

**T.C TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRK TOPLUMUNDA MULTİPLE SKLEROZ HASTALIĞINDA  
ETKİLİ OLABİLECEK GENLERİN BİLİNEN VE *DE NOVO*  
MUTASYON TARAMASI**

**HAZIRLAYAN  
BURAK YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ**

**ANKARA 2014**



**T.C TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRK TOPLUMUNDA MULTİPLE SKLEROZ HASTALIĞINDA  
ETKİLİ OLABİLECEK GENLERİN BİLİLEN VE *DE NOVO*  
MUTASYON TARAMASI**

**HAZIRLAYAN  
BURAK YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ**

**ANKARA 2014**

## ONAY

*Burak Yılmaz* tarafından hazırlanan “*Türk Toplumunda Multipl Skleroz Hastalığında Etkili Olabilecek Genlerin Bilinen Ve De Novo Mutasyon Taraması*” başlıklı bu çalışma, **09.01.2014** tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda *oybirliği* ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından *Anabilim* dalında *Yüksek Lisans* tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra Gündüz (Başkan)

.....

Prof. Dr. Mehmet Gündüz

.....

Doç. Dr. Hüsamettin Erdamar

.....

Yard. Doç. Dr. Muradiye Acar

.....

Yard. Doç. Dr. Ömer Faruk Hatipoğlu

.....

## **Bilimsel Etik Bildirim Sayfası**

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

02.01.2014

**BURAK YILMAZ**

## ÖNSÖZ

Bu tezin teorik altyapısının oluşturulmasında yardımcı olan başta tez danışmanım çok kıymetli Prof. Dr. Mehmet Gündüz olmak üzere değerli hocam Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Doç. Dr. Esra Gündüz'e, ön hazırlıkların ve deneylerin her aşamasının gerçekleştirilmesinde yüksek fedakarlıklarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım başta Kübra Erdoğan, Seda Şengül olmak üzere Gökhan Nas, Esin Demir, Hacer Esra Gürses, Onur Bender'e verilerin analiz edilmesi ve yorumlanmasında katkı sağlayan Ar. Gör. Dr. Eyyüp Üçtepe'ye, çalışmalarım boyunca bilgi tecrübelerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Muradiye Acar'a, örneklerin toplanmasını organize eden ve yardımcı olan Gülhan Kaya ve Burcu Acar'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca gerek çalışma hayatımda gerekse güncel yaşamımda benden maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, yardımcı olan motivasyon ve moral kaynağım çok sevdiğim ve değer verdiğim eşim, kıymetlim Fazilet Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

## ÖZET

Burak Yılmaz. Türk Toplumunda Multipl Skleroz Hastalığında Etkili Olabilecek Genlerin Bilinen Ve De Novo Mutasyon Taraması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014.

Multipl Skleroz (MS) en yaygın merkezi sinir sistemi inflamatuvar hastalığıdır. Multipl skleroz 'un etiyolojisi bilinmemektedir. Büyük ihtimalle MS genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörlerin tetiklemesi ile ortaya çıkar. MS'deki genlerin ve çevrenin etkisi tam olarak anlaşılammıştır. MS'de etkili olan genler için pek çok GWAS (Genom Wide Association Study) yapılmıştır. Bu çalışmalara göre MS'den ilişkilendirilmiş varyasyonlar daha çok kromozom 6p21.3 deki MHC (Major Histocompatibility Complex) bölgelerinde tespit edilmişti ve bunlar HLA(Human Leukocyte Antigen) genleridir. Ayrıca MS HLA olmayan bölgelerde MS'le ilişkili genler keşfedilmiştir. Bunlar IL2RA, IL7R, CLEC16A, CD58, CD226, KIF1B, vb. genlerdir. IL2RA (interleukin Receptor 2 alpha) geni MS'le ilişkilendirilen ve HLA bölgesinde olmayan genlerden istatistiksel olarak en yüksek yatkınlık değerine sahip olan genidir. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri tabanında MS'le ilişkilendirilmiş varyasyonlar sadece IL2RA geninde bulunmaktadır. Bu açıdan IL2RA MS'de önemli bir yere sahiptir. Bu tezde IL2RA geninin 5 adet Türk MS hastalarında Yeni Nesil Dizileme(YND) yöntemleri kullanılarak tüm gen dizilemesi yapılması ve bilinen ve bilinmeyen varyasyonların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Hedef kapsamında gerçekleştirilen çalışmadan 5 adet hastanın 80 kb (kilo baz)'lık IL2RA geni ikişer kere dizilenmiş ve bütün varyasyonlar listelenmiştir. Bulunan bütün varyasyonlar dbSNP (database SNP)'e göre annotate edilmiş ve dbSNP 'de olmayanlar aday varyasyon olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre mRNA bölgesinde frameshift mutasyona sebep olan yeni bir aday varyasyon dahil olmak üzere pek çok SNP, indel ve *de novo* varyasyon tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Multipl skleroz, IL2RA, Yeni Nesil Dizileme, Varyasyon

## ABSTRACT

Burak Yılmaz. Known and *de novo* mutation screening of genes having role in Multiple Sclerosis in Turkish Population, Master Thesis, Ankara, 2014.

Multiple sclerosis (MS) is one of the central nervous system disorder and the most common inflammatory disease. MS's etiology is unknown. Most probably MS is triggered by environmental factors in genetically susceptible persons. Genes and environmental' roles in MS are not understood clearly. Lots of GWAS (Genome Wide Association Study) studies are done for genes related with MS. According to these studies genetic variations in MS mostly found in HLA (Human Leukocyte Antigen) genes part of MHC (Major Histocompatibility Complex) region of chromosome 6p21.3. Moreover, MS related genes also found in non- HLA regions. These genes are IL2RA, IL7R, CLEC16A, CD58, CD226, KIF1B, etc. IL2RA (interleukin Receptor 2 alpha) has highest relation with MS is the class of non- HLA MS related genes. There are only 2 variations in OMIM related with MS, and both of them are IL2RA variations. Therefore, IL2RA has a key role in MS. In this thesis we aimed to sequence of complete IL2RA gene in the 5 Turkish patients and to find known and unknown variations with the help of Next Generation Sequencing (NGS). To reach target we sequenced 5 patients 80 KB IL2RA gene two times and we listed all variations found. All variations found were annotated and all *de novo* variations determined according to dbSNP (database SNP). In results, we detect lots of *de novo* indel and SNPs including putative frameshift mutation in mRNA coding region. We will confirm all these variations by using Sanger sequencing.

**Keywords:** Multiple Sclerosis, IL2RA, Next Generation Sequencing, and Variations



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET .....	II
ABSTRACT .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
KISALTMALAR.....	VI
TABLolar DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
1. GİRİŞ.....	10
2. GENEL BİLGİLER.....	11
2.1. MULTİPLE SKLERoz .....	11
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ .....	11
2.1.2. RİSK FAKTÖRLERİ.....	12
2.1.3. KLİNİK SEMPTOMLAR VE BULGULAR .....	13
2.1.4. MS'İN SINIFLANDIRILMASI .....	14
2.2. MULTİPLE SKLERoz GENETİĞİ .....	15
2.2.1. MS'İN GENETİK TEMELLER .....	15
2.2.2. MS GENOMİKS.....	16
2.2.3. MS'DE GENETİK HETEROJENİSİTE.....	18
2.2.4. GENETİĞİN MS'DEKİ ROLÜ .....	19
2.2.5. MS'DEKİ AİLESEL RİSKLER .....	20
2.2.5.1. EVLATLIK ÇALIŞMALARI.....	20
2.2.5.2. YARI SİBLİNG.....	21
2.2.5.3. İKİZLER .....	21
2.2.5.4. KONJUGAL MS.....	22
2.2.5.5. AKRABA EVLİLİĞİ.....	22
2.2.5.6. MS'DE CİNSİYET ETKİSİ.....	23
2.3. MULTİPLE SKLERoz'DAN SORUMLU GENLER .....	23
2.3.1. HLA BÖLGESİ GENLERİ .....	23
2.3.2. HLA DIŞI GENLER VE GWAS ÇALIŞMALARI .....	24
2.4. IL2RA GENİ.....	26
2.4.1. IL2RA RESMİ İSMİ.....	26
2.4.2. IL2RA FONKSİYONU .....	27
2.4.3. IL2RA'DAKİ DEĞİŞİKLİKLER.....	27
2.4.4. IL2RA GEN LOKASYONU .....	28

2.4.5.	IL2RA GEN YAPISI.....	28
3.	MATERYAL VE METOD.....	30
3.1.	PRİMER TASARIMI .....	30
3.2.	HASTALARIN DNA İZOLASYONU .....	33
3.3.	KÜTÜPHANE HAZIRLAMA .....	38
3.3.1.	LONG PCR.....	38
3.3.2.	AMPLİKONLARDAN HAVUZ OLUŞTURMA , PARÇALARA AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA.....	40
3.3.3.	ION SHEAR™ PLUS REAKTİFİ İLE PARÇALAMA VE SAFLAŞTIRMA .....	41
3.3.4.	DNA PARÇALAMA .....	43
3.3.5.	PARÇALANAN KÜTÜPHANENİN SAFLAŞTIRILMASI.....	44
3.3.6.	ADAPTÖR BAĞLAMASI, ÇENTİK -TAMIRI , VE SAFLAŞTIRMA .....	45
3.3.7.	ADAPTÖR BAĞLAMASI VE ÇENTİK TAMİRİ .....	46
3.3.8.	ADAPTÖR BİRLEŞTİRİLMİŞ VE ÇENTİK DÜZELTİLMİŞ DNA'NIN SAFLAŞTIRILMASI.....	47
3.3.9.	ÇOĞALTILMAMIŞ KÜTÜPHANENİN BOYUT SEÇİMİ .....	48
3.3.10.	KÜTÜPHANE ÇOĞALTILMASI .....	52
3.3.11.	KÜTÜPHANE SAFLAŞTIRMASI .....	53
3.4.	KALIP (TEMPLATE) DNA HAZIRLAMA .....	53
3.5.	SEKANSLAMA.....	55
4.	BULGULAR VE ANALİZ.....	56
4.1.	PRİMER TASARIMI .....	56
4.2.	DNA İZOLASYONU .....	57
4.3.	KÜTÜPHANE HAZIRLAMA .....	58
4.4.	DNA PARÇALAMA GÖRÜNTÜLERİ .....	62
4.5.	SEKANS RAPORLARI.....	63
4.6.	ANALİZ.....	71
5.	SONUÇLAR.....	81
6.	TARTIŞMA.....	90
7.	KAYNAKLAR .....	93

**KISALTMALAR**

<b>Kısaltma</b>	<b>Açık Yazılış</b>
MS	Multipl Skleroz
GWAS	Genom Wide Association Study
MHC	Major Histocompatibility Complex
HLA	Human Leukocyte Antigen
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
IL2RA	İnterlökin Reseptör 2 alfa
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
İndel	Insertion-deletion
dbSNP	SNP database
YND	Yeni Nesil Dizileme
MLF	Medyal Longitudinal Fasikül
GİS	Gastro İntestinal Sistem
MBP	Myelin Basic Protein
IMSGC	Uluslararası MS Genetik Konsorsiyumu

## TABLolar DİZİNİ

TABLO 1: MHC OLMAYAN BÖLGELERDEKİ LINKAGE (BAĞLANTI) ANALİZİ[41].....	17
TABLO 2: SEÇİLMİŞ İKİZ ÇALIŞMALARI [67].....	22
TABLO 3 : BAZI MS RİSK GENLERİ DİĞER HASTALIK RİSK GENLERİ İLE ÇAKIŞABİLİYOR [76]. .....	25
TABLO 4: MS'DEN SORUMLU GENLER[89] .....	26
TABLO 5: ÖRNEK LONG PCR PROTOKOL İÇERİĞİ.....	39
TABLO 6: ÖRNEK LONG PCR PROTOKOL ŞARTLARI.....	39
TABLO 7: ÇALIŞILAN LONG PCR PROTOKOL İÇERİĞİ .....	40
TABLO 8: ÇALIŞILAN LONG PCR PROTOKOL ŞARTLARI .....	40
TABLO 9: KÜTÜPHANE VE ORTALAMA PARÇALAMA BOYUTU .....	41
TABLO 10: DNA PARÇALAMA REAKSİYON İÇERİĞİ .....	43
TABLO 11: DNA PARÇALAMA REAKSİYON ZAMANI.....	44
TABLO 12: ADAPTÖR BAĞLAMASI VE ÇENTİK TAMİRİ REAKSİYONU İÇERİĞİ .....	46
TABLO 13: ADAPTÖR BAĞLAMASI VE ÇENTİK TAMİRİ REAKSİYONU SICAKLIK VE ZAMAN .....	47
TABLO 14: AMPURE® XP REAKTİFİ HACMİ .....	47
TABLO 15: ÇOĞALTILMAMIŞ KÜTÜPHANİN BOYUT SEÇİMİ .....	48
TABLO 16: ÇOĞALTILMAMIŞ KÜTÜPHANENİN PİPİN PREP CİHAZINDA HEDEF PİK SEÇİMİ.....	50
TABLO 17: KÜTÜPHANENİN ÇOĞALTILMASI İÇİN REAKSİYON İÇERİĞİ.....	52
TABLO 18: KÜTÜPHANENİN ÇOĞALTILMASI İÇİN REAKSİYON KONDİSYONLARI.....	52
TABLO 19: KALIP DNA HAZIRLAMAK İÇİN GEREKLİ SOLÜSYONLAR.....	54
TABLO 20: TASARLANAN PRİMERLER.....	56
TABLO 21: HASTA DNA'SI İZOLASYON SONUÇLARI .....	57
TABLO 22: 3 NOLU HASTA VARYASYON SONUÇLARI.....	82
TABLO 23: 4 NOLU HASTA VARYASYON SONUÇLARI.....	85
TABLO 24: 5 NOLU HASTA VARYASYON SONUÇLARI.....	86
TABLO 25: 7 NOLU HASTA VARYASYON SONUÇLARI.....	87
TABLO 26: 8 NOLU HASTA VARYASYON SONUÇLARI.....	87
TABLO 27 : EN AZ ÜÇ ÖRNEKTE GÖRÜLEN VARYASYON TABLOSU .....	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1: MS'İN DÜNYA'DAKİ DAĞILIMI[5].....	11
ŞEKİL 2: MS'İN SINIFLANDIRILMASI .....	14
ŞEKİL 3: MHC BÖLGESİ[41].....	18
ŞEKİL 4: MS'İN BAĞIL RİSKLERİNİN ALELLERE GÖRE DEĞİŞİMİ[76].....	24
ŞEKİL 5: IL2RA GEN LOKASYONU .....	28
ŞEKİL 6: IL2RA GEN YAPISI[92] .....	28
ŞEKİL 7: IL2RA EKZON YAPISI[93] .....	29
ŞEKİL 8: ENSEMBLE VERİ TABANINDAN GEN REFERANS DİZİLİMİNE ULAŞILMASI .....	30
ŞEKİL 9: IL2RA GENİNİN BLOKLARA BÖLÜNMESİ.....	31
ŞEKİL 10: FAST PCR YAZILIMININ KULLANIMI.....	32
ŞEKİL 11: FAST PCR YAZILIMININ KULLANIMI.....	33
ŞEKİL 12: 3 VE 4 NOLU HASTANIN 1. SEKANS RAPORU .....	63
ŞEKİL 13: 3 VE 4 NOLU HASTANIN 1. SEKANS KALITE RAPORU .....	64
ŞEKİL 14: 3 VE 4 NOLU HASTANIN 2. SEKANS RAPORU .....	65
ŞEKİL 15: 3 VE 4 NOLU HASTANIN 2. SEKANS KALITE RAPORU .....	66
ŞEKİL 16: 5,7 VE 8 NOLU HASTANIN 1. SEKANS RAPORU .....	67
ŞEKİL 17: 5,7 VE 8 NOLU HASTANIN 1. SEKANS KALITE RAPORU.....	68
ŞEKİL 18: 5,7 VE 8 NOLU HASTANIN 2. SEKANS RAPORU .....	69
ŞEKİL 19: 5,7 VE 8 NOLU HASTANIN 2. SEKANS KALITE RAPORU.....	70

## RESİMLER DİZİNİ,

RESİM 1: 2. VE 3. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 1.,3., VE 7., BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	58
RESİM 2: 5. , 6., 7., VE 8. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 4.,5., VE 6., BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ .....	58
RESİM 3: 5. , 6., 7., VE 8. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 8.,9., VE 10. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	59
RESİM 4: 5. , 6., 7., VE 8. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 11. VE 12. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ .....	59
RESİM 5: 5. , 6., 7., VE 8. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 8.,9., VE 10., BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	60

RESİM 6: 3. VE 4. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 6. VE 7. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	60
RESİM 7: 1. , 2., 3., 4., 9., 10., 11., 12., 13., 14., VE 15. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 8.,9., VE 10. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ .....	61
RESİM 9: 11., 12., 13., 14., 15. VE 16. HASTALARIN DNA'SINDAN ÇOĞALTILAN 10. VE 11. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	61
RESİM 10: 1. , 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., VE 15. HASTALARIN DNA'INDAN ÇOĞALTILAN 11. VE 12. BLOKLARIN PCR GÖRÜNTÜLERİ.....	62
RESİM 11: BIORUPTOR CİHAZI VE ENZİMATİK PARÇALAMA SONRASI 1-8 HASTA GÖRÜNTÜSÜ.....	62

## 1. GİRİŞ

Multipl skleroz genç yetişkinlerde nörolojik fonksiyon kaybının en büyük sebebi olan ve dünyada 2.1 milyondan fazla insanı etkileyen bir hastalıktır. MS sebebi anlaşılamayan kompleks bir hastalıktır. MS’de immün sistem miyelin kılıflarına saldırır ve nörodejenerasyon komponentleri oluşturur. MS’in oluşumunda kompleks ağ oluşturan faktörler çevresel ve genetik faktörlerdir[1].

Hastalığa sebep olarak bulunan ilk genetik faktör 1970’lerde bulunan HLA (Human Leukocyte Antigen) lokusudur. Bu lokus kromozom 6’nın kısa kolunda MHC (Major Histocompatibility Complex) olarak adlandırılan bölgede bulunur. Bu bölgedeki genler immün sistemin anahtar parçalarından oldukça polimorfik hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlarlar.

Bu günlerde HLA tek başına MS’in genetik komponentlerini açıklamakta yetersizdir. HLA lokusunun hastalığın oluşturmaya ek olarak diğer HLA olmayan lokuslarında hastalığın karmaşıklığına çevresel, yaş ve cinsiyet faktörleri ile beraber katkıda bulunduğu belirlenmiştir.

HLA olmayan genlerden MS’le en fazla ilişkilendirilmiş gen IL2RA (interlökin 2 reseptör alfa) genidir. OMIM’de bu genle ilişkilendirilmiş intron bölgesinde bulunan 2 adet SNP rapor edilmiştir. Bu SNP’lerden başka MS’le ilişkilendirilmiş varyasyon OMIM’de bulunmamaktadır.

Bu sebeple bu tezde ülkemizde ilk defa IL2RA geninin Türk MS hastalarındaki varyasyonları Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Amacımızı gerçekleştirmek için 5 adet MS hastasının etik kurul izinleri dahilinde kanları toplanmış, genomik DNA’ları izole edilmiş ve IL2RA geninin bütün intron ve ekzon bölgeleri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan genler Ion Torrent yeni nesil dizileme makinesi ile ikişer defa dizilenmiş ve hastaların varyasyonları listelenmiştir.

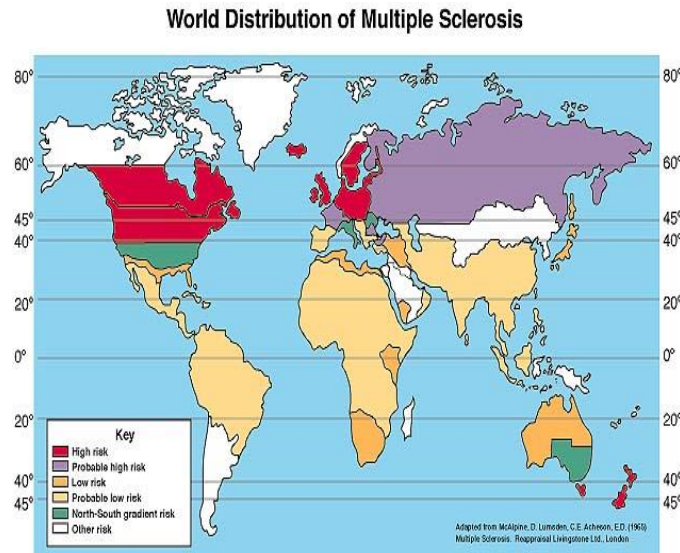
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MULTİPLE SKLEROZ

Multipl skleroz, doku hasarının çeşitliliğine bağlı olarak farklı klinik semptomların ortaya çıktığı bir hastalıktır. Genel olarak, tek bir lezyonla açıklanamayan nörolojik semptomlar bulunur. Klinik semptomların ortaya çıkışında temel olarak inflamasyon, demiyelinizasyon ve akson dejenerasyonu vardır [2, 3].

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Kadın erkek oranı 1.4-2.3 arasında değişmektedir. MS coğrafi enlem dairelerine göre değişik gösterir [4]. Kuzey ABD ve kuzey Avrupa'daki prevalansı daha fazladır. Her iki yarım kürede 65 derece enlemine kadar prevalans artmakta ve



**Şekil 1: MS'in Dünya'daki dağılımı[5]**



sonra tekrar azalmaktadır (Şekil 1). 2. Dünya savaşı sırasında epidemi şeklinde (16 milyon kişi) görülmüş ve bu epidemi sırasında MS in bir enfeksiyon hastalığı olduğu düşünülmüş ve o zamanın yeni tüberküloz ilacı olan izoniyazid ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Savaşta hasta olanların çoğunluğunun Danimarka, Norveç, İsveç, Finlandiya ve İsviçre vatandaşı olmaları dikkat çekmiş ve sonraki çalışmalarda kuzey Avrupa ülkelerine yönelilmiştir. Bu çalışmalar sırasında hastalığın coğrafik özelliklerden etkilendiği ve bunun göç edilen yaşa bağlı olduğu gösterilmiştir.

İlk 15 yaşından önce ve sonra göç eden gruplar karşılaştırıldığında; 15 yıldan fazla doğduğu ülkede yaşayanlarda doğduğu ülkenin etkisinin daha fazla olduğu, 15 yıldan az yaşayanları göç ettikleri ülkenin etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir [6].

Hem erkeklerde hem kadınlarda görülmektedir, oran K/E = 2:1 şeklindedir. Ortalama pik yaşı 25-34 yaş arasında değişmektedir. İnsidansı yıllar geçtikçe artmaktadır [7].

### 2.1.2. Risk faktörleri

**İmmün sistem stimülasyonu:** Hastalığın kendisi immün sistemle ilgili olduğu için aşı gibi immün sistemi tetikleyen durumların hastalığa sebep olabileceği üzerine hipotezler kurulmuş ancak anlamlı bir sonuç alınamamıştır [8, 9].

**Viral enfeksiyonlar:** HBV, EBV, VZV ile ilişkili olabileceği ile ilgili çalışmalar yapılmış, arada bazı ilişkiler gösterilmişse de ileriki çalışmalara gerek duyulmaktadır [10-12].

**Coğrafi faktörler:** Coğrafi bölgelere göre değişen insidans ve prevalansı vardır. Kuzey ülkeler ve beyaz ırkta risk daha fazladır. Amerika'daki insidansı 100/100.000'dür [13].

**Güneş ışığı ve D vitamini:** D vitamini takviyesi alan kadınlarda risk anlamlı oranda düşmektedir [14].

**Diğer çevresel faktörler:** Doğum ayı ile ilişkili çeşitli çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmaya göre Nisan, Mayıs ayında doğanlar en yüksek riske; Ekim, Kasım ayında doğanlar en düşük riske sahiptirler [15].

**Genetik faktörler:** Ayrıntılı olarak diğer bölümde incelenecektir.

### 2.1.3. Klinik semptomlar ve bulgular

**Optik nörit:** Optik nörit en yaygın göz tutulumudur. Genellikle akut ya da sunakta başlangıçlı tek taraflı ve ağrıyalım başlayan tutulum vardır. (125) çeşitli derecelerde etkilenmiş santral görme kaybı mevcuttur [16]. Fizik muayenede Marcus Gunn Pupili vardır. Fundoskopide optik disket ödem olabilir. Bilateral optik nörit MS de sık görülen bir bulgu değildir. Eğer tutulum bilateralse ayırımı tanımak diğer hastalıklar düşünülmelidir.

**İnternükleer oftalmopleji:** MLF( medial longitudinal fasikül) lezyonuna bağlı oluşan horizontal bakış defektidir. Göz laterale baktığında diğer gözün 6. Siniri uyarılamadığı için iki göz birbirinden bağımsız olarak hareket eder.

**Duyusal semptomlar:** Neredeyse bütün MS Hastalarında görülen bir bulgudur. Spinal korddaki duyu yollarındaki lezyonlara bağlı olarak gelişir.

Hastaların genel şikayetleri; yanma, batma, karıncalanma, uyuşma şeklindedir. Alt torasik ve abdominal bölgelerde radiküler ağrı da görülebilir.

**Lhermitte fenomeni:** Boyunun fleksiyonula tetiklenip, elektrik şoku gibi yayılan geçici duysal semptomlardır [17].

**Motor semptomlar:** Tutulan yere bağlı olarak parastezi, parapleji, spastisite görülebilir.

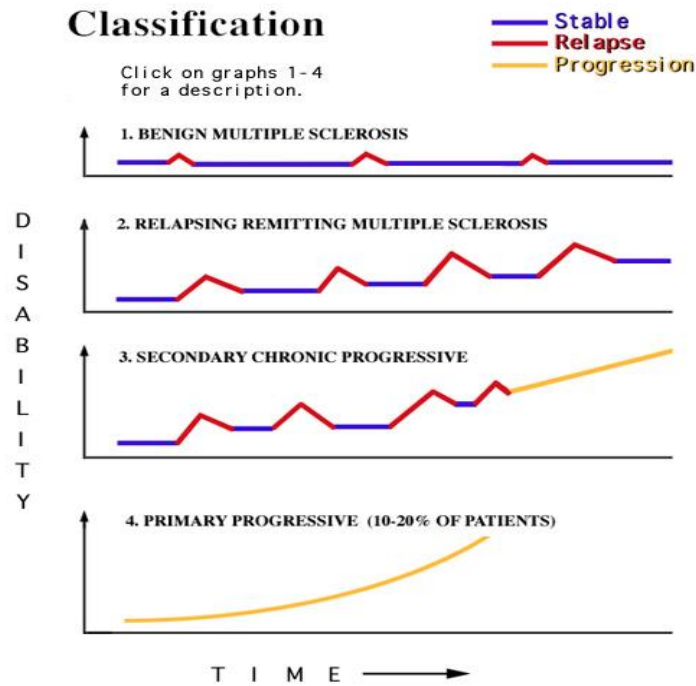
**Depresyon:** Hastaların 2/3 ünde görülmektedir.

**Epilepsi:** MS hastalarındaki sıklığı topluma göre daha fazladır.

Ana bulgular bunlar olmakla beraber, vertigo, nistagmus, halsizlik, GİS(Gastro İntestinal Sistem) semptomları, koordinasyon bozuklukları gibi çok çeşitli tablolar ortaya çıkabilir.

#### 2.1.4. MS'in sınıflandırılması

- A. Relaps ve remisyonlarla giden- kalıcı sekel yoktur ve remisyon döneminde hastalık ilerlemez. MS in %85-90 in bu şekilde başlar. Bu hastaların çoğu ilerleyen dönemlerde sekonder progresif e dönüşür (Şekil 2).
- B. Sekonder progresif- relapsing remiting olarak başlayan hastalığın ilerleyip



Şekil 2: MS'in sınıflandırılması

plato çizerek ilerlemesidir. Belirgin bir atak olmadan tablo gittikçe ilerler.

- C. Primer progresif- hastalığın %10 U bu şekilde başlar. Özellikle ileri yaşlarda başlayan MS de daha siktir. Akut atak olmadan gittikçe ilerleyen bir tablo vardır.
- D. Progresif relapsing - progresif olarak devam eden tablo içinde belirgin atakların olduğu ve ataklardan sonra iyileşme olarak ya da olmadan hızla ilerleyen tablodur [18].

## **2.2. MS GENETİĞİ**

### **2.2.1. MS'in genetik temeller**

Genler kalıtımın birimleridir. Genler uzun spiral molekül olan DNA'nın parçalarıdır. Her bir gen bir kromozomda lokus adı verilen spesifik bir yer işgal eder ve her bir kromozom pek çok gen içerir [19]. İnsanlardaki farklı kromozomlar tahmini olarak 30,000-40,000 gen bulundurur. Bu gen setlerinin bütününe insan genomu denir. Pek çok gen ikiden fazla alele sahiptir ve aleller genlerin farklı formlarıdır [20].

İnsanlarda majör histokompatibilite kompleksi (MHC) olarak bilinen kromozom 6'daki gen kümesi insan lenfosit antijenlerini (HLA genleri) üretir. Örneğin, başarılı organ transplantasyonları ve deri greftleri alıcı ve vericilerin histokompatibilite antijenlerinin uyumuna bağlıdır. HLA'lar beyaz kan hücrelerinin yüzelelerinde bulunan proteinlerdir ve immün yanıtta rol oynarlar. HLA kompleksi pek çok gen kümesinden oluşur. Bunlardan bir tanesi sınıf I 'dir, HLA-A, HLA-B ve HLA-C'yi içerir. Bu kümenin komşusu sınıf II 'dir, HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP'yi içerir. Her birimiz kromozom 6'nın iki adet kopyasını taşıdığımız için hepimizde iki HLA haplotipi bulunur [21].

Ayrıca, pek çok alel kombinasyonu mümkün olduğundan herhangi iki kişinin mükemmel HLA uyumu göstermesi nadirdir. İkizler bundan istisnadır ve aynı HLA haplotipine sahiptirler, kardeşlerde %25 eşleşme şansına sahiptirler.

HLA alellere özgü sekanslar immün sistemin antijenlere yanıt verme kabiliyetlerini belirler. HLA sistemleri antijenlerin kendisine ait olup olmadığını belirler. Böylece HLA sistemindeki fonksiyon bozuklukları otoimmün hastalıklara sebep olur. Araştırmacılar belirli HLA alelleri ile MS gibi spesifik otoimmün hastalıkları arasında ilişki keşfetmişlerdir. Bu hastalıklar büyük ihtimalle HLA ve HLA olmayan etkilerin çevresel aktivasyonlarının sonucu oluşur ör; enfeksiyon [22]. DNA sekanslarındaki varyasyonlar kişiye özeldir ve sonraki nesle aktarılır. Bazı hastalıklar tek gen varyasyonlarıyla meydana gelir ve kalıtılır. MS ise pek çok gen tarafından tetiklenen bir hastalıktır.

### **2.2.2. MS genomiks**

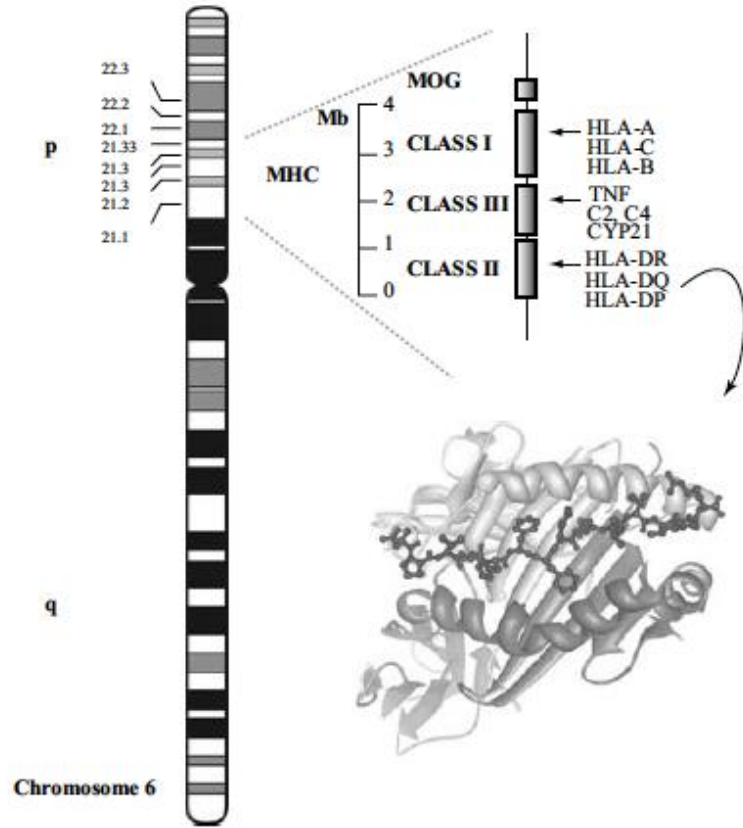
MS'li hastalardaki genetik çalışmalar son 25 yılda US, UK ve Kanada'daki çoklu etkilenen ailelerde mikrosatellit tabanlı üç farklı tüm genom 10cM taramalarına yoğunlaştı [23-25]. Taramaların konfirmasyonu 830 kardeş çiftinde 4500 tek nükleotitli değişim (SNP) markörleri üzerinden tamamlandı. Bu çalışmalarla beraber 60 genomik bölgenin potansiyel olarak hastalık şüphesine katkıda bulunduğu ve MS'in çok genli bir hastalık olduğunu gösterdi. 700'ün üzerinde MS ailesinin üzerinde yapılan 11 farklı çalışmanın meta-analiz verilerine göre bağlantı haritası (linkage map) çıkartıldı (tablo 1) [23-40].

<i>Chromosome</i>	<i>NPL</i> ( <i>n</i> = 719)	<i>NPL*</i> ( <i>n</i> = 633)	<i>MLS*</i> ( <i>n</i> = 633)	$\lambda_c^*$
2p14	1.5	2.1	1.4	1.13
10p15	1.9	2.1	1.9	1.13
11ptr	2.1	2.2	1.9	1.30
16p13	2.1	2.2	1.8	1.12
17q21	2.3	1.8	1.1	1.14
22q13	2.4	2.1	1.2	1.17

**Tablo 1: MHC olmayan bölgelerdeki Linkage (Bağlantı) Analizi[41]**

Bu analizlerden istatistiksel öneme sahip eşik değerini aşan bağlantılar sadece kromozom 6p21.3 deki MHC bölgelerinde tespit edildi ve HLA sınıf II *DR2* Haplotipi ( *HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602*) konfirme edildi [23-40, 42-46]. İlginç olarak HLA-DR2 kopya sayısının hastalık riski üzerindeki etkisi de keşfedildi [23, 24, 26-39, 42-48]. *HLA-DRB1*'in MS şüphesindeki birincil rolü patogeneze modeli ile konsistent olmasıdır, bu model T-Hücre destekli myelin temel proteini (MBP) nindeki 85-89 'uncu peptitlerine karşı otoimmün cevabına katkıda bulunur [49-51].

*DRβ1501* 'in kristal yapısı diğer *DR2* ilişkili olmayan *DRβ* moleküllerin peptit bağlanma domainlerinin ligandlardaki aromatik rezidülerin büyük hidrofobik P4 ceplerini tercih etmesi sebebi ile farklıdır [52]. MBP için bu cep öncelikli olarak aromatik yan zincirli Phe92 ile doldurulur, bu yan zincir önemli primer çapa (anchor) olarak rol oynar ve *HLA-DRα0101/DRβ1501*'ya ve yüksek afinite ile bağlanmadan sorumludur.



Şekil 3: MHC bölgesi[41]

### 2.2.3. MS'de genetik heterojenite

MS'i tam olarak anlamak lokus heterojeniteyi kavramaktan geçmektedir, lokus heterojenite farklı genlerin farklı kişilerin aynı ya da benzer çeşit hastalıklara sebep olmasıdır. Bir çalışmada 184 çoklu vakalı US MS ailelerinde *HLA-DRB1* lokusu ile bağlantı (linkage) ve spesifik DR2 haplotipi (*DRB1\*1501*, *DQB1\*0602*) ile güçlü ilişki konfirme edildi [23, 24, 26-35, 37-40, 42, 44-46].

Dikkat çekici olarak bütün bağlantı (linkage) bilgileri ve ilişki delilleri en az bir üyesi bulunan *DRB1\*1501* taşıyan ailelerden elde edildi. Klinik olarak ayırt edilemeyen *DRB1\*1501* negatif aile setlerinden HLA lokusunun hiçbir genetik etkisi fark edilemedi. Aslında *DRB1\*1501* negatif ailelerde *HLA-DRB1* civarındaki 20cM

bağlantısı hariç tutulan sonuçlar gösteriyor ki MS’de HLA lokusunda heterojenite bulunmaktadır [35].

#### 2.2.4. Genetiğin MS’deki Rolü

Genetik faktörler bireylerin immün sistemlerini ve bu sistemlerin yabancı antijenlere yanıtlarını etkiler. Genler bireylerin hücrelerindeki MHC moleküllerinin çeşitliliğini belirler. Ayrıca genler T hücrelerindeki T hücre reseptör dizilerini etkiler. Bazı MHC genleri MS’le doğrudan ilişkilidir [53]. Fakat genler kişinin MS şüphesindeki tek faktör değildir. Örneğin hastalık ilişkili MHC molekülleri taşıyan her birey MS’ yakalanmaz [24, 54]. Çalışmalar gösteriyor ki kromozom 12 bulunan interferon gama genindeki varyantlarda MS şüphesiyle ilişkili olabilir [55]. Bu varyantlar erkeklerde ve bayanlarda farklı olarak bulunur ve MS bayanlarda yüksek prevalansta bulunur [55]. 1996 yılında araştırmacılar genomdaki 20 lokasyonun MS’le ilişkili olduğu bulundu [56]. Sonuç olarak, araştırmacılar inanıyor ki spesifik gen kombinasyonu kalıtılırsa bireylerde MS şüphesi gelişebilir [53].

Epidemiyolojik bulgular destekliyor ki MS’de poligenik kalıtım yatkınlığı göstermekte. İnsan lökosit antijeni (HLA) DR2 taşıyıcılığı MS riskini artırmaktadır. HLA-DR2 MS’deki kesin genetik ilişkilerden bir tanesidir. Kuzey Avrupa’daki MS hastalarının %60 ‘ı DRB1-1501 (DR2 haplotipi) pozitifdir sağlıklı bireylerde ise bu oran %30’dur. Sonuç olarak HLA-DR2 alel kümesi ile ilişkilidir ve MS geliştirme riskini %30 oranında artırmaktadır. Bu haplotip için risk düşüktür MS gelişimi için ne yeterli nede gereklidir [57]. HLA-DR2’nin varlığını tespit için kan testi vardır. Fakat bu test verilerin güvenilir olmamasından dolayı klinikte rutin olarak önerilmemektedir.

MS bayanlarda erkeklerden iki kat fazla görülür [19]. Son çalışmalarda interferon gama ekspresyonunun cinsiyete göre değiştiği gözlenmiştir. İnterferon gama  $\gamma$  MS’de kötüleştirici bir etkiye sahiptir. İnterferon Gama’nı ekspresyonunu



etkileyen varyantlar MS şüphesini etkiler ve değişik hastalıklara sebep olur. Genel olarak yüksek interferon gama ekspresyonu yüksek MS şüphesine göre artan Th-1 hücre yanıtına sebep olur. Bu çalışma erkeklerde yüksek interferon gama seviyesine sebep olan varyantlar erkeklerde daha az görülür [55]. Sonuç olarak interferon gama genindeki polimorfizimler farklı MS hassasiyetlerine katkıda bulunur.

MHC genleri dışında MS analizleri son zamanlara kadar çok da başarılı değildi. Eski yıllardaki çalışmalar ikna edici aşamalardan uzak veriler hayal kırıklığı oluşturdu ve veri uyumsuzlukları tartışmalara yol açtı [58]. Şimdilerde ilişkili genlerin belirlenmesinde iki önemli konu kafa karışıklığına yol açmakta makul ölçüde etkilerin bireysel loci'lere katkısı ve yüksek ölçekli genom verilerinden ortaya çıkan başarısız istatistiksel sonuçlar [59]. MS'de ilişkili genleri bulmak samanlıkta iğne aramaya benzetilebilir

### **2.2.5. MS'deki Ailesel Riskler**

Genetik faktörlerin MS'de rollerinin olduğu düşüncesi 1980ler de ailesel agregasyonun tanımlanması ile başladı [60, 61]. İlk genetik ilişki HLA sınıf I antijenleri olarak 1972'de rapor edildi [62, 63]. Fakat, 30 yıl boyunca sistematik genetik epidemiyolojik ve moleküler genetik çalışmalar önemli yok kat etse de rağmen hala MS'in gerçek etiyolojisini, çevrenin ve genlerin ilişkileri tam olarak anlaşılamadı.

#### **2.2.5.1. Evlatlık Çalışmaları**

Elimizdeki en iyi bilgilere göre MS'deki evlatlık çalışmaları ve yarı sibling çalışmaları bu çeşit bir otoimmün hastalık da ki tek çalışmadır. Evlatlık çalışmalarındaki sonuçlar gösteriyor ki çocukluğundan veri MS'li evlat edinen akrabalar tarafından yetiştirilenler genel popülasyona göre daha fazla MS' e

yakalanmıyorlar. Bu veriler gösteriyor ki MS'in ailesel agregasyonu çevre paylaşımından daha çok genetik paylaşım ile ilişkilidir [42]

### **2.2.5.2. Yarı sibling**

Yarı sibling deki rekürrens risk çalışmaları kompleks özelliklerdeki ebeveyn spesifik etkisinin genetik ve çevresel varlığını test etmek için güçlü bir metottur [64, 65]. Rekürrens riskleri karşılaştırmadaki verilerin ayrımı için bu çalışmalarda örnek sayısı oldukça yeterlidir [27]. Yarı sibling çalışmalarda sonuçlar gösterdi ki genetik paylaşımındaki ve ailesel olmayan çevredeki evlatlık verileri hastalığı ailesel agregasyonu için önemlidir [27]. Ayrıca veriler gösterdi ki yarı sibling rekürrens riski (1.32%) aynı ailedeki tam sibling rekürrens risk (3.46%) 'den önemli ölçüde düşüktür.

### **2.2.5.3. İkizler**

Klasik ikiz çalışmaları çevre ve genetiğin katkısını ayırmak için ilk olarak Galton tarafından önerilmiştir [66]. Popülasyon tabanlı çalışmalarda görüldü ki monozigotik konkordans dizogotik konkordansa göre oldukça fazladır (Tablo 2).

Reference	Pairwise monozygotic twin concordance	Pairwise dizygotic twin concordance
Thums, 1939 <sup>28</sup>	0/14	1/36 (2.8%)
Bammer et al, 1960 <sup>21</sup>	1/6 (16.7%)	2/7 (28.6 %)
Mackay and Myrianthopoulos, 1966 <sup>20</sup>	6/36 (16.7%)	3/26 (11.5 %)
Cendrowski, 1968 <sup>22</sup>	--	0/3
Gardner-Thorpe and Foster, 1975 <sup>23</sup>	0/1	--
Bobowick et al, 1978 <sup>24</sup>	2/5 (40%)	0/4
Williams et al, 1980 <sup>25</sup>	6/12 (50%)	2/12 (16.7%)
Cumler and Eldridge 1982 <sup>26</sup>	8/22 (36.4%)	3/29 (10.3%)
Heitberg and Holm, 1982 <sup>27</sup>	4/19 (21.1%)	1/28 (3.57%)
Kinnunen et al, 1987 <sup>28</sup>	1/11 (9.1 %)	0/10
Kinnunen et al, 1988 <sup>29</sup>	2/7 (28.6 %)	0/6
French Research Group, 1992 <sup>30</sup>	1/17 (5.9 %)	1/37 (2.7%)
Mumford et al, 1994 <sup>31</sup>	11/44 (25%)	2/61 (3.3%)
Willer et al, 2003 <sup>32</sup>	24/133 (18.0%)	9/221 (4.1%)
Total	62/308 (20.1 %)	23/452 (5.1%)

**Tablo 2: Seçilmiş ikiz çalışmaları [67]**

#### 2.2.5.4. Konjugal MS

Kanada'da ki çalışmalarda görüldü ki her iki ebeveynin de MS olduğu vakalardaki çocukların MS' e yakalana riski (30.5%) tek bir ebeveynin MS olduğu çocukların riskine (2.49%) göre oldukça fazladır. Kanada verileri gösterdi ki 13.000 MS'li eşin hastalık ilerleme hızı genel popülasyon riskine göre çok farklı değildir. Bu verileri İkizler, yarı sibling ve evlatlık çalışmalarında ki bütün verilerle birleştirince görülüyor ki MS'in normal bir ailedeki geçişinin çocukluk ve yetişkinlik dönemindeki değişkenliğini destekleyen deliller yeterli değildir [27, 36, 42].

#### 2.2.5.5. Akraba Evliliği

Beyaz ırklarda akraba evliliği yaygın değildir. Akraba evliliğindeki çocukların rekürrens risklerinin popülasyon tabanlı çalışıldığı bir araştırma gösteriyor ki anne

babası akraba evliliği yapmış çocukları rekürrens riski akraba evliliği yapmamış ebeveynlerden 4 kat daha fazladır [68].

#### 2.2.5.6. MS’de cinsiyet etkisi

Bayanlarda MS’ görülme sıklığı erkeklere göre 2 kat daha fazladır [69]. Bu oran buluşdan önceki oranda artar ve coğrafyaya göre farklılık göstermektedir. Fakat erkeklerdeki hastalık ekspresyonu en az 25-35 yaşlarında ki bayanlardan daha fazladır [70]. Mikrokimerizm MS şüphesini artırır ve cinsiyet eğilimli MS’le direk ilişkisi vardır [71].

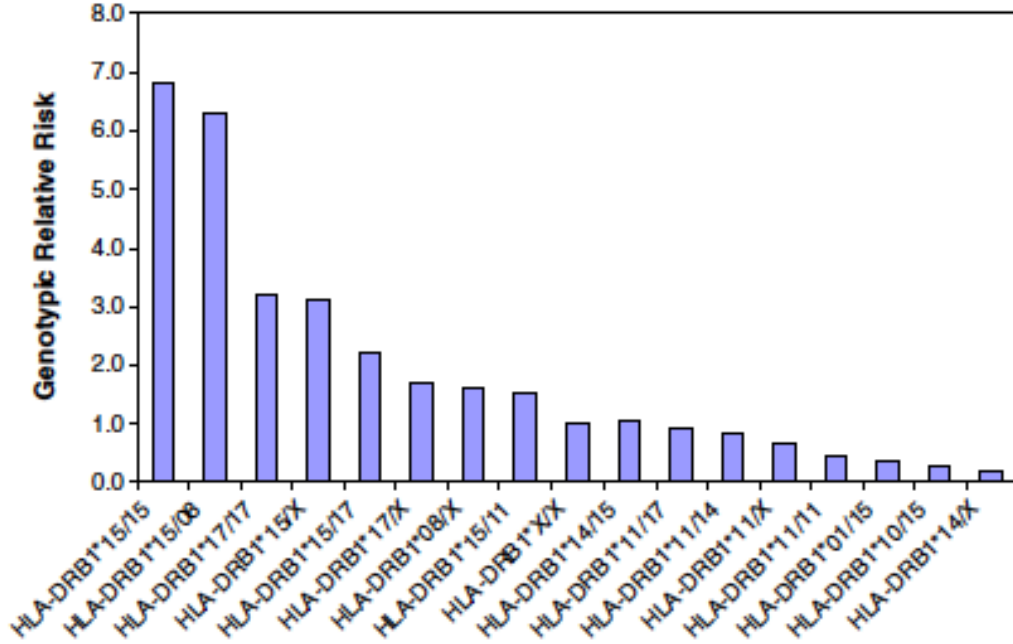
### 2.3. MULTİPLE SKLEROZ’DAN SORUMLU GENLER

#### 2.3.1. HLA bölgesi genleri

Son zamanlara kadar pek çok bağlantı (linkage) ve ilişki çalışmalarına göre sadece kromozom 6p21 ‘deki HLA sınıf II HLA-DR2 haplotipini MS’le önemli bir ilişkisi bulunmuştu. Bu haplotipin üç aday risk geni, *HLADRB\*1501*(HLA-DR2b’yi kodluyor), *HLADRB5\*0101*( HLA-DR2a’yı kodluyor) ve *HLADQB1\*0602* ( HLA-DQ6’yı kodluyor) oldukça yakın ilişkili ve beraber kalıtılıyorlar [72]. Sonuç olarak klasik genetik çalışmalar bunları ayırmakta başarılı olmadı. Son zamanlardaki daha güçlü genetik çalışmalar gösterdi ki *HLADRB1\*1501* MS’deki ana şüpheli aleldir (Şekil 4) .

[73, 74]. İlişki kuzeydoğu Avrupalılar ‘da daha güçlüdür fakat Akdeniz popülasyonları hariç diğer popülasyonlarda da gözükür, Akdeniz’de DR4 yaygındır. *HLADRB1\*15* MS için tek risk aleli değildir [75].

LA. Hoppenbrouwers, RQ. Hintzen / *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (2011) 194–201



Şekil 4: MS'in bağıl risklerinin alellere göre değişimi[76]

### 2.3.2. HLA dışı genler ve GWAS çalışmaları

Son zamanlara kadar HLA risk geninden başka genlerin tespit edilememesinin pek çok nedeni var. Birincisi HLA dışındaki diğer alellerin risk katkıları oldukça düşüktür. Buna ilaveten dünya genelindeki popülasyon çalışmaları oldukça heterojen ve en büyük faktör güçlü istatistiklerin olmamasıdır.

Bu istatistiksel sorunları aşmak için Uluslararası MS Genetik Konsorsiyumu (IMSGC) 931 ailedeki 500.000 SNP arrayi kullanarak GWAS (Genom Wide Association Study-genom genişliğinde ilişki çalışmaları) gerçekleştirildi ve 12000'den fazla örnek içim analiz yapıldı.

Sonuçlar MHC olmayan 16 SNP’i 13 gen bölgesinde az etkili olarak tespit etti (Tablo 3). Fakat sadece IL2RA geninde ki MHC olmayan SNP ‘lerde MS’le önemli ilişkiler bulundu ( $p=2.96 \times 10^{-8}$ ) [77]

Gene	Chr	Function	Disease
IL7R	5	Homeostasis of the memory T-cell pool	T1D
IL2R	10	Regulation of T-cells	T1D, Graves' disease
CLEC16A	16	Provides signals for decisions between tolerance and immunity	Addison's disease, T1D
CD226		Adhesion and co-stimulation T-cells	T1D, RA, Graves'disease, Crohn's disease
CYP27B1	12	Hydroxylates 25-hydroxyvitamin D into the bioactive form	T1D
TNFRSF1A	12	Influences the TNF $\alpha$ pathway	Tumor necrosis factor associated periodic syndrome (TRAPS)
CD40	20	Regulator of humoral and cellular immunity	RA, Graves' disease
CD58	1	Influences T-cell proliferation and differentiation	RA
STAT3	17	Involved in multiple pathways and functions, including the Jak-STAT pathway, neuron axonal guidance, apoptosis, activation of immune responses and Th17 cell differentiation	CD, UC, hyper-IgE syndrome

**Tablo 3 : Bazı MS risk genleri diğer hastalık risk genleri ile çakışabiliyor [76].**

Üçüncü gen olarak IL7R ikna edici fonksiyonel destekler elde edildi [78, 79]. Daha sonra 111,019 hasta ve 12,616 kontrol de katılımlı analizle genom-wide önem sırası kuruldu [80].

Görüldü ki üç alelik varyantların risk sekansı çok görülen varyantlardandır (risk alel sıklığı  $>10\%$  ve  $<90\%$ ). Büyük ihtimalle MS epistazi ve epigenetiği MS deki direkt olmayan biyolojik yollarda oluşur.

GWAS çalışmalarındaki MHC olmayan bölgelerdeki ilişkili genler şunlardır: IL2RA, IL7R, CLEC16A [81, 82], CD58 [82], CD226 [81, 83], KIF1B [83, 84], CD6 [85], IRF8 [85], THFRSF1A [85], ve kromozom 12 ve 20 de CD40, CYP27B1, [86, 87], TYK2 ve STAT3 [88] dur. Dikkat çekici olarak bu moleküllerin çoğu immün fonksiyonlarla ilişkilidir (tablo 4).

MSGENE - TOP RESULTS										
<a href="#">BACK</a>	<a href="#">SEARCH</a>	<a href="#">METHODS</a>	<a href="#">DISCLAIMER</a>	<a href="#">CREDITS</a>						
Status: Updated 25 November 2011										
RANKING BASED ON HUGENET INTERIM GUIDELINES FOR THE ASSESSMENT OF GENETIC ASSOCIATION STUDIES										
#	Gene	Polymorphism	Ethnicity	OR (95% CI)	P-value	N minor (Grade)	I <sup>2</sup> (Grade)	Bias Reason (Grade)	Overall Grade	Bayes Factor (log10)
1	<a href="#">HLA-DRB1</a>	rs3135388	All	2.27 (2.04-2.54)	1.62E-48	1768 (A)	n.a. (A)	(A)	A	41.7
2	<a href="#">IL2RA</a>	rs2104286	Caucasian	0.82 (0.79-0.85)	1.49E-24	16087 (A)	n.a. (A)	(A)	A	21.5
3	<a href="#">IL7R</a>	rs6897932	Caucasian	0.84 (0.81-0.88)	6.04E-20	19322 (A)	n.a. (A)	(A)	A	17.0
4	<a href="#">TAGAP</a>	rs1738074	All	0.88 (0.86-0.91)	1.78E-15	31160 (A)	n.a. (A)	(A)	A	12.6
5	<a href="#">CLEC16A</a>	rs12708716	All	0.83 (0.79-0.87)	2.00E-15	13224 (A)	n.a. (A)	(A)	A	12.6
6	<a href="#">EVIS</a>	rs11810217	All	1.15 (1.11-1.19)	2.22E-15	19829 (A)	n.a. (A)	(A)	A	12.5
7	<a href="#">GWA_16q24.1</a>	rs17445836	Caucasian	0.83 (0.80-0.87)	2.44E-15	9646 (A)	n.a. (A)	(A)	A	12.5
8	<a href="#">GWA_5p13.1</a>	rs4613763	All	1.20 (1.14-1.25)	9.44E-15	9813 (A)	n.a. (A)	(A)	A	11.9
9	<a href="#">TTC34</a>	rs4648356	All	0.88 (0.85-0.91)	1.53E-14	23422 (A)	n.a. (A)	(A)	A	11.7
10	<a href="#">AHL1</a>	rs11154801	All	1.13 (1.10-1.17)	2.68E-13	26365 (A)	n.a. (A)	(A)	A	10.5

**Tablo 4: MS'den sorumlu genler[89]**

## 2.4. IL2RA GENİ

### 2.4.1. IL2RA RESMİ İSMİ

Bu genin resmi ismi “interlökin 2 reseptör , alfa” dır.

IL2RA genin resmi sembolüdür. IL2RA ayrıca aşağıdaki diğer isimlerle de bilinir:  
CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR

### **2.4.2. IL2RA FONKSİYONU**

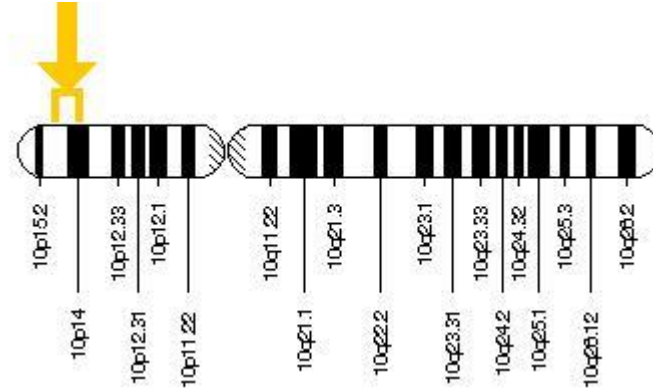
İnterlökün 2 (IL2) reseptör alfa (IL2RA) ve beta (IL2RB) zincirleri yaygın gama zinciri (IL2RG) ile birlikte IL2 reseptörünün yüksek affinitesini sağlar. Homodimerik alfa zinciri (IL2RA) düşük afinite reseptör oluştururken homodimerik beta zincirleri (IL2RB) orta düzeyli afinite oluşturur. İntegral membran proteini, çözünebilir IL2RA normalde ekstraselüler membran proteolizi sonucu izole edildi ve belirlendi. Alternatif olarak splays olan IL2RA mRNA'sı izole edildi fakat önemi hala bilinmiyor. Bu gendeki mutasyonlar interlökün 2 reseptör alfa eksikliği hastalığı ile ilişkilidir [90]. [RefSeq, Nov 2009]

### **2.4.3. IL2RA'DAKİ DEĞİŞİKLİKLER**

Genetics Home Reference IL2RA genindeki değişiklikleri şu hastalıklarla ilişkilendiren bilgiler vermiştir: Graves disease, juvenile idiopathic arthritis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes. Ayrıca OMIM kataloğunda belirtildiği üzere Diabetes mellitus, insulin-dependent ve Interleukin 2 Receptor, alpha, deficiency fenotipleride IL2RA genindeki değişikliklerle ilişkilidir[91].



#### 2.4.4. IL2RA GEN LOKASYONU

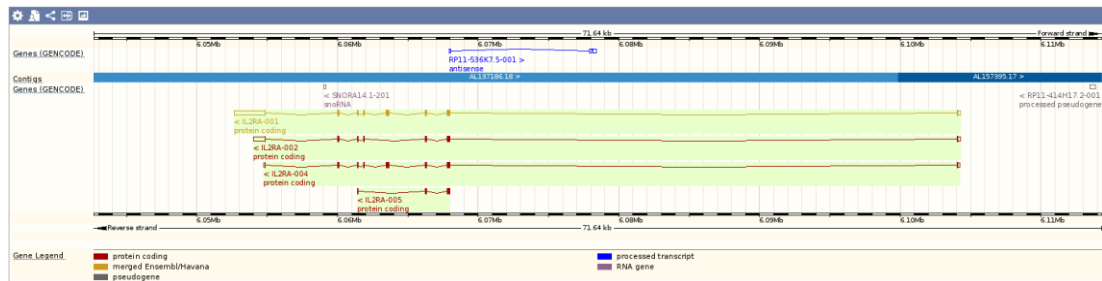


Şekil 5: IL2RA Gen Lokasyonu

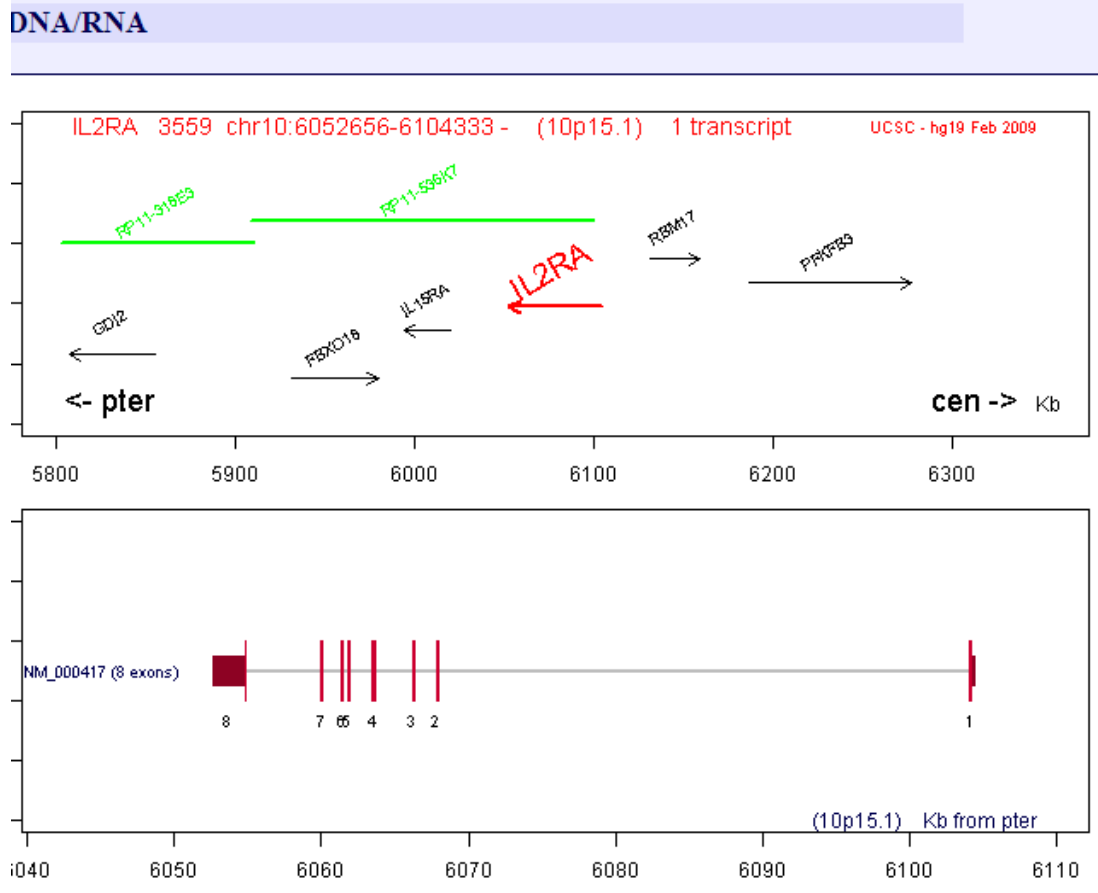
Sitogenetik Lokasyon: 10p15-p14. Kromozom 10'daki Moleküler Lokasyon: baz çifti 6,052,656 'dan 6,104,330'a kadar. IL2RA geni kromozom 10'un kısa (p) kolundaki 15 ve 14. Pozisyonları arasındadır [91].

#### 2.4.5. IL2RA GEN YAPISI

IL2RA geni 8 ekzonludur ve 4 adet transkript oluşturur.



Şekil 6: IL2RA gen yapısı[92]



Şekil 7: IL2RA Ekzon yapısı[93]

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. PRİMER TASARIMI

1. ENSEMBLE veri tabanından gen sayfasına girilir ve varyasyonlar gösterilir.

**Gene: IL2RA** ENSG00000134460

Description: interleukin 2 receptor, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:6008]

Location: **Chromosome 10: 6.052.652-6.104.288** reverse strand.

INSDC coordinates: chromosome:GRCh37:CM000672.1:6052652-6104288.1

Transcripts: This gene has 4 transcripts (splice variants) [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype	CDS incomplete	CCDS
IL2RA.001	ENST00000379959	3176	ENSP00000369293	272	Protein coding	-	CCDS7076
IL2RA.002	ENST00000379954	1562	ENSP00000369287	200	Protein coding	-	-
IL2RA.004	ENST00000256876	1006	ENSP00000256876	263	Protein coding	-	-
IL2RA.005	ENST00000447847	326	ENSP00000402024	109	Protein coding	5' and 3'	-

**Marked-up sequence**

Key:

- All exons in this region
- IL2RA exons

Variations:

- 5 prime UTR
- Downstream
- 5 prime UTR
- Frameshift
- Intronic
- Absence
- Splice donor
- Splice region
- Stop gained
- Unknown task
- Upstream

>chromosome:GRCh37:10:6052052:6104888:-1

```

1  CATGATCCTTTAGAGAAAGAAATCTGGAGCAAAACACCTTATAAATGCAATGCATTTTCAGGAGCCACGCTACTGTGGTGAATGATGATGGCTATACAA 105
106  GGTATAGACCTTGGGGAAATTTATGATTCACAGGCTTCAGTTTGGTATCTCCTCCATTTTGAATTTGGAGGCTCTGACCAAACTTCTGTCT 210
211  AGGACTTTGGCTTCCATCCAGSTGGTCCGGCTACTCTGAGGAGTTACAGCCCTGAGGGAGSACTCAGCTATGAGTGGTGGTGGACCACTGCCAA 315
316  GAAGTGTCTGCTCACTCCCTACTTCAACGCGCAGGGGAATCTCCCTCTCCTTTATGGGCTAGCTGAAGAAAGGATTCATAAATGAATTCATCTCTCA 420
421  CCCCAGCCACACTCCAGCAATGAACTTGAAGAAATGAACCTGGTTTGAAGAAATACGCAACTATATTGTATCACTCAAAAAAAGAAATGAAGACTTC 525
526  CTATATTGAGTGAAGAGAGAGAGAGTCTAGGCACTTCTGGCTGAACAGCCAGCCCAATATTAAAGAGAGCAACTCCGACTCCGATAGAGACTGGAT 630
631  CCCAGAAAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 735
736  TCCGCTTCACTCCCGGCTCTCCAGAGGTGAGGAAATGATTCATCTGCTGATGTGGGACTCTCCAGCTTCATCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 840
841  AAGGGCTGTGGTGGCCCGAATTCGGGAGGCTGATGGGCACTCCCTCTCCAGCCACAGAGAGGAGTCCCGAGTGAATGATGATGATGATGATGATG 945
946  TTGAATCTGGGTTCCACTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1050
1051  TGTCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1155
1156  TTATCTTTATCTTCAATGAAATCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1260
1261  ATGAGTACTCTATCAACACTGGGAAATTAAGTCTCGAAGAGTTAGCTTCAAGGATGATATCTGCTTTTACCTCTTAGGAAATCAACACTAGGAA 1365
1366  TTCTCTACAGTGCACCTTAAAGAAATTTTAAATATGCACTACTCATTITAGAACATTACTACTCTCATAAATCTATGATATACATGATGATGAT 1470
1471  TATACGTGTTATATATGCAAAATTTAAATTTCAATCTGTTTCAATGGATTTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTGACACTGCTCTGTCAGCCAGACTGGAG 1575
1576  GATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 1680

```

**Şekil 8: Ensemble veri tabanından gen referans dizilimine ulaşılması**

**Display options**

5' Flanking sequence (upstream): 600 (Maximum of 1000000)

3' Flanking sequence (downstream): 600 (Maximum of 1000000)

Number of base pairs per row: 105 bps

Additional exons to display: Core exons

Orientation of additional exons: Display exons in both orientation

Show variations: Yes

Hide variations longer than 10bp: Yes

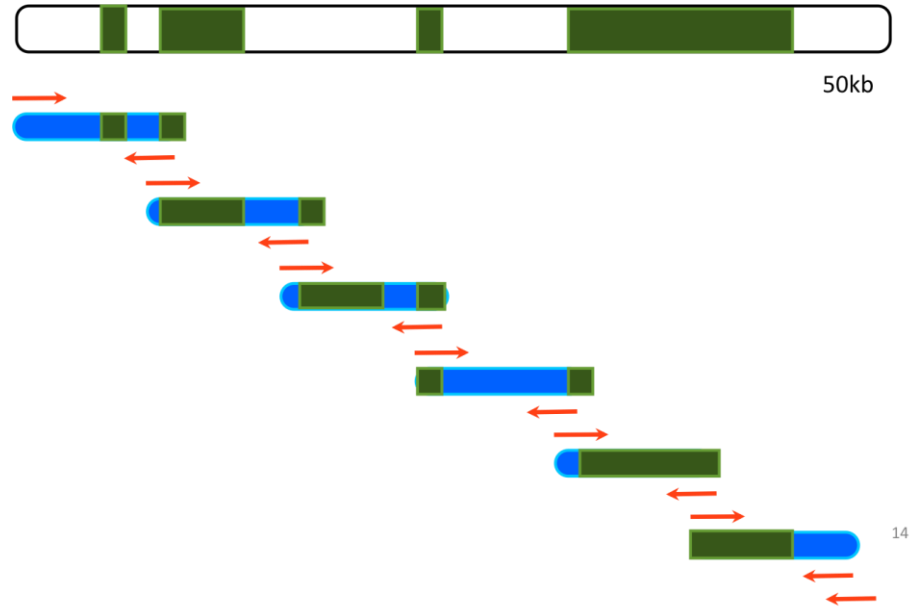
Filter variations by consequence type: No filter

Line numbering: Relative to this sequence

Display pop-up information on mouseover: Yes

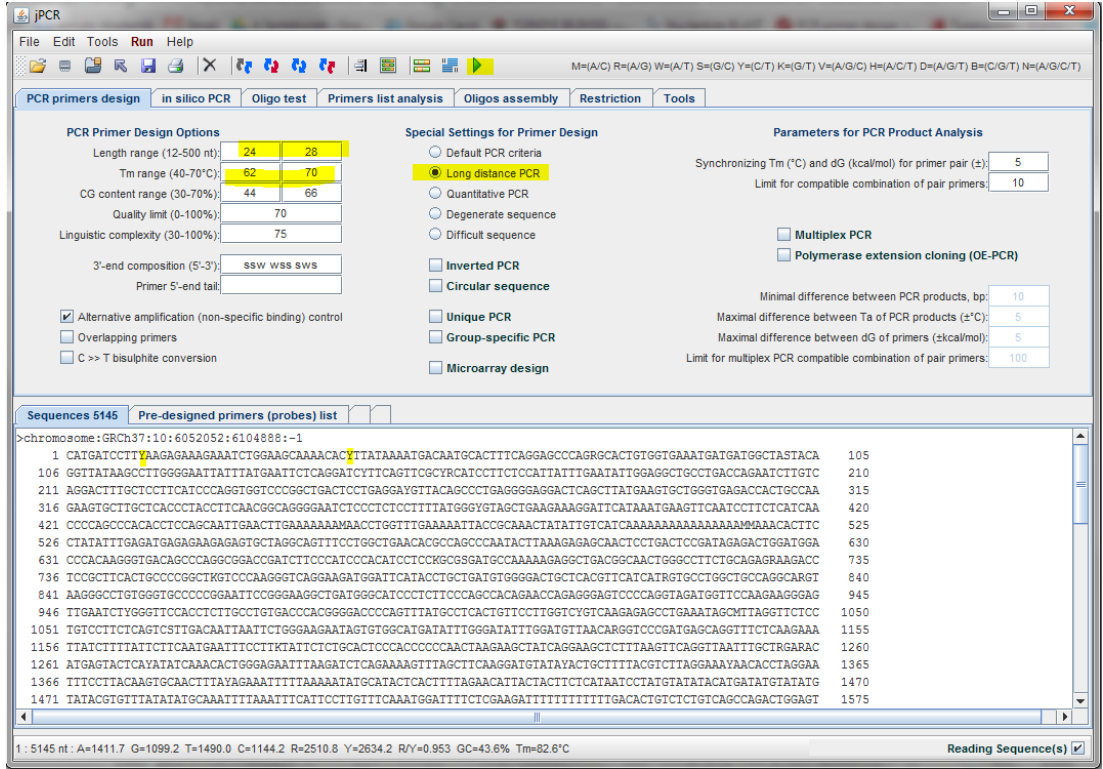
Fields marked \* are required

2. IL2RA gen dizisi 5000 bazlık parçalara ayrılır. 80 KB'lık gen için 12 adet blok üretilmiştir.



**Şekil 9: IL2RA geninin bloklara bölünmesi**

3. FAST PCR yazılımı kullanılarak bu uzun ampliconları çoğaltacak primerler tasarlanır. Uzunluk; 24-28, Tm; 62-70, GC;44-66 aralıkları seçilir



**Şekil 10: FAST PCR yazılımının kullanımı**

4. Tasarlanan primerlerin varyasyon bölgelerine gelmesinden kaçınılır ve her bir primer NCBI veri tabanı ile blast yapılır. Primerlerin hairpin, self-dimer, heterodimer özellikleri incelenir ve uygun aralıkta olmasına dikkat edilir.

The screenshot shows the jPCR software interface. The main window is titled "jPCR" and has a menu bar with "File", "Edit", "Tools", "Run", and "Help". Below the menu bar is a toolbar with various icons. The main area is divided into several sections:

- PCR Primer Design Options:** Includes fields for Length range (12-500 nt), Tm range (40-70°C), CG content range (30-70%), Quality limit (0-100%), Linguistic complexity (30-100%), 3'-end composition (5-3'), and Primer 5'-end tail.
- Special Settings for Primer Design:** Includes radio buttons for Default PCR criteria, Long distance PCR, Quantitative PCR, Degenerate sequence, and Difficult sequence. It also has checkboxes for Inverted PCR, Circular sequence, Unique PCR, Group-specific PCR, and Microarray design.
- Parameters for PCR Product Analysis:** Includes fields for Synchronizing Tm (°C) and dG (kcal/mol) for primer pair (±), Limit for compatible combination of pair primers, Minimal difference between PCR products, bp, Maximal difference between Ta of PCR products (±°C), Maximal difference between dG of primers (±kcal/mol), and Limit for multiplex PCR compatible combination of pair primers.
- Sequences 5145 Pre-designed primers (probes) list PCR primer design result:** A table showing the results of the primer design process. The table has columns for PrimerID, Sequence (5'-3'), Length (nt), Tm (°C), dG (kcal/mol), CG (%), Linguistic\_complexity (%), and Primer\_Quality (%).

The table below is a representation of the data shown in the screenshot:

PrimerID	Sequence (5'-3')	Length (nt)	Tm (°C)	dG (kcal/mol)	CG (%)	Linguistic_complexity (%)	Primer_Quality (%)
1F1_1_57-80	cactttcaggagcccagrgcaactg	24	62.8	-32.3	60.4	78	80
1F2_1_137-164	tctcaggatcyttcagttcgcyrcatcc	28	62.4	-36.1	51.8	78	73
1F3_1_185-210	ggagggtgctgaccagaatcttctgc	26	62.9	-34.3	57.7	93	72
1F4_1_211-238	aggactttgctccttcatcccaggtggt	28	65.2	-36.8	53.6	84	78
1F5_1_245-269	tgactcctgaggayttacagccct	25	62.3	-32.4	54.0	88	93
1F6_1_273-299	ggaggactcagcttatgaagtctgg	27	62.3	-34.9	55.6	91	86
1F7_1_289-312	tgaagtctgggtgagaccactgc	24	63.4	-32.5	58.3	78	80
1F8_1_303-326	agaccactgccaagaagtctctgc	24	62.3	-32.0	54.2	76	80
1F9_1_331-356	cctaccttcaacggcaggggaatctc	26	62.6	-34.0	57.7	90	80
1F10_1_547-570	agagtctagcagttctcctgctc	24	62.6	-31.6	54.2	83	86
1F11_1_575-601	acgccagcccaataacttaagagagca	27	62.2	-34.6	48.1	80	73
1F12_1_624-647	ggatggaccaccaaggggtgacagc	24	63.8	-32.7	62.5	80	86
1F13_1_668-691	atcccacatcctcckgcsagatgc	24	66.4	-34.3	64.6	78	73
1F14_1_686-710	sgatgccaaaaagaggtgacggca	25	64.1	-34.3	56.0	83	81

At the bottom of the window, there is a status bar with the following information: 1: 5145 nt: A=1411.7 G=1099.2 T=1490.0 C=1144.2 R=2510.8 Y=2634.2 R/Y=0.953 GC=43.6% Tm=82.6°C. There is also a "Reading Sequence(s)" checkbox at the bottom right.

Şekil 11: FAST PCR yazılımının kullanımı

### 3.2. HASTALARIN DNA İZOLASYONU

Bu proje kapsamında toplanan kanların DNA izolasyonu Phenol-Cloroform yöntemi ile yapılmıştır.

Kullanılması gerekli malzemeler;

RBC Lysis Buffer, 10-10 TE , SDS , Proteinaz K , %100 Ethanol , 5 M NaCl , Phenol , CIA , 70% Ethanol , 1-1 TE

Phenol-Cloroform yöntemi ile DNA izolasyonunda izlenmesi gereken yol;

1. 9ml RBC Lysis Buffer'ın (1X) (+4'de) içine 3ml periferik kan konur ve iyice karıştırılır.

2. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Her 2 dk arayla karıştırılır.

a.Heat block 70 dereceye ayarlanır.

3. 2000 g de 10 dk santrifüj edilir.

4. Süpernatant, pelleti koruyacak şekilde yavaşça dökülerek uzaklaştırılır. Kalanı pipetle çekilir.

5. Pelletin üzerine 350 ul 10-10 TE konur ve eppendorf tüpe aktarılır (TE ilave edildikten sonra pipetaj yapılarak pellet eppendorf tüpe aktarılır).

NOT: SDS ve Proteinaz K direkt sıvının üzerine pipetaj yapılarak bırakılır.

6. 20 ul 10% SDS konur. Vorteks yapılır.

7. 8 ul Proteinase K konur. Eppendorf tüpün ağzı parafilm ile kapatılır. Vorteks yapılır.

8. 15 dk 70oC de inkübe edilir.

9. Vorteks yapılır.

10. 37oC de overnight inkübe edilir (İnkübasyon süresince vorteks yapılır).

11. Overnight inkübasyon sonrasında pellet tamamen çözülmüş ise 12.aşamadan devam edilir.

12. 5000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir.

NOT: %100 Ethanol (22 aşamada kullanılacak) buza konur.

13. (Pellet oluşmuşsa) Supernatant temiz bir tüpe transfer edilir (Pellet oluşmamışsa aynı ependorfla devam edilir).

14. Supernatantın üzerine 20 ul 5 M NaCl konur. Pipetaj yapılır. Vorteks yapılır.

15. (Phenolü kullanmadan önce çalkalayınız) 400 ul Phenol eklenir (Çeker ocakta). Hızlıca alt-üst yapılarak iyice karıştırılmalıdır. (Phenolle işiniz bitince +4'e ışık görmeyecek şekilde koyunuz!!!)

16. 15.000 rpm de 15 dk 4oC de santrifüj edilir.

17. İki faz görülür, üstteki Supernatant (şeffaf faz) temiz bir ependorfa aktarılır.

18. 400 ul CIA eklenir (Çeker ocakta). Hızlıca alt-üst yapılarak iyice karıştırılmalıdır. İki şeffaf faz gözlenecektir.

19. 15.000 rpm de 15 dk 4oC de santrifüj edilir.

20. İki fazdan üstteki şeffaf kısım temiz bir ependorfa aktarılır (İki faz arasında beyaz bir bölge oluşmuşsa, o bölge çekilmez).

21. 18. , 19. ve 20. Basamaklar bir kez tekrarlanır.

22. 1 ml %100 Ethanol eklenir (Ethanol buzun içinde soğutulur öyle konursa DNA iplikçikleri daha rahat gözlenir).

23. 10 dk buzda inkübe edilir.

24. Ependorf tüpler, tüp ve kapağın birleştiği nokta dışa gelecek şekilde santrifüje yerleştirilir. 15.000 rpm de 15 dk 4oC de santrifüj edilir.



25. Pelletin (DNA) nerede olduğu görüldükten sonra dikkatli bir şekilde supernatant atılır.

26. Pelletin üzerine 500 ul 70% Ethanol eklenir. Yavaş bir pipetajla pellet çalkalanır.

27. 15.000 rpm de 15 dk 4oC de santrifüj edilir.

28. Tüm ethanol çekilerek pellet kurumaya bırakılır, 10-15 dk.

29. Pelletin büyüklüğüne göre 100-200 ul 1-1 TE pipetaj yapılarak eklenir. 15-20'lık inkübasyondan sonra vorteks yapılır ve nanodrop'da ölçülür.

Nano drop'da ölçüm yapıldıktan sonra DNA etiketlenir ve -20 C'de saklanır.

Solüsyonların Hazırlanması;

1. 10-10 TE (10mM Tris – 10mM EDTA)

a. 10 mM Tris: 45 ml ddH<sub>2</sub>O içine 0.061 gr Tris (Trizma Base M/96) konur. pH 7.5 a HCl (M/92) ile ayarlanır. Solüsyon 50 ml ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

b. 10mM EDTA: 0,5 M EDTA stoğundan 1ml alınarak 49ml ddH<sub>2</sub>O içine eklenir.

c. Bu iki solüsyondan eşit miktarlarda karıştırılarak 10-10 TE hazırlanmış olur. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

2. 10 mg/ml Proteinase K

a. Hazır olarak satın alınmaktadır. Konsantrasyonunun 10 mg/ml olmasına dikkat edilerek kullanılır.

3. 10% SDS

a. 10 gr SDS 100 ml ddH<sub>2</sub>O içinde çözülerek hazırlanır. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 4. 5 M NaCl

a. 10 ml ddH<sub>2</sub>O içinde 2,9 gr NaCl çözünerek hazırlanır. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 5. Phenol

a. Hazır satın alınmaktadır. +4 de muhafaza edilir. Phenol ilk defa açılacaksa kullanılmadan 4-5 saat önce klavuzda belirtilen şekilde pH'ı DNA izolasyonuna uygun noktaya küçük şişedeki solüsyon eklenerek getirilir. Kullanıldıktan sonra hemen yerine kaldırılır. Işığa duyarlıdır.

#### 6. CIA (chloroform/iso-amyl alcohol)

a. Hazır satın alınmaktadır (Hazır CIA yoksa chloroform/iso-amyl alcohol 24:1 oranında karıştırılır). Örn; 23ml chloroform,1ml iso-amyl alcohol şeklinde...Oda sıcaklığında muhafaza edilir. Kullanıldıktan sonra hemen yerine kaldırılır. Işığa duyarlıdır.

#### 7. 70% Ethanol

a. 15 ml dH<sub>2</sub>O içinde 35 ml Ethanol eklenerek hazırlanır.

#### 8. 1-1 TE

a. 10-10 TE solüsyonunun 1/10 oranında sulandırılmasıyla hazırlanır.

İzolasyon sonucunda kanların DNA miktarlarının spektrofotometrede ölçümünün sonuçları;

### 3.3. KÜTÜPHANE HAZIRLAMA

Örnek PCR ve amplikon purifikasyonu

Gerekli materyal ve ekipmanlar

- Forward and reverse PCR primerleri
- 0.2-mL PCR strip tüpler
- Platinum® PCR SuperMix High Fidelity
- Nuclease-free su
- Agencourt® AMPure® XP Reagent
- SPRIplate 96R Magnet Plate or Magna-Sep™ 96 Magnetic Particle Separator
- 70% etanol

#### 3.3.1. Long PCR

Örnek PCR

1. PCR primerlerini, Platinum® PCR SuperMix High Fidelity, ve yüksek kalitedeki genomik DNA 'yı buzun üzerinde çözülür.
2. Her bir amplikon için eşit hacimde 10 µM forward ve 10 µM reverse primerleri karıştırılır.
3. Aşağıdaki kimyasalları sırasıyla 0.2-mL strip tüpe eklenir.

İçerik	Hacim
<b>Platinum® PCR SuperMix High Fidelity*</b>	45 µL
<b>20–50 ng genomik DNA</b>	4 µL
<b>10 µM primer karışımı</b>	1 µL
<b>Toplam</b>	50 µL

**Tablo 5: Örnek Long PCR protokol içeriği**

4. Tüpleri Termal Cykler 'a yükle ve aşağıdaki programı çalıştırılır.

Aşama	Step	Sıcaklık	Zaman
<b>Holding</b>	Aktive enzyme	95°C	3 dk
<b>Cycling cycles)</b>	<b>(40</b> Denature	95°C	30 sn
	Anneal	58°C	30 sn
	Extend	68°C	1 dk/kb
<b>Holding</b>	—	4°C	∞

**Tablo 6: Örnek Long PCR protokol şartları**

Çalıştığımız PCR

Thermo Scientific / Long PCR Enzyme Mix

Gerekli malzemeler ve kullanılan miktarlar:

	Örnek için kullanılan miktarlar
<b>10X Long PCR buffer with 15Mm MgCl<sub>2</sub></b>	5ul
<b>dNTP Mix, 2mM</b>	1ul
<b>Forward Primer</b>	0,5ul
<b>Reverse Primer</b>	0,5ul
<b>Long PCR Enzim Mix</b>	0,5ul
<b>Water, nuclease- free</b>	42,1ul

<b>Template DNA</b>	0,4ul
<b>Total</b>	50ul

**Tablo 7: Çalışılan Long PCR protokol içeriği**

<b>Thermal cycle kondisyon;</b>	<b>Temperature °C</b>	<b>Time</b>	<b>Number of cycles</b>
<b>Initial Denaturation</b>	94	3dk	1
<b>Denaturation</b>	94	20sn	10
<b>Annealing/ Extension</b>	68	5dk	
<b>Denaturation</b>	94	20sn	25
<b>Annealing/ Extension</b>	68	5,5dk	
<b>Final Extension</b>	68	10dk	1

**Tablo 8: Çalışılan Long PCR protokol şartları**

### **3.3.2. Amplikonlardan havuz oluşturma, parçalara ayırma ve saflaştırma**

Uzun amplikonlardan eşit molaritede havuz oluşturma

Gerekli materyal ve ekipmanlar

- Bioanalyzer® 2100 instrument
- Agilent® High Sensitivity DNA Kit

1. Daha önceki deneyimlerinizi kullanarak ya da bir önceki örnekteki PCR protokolü ile 20-50 ng gDNA'dan >400 bp'den büyük hedefleri çoğalt ve her bir ampliconu saflaştırılır.
2. Olabilecek en yüksek konsantrasyonda saflaştırılmış ampliconlardan eşit molaritede havuzlar oluşturulur.
  - a. Herbir ampliconunun 1  $\mu$ L'sini Agilent® Bioanalyzer® ve Agilent® High Sensitivity DNA Kit kullanarak analiz edilir.
  - b. Bioanalyzer® yazılımını kullanarak her bir ampliconun molar konsantrasyonunu (nmol/L) belirlenir.
  - c. Herbir ampliconu eşit molaritede birleştirilir.
3. Birleştirilmiş havuzdaki toplam konsantrasyonu hesapla ve ng/ $\mu$ L formatına çevrilir.

### 3.3.3. Ion Shear™ Plus reaktifi ile parçalama ve saflaştırma

İstenilen kütüphane boyutuna göre parçalama kondisyonlarını seç.

Kütüphane boyutu	Ortalama parça boyutu
300 baz-okuma	270–370 bp
200 baz-okuma	200–300 bp
100 baz-okuma	100–200 bp

**Tablo 9: Kütüphane ve ortalama parçalama boyutu**

### Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit materyalleri

- Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer
- Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II
- Ion Shear™ Plus Stop Buffer
- Low TE

### Diğer materyal ve ekipmanlar

- Nuclease-free su
- 1.5-mL Eppendorf® LoBind tüpler
- 0.2-ml PCR tüpleri
- 37°C su banyosu
- P10–P20 ve P100–P200 pipetler
- Buz
- Agencourt® AMPure® XP Kit
- Taze hazırlanmış 70% etanol
- Magnetik rack

### 3.3.4. DNA parçalama

1. Havuz oluşturma protokolünde elde edilen verilerle 100ng 'lık DNA'nın hacmi belirlenir.
2. Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer ve Ion Shear™ Plus Enzyme Mix 'i vorteks ile karıştırılır 5 saniye spin attırılır.
3. Aşağıdaki reaktifler 1.5-mL LoBind tüpe eklenir vorteks yapılır spin attırılır.

İçerik	Hacim
Uzun ampikon havuzu, 100 ng	Y µL
Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer	5 µL
Nuclease-free su	35 – Y µL
<b>Toplam</b>	<b>40 µL</b>

**Tablo 10: DNA parçalama reaksiyon içeriği**

4. P10–P20 pipet kullanarak, 10 µL Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II örneğe eklenir
5. P100–P200 pipet seti 40-µL hacime ayarlanır pipetaj yapılarak 8-10 kere karıştırılır, baloncuk oluşmaması için vorteks yapılmaz.
6. Aşağıdaki uygun zamanlara göre tüpler 37°C su banyosu ya da ısıtıcı blokta inkübe edilir.

Ortalama parça boyutu	Reaksiyon zamanı	Optimizasyon Aralığı
270–370 bp (300 baz- okuma kütüphanesi)	10 dakika	5–15 dakika
200–300 bp (200 baz- okuma kütüphanesi)	15 dakika	5–30 dakika



<b>100–200 bp (100 baz- okuma kütüphanesi)</b>	<b>40 dakika</b>	<b>30–60 dakika</b>
--	------------------	---------------------

**Tablo 11: DNA parçalama reaksiyon zamanı**

7. İnkübasyondan sonra 5 µL o Ion Shear™ Stop Buffer hemen eklenir 5 sn vorteks yapılır ve buzun üzerine koyulur.

### **3.3.5. Parçalanmış kütüphanenin saflaştırılması**

1. Parçalanmış DNA örneğine 99 µL Agencourt® AMPure® XP reaktifi eklenir (1.8X örnek hacmi), 5 kere pipetaj yapılır, spin attırılır ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
2. Spin attırılır ve tüpler 3 dk magnetik raka yerleştirilir.
3. Tüpü magnetik raktan kaldırmadan 500 µL taze hazırlanmış 70% etanol eklenir. 10 saniye inkübe edilir tüp iki kere döndürülür, solüsyon temiz hale gelince süpernantant kısmı çekilir ve atılır.
4. Step 2 tekrarlanır.
5. Kalan etanolden kurtulmak için tüp spin attırılır ve tekrar magnetik raka koyulur kalan supernatant pelleti rahatsız etmeden 20-µL pipetör ile çekilir.
6. Tüp magnet üzerinde oda sıcaklığında 5 dk'lığına ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılır.

7. Tüp magnetik rakdan alınır ve 25 µL Low TE direk olarak peletin üzerine eklenir süspansiyon 5 kez pipetaj yapılır ve 10 saniye vortekslenir.
8. Tüp spin atılır ve solüsyon temizlenene kadar en az 1 dakika boyunca magnetik raka koyulur. Süpernatant içeren elüt edilmiş DNA yeni bir 0.2-mL PCR tüpüne peleti rahatsız etmeden konulur.

### **3.3.6. Adaptör bağlaması, çentik -tamiri, ve saflaştırma**

Plus Fragment Library Kit için gerekli olan materyaller

- 10X Ligase Buffer
- Adapters (for non-barcoded libraries)
- DNA Ligase
- Nick Repair Polymerase
- dNTP Mix
- Low TE

Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit için gerekli olan materyaller

- Ion Xpress™ P1 Adapter
- Ion Xpress™ Barcode X (1 barcode adapter per library)

Diğer materyal ve ekipmanlar

- 0.2-mL PCR tüpler

- Thermal cyclers
- Nuclease-free su
- Agencourt® AMPure® XP Kit
- Taze hazırlanmış 70% etanol
- Magnetik rak

### 3.3.7. Adaptör bağlaması ve çentik tamiri

1. 0.2-mL PCR tüpün içine aşağıdaki reaktifleri ekle ve pipetaj yap.

Barkodlanmayan kütüphaneler için

İçerik	Hacim
DNA	~25 µL
10X Ligase Buffer	10 µL
Adaptörler	2 µL
dNTP Mix	2 µL
Nuclease-free Su	51 µL
DNA Ligase	2 µL
Nick Repair Polymerase	8 µL
<b>Toplam</b>	<b>100 µL</b>

**Tablo 12: Adaptör bağlaması ve çentik tamiri reaksiyonu içeriği**

2. Tüpü thermal cycler 'a yerleştirilir ve aşağıdaki program çalıştırılır.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Hold	25°C	15 dk
Hold	72°C	5 dk
Hold	4°C	∞*

**Tablo 13: Adaptör bağlaması ve çentik tamiri reaksiyonu sıcaklık ve zaman**

3. Bütün reaksiyon karışımı 1.5-mL LoBind tüpe aktarılır.

### 3.3.8. Adaptör birleştirilmiş ve çentik düzeltilmiş DNA'nın saflaştırılması

1. Agencourt® AMPure® XP Reagent aşağıda gösterilen hacimde örneğe eklenerek 5 kez pipetaj yapılır spin attırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika ünkübe edilir

Kütüphane Boyutu	Agencourt® AMPure® XP Reagent hacmi
200- yada 300- baz okuması	140 µL (1.4X örnek hacmi)
100-baz okuması	180 µL (1.8X örnek hacmi )

**Tablo 14: AMPure® XP Reaktifi hacmi**

2. Spin attırılır ve tüpler 3 dk magnetik raka yerleştirilir.

3. Tüpü magnetik raktan kaldırmadan 500 µL taze hazırlanmış 70% etanol eklenir. 10 saniye inkübe edilir tüp iki kere döndürülür, solüsyon temiz hale gelince süpernantant kısmı çekilir ve atılır.

4. Step 2 tekrarlanır.
5. Kalan etanolden kurtulmak için tüp spin attırılır ve tekrar magnetik raka koyulur kalan supernatant pelleti rahatsız etmeden 20- $\mu$ L pipetör ile çekilir.
6. Tüp magnet üzerinde oda sıcaklığında 5 dk'lığına ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılır.
7. Tüp magnetik rakdan alınır ve 25  $\mu$ L Low TE direk olarak peletin üzerine eklenir süsfansiyon 5 kez pipetaj yapılır ve 10 saniye vorteklenir.
8. Tüp spin attırılır ve solüsyon temizlenene kadar en az 1 dakika boyunca magnetik raka koyulur. Süpernatant içeren elüt edilmiş DNA yeni bir 0.2-mL PCR tüpüne peleti rahatsız etmeden konulur.

### 3.3.9. Çoğaltılmamış kütüphanenin boyut seçimi

Kütüphane Boyutu	Hedef Pik Boyutu
300 baz-okuma	~390 bp
200 baz-okuma	~330 bp
100 baz-okuma	~200 bp

**Tablo 15: Çoğaltılmamış kütüphanenin boyut seçimi**

Kitteki materyaller

- Low TE

Diğer materyal ve ekipmanlar

- Pippin Prep™ instrument (Part no. 4471271)

- 2% Agarose Gel Cassettes for the Pippin Prep™ instrument (Part no. 4472170)
- Nuclease-free Su
- Agencourt® AMPure® XP Kit
- Taze hazırlanmış 70% etanol
- Magnetik rak

1. Pippin Prep™ cihazı için 2% Agaroz Jel kaseti hazırlama:

- a. Kaset ambalajından çıkarılır cihaza yüklenir.
- b. Yükleme ve elüsyon kuyucuklarındaki yapışkan stripler kaldırılır.
- c. Yükleme kuyucukları Electrophoresis Buffer ile doldurulur.
- d. Elüsyon kuyucuklarındaki sıvı çekilir ve 40 µL Electrophoresis Buffer eklenir.
- e. Pippin Prep™ manüeli takip edilerek akımın seperasyon ve elüsyon portlarında olduğundan emin olunur.

2. Plaka düzenlemesi ve protokol editör ekranındaki seperasyon parametreleri tanımlanır:

- a. Kaset tipi menüsünden 2% Marker B seçilir.
- b. Ref Lane (reference lane) ' a basılır ve 5. şerit ladder şeridi olarak atanır.

c. 1–4 şeritleri örnek şeridi olarak tanımlanır, ve tabloya göre hedef BP boyutu tanımlanır.

<b>Kütüphane Boyutu</b>	<b>Hedef Pik Boyutu</b>
<b>300 baz-okuma</b>	~390 bp
<b>200 baz-okuma</b>	~330 bp
<b>100 baz-okuma</b>	~200 bp

**Tablo 16: Çoğaltılmamış kütüphanenin Pipin Prep cihazında hedef pik seçimi**

d. Şerit görüntülemesini in aktive etmek için her bir örnek şeridi için Sig Mon (signal monitoring) butonuna basılır.

e. Yürütme süresi 1.5 saat olarak ayarlanır.

3. Örnekler yüklenir:

a. 10 µL Low TE saflaştırılmış ve birleştirilmiş DNA (20 µL) örneklerine eklenir.

b. 10 µL Loading Solution eklenir..

c. Ana ekrana gidilir ve yeni oluşturulmuş ayırma dosyası seçilir.

d. Referans şeritte bulunan yükleme kuyucuğunda ki 40 µL Electrophoresis Buffer çekilir ve yerine 40 µL of 2% DNA Marker B yüklenir.

e. Örnek yükleme kuyucuklarındaki 40 µL Electrophoresis Buffer çekilir ve yerine bütün 40-µL örnek koyulur.

4. Cihaz çalıştırılır:

a. Bütün ladder ve örnekler yüklendikten sonra cihazın kapağı kapatılır.

- b. Ana menüdeki start tuşuna basılır.
  - c. Ayrışma tamamlandıktan sonra elüsyon kuyularındaki DNA (40–60  $\mu$ L) pipetle yeni bir 1.5-mL LoBind tüpe aktarılır.
  - d. Hacimi 60  $\mu$ L getirene kadar Nuclease-free su eklenir
5. Boyutu seçilen DNA'nın saflaştırılması:
- a. DNA örneğine 108  $\mu$ L Agencourt® AMPure® XP reaktifi eklenir (1.8X örnek hacmi), 5 kere pipetaj yapılır, spin attırılır ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
  - b. Spin attırılır ve tüpler 3 dk magnetik raka yerleştirilir.
  - c. Tüpü magnetik raktan kaldırmadan 500  $\mu$ L taze hazırlanmış 70% etanol eklenir. 10 saniye inkübe edilir tüp iki kere döndürülür, solüsyon temiz hale gelince süpernantant kısmı çekilir ve atılır.
  - d. Step 2 tekrarlanır.
  - e. Kalan etanolden kurtulmak için tüp spin attırılır ve tekrar magnetik raka koyulur kalan supernatant pelleti rahatsız etmeden 20- $\mu$ L pipetör ile çekilir.
  - f. Tüp magnet üzerinde oda sıcaklığında 5 dk'lığına ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılır.
  - g. Tüp magnetik rakdan alınır ve 25  $\mu$ L Low TE direk olarak peletin üzerine eklenir süsfansiyon 5 kez pipetaj yapılır ve 10 saniye vorteklenir.
  - h. Tüp spin attırılır ve solüsyon temizlenene kadar en az 1 dakika boyunca magnetik raka koyulur. Süpernantant içeren elüt edilmiş DNA yeni bir 0.2-mL PCR tüpüne peleti rahatsız etmeden konulur.



### 3.3.10. Kütüphane çoğaltılması

1. Aşağıdaki reaktifler uygun boyuttaki tüpte birleştirilir ve pipetaj yapılır.

İçerik	Hacim
Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	100 µL
Library Amplification Primer Mix	5 µL
Çoğaltılmamış Kütüphane (Pipin Prep)	25 µL
<b>Toplam</b>	<b>130 µL</b>

**Tablo 17: Kütüphanenin çoğaltılması için reaksiyon içeriği**

2. 130-µL 'lik reaksiyon 0.2-mL PCR tüplerine her biri 65 µL olacak şekilde ikiye bölünür.
3. Tüpler thermal cyclers 'a yerleştirilir ve aşağıdaki program çalıştırılır.

Aşama	Adım	Sıcaklık	Zaman
<b> Holding </b>	Denature	95°C	5 dk
<b> 8 cycles </b>	Denature	95°C	15 saniye
	Anneal	58°C	15 saniye
	Extend	70°C	1 dk
<b> Holding </b>		4°C	∞

**Tablo 18: Kütüphanenin çoğaltılması için reaksiyon koşulları**

4. İkiye bölünen PCR'ları yeni bir 1.5-mL LoBind tüpte birleştir.

### 3.3.11. Kütüphane Saflaştırması

1. Çoğaltılan DNA örneğine 195 µL Agencourt® AMPure® XP reaktifi eklenir (1.5X örnek hacmi), 5 kere pipetaj yapılır, spin attırılır ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
2. Spin attırılır ve tüpler 3 dk magnetik raka yerleştirilir.
3. Tüpü magnetik raktan kaldırmadan 500 µL taze hazırlanmış 70% etanol eklenir. 10 saniye inkübe edilir tüp iki kere döndürülür, solüsyon temiz hale gelince süpernantant kısmı çekilir ve atılır.
4. Step 2 tekrarlanır.
5. Kalan etanolden kurtulmak için tüp spin attırılır ve tekrar magnetik raka koyulur kalan supernatant pelleti rahatsız etmeden 20-µL pipetör ile çekilir.
6. Tüp magnet üzerinde oda sıcaklığında 5 dk'lığına ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılır.
7. Tüp magnetik rakdan alınır ve 25 µL Low TE direk olarak peletin üzerine eklenir süsfansiyon 5 kez pipetaj yapılır ve 10 saniye vorteklenir.
8. Tüp spin attırılır ve solüsyon temizlenene kadar en az 1 dakika boyunca magnetik raka koyulur. Süpernatant içeren elüt edilmiş DNA yeni bir 0.2-mL PCR tüpüne peleti rahatsız etmeden konulur.

### 3.4. KALIP (TEMPLATE) DNA HAZIRLAMA

1. Öncelikli olarak PCR karışımı hazırlanır.

<b>Nuclease Free Su</b>	<b>280 µl</b>
<b>Ion One Touch 2x Reagent Mix</b>	500 µl
<b>Ion One Touch Enzyme Mix</b>	100 µl

**Tablo 19: Kalıp DNA hazırlamak için gerekli solüsyonlar**

2. 20 µl seyreltilmiş kütüphane bu karışıma toplam 900 µl olacak şekilde eklenir.
3. 100 µl Ion sphere parçacıkları 1dk yüksek hızda vorteks yapılarak eklenir. Toplam hacimi 1000 µl olan karışım maksimum hızda 5 sn vorteks yapılır.
4. Ion One Touch Plus Reaction Filter'ı dik konumda tutulacak şekilde uygun bir spora yerleştirilir.
5. 1000 µl lik karışımımızı bu filtreye aktarılır.
6. Üzerine yavaş ve dikkatli bir şekilde 1000 µl Reaction Oil ve 500 µl Reaction Oil koyulur. Baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
7. Aparat yavaş ve dikkatlice ters çevrilir. İki faz ayrımının birbirine karışmamasına dikkat edilir
8. Aparat Ion One Touch cihazına takılır.
9. Ion One Touch cihazının çalıştırılır. Cihazın ekranında cihazın nasıl çalıştırılmasına dair yönerge takip edilir. Yaklaşık 3 saatlik bir çalışmadan sonra PCR ürünü ortaya çıkar.
10. PCR ürünündeki tüpün pelletinin karşı yönünde üsteki sıvı 50 µl kalana kadar çekilir.

11. İki tp birleştirilir ve pelleti pipetaj yaparak üzülür. zerine 1ml Ion One Touch Wash solüsyonu koyulur.

12. 15.500 x g 'de 2.5 dk santrifüj yapılır. Pelletin karşı yönünden 100 µl kalana kadar çekilir. Pelleti yine vortekslendikten sonra üzerine 100 µl Ion One Touch Wash solüsyonu eklenir ve bu aşama 3 kez tekrarlanır.

### **3.5. SEKANSLAMA**

Hazırlanan template DNA'sı 314 çipine yüklenerek cihazın yönergeleri takip edilir. Yaklaşık 3 saat sonra sonuçlar elde edilir.

## 4. BULGULAR VE ANALİZ

### 4.1. PRİMER TASARIMI

	Forward Primer	Length-F	Tm-F
IL2RA-1F	GGAGGCTGCCTGACCAGAATCTTGTC	26	67.04
IL2RA-2F	CTCAACGTGGCAGCTGTTCCCACC	24	68.13
IL2RA-3F	TAGGACAGTCTCCAACAGGCCCTG	24	65.50
IL2RA-4F	TCTGTTCAAGCTGGGACATCCGTCG	25	66.70
IL2RA-5F	GTGCTGATCCAGCAAAGAGTGGGTGG	26	67.67
IL2RA-6F	ACAACACCGCTCAAGAGGTCATTGTAGC	28	67.11
IL2RA-7F	ATCACCGCAGAGCCCGTGGTTCAG	24	69.02
IL2RA-8F	AGGGTTGGCTTCAAGTCTACCTTCTTGC	28	66.71
IL2RA-9F	TGTTTGACCACTGCTTCTGGTGCCT	25	66.85
IL2RA-10F	TGTGTGTCAACCTTCAGGTGTGGCT	25	66.56
IL2RA-11F	GGAGCCTCACATTCATTGAGCACCCA	26	67.04
IL2RA-12F	CACAGTGCTGGCTAGAAACCAAGTGC	26	66.39

	Reverse Primer	Length-R	Tm-R	Block Length
IL2RA-1R	TGAGAAAGGTGCCTTCAATAACGTGCCA	28	66.89	3958
IL2RA-2R	AATCAGGGCCTGTTGGAGACTGTCC	25	66.30	4206
IL2RA-3R	TCTGCTTCCACTATGTGCCTGAGCT	25	65.82	4711
IL2RA-4R	GGGGTAGTAACTTTTGGGTCAATCCGGT	27	66.12	4812
IL2RA-5R	CCAGGCAACAGAATGAAGGCTGCT	24	65.72	4926
IL2RA-6R	TCTAGGTGGGCTTCCCAAAGCCAC	24	66.53	4822
IL2RA-7R	GCAAGAAGGTAGACTTGAAGCCAACCCT	28	66.71	4545
IL2RA-8R	CTCACTAAAGGCACCAGAAGCAGTGGT	27	66.69	4499
IL2RA-9R	GACCCTGTCACCTCCTGCAAGGGGTG	25	68.71	4765
IL2RA-10R	TTCATGTTGCAGTGCTGGCCTCTG	24	65.92	4938
IL2RA-11R	TGGTCCTCACTCTAAACCAGTGACAC	27	66.41	4592
IL2RA-12R	CCTACCAGCCATCTGTGAGCATTCT	26	66.19	3127

**Tablo 20: Tasarlanan primerler**

## 4.2. DNA İZOLASYONU

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2012.05.23

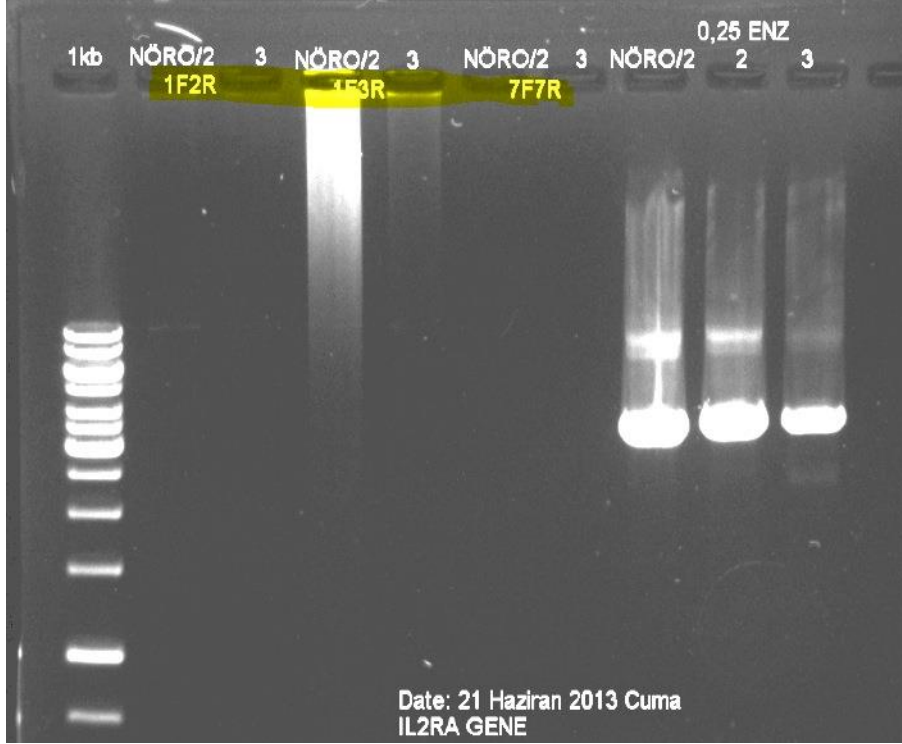
Analyte:dsDNA

Page:1/1

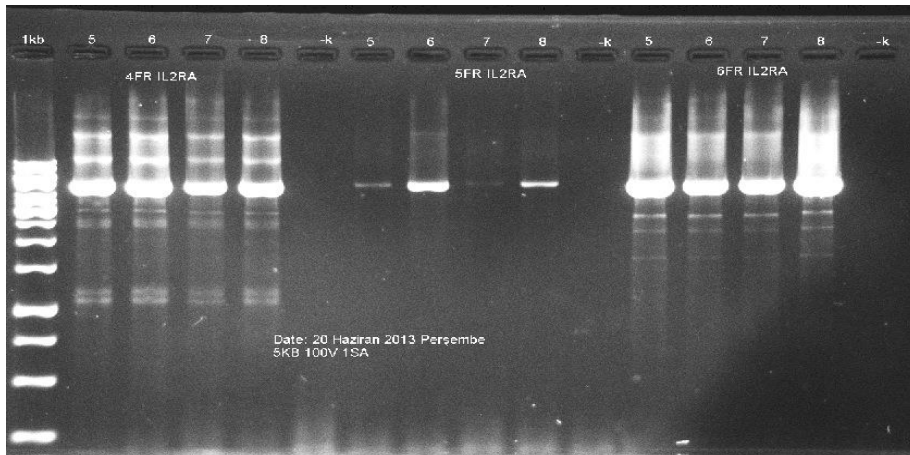
No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	20120523	12.05.23 09:29:41			-1,23	3,09	4,86	-0,050	-0,033	-0,030	-0,025	0,677	1,000
2	20120523	12.05.23 09:31:14			-0,03	-2,55	0,06	0,066	0,067	0,058	0,066	0,677	1,000
3	23.05.2012N/ [REDACTED]	12.05.23 09:32:49			514,50	1,97	1,99	10,371	5,307	5,256	0,081	0,677	1,000
4	23.05.2012N/ ÖZGÜL MA	12.05.23 09:33:47			547,21	1,59	1,56	11,078	7,028	7,130	0,134	0,677	1,000
5	23.05.2012N/ AYSEL GÜ	12.05.23 09:34:35			338,57	2,00	1,82	6,873	3,489	3,828	0,102	0,677	1,000
6	23.05.2012N/S [REDACTED]	12.05.23 09:35:19			443,91	1,81	1,81	8,957	4,983	4,989	0,078	0,677	1,000
7	23.05.2012N/ METE RİZ	12.05.23 09:36:31			901,30	2,00	2,04	18,189	9,191	8,989	0,163	0,677	1,000
8	23.05.2012N/ [REDACTED]	12.05.23 09:37:19			1134,23	2,01	2,15	22,847	11,445	10,691	0,163	0,677	1,000
9	23.05.2012N/ [REDACTED]	12.05.23 09:37:58			755,89	1,88	1,81	15,497	8,431	8,715	0,379	0,677	1,000
10	23.05.2012N/ [REDACTED]	12.05.23 09:38:50			400,72	1,99	1,89	8,477	4,497	4,708	0,463	0,677	1,000

**Tablo 21: Hasta DNA'sı izolasyon sonuçları**

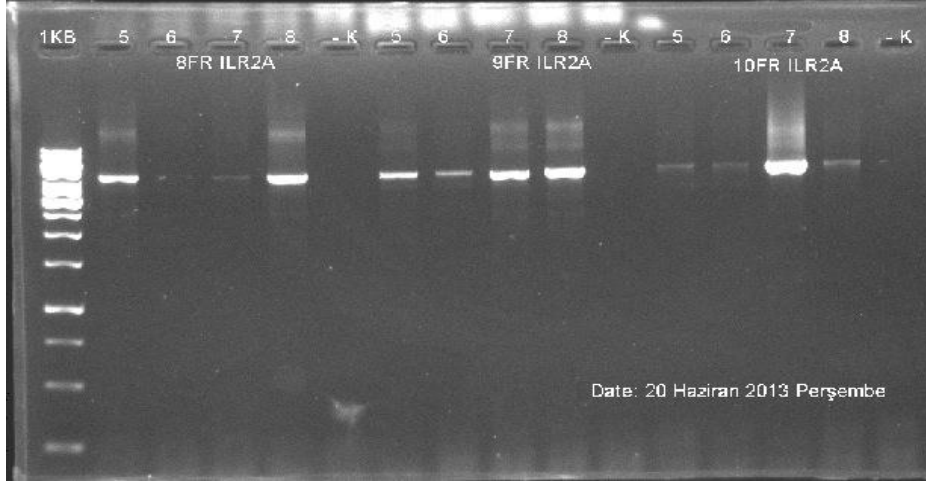
### 4.3. KÜTÜPHANE HAZIRLAMA



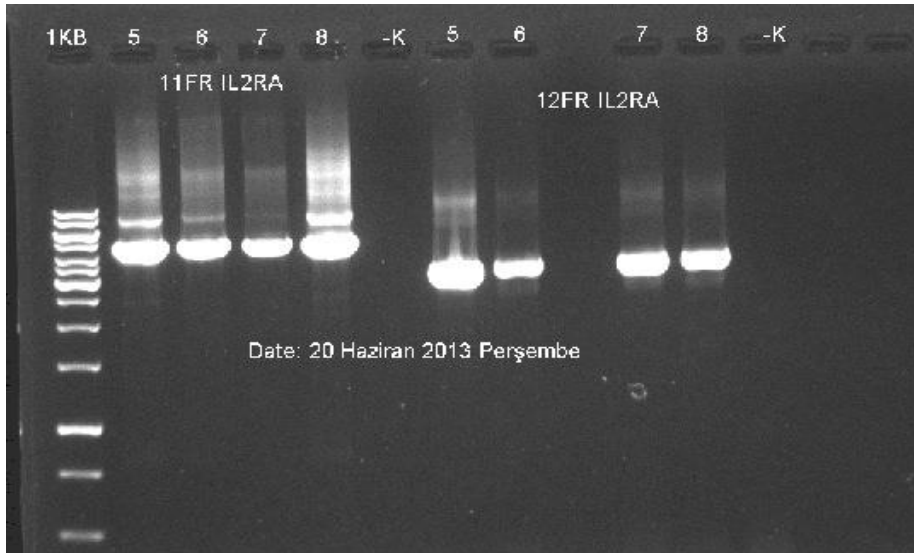
**Resim 1: 2. ve 3. hastaların DNA'sından çoğaltılan 1.,3., ve 7., blokların PCR görüntüleri**



**Resim 2: 5. , 6., 7., ve 8. hastaların DNA'sından çoğaltılan 4.,5., ve 6., blokların PCR görüntüleri**



**Resim 3: 5. , 6., 7., ve 8. hastaların DNA'sından çoğaltılan 8.,9., ve 10. blokların PCR görüntüleri**

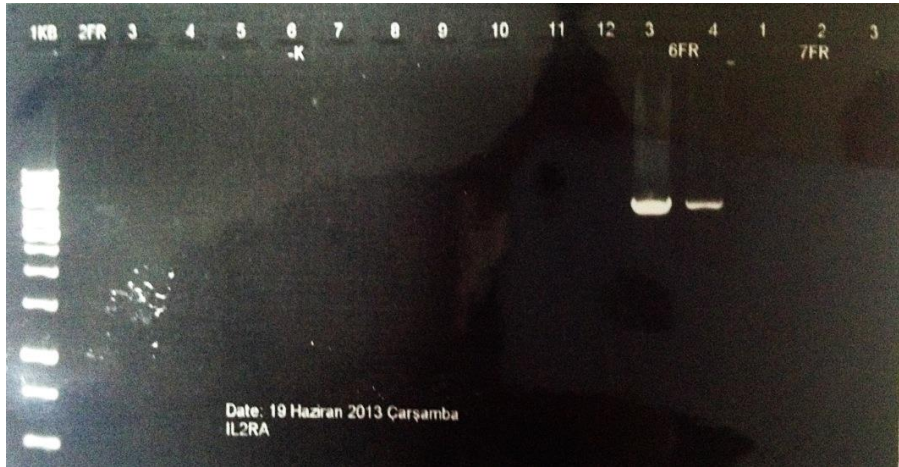


**Resim 4: 5. , 6., 7., ve 8. hastaların DNA'sından çoğaltılan 11. ve 12. blokların PCR görüntüleri**

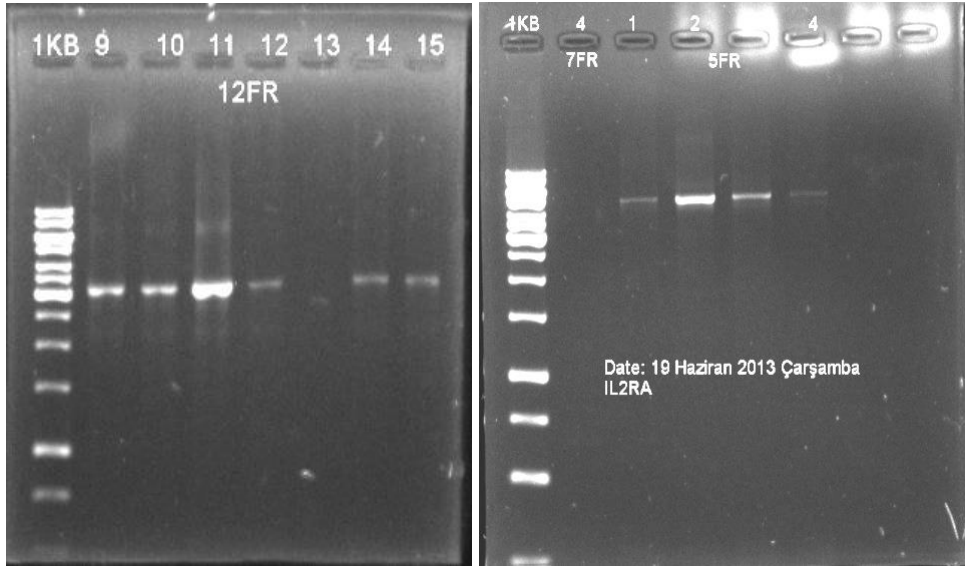




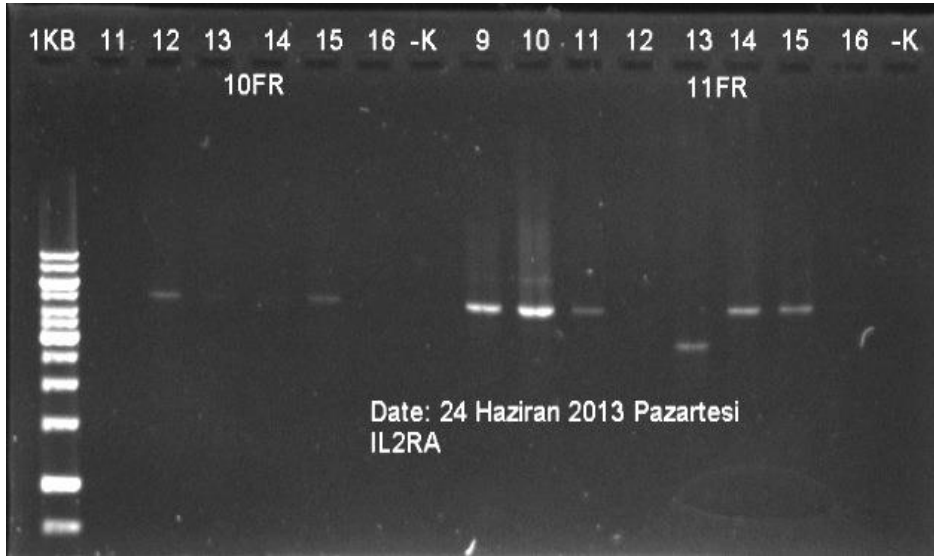
**Resim 5: 5. , 6., 7., ve 8. hastaların DNA'sından çoğaltılan 8.,9., ve 10., blokların PCR görüntüleri**



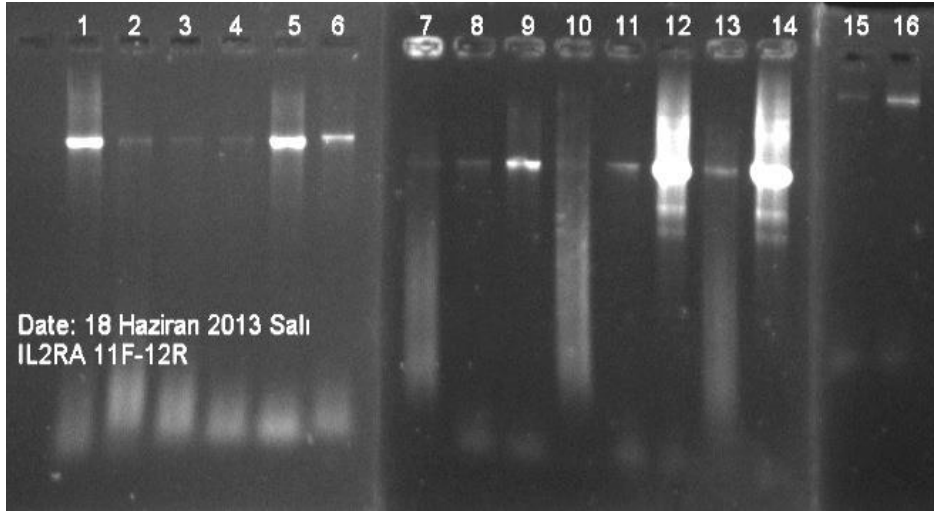
**Resim 6: 3. ve 4. hastaların DNA'sından çoğaltılan 6. ve 7. blokların PCR görüntüleri**



**Resim 7: 1. , 2., 3., 4., 9., 10., 11., 12., 13., 14., ve 15. hastaların DNA'sından çoğaltılan 8.,9., ve 10. blokların PCR görüntüleri**

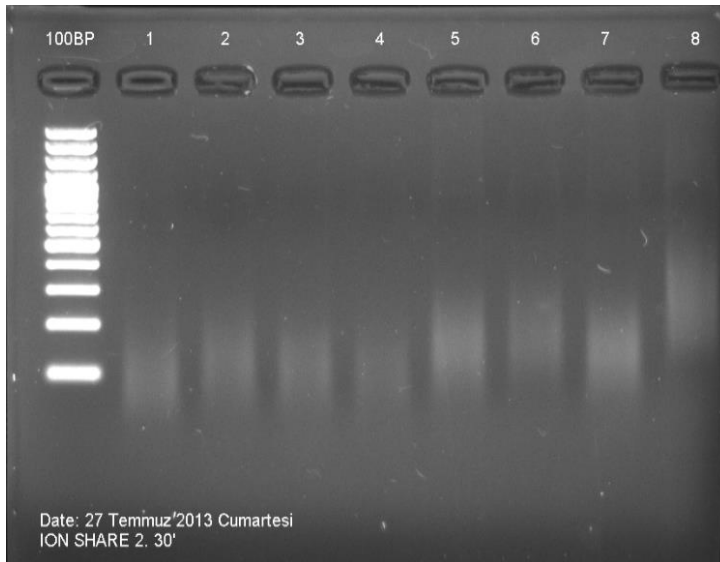


**Resim 8: 11., 12., 13., 14., 15. ve 16. hastaların DNA'sından çoğaltılan 10. ve 11. blokların PCR görüntüleri**



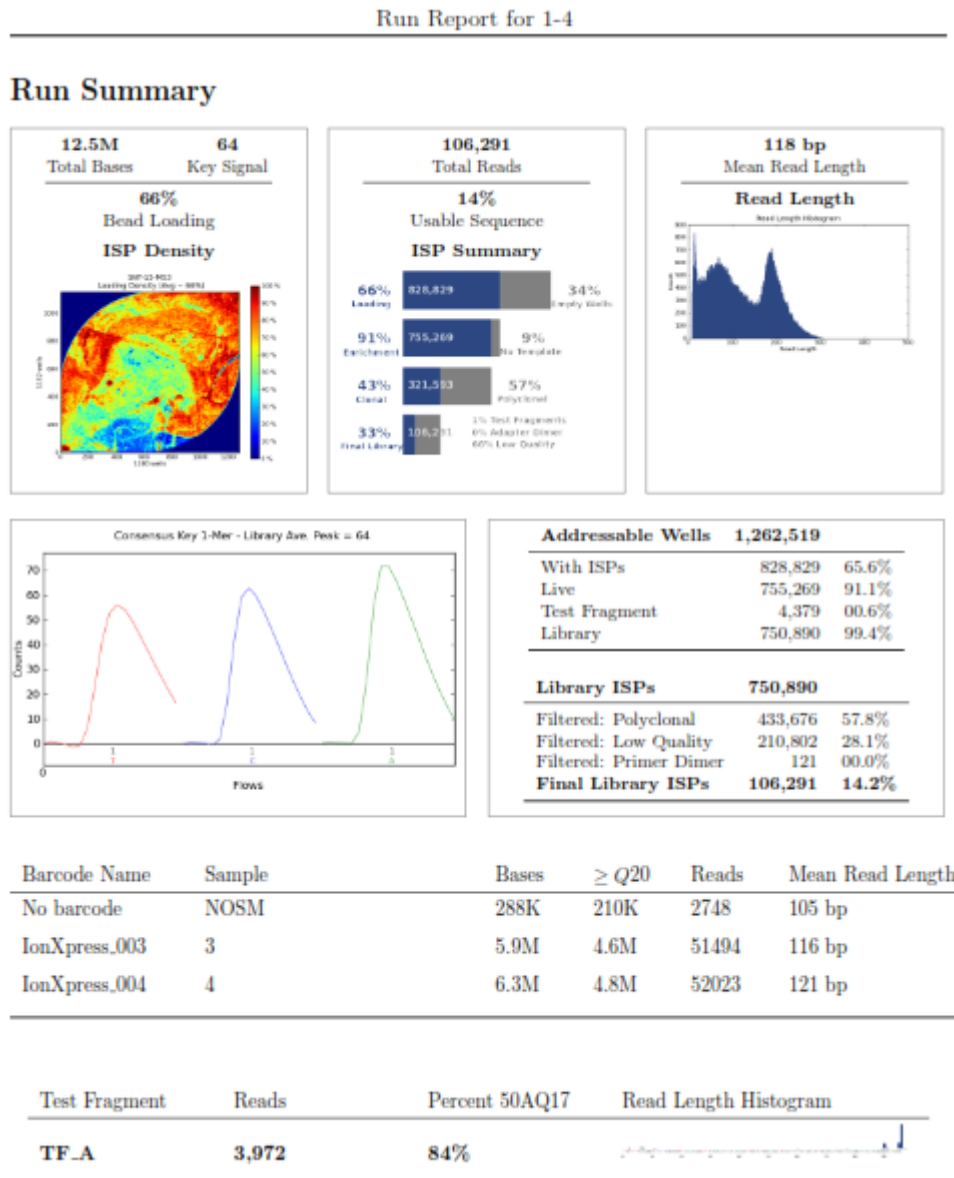
**Resim 9: 1. , 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., ve 15. hastaların DNA'sından çoğaltılan 11. ve 12. blokların PCR görüntüleri**

#### 4.4. DNA PARÇALAMA GÖRÜNTÜLERİ



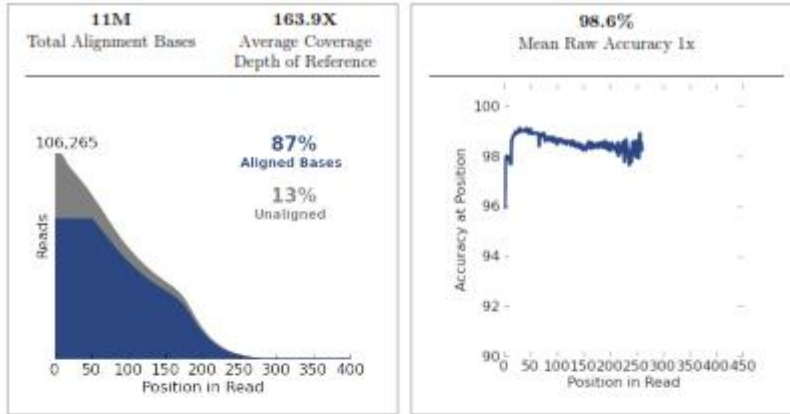
**Resim 10: Bioruptor cihazı ve enzimatik parçalama sonrası 1-8 hasta görüntüsü**

## 4.5. SEKANS RAPORLARI

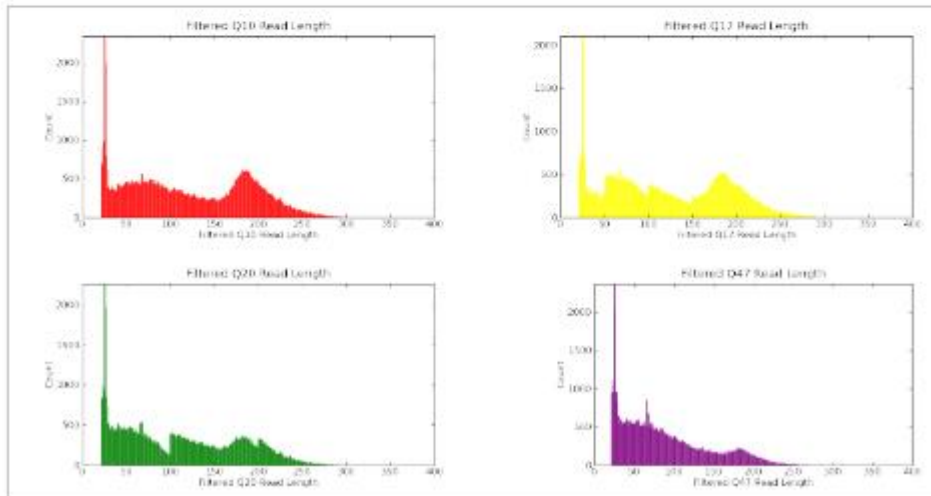


Şekil 12: 3 ve 4 nolu hastanın 1. Sekans raporu

## Run Report for 1-4

Alignment Summary (*aligned to homosapiens IL2RA*)

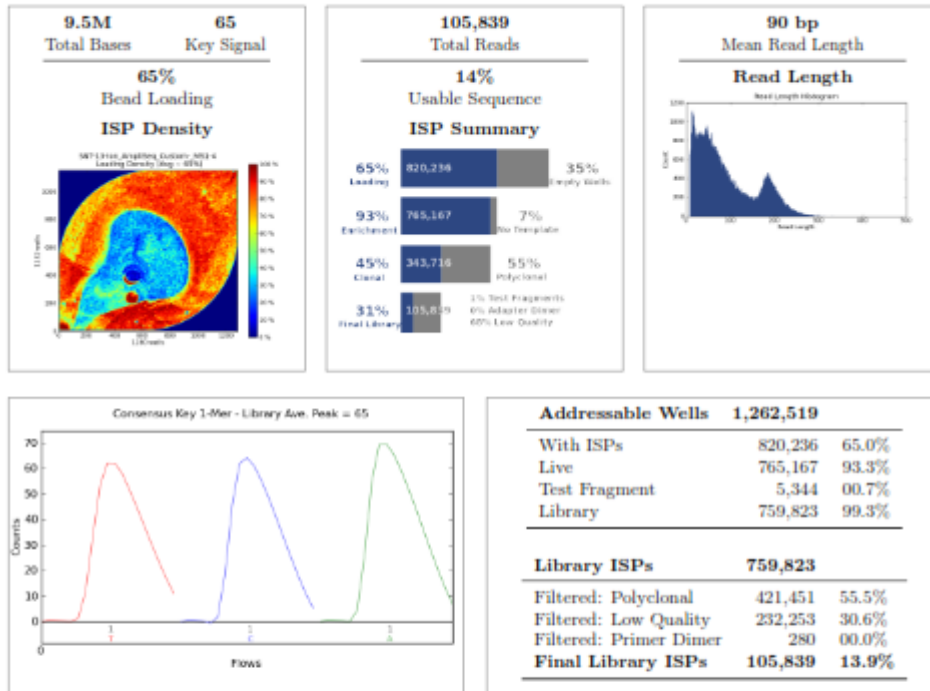
	AQ17	AQ20	Perfect
<b>Total Number of Bases [Mbp]</b>	9.6M	8.1M	6.2M
<b>Mean Length [bp]</b>	120	109	87
<b>Longest Alignment [bp]</b>	304	304	302
<b>Mean Coverage Depth</b>	143.2	121.8	93.2



Şekil 13: 3 ve 4 nolu hastanın 1. Sekans kalite raporu

## Run Report for 13-1-4

## Run Summary



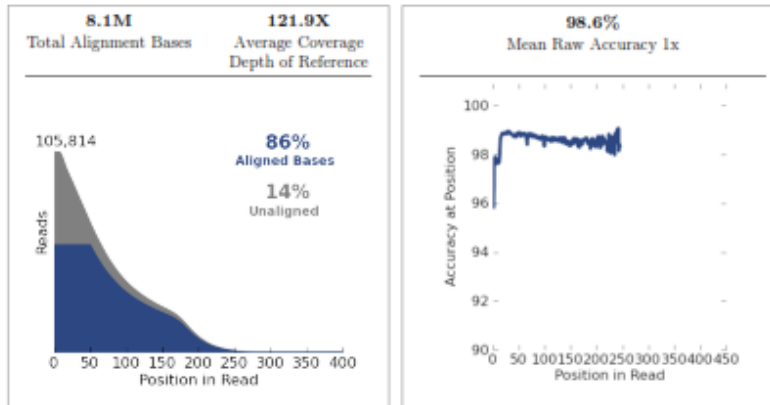
Notes: None

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	NOSM	245K	170K	3008	79 bp
IonXpress.003	3	4.6M	3.5M	51501	90 bp
IonXpress.004	4	4.6M	3.5M	51215	91 bp

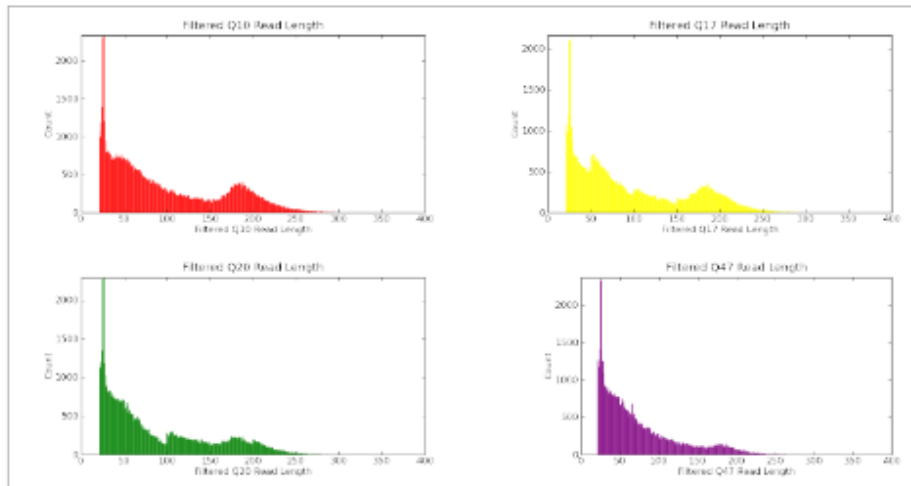
Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	4,547	74%	

Şekil 14: 3 ve 4 nolu hastanın 2. Sekans raporu

## Run Report for 13-1-4

Alignment Summary (*aligned to homosapiens IL2RA*)

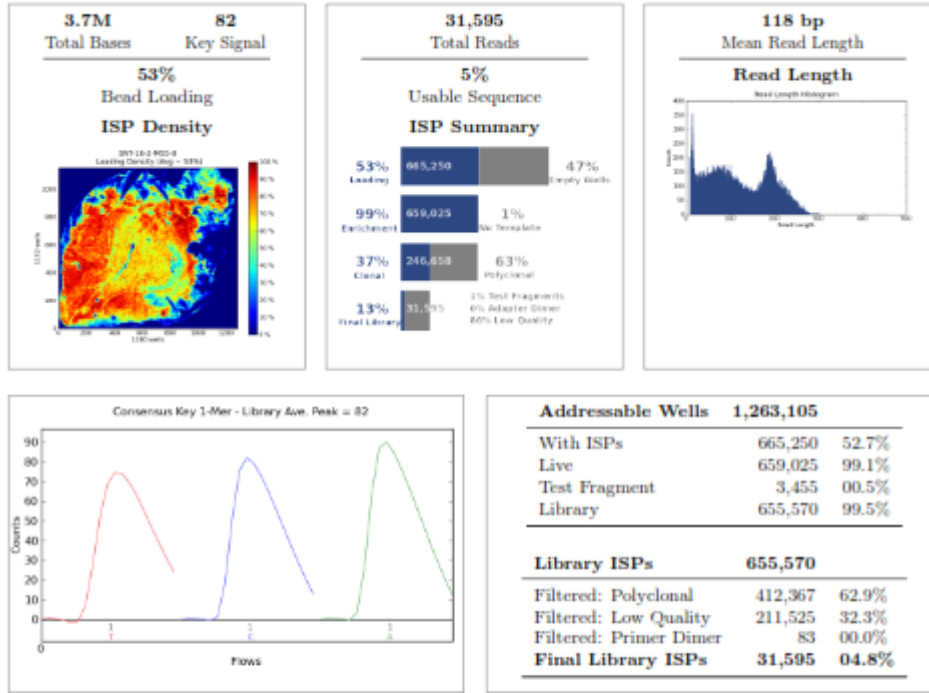
	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [Mbp]	6.9M	5.9M	4.8M
Mean Length [bp]	95	86	72
Longest Alignment [bp]	309	305	293
Mean Coverage Depth	103.7	89.2	72.8




Şekil 15: 3 ve 4 nolu hastanın 2. Sekans kalite raporu

## Run Report for 5-8

## Run Summary



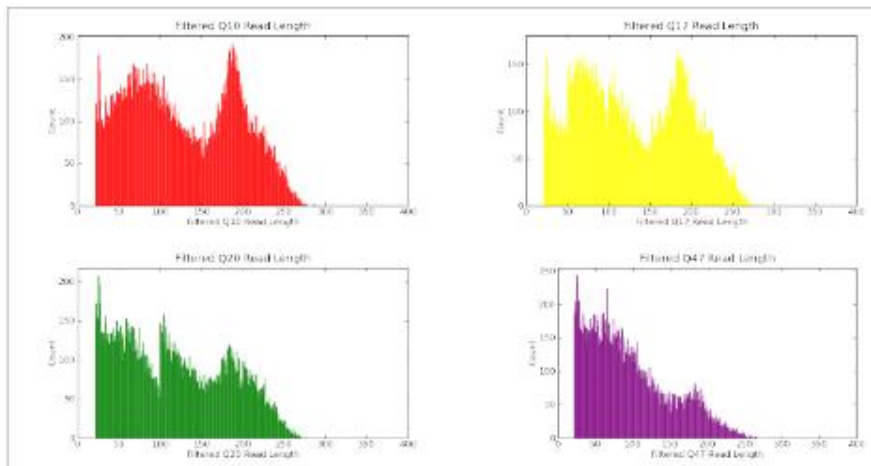
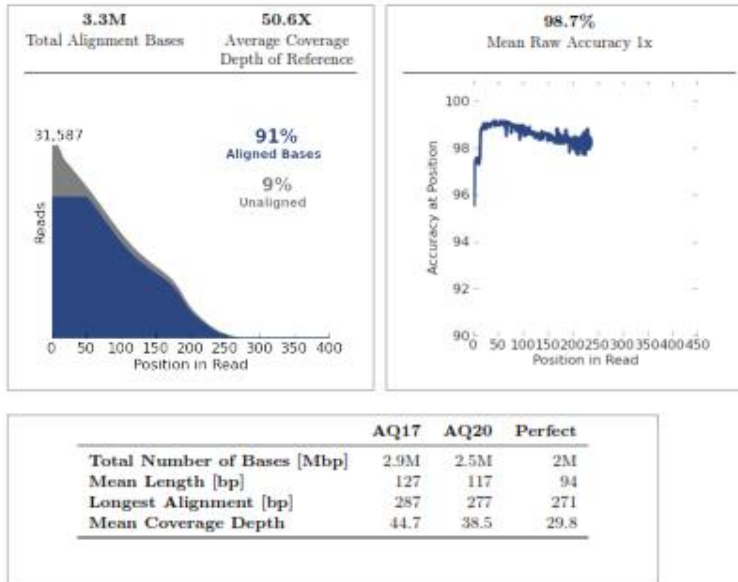
Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	NOSM	100K	56.7K	1558	64 bp
IonXpress_005	5	1.2M	1M	10250	125 bp
IonXpress_007	7	1.4M	1.1M	12200	121 bp
IonXpress_008	8	873K	707K	7579	115 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	3,074	83%	

Şekil 16: 5,7 ve 8 nolu hastanın 1. Sekans raporu



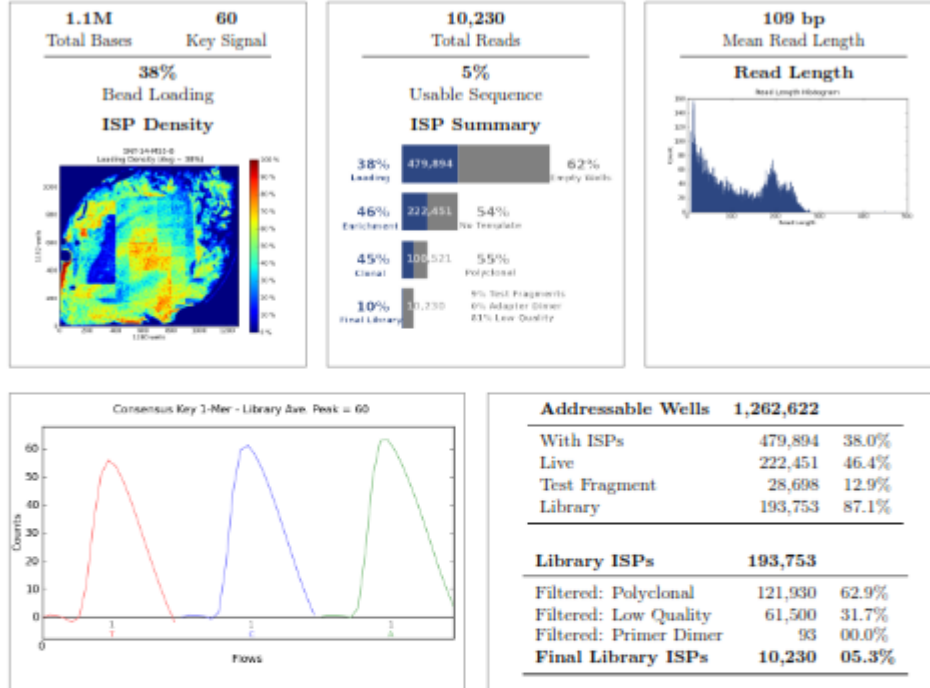
## Run Report for 5-8

Alignment Summary (*aligned to homosapiens IL2RA*)

Şekil 17: 5,7 ve 8 nolu hastanın 1. Sekans kalite raporu

## Run Report for 14-5-8

## Run Summary

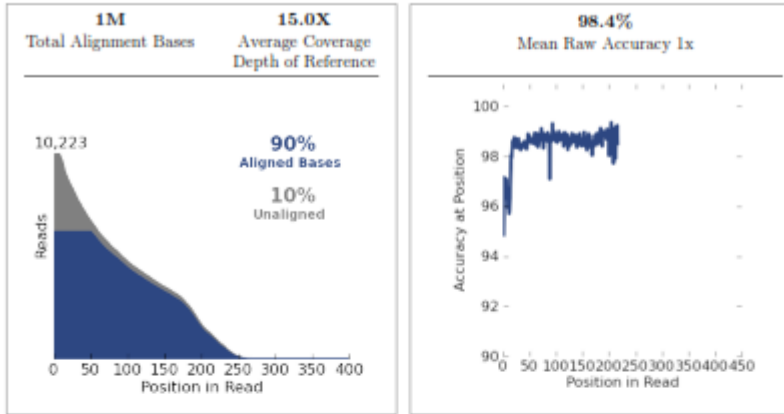


Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	NOSM	52.6K	23.9K	933	56 bp
IonXpress_005	5	423K	321K	3627	116 bp
IonXpress_007	7	403K	305K	3476	115 bp
IonXpress_008	8	236K	179K	2187	108 bp

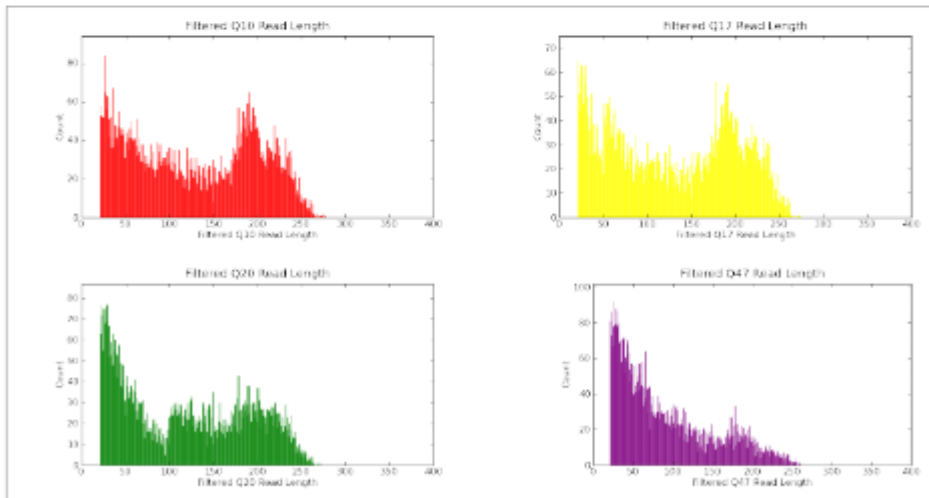
Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	8,464	69%	

Şekil 18: 5,7 ve 8 nolu hastanın 2. Sekans raporu

## Run Report for 14-5-8

Alignment Summary (*aligned to homosapiens IL2RA*)

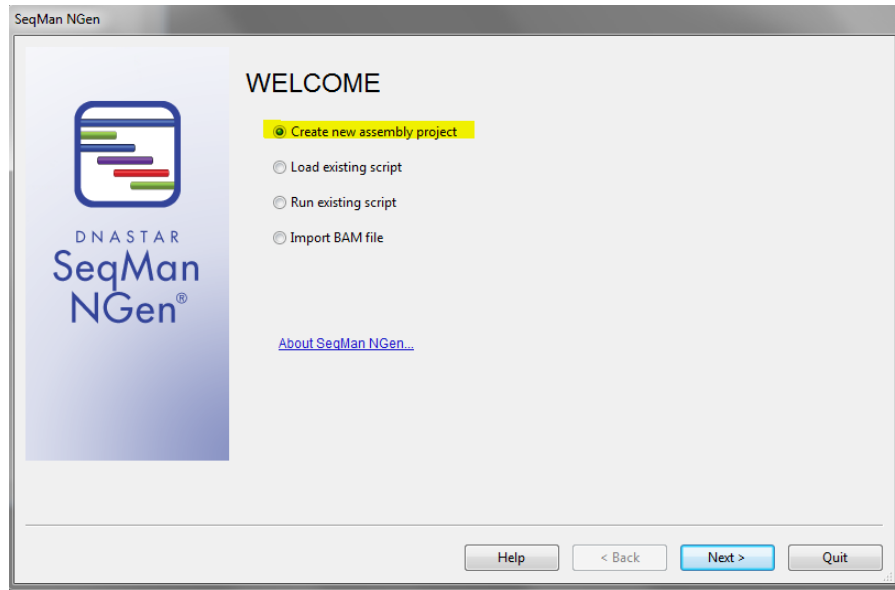
	AQ17	AQ20	Perfect
<b>Total Number of Bases [Mbp]</b>	845K	722K	534K
<b>Mean Length [bp]</b>	128	116	90
<b>Longest Alignment [bp]</b>	274	271	260
<b>Mean Coverage Depth</b>	12.6	10.8	8.0



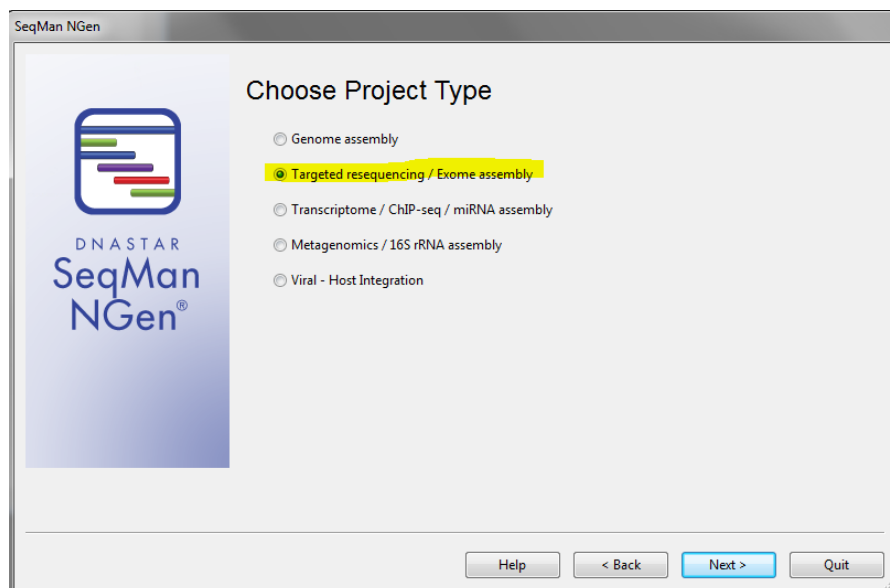
Şekil 19: 5,7 ve 8 nolu hastanın 2. Sekans kalite raporu

## 4.6. ANALİZ

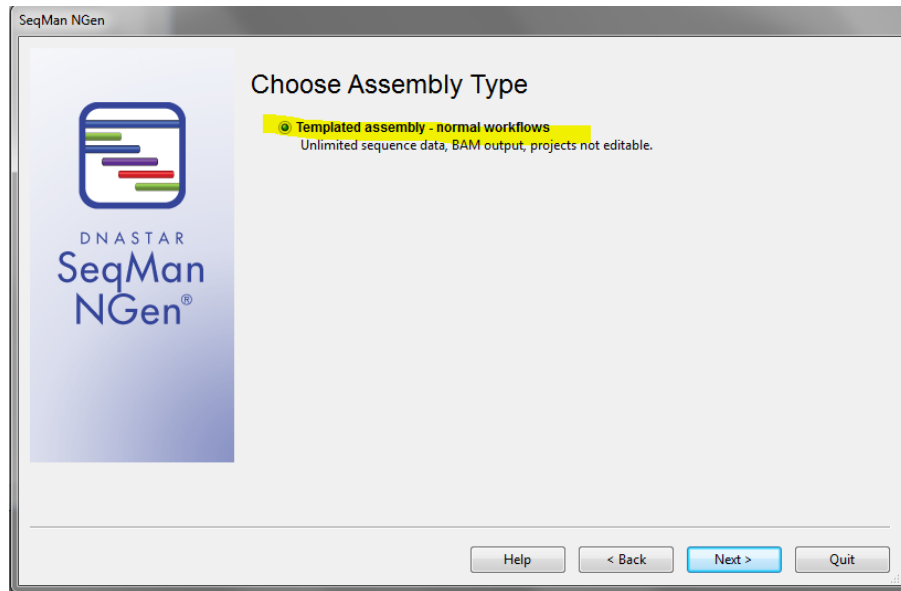
. DNASTAR yazılımında SeqMan aracı açılır ve yeni assembly projesi oluştur tıklanır.



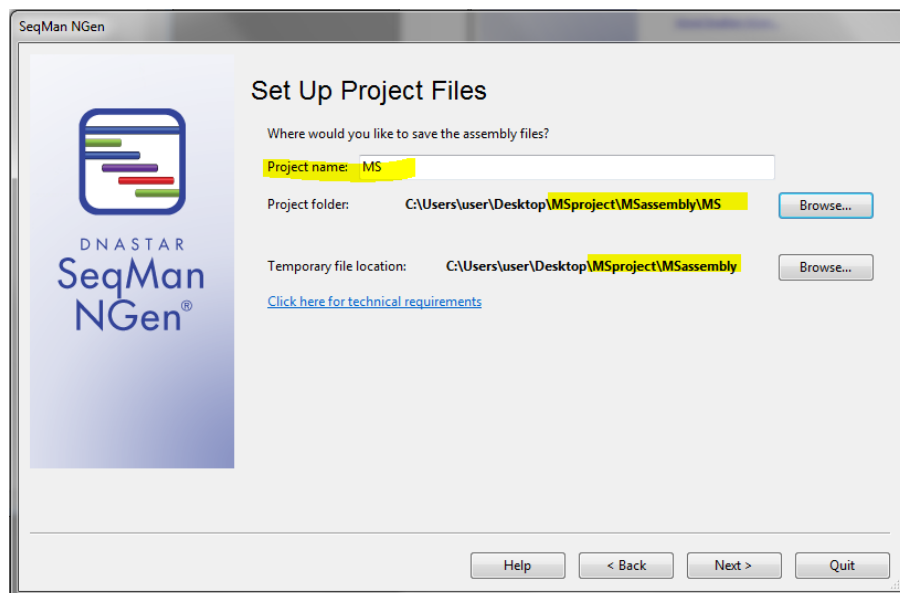
2. Proje çeşidinden Targeted resequencing seçilir.



3. Assembly çeşidi olarak “Templated assembly” seçilir.

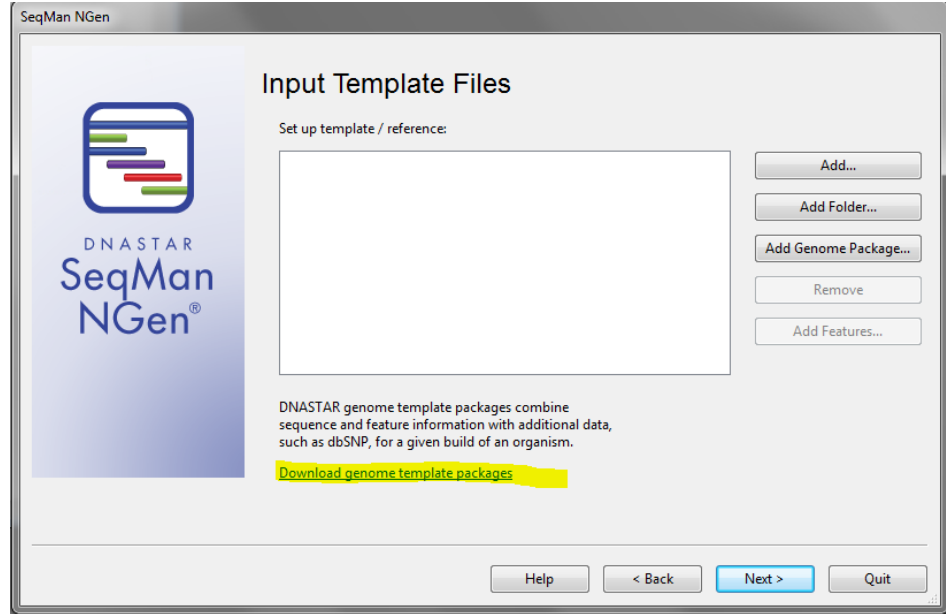


4. Proje dosyası belirlenir



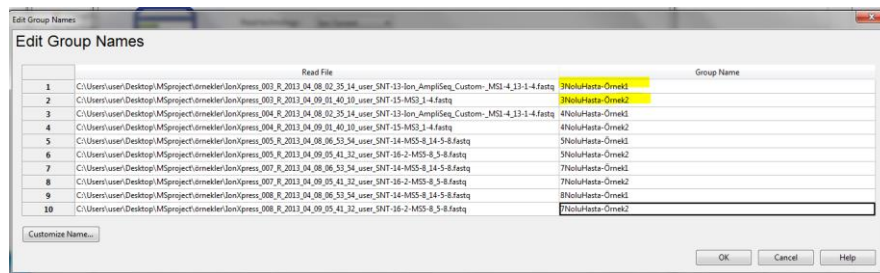
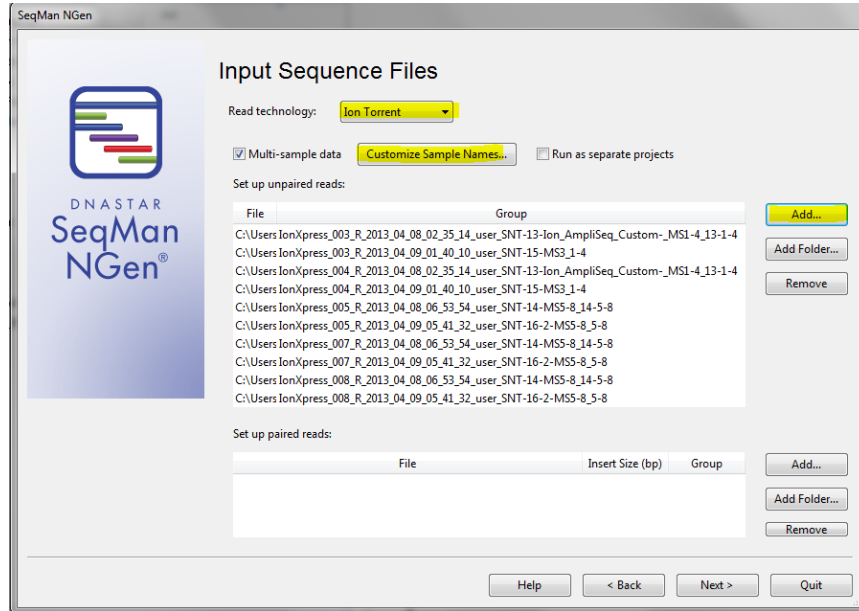
## Referans genom oluşturulması

1. Referans genom için Human-GRCh37-db138 genom template indirilir ve bu Templated Kromozom 10 bölgesi için bir template oluşturulur.

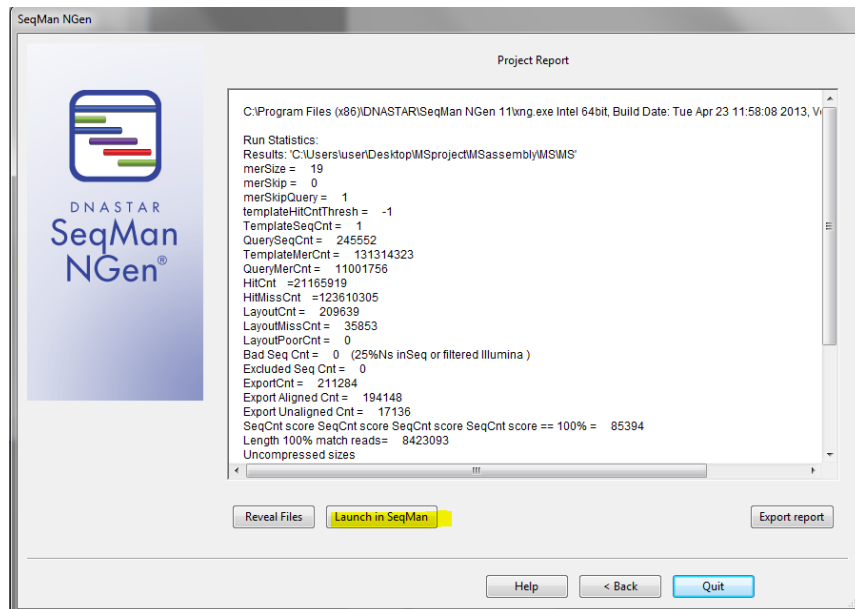
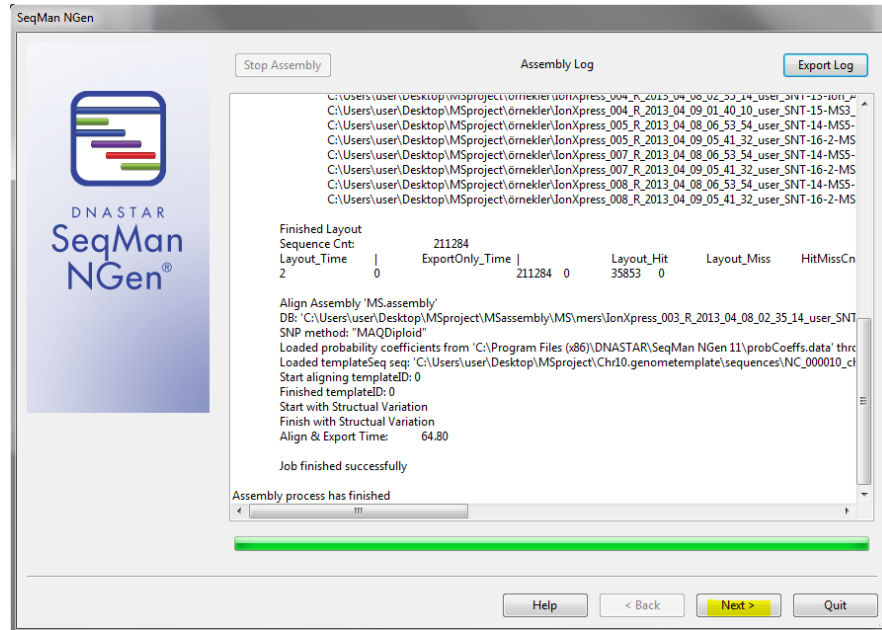


Available Data Packages				
Organism	dbSNP Build	Assembly	Compressed File Size (MB)	Decompressed File Size (MB)
<i>Apis mellifera</i>	138	Amel_4.5	101	348
<i>Arabidopsis thaliana</i>	138	TAIR10	83	347
<i>Bos taurus</i>	138	UMD_3.1	1,190	3,670
<i>C. elegans</i>	138	WS195	37	145
<i>Danio rerio</i>	138	Zv9	581	1,820
<i>Gallus gallus</i>	138	4.0	479	1,470
<b>Homo sapiens</b>	<b>138</b>	<b>GRC37.p13</b>	<b>3,460</b>	<b>6,890</b>
<i>Homo sapiens</i> , CEU reference	137	GRCh37.p5/hg19	3,110	6,260

## 5. Sekans dosyaları yüklenir ve örnekler isimlendirilir.

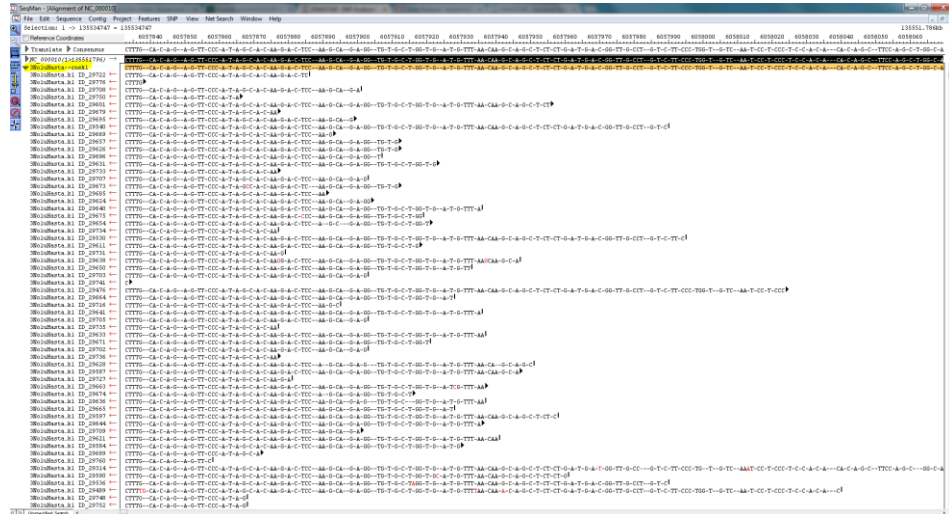


## 6. Program çalıştırılır.

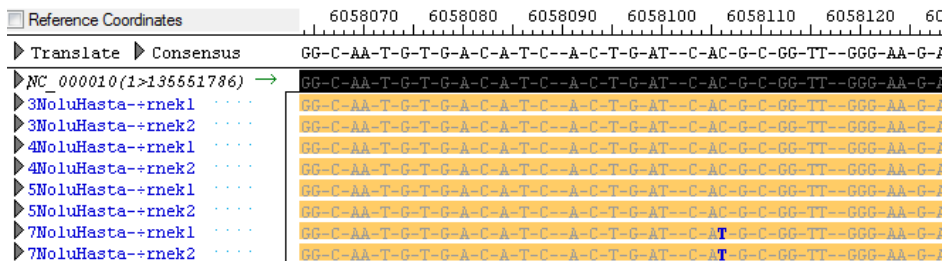




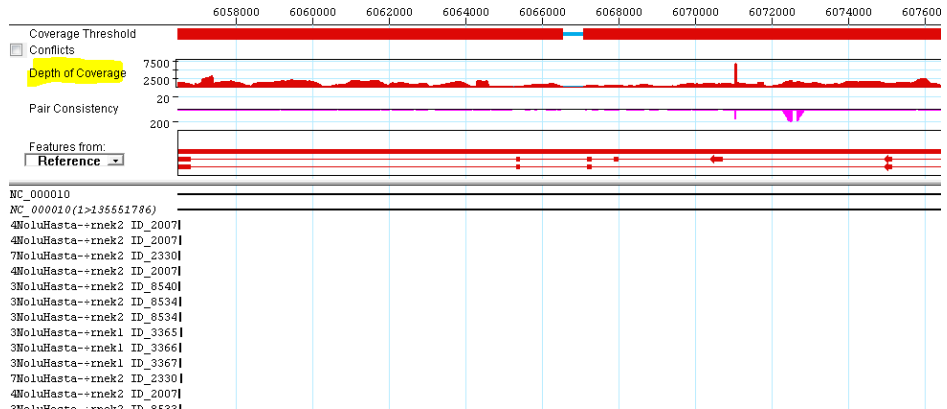
7. SeqMan programı açılır ve hizalamalar görüntülenir.



Selection: 1 -> 135534747 = 135534747



Selection: 6077421 -> 6077421 = 1



8. SNP butonundan SNP re port tıklanır. Depth değeri min. 30, P not Ref değeri %95, Q cal değeri 10 olarak filtrelenir.

SeqMan - [SNP Statistics Report from NC\_000010]

File Edit Sequence Contig Project Features SNP View Net Search Window Help

SNPs Summary

Confirmed SNP  Show All SNPs  Show Counts as a percent  Show Codon Base & Distance to feature  Show All [Coding/NonCoding...]

Rejected SNP  Max SNP SNP Percent Filter keep range min.  to max.  Depth:  P Not Ref:  Q Cal:

1463 SNP Columns Reported 0 Confirms 0 Features 1463 Masked 0 Filtered 23

SNP	MD	Contig ID	Contig Pos	Ref Pos	Type	Ref Base	Called Base	Sequence	Impact	Heteropolymer	SNP %	Post-ref	Q cal	Feature Type	Feature Name	DNA Change	A
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	805324	805313	SNP	O	GA	Hetero Ref			40.0%	100.00%	60.00	mRNA	L2RA [3]		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8053979	8053163	SNP	T	TIA	Hetero Ref			60.0%	100.00%	60.00	mRNA	L2RA [3]		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8054875	8053980	SNP	C	TIC	Hetero Ref			60.0%	88.50%	13.95	mRNA	L2RA [3]		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8071120	8056171	Indel	O	GC	Hetero Ref			31.6%	99.40%	22.25	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8073352	8065310	Indel	-	TI	Hetero Ref		Heteropolymer	33.3%	99.90%	32.34	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8073973	8065616	SNP	A	GA	Hetero Ref			26.3%	97.40%	15.71	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8073999	8065634	SNP	T	TIC	Hetero Ref			29.4%	100.00%	37.71	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8073982	8065636	SNP	O	A	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8074876	8066185	SNP	T	TIA	Hetero Ref			54.2%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8075544	8066586	SNP	T	TIC	Hetero Ref		Heteropolymer	20.0%	86.70%	14.73	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8075551	8066590	Indel	-	TI	Hetero Ref			31.3%	100.00%	35.17	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8075554	8066591	Indel	C	Cj	Hetero Ref			26.3%	99.80%	27.37	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8077421	8067689	SNP	A	GA	Hetero Ref			61.9%	100.00%	52.33	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8078155	8068010	Indel	-	TI	Hetero Ref			20.9%	95.20%	13.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8078271	8068077	Indel	-	Aj	Hetero Ref			20.9%	95.10%	14.42	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8078982	8068947	SNP	O	C	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8088488	8077849	SNP	A	C	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8088909	8077931	SNP	T	C	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8090945	8079044	SNP	T	TIC	Hetero Ref			44.4%	100.00%	40.40	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8091710	8079846	SNP	O	GA	Hetero Ref			40.0%	86.10%	13.95	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8092032	8080749	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8092989	8080794	SNP	C	OIC	Hetero Ref			44.4%	100.00%	33.47	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8093462	8081040	SNP	T	TIC	Hetero Ref			50.0%	100.00%	40.16	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8094760	8081924	SNP	A	C	Homo Variant			75.0%	100.00%	23.48	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8095587	8082959	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8100989	8087926	SNP	A	GA	Hetero Ref			40.0%	82.20%	2.15	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	8102111	8087965	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	105157200	105149655	SNP	O	A	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	TAF5		
?	BhoulHasta-mmk1	NC_000010	105157212	105149655	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	TAF5		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765206	765291	SNP	C	T	Homo Variant			66.7%	99.80%	9.88				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765424	765415	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765479	765482	SNP	T	C	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765477	765464	SNP	O	A	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765490	765475	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	765502	765486	SNP	O	A	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	4855600	4855539	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00				
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8053924	8053123	SNP	O	A	Homo Variant			82.8%	100.00%	60.00	mRNA	L2RA [3]		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8053978	8053163	SNP	T	A	Homo Variant			84.1%	100.00%	60.00	mRNA	L2RA [3]		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8054875	8053980	SNP	C	T	Homo Variant			82.8%	100.00%	41.61	mRNA	L2RA [3]		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8054904	8053986	Indel	-	T	Homo Variant			10.2%	86.20%	2.95	mRNA	L2RA [3]		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8056959	8054389	Indel	O	GC	Hetero Ref		Heteropolymer	46.3%	100.00%	60.00	mRNA	L2RA [3]		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8057450	8055222	SNP	T	A	Homo Variant			86.4%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8059108	8055664	SNP	C	T	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8058433	8055913	Indel	-	T	Homo Variant		Heteropolymer	72.7%	100.00%	16.59	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8059099	8055665	Indel	-	Aj	Hetero Ref			24.5%	94.60%	7.48	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8060539	8057075	SNP	-	T	Homo Variant		Heteropolymer	87.5%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8060789	8057221	SNP	T	O	Homo Variant			87.5%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8062278	8059112	Indel	O	GC	Hetero Ref			32.4%	100.00%	41.70	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8062827	8058223	SNP	A	O	Homo Variant			100.0%	100.00%	60.00	gene	L2RA		
?	7houlHasta-mmk2	NC_000010	8062917	8058495	Indel	-	C	Homo Variant		Heteropolymer	75.4%	99.70%	22.84	gene	L2RA		

SNPs Summary

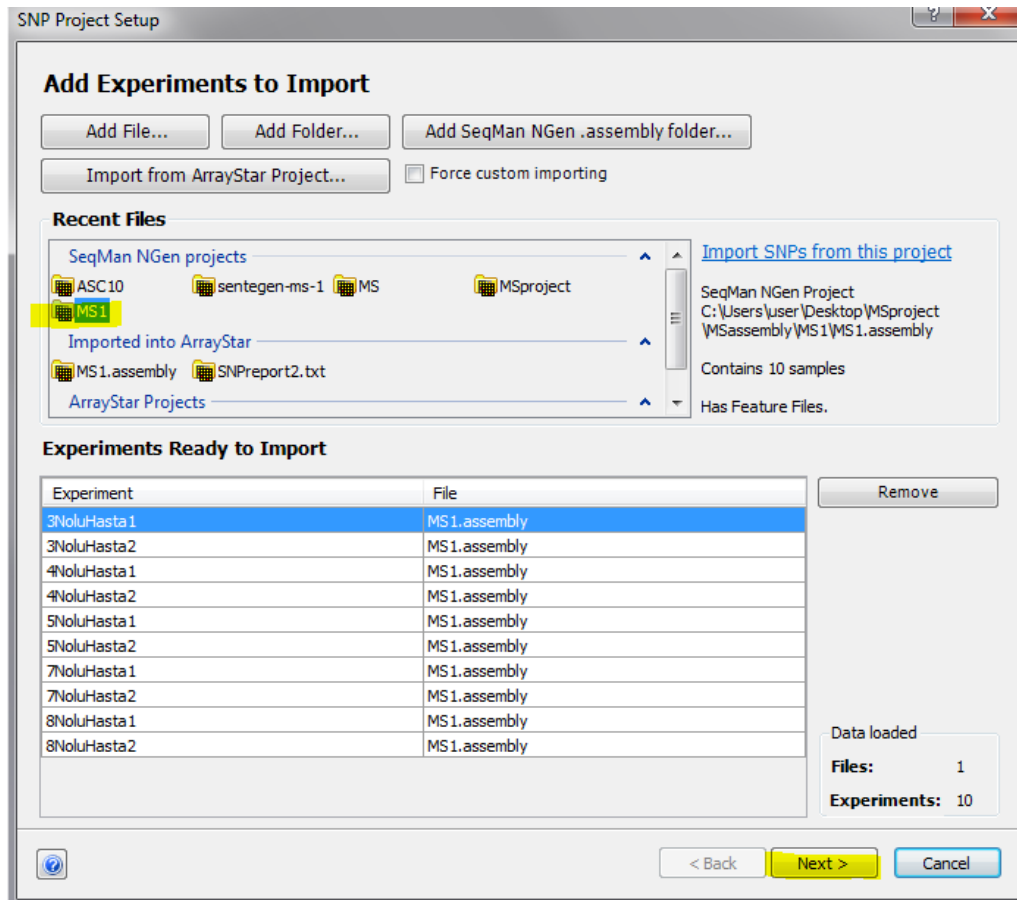
Confirmed SNP  Show All SNPs  Show Counts as a percent  Show Codon Base & Distance to feature  Show All [Coding/NonCoding...]

Rejected SNP  Max SNP SNP Percent Filter keep range min.  to max.  Depth:  P Not Ref:  Q Cal:

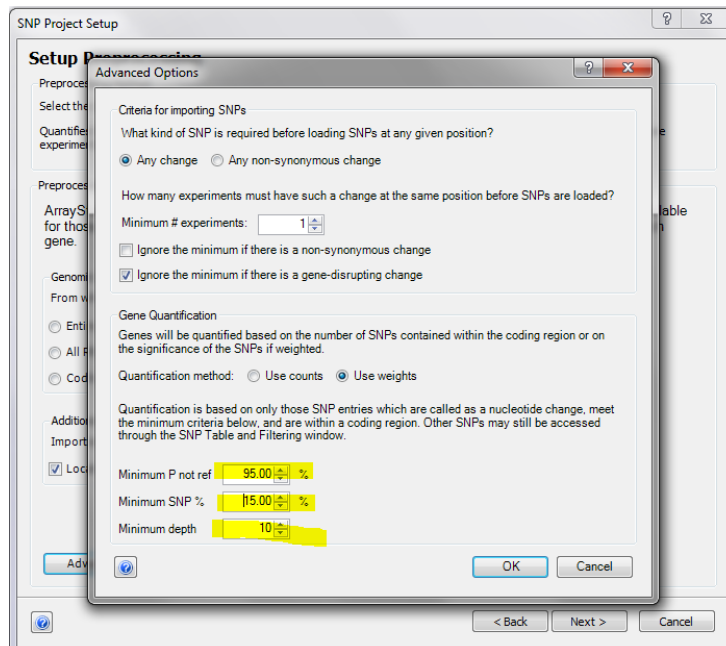
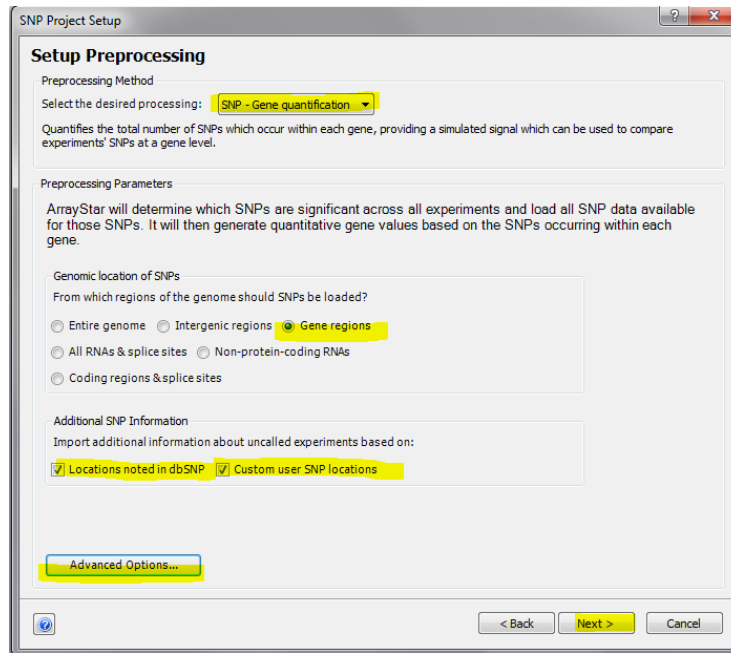
1113 SNP Columns Reported 0 Confirms 0 Features 1113 Masked 0 Filtered 103

SNP	MD	Contig ID	Contig Pos	Ref Pos	Type	Ref Base	Called Base	Sequence	Impact	Heteropolymer	SNP %	Post-ref	Q cal	Feature Type	Feature Name	DNA Change	Amino Acid Change	Depth	A Cnt	C Cnt	G Cnt	T Cnt
?	4N_48242	NC_000010	8070504	8063554	Indel	C	Cj	Hetero Ref	Fr. shift		20.1%	100.00%	60.00	CDS	L2RA [3]	A->TGC		472	0	-	0	0
?	3N_48242	NC_000010	8070504	8063554	Indel	C	Cj	Hetero Ref	Fr. shift		27.5%	100.00%	43.32	CDS	L2RA [3]	A->ATGC		40	0	-	0	0
?	4N_48242	NC_000010	8080495	8078034	Indel	-	T	Homo Variant	Ho. overlap		75.0%	100.00%	41.37	gene	L2RA			40	0	4	0	
?	4N_48242	NC_000010	8080495	8078034	Indel	-	T	Homo Variant	Ho. overlap		80.0%	100.00%	18.08	gene	L2RA			24	0	2	0	
?	3N_48242	NC_000010	8080495	8078034	Indel	-	Tj	Hetero Ref	Ho. overlap		54.4%	100.00%	14.93	gene	L2RA			57	0	5	0	
?	3N_48242	NC_000010	8080495	8078034	Indel	-	Tj	Hetero Ref	Ho. overlap		45.5%	100.00%	18.21	gene	L2RA			23	0	4	0	
?	4N_48242	NC_000010	8080495	8078034	Indel	-	Tj	Hetero Ref	Ho. overlap		27.0%	100.00%	18.21	gene	L2RA			42	0	0	0	

9. SNP annotasyonu için ArrayStar programı açılır ve bir önceki çalışma sonuçları buraya yüklenir.



10. İstenilen işlem için “SNP-Gene quantification” seçilir bölge için “Gene regions” seçilir ve dbSNP’de olan lakasyonlar işaretlenesin butonu da işaretlenir. Filtreleme yapılır , minimum depth: 10, minimum SNP %: 15, minimum p not for ref: 95.



## 11. Daha sonra hastalardaki varyasyonlar listelenir.

ArrayStar\*

File Edit Filter Data Clustering Graphs Statistics View Help

SNP Table Experiment List

SNP Table

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	3NoluHasta1 - Called Seq	4NoluHasta1 - Called Seq	5NoluHasta1 - Called Seq	7NoluHasta1 - Called Seq	8NoluHasta1 - Called Seq	3NoluHasta2 - Called Seq	4NoluHasta2 - Called Seq	5NoluHasta2 - Called Seq	7NoluHasta2 - Called Seq	8NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010.6052663	IL2RA	-	A -	A -					A -				
NC_000010.6052727	IL2RA	A			CJA					CJA			
NC_000010.6052826	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6052954	IL2RA	-				G -							
NC_000010.6052962	IL2RA	G	G -						G -				
NC_000010.6053133	IL2RA	G					A	GJA				A	GJA
NC_000010.6053163	IL2RA	T					A	TJA				A	TJA
NC_000010.6053253	IL2RA	-	T -				T -		T -	-	T -		T -
NC_000010.6053259	IL2RA	T					T		T -				
NC_000010.6053286	IL2RA	G				GJA					GJA		
NC_000010.6053369	IL2RA	-	A -						A -				
NC_000010.6053374	IL2RA	A	G		GJA				G				
NC_000010.6053519	IL2RA	-							G				
NC_000010.6053568	IL2RA	C			TJC		T	TJC		TJC	TJC	T	TJC
NC_000010.6053686	IL2RA	-				T						T	
NC_000010.6053827	IL2RA	C			TJC					TJC			
NC_000010.6053915	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6054205	IL2RA	-							T -				
NC_000010.6054234	IL2RA	-							G -				
NC_000010.6054389	IL2RA	G	G -		G -		G -		G -		G -		G -
NC_000010.6054986	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6055124	IL2RA	C				GIC					GIC		
NC_000010.6055222	IL2RA	T					A					A	
NC_000010.6055604	IL2RA	C					T					T	
NC_000010.6055813	IL2RA	-	T -	T	T -	T	T -		T -	T	T -	T	T
NC_000010.6055972	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6056007	IL2RA	G							G		G -		G -
NC_000010.6056081	IL2RA	C									C -		C -
NC_000010.6056115	IL2RA	-							A -				A -

ArrayStar\*

File Edit Filter Data Clustering Graphs Statistics View Help

SNP Table Experiment List Gene Ontology Set List

SNP Table

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	3NoluHasta1 - Called Seq	4NoluHasta1 - Called Seq	5NoluHasta1 - Called Seq	7NoluHasta1 - Called Seq	8NoluHasta1 - Called Seq	3NoluHasta2 - Called Seq	4NoluHasta2 - Called Seq	5NoluHasta2 - Called Seq	7NoluHasta2 - Called Seq	8NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010.6052663	IL2RA	-	A -	A -					A -				
NC_000010.6052727	IL2RA	A			CJA					CJA			
NC_000010.6052826	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6052954	IL2RA	-				G -							
NC_000010.6052962	IL2RA	G	G -						G -				
NC_000010.6053133	IL2RA	G					A	GJA				A	GJA
NC_000010.6053163	IL2RA	T					A	TJA				A	TJA
NC_000010.6053253	IL2RA	-	T -				T -		T -	-	T -		T -
NC_000010.6053259	IL2RA	T					T		T -				
NC_000010.6053286	IL2RA	G				GJA					GJA		
NC_000010.6053369	IL2RA	-	A -						A -				
NC_000010.6053374	IL2RA	A	G		GJA				G				
NC_000010.6053519	IL2RA	-							G				
NC_000010.6053568	IL2RA	C			TJC		T	TJC		TJC	TJC	T	TJC
NC_000010.6053686	IL2RA	-				T						T	
NC_000010.6053827	IL2RA	C			TJC					TJC			
NC_000010.6053915	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6054205	IL2RA	-							T -				
NC_000010.6054234	IL2RA	-							G -				
NC_000010.6054389	IL2RA	G	G -		G -		G -		G -		G -		G -
NC_000010.6054986	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6055124	IL2RA	C				GIC					GIC		
NC_000010.6055222	IL2RA	T					A					A	
NC_000010.6055604	IL2RA	C					T					T	
NC_000010.6055813	IL2RA	-	T -	T	T -	T	T -		T -	T	T -	T	T
NC_000010.6055972	IL2RA	-				T -							
NC_000010.6056007	IL2RA	G							G		G -		G -
NC_000010.6056081	IL2RA	C									C -		C -

## 5. SONUÇLAR

a. 3 Notlu hastanın her iki örneğinin varyasyon sonuçları.

Ref Seq : referans , Called Seq: Sekans sonucu

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	3NoluHasta1 - Called Seq	3NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010	6052663	IL2RA	-	A -	A -
NC_000010	6052962	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6053253	IL2RA	-	T -	T -
NC_000010	6053259	IL2RA	T		T -
NC_000010	6053369	IL2RA	-	A -	A -
NC_000010	6053374	IL2RA	A	G	G
NC_000010	6054205	IL2RA	-		T -
NC_000010	6054234	IL2RA	-		G -
NC_000010	6054389	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6055813	IL2RA	-	T -, T	T -, T
NC_000010	6056227	IL2RA	-		A -
NC_000010	6056294	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6056973	IL2RA	G		G -
NC_000010	6057231	IL2RA	T	T G	T G
NC_000010	6058416	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6058495	IL2RA	-	C	C
NC_000010	6058735	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6060433	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6060630	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6063319	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6063383	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063554	IL2RA	C		C -
NC_000010	6063674	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6064311	IL2RA	C		C -
NC_000010	6064617	IL2RA	-	A -	A -
NC_000010	6064880	IL2RA	T		T -
NC_000010	6065171	IL2RA	G		G -
NC_000010	6065611	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6065636	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6065790	IL2RA	-		T -
NC_000010	6066195	IL2RA	T	T A	T A
NC_000010	6066462	IL2RA	G	G A	G A

NC_000010	6066532	IL2RA	-		T -
NC_000010	6067594	IL2RA	C	C -	
NC_000010	6067688	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6068110	IL2RA	-		T -
NC_000010	6068177	IL2RA	-		A -
NC_000010	6068547	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6077796	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6077931	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6077965	IL2RA	C	C -	-
NC_000010	6078032	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6078079	IL2RA	C	A	A
NC_000010	6078796	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6079034	IL2RA	-	T -	T -
NC_000010	6079037	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6079152	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6079344	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6079479	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6079846	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6079922	IL2RA	C		C -
NC_000010	6080637	IL2RA	A	C A	C A
NC_000010	6080648	IL2RA	A	A -	A -
NC_000010	6080748	IL2RA	A	G	G
NC_000010	6080794	IL2RA	C	G C	G C
NC_000010	6081040	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6081924	IL2RA	A	C A	C A
NC_000010	6087026	IL2RA	A	C	C
NC_000010	6087794	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6089571	IL2RA	G	G A	G A

**Tablo 22: 3Nolu hasta varyasyon sonuçları**

b. 4 Nolu hastanın her iki örneğinin varyasyon sonuçları.

Ref Seq : referans , Called Seq: Sekans sonuçları

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	4NoluHasta1 - Called Seq	4NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010	6052727	IL2RA	A	C A	C A
NC_000010	6053374	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6053519	IL2RA	-		T
NC_000010	6053568	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6053827	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6054389	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6055813	IL2RA	-	T -, T -	T -, T -
NC_000010	6055972	IL2RA	-	T -	
NC_000010	6056007	IL2RA	G		G -
NC_000010	6056081	IL2RA	C		C -
NC_000010	6056227	IL2RA	-		A -
NC_000010	6056294	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6056318	IL2RA	G		G -
NC_000010	6056548	IL2RA	-	A -	A -
NC_000010	6056749	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6057231	IL2RA	T	T -	
NC_000010	6057473	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6057732	IL2RA	G	T G	T G
NC_000010	6057812	IL2RA	-		A -
NC_000010	6057969	IL2RA	G		G -
NC_000010	6058112	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6058247	IL2RA	C		C -
NC_000010	6058495	IL2RA	-	C -	C -, C -
NC_000010	6058735	IL2RA	G	G C	G C
NC_000010	6059074	IL2RA	C		C -
NC_000010	6059075	IL2RA	C		C -
NC_000010	6059584	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6059690	IL2RA	C		C -
NC_000010	6059704	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6059898	IL2RA	C	C A	C A
NC_000010	6060433	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6060630	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6061751	IL2RA	C		C -



NC_000010	6061781	IL2RA	T	C	C -
NC_000010	6061787	IL2RA	C		C -
NC_000010	6061808	IL2RA	G		G -
NC_000010	6062051	IL2RA	T	A	A
NC_000010	6062382	IL2RA	G		G -
NC_000010	6062748	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6062915	IL2RA	T	T -	T -
NC_000010	6062916	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6062931	IL2RA	G		G -
NC_000010	6062995	IL2RA	-	G -	
NC_000010	6063016	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063227	IL2RA	-	G -	
NC_000010	6063253	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6063291	IL2RA	T		T -
NC_000010	6063319	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6063383	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063554	IL2RA	C		C -
NC_000010	6063674	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063750	IL2RA	T		T -
NC_000010	6064149	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6064215	IL2RA	G		G -
NC_000010	6064617	IL2RA	-	A -	A -
NC_000010	6064618	IL2RA	-		A -
NC_000010	6065611	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6065636	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6065790	IL2RA	-		T -
NC_000010	6066200	IL2RA	C	G C	G C
NC_000010	6066462	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6066532	IL2RA	-		T -
NC_000010	6066568	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6067303	IL2RA	C	C A	C A
NC_000010	6067594	IL2RA	C	C -	
NC_000010	6068110	IL2RA	-		T -
NC_000010	6068177	IL2RA	-		A -
NC_000010	6068547	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6077796	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6077845	IL2RA	T	T G	T G
NC_000010	6077931	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6077965	IL2RA	C	C -	C -
NC_000010	6078390	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6078751	IL2RA	T		T -
NC_000010	6079017	IL2RA	C	T C	T C

NC_000010	6079034	IL2RA	-	T	T
NC_000010	6079344	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6079479	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6080354	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6080748	IL2RA	A	G	G
NC_000010	6081040	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6081230	IL2RA	C	C A	C A
NC_000010	6081924	IL2RA	A	C	C
NC_000010	6091017	IL2RA	T	T A	T A
NC_000010	6091146	IL2RA	G		G -
NC_000010	6091148	IL2RA	C	T	T

**Tablo 23: 4 Nolu hasta varyasyon sonuçları**

c. 5 Nolu hastanın her iki örneğinin varyasyon sonuçları.

Ref Seq : referans , Called Seq: Sekans sonuçları

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	5NoluHasta1 - Called Seq	5NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010	6055124	IL2RA	C	G C	G C
NC_000010	6056007	IL2RA	G		G -
NC_000010	6057231	IL2RA	T	T G	T G
NC_000010	6057732	IL2RA	G	T G	T G
NC_000010	6058112	IL2RA	G		G -
NC_000010	6058495	IL2RA	-	C -, C	C
NC_000010	6058735	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6059584	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6059704	IL2RA	G		G A
NC_000010	6059898	IL2RA	C	C A	C A
NC_000010	6061781	IL2RA	T	C	C -
NC_000010	6062382	IL2RA	G		G -
NC_000010	6062751	IL2RA	C		C -
NC_000010	6062915	IL2RA	T	T -	T -
NC_000010	6062916	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6062922	IL2RA	-		G -, C -
NC_000010	6063016	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063253	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6063383	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6063674	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6077796	IL2RA	T	C	C

NC_000010	6077845	IL2RA	T	T G	T G
NC_000010	6077931	IL2RA	T	C	C
NC_000010	6078079	IL2RA	C	C A	C A
NC_000010	6078728	IL2RA	C	C -	C -
NC_000010	6079034	IL2RA	-	T	T
NC_000010	6079344	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6079479	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6079846	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6080648	IL2RA	A	A -	
NC_000010	6080674	IL2RA	-	A -	
NC_000010	6080712	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6080748	IL2RA	A	G	G
NC_000010	6080794	IL2RA	C	G C	G C
NC_000010	6081381	IL2RA	-	T -	
NC_000010	6081924	IL2RA	A	C	C

**Tablo 24: 5 Nolu hasta varyasyon sonuçları**

d. 7 Nolu hastanın her iki örneğinin varyasyon sonuçları

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	7NoluHasta1 - Called Seq	7NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010	6053133	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6053163	IL2RA	T	A	A
NC_000010	6053568	IL2RA	C	T	T
NC_000010	6054389	IL2RA	G	G -	G -
NC_000010	6055222	IL2RA	T	A	A
NC_000010	6055604	IL2RA	C	T	T
NC_000010	6057231	IL2RA	T	G	G
NC_000010	6058112	IL2RA	G		G -
NC_000010	6058495	IL2RA	-	C	C
NC_000010	6058711	IL2RA	-		T -
NC_000010	6058735	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6064880	IL2RA	T		T -
NC_000010	6064952	IL2RA	-		A -
NC_000010	6065288	IL2RA	T		T -
NC_000010	6065636	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6065790	IL2RA	-	T -	T -

NC_000010	6066195	IL2RA	T	A	A
NC_000010	6067594	IL2RA	C	C	C
NC_000010	6067688	IL2RA	A	G	G
NC_000010	6068547	IL2RA	G	C	C
NC_000010	6086747	IL2RA	C		C
NC_000010	6087026	IL2RA	A	C	C
NC_000010	6087794	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6090046	IL2RA	C		C

**Tablo 25: 7 Nolu hasta varyasyon sonuçları**

e. 8 Nolu hastanın her iki örneğinin varyasyon sonuçları

Ref ID	Ref Pos	Gene Name	Ref Seq	8NoluHasta1 - Called Seq	8NoluHasta2 - Called Seq
NC_000010	6053133	IL2RA	G	G A	G A
NC_000010	6053163	IL2RA	T	T A	T A
NC_000010	6053253	IL2RA	-		T
NC_000010	6053568	IL2RA	C	T C	T C
NC_000010	6064311	IL2RA	C		C
NC_000010	6064952	IL2RA	-		A
NC_000010	6065171	IL2RA	G	G	
NC_000010	6065616	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6065634	IL2RA	T	T C	T C
NC_000010	6065636	IL2RA	G	A	A
NC_000010	6065790	IL2RA	-		T
NC_000010	6066195	IL2RA	T	T A	T A
NC_000010	6066590	IL2RA	-	T	T
NC_000010	6067688	IL2RA	A	G A	G A
NC_000010	6068110	IL2RA	-	T	
NC_000010	6068547	IL2RA	G	C	C

**Tablo 26: 8 Nolu hasta varyasyon sonuçları**

f. En az üç örnekte ortak bulunan varyasyon tablosu

	Ref	No3-1	No3-2	No4-1	No4-2	No5-1	No5-2	No7-1	No7-2	No8-1	No8-2	dbSNP	Varyant	Önemi
6063554	C		C -		C -							novel	exon	frameshift
6053374	A	G	G	G A	G A							rs12244380	exon	
6053568	C			T C	T C		T C	T	T	T C	T C	rs1570538	exon	Spain population
6056294	T	T C	T C	T C	T C							rs12722596	intron	
6057231	T	T G	T G	T -		T G	T G	G	G			rs11256342	intron	
6057732	G			T G	T G	T G	T G					rs2386841	intron	
6058735	G	C	C	G C	G C	C	C	C	C			rs4747837	intron	
6059704	G	G A		A	A		G A					rs3793713	intron	
6059898	C			C A	C A	C A	C A					rs7899538	intron	
6060433	C	T C	T C	T C	T C							rs12722588	intron	
6060630	C	T C	T C	T C	T C							rs12722587	intron	
6063016	T	C	C	C	C	C	C	C	C			rs942198	intron	
6063253	A			G A	G A	G A	G A					rs2076846	intron	
6063319	C	T C	T C	T C	T C							rs7093069	intron	
6063383	T	C	C	C	C	C	C		C			rs11256342	intron	
6063674	T	C	C	C	C	C	C	C	C			rs942200	intron	
6065611	A	G A	G A	G A	G A							rs7900744	intron	
6065636	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	rs7913476	intron	
6066195	T	T A	T A			A	T A	A	A	T A	T A	rs12358961	intron	
6066462	G	G A	G A	G A	G A							rs12722575	intron	
6067688	A	G A	G A				G A	G	G	G A	G A	rs2025345	intron	
6068547	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	rs7078547	intron	
6077796	T	C	C	C	C	C	C				T C	rs7910961	intron	
6077931	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	rs7911218	exon	non-coding

<b>6078079</b>	C	A	A			C A	C A					rs6602392	intron	
<b>6079344</b>	T	T C	T C	T C	T C	T C	T C	C	C	T C	T C	rs11256442	intron	
<b>6079479</b>	A	G A	G A	G A	G A	G A	G A					rs11256448	intron	
<b>6079846</b>	G	A	A			G A	G A	A	A	G A	G A	rs7072398	intron	
<b>6080748</b>	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	rs4405212	intron	
<b>6080794</b>	C	G C	G C			G C	G C	G	G	G C	G C	rs11256457	intron	
<b>6081040</b>	T	T C	T C	T C	T C					T C	T C	rs12722517	intron	
<b>6081924</b>	A	C A	C A	C	C	C	C	C	C	C	C	rs791591	intron	
<b>6087794</b>	G	G A	G A					A	A		G A	rs11256497	intron	
<b>6053253</b>	-	T -	T -		-		T -	T -			T -	novel indel	exon	
<b>6054389</b>	G	G -	G -	G -	G -		G -	G -	G -		G -	novel indel	exon	
<b>6058112</b>	G			G -	G -		G -		G -			rs12722702	intron	
<b>6058495</b>	-	C	C	C -	C -, C -	C -, C	C	C	C		C	novel indel	intron	
<b>6059584</b>	G			G -	G -	G -	G -		-			novel indel	intron	
<b>6062915</b>	T	T -	T -	T -	T -	T -	T -		C			rs59002005	intron	
<b>6062916</b>	G	G -	G -	G -	G -	G -	G -					rs59002005	intron	
<b>6064617</b>	-	A -	A -	A -	A -							rs41294689	intron	
<b>6065790</b>	-		T -		T -		T -	T -	T -		T -	novel indel	intron	
<b>6067594</b>	C	C -		C -		-	C -	C -	C -		C -	rs181789365	intron	
<b>6068110</b>	-		T -		T -			T -		T -		novel indel	intron	
<b>6077965</b>	C	C -	-	C -	C -	C -	C -		-		C -	rs7911218-	exon	Varyant yanı
<b>6079034</b>	-	T -	T -	T	T	T	T	T	T -		T	novel indel	intron	

**Tablo 27 : En az üç örnekte tespit edilen varyasyon tablosu**

## 6. TARTIŞMA

Multipl Skleroz hastalığı genelde yetişkinliğin ilk dönemlerinde görülen ve kronik nörolojik hasarlara sebep olan genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı bir hastalıktır. MS'e genetik katkının varlığı ailesel agregasyon, ikiz çalışmaları ve Avrupa orijinli popülasyonlarında ki yüksek insidansın Afrika ve Asya popülasyonları ile karşılaştırma çalışmaları ile kanıtlanmıştır [32]. Prevalans paterni kuzey Avrupa'lı grupların ve onların soyundan gelenlerin göçleri ile çaiklanabilir ve bu durum genetik faktörlerin MS'e katkıda bulunduğu hipotezini güçlendirmektedir [35]. İkizlerde ve kardeşlerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar genetik faktörlerin etkisini açıkça göstermektedir [27, 94]. Var olan bilgiler gösteriyor ki sadece tek bir gen MS hassasiyetini etkilemiyor, her biri çok az etki eden bir sürü gen MS'e katkıda bulunuyor [95]. Yapılan pek çok çalışmada kromozom 6p21 'deki HLA-DRB1 geninin test edilen popülasyonlarda majör risk olarak görev aldığı belirtiliyor [41]. Fakat bu durum MS'in genetik temelini tam olarak açıklayamıyor [96, 97]. HLA bölgeleri dışında şüphelinenen pek çok aday gen ya da genom tabanlı yaklaşımlar bulunmaktadır fakat bunlar daha valide edilmemişlerdir.

IL2RA (interleukin-2 receptor-alpha ) genindeki varyasyonlar, aday gen yaklaşımı ve tüm genom taramaları ile bu genin MS' katkıda bulunduğunu gösterdi.Uluslar arası Multipl Skleroz Genetiği Konsorsiyumu (IMSGSC) 'nin yaptığı iki farklı Avrupalı MS örneklerinin ( Fransız ve Alman) kullanıldığı çalışmada IL2RA genine ait iki adet SNP genotiplenmiş ve MS'le çok güçlü ilişkilerinin olduğu gözlenmiştir [77] . Bu SNP'ler rs12722489 ve rs2104286'dır. Bu IL2RA genindeki bu SNP'lerin risk ilişkisi kabul edilebilir değer aralığındadır (odds ratio,1.1-1.5). Fakat büyük ölçekli örnek sayılarındaki replikasyonları bu SNP'lerin MS'e duyarlılığına katkılarını daha ikna edici yapabilir.

Görüldüğü üzere MS'le ilişkilendirilmiş HLA olmayan genlerin belirlenmesi oldukça zordur. Türk toplumunda daha önce herhangi bir genom tabanlı (GWAS)

çalışması MS'le alakalı yapılmamıştır. Buna ilaveten Türk MS hastalarının HLA ve HLA olmayan genlerdeki SNP çalışmalarında mevcut değildir.

Biz de Türk toplumunda görülen MS'le ilişkili varyasyonları tespit etmenin ilk adımı olarak HLA olmayan genlerden ve daha önce içerdiği intronik 2 SNP'le MS'le yatkınlığı keşfedilmiş IL2RA genin Türk MS hasta örneklerinde tüm gen dizilemesini yeni nesil dizileme yöntemleri ile yapmaya karar verdik. Bu çalışmadaki amacımız MS hastalarının IL2RA genindeki varyasyonları tespit ederek gelecek çalışmalarla beraber hastalıkla ilişkilerini belirlemektir.

Toplam 5 adet hastanın 2'şer adet örneği olmak üzere genomik DNA'dan IL2RA gen bölgeleri ampikon şeklinde çoğaltıldı ve 10 örnek yeni nesil dizileme ile dizilendi. Dizileme işleminden sonra SNP analizi ve bu SNP'lerin dbSNP veri tabanı ile anotasyonları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre bütün hastalar da toplam 51 SNP ve 71 farklı indel olmak üzere 122 farklı varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlardan en az iki, üç, dört ve beş hastada ortak olan varyasyonlar listelenmiştir. En az iki hastada ortak olan varyasyonların listesine bakıldığında önem ifade eden değişiklikler tespit edilmiştir. En önemli bulgu 3 Nolu ve 4 Nolu hastada 6063554 referans pozisyonunda 4. Ekzonda tek alelde heterozigot 1 adet yeni (de novo) frameshift'e sebep olan delesyon keşfedilmiştir. Bu bulgulara ilaveten 3,5,7 ve 8 nolu hastalarda 6053253 lokasyonlu ekzon bölgesinde ve 3,4,5,7 ve 8 hastalarda 6053253 lokasyonlu ekzon bölgesinde de novo heterozigot insersiyon bulunmuştur. Fakat bu farklılıkların yeni bir varyasyon olduğunu söyleyebilmek için sanger sekansla konfirme edilmesi gerekmektedir. Ayrıca 3,5 7, ve 8 Nolu hastalarda da 6053568 pozisyonunda ekzon bölgesinde rs1570538 numaralı SNP bulunmuştur. rs1570538 SNP'inin özelliği İspanyol MS hastası popülasyonunda bulunmuş bir SNP'tir.

MS hastalığıyla sadece ekzonlarda varyasyonlar değil aynı zamanda intronlardaki varyasyonlarda hastalıkla ilişkili olabilir çünkü OMIM'de MS ilişkilendirilmiş 2 adet SNP'de intron bölgesinde bulunmaktadır. Bu nedenle bu hastalardaki intron



bölgelerindeki varyasyonlara da bakılmıştır. En az iki hastada bulunan ve konfirme edilmesi gereken de novo varyasyonlar şu lokasyonlarda ki varyasyonlardır, 6058495, 6068110, 6079034. Son olarak en az iki hasta da bulunan ve annotasyon dbSNP’de eşleştirilen varyasyonlar numaraları şu tablo 27’de listelenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda amaçlanan Türk MS hastalarında bilinen ve denovo varyasyon çalışmasında yeni nesil dizileme ile 5 adet hastanın IL2RA geni intron ve ekzon bölgeleri dahil olmak üzere sekanslanmış ve bulunan varyasyonlar önemlerine göre listelenmiştir. Bundan sonraki çalışmada bulunan bu de novo varyasyonlar sanger sekansla konfirme edilecek ve hasta sayısı artırılarak GWAS çalışmalarının önü açılacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- [1] M. Munoz-Culla, H. Irizar, and D. Otaegui, "The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates," *Appl Clin Genet*, vol. 6, pp. 63-73, 2013.
- [2] H. L. Weiner, "Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease," *Arch Neurol*, vol. 61, pp. 1613-5, Oct 2004.
- [3] A. Compston and A. Coles, "Multiple sclerosis," *Lancet*, vol. 372, pp. 1502-17, Oct 25 2008.
- [4] A. Alonso and M. A. Hernan, "Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review," *Neurology*, vol. 71, pp. 129-35, Jul 8 2008.
- [5] A. K. Hedstrom, T. Akerstedt, J. Hillert, T. Olsson, and L. Alfredsson, "Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis," *Ann Neurol*, vol. 70, pp. 733-41, Nov 2011.
- [6] J. F. Kurtzke, "Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress," *Brain*, vol. 136, pp. 2904-17, Sep 2013.
- [7] E. Alcalde-Cabero, J. Almazan-Isla, A. Garcia-Merino, J. de Sa, and J. de Pedro-Cuesta, "Incidence of multiple sclerosis among European Economic Area populations, 1985-2009: the framework for monitoring," *BMC Neurol*, vol. 13, p. 58, 2013.
- [8] A. Ascherio, S. M. Zhang, M. A. Hernan, M. J. Olek, P. M. Coplan, K. Brodovicz, *et al.*, "Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 327-32, Feb 1 2001.
- [9] C. Confavreux, S. Suissa, P. Saddier, V. Bourdes, S. Vukusic, and G. Vaccines in Multiple Sclerosis Study, "Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 319-26, Feb 1 2001.
- [10] M. Brahic, "Multiple sclerosis and viruses," *Ann Neurol*, vol. 68, pp. 6-8, Jul 2010.

- [11] M. F. Cusick, J. E. Libbey, and R. S. Fujinami, "Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses," *Curr Opin Rheumatol*, vol. 25, pp. 496-501, Jul 2013.
- [12] M. A. Hernan, S. M. Zhang, L. Lipworth, M. J. Olek, and A. Ascherio, "Multiple sclerosis and age at infection with common viruses," *Epidemiology*, vol. 12, pp. 301-6, May 2001.
- [13] G. C. Ebers, "Environmental factors and multiple sclerosis," *Lancet Neurol*, vol. 7, pp. 268-77, Mar 2008.
- [14] A. Ascherio and K. L. Munger, "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors," *Ann Neurol*, vol. 61, pp. 504-13, Jun 2007.
- [15] R. Dobson, G. Giovannoni, and S. Ramagopalan, "The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 84, pp. 427-32, Apr 2013.
- [16] L. J. Balcer, "Clinical practice. Optic neuritis," *N Engl J Med*, vol. 354, pp. 1273-80, Mar 23 2006.
- [17] R. Kanchandani and J. G. Howe, "Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 45, pp. 308-12, Apr 1982.
- [18] M. Koch, E. Kingwell, P. Rieckmann, and H. Tremlett, "The natural history of primary progressive multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 73, pp. 1996-2002, Dec 8 2009.
- [19] L. B. M. Zacharia, L., "The Basics of Genetics in Multiple Sclerosis," 2005
- [20] M. R. Cummings, *Human Heredity: Principles and issues*. Pacific Grove, CA: Thompson Learning, Brooks/Cole., 2003.
- [21] T. D. Gelehrter, Collins, F. S., & Ginsburg D. , *Principles of medical genetics*. Maryland: Williams & Wilkins, 1998.
- [22] G. Edlin, *Human genetics: A modern synthesis*. Boston: Jones & Bartlett, 1990.

- [23] G. C. Ebers, K. Kukay, D. E. Bulman, A. D. Sadovnick, G. Rice, C. Anderson, *et al.*, "A full genome search in multiple sclerosis," *Nat Genet*, vol. 13, pp. 472-6, Aug 1996.
- [24] J. L. Haines, M. Ter-Minassian, A. Bazyk, J. F. Gusella, D. J. Kim, H. Terwedow, *et al.*, "A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group," *Nat Genet*, vol. 13, pp. 469-71, Aug 1996.
- [25] S. Sawcer, H. B. Jones, R. Feakes, J. Gray, N. Smaldon, J. Chataway, *et al.*, "A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22," *Nat Genet*, vol. 13, pp. 464-8, Aug 1996.
- [26] N. P. Robertson, M. Fraser, J. Deans, D. Clayton, N. Walker, and D. A. Compston, "Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis," *Brain*, vol. 119 ( Pt 2), pp. 449-55, Apr 1996.
- [27] A. D. Sadovnick, G. C. Ebers, D. A. Dyment, and N. J. Risch, "Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group," *Lancet*, vol. 347, pp. 1728-30, Jun 22 1996.
- [28] I. Milanov, N. Topalov, and T. Kmetski, "Prevalence of multiple sclerosis in Gypsies and Bulgarians," *Neuroepidemiology*, vol. 18, pp. 218-22, 1999.
- [29] G. C. Ebers, I. M. Yee, A. D. Sadovnick, and P. Duquette, "Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group," *Ann Neurol*, vol. 48, pp. 927-31, Dec 2000.
- [30] A. D. Sadovnick, I. M. Yee, G. C. Ebers, and G. Canadian Collaborative Study, "Factors influencing sib risks for multiple sclerosis," *Clin Genet*, vol. 58, pp. 431-5, Dec 2000.
- [31] R. Hupperts, S. Broadley, A. Mander, D. Clayton, D. A. Compston, and N. P. Robertson, "Patterns of disease in concordant parent-child pairs with multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 57, pp. 290-5, Jul 24 2001.

- [32] G. Rosati, "The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update," *Neurol Sci*, vol. 22, pp. 117-39, Apr 2001.
- [33] O. H. Kantarci, M. de Andrade, and B. G. Weinshenker, "Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis," *J Neuroimmunol*, vol. 123, pp. 144-59, Feb 2002.
- [34] Games and C. Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics, "A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis," *J Neuroimmunol*, vol. 143, pp. 39-46, Oct 2003.
- [35] S. Sotgiu, M. Pugliatti, A. Sotgiu, A. Sanna, and G. Rosati, "Does the "hygiene hypothesis" provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia?," *Autoimmunity*, vol. 36, pp. 257-60, Aug 2003.
- [36] C. J. Willer, D. A. Dyment, N. J. Risch, A. D. Sadovnick, G. C. Ebers, and G. Canadian Collaborative Study, "Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 12877-82, Oct 28 2003.
- [37] G. C. Ebers, A. D. Sadovnick, D. A. Dyment, I. M. Yee, C. J. Willer, and N. Risch, "Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings," *Lancet*, vol. 363, pp. 1773-4, May 29 2004.
- [38] C. J. Willer, D. A. Dyment, A. D. Sadovnick, P. M. Rothwell, T. J. Murray, G. C. Ebers, *et al.*, "Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study," *BMJ*, vol. 330, p. 120, Jan 15 2005.
- [39] D. Brassat, C. Azais-Vuillemin, J. Yaouanq, G. Semana, J. Reboul, I. Cournu, *et al.*, "Familial factors influence disability in MS multiplex families. French Multiple Sclerosis Genetics Group," *Neurology*, vol. 52, pp. 1632-6, May 12 1999.
- [40] L. F. Barcellos, J. R. Oksenberg, A. J. Green, P. Bucher, J. B. Rimmler, S. Schmidt, *et al.*, "Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis," *Brain*, vol. 125, pp. 150-8, Jan 2002.
- [41] J. R. Oksenberg and L. F. Barcellos, "Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned," *Genes Immun*, vol. 6, pp. 375-87, Aug 2005.

- [42] G. C. Ebers, A. D. Sadovnick, and N. J. Risch, "A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group," *Nature*, vol. 377, pp. 150-1, Sep 14 1995.
- [43] J. F. Kurtzke, G. W. Beebe, and J. E. Norman, Jr., "Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution," *Neurology*, vol. 29, pp. 1228-35, Sep 1979.
- [44] C. J. Mumford, N. W. Wood, H. Kellar-Wood, J. W. Thorpe, D. H. Miller, and D. A. Compston, "The British Isles survey of multiple sclerosis in twins," *Neurology*, vol. 44, pp. 11-5, Jan 1994.
- [45] N. Risch, "Corrections to "Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs", " *Am J Hum Genet*, vol. 51, pp. 673-5, Sep 1992.
- [46] A. D. Sadovnick, H. Armstrong, G. P. Rice, D. Bulman, L. Hashimoto, D. W. Paty, *et al.*, "A population-based study of multiple sclerosis in twins: update," *Ann Neurol*, vol. 33, pp. 281-5, Mar 1993.
- [47] L. F. Barcellos, J. R. Oksenberg, A. B. Begovich, E. R. Martin, S. Schmidt, E. Vittinghoff, *et al.*, "HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course," *Am J Hum Genet*, vol. 72, pp. 710-6, Mar 2003.
- [48] H. Modin, W. Olsson, J. Hillert, and T. Masterman, "Modes of action of HLA-DR susceptibility specificities in multiple sclerosis," *Am J Hum Genet*, vol. 74, pp. 1321-2, Jun 2004.
- [49] M. Allegretta, J. A. Nicklas, S. Sriram, and R. J. Albertini, "T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis," *Science*, vol. 247, pp. 718-21, Feb 9 1990.
- [50] J. R. Oksenberg, M. A. Panzara, A. B. Begovich, D. Mitchell, H. A. Erlich, R. S. Murray, *et al.*, "Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis," *Nature*, vol. 362, pp. 68-70, Mar 4 1993.
- [51] M. Pette, K. Fujita, B. Kitze, J. N. Whitaker, E. Albert, L. Kappos, *et al.*, "Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals," *Neurology*, vol. 40, pp. 1770-6, Nov 1990.

- [52] K. J. Smith, J. Pyrdol, L. Gauthier, D. C. Wiley, and K. W. Wucherpfennig, "Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein," *J Exp Med*, vol. 188, pp. 1511-20, Oct 19 1998.
- [53] S. Sawcer, "The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects," *Brain*, vol. 131, pp. 3118-31, Dec 2008.
- [54] P. L. De Jager and D. A. Hafler, "Gene expression profiling in MS: what is the clinical relevance?," *Lancet Neurol*, vol. 3, p. 269, May 2004.
- [55] O. H. Kantarci, A. Goris, D. D. Hebrink, S. Heggarty, S. Cunningham, I. Alloza, *et al.*, "IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis," *Genes Immun*, vol. 6, pp. 153-61, Mar 2005.
- [56] N. M. S. Society, "Genetics: Multiple Sclerosis Basic Facts Series," National Multiple Sclerosis Society 2002.
- [57] B. A. de Jong, T. W. Huizinga, E. Zanelli, M. J. Giphart, E. L. Bollen, B. M. Uitdehaag, *et al.*, "Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region," *Neurology*, vol. 59, pp. 549-55, Aug 27 2002.
- [58] J. N. Hirschhorn, K. Lohmueller, E. Byrne, and K. Hirschhorn, "A comprehensive review of genetic association studies," *Genet Med*, vol. 4, pp. 45-61, Mar-Apr 2002.
- [59] J. P. Ioannidis, T. A. Trikalinos, and M. J. Khoury, "Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases," *Am J Epidemiol*, vol. 164, pp. 609-14, Oct 1 2006.
- [60] R. P. Mackay, "The familial occurrence of multiple sclerosis and its implications," *Ann Intern Med*, vol. 33, pp. 298-320, Aug 1950.
- [61] E. H., "Veber infantile und hereditare multiple sklerosis ." *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, vol. 146, p. 92, 1896.
- [62] S. A. Jersild C, Fog T., "HLA antigens and multiple sclerosis," *Lancet*, vol. 2, p. 41, 1972.

- [63] S. Naito, N. Namerow, M. R. Mickey, and P. I. Terasaki, "Multiple sclerosis: association with HL-A3," *Tissue Antigens*, vol. 2, pp. 1-4, 1972.
- [64] M. A. Vogel F, *Human genetics: problems and approaches*. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- [65] Gottesman, II, "Complications to the complex inheritance of schizophrenia," *Clin Genet*, vol. 46, pp. 116-23, Jul 1994.
- [66] F. Galton, *History of twins in human faculty and its development*. London: MacMilan, 1883.
- [67] D. A. Dyment, G. C. Ebers, and A. Dessa Sadovnick, "Genetics of multiple sclerosis," *The Lancet Neurology*, vol. 3, pp. 104-110, 2004.
- [68] Y. I. Sadovnick AD, Ebers GC and the Canadian Collaborative Study Group., "Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous mating," *Neurology*, vol. 200156, p. 85, 2001.
- [69] P. O'Connor and G. Canadian Multiple Sclerosis Working, "Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview," *Neurology*, vol. 59, pp. S1-33, Sep 24 2002.
- [70] D. A. Cottrell, M. Kremenchutzky, G. P. Rice, W. J. Koopman, W. Hader, J. Baskerville, *et al.*, "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis," *Brain*, vol. 122 ( Pt 4), pp. 625-39, Apr 1999.
- [71] C. J. Willer, A. D. Sadovnick, and G. C. Ebers, "Microchimerism in autoimmunity and transplantation: potential relevance to multiple sclerosis," *J Neuroimmunol*, vol. 126, pp. 126-33, May 2002.
- [72] M. M. Miretti, E. C. Walsh, X. Ke, M. Delgado, M. Griffiths, S. Hunt, *et al.*, "A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms," *Am J Hum Genet*, vol. 76, pp. 634-46, Apr 2005.
- [73] M. R. Lincoln, A. Montpetit, M. Z. Cader, J. Saarela, D. A. Dyment, M. Tiislar, *et al.*, "A predominant role for the HLA class II region in the



association of the MHC region with multiple sclerosis," *Nat Genet*, vol. 37, pp. 1108-12, Oct 2005.

- [74] J. R. Oksenberg, L. F. Barcellos, B. A. Cree, S. E. Baranzini, T. L. Bugawan, O. Khan, *et al.*, "Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans," *Am J Hum Genet*, vol. 74, pp. 160-7, Jan 2004.
- [75] D. A. Dyment, B. M. Herrera, M. Z. Cader, C. J. Willer, M. R. Lincoln, A. D. Sadovnick, *et al.*, "Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance," *Hum Mol Genet*, vol. 14, pp. 2019-26, Jul 15 2005.
- [76] I. A. Hoppenbrouwers and R. Q. Hintzen, "Genetics of multiple sclerosis," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1812, pp. 194-201, Feb 2011.
- [77] C. International Multiple Sclerosis Genetics, D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, *et al.*, "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study," *N Engl J Med*, vol. 357, pp. 851-62, Aug 30 2007.
- [78] F. Lundmark, K. Duvefelt, E. Iacobaeus, I. Kockum, E. Wallstrom, M. Khademi, *et al.*, "Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis," *Nat Genet*, vol. 39, pp. 1108-13, Sep 2007.
- [79] S. G. Gregory, S. Schmidt, P. Seth, J. R. Oksenberg, J. Hart, A. Prokop, *et al.*, "Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis," *Nat Genet*, vol. 39, pp. 1083-91, Sep 2007.
- [80] T. Aasen, A. Raya, M. J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, *et al.*, "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes," *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 1276-84, Nov 2008.
- [81] C. International Multiple Sclerosis Genetics, "The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes," *Genes Immun*, vol. 10, pp. 11-4, Jan 2009.
- [82] I. A. Hoppenbrouwers, Y. S. Aulchenko, A. C. Janssens, S. V. Ramagopalan, L. Broer, M. Kayser, *et al.*, "Replication of CD58 and

CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis," *J Hum Genet*, vol. 54, pp. 676-80, Nov 2009.

- [83] A. Goris, S. Boonen, B. D'Hooghe M, and B. Dubois, "Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis," *J Med Genet*, vol. 47, pp. 775-6, Nov 2010.
- [84] C. International Multiple Sclerosis Genetics, "Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci," *Hum Mol Genet*, vol. 19, pp. 953-62, Mar 1 2010.
- [85] P. L. De Jager, X. Jia, J. Wang, P. I. de Bakker, L. Ottoboni, N. T. Aggarwal, *et al.*, "Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci," *Nat Genet*, vol. 41, pp. 776-82, Jul 2009.
- [86] Australia and C. New Zealand Multiple Sclerosis Genetics, "Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20," *Nat Genet*, vol. 41, pp. 824-8, Jul 2009.
- [87] E. Sundqvist, M. Baarnhielm, L. Alfredsson, J. Hillert, T. Olsson, and I. Kockum, "Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1," *Eur J Hum Genet*, vol. 18, pp. 1349-52, Dec 2010.
- [88] E. Jakkula, V. Leppa, A. M. Sulonen, T. Varilo, S. Kallio, A. Kemppinen, *et al.*, "Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene," *Am J Hum Genet*, vol. 86, pp. 285-91, Feb 12 2010.
- [89] M. S. Society. (2014). Available: <http://www.msgene.org/TopResults.asp>
- [90] N. C. f. B. Information. (2014). Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3559>
- [91] L. H. N. C. f. B. Communications. (2014). Available: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL2RA>
- [92] E. release. (2013). Available: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000134460;r=10:6052652-6104288](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000134460;r=10:6052652-6104288)

- [93] . Available: [http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC\\_IL2RA.html](http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_IL2RA.html)
- [94] D. A. Dyment, C. J. Willer, B. Scott, H. Armstrong, A. Ligers, J. Hillert, *et al.*, "Genetic susceptibility to MS: a second stage analysis in Canadian MS families," *Neurogenetics*, vol. 3, pp. 145-51, Jul 2001.
- [95] J. W. Lindsey, "Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis," *Am J Med Genet A*, vol. 135, pp. 53-8, May 15 2005.
- [96] J. L. Haines, H. A. Terwedow, K. Burgess, M. A. Pericak-Vance, J. B. Rimmner, E. R. Martin, *et al.*, "Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group," *Hum Mol Genet*, vol. 7, pp. 1229-34, Aug 1998.
- [97] J. Hillert, "Multiple sclerosis: postlinkage genetics," *Clin Neurol Neurosurg*, vol. 108, pp. 220-2, Mar 2006.