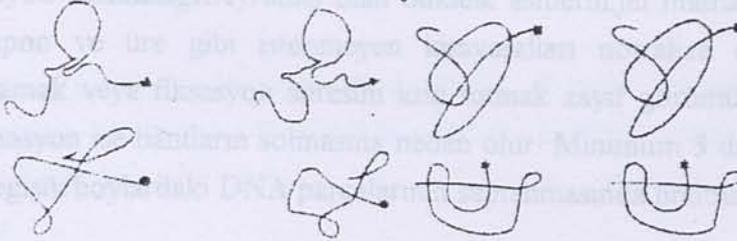
Homozigot A

Heterozigot

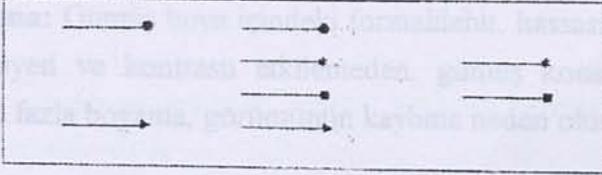
Homozigot B



Isı ve formamidle denaturasyon



Jel Elektroforezi



Şekil 10: SSCP Analizi.

Mutant bir gen veya polimorfizmitest etmek için, kontrol ve test örneklerinden elde edilmiş olan PCR ürünlerinin, formamidle birlikte ısıyla denatürasyonu yapılır. Tek iplikli hale getirilmiş olan bu örnekler nondenatüre poliakrilamid jele yüklenir. Tek baz değişimi nükleik asitin göçünü kesin olarak değiştireceğinden dolayı, bu yöntemde mutasyon saptama hassasiyeti oldukça yüksektir(55).

POLIAKRİLAMİD JELLER İÇİN YÜKSEK REZOLÜSYONLU GÜMÜŞ BOYAMA

Genel olarak gümüş boyama az miktardaki nükleik asitlerin saptanmasında oldukça etkindir. Minimum zemin boyama ile nükleik asitlerin doğru saptanmasını sağlayan "asidik gümüş boyama" oldukça hassas bir methodur(51). Bu metod daha az basamak ve kimyasal içerir ve dolayısıyla daha az zamanda boyama gerçekleştirilir. Ayrıca RNA, protein, polisakkarit ve oligonükleotidlerin boyaması için de kullanılabilir.

Bu nonradyoaktif boyama yönteminin çeşitli sınırlamaları vardır. Bunlar boyamanın etkinliğini değiştirir.

-Fiksasyon basamağı: Ayrılmış olan nükleik asitlerin, jel matriksi içine difüzyonunu engeller. Tampon ve üre gibi istenmeyen kimyasalları nötralize eder ve uzaklaştırır. Fiksasyonu atlamak veya fiksasyon süresini kısa tutmak zayıf görüntünün elde edilmesine, uzun süreli fiksasyon ise bantların solmasına neden olur. Minimum 5 dakika %7.5'lük asetik asitte tutma, değişik boylardaki DNA parçalarının saptanmasında limittir.

-Jel yıkama: Bu basamak, fiksasyon sonrası kalan çözünebilir jel komponentleri artıkları, diğer eser maddeleri ve asiti uzaklaştırır.

-Gümüş boyama: Gümüş boya içindeki formaldehit, hassasiyeti ve kontrastı artırır. Bu basamakta hassasiyeti ve kontrastı etkilemeden, gümüş konsantrasyonu azaltılamaz. Yaklaşık 90 dakikadan fazla boyama, görüntünün kaybına neden olur.

-Yıkama: Eger bu basamak unutulursa, gümüş kalıntıları kahverengi presipitanlar oluşturur.

-Görüntünün elde edilmesi: Görüntünün oluşumu, ani pH değişimini gerektirir. Bu değişim, çözünmeyen gümüş tuzlarının oluşumuna neden olur. Bu çökeltiler jelin yüzeyine tutunur ve zeminin boyanmasını artırarak görüntü kontrastını azaltır. Ön bir yıkama ile jelin yüzeyinde bulunan gümüşün konsantrasyonu azaltılarak gümüş çökmesi engellenir. Ancak hassasiyet azalır. Bununla birlikte sodyum tiosülfat gibi gümüş iyonu ile bileşenler, serbest gümüş iyonu konsantrasyonunu düşürür. Redüksiyon kinetiğini azaltır ve böylece matriks çevresindeki redoks potansiyeli artar, zemin boyama azalır. $4\mu\text{M}$ Sodyum tiosülfat konsantrasyonu, nonspesifik background boyamayı etkin şekilde düşürür Sodyum karbonat konsantrasyonunda azalma (4g/l 'nin altında) zeminin boyanmasını artırır ve zayıf kontrast görüntü oluşur. $0.028\text{-}0.111$ formaldehit konsantrasyonu, optimal boyama sağlar. Daha düşük konsantrasyonlar hassasiyeti azaltır. Buna karşın, daha yüksek formaldehit konsantrasyonlarında zemin de boyanır.

Developer'ın sıcaklığı da önem taşımaktadır. $8\text{-}10^\circ\text{C}$ arasında olmalıdır. Gerekli sıcaklık jel kalınlığı ve developer'daki kimyasal maddelerle değişim gösterir. 10°C 'nin üzerindeki sıcaklıkta boyama yapıldığı zaman görüntü çok hızlı gelişir ve jel yüzeyi kahverengi olur.

2. Presipitasyon aşamasında, isopropanol.

-Reaksiyonu durdurma: Reaksiyon pH'ı düşürme ile durdurulur. Bunun için $+4^\circ\text{C}$ 'deki $\%7.5$ asetik asit kullanılır. Daha yüksek asit konsantrasyonu görüntünün kaybına neden olur.

4. Çözme amacıyla da aprotik distile su kullanılmaktadır.

Bütün bunlara uyulduğu takdirde gümüş boyama radyoaktif yöntemlere iyi bir alternatiftir ve sürekli radyoaktif akışını sağlayamayan veya radyoaktif materyalle çalışmada gerekli alt yapıyı henüz kurmamış laboratuvarlar için önerilebilecek bir boyama yöntemidir.

III. DOKUDAN RNA İZOLASYONU

Bu çalışmada kolon rezeksiyonu yapılarak D.E.U. Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'ne gönderilen kolon dokuları ile çalışıldı. Bu dokuların patoloji tarafından yapılan makroskopik değerlendirilmesi sonucu 5 normal kolon, 75 ne tanımlı bölgeden alınan kolon dokusu çalışıldı. Dokuların beklenmeden laboratuvara buzdolabında ulaştırılması ve tüm dokularda RNA ekstraksiyon işlemi hemen gerçekleştirildi.

Tüm solüsyonlar ve malzemeler RNaz inhibitörü olan DEPC'li suda hazırlandı.

III. MATERYAL VE METOD

Araştırmada asit guanidinium thiocyanate fenol chloroform ekstraksiyonuyla tek aşamada RNA izolasyonu yöntemi kullanıldı(52,53). Belirtilen yöntem aşağıya çıkarılan tablodaki işlemler sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

1. Ekstraksiyon.
2. Presipitasyon.
3. Yıkama.
4. Çözme.

1. Ekstraksiyon aşamasında; 5M guanidinium thiocyanate, 1M sodyum sitrat, %10 N-Lauröyl sarcosine ve beta merkaptoetanol maddelerinin sırasıyla 40 ml, 5 ml, 2.5 ml, 347 µ miktarlarda karışımıyla elde edilen liziz buffer A, fenol ve kloroform-isoamilalkol (24:1),

2. Presipitasyon aşamasında; isopropanol,

3. Yıkama aşamasında %80 etil alkol ve

4. Çözme amacıyla da apirojen distile su kullanılmıştır.

Materyalin bu şekilde seçimi Chomczynski ve Sacchi nin yönteminin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir(52).

III.I. DOKUDAN RNA İZOLASYONU

Bu çalışmada kolon rezeksiyonu yapılarak D.E.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.'na gönderilen kolon dokuları ile çalışıldı. Bu dokuların patoloji tarafından yapılan makroskopik değerlendirilmesi sonucu 8 normal kolon, 7'si ise tümürlü bölgeden alınan kolon dokusu çalışıldı. Dokuların bekletilmeden laboratuvara buz içinde ulaşması sağlandı ve tüm dokularda RNA ekstraksiyon işlemi hemen gerçekleştirildi.

Tüm solüsyonlar ve malzemeler RNaz inhibitörü olan DEPC'li sudan hazırlandı (%0.1 DEPC).

RNA izolasyonu yapılan tümörlü dokuların patolojik bulgusu:

1. Orta diferansiye Adenokarsinom (T3N0)
2. Orta diferansiye Adenokarsinom (T3N1)
3. Kloakojenik karsinom (T3N1)
4. Orta derecede diferansiye adenokarsinom (T4N0)
5. Az diferansiye adenokarsinom (T4N1)
6. Müsinöz karsinom (T3N2)
7. Orta derecede diferansiye adenokarsinom (T3N1)

III. LENFOSİT AYIRIMI İŞLEMİ

1. Yaklaşık 100µg kadar olan normal ve tümoral kısımlardan örnek alınarak, buz üzerine yerleştirilmiş steril petri kabı içerisinde bistüri yardımıyla steril şartlar altında çalışılarak doku parçalandı.

2. 1 x PBS ile muamele edildi.

IV. DEKSTRANLA LENFOSİT AYIRIMI

3. Doku, enjektör iğnesinden geçecek duruma gelene kadar parçalandı ve hücrelerin sıvı faza iyice dökülmesine çalışıldı.

4. PBS ile homojenize edilmiş olan hücreler ependorf tüplerine bölünerek, 1500 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.

5. Süpernatant atıldı ve yaklaşık 100 µl'lik pelet homojenize edildi. 500 µl lizis buffer A ilave edildi. Ependorf kapagı kapatılarak hızlı şekilde çalkalandı.

6. 500 µl fenol ve 100 µl kloform izoamilalkol eklendi ve buz içinde 5 dakika bekletildi.

7. 15 dakika 4°C'de 13.000 g 'de santrifüj yapıldı.

8. Santrifüj sonrası üç fazın oluştuğu gözlemlendi. Üstteki sıvı faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.

9. 500 µl isopropanol eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi.

10. 4°C'de 13.000 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak RNA peleti oluşturuldu.

11. Pelet üzerine %80 etanol ilave edilerek santrifüj edildi.

12. Süpernatant olarak pelet kurumaya bırakıldı. Tüpün çeperinde ve dibinde alkol kalıntısı yok olduğu gözlendiğinde 50µl apirojen distile su ilave edilerek RNA peleti iyice çözüldü.

3. 400 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı.

III.II. LENFOSİT AYIRIMI İŞLEMİ:

4. Tüpün dibinde eritrositler, en üstte plazma ve plazmanın altında beyaz bulutumsu

Kontrol amacıyla 16 normal, sağlıklı insanın lenfositinden RNA ekstraksiyonu yapıldı. Lenfositlerden RNA ekstraksiyonu için öncelikle, dekstran ve fikol kullanılarak iki ayrı şekilde lenfosit ayırımı gerçekleştirildi.

III.III. DEKSTRANLA LENFOSİT AYIRIMI:

6. 15 dakika 1.300 rpm'de lenfositler çöktürüldü.

Dekstranla lenfosit ayırımı için;

7. Süpernatant olarak pelet homojenize edildi.

1. 250 µl EDTA'lı kan 5:1 oranında %6'lık dekstranla karıştırıldı. Yavaş yavaş altüst edildi.

III.IV. LENFOSİTTEN RNA İZOLASYONU:

2. Oda ısısında 10-20 dakika bekletildi.

3. Üstteki faz alınarak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

4. Üstteki sıvı faz atıldı ve pelet 1xPBS ile yıkandı.

5. PBS ile santrifüj sonrası pelet maksimum 100 µl olacak şekilde ependorf tüpüne aktarıldı.

4. 500 µl isopropanol eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi.

III.II.II. FİKOLLE LENFOSİT AYIRIMI:

1. 2cc düz kan +250 µl 0.5 M EDTA – 2cc 1 x PBS ile sulandırıldı.

2. 3ml fikolün üzerine tüpün kenarından dilüe edilmiş kan tabakalandırma yapılarak ilave edildi.

3. 400 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı.

III.IV. RNA ELEKTROFOREZİ:

4. Tüpün dibinde eritrositler, en üstte plazma ve plazmanın altında beyaz bulutumsu lenfosit tabakası oluştu.

5. Bu lenfosit tabakasından yaklaşık 700 µl alınarak ependorfa aktarıldı. 500 µl 1 x PBS ilave edildi.

6. 15 dakika 1.500 rpm'de lenfositler çöktürüldü.

7. Süpernatant atılarak pelet homojenize edildi.

III.III. LENFOSİTTEN RNA İZOLASYONU:

1. Aktarılan peletin üstüne 500 µl GITC solüsyonu (Liziz Buffer A) ilave edildi. İyiçe homojenize edildi. 500 µl fenol ilavesinden sonra yeniden homojenize edildi ve 100 µl kloroform-isoamilalkol eklendi. 5 dakika buz içinde bekletildi.

2. 15 dakika 4°C'de 13.000 g 'de santrifüj yapıldı.

3. Santrifüj sonrası üç fazın oluştuğu gözlemlendi. Üstteki sıvı faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.

4. 500 µl isopropanol eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi.

100 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

5. 4°C'de 13.000 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak RNA peleti oluşturuldu.

6. Pelet üzerine %80 etanol ilave edilerek santrifüj edildi.

7. Süpernatant olarak pelet kurumaya bırakıldı. Tüpün çeperinde ve dibinde alkol kalıntısı yok olduğu gözlemlendiğinde 50 µl aprotin distile su ilave edilerek RNA peleti iyice çözüldü.

8. Çözülen RNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

III.IV. RNA ELEKTROFOREZİ:

5 x Formaldehit jel-running buffer

0.1 M MOPS (pH:7.0)

40 mM Sodyum asetat

5 mM EDTA (pH:8.0)

DEPC ile muamele edilmiş 50 mM Sodyum asetatın 800 ml'sinde 20.6 g MOPS çözüldü. 2 N NaOH ile pH 7.0'a ayarlandı. DEPC ile muamele edilmiş 0.5 M EDTA (pH:8.0)'dan 10 ml ilave edildi. DEPC'li su ile 1 l'ye tamamlandı. 0.2 µ milipor filtreyle solüsyon steril edildi. Oda ısısında ışıktan korunarak saklandı (54).

Son konsantrasyon 1 x olacak şekilde agaroz formaldehit jel running bufferda çözüldü.

%1'lik agaroz için;

20 ml 5 x Formaldehit jel running buffer,

1g agaroz,

17.8 ml formaldehit (2.2 M Son konsantrasyon),

100 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

1. Öncelikle uygun miktarda dH₂O ile agaroz çözüldü. 60°C'ye kadar soğutuldu. Son konsantrasyon 1x olacak şekilde 5 x formaldehit jel running buffer ve ardından 2.2 M son konsantrasyon olacak şekilde (17.8 ml) formaldehit (stok 12.3 M) ilave edildi.

2. Jel çekerecek içerisindeyken döküldü. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

3. Ependorf tüplerinde, yüklenecek olan RNA'lar hazırlandı. RNA 6 µl (yaklaşık 30 µg), 5 x Formaldehit jel running buffer 2.0 µl, Formamid (Stop buffer) 2 µl ilave edildi.

4. Örnekler 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Buza daldırıldı. 5 saniye santrifüj edilerek jele yüklendi.

5. Yükleme öncesi elektroforez yapıldı (5 dakika, 5 V/cm).

6. Yürütmenin sonunda (brom fenol mavisi yaklaşık 8 cm göç ettiği zaman) jel çıkarılarak etidyum bromid ile boyandı (0.5µg /ml Etidyum bromid).

III.V. REVERSE TRANSCRIPTION

(cDNA SENTEZİ)

1. Template (TRNA) ve Random heksamer veya 3'antisense primer ve hesaplanan miktarda dH₂O ependorf tüpüne konularak pipetle homojenize edildi.

2. Beher içinde 80°C'deki su içine ependorf tüpleri konuldu.

3. Suyun sıcaklığı 37 °C'ye inene kadar tüpler bekletildi.

4. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

5. 5 x Buffer, DTT, dNTP, ve revers transkriptaz enzimi yukarıdaki miktarlarda tüplere konulup 37°C'de etüvde 1 saat inkübasyon yapıldı.

6. RT sonrası direk PCR'a geçildi.

Tablo 3 : RT reaksiyonunda kullanılan maddeler ve miktarları.

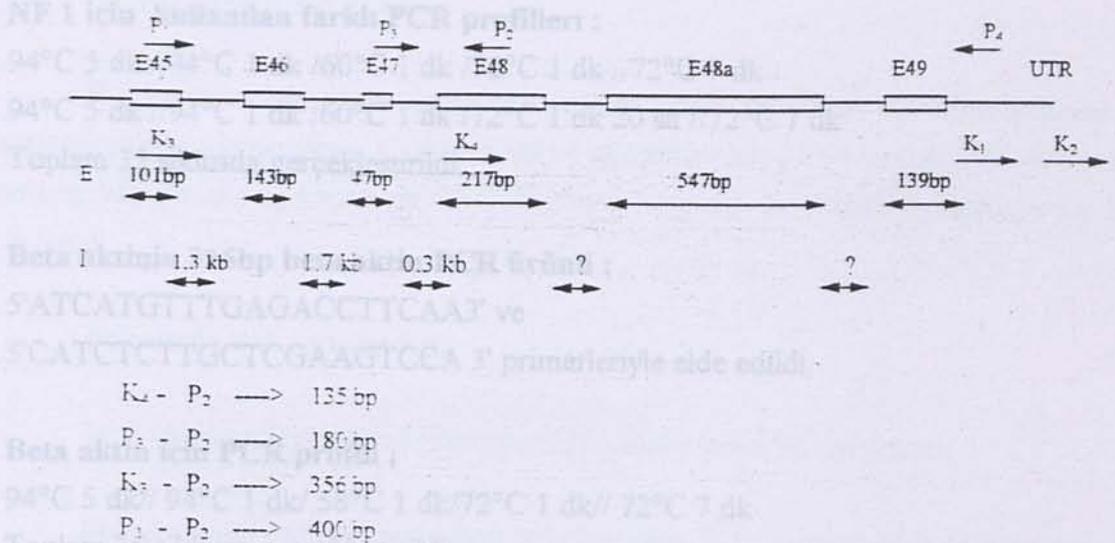
5 x First strand buffer	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l
10 mM dNTP's	1 μ l
Random Heksamers veya	
Spesifik 3'(Antisense) primer	1 μ l (100 pmol)
MMLV-RT (Boeh.Manh.)	0.5 μ l (10 U)
TRNA	1-5 μ g
dH ₂ O	20 μ l'ye tamamlayacak kadar

III.VI. PCR REAKSİYONLARI

PCR, 50 μ l'lik toplam volümde, 200 μ M dNTP's (Stratagene), 2.0 mM MgCl₂, 10-100 pmol 3' ve 5' primer, 1.25 U Taq Poly. (MBI Fermentas mol. Bio.), 200 ng DNA kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 4 : PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.

Total Hacim	50μl	Son konsantrasyon
ddH ₂ O	tamamlayacak miktarda	
10 x Buffer	5 μ l	1 x
dNTP's	2 μ l	200 μ M
MgCl ₂	4 μ l	2.0 mM
Primer 5'(sense)	0.1-1 μ l	10-100 pmol
Primer 3'(antisense)	0.1-1 μ l	10-100 pmol
Templete DNA	1 μ l	200 ng
Taq Poly.	0.25 μ l	1.25 U



E Ekson

I Intron

Şekil 11: NF1 Primerlerinin Yerleşimleri (Ekson ve Intron Uzunluklarına ait bilgiler 11 Nolu Referanstan sağlandı).

Tablo 5: NF1 için kurulumu olan PCR ve RT-PCR ürünlerinin beklenen uzunlukları.

PRIMERLER	NF1 için kullandığımız primerlerin baz dizisi:	Beklenen Uzunluk (bp)
P1P2	P1 5'GAGTTTGATCAACGAATTCTTTATG 3'	
P3P2	P2 5'TGGCTCTGCAGTGCAGGAGGGTAAG 3'	
K4P2	P3 5'TGGCTTGTGGCGGTTTGCAGGACCG 3'	135 bp
P3P2	P4 5'CAGGAAGTGCAGCATTACAACATGG 3'	180 bp
K3P2	K1 5'CCCATGTTGTAATGCTGC3'	356 bp
P1P2	K2 5'GGGAGGTCAGGAAACTTTT3'	400 bp
	K3 5'CCCAAAGTCTTTCCTGTTGTGC3'	
	K4 5'CCAGACTATGCTGAGCTTA3'	

NF 1 için kullanılan farklı PCR profilleri :

94°C 5 dk //94°C 1 dk /60°C 1 dk /72°C 1 dk //72°C 7 dk

94°C 5 dk //94°C 1 dk /60°C 1 dk /72°C 1 dk 20 sn //72°C 7 dk

Toplam 35 siklusda gerçekleştirildi.

Beta aktinin 316bp beta aktin PCR ürünü ;

5'ATCATGTTTGAGACCTTCAA3' ve

5'CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3' primerleriyle elde edildi.

Beta aktin için PCR profili ;

94°C 5 dk// 94°C 1 dk/ 58°C 1 dk/72°C 1 dk// 72°C 7 dk

Toplam 35 siklusta gerçekleştirildi.

PCR, 50µl'lik toplam volumde gerçekleştirildi. Buharlaşmayı önlemek amacıyla, reaksiyon karışımının üstüne 40µl mineral yağ ilave edildi. PCR reaksiyonları için Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler cihazı kullanıldı.

Tablo 5: NF1 için kurulmuş olan PCR ve RT-PCR ürünlerinin beklenen uzunlukları.

PRİMERLER	Çoğaltılmış Olan cDNA Parçasının Beklenen Uzunluğu (bp)	Çoğaltılmış Olan Genomik DNA Parçasının Beklenen Uzunluğu (bp)
K4P2	135 bp	135 bp
P3P2	180 bp	480 bp
K3P2	356 bp	≈3656 bp
P1P2	400 bp	≈3725 bp

5. Yükleme öncesi tarak çıkarılarak cam vertikal elektroforezze yerleştirildi.

III.VII. SSCP ANALİZİ:

Elektroforez için kullanılacak olan camlar, önce etil alkol ile temizlendikten sonra isopropanol ile tekrar silindi. Camların sol ve sağ kenarlarına 0.04 mm kalınlıktaki spacerler yerleştirildi. Camın üç kenarı jel döküldüğünde herhangi bir sızdırma yapmayacak şekilde bantlandı.

Poliakrilamid jel hazırlığı:

39:1 Oranında (akrilamid:bisakrilamid) poliakrilamid jel hazırlandı.

Poliakrilamid jel konsantrasyonu %10'luk olup, %5 oranında gliserol içermektedir.

25 ml poliakrilamid jel için;

- 2.450 g akrilamid (Sigma),
- 0.060 g bisakrilamid (Sigma),
- 1.4 ml gliserol (Merck),
- 240 µl amonyum persülfat (Sigma),
- 30 µl TEMED (Sigma) kullanıldı.

Jelin Hazırlanışı :

1. Fiksasyon	1. Akrilamid ve bisakrilamid 0.5 x TBE'de çözüldü.	2 x 5 dk
2. Yıkama		2 x 5 dk
3. Gümüş Boyama	2. 0.45 µ por çaplı fitreden geçirildi.	20 dk
4. Fiyaz yıkama	3. Amonyum persülfat ve TEMED ilave edildikten sonra derhal 24 x 20 cm boyutundaki cama döküldü.	20 sn
5. Developman		2-10 dk
6. Durdurma	4. Tarak yerleştirildi ve en az iki saat jelin donması için beklendi.	1 dk

5. Yükleme öncesi tarak çıkartılarak cam vertikal elektroforeze yerleştirildi.

6. 30 dakika, 800 V'da yükleme öncesi elektroforez yapıldı. Denatüre edilmiş olan örnekler jele yüklendi (Maksimum 5 µl olacak şekilde).

Örneklerin denatürasyonu için:

1. Stop buffer ile eşit miktardaki cDNA örneği karıştırıldı (2 µl cDNA + 2 µl Stop Buffer).
2. 98 °C'de 3 dakika bekletilip direk buza daldırıldı ve işlem ikinci kez tekrarlandı.
3. Derhal yüklemeye geçildi.
4. + 4 °C'de 2 W'da 7 saat içinde elektroforez gerçekleştirildi.

III.VIII. GÜMÜŞ BOYAMA

Gümüş boyamadaki basamaklar aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 6: Gümüş Boyamada Kullanılan Madde Miktarları ve Son Konsantrasyonları.

1. Fiksasyon	%7.5 Gl.Asetik Asit	2 x 5 dk
2. Yıkama	ddH ₂ O	2 x 5 dk
3. Gümüş Boyama	%0.15 AgNO ₃ %0.056 Formaldehit	20 dk
4. Hızlı yıkama	ddH ₂ O	20 sn
5. Developman	%3 Na ₂ CO ₃ %0.056 Formaldehit 40 µg/100 ml Sodyum thiosülfat	2-10 dk
6. Durdurma	%7.5 Gl.Asetik Asit	1 dk

96 ml kloroform (Sigma)

4 ml Izoamilalkol (Merck)

IV. SOLÜSYONLAR

i. Amonyum persülfat (%10)

10 g Amonyum persülfat (Sigma)

100 ml dH₂O ile çözüldü. Çözüldükten sonra -20 °C'de saklandı.

ii. Dekstran (%6)

6 g Dekstran (Sigma)

100 ml izotonik NaCl'de çözüldü.

iii. EDTA (0.5 M)

186.1 g Na₂H EDTA.2H₂O (Sigma)

700 ml dH₂O eklendi.

10 M NaOH ile pH=8.0'a ayarlanıp dH₂O ile 1 l'ye tamamlandı.

iv. DEPC'li dH₂O (%0.1)

1 ml DEPC (Sigma)

1 l dH₂O ile tamamlandı.

v. Developer Solüsyonu

3 g Na₂CO₃ (Merck)

140 µl Formalin (Stok %40) (Merck)

40 µl Sodyumtiosülfat

100 ml ddH₂O ile tamamlandı.

vi. Formaldehit jel running buffer (5 x)

0.1 M MOPS (pH 7.0) (Sigma)

40 mM Sodyum Asetat (Merck)

5 mM EDTA (pH 8.0) (Sigma)

vii. Gl.asetik asit (%7.5)

7.5 ml Gl.asetik asit (Merck)

100 ml ddH₂O ile tamamlandı.

viii. Gümüş Nitrat solüsyonu

150 mg Gümüş Nitrat (BDH Chem.Ltd)

140 µl Formalin (Stok %40) (Merck)

100 ml ddH₂O ile tamamlandı.

ix. Kloroform-izoamilalkol (24 : 1)

96 ml kloroform (Sigma)
4 ml İzoamilalkol (Merck)

x. Lizis buffer A

40 ml 5 M Guanidintiosiyanat (Stratagene)
5 ml 1 M Sodyumsitrat (Merck)
2.5 ml %10'luk N Lauril sarkozin (Sigma)
347 µl β-merkaptöetanol (Merck)

xi. 1 x PBS

8 g NaCl (Merck)
0.2 g KCl (Merck)
1.15 g Na₂HPO₄·7H₂O (Merck)
0.2 g KH₂PO₄ (Merck)
1 l'ye DEPC'li dH₂O ile tamamlandı.

xii. Sodyum Sitrat (1 M)

25.8 g Sodyum Sitrat (Merck)
1 l'ye dH₂O ile tamamlandı.

xiii. Stop buffer

%95 Formamid
20 mM EDTA
%0.05 Bromfenol mavisi
%0.05 Ksilen siyanol

ORNEK SAYISI	RNA SAFLIĞI
19	1.0-1.7
8	1.1-1.5
7	0.9-1.6

xiv. 1 x TBE

10.8 g Tris base (0.04 M) (Sigma)
5.5 g Borik asit (Sigma)
40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
1 l'ye dH₂O ile tamamlandı.

V. SONUÇLAR:

V.I. RNA İZOLASYONU

Çalışmamıza lenfosit, normal ve tümoral kolon dokularından RNA izolasyonu ile başladık. Fikol ile yapmış olduğumuz lenfosit ayırım işlemi ile dekstranla yapılan işlemden daha fazla ve saf RNA elde edildiği spektrofotometrik ölçümler sonucu görüldü.

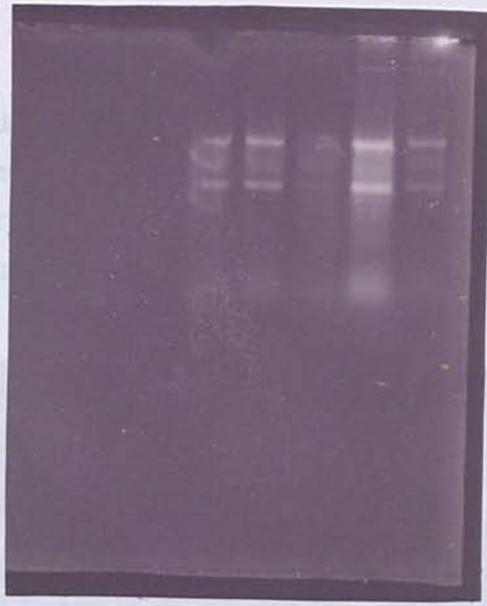
Çalışılan örnek sayısı ve spektrofotometrik olarak belirlenmiş RNA saflık değerleri Tablo 7 'de verilmiştir.

Tablo 7: Lenfosit, normal ve tümoral dokulardan izole edilmiş RNA'ların saflık değer aralıkları(O.D 260/O.D 280).

ÖRNEK	ÖRNEK SAYISI	RNA SAFLIĞI
Lenfosit	19	1.0 - 1.7
Normal Kolon Dokusu	8	1.1 - 1.5
Tümoral Kolon Dokusu	7	0.9 - 1.6

V.II. RNA ELEKTROFOREZİ

Tüm doku ve lenfositten RNA izolasyonu sonrası, elektroforez yapılarak 18S ve 28S rRNA bantları izlendi. Dokudan RNA izolasyonu çalışmasında, RNA degradasyonu lenfosite oranla daha fazla olduğundan, dokudan izole edilmiş RNA örneklerindeki bant kalitesi daha düşüktü. Şekil 12'de dokudan ve lenfositten izole edilmiş RNA'ların agaroz jel elektroforez fotoğrafı görülmektedir.



→ 28S
→ 18S

Şekil 12: %1'lik formaldehitli agaroz jelde yürütülmüş olan RNA'ların 18S ve 28S rRNA bantları.

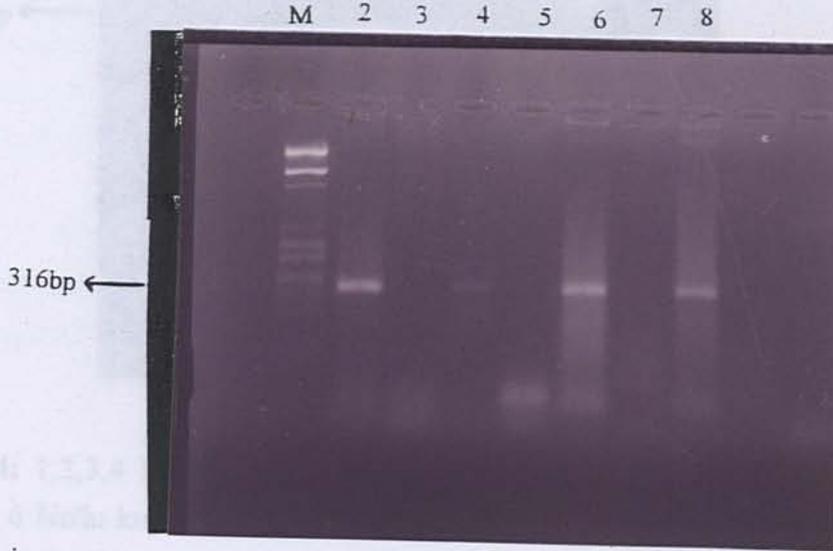
- 1- Kolon dokusu,
- 2- Kolon dokusu,
- 3- Boş kuyu,
- 4- Lenfosit,
- 5- Kolon dokusu.

C - RT - PCR

RNA elektroforezi işleminin ardından "RT - PCR" uygulamasına geçildi. Bu reaksiyon için yapılmış olan ilk denatürasyon çalışmalarında, 80 °C'de 3 dakikalık denatürasyonla, tam bir denatürasyon sağlanamadığı sonucuna vardık. En iyi sonuç, 80 °C'deki beher içinde 37 °C'ye inene kadar oda sıcaklığında bekletilerek sağlandı.

İki primer (Random Heksamer ve spesifik 3' antisense primerler) kullanarak yapılmış olan çalışma karşılaştırıldığında, spesifik primerlerin daha iyi çalıştığı, PCR amplifikasyonu sonrası agaroz jel elektroforezindeki bant kalitesine bakılarak değerlendirildi.

Beta aktin RT - PCR ile, Reverse Transkripsiyon Reaksiyonunun kontrolü yapıldıktan sonra, NF1 ekspresyonunu belirlemek amacıyla RT - PCR'a geçildi. Çalışılan vakaların hiçbirinde NF1 amplifikasyonu gözlenemedi. Şekil 13'de Beta aktin ve ilk NF1 RT - PCR amplifikasyon sonuçları verimmiştir.



Şekil 13: % 1.5'lük agaroz jelde yürütülmüş Beta aktin ve ilk NF1 RT - PCR amplifikasyon sonuçları

1- Marker (pGEM).

2- Beta aktin,

3- NF1,

4- Beta aktin,

5- NF1.

6-Beta aktin,

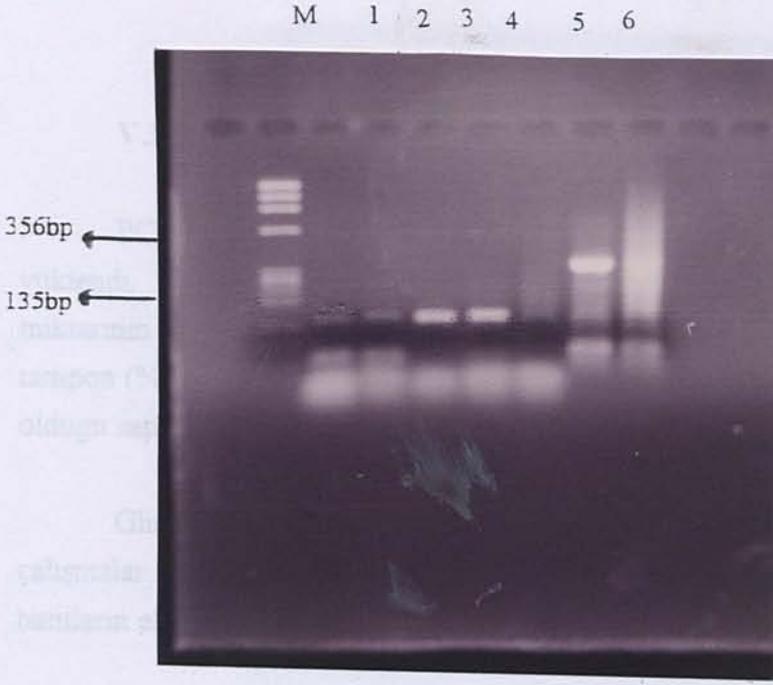
7-NF1,

8-Beta aktin.

NF1'in düşük ekspresyona sahip bir gen olduğu ve amplifikasyon başarısızlığının nedeninin bu olduğu düşünülerek, NF1 için ikinci bir amplifikasyonun (reamplifikasyon) uygun olacağına karar verildi.

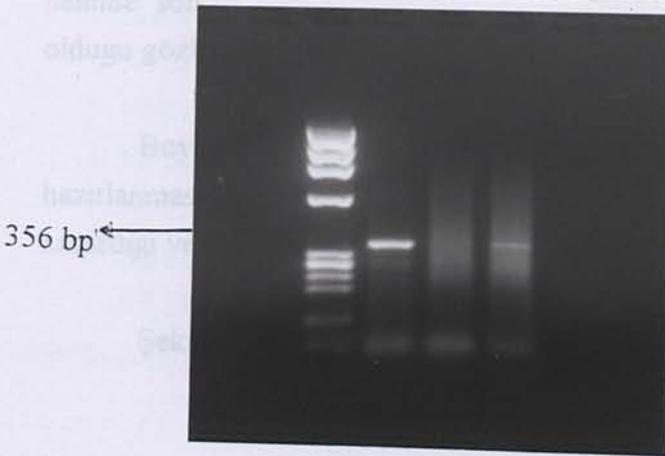
İlk PCR ürünlerinden 10 µl kullanarak, ikinci PCR (reamplifikasyon) gerçekleştirildi.

İkinci PCR sonucu, amplifikasyon bantları elde edildi (Şekil 14).



Şekil 14: 1,2,3,4 No'lu kuyular 135 bp(NF1'in 48. Ekzonu, P2K4 primerleriyle amplifiye edildi), 6 No'lu kuyu 356 bp(NF1'in 45-48.Ekzonlar, P2K3 primerleri ile amplifiye edildi). 1, 2 nolu kuyular kolon dokusu, 3, 4 ve 6 nolu kuyular lenfosit.(Marker PhiX 174).

Amplifikasyonu gördükten sonra NF1 amplifikasyonu için farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları (1.5, 2.5, 3.5 ve 4.0 mM) kullanılarak optimizasyon sağlandı ve en başarılı amplifikasyonun 2.0 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlendi.



Şekil 14a: NF1'in P2K3 primerleriyle amplifiye edilmiş 45-48. Ekzonlarını içeren 356 bp'lik amplifikasyon ürünü(Her iki örnek de lenfosite aittir)(Marker PhiX 174).

V.IV. SSCP

PCR amplifikasyon ürünleri, denatüre edilerek non-denatüre poliakrilamid jelle yüklendi. Denatürasyon formamid ve sıcaklıkla sağlandı. Jelle yükleneyecek olan cDNA miktarının optimizeasyonu, bant kalitesine göre ayarlandı. Yaklaşık 2 µl cDNA örneği ve 2 µl tampon (%95 formamid içeren Stop buffer) karışımının, kaliteli bant elde edilmesi için uygun olduğu saptandı.

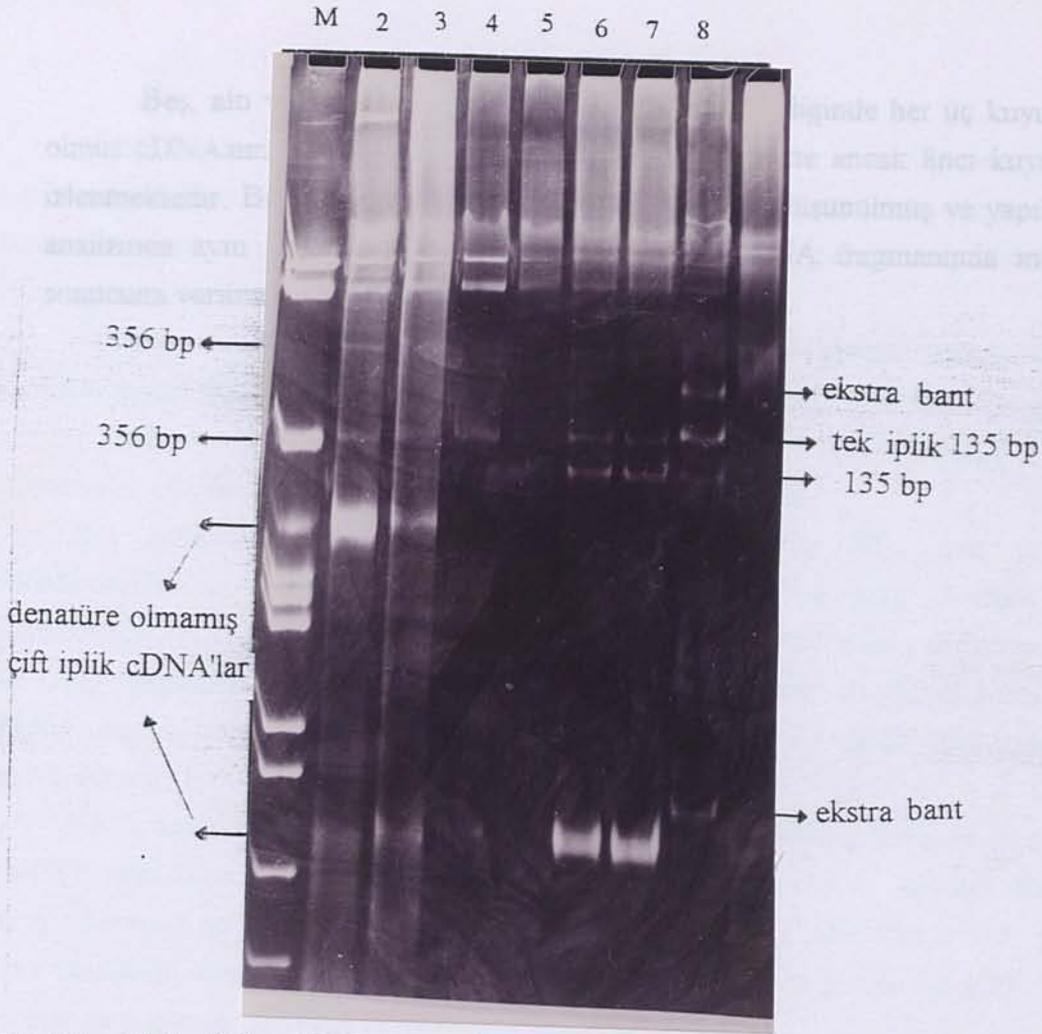
Gliserollü (%5) ve gliserolsüz olarak hazırlanan poliakrilamid jellerle yapılan çalışmalar sonucunda, gliserol kullanılan jellerin bant kalitesinin daha iyi olduğu, daha keskin bantların elde edildiği, ancak elektroforez süresinin uzadığı gözlemlendi.

V.V. GÜMÜŞ NİTRATLA BOYAMA

Elektroforez sonrası gümüş nitrat boyamasında, solüsyonlarda ve jelde kullanılan suyun kalitesinin çok önemli olduğu sonucuna vardık. Gümüş nitrat boya solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan suyun, özellikle klor iyon konsantrasyonunun yüksek olması halinde sonuç elde edilemediği, solüsyonda bulanıklık, matlaşma ve ardından kararma olduğu gözlemlendi. 18 Mohm'lük (Tip 1) su kullanarak bu sorunlar çözümlendi.

Boyama için kullanılacak olan solüsyonların kullanımdan kısa süre önce hazırlanmasına dikkat edildi. Beklemiş solüsyonlarla yapılan boyamalarda da zeminin karardığı ve bant kontrastının sağlanamadığı görüldü.

Şekil 15 'de gümüş nitrat ile boyanmış poliakrilamid jel elektroforezi verilmiştir.



Şekil 15 : NF1 RT - PCR ürünlerinin denatüre edilerek yüklenmiş, poliakrilamid jel elektroforezi

- 1- Marker (Phi X 174),
- 2- NF1'in 356 bp'lik amplifikasyon ürünü(Lenfosit),
- 3- NF1'in 356 bp'lik amplifikasyon ürünü(Lenfosit),
- 4- NF1'in 356 bp'lik amplifikasyon ürünü(Lenfosit),
- 5- NF1'in 135 bp'lik amplifikasyon ürünü(Normal kolon dokusu),
- 6- NF1'in 135 bp'lik amplifikasyon ürünü(Tümoral kolon dokusu),
- 7- NF1'in 135 bp'lik amplifikasyon ürünü(Normal kolon dokusu) .
- 8- NF1'in 135 bp'lik amplifikasyon ürünü(Tümoral kolon dokusu) .

Beş, altı ve yedinci kuyulardaki örnekler incelendiğinde her üç kuyuda da denatüre olmuş cDNA'nın tek iplikçikli normal allelleri görülmekte ancak 8nci kuyuda 4 ayrı bant izlenmektedir. Bu ekstra iki bantın mutant allel olduğu düşünülmüş ve yapılan ikinci SSCP analizinde aynı dört bant tekrar görülmüş ve bu cDNA fragmanında mutasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Araştırmamızda SSCP metodu ile NF1 geninin downstream ucuında 45' ve 48' Ekzonları içeren bölgede mutasyon taraması amaçlandı. Çalışma için oldukça güvenilir ve ucuz bir yöntem olan "Günlük Boyama" ile SSCP Analizi uygun bulduk. Böylelikle radyoaktivite gibi önemli bir problem aslında ortadan kaldırılmış oldu.

Ras proteinleri ile etkileşim gösterdiği bilinen NF1 geninin olan "Nörofibromin" in GAP ile ilişkili bölgesi "GRD" (GAP Related Domain) önceden tanımlanmıştır (8, 11, 13). Çalışmaların büyük bir kısmı Nörofibrominin fonksiyonel bölgesi olan GRD bölgesinde odaklanmaktadır. SSCP ve Heterodubleks analizi gibi metodlarla bu bölgede birçok mutasyon ve bazı mutasyonlar sonucu NF1-GRD fonksiyonel kaybı tanımlanmıştır(11).

NF1'i hastaların tümörlerinde (Schwannomalar) Nörofibrominin seviyesinin azalması ve Ras-GTP miktarının artışı gösteriyor. NF1'in bir "Tümör Supresör" olduğu düşüncesinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. NF1 için heterozigotite kaybı (LOH) çalışmaları yapılmıştır. NF1'i hastaların tümör DNA'sında LOH gösterilmiş ve NF1'in gerçek bir tümör supresör gen olduğu düşüncesi literatürde desteklenmiştir(11, 20).

Bu bulgulardan sonra NF1 geninin katabolizmi ve bu gen için 54 mutasyon tanımlanmıştır(14).

Araştırmada öncelikle yapılmış gerekçe NF1 ekspresyonunu göstermek ve sonrasında SSCP analizini yapabilmektir.

Çalışmamıza tümör supresör gen olan NF1'in 3' ucuna yakın bölgede SSCP Analizini kullanarak mutasyon taramak için RNA izolasyonu ile başladık.

Normal bireylerden ve NF1 hastası olan 3 bireyin lökositlerinden, ayrıca normal ve tümörlü 7 tane örneğinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Doğrudan RNA izolasyonu çalışırken, lenfosit oranında RNA degradasyonu fazla idi. Bunun nedeni dokuyu parçalama sırasında, parçalama işlemi için üretilen kullandıkları ve el manipülasyonu ile oldukça uzun sürede yapılabilecek sonucu açığa çıkan RNaz'lar olabileceğini düşündük. Bununla birlikte GITC (Guanidinium isothiocyanate) metoduyla tek basamaklı elde etmiş olduğumuz RNA'ların spektrofotometrik olarak tespitimiz saflik degerleri literatüre uygun bulunmuştur (15, 16).

VI. TARTIŞMA

SSCP Analizi, tek nokta mutasyonu saptamaya yönelik son yıllarda kullanılan en yaygın metodlardan biridir(41, 42, 43, 44). Duyarlılık oranı oldukça yüksek olan SSCP metodunun, radyoaktif ve non-radyoaktif olmak üzere farklı uygulamaları geliştirilmiştir(44, 45).

Araştırmamızda SSCP metodu ile NF1 geninin downstream ucunda 45. ve 48. Ekzonları içeren bölgede mutasyon taramayı amaçladık. Çalışma için oldukça güvenilir ve ucuz bir yöntem olan "Gümüş Boyama" ile SSCP Analizini uygun bulduk. Böylelikle radyoaktivite gibi önemli bir problem de ortadan kaldırılmış oldu.

Ras proteinleri ile etkileşim gösterdiği bulgularan NF1 gen ürünü olan "Nörofibromin" in, GAP ile ilişkili bölgesi "GRD" (GAP Related Domain) önceden tanımlanmıştır.(8, 11, 13). Çalışmaların büyük bir kısmı Nörofibrominin fonksiyonel bölgesi olan GRD bölgesinde odaklanmaktadır. SSCP ve Heterodubleks analizi gibi metodlarla bu bölgede birçok mutasyon ve bu mutasyonlar sonucu NF1-GRD fonksiyonel kaybı tanımlanmıştır(11).

NF1'li hastaların tümörlerinde (Shwannomalar) Nörofibromin seviyesinin azalması ve Ras-GTP miktarının artış göstermesi NF1'in bir "Tümör Supressör" olacağı düşüncesinin ortaya çıkmasına neden olmuş, NF1 için heterozigosite kaybı (LOH) çalışmaları yapılmıştır. NF1'li hastaların tümör DNA'larında LOH gösterilmiş ve NF1'in gerçek bir tümör supressör gen olduğu düşüncesi literatürde doğrulanmıştır(11, 29).

Bu bulgulardan sonra NF1 geni önem kazanmış ve bu gen için 54 mutasyon tanımlanmıştır(14).

Araştırmada öncelikle yapılması gereken NF1 ekspresyonunu gösterebilmek ve sonrasında SSCP analizini yapabilmektir.

Çalışmamıza tümör supressör gen olan NF1'in 3' ucuna yakın bölgede SSCP Analizini kullanarak mutasyon taramak için, RNA izolasyonu ile başladık.

Normal bireylerden ve NF1 hastası olan 3 bireyin lökositlerinden, ayrıca normal ve tümoral 7 kolon örneğinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Dokudan RNA izolasyonu çalışmasında, lenfosit oranla RNA degradasyonu fazla idi. Bunun nedeninin dokuyu parçalama sırasında, parçalama işleminin bistüri kullanılarak ve el manüplasyonu ile oldukça uzun sürede yapılabilmesi sonucu açığa çıkan RNaz'lar olabileceğini düşündük. Bununla birlikte GITC (Guanidinium isotiocyanate) metoduyla tek basamakta elde etmiş olduğumuz RNA'ların spektrofotometrik olarak saptanmış saflık değerleri literatüre uygun bulunmuştur (1.5, 1.6).

Mutasyon RNA izolasyonunu takiben, Ters Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu için, "Random Heksamer" ve "Spesifik 3' antisense primer" ler ile iki ayrı RT Reaksiyonu kuruldu. 3' antisense primerlerden 3' Beta Aktin ve diğer 3' antisense NF1 primerleri kullanıldı. RT Reaksiyonunun kontrolü için, "Beta Aktin PCR" kuruldu. Spesifik primerler ile yapılan RT sonrası Beta Aktin PCR ile random heksamer çalışması, agaroz jel elektroforezindeki bantlarla değerlendirildi.

Spesifik primerler ile yapılan çalışmada bant kalitesi oldukça yüksekti ve bundan sonraki RT Reaksiyonları için spesifik primerlerin kullanılması uygun görüldü.

NF1 geni için PCR amplifikasyonunda, farklı NF1 primer kombinasyonunu kullanarak ilk NF1 RT-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Ancak ilk amplifikasyonlarda agaroz jel elektroforezinde herhangi bir bant izlenemedi. İlk PCR ürünleri üzerinden ikinci kez PCR kurularak reaksiyon gerçekleştirildi. İkinci amplifikasyon sonrası NF1 bantları agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi.

SSCP Analizi için 48. Ekzon üzerinden K4P2 primerleri ile 135 bp'lik ve 45-48. Ekzonlar üzerine oturan K3P2 primerleri ile 356 bp'lik amplifikasyon ürünleri kullanıldı.

Düşük akımda uzun süreli elektroforezin SSCP Analizi için uygun olduğu denemeler sonucu gözlemlendi. +4 °C'de, 3 W'da ve 7 saat içinde elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin ardından AgNO₃ ile boyama sonrası, elektriksel yüke bağlı olarak tek iplikli cDNA'lar çift bant halinde jelin üst kısmında, denatüre olmamış çift iplik cDNA'lar ise tek bant şeklinde "marker" ile karşılaştırıldığında, olması gereken yerde izlendi.

SSCP Analizinde ısı ve formamid ile denatüre edilmiş olan cDNA'ların tekrar birbiriyle birleşmesine (annealing) izin vermeden hemen jele yüklenmesine dikkat edildi. Aksi takdirde jel üzerinde tek iplikli cDNA'ları görmemiz imkansızlaşmaktaydı. Elektroforez öncesi "pre-run" (Yükleme öncesi elektroforez) yapılması ve jelin soğuması için zamanın oldukça önem taşıdığı bulgularıdır.

SSCP Analizi yapılan lenfosit ve kolon örneklerinde, denatüre edilerek tek iplik haline gelmiş olan cDNA'lar çift bant şeklinde izlendi ve bu iki bant normal alleli ifade etmekteydi. Tümör örneklerinden birinde bu normal çift banta ilaveten ekstra iki bant daha görüldü. Bu ekstra iki bantın mutant allelden kaynaklandığı kanısına varıldı ve bu örneğin ikinci kez SSCP Analizi yapılarak deney sisteminin tekrar edilebilirliği ölçüldü ve ikinci çalışmada da aynı sonuca ulaşıldı.

Mutasyonun varlığı saptandıktan sonra bu mutasyonun nerede yer aldığı ve ne tür bir mutasyon olduğunu belirlemek için birçok literatürde de verildiği gibi "dizi analizi" nin yapılması gerektiği ortak sonucuna varıldı.

Mutasyon tarama çalışmalarında, ilgilendığımız gen bölgesine direk dizi analizi yaparak veya "Kimyasal Kesim" ya da "Heterodubleks Analiz" gibi zor olan metodlarla mutasyon araştırmaya çalışmak yerine, oldukça hassas ve kolay bir metod olan SSCP Analizini yapmak oldukça uygundur. Analizin ardından mutasyon bulunup bulunmadığı belirlendikten sonra "dizi analize" geçilmesi, hem zaman kazandırıcı hem de maddi açıdan laboratuvara kazanç sağlayıcı bir uygulamadır.

2. Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg A, Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, Collins FS and White R. cDNA Sequence and Genomic Structure of EVI2B, a Gene Lying within an Intron of the NF1 Gene. *Genomics* 9:445-460,1991.

3. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brezner A, Nicholson J, Mitchel AL, Brownstein BH, Collins FS. Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Disrupted in Three NF1 Patients. *Science* 249:181-186,1990.

4. Heon RA, Edverman LM, Fufes RA, Kam-Morgan LNW, Luce MC. Screening for Truncated NF1 proteins. *Nature Genetics* 8:218-219,1994.

5. Andersen LB, Ballinger R, Marchuk DA, Chang E, Guzman DH, Saulino AM, Cannon J, Wigler M, Collins FS. A Conserved Alternative Splice in the von Recklinghausen Neurofibromatosis Gene Produces Two Neurofibromin Isoforms, Both of Which Have GTPase-Activating Protein Activity. *Molecular and Cellular Biology* 13 No 1:487-497,1993.

6. O'Connell P, Cawthon R, Xu GF, Li Y, Viskochil D, White R. The Neurofibromatosis Type 1 Gene: Identification and Partial Characterization of a Putative Tumour Suppressor Gene. *J Dermatol* 19:831-834,1992.

7. Bellugi G, McCormick F. Differential Regulation of rasGAP and Neurofibromatosis Gene Product Activities. *Nature*351:576-579,13 June 1991.

8. Olowu E, McCormick F. Tumour Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer. Vol 15-Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

REFERANSLAR

1. Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, Coulter-Mackie MB, Singh SM, Jung JH : A Genetic Study of Neurofibromatosis Type(1NF) in South-Western Ontario.II A PCR Based Approach to Molecular and Prenatal Diagnosis Using Linkage. *J Med Genet* 30:363-368,1993.
2. Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg A, Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, Collins FS and White R: cDNA Sequence and Genomic Structure of EVI2B, a Gene Lying within an Intron of the NF1 Gene. *Genomics* 9,446-460,1991.
3. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchel AL, Brownstein BH, Collins FS: Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Distrupted in Three NF1 Patients. *Science* 249:181-186,1990.
4. Heim RA, Silverman LM, Farber RA, Kam-Morgen LNW, Luce MC: Screening for Truncated NF1 proteins. *Nature Genetics* 8:218- 219,1994.
5. Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS: A Conserved Alternative Splice in the von Recklinghausen Neurofibromatosis Gene Produces Two Neurofibromin Isoforms, Both of Which Have GTPase-Activating Protein Activity. *Molecular and Cellular Biology* 13:No 1,487-495,1993.
6. O'Connell P, Cawthon R, Xu G.F, Li Y, Viskochil D, White R The Neurofibromatosis Type 1Gene: Identification and Partial Characterization of a Putative Tumour Suppressor Gene. *J Dermatology* 19:881-884,1992.
7. Bollag G, McCormick F: Differential Regulation of rasGAP and Neurofibromatosis Gene Product Activities. *Nature*351:576-579,13 June 1991.
- 8.Olakis P, McCormick F: Tumour Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer. Vol.12.Cold Spring Harbor Labaratory Press, 1992.

9. Lowy DR, Zhang K, Declue JE, Willumsen BM: Regulation of p21ras Activity. *Cell* 7:11/12:346-351,1991.
10. Bollag G, McCormick F, Clark R: Characterization of Full-Length Neurofibromin: Tubulin Inhibits Ras GAP Activity. *The EMBO Journal* 12:5: 1923-1927,1993.
11. Viskochil D, White R, Cawthon R: NF1 Gene. *Annu Rev Neurosci* 16:183-205,1993.
12. Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J: Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356:713-715,23 April 1992
13. Rey I, Hall A: Tumour Suppressors and the Regulation of GTP-Binding Protein Activity. *Trends in Cell Biology* 3:39- 42,1993.
14. Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Krone W: Unequal expression of NF1 alleles. *Nature Genetics* 6: 331,6 April 1994.
15. Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M, Ponder MA, Huson S.M, Carey J, Fryer A, Mathew CGP, Barker DF, Ponder BAJ.: Paternal Origin of New Mutations in von Recklinghausen Neurofibromatosis. *Nature* 343:558-559, 1990.
16. Gasparini P, Grif A, Origone P, Coviello D, Antonacci R, Rocchi M: Detection of a Neurofibromatosis Type 1 Homologous Sequence by PCR. Implications for the Diagnosis and Screening of Genetic Diseases. *Molecular and Cellular probes* 7:415- 418,1993.
17. Hofman KJ, Boehm CD: Familial Neurofibromatosis Type 1: Clinical Experience With DNA Testing. *J Pediatrics* 120:394- 98,1992.
18. Viskochil D, Buchberg AM, KSu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, White R, O'Connell P: Deletion and a Translocation Interrupt a Cloned Gene at the NF1 Locus. *Cell* 62:187-192,1990.

19. Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A, Park S, Boguski M, Jacks T, Wood DL, Jove R, Collins FS: NF1 Gene Product Associates with Microtubules. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 19(3):265-274,1993.
20. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA: Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nature Genetics* 7: 353-361, 7 July 1994.
21. Trahey M, McCormick F: A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-ras p21 GTPase, but Dose Not Affect Oncogenic Mutants. *Science* 542-545, 23 October 1987.
22. DeClue JE, Cohen B.D, Lowy DR: Identification and Characterization of the Neurofibromatosis Type 1 Protein Product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9914-9918,1991.
23. Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R: The NF1 Gene Encode a Protein Related to GAP. *Cell* 62:599- 08,1990.
24. Stark M, Assum G, Kaufmann D, Kehrer H, Krone W : Anaysis of Segregation and Expression of an Identified Mutation at the NF1 Locus. *Hum Genet* 90:356-359,1992.
25. Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Schwenk K, Krone W: A Deletion in 5'-Region of the NF1 Gene. 94:97-100,1994.
26. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127, 10 January 1991.
27. Ainsworth PJ, Rodenhiser DI, Costa MT: Identification and Characterization of Sporadic and Inherited Mutations in Exon 31 of the NF1 Gene. *Hum Genet* 91:151-156,1993.
28. Wallace MR, Andersen LB, Saulino A, Gregory PE, Glover TW, Collins FS: A de novo Alu insertion results in Neurofibromatosis type 1. *Nature* 353: 864-866, 31 October 1991.

29. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 1:677-696, International Edition, 1995.
30. Nakai H, Misawa S, Horiike S, Taniwaki M, Seriu T, Shizamaki C, Fujii H, Maekawa T, Furukawa T, Abe T, Ishizaki K, Kashima K: Analysis of Mutations and Expression of GAP-Related Domain of the NF1 Gene in Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. *Leukemia* 8: No.6 1027-1033, 1994.
31. Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R: A Major Segment of the NF1 Gene: cDNA Sequence, Genomic Structure, and Point Mutations. *Cell* 62:193-201, 1990.
32. Al-Alawi N, Xu G, White R, Clark R, McCormick F, Feramisco JR: Differential Regulation of Cellular Activities by GTPase Activating Protein and NF1. *Molecular and Cellular Biology* 13(4):2497-2503, 1993.
33. Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS: A Conserved Splice in the von Recklinghausen Neurofibromatosis Gene Product Two Neurofibromin Isoforms, Both of Which Have GTPase-Activating Protein Activity. *Molecular and Cellular Biology* 13(1):487-495, 1993.
34. Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F: Loss of the Normal NF1 Allele From The Bone Marrow of Children With Type 1 Neurofibromatosis and Malignant Myeloid Disorders. *The New England Journal of Medicine* 330(9): 597-601, 1994.
35. Nakamura T, Nemato T, Arai M, Yamazaki Y, Kasuga T, Gutmann DH, Collins FS, Ishikawa T: Specific Expression of the NF1 Gene in the Hamster Schwann Cell. *American Journal of Pathology*. 144(3):549-555, 1994.
36. Slater RJ: Experiments in Molecular Biology. Humana Pres. Clifton, New Jersey, 1986.
37. *Methods in Enzymology*. 152: 219-226, 1987.

47. Chaubey P, Bautista D, Beahar J: An Improved Method for Rapid Screening of DNA Mutations. *Biotechniques* 16(4):586-588, 1994.
38. RT-PCR Assay for Detection of Transcripts from Very Few Cells Using Whole Cell Lysates. *Biotechniques* 16(4): 586-588, 1994.
48. Enhanced SSCP Detection of Point Mutations Utilizing Methylmercury Hydroxide. *Biotechniques* 17(3):490-496, 1994.
39. Pfeffer U, Fecarotta E, Vidali G: Efficient One-Tube RT-PCR Amplification of Rare Transcripts Using Short Sequence-Specific Reverse Transcription. *Biotechniques* 18(2):204-205, Feb, 1995.
49. Miller DE: Comparative Sensitivity of Alternative SSCP Methods. *Biotechniques* 17(3):490-496, 1994.
40. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR Protocols A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990.
50. J. SSCP Analysis is a rapid and Effective Method for the Identification of Mutations and Polymorphisms in the Gene for Glycoprotein IIIa. *Blood* 83(8):2118-2122, 1994.
41. Sheffield VC, Beck JS, Kwiyeck AE, Sandstrom DW, Stone EM: The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16:325-332, 1993.
51. C. Silver. *Promega Notes Magazine* 45: 13-18, 1994.
42. Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM: Limitation in the use of SSCP analysis. *Mutation Res* 288:85-92, 1993.
52. C. Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159, 1987.
43. Spinardi L, Mazars R, Theillet C: Protocols for an Improved Detection of Point Mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research* 19(14):4009, 1991.
53. C. Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques* 15(3):532-536, 1993.
44. Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB: Diagnostic Single Strand Conformational Polymorphism. (SSCP): A simplified Non-Radioisotopic Method As Applied to a Tay-Sachs B1 Variant. *Nucleic Acids Research* 19(2):405, 1991.
54. B. 45. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM: Cold SSCP: A Simple, Rapid and Non-Radioactive Method for Optimized SSCP Analysis. *Nucleic Acids Research* 21(16):3637-3642, 1993.
46. D-Dworniczak B, Brömmelkam L, Bulles J, Horst J, Böcker WW: Non-Isotopic Detection of Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP): A Rapid and Sensitive Technique in Diagnosis of Phenylketonuria. *Nucleic Acids Research* 19(9):2500, 1991.

47. Chaubert P, Bautista D, Benhattar J: An Improved Method for Rapid Screening of DNA Mutations by Nonradioactive SSCP Procedure *Biotechniques* 15(4):586,1993.
48. Enhanced SSCP Detection of Point Mutations Utilizing Methimercury Hydrokside. *Biotechniques* 15(3),1993.
49. Vidal-Puig A, Moller DE:Comparative Sensitivity of Alternative SSCP Methods.*Biotechniques* 17(3):490-496,1994.
50. Jin Y, Dietz HC, Nurden A, Bray PF: SSCP Analsis is a rapid and Effective Method for the Identification of Mutations and Polymorphisms in the Gene for Glycoprotein IIIa. *Blood* 82(8):2281-2288,1993.
51. C-Anolless G, Gresshoff PM: Staining with Silver. *Promega Notes Magazine* 45: 13-18, 1994.
52. Chomczynski P, Sacchi N: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Choloroform Ekstraktion. *Analytical Biochemistry* 162:156-159,1987.
53. Chomczynski P: A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques* 15(3): 532-536, 1993.
54. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition 1:7.43-7.45.,1989.
55. Michael AI, Gelfand DH, Sninsky JJ: *PCR Strategies*. Academic Press, USA, 1995.