

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI

FENİLALANİN HİDROKSİLAZ GENİNDE GÖRÜLEN
YAYGIN MUTASYONLARIN TARANMASI

Tezi Hazırlayan
Şerife ERDEM

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS

Eylül 2013
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI

FENİLALANİN HİDROKSİLAZ GENİNDE GÖRÜLEN
YAYGIN MUTASYONLARIN TARANMASI

Tezi Hazırlayan
Şerife ERDEM

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSY-12-3860 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2013
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

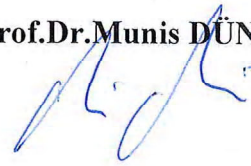
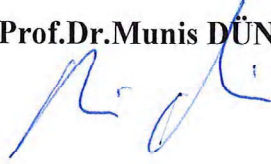
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Şerife ERDEM

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Fenilalanin Hidroksilaz Geninde Görülen Yaygın Mutasyonların Taranması” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan**Şerife ERDEM****Danışman****Prof.Dr.Munis DÜNDAR****Anabilim Dalı Başkanı****Prof.Dr.Munis DÜNDAR**

Prof.Dr.Munis DÜNDAR danışmanlığında **Şerife ERDEM** tarafından hazırlanan **“Fenilalanin Hidroksilaz Geninde Görülen Yaygın Mutasyonların Taranması”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalı **Yüksek Tezi** olarak kabul edilmiştir.

13/09/2013

JÜRİ

Danışman : Prof.Dr.Munis DÜNDAR (Tıbbi Genetik AD)

İmza

Üye : Prof.Dr.Mustafa KENDİRCİ (Çocuk Beslenme ve Met. BD)

Üye : Doç.Dr.Çetin SAATÇİ (Tıbbi Genetik AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **19 EYLÜL 2013** tarih ve **596** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

19 EYLÜL 2013

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

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

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

Tıbbi Genetik Anabilim Dalında ki eğitimim süresince bilgilerini benden esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve Doç. Dr. Çetin SAATÇI'ye,

Hasta ve kaynak temininde ki yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ ve Yrd. Doç. Dr. Fatih KARDAŞ'a,

Tez çalışmalarım sırasında, hem deney aşamasında ve hem de tezimi yazarken, pratik ve teorik alandaki değerli bilgileri ve tecrübeleri ile her zaman benim yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Yagut Akbarova' ya,

Araştırmamın klinik yönü ile ilgili tüm aşamalarda beni yalnız bırakmayan değerli Uzm. Dr. Aslı Subaşıoğlu Uzak'a ve laboratuvar çalışmalarımda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Şerife Sar, Yasin Ada, Hilal Akalın, Mehmet Boz' a

Karamsarlığa düştüğüm zamanlarda beni yüreklendiren dostlarım İnayet Uslu, Deniz Tokluman ve İnayet Güntürk'e

Çalışmalarımı yürütmemde gösterdikleri hoşgörülerini nedeniyle başta Uzm. Dr. Fatma Demiryılmaz olmak üzere tüm Detagen Gen. Tanı Merkezi ailesine...

Varlığını ve desteğini hep hissettiren, tüm dert ve sıkıntılarla birlikte mutlu anlarımda da hep yanımda olan biricik hayat arkadaşım Hakan Erdem'e teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden beri yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini daima hissettiğim, yaşadığım tüm güzellikleri borçlu olduğum annem Necla Altunok ve babam Mesut Altunok' a ithafen...

FENİLALANİN HİDROKSİLİZ GENİNDE GÖRÜLEN YAYGIN MUTASYONLARIN TARANMASI

Şerife ERDEM

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2013

Danışman: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

ÖZET

Hiperfenilalaninemiler, fenilalaninin (FA) tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidroksilaz (FAH) enziminin eksikliği veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiyopiterinin (BH₄) üretim ve döngüsündeki bozukluk sonucu ortaya çıkan bir grup hastalıktır. Klasik fenilketonüri (FKÜ) ise FAH enziminin tama yakın eksikliğinden kaynaklanan ve tedavi edilmediğinde neredeyse her zaman ağır mental gerilikle karakterize otozomal resesif, genetik geçişli bir hastalıktır. FKÜ, amino asit metabolizmasının en yaygın doğumsal hatalarından biridir. Hiperfenilalaninemisinin (HFA) Türkiye'deki insidansı 1/4172 iken, FKÜ için 1/5049'dur. HFA ailelerinde hastalıktan etkilenmiş veya taşıyıcı bireylerde FAH gen mutasyonlarının taranması hem doğum öncesi tanı hem de postnatal tedavi için oldukça önemlidir.

İnsan genomunda FAH enzimi kodlayan gen 12q22- q24.1 kromozomunda yerleşir. Bu gen yaklaşık olarak 100 kb uzunluğunda olup ve 13 ekzon içerir. HFA' ya neden olan FAH geninde şu ana kadar 500'ün üzerinde mutasyon belirlenmiştir. Gen dizisinde küçük değişimlere neden olan 31 farklı polimorfizm tanımlanmıştır. FAH geninde meydana gelen mutasyonlar; yanlış anlamlı (missense), splice-site ve anlamsız (nonsense) mutasyonlar ile küçük delesyonlar ve insersiyonlardır.

Bu çalışmada, birbirinden bağımsız 80 HFA allelindeki FAH gen mutasyonlarını pyrosekans (Qiagen Pyromark Q24) moleküler yöntemi ile saptamaya ve genotip-fenotip ilişkisini kurmaya çalıştık. Çalışmada 80 HFA alleli için 5 farklı mutasyon saptandı (%15). En sık görülen mutasyonlar ve allel sıklıkları; R261Q (%6.25), R243Q (%2.5), R243L (%2.5), R241C (%2.5), R261X (%1.25) olarak saptanmıştır. 40 hastanın hiçbirinde E221G, P225T, R413P, D415N mutasyonlarına rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Fenilalanin Hidroksilaz Geni, Fenilketonüri, Pyrosekans, Fenilalanin

SCREENING OF WIDESPREAD MUTATIONS OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE GENE

Şerife ERDEM

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Medical Genetics Department
Master Thesis, August 2013
Advisor: Proffosor. Munis DÜNDAR**

ABSTRACT

Hyperphenylalaninemia is a group of diseases caused by deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH), an enzyme which converts phenylalanine (PA) to tyrosine, or by defects either in production or recycling of tetrahydrobiopiterin, the cofactor of PAH. Total absence of PAH leads to classical phenylketonuria (PKU) which is a hereditary, autosomal recessive disease characterized by almost invariably mental retardation when remains untreated. PKU is a general inborn error of amino acid metabolism. As the incidence of HPA (1/4172) and PKU (1/5049) are very high in Turkey, genotyping of patients with PAH deficiency is useful in HPA families for prenatal or postnatal diagnosis of affected individuals or carriers.

In the human genome, the gene that codes PAH enzyme places chromosome 12q22-q24.1. This gene spans about 100 kb and contains 13 exons. More than 500 PKU mutations that cause HPA have been identified until now. Thirty-one different polymorphisms causing minor changes in the gene sequence have been identified. Mutations observed in the PAH gene include missense, splice-site and nonsense mutations, small deletions and insertions.

This study aims to analyze mutations of the PAH gene by pyrosequencing (Qiagen Pyromark Q24) molecular method and to clarify genotype-phenotype relation in 80 PKU alleles throughout Turkey.

As a result, 5 different mutations are identified for 80 HPA alleles (15 %). The most widespread mutations are R261Q (%6.25), R243Q (%2.5), R243L (%2.5), R241C (%2.5), R261X (%1.25). None of the E221G, P225T, R413P, D415N mutations is seen among 40 patients.

Key Words: Phenylalanine Hydroxylase Gene, Phenylketonuria, Pyrosequencing, phenylalanine

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
ONAY :	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 L-FENİLALANİN	3
2.1.1 L-fenilalaninin fiziksel ve kimyasal özellikleri	3
2.2. DOĞUMSAL METABOLİZMA HASTALIKLARI	5
2.3. HİPERFENİLALANİNEMİ	5
2.4. KALITSAL HİPERFENİLALANİNEMİLER HASTADA MEVCUT ENZİM AKTİVİTESİNE VE HASTALIĞIN BİYOKİMYASAL FENOTİPİNE GÖRE ÜÇ GRUPTA DEĞERLENDİRİLMEKTEDİR (13) :	6
2.5. KLASİK FENİLKETONÜRİ	8
2.6. FENİLKETONÜRİNİN TARİHÇESİ	8
2.7. FENİLKETONÜRİ SIKLIĞI	10
2.8. FENİLALANİN HİDROKSİLAZ VE METABOLİK YOLAKTAKİ DİĞER ENZİMLER	11
2.9. FENİLALANİN HİDROKSİLAZ GENETİĞİ	13
2.10. FENİLALANİN HİDROKSİLAZ GENİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE EXPRESYONU	15
2.11. FAH GENİNDE BULUNAN POLİMORFİZMLER VE HAPLOTİPLERLE BAĞLANTILARI	17
2.12. FAH GENİNDEKİ MUTASYONLAR	17
2.13. MATERNAL FENİLKETONÜRİ	20
2.14. GENOTİP - FENOTİP İLİŞKİSİ	22
2.15. VARYANT FKÜ VE NON-FENİLKETONÜRİK HİPERFENİLALANİNEMİ	23
2.16. FENİLKETONÜRİDE KLİNİK BULGULAR	24

Sayfa no

2.17. FENİLKETONÜRİ TARAMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	25
2.18. FENİLKETONÜRİDE TEDAVİ ÇALIŞMALARI.....	28
2.18.1. Diyet Tedavisi.....	28
2.18.2. Gen Tedavisi.....	31
2.18.3. Enzim Tedavisi	31
2.18.4. Madde Birikimini Önlemek.....	31
2.18.5. Oluşmayan Son Ürünü Yerine Koymak.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1 GEREÇLER	33
3.2 YÖNTEMLER.....	33
3.2.1. Örneklerin Alınması.....	33
3.2.2. Periferik kandan DNA izolasyonu	33
3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları.....	34
3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
3.2.3.2. Pyrosekans	35
3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR VE HAZIRLANIŞLARI.....	41
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	i
6.KAYNAKLAR	i
EKLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP:	Adenozin trifosfat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
FAH:	Fenilalanin Hidroksilaz
FA:	Fenilalanin
FKÜ:	Fenilketonüri
HFA:	Hiperfenilalaninemi
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (Polymerase Chain Reaction)
BH₄:	Tetrahidrobiyopterin
ml:	mililitre
SNP:	Single nücleotide polymorphisms
LNAA:	Large Neutral Amino Acid
M:	Molar
Mg:	Miligram
Mg/dl:	miligram/desilitre
NH₂ :	Amid grubu
PCD :	Piterin-4 α -karbinolamin dehidrataz
DHPR:	Dihidropteridin redüktaz
GTP:	Guanozin trifosfat
PTPS :	6-piruvoyil-tetrahidropiterin sentetaz
SR:	Epiapiterin redüktaz
FeCl₃:	Demir-3-klorür
Ppi:	Pirofosfat
kb:	kilobaz

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Fenilalanin özellikleri	4
Tablo 2.2 Hiperfenilalaninemilerin kalıtsal ve geçici nedenlere bağlı olarak sınıflandırılması	6
Tablo 2.3 Hiperfenilalaninemilerin Tetrahidrobiopterin Yanıtına Göre Sınıflandırması	7
Tablo 2.4. Fenilketonürinin klinik ve genetik özelliklerinin tarihsel gelişimi	10
Tablo 2.5. Popülasyonlara göre FKÜ sıklığı	11
Tablo 2.6. Tetrahidrobiopterinin oluştuğu metabolik yolaktaki diğer enzimler ve neden oldukları hastalıklar	13
Tablo 2.7. PAH geninde bulunan mutasyonların sınıflandırılması	18
Tablo 2.8. HFA'lı/ FKÜ'lü anne çocuklarında, kan fenilalanin düzeylerine göre anomali sıklığı	21
Tablo 2.9. Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri	25
Tablo 2.10. Normal kan FA düzeyleri	26
Tablo 2.11. Fenilketonüri taramasında kullanılan yöntemler	27
Tablo 3.1. Fenilalanin Hidroksilaz Mutasyon Dizilimleri	34
Tablo 3.2. PCR reaksiyon kompozisyonu	35
Tablo 3.3. PCR Cihaz Protokolü	35
Tablo 3.4. Mastermix Kompozisyonu	38
Tablo 4.1. FAH geninde tanımlanan mutasyonlar ve allel sıklığı	44
Tablo 4.2. HFA hastalarının klinik bulguları	45
Tablo 4.3. Anamnez özeti	46
 Şekil 2.1. Fenilalaninin kimyasal yapısı	 3
Şekil 2.2. Serbest L-fenilalaninin insan metabolizmasındaki ana girdi ve çıktıları.	4
Şekil 2.3 Aromatik amino asitlerin hidroksilasyonu, tetrahidrobiopterin sentez ve rejenerasyonu, fenilalanin metabolitlerinin oluşumu	12
Şekil 2.4 Fenilalanin hidroksilaz enziminin domainleri	14
Şekil 2.5. Fenilalanin hidroksilazın (FAH) yapısal bileşenleri	15
Şekil 2.6. 12.kromozom üzerinde FAH geni lokalizasyonu	16

Sayfa No

Şekil 2.7.	FAH geninde tanımlanan mutasyonlar ve polimorfik bölgelerin gen içindeki dağılımları	18
Şekil 2.8.	Avrupa ve Asya kökenli popülasyonlarda PAH mutasyonları ve dağılımı.	20
Şekil 3.1.	Ppilerin açığa çıkması	37
Şekil 3.2.	Nükleotid bağlanmalarının ışığa dönüşmesi	37
Şekil 3.3.	Apiraz enziminin bağlanmayan nükleotidleri degrade etmesi	37
Şekil 3.4.	Eklenen nükleotidlerin ekrandan izlenmesi... ..	37
Şekil 3.5.	R243Q homozigot mutasyonu.....	39
Şekil 3.6.	R261Q homozigot mutasyonu.....	40
Şekil 3.7.	R261Q heterozigot mutasyonu.....	40
Şekil 3.8.	Normal genotip dizisi.....	41

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Fenilalanin (FA) temel bir aminoasittir ve proteinlerde bulunan aminoasitlerin yaklaşık % 4-6 kadarını oluşturmaktadır. Vücuda yiyeceklerle alınan fenilalaninin büyük bir kısmı karaciğer hücrelerinde sentezlenen fenilalanin hidroksilaz (FAH, EC1.14.16.1) enzimi tarafından okside edilerek tirozine dönüştürülmektedir. Fenilalanin amino asidinin tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidroksilaz enziminde (FAH) veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin (BH₄) sentez ve rejenerasyonundan sorumlu olan diğer enzimlerdeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubu hiperfenilalaninemi (HFA) olarak adlandırılmaktadır.

Fenilketonüri (FKÜ, MIM# 261600), fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliği ile gelişen entellektüel fonksiyonlarda bozulma ile ilerleyen ve tedavi edilmez ise ağır mental motor gerilikle sonuçlanan otozomal resesif geçişli doğuştan metabolik bir hastalıktır.

Fenilketonüri kalıtsal metabolik hastalıkların en önemlilerinden biridir. Gelişmiş ülkelere oranla ülkemizde akraba evliliklerinin ve doğum sayısının yüksek olması sonucu doğumsal metabolizma hastalıklarına sık rastlanmaktadır. Genelde 1:10000 sıklıkta görülen fenilketonüri ülkemizde 1:5049 oranında görülmektedir. FAH geni için 500'den fazla farklı mutasyon bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı FKÜ tanısı konmuş 40 hastanın FAH genindeki özgül ve yaygın mutasyonlar olan; E221G, P225T, R241C, R243Q, R243L, R261X, R261Q, R413P, D415N açısından pyrosekans moleküler yöntemini kullanarak taranmaları, tespit

edilebilecek mutasyon ile genotip-fenotip ilişkisi kurularak literatüre katkıda bulunmak ve ayrıca ailelere bir sonraki gebelikleri için preimplantasyon genetik tanı şansı sunmaktır. Pyrosekans moleküler yönteminin söz konusu hastalığın tanısını koymadaki etkinliği, avantaj ve dezavantajları ayrıca değerlendirilecek ve tartışılacaktır.

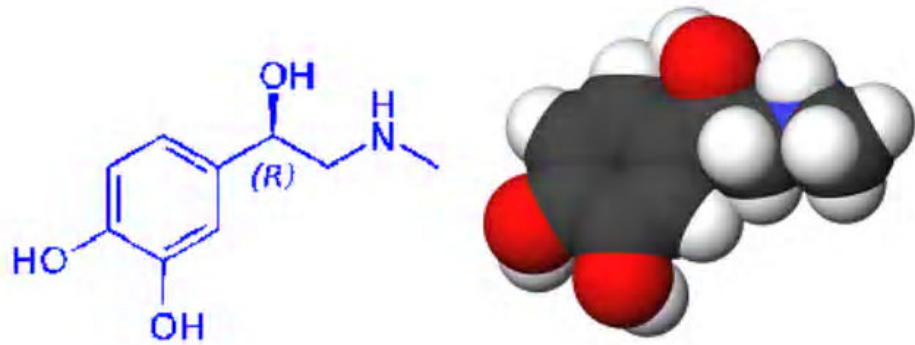
2. GENEL BİLGİLER

2.1 L-FENİLALANİN

Fenilalanin (α -amino-hidroksinnamik asit, α -amino- β -fenilpropiyonik asit), proteinlerin amino asit içeriklerinin %4-6 kadarını oluşturan esansiyel bir amino asittir ve ketojeniktir (1).

2.1.1 L-fenilalaninin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Canlılar için gerekli temel aminoasitlerden olan L-fenilalaninin (L-2-Amino-3-fenilpropionik asit) molekül formülü şöyledir:



Şekil 2.1. Fenilalaninin kimyasal yapısı

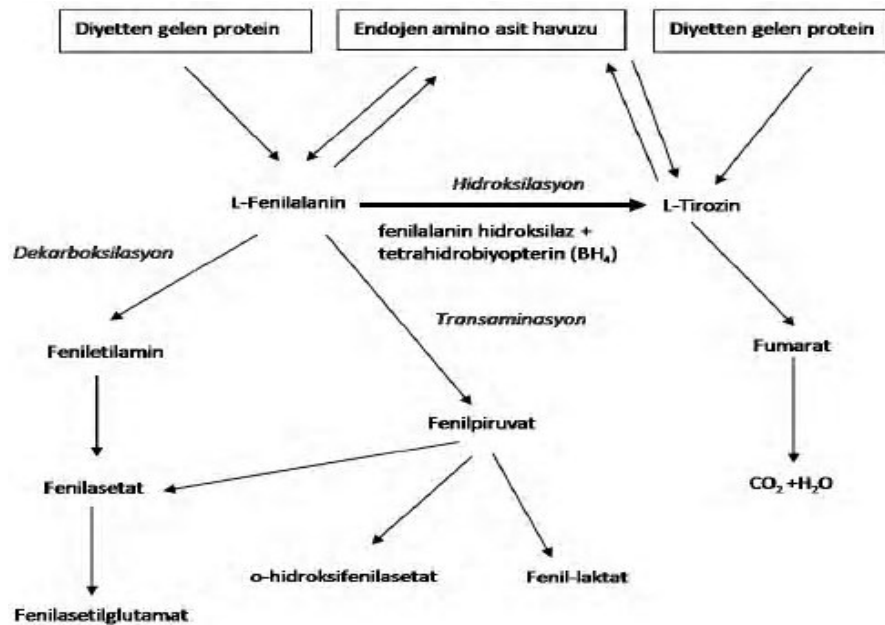
L-fenilalanin organizma tarafından sentezlenemeyen bu nedenle dışarıdan besin maddeleriyle alınması gereken beyaz, tatlı, kristal yapıda aromatik bir aminoasittir.

Tablo 2.1. Fenilalanin özellikleri

Molekül kütlesi (g/mol)	Erime noktası (°C)	pK1 (-COOH)	pK2 (-NH ₃ ⁺)	pI
165.19	283	1.83	9.13	5.48

Fenilalanin vücutta tirozine dönüştürülerek bütün duygusal algılarımız ve tepkilerimizin yönetiminde görevli nörotransmitterler olan epinefrin, dopamin, norepinefrinin adrenalin ve tiroid hormon yapımının yanı sıra önemli nöropeptidlerin, somatostatin, vazopressin, melanotropin, adrenokortikotropik hormon, substans P, enkefalin, vazoaktif intestinal peptid, anjiyotensin II ve kolesistokinin üretimiyle de ilgilidir (2).

Plazmadaki FA dengesi “girdiler” ve “çıktılar” bileşenleriyle oluşur. Girdiler bileşeni ekzojen (diyet) ve endojen (proteolizis) birleşimi ile çıktılar bileşeni ise protein sentezi, tirozine hidroksilasyonu ve minör metabolitlerine dönüşümünden oluşur. Bu bileşenlerden herhangi birinde oluşabilecek farklılıklar FA metabolizması ve homeostazını bozabilir. Fenilalanin metabolizmasının esas yönü hidroksilasyon reaksiyonudur (%75) ve sonucunda FA ya katabolik yol ile karbondioksit ve suya yıkılır ya da endojen amino asit tirozin oluşur (3).



Şekil 2.2. Serbest L-fenilalaninin insan metabolizmasındaki ana girdi ve çıktıları. Girdileri diyetten gelen protein ve endojen amino asit havuzu oluşturur. Çıktılar ise (1) tirozine hidroksilasyon, (2) bağlı polipeptid havuzuna katılım, (3) transaminasyon ve dekarboksilasyon aracılığıyla gerçekleşir. Normal dengeli durumda bu üç reaksiyonun oransal önemi yaklaşık olarak sırasıyla 3:1:eser şeklindedir. (3)

İlk yaş için fenilalanin ihtiyacı 60-90 mg/kg daha sonra 35-40 mg/kg'dır. Fenilalanin bitkisel ve hayvansal protein kaynaklarında bulunur. Et, balık, yumurta, süt ve süt ürünleri, kuru baklagiller, kuruyemişler, normal ekmek, bisküvi protein ve fenilalaninin yüksek olduğu gıdalardır (4).

2.2. DOĞUMSAL METABOLİZMA HASTALIKLARI

Doğumsal metabolizma hastalıkları; bir enzimin, kofaktörün eksikliği ya da aktivitesinde azalması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal bozukluklardır ve çoğu otozomal resesif kalıtım göstermektedir (5).

İlk kez 1908'de Garrod tarafından tanımlanmış olan doğumsal metabolizma hastalıkları, gelişmiş ülkelere oranla ülkemizde akraba evliliklerinin ve doğum sayısının yüksek olmasından dolayı daha sık görülmektedir (6).

2.3. HİPERFENİLALANİNEMİ

Amino asit metabolizma hastalıkları, enzimlerin düzgün çalışmamasından kaynaklanan, kız ve erkekleri eşit oranda etkileyen, nadir görülen, kalıtsal hastalıklardandır. En sık görülen amino asit bozuklukları arasında hiperfenilalaninemiler yer almaktadır (7, 8, 9).

Fenilalanin amino asidinin tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidroksilaz enziminde (FAH) veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiyopterin (BH₄) sentez ve rejenerasyonundan sorumlu olan diğer enzimlerdeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubu hiperfenilalaninemi (HFA) olarak adlandırılmaktadır (3).

HFA'ler kalıtsal (primer) veya geçici (sekonder) nedenlere bağlı olarak oluşabilir. Primer hiperfenilalaninemiler kalıtsal nedenlere bağlıyken sekonder hiperfenilalaninemiler geçici nedenlere bağlı olarak oluşmaktadır. Fenilalaninin tirozine dönüşümünü sağlayan FAH enzimindeki veya enzimin kofaktörü olan BH₄ metabolizmasındaki bozukluklar kalıtsal HFA' lere neden olmaktadır.

Böbrek hastalıkları, ağır inflamatuvar yanıt, metotreksat gibi ilaçlarla galaktozemi ve tirozinemi, sekonder yani geçici HFA' lerin oluşmasına neden olmaktadır (10).

Tablo 2.2. Hiperfenilalaninemilerin kalıtsal ve geçici nedenlere bağlı olarak sınıflandırılması

1. Primer (kalıtsal)	2. Sekonder (edinsel)
<i>Fenilalanin hidroksilaz eksikliği</i> • Ağır (klasik FKÜ) • Orta ağırlıkta hiperfenilalaninemi • Hafif hiperfenilalaninemi <i>Biopterin metabolizması bozuklukları</i> • Guanozin trifosfat siklohidrolaz eksikliği • 6-piruvoyl- tetrahidropterin sentaz eksikliği • Dihidropteridin redüktaz eksikliği • Pterin karbinolamin dehidrataz eksikliği • Semiapterin redüktaz eksikliği	• Maternal FKÜ • Tirozinemi • Geçici neonatal hiperfenilalaninemi • İlaça bağlı (metotreksat, trimetoprim) • Ağır enflamatuvar yanıt • Renal hastalık • Karaciğer hastalığı

Normalde plazmadaki fenilalanin miktarı $< 2 \text{ mg/dl}$ ($120 \mu\text{mol/L}$) dir. Vücut sıvılarında ve kandaki fenilalaninin tirozine oranı $0.6-1.5 \text{ mg/dl}$ 'dir. Hiperfenilalaninemi hastalarında bu oran 3 veya 3'ün üzerindedir (11). Tirozine dönüştürülemeyen fenilalanin amino asidindeki NH_2 grubu, transaminazlar tarafından α -ketoglutarat'a transfer edilerek fenilpüriyat oluşmasına neden olmaktadır (12).

2.4. KALITSAL HİPERFENİLALANİNEMİLER HASTADA MEVCUT ENZİM AKTİVİTESİNE VE HASTALIĞIN BİYOKİMYASAL FENOTİPİNE GÖRE ÜÇ GRUPTA DEĞERLENDİRİLMEKTEDİR (13) :

1. Fenilketonüri (FKÜ)

- Klasik FKÜ: Enzim aktivitesi %1'den az, kan FA düzeyi 20 mg/dl 'den yüksektir, hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20 mg/kg 'dır.
- Orta derecede 'moderate' FKÜ: Enzim aktivitesi normalin yüzdesinin %1'inin üzerinde, kan FA düzeyi $15-20 \text{ mg/dl}$ arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı $20-25 \text{ mg/kg}$ 'dır.
- Hafif 'mild' FKÜ: Enzim aktivitesi normalin yüzdesinin %5'inin üzerinde, kan FA düzeyi $10-15 \text{ mg/dl}$ arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı $25-50 \text{ mg/kg}$ 'dır.

2. Hafif ‘mild’ HFA (fenilketonüri olmayan HFA): Enzim aktivitesi normalin yüzdesinin %30’unun üzerinde, kan FA düzeyi 10 mg/dl’nin altındadır. Hastalara kontrol altında serbest diyet tedavisi uygulanmaktadır.

3. Tetrahidrobiopterin metabolizması bozuklukları: Dihidropteridin redüktaz, GTP siklohidrolaz I, pterin-4-8-karbinolamin dehidrataz, 6-pürivoyil- tetrahidropterin sentaz aktivitesinde ki bozuklukları ile oluşan ve BH₄’ne yanıt veren hiperfenilalaninemilerdir.

Tetrahidrobiopterin metabolizması bozuklukları (11)

BH₄ sentezinde bozukluk

-Guanozin trifosfat siklohidrolaz (GTF-SH) eksikliği

-6-pürivoyil tetrahidropterin sentaz (PTPS) eksikliği

BH₄ rejenerasyonunda bozukluk

-Pterin-4 α -karbinolamindehidrataz (PKD) eksikliği

-Dihidropteridin redüktaz (DHPR) eksikliği

FAH eksikliği olan hastaların FKÜ ve non-FKÜ HFA olarak sınıflandırılması uygun görülmektedir. Buna göre, tedavi öncesi plazma FA düzeyi 16,5 mg/dL’den yüksek ve günlük tolere ettiği FA miktarı 500 mg’ın üstünde olanlar non-FKÜ HFA olarak kabul edilmektedir (5, 6,14).

Tedaviye yönelik yapılan çalışmaların sonuçları ve hastaların oral BH₄ tedavisine çok iyi yanıt vermesi, BH₄ yanıtına göre hastalığın yeniden sınıflandırılmasını gerektirmektedir (15).

Tablo 2.3. Hiperfenilalaninemilerin Tetrahidrobiopterin Yanıtına Göre Sınıflandırması

1. Tetrahidrobiopterine yanıt vermeyen hiperfenilalaninemiler.	2. Tetrahidrobiopterine yanıt veren hiperfenilalaninemiler. a. Tetrahidrobiopterine yanıt veren fenilalanin hidroksilaz enzimi eksikliği. b. Tetrahidrobiopterin metabolizması bozuklukları.
--	--

2.5. KLASİK FENİLKETONÜRİ

FAH enzim eksikliklerinin ağır durumları için fenilketonüri (FKÜ) ifadesi kullanılmaktadır (11). Klasik fenilketonürde FAH tam veya tama yakın eksiktir. Artmış FA metabolitleri ve ürünleri normal metabolizmayı bozup santral sinir sisteminde (SSS) kalıcı zedelenmeye yol açar ve zekâ geriliğine neden olur (1). Fenilketonüri, FAH enzim aktivitesine ve kan fenilalanin düzeyine göre kendi içinde klasik FKÜ, orta derecede “moderate” FKÜ ve hafif “mild” FKÜ olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır.

2.6. FENİLKETONÜRİNİN TARİHÇESİ

Fenilketonüri ilk kez 1934 yılında Norveç’li biyokimyacı ve klinisyen Dr. Asbjorn Folling tarafından tanımlanmıştır (16-18). Mental retardasyonu olan ve değişik bir vücut kokusuna sahip altı buçuk ve dört yaşındaki iki kardeşin idrar örneklerinde keton olup olmadığını anlamak için demir-üç-klorür ilave ettiğinde kahverengimsi bir renk elde edilmesi gerekirken yeşil renk oluştuğunu görmüş, daha sonra ki çalışmalarla idrarla atılan bu bileşiğin fenilpiruvik asit olduğunu ortaya koymuştur. Mental retardasyonu olan ve idrarlarında fenilpiruvik asit bulunan hastaların saç ve göz renklerinin açık oluşu, egzama şeklindeki deri lezyonları dikkatini çekmiştir. Yeni tanımladığı bu hastalığa kognitif gelişim üzerine olan etkisini de vurgulamak amacıyla “*Imbecilitas phenylpyrouvica*” ismini vermiştir (19-21). Penrose 1935’te bu hastalığı fenilketonüri olarak adlandırmış, Jervis 1947’de FKÜ’deki metabolik bozukluğun FA’nın tirozine dönüşümünde olduğunu keşfetmiş ve 1953 yılında fenilketonürlü hastalarda herediter bir enzimatik defektin karaciğerde fenilalaninin tirozine çevrilmesini engellediğini bildirmiştir (22-24).

Fenilalaninden kısıtlı diyet ile tedavi edilebileceği ise ilk kez 1953’de Bickel tarafından gösterilmiş, diyetle protein kaynağı olarak FA’dan kısıtlı kazein hidrolizatları kullanılmaya başlanmıştır (25). Prof. Dr. Hors Bickel ve arkadaşları fenilketonürlü hastalar için fenilalanin içermeyen ilk formula mamayı üretmiştir (26).

1956’da enzim sisteminin iki bileşeni olduğu fark edilmiş (27), 1963’de bu iki sistemin FAH ve dihidrobiyopteridin redüktaz enzimlerinden oluştuğu (28), 1958’de hastaların çoğunda esas patolojinin FAH aktivitesinin düşüklüğü olduğu, 1978’de ise tetrahidrobiyopiterin biyosentezi ile ilişkili basamakların eksikliğinin hastalığa neden olabileceği gösterilmiştir (29).

Fenilketonüri için toplumsal taramaya yönelik ilk test Dr. Willard Centerwal tarafından 1957 yılında uygulanmaya başlanmıştır. Bu test, hastanın idrarına damlatılan demir-3-klorür çözeltisinin fenilpiruvik asit ile reaksiyona girmesi sonucunda yeşil renk almasına dayanmaktaydı. Ancak testin pozitifleşebilmesi için gerekli olan fenilpiruvik asit, bebek ancak birkaç haftalık olduğunda yeterli miktara ulaşıyordu. Bu nedenle yeterince erken dönemde hastalara tanı konulamıyor ve tarama testi olarak uygulanamıyordu. 1959 yılında fenilketonürlü hastaları tedavi eden ve kan fenilalanin miktarının ölçülebilmesi için her seferinde 15-20 ml kan örneği almak zorunda olan Dr. Robert Warner, bir kanser araştırmacısı olan Dr. Robert Guthrie'den kan fenilalanin düzeyinin izlenebileceği basit bir test üretmesini istemiştir (22).

Günümüzde en yaygın kullanılan bakteriyel inhibisyon analizi 1961'de Dr. Robert Guthrie tarafından geliştirilmiş ve "Guthrie testi" olarak adlandırılmıştır (19). 1967'de ABD'nin 37 eyaletinde kanun ile uygulanması zorunlu kılınmıştır. Tarama yöntemleri hasta bebeklerin erken tanımlanması ve erken dönemde diyet tedavisi ile dünya çapında yüzbinlerce çocuğun zekâ geriliğinin engellenmesini sağlamıştır. 1970 yılında FAH' ın kofaktörü olan BH_4 metabolizmasındaki eksikliklerin de, benzer fenotipe sebep olabileceği anlaşılmış (30), 1983'de FAH cDNA'sında RFLP polimorfik belirleyicilerin varlığı gösterilmiş (31), Dahl ve arkadaşları 1984'de FAH cDNA'sı kullanılarak PAH lokusunun 12. kromozomunun uzun kolunda (12q22) lokalize olduğunu göstermişlerdir (32, 33).

1985 yılında FAH geninin 100 kb, mRNA'sının ise, 2.4 kb'lık olduğunu gösterilmiş (33), 1992'de FAH aktivitesi ile hastalık fenotipi arasında belirli bir bağlantının olduğu gösterilmiştir. Eiken 1996'da FAH genindeki mutasyonların saptanması için DGGE analizi kullanmıştır (34). 2002 yılında FKÜ'nin tedavisi için gen tedavisi ve enzim replasman tedavileri için çalışmalar başlamıştır (35).

Tablo 2.4. Fenilketonürinin klinik ve genetik özelliklerinin tarihsel gelişimi.

1934	Asbjörn Fölling	Hastalığın “Imbecilitas Phenylpyrouvica” olarak adlandırılması
1935	Lionel Penrose	Hastalığın fenilketonüri olarak adlandırılması
1947	George Jervis	Fenilalanin amino asidinin tirozine dönüşümünde bir bozukluk olduğunun keşfedilmesi
1953	George Jervis	Fare karaciğerinde fenilalanin hidroksilaz enzim eksikliğinin gösterilmesi
1953	Horst Bickel	Fa’ından kısıtlı diyet tedavisinin hastalığın beyin dokusunda yaptığı olumsuz etkilerin önlenebileceğinin göstermesi
1961	Robert Guthrie	Hastalığın erken tanısı için “Guthrie” testinin geliştirilmesi
1969	C.C. Huntley, R.E. Stevenson	Maternal FKÜ sendromu olarak da bilinen ilk embriyofetopati vakasının rapor edilmesi
1970	N. Blau	FAH’ ın kofaktörü olan BH ₄ metabolizmasındaki eksikliklerin de, benzer fenotipe sebep olabileceği anlaşılmaması
1983	S.L.C. Woo	FAH cDNA’sında RFLP polimorfik belirleyicilerin varlığının gösterilmesi
1984	H.H. Dahl, J.F. Mercer, A. Lidsky	FAH cDNA’sı kullanılarak PAH lokusunun 12. kromozomunun uzun kolunda (12q22) lokalize olduğunun gösterilmesi
1985	A. Lidsky, S.L.C. Woo	FAH geninin 100 kb , mRNA’sının ise, 2.4 kb’lık olduğunun gösterilmesi
1992	S.J. Ramus	FAH aktivitesi ile hastalık fenotipi arasında belirli bir bağlantının olduğu gösterildi
1996	H.G. Eiken	FAH genindeki mutasyonların saptanması İçin DGGE analizi kullanılmaya başlandı
2002	U. Lassker	Tetrahidrobiopterin tedavisine cevap veren 2 hasta literatüre geçti
2002	J. Liu, X. Jia	FKÜ’nun tedavisi için Gen tedavisi ve enzim replasman tedavileri için çalışmalar başladı

2.7. FENİLKETONÜRİ SIKLIĞI

FKÜ’ nün tüm dünyada taranmış nüfusta sıklığı 1/12.000’dir, tahmini taşıyıcı frekansı 1/55’dir (36). FKÜ’nün ülkemizde sıklığı 1/5049, HFA sıklığı 1/4172’dir. Ülkemizde kaba bir hesapla yılda 250-300 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır. Bu yüksek oranın nedeni toplumda 26 kişiden birinin taşıyıcı olması ve akraba evliliğinin çok sık (I. derece kuzenler arası %21) gerçekleşmesidir (37). Dünyadaki verilerle karşılaştırıldığında ülkemiz, FKÜ hastalığının İrlanda (38) ve Yemen kökenli Yahudilerle (39) birlikte en sık görüldüğü ülkedir.

Tablo 2.5. Popülasyonlara göre FKÜ sıklığı (37, 3)

Bölge	Ülke	FKÜsıklığı
Asyalı popülasyonlar	Çin	1:17000
	Japonya	1:125000
	Türkiye	1:5049
	Yemen Yahudileri (İsrail)	1:5300
	İskoçya	1:5300
	Çekoslovakya	1:7000
	Macaristan	1:11000
	Danimarka	1:12000
	Fransa	1:13500
Avrupalı popülasyonlar	Norveç	1:14500
	İngiltere	1:14300
	İtalya	1:17000
	Kanada	1:22000
	Finlandiya	1:200000
	İrlanda	1:6110
	Arap popülasyonları	1:6000 'e kadar
Okyanusya	Avustralya	1:10000

2.8. FENİLALANİN HİDROKSİLİZ VE METABOLİK YOLAKTAKİ DİĞER ENZİMLER

Fenilalanin hidroksilaz (fenilalanin-4-monooksijenaz) esansiyel bir amino asit olan L-fenilalaninin L- tirozine geri dönüşümsüz hidroksilasyonunu katalizleyen kompleks bir enzim sistemidir (3).

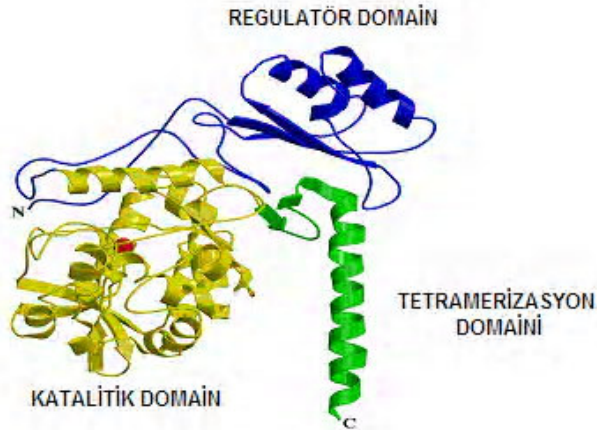
FA katabolizması memelilerde esasen karaciğerde aktiftir, beyinde bulunmaz (40). Hepatositlerin sitoplazmalarında dağınık halde bulunur (41). FA'nın geri dönüşümsüz katabolizmasında ilk basamak FAH ile tirozine dönüşümüdür. FAH demir içeren bir homotetramerdir. Kofaktör olarak konjuge olmayan piterin, tetrahidrobiyopiterin (BH₄) ve moleküler oksijene gereksinim duyar. Hidroksilasyon reaksiyonu sırasında BH₄ kuinoid BH₂'e oksidize olur. FAH enzim aktivitesinin sürekliliğini sağlamak için aktif piterin sürekli ortamda yeterince bulunmalıdır. BH₄ havuzunun idame edilmesi için qBH₂, piterin-4 α -karbinolamin dehidrataz (PCD) ve dihidropteridin redüktaz (DHPR) ile BH₄'e geri çevrilebilir veya guanozin trifosfattan (GTP) de novo sentezlenebilir. GTP' den BH₄ sentezi sırasıyla 3 enzimatik reaksiyon sonucu gerçekleşir; GTP siklohidrolaz, 6- piruvoyil-tetrahidropiterin sentetaz (PTPS) ve sepiapiterin redüktaz (SR). BH₄ ayrıca tirozin hidroksilaz, triptofan hidrolaz için de kofaktör olup dopamin, katekolamin, melanin, serotonin ve nitrik oksidaz sentezi için gereklidir (42, 43). FAH enzim sistemi bileşenlerinde herhangi bir bozukluk sonucu FA vücutta birikir ve FA

Tablo 2.6. Tetrahydrobiyopterinin oluştuğu metabolik yolaktaki diğer enzimler ve neden oldukları hastalıklar (44)

HASTALIK	EKSPRESE OLDUĞU DOKULAR	KROMOZOMAL YERLEŐİM
Hiperfenilalaninemi ile birlikte giden hastalıklar		
Guanozin trifosfat siklohidrolaz I (GTPCH) eksikliği	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit	14q22.1-22.2
6-pürivoyl-tetrahydrobiyopterin sentaz (PTPS) eksikliği	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit, eritrosit, fibroblast	11q22.3-23.23
Dihidropteridin redüktaz (DHPR) eksikliği	Tüm dokularda	4p15.3
Pterin 4 α karbinolamin dehidrataz (PCD) eksikliği	İnce bağırsak, karaciğer, beyin	10q22
Hiperfenilalaninemi ile birlikte gitmeyen hastalıklar		
Dopaya cevap veren distoni (DRD)	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit	14q22.1-22.2
Seplapterin redüktaz eksikliği	Tüm dokularda	2p14-p12

2.9. FENİLALANİN HİDROKSİLİZ GENETİĞİ

İnsan FAH enzimi 452 amino asitten oluşur, karaciğerde dimer veya aktif formu olan tetramerler şeklinde bulunur. Ortamdaki FA konsantrasyonu arttığında dimerik formlar tetramerik forma dönüşür (3). Tetramerik ve dimerik formları oluşturan monomerlerin her biri, üç alt birimden oluşur: N-terminal düzenleyici alt birim, katalitik alt birim ve C-terminal tetramerizasyon alt birimi (45) (Şekil 2. 4.). Katalitik alt birimin merkezinde bulunan aktif bölgede bir üç değerklikli demir atomu ve iki su molekülünün varlığı gösterilmiştir.



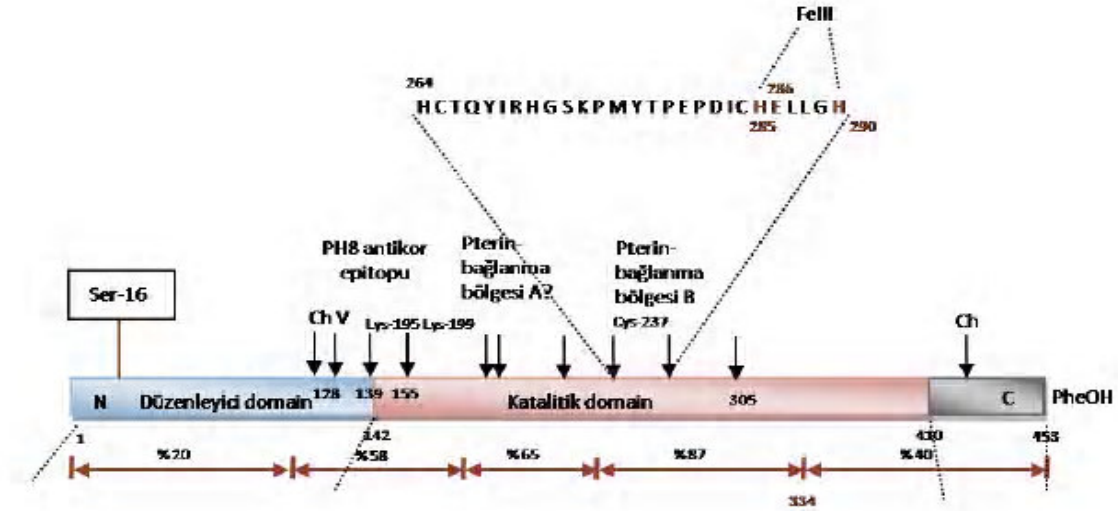
Şekil 2.4. Fenilalanin hidroksilaz enziminin domainleri (45)

Mutasyonların büyük çoğunluğu FAH enziminin katalitik bölgesinde bulunmaktadır. Tetramerizasyon bölgesi, dimerlerin tetramer forma dönüşümlerini sağlar. Bu bölge 2 antiparalel β tabakası ve C-terminalde tetramer oluşumunda görev alan bir α - heliks bölgesi içermektedir. Regülatör bölge ise, aktif bölgenin işlev görmesini düzenlemektedir.

Fenilalanin hidroksilaz enzimi üzerinde BH_4 bağlanması için iyi korunan 27 amino asitlik bir bölge vardır ve bu 27 amino asitin 10 tanesi aktif bölgededir. Pterinler demire bağlanırken bağlanma bölgesindeki amino asitler ve su molekülü ile de hidrojen bağları kurarlar. Pterin bağlanması sonrasında 245-250. Pozisyonlardaki amino asit rezidüleri demir yönüne kayar, iki değerlikli oksijenin demir ve pterin arasında köprü oluşturacak şekilde yerleşmesi sağlanır ve FA'nın hidroksilasyonu gerçekleşir. Pterin bağlanması sonrasında gerçekleşen konformasyonel değişiklikler pterinlerin FAH üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu göstermektedir.

Tetrahidrobiopterin düzenleyici etkisini, bir cAMP protein kinazı inhibe edip, düzenleyici alt birimde 16. pozisyonundaki serinin fosforilasyonunu inhibe ederek gösterir (45). Proteinden zengin beslenme sonrası kan glukagon düzeyi artar, glukagon hepatik adenilat siklazı aktive eder ve cAMP düzeyini yükseltir. Fenilalanin hidroksilazın aktif formu olan fosforile şekli, cAMP bağımlı protein kinazların aktivasyonu ile oluşur. Sonuç olarak yüksek kan FA düzeyi FAH'nın fosforillenerek aktive olmasını sağlar. Ayrıca FA'nın enzimin tetramerik formunda kendine özgün bağlanma bölgesine bağlanarak stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Düşük doz steroidlerin FAH aktivitesini stimule ettiği de gösterilmiştir. Bu bilgiler hayvan deneyleri ile elde

edilmiştir. İnsan FAH'ını düzenleyici etkenler üzerinde çalışmalar devam etmektedir (3).

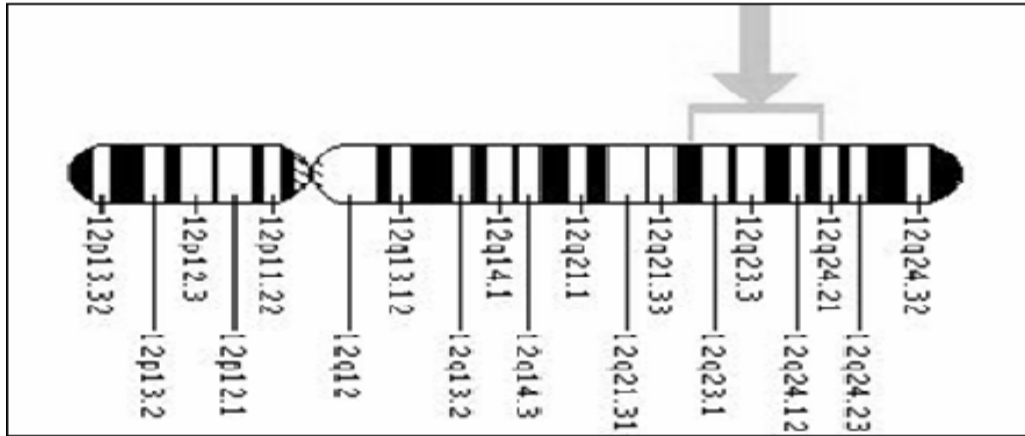


Şekil 2.5. Fenilalanin hidroksilazın (FAH) yapısal bileşenleri. FAH'ın katalitik domaini ferrik demir ve kofaktör (BH₄) bağlanmasından sorumlu 26 veya 27 amino asitlik motifi içerir (41).

2.10. FENİLALANİN HİDROKSİLAZ GENİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE EXPRESYONU

İnsan FAH cDNA'sının (phPAH247) tam dizisi 1985 yılında Kwok ve ekibi tarafından tamamlanmış ve proteinin amino asit dizisi belirlendiğinde fonksiyonel bir enzim için gereken tüm bilgiyi bu amino asit dizisinin içerdiği gösterilmiştir (46).

FAH geni 12. kromozomda q22-q24.1 yer almaktadır. Gen 13 ekzon içermekte ve yaklaşık olarak 100 kb'lık bir DNA bölgesini kapsamaktadır. FAH geninden kodlanan olgun mRNA 2.4 kb uzunluğundadır ve translasyon sonucunda oluşan FAH enzimi ise, 452 amino asit içermektedir.



Şekil 2.6. 12. kromozom üzerinde FAH geni lokalizasyonu (<http://www.sci.ege.edu.tr>)

FAH temel olarak insanda karaciğerde eksprese olmaktadır. Çeşitli immünohistokimyasal analizler sonucunda bu enzimin böbrekte de eksprese olduğu gösterilmiştir (47). Ayrıca fibroblast hücrelerinde, deride keratinosit hücrelerinde de FAH mRNA'larının varlığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalar sonucunda, pankreas ve beyin dokusunda da FAH aktivitesi bulunduğu gösterilmiştir. Fenilalanin amino asidinin vücuttaki yıkımı fenilalanin alınımına, hidrosilasyonuna, protein sentezi için kullanım miktarına, fenilalanin transaminasyonuna ve fenilalanin

dekarboksilasyonuna göre değişiklik göstermektedir. İnsan ve faredeki böbrek FAH enziminin kinetik özellikleri açısından aynı oldukları ve karaciğerdeki izomerik formlarının da büyük oranda benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (48).

Farelerde, böbrek dokusunda bulunan FAH enzimi ile karaciğer dokusunda bulunan FAH enzimi arasında kortizol ve glukagon aracılığı ile dokuya özgül regülasyonlarında, substratla aktivasyonlarında ve posttranslasyonel modifikasyonla aktivasyonlarında (fosforilasyon gibi) belirgin farklılıklar bulunmaktadır (48).

Ayrıca yapısal açıdan da, bu iki enzim arasında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Fenilalanin ile aktivasyonda karaciğer FAH enzimi dimerik formdan aktif formu olan tetramerik forma dönüşmektedir. Böbrek dokusundaki FAH enzimi ise, dimerik formda daha aktiftir. Kuaterner formdaki bu fark böbrekteki izoenzimin tetramerizasyon domaininde farklı bir amino asit dizisinin bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Ayrıca amino asit dizisindeki farklılığının yanı sıra pH, glikozilasyon, farklı ligandların bulunması da bu durumu etkileyebilmektedir. Ancak insanda karaciğer ve böbrek dokusunda bulunan FAH enzimleri arasında regülasyonda, aktivasyonda ve

konformasyonda böyle bir fark gözlenmemiştir. Böbrek bozukluklarında fenilalanin hidroksilasyonunda problemler gözlenmektedir. Bu HFA fenotipinde rezidüel enzim aktivitesinin sadece karaciğer FAH'ından değil böbrekteki FAH'dan da etkilendiğini göstermektedir (49). X-ray analiz çalışmaları, tam uzunluktaki insan FAH enziminin aktif formunun tetramerik yapıda olduğunu göstermektedir. Dimerik formlar substrat varlığında bir araya gelerek tetramerleri oluşturur. Fosfat tamponu içinde pH 8 de, tetramerler tekrar dimerik forma dönebilmektedir (45).

2.11. FAH GENİNDE BULUNAN POLİMORFİZMLER VE HAPLOTİPLERLE BAĞLANTILARI

FAH gen bölgesinde üç farklı polimorfizm grubu tanımlanmıştır.

Biallelik polimorfik belirleyiciler: “Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)”, FAH geninde, Bgl II, Pvu II(a), Pvu II(b), Xmn I, EcoR I, Msp I, EcoR V, Hind III restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgeleri için 8 polimorfik bölge bulunmaktadır.

Multiallelik polimorfik belirleyiciler: FAH geninde biri genin son ekzonundan 3kb aşağıda bulunan 10 farklı allel içeren “Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)” diğeri genin üçüncü intronunda bulunan 9 farklı allel içeren “Short Tandem Repeat (STR)” olmak üzere iki tane multiallelik polimorfik belirleyici bulunmaktadır.

Tek Nükleotid Değişiklikleri: “Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)” FAH geni içinde protein fonksiyonu için bilinen herhangi bir etkileri olmayan 17 SNP tanımlanmıştır.

FAH geninde bulunan bu polimorfik belirleyiciler kullanılarak farklı popülasyonlar için haplotipler çıkartılmıştır. Geniş bir haplotip analizi biallelik polimorfik belirleyicilerin kullanımı ile çıkartılırken, sadece VNTR ve STR polimorfik belirleyicilerini kullanarak mini haplotipler de oluşturulmaktadır (50).

2.12. FAH GENİNDEKİ MUTASYONLAR

FAH enziminin aktivitesine göre mutasyonlar 3 değişik kategoriye ayrılmaktadır.

A. Enzimin hem kinetiğini hem de yapısal özelliklerini etkileyen mutasyonlar.

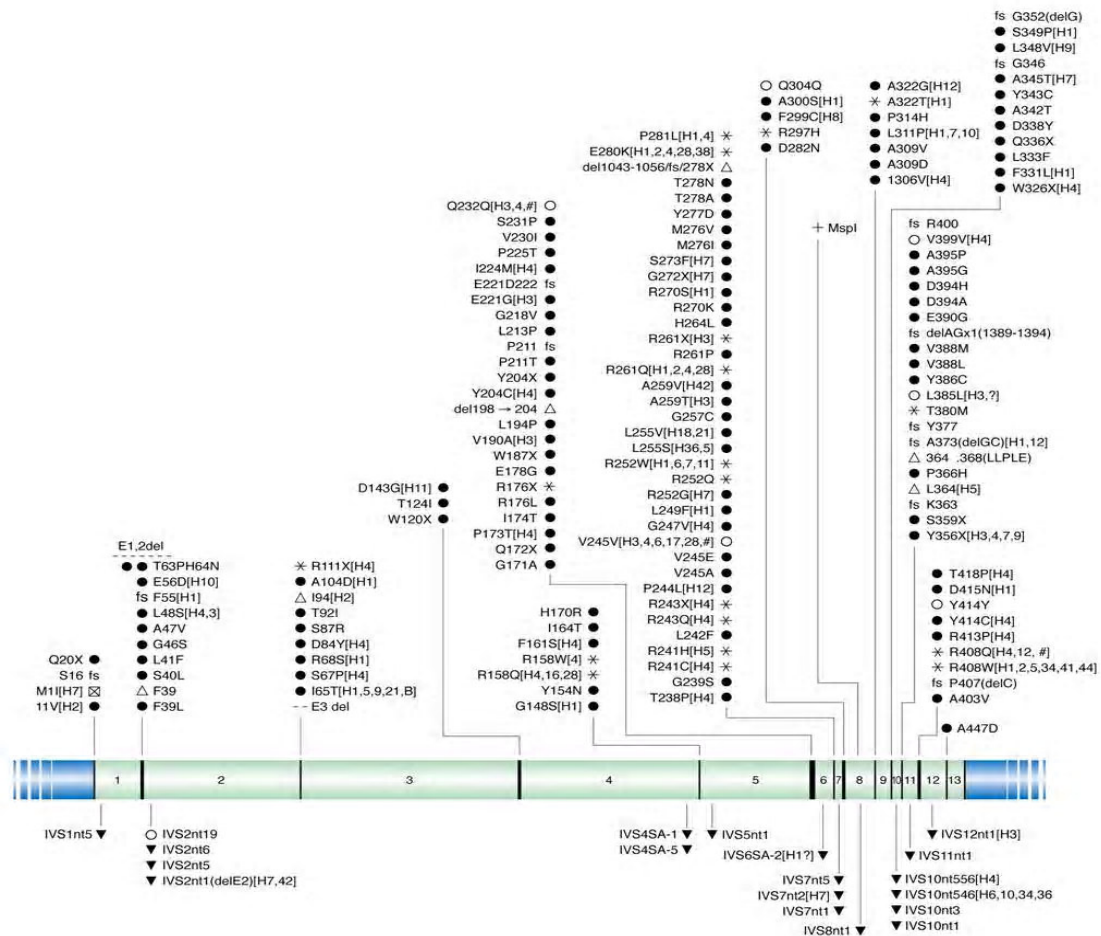
B. Yapısal olarak bir değişime sebep olmayan ama enzim kinetiğini etkileyen mutasyonlar.

C. Enzimin kinetiğini etkilemeyen ancak yapısında değişime neden olan mutasyonlar.

Tablo 2.7. FAH geninde bulunan mutasyonların sınıflandırılması.

Mutasyon tipi	Mutasyon sayısı	Yüzdesi (%)
Missense (yanlış anlamlı)	341	60.14
Delesyon	76	13.40
Splicing	62	10.93
Nonsense (sessiz)	32	5.64
Anlamsız	39	6.88
İnserisyon	10	1.76
Bilinmeyen	7	12.5
Toplam	567	

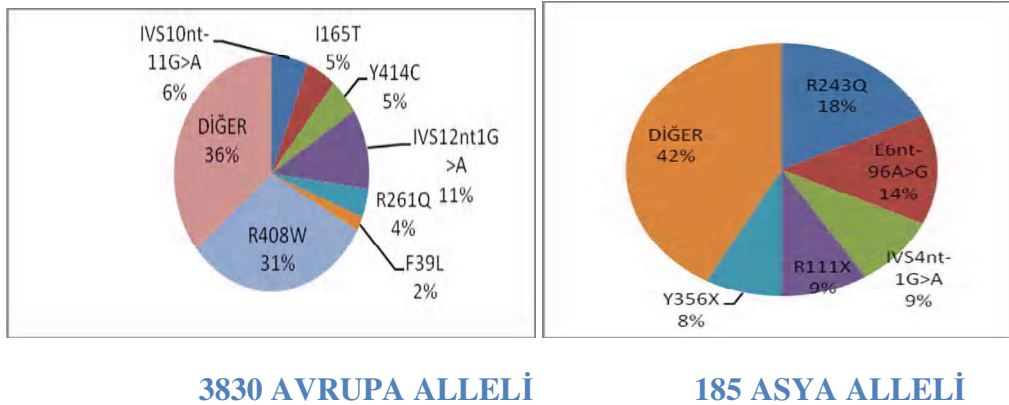
Fenilalanin hidrosilaz geninde 06.03.2012 itibariyle tam olarak 567 mutasyon bildirilmiştir (Tablo 2.7.). FAH geninde tanımlanan mutasyonların gen içindeki dağılımı Şekil 2.7.' de verilmiştir.(51)



Şekil 2.7. FAH geninde tanımlanan mutasyonlar ve polimorfik bölgelerin gen içindeki dağılımları <http://www.mun.ca>

Fenilalanin hidroksilaz geninde bildirilen ilk mutasyon, 12. intronun 5' ucunda "splice" bölgesindeki tek bir baz değişikliğidir (GT→AT) (52). Fenilalanin hidroksilaz enzim aktivitesinin tam ya da tama yakın eksikliğine yol açan mutasyonlar, "null" mutasyon olarak adlandırılır. Ancak FAH allellerinin %60'ından fazlasında missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların etkileri ancak deneysel olarak, invitro ekspresyon yöntemi ile değerlendirilebilir.

FAH geni 1986 yılında izole edilmiş ve izleyen yıllarda FAH eksikliği bulunan popülasyonda önemli oranda allelik heterojenite gösterilmiştir. Bening polimorfizmler veya daha az sıklıkla görülen bening varyantlar tanımlanmışsa da bunların büyük çoğunluğu nadir görülen mutasyonlar olup FAH aktivitesini etkileyip hiperfenilalaninemiye yol açmaktadır. Avrupa kökenli popülasyonda mutant kromozomların üçte ikisinden altı farklı mutasyon sorumludur. Belirtmeye değer bir bulguda Asya toplumunda (bilgiler Çin, Kore, Japonya aittir) FAH mutasyonlarının %80 'inden biraz fazlasını diğer altı mutasyon oluşturmaktadır. Geriye kalan hastalık yapıcı mutasyonlar tek başlarına enderdir. (Şekil 2.8.)



Şekil 2.8. Avrupa ve Asya kökenli popülasyonlarda FAH mutasyonları ve dağılımı. (Asya ile ilgili bilgiler Çin, Kore, Japonya'ya aittir) (53)

Her toplumda FAH mutant popülasyonunda önemli ölçüde genetik heterojenite vardır. Lokustaki yüksek allelik heterojenite (bir lokusta birden fazla allel bulunması) nedeni ile toplumların çoğunda FKÜ' li hastalar genetik birleşiktir (compound) ve FAH bozukluklarında görülen enzimatik ve klinik bulgularıyla fenotipik farklılıklarla uyumlu bir bulgudur. Başlangıçta FAH genotipini bilmenin fenotipi güvenilir bir şekilde tahmin edebilmeye olanak vereceği düşünülmüşse de bu beklentiler gerçekleşmemiştir. Böylece henüz aydınlatılamamış biyolojik değişkenlerin FAH lokusunda genotipik

benzerlik olsa dahi FKÜ’de fenotipik farklılıklar yarattığı açıktır. Fenilketonurideki fenotipik çeşitlilik mutant allellerin heterojenitesinden kaynaklanır. Ancak FAH lokusundaki genotipin etkisinin her zaman beklenen fenotip ile uyumlu olmadığı da anlaşılmıştır (53). Bu bilgiler bize HFA fenotipinin başka genetik ve çevresel faktörlerden de etkilenen kompleks bir özelliğe sahip olduğunu, HFA’ nın multifaktoriyel bir hastalık olduğunu göstermektedir (38).

Aynı genotipe sahip kardeşlerde farklı fenotiplerin gözlenmesi, mutant FAH genotipi için tahmin edilen enzim aktivitesinin her zaman metabolik fenotip ile uyumlu olamaması, FKÜ ‘nun multifaktoriyel bir hastalık olduğunu desteklemektedir (54, 55). Beyne FA transportunu, FA havuzunun büyüklüğünü ve metabolik kontrolü düzenleyen henüz tanımlanmamış genlerin var olduğu düşünülmektedir. Bu çeşitli genetik faktörlerin yanı sıra tanı yaşı ve metabolik kontrolün derecesi gibi çevresel ve toplumsal faktörler de fenotipik çeşitliliğe katkı sağlamaktadır (56, 57).

Hiperfenilalaninemili vakaların dörtte üçünden fazlasında birleşik heterozigosite bulunduğundan, genotip - fenotip korelasyonunun gözlenmesi zordur (57).

2.13. MATERNAL FENİLKETONÜRİ

Canlılarda sistein haricindeki fetal amino asit konsantrasyonları, maternal aminoasit konsantrasyonlarından yüksektir. Taurin, glutamik ve aspartik asit dışında tüm amino asitler anneden fetusa aktif transport ile taşınır. Fetal FA konsantrasyonları annedekinin yaklaşık iki katıdır. Hiperfenilalaninemili gebelerde FA, plasental transport için diğer nötral amino asitlerle yarışa girer ve tıpkı postnatal hayatta olduğu gibi değişik yollarla fetal kimyayı etkiler. Ancak bu yollardan hangisinin fetusun gelişmesi üzerinde kritik rol oynadığı bilinmemektedir (1, 58).

Fetusta organogenezin büyük oranda gerçekleştiği üçüncü-sekizinci gebelik haftaların da maternal ve dolayısıyla fetal kan FA düzeyinin yüksek olması organogenezisi bozar ve fetusta *maternal fenilketonuri* olarak adlandırılan anomalilerin görülmesine neden olur (58).

Erişkin hayatta diyet tedavisi uygulanmayan hiperfenilalaninemili anne bebeklerinin %90-95 ‘inde mental retardasyon, %73-100’ünde mikrosefali, %12- 29’unda konjenital kalp hastalığı, %40-50’sinde intrauterin büyüme geriliği görülür. Daha nadir olarak fetal alkol sendromunu bulgularına benzer şekilde dismorfik yüz bulguları, özefageal atrezi,

trakea-özefageal fistul, intestinal malrotasyon, ekstrofi vezika ve diğer ürogenital anomaliler, koloboma ya da katarakt, yarı damak dudak görülür (58, 59, 60). Gebelikte uygulanan FA'den kısıtlı diyetin yararı konusunda şüphe yoktur. Gebelik süresince kan FA düzeylerinin 3-6 mg/dl arasında tutulması ile mental retardasyon oranı %2'ye, mikrosefali oranı %24'e, düşük doğum ağırlığı oranı %13'e düşmekte, konjenital kalp hastalığı kaybolmaktadır (61).

Diyet tedavisi uygulanmayan HFA'lı kadınlarda spontan düşük riski de yüksektir (%24) ve tedavi ile bu oran belirgin olarak düşmektedir (62).

Tablo 2.8. HFA'lı/ FKÜ'lü anne çocuklarında, kan fenilalanin düzeylerine göre anormali sıklığı (61)

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

Cinsel olgunluğa erişen HFA'lı kız hastaların maternal FKÜ hakkında bilgilendirilmesi gerekliliğinin, özellikle de diyet tedavisinin konsepsiyondan en az üç ay önce başlanması gerekliliğinin üzerinde durulmaktadır (58). Yapılan geniş çaplı bir çalışmada konsepsiyon öncesinde ve gebelik sırasında FA'dan kısıtlı diyet tedavisi başlanan, kan FA düzeyleri 250 µmol/L (4 mg/dl) altında tutulan HFA'lı anne çocukları karşılaştırılmış, çocuklara birinci, dördüncü, sekizinci ve 14. yaşlarında zeka testleri uygulanmış ve konsepsiyon öncesi diyetle başlayan HFA'lı anne çocuklarının test sonuçlarının anlamlı olarak daha iyi olduğu gösterilmiştir (63).

Önerilen kan FA düzeyinin gebelik süresince 10 mg/dl'nin altında, 6 mg/dl civarında tutulmaya çalışılmasıdır. Daha düşük değerlerde ise hipofenilalaninemi nedeniyle fetusun zarar görebileceği düşünülmektedir. Diyet, fetusun da gelişimi göz önünde tutularak, gerekli miktarda protein, yağ, vitamin, eser element ve kalori içermelidir (62).

Gebelikte BH₄ tedavisi alternatif tedavi yöntemi olarak umut vaat etmektedir (64). Ancak gebelikte BH₄ kullanımı ve güvenilirliğine dair yeterli çalışma yoktur. Geç tanı alan, PTPS eksikliği olan ve gebeliği süresince BH₄ tedavisi alan bir hastada BH₄ kullanımının fetus üzerine yan etkisi saptanmamıştır (65). Yine, FAH geninde BH₄ 'e yanıt veren mutasyonları saptanan ve gebeliği süresince BH₄ tedavisi alan HFA' lı anne bebeğinin normal gelişim gösterdiği bildirilmiştir (66). Gebelikte BH₄ tedavisinin etkinliği, güvenilirliği ve maliyeti açısından ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Kan FA düzeyi 15 mg/dl ve üzerinde iken gebe kalanlarda malformasyon riski çok yüksek olduğundan mutlaka tıbbi terminasyona gidilmesi, kan FA düzeyi 12 mg/dl ve üzerinde olan gebelere de gebeliğin sonlandırılması önerilmektedir (1).

2.14. GENOTİP - FENOTİP İLİŞKİSİ

Fenilalanin hidroksilaz eksikliğinde iç ve dış kaynaklı birçok faktör etkili olabilmektedir. Bu hastalıktan hem çevre (diyetle alınan fenilalanin miktarı) hem de kişinin sahip olduğu genetik özellikler (FAH genindeki ve BH₄'nin oluşumunda görev alan çeşitli enzimlerin sentezlendiği genlerdeki mutasyonlar) sorumludur. Her bireyin genomu kendine özgüdür ve bireyler aynı mutant FAH genotipine sahip olsalar bile aynı HFA fenotipine sahip olamayabilmektedirler. Tedavi görmemiş bazı HFA hastaları, klasik FKÜ'ye sebep olacak mutasyonlara sahip olsalar bile, normal zekâ düzeyi gösterebilmektedirler. Bazı tek yumurta ikizlerinde ise, aynı genotipe sahip oldukları halde farklı klinik ve metabolik fenotiplerin görüldüğü gözlenmiştir (67).

Her ne kadar FAH eksikliğinde fenotipi etkileyen birçok faktör bulunsun da birçok vakada FAH genotipi, metabolik fenotipin en önemli belirleyicisidir. Metabolik fenotipteki bu çeşitlilik öncelikle FAH genindeki mutasyonlar nedeniyle olmaktadır. Genotip, biyokimyasal fenotipin tahmini için yeterli olabilirken (örneğin fenilalanin yükleme testleri yoluyla) klinik fenotipin tahmini için yeterli olmamaktadır (örneğin mental retardasyon seviyesi). Kognitif ve metabolik düzeylerdeki karmaşıklık nedeniyle FKÜ artık "sadece bir tek genin neden olduğu bir hastalıktır" kavramı geçerliliğini yitirmektedir.

Kognitif Fenotip

Beyin dokusunda birikim yapan fenilalanin, beyin gelişimi ve fonksiyonu üstüne olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle tedavi edilmemiş HFA hastalarında mental retardasyon görülmektedir. Ancak diyet tedavisi almamış her bir bireyde beyin

gelişimi ve zekâ aynı oranda etkilenmemektedir. Zekâ oldukça karmaşık bir özelliktir ve aynı genotipe sahip olan HFA hastalarında farklı IQ değerleri görülebilmektedir. Bu durum kan-beyin bariyeri ve bireyler arası metabolizma farklılıklarından dolayı fenilalaninin beyine alınımı ile ilişkilidir (67).

Metabolik Fenotip

Birçok hasta birey aynı mutant FAH genotipine sahip olsalar da, kan fenilalanin seviyesi ve tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarları farklılık göstermektedir. Bu durumun en önemli nedeni diyetle alınan fenilalaninin ince bağırsak yoluyla absorpsiyonunda ve karaciğer ile alınımında bireyler arası metabolik farklılıkların olmasıdır. Bunun yanı sıra hidroksilasyon, transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları sonucu fenilalaninin metabolize edilmesi de kişiden kişiye değişiklik göstermektedir (59).

Örneğin, hepatik nükleer faktör 1 (HNF1) hepatik genlerin ekspresyonundan sorumludur ve bu gen lokusunda meydana gelebilecek bir değişim de fenilalanin hidroksilasyon seviyesini etkileyebilmektedir (57).

Enzimatik Fenotip

Metabolik fenotipte ve kognitif fenotipte olduğu gibi aynı mutant FAH genotipine sahip olan hasta bireylerde fenilalaninin hidroksilasyon seviyelerinde farklılıklar gözlenmektedir. Bu bireylerin farklı enzimatik aktiviteye sahip olabileceklerini göstermektedir. Ayrıca bu durum kişinin genetik altyapısına bağlı olarak sahip olduğu şaperonların ve proteazların niteliksel ve niceliksel özellikleri ile ilişkilidir (57).

2.15. VARYANT FKÜ VE NON-FENİLKETONÜRİK HİPERFENİLALANİNEMİ

FAH aktivitesi yokluğu (kontrollere göre aktivite %1 'in altında) fenilketonüriye neden olurken, FAH enziminde bir miktar rezidüel aktivite ile birlikte olan mutasyonlar şiddeti daha az non-FKÜ hiperfenilalaninemi ve varyant FKÜ denilen hastalıklara yol açmaktadır. Normal diyet almakta iken plazma fenilalanin düzeyi 1 mM'un altında ise non-FKÜ hiperfenilalaninemiden bahsedilir. Bu fenilalanin düzeyleri normal düzeylerin 10 katı kadardır ve klasik fenilketonürideki düzeylerin (>1 mM) altındadır. Non-FKÜ hiperfenilalaninemideki orta derecede fenilalanin düzeyi artışları beyine çok fazla zarar vermez, çok fazla artış yoksa (<0,4 mM) hiç zarar vermez ve bu vakalar rutin yenidoğan

taramasında saptandıkları için dikkate gelirler. Non-FKÜ hastalardaki normal fenotip, klasik fenilketonürlü vakaların tedavisinde aşılması gereken ‘emin’ kan fenilalanin düzeylerini belirlemede en iyi göstergedir. Varyant FKÜ ise klasik FKÜ ile non-FKÜ hiperfenilalaninemi arasında fenilalanin toleransı olan bir kategoridir, hastalar diyetlerinde fenilalanin kısıtlaması gerektirirler fakat bu kısıtlama klasik FKÜ’de olduğu gibi sıkı değildir. Bu üç fenotip ile FAH geni mutasyonları arasındaki ilişki klinik heterojenitenin açık bir örneğini oluşturmaktadır (53).

2.16. FENİLKETONÜRİDE KLİNİK BULGULAR

Doğumda normal olan bebekte beslenmeye başladıktan sonra metabolize olamayan, biriken fenilalanin ve metabolitleri beyin dokusuna toksik etki gösterirler (22, 68, 69). Beyin dokusundaki amino asit transportu etkilendiğinden miyelinizasyon kusurları ve katekolamin sentezinde bozukluklar oluşur (5, 70). Fenilalanin birikimi ve azalmış nörotransmitter düzeyi (dopamin ve triptofan) normal beyin gelişimini ve santral sinir sistemini etkiler. Sonuç olarak hasarlı miyelinleşme, gri ve beyaz madde de kistik dejenerasyonlar oluşur (8, 20).

Vakaların 1/3’ünde EEG’de hipsaritmi bulguları ile birlikte infantil spazm gelişmektedir. Nadiren pilor stenozunu düşündürebilen şiddetli kusmalar görülür (68).

Deri ve saçtaki hipopigmentasyon artan fenilalanin konsantrasyonu ile tirozin hidroksilazın kompetitif inhibisyonu yüzündendir. Tirozin hidroksilaz aktivitesinin inhibisyonu, tirozinin DOPA’ya dönüşümünü ve melanin oluşumunu önler. Böylece etkilenmiş ve tedavi edilmemiş bireyler mavi gözlü, kumral saçlı ve açık tenli olurlar (71, 72). Genetik olarak koyu ciltli çocuklar kızıl saçlı olabilmektedir (73). Daha büyük çocuklarda hiperaktivite, otizm tarzında davranış bozuklukları, amaçsız hareketler, ritmik sallanma ve titreme görülebilir (74). Doğuştan kalp hastalıkları FKÜ ‘de genel popülasyondan daha yaygındır (75). Birçok çalışma gösteriyor ki FKÜ’li bireyler yüksek osteopeni insidansına sahipler (76, 77).

Genel olarak altı ay civarında, fenilketonürlü çocukta yaş gruplarına göre büyüme-gelişme geriliği olduğu fark edilmeye başlanır. Baş kontrolü, oturma ve yürüme evreleri gecikir.

Mikrosefali, konvülsiyon, egzamatöz deri lezyonları ve idrarda küf kokusu tedavi edilmemiş hastalarda izlenen diğer bulgulardır (22, 69, 73). Fenilketonürinin klinik

belirtileri sık kusma, irritabilite, hiperaktivite ve önceden belli olmayan dengesiz davranışları içerir. Tremor, yürüme ve postür bozukluğu, tikler ve belirgin parkinsonizm gelişebilir.

FKÜ'li insanlar diğerleri ile iletişim kurmaktan çekinirler, sinirli görünürler ve depresyon belirtileri gösterirler. Bununla birlikte bazı hastalar kendilerini ifade edebilir, hiperaktif, konuşkan ve atılgan kişilik gösterebilir. İlginçtir ki FKÜ'li insanlar yalan söyleme, ağlama ve söz dinlememe gibi davranışları daha az gösterirler (78) .

Tablo 2.9. Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri

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

2.17. FENİLKETONÜRİ TARAMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Fenilketonüri görülme sıklığının yüksek olması ve erken tespit edildiğinde tedavi edilebilirliği açısından günümüzde taranması önerilen hastalıkların başında yer almaktadır (69). Fenilketonürinin geriye dönüşümsüz hasarlarının önlenmesi için erken tanı ve tedavisi şarttır (68). Tarama; asemptomatik hastalarda subklinik dönemde tanı amacıyla fizik muayene, laboratuvar ve radyolojik inceleme işlemlerinin yapılmasıdır. Taramada kullanılan testlerle tanı amaçlı testler arasındaki farklılık iyi bilinmelidir. Tarama testi sağlıkla ilgili bir sorun olabileceği konusunda uyarır. Tek başına kesin olarak hastalığın olduğunu söylemez. Şüphe edilen sağlık sorununun olup olmadığının anlaşılabilmesi için kesin tanı koydurucu testlerin uygulanması gerektiğini bildirir. Bu nedenle sadece tarama testi sonuçlarına dayanarak ailelere genetik danışma verilmemeli, konvansiyonel laboratuvar testleri ile tanının doğrulanması beklenmelidir (69, 79).

Alınan kan örneklerinin değerlendirilmesi ve yüksek FA düzeylerinin saptanması için Guthrie testi, kromatografik inceleme, fluorometrik inceleme, enzimatik inceleme ve ardışık kütle spektrometrisi ile tarama günümüze kadar kullanılan laboratuvar uygulamalarıdır (17). Dr.Robert Guthrie (A.B.D) 1965 yılında çok sayıda yeni doğan etkin taranmasına elverişli tarama testi geliştirmiştir. Guthrie mikrobiyolojik analizi yüzlerce çocuğa kısa sürede uygulanabilmesi, özel bir aleti gerektirmemesi ve çok ekonomik olması nedeniyle 1960'lı yıllardan beri taramada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajları dikkate alınarak ülkemizde de ulusal fenilketonüri taraması Guthrie testi ile yapılmaktadır (1). Bu tarama testi filtre kağıdında ki kurumuş kan örneklerinin fenilalanini ölçmek için kullanılan bakteriyel inhibisyon analizine dayanır (80). Tarama laboratuvarlarında örnekler *Basillus Subtilis* içeren besi ortamına alınır. *Basillus Subtilis* fenilalanin içermeyen bir kültür ortamında yaşayamamaktadır. Fenilalaninin analogu olan beta-2-tiyenilalanin besi yerine eklenir ve böylece bakterilerin fenilalanin kullanımı engellenir. Hiperfenilalaninemi varsa fazla fenilalanini basil kullanır ve bebeğin kan örneğinin çevresinde kan fenilalanin düzeyiyle orantılı bir üreme alanı izlenir (81, 82). Testte 2.5 mg/dl üzerindeki değerler pozitif kabul edilir. Taramanın duyarlılığı %90'ın üzerinde, yalancı pozitiflik oranı %1'in altındadır (1, 17, 83).

Guthrie testinde pozitif sonuç alınan her yenidoğanda FKÜ olması beklenmez. Bebeğe kalıcı HFA'lardan biri olabileceği gibi enzim maturasyonunda ki gecikmeye bağlı geçici HFA ya da yalancı pozitiflik de olabilir. Bu nedenle kan FA düzeylerinin kantitatif ölçümü gerekir (17), Normal kan FA düzeyleri Tablo da gösterilmiştir.

Tablo 2.10. Normal kan FA düzeyleri

	<u>mg/dl</u>	<u>μmol/L</u>
Erişkin	0.96 ± 0.25	58 ± 15
Adolesan	1 ± 0.21	60 ± 13
Çocuk	1,03 + 0.3	62 ± 18
Yenidoğan	≤ 2	≤ 120

Hiperfenilalaninemi düşünülen hastaların tanısı için uygulanabilecek, yönlendirici olabilecek en basit test demir-3-klorür (FeCl_3) testidir. Test bir tüp içerisine altı damla idrar ve üç damla %10'luk FeCl_3 konularak yapılır. Fenilketonürlü hastanın idrarına

FeCl₃ eklendiğinde 2-3 dakika içerisinde kaybolan yeşil bir renk oluşur. Demir-3-klorür testini pozitifleştiren başka durumlar da olduğundan tanı kantitatif yöntemlerle doğrulanmalıdır (1). Ancak bu testin yenidoğan dönemi hatta erken bebeklik döneminde hasta bireylerde de negatif sonuç verebileceği unutulmamalıdır. Pozitif test sonuçlarının doğrulanması için kullanılan kantitatif sonuç veren yöntemler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), iyon Exchange kromatografisi, fluorometrik metottur (1). Hiperfenilalaninemisi olan bebeklerin bazılarında, özellikle anne sütü ile beslenenlerde, kan FA düzeyinin yavaş yavaş yükselebileceği göz ardı edilmemelidir. Bu hastalarda HFA tipini belirlemek için, diyetteki bebeğe kısa süreli olarak normal protein içeren diyet vererek biyokimyasal bulgularını değerlendirmek ya da diyet tedavisinde hastanın FA'ya toleransını izlemek gerekebilir (17).

Normal diyet altında kan FA düzeyleri 10 mg/dl'den az olan hafif "mild" HFA (fenilketonuri olmayan HFA) vakalarında tanıyı desteklemek amacıyla FA yükleme testi uygulanır. Hastalara 100 mg/kg FA oral verildikten 24 saat sonra bakılan kan FA düzeyi, başlangıç düzeyine dönmüşse bu grup hastalara diyet tedavisi gerekmez. Ancak FA düzeyi başlangıç değerine dönmemişse proteinden kısıtlı diyet ile tedavi başlanır (83). Kalıcı HFA saptanan vakaların %1-3'ünde FAH enziminin kofaktörü olan BH₄ metabolizma bozukluğu vardır. Ayırıcı tanı için ileri testler yapılmalıdır (1).

Tablo 2.11. Fenilketonüri taramasında kullanılan yöntemler

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

2.18. FENİLKETONÜRİDE TEDAVİ ÇALIŞMALARI

- Diyet tedavisi
- Gen tedavisi
- Enzim tedavisi
- Madde birikimini önlemek
- Oluşmayan Son Ürünü Yerine Koymak

2.18.1. Diyet Tedavisi

Tıbbi besin kısıtlaması uygulanan hastalık gruplarının önemli bir örneği doğumsal metabolik hastalıklardır. Bu hastalıklarda kabaca enerji eksikliği oluşturan toksik metabolitlerle zehirlenme tablosu yaratan veya değişimi sağlanamadığından çeşitli organlarda metabolitlerin depolanmasına neden olan hastalık tabloları ortaya çıkar (84).

Genlerdeki bozukluk nedeniyle enzim eksikliği ve yokluğunda gelişen hastalıkların bazıları metabolize olmayan besin öğelerinin diyetten çıkarılması ya da miktarının kısıtlanmasıyla tedavi edilebilir. Uygulanacak diyet hastalığın kötü gidişini durdurmalıdır. Aksi halde gereksiz ve pahalı bir tedavi uygulanmış olur. Diyet tedavisinin amacı; santral sinir sisteminin korunması, normal büyüme gelişmenin sağlanması, biyokimyasal parametrelerin düzeltilmesi, diyetle yeterli miktarda protein, enerji, vitamin, mineral ve eser elementlerin verilmesidir. Önerilen diyet, hasta için tat ve çeşitlilik yönünden kabul edilebilir olmalıdır (85). FAH enzimi fenilalaninin tirozine dönüşümünden sorumludur ve bu enzimdeki bozukluklar FKÜ hastalarında beyinde fenilalanin amino asidinin birikmesi sonucunda zihinsel aktivite kaybına neden olmaktadır. FKÜ hastalarının diyetlerine büyük nötral amino asitlerin (Large Neutral Amino Acids (LNAA): fenilalanin, tirozin, triptofan, treonin, izolösin, lösin, valin, metionin, histidin) eklenmesi FKÜ'li bireylerde beyinde biriken fenilalanin miktarının azalmasını sağlamaktadır. Çünkü bu LNAA'ler kan-beyin bariyerini geçerken fenilalanin ile birlikte ortak bir taşıyıcı kullanmakta ve fenilalanin ile bu açıdan yarışa girmektedir (86).

1950'lerin başlarında fenilketonürlü çocukların yaşamlarının ilk bir haftası içinde, fenilalaninden kısıtlı diyetle başlamaları çocukların nörolojik durumlarında yararlı etkilerle sonuçlanmıştır. Diyet tedavisinin başlamasıyla birçok uzman diyetisyen, bu diyet tedavisinin ne kadar sürdürülmesi konusunda tartışmaya düşmüştür. İlk başlarda yaşamın ilk 10 yılında diyet uygulaması düşüncesinin yerini, son günlerde çocukluk yıllarının

yanında tüm “Yaşam Boyu” fenilalaniniden kısıtlı diyet uygulaması almıştır. Bu düşünce ve uygulama değişiklikleri klinik gözlemlere ve hayvanlar üzerinde yapılan deneylere dayanmaktadır. Klasik fenilketonüri hastalığında beyin hasarının önlenmesi için tedavinin hayatın ilk 20 günü içinde başlaması önemlidir (17, 85, 87).

Doğumdan hemen sonra bir fenilalaniniden kısıtlı diyet ve fenilalanin içermeyen formüle başlanmalıdır. Tedavi başlangıçta dokularda biriken fenilalaninin beyin ve diğer vücut dokularına zarar vermemesi için boşaltılması gerekmektedir. Bu diyet “boşaltma diyeti” denir. Kandaki fenilalanin düzeyine göre 3-7 gün süreyle hastaya “0” mg fenilalanin, 2 g/kg protein verilerek takip edilir. Serum fenilalanin seviyesi istenilen düzeye geldiğinde hastanın gereksinimlerine uygun düzeyde fenilalanin içeren diyet başlanır (85). 2 yaşın altındaki çocuklar en azından günde 25 mg /kg/tirozin içeren 3 g/kg toplam amino asit alımına devam etmelidir. Beyin gelişimi için de zararlı olan düşük kan fenilalanin konsantrasyonunun uzun süre devam etmesinden kaçınmak için önlemler alınmalıdır.

Kan fenilalanin konsantrasyonunu kontrol amacıyla haftalık ya da iki haftada bir takipler yapılmalıdır (89). Diyet, serum fenilalanin düzeyini 2-8 mg/dl arası sürdürmek için günlük kg başına 20-30 mg fenilalanin içerecek şekilde hesaplanır (73). Normalde 3 mg/dl altında olması gereken serum fenilalanin düzeyi klasik fenilketonüride 20 mg/dl’nin üzerindedir (85).

Hiçbir düşünce fenilalaninin optimal düzeyde olmasını istemez (26). Fenilketonürlü hastalarda istenilen kan değerleri 1-10 yaş için 2-6 mg/dl, 11-16 yaş için < 10 mg/dl, 16 yaş üstü için < 20 mg/dl’dir (9). US’da klinikler yaygın olarak fenilalanin düzeylerini 12 yaşından önce çocuklarda 2-6 mg/dl, 12 yaşından büyük çocuklarda 2- 10 mg/dl önermektedirler. Fakat NIH (National Institutes of Health) 12 yaşından sonraki çocuklarda fenilalanin düzeyinin 2-15 mg/dl sürdürülmesi gerektiğini söylemektedir (26). Kan fenilalanin düzeyinin periyodik ölçümünde; besin alımının analizi, beslenme durumunun gözden geçirilmesi ile beraber hastanın bunlara yanıtının izlenmesi kullanılır (26). Genellikle beyin hasarı, 10-15 mg/dl fenilalanini geçince önem kazanır. 2 mg/dl nin altına düşünce vücut protein depolarını katabolize etmeye başlar, sonuç olarak gelişme geriliği oluşur. Her çocuk için günlük miktar bireysel olarak; iştaha, büyüme ve gelişime, kan fenilalanin ve tirozin seviyesine göre değişir (8). Tedavi hastanın klinik durumuna göre değişim göstermekle birlikte; ilk yıl haftada bir, 1-12 yaşları arasında ayda iki kez, 12 yaştan sonra ayda bir ve gebelik döneminde haftada iki kez izleme yapılmalıdır. US klinikleri 18 yaşına kadar yaklaşık ayda bir izlem

yapmaktadırlar (26). Fenilketonürlü çocuklarda eser element ve minerallerin ana kaynağı olan doğal protein kaynakları sınırlandırıldığı için, selenyum, çinko, bakır, demir, kalsiyum ve içme suyu florlanmamış ise flor yetersizliği görülmektedir. Hastaya vitamin ve mineraller yönünden destek verilebilir (9). Ergenler ve yetişkinlerdeki tedavi tavsiyeleri çeşitlidir (89). Genel olarak yaşam için diyet tedavisine destek artar (49). Bazı çalışmalar ergenlikteki sıkı diyetle ara verilmesinin, plazma fenilalanin konsantrasyonu 1200 $\mu\text{mol/L}$ 'nin altında kaldığında yönetici olmayan fonksiyonları etkilemediğini belirtilmektedir (90). Bir başka çalışma gösteriyor ki, eğer 12 yaşından sonra diyetle ara verilirse IQ sabit kalır fakat diğer fonksiyonlar geriler. Fenilalaninden kısıtlı diyeti bırakan yetişkinlerde dikkat süresinde azalma ve bilgi işleme yeteneğinde yavaşlık gözlenir. Aynı zamanda beyin elektriksel aktivitesinde hasar, kas tonusunda artma, kemik mineral içeriğinde azalma ve mental problemler ortaya çıkar.

FAH Eksikliği Olan Hamile Kadın:

Fenilketonürlü kadınlar, bebek sahibi olabilirler ancak gebelik dönemlerinde diyet takibi çok önemlidir (26). Fenilketonürlü anne adayları konsepsiyondan önce düşük fenilalaninli diyetle alınmalı ve kan fenilalanin düzeyi yakından izlenmelidir (62).

Planlı gebelik, gebelikten önceki fenilalanin düzeyinin kontrollü olmasını sağlarken plansız gebelik ise anne ve bebek için tehlikeli olabilmektedir (26). Gebelikten en az 3 ay önce fenilalanin düzeyi 6 mg/dl'den az olduğunda başarı sağlanabilmektedir. Gebelikte tavsiye edilen kan fenilalanin düzeyi 2-6 mg/dl'dir (26). Kan fenilalanin düzeyi 5 mg/dl geçmeyecek şekilde tedavi sağlanmalıdır (17). Kullanılan aminoasit karışımları da göz önüne alınarak 1-1.3 g/kg/gün protein önerilmektedir (9). Gebelik süresince en fazla 15 gün aralarla kan fenilalanin düzeyinin ölçülmesi maternal fenilketonürlünün önlenmesinde esas olmalıdır (3).

Fenilalaninin fetüse geçisi, fetüsün gelişimini 1.5 kez daha fazla etkilemektedir (24). Fetüsteki yüksek fenilalanin düzeyleri mikrosefali, mental gerilik, konjenital kalp hastalığı, düşük doğum ağırlığı açısından risklidir (19, 26, 47). Ayrıca doğumsal anomaliler (kardiyak lezyon, özefajiyal atrezi, intra uterin büyüme geriligi) meydana gelebilmektedir. Ölü doğum ve düşük doğum riski yüksektir (17). Hiperfenilalaninemili adolesan kızlar, plansız gebeliklerin riski (fötal anomali) için danışmanlık almalı ve fenilalanin düzeyinin takibinin sürdürülmesi için cesaretlendirilmelidirler (24). Fenilketonürlü kız çocuklarına 10-12 yaşından başlayarak maternal fenilketonüri ve gebelik süresinde sıkı diyet tedavisinde

bulunmanın önemi konusunda eğitim yapılmalıdır (17). Tüm aile için psikososyal destek sağlanmalı, bebeğin bakımının devamlılığı geliştirilmeli ve takip edilmelidir (26). Maternal fenilketonüride diyetin amacı; kan fenilalanin seviyesini normal sınırlarda tutabilmek, sağlıklı bebeklerin dünyaya gelmesini sağlamak ve yaşam kalitesini arttırmaktır (9).

2.18.2. Gen Tedavisi

Diyet tedavisine alternatif olarak geliştirilen başlıca tedavi yöntemi gen tedavi yöntemidir. Fenilalaninin hidrosilasyonu en az üç enzim tarafından oluşturulur ve bunların en az ikisini etkileyen iki lokusta mutasyon vardır (94). Bu lokuslar da FAH apoenzimini tanımlayan allellerin etkilenmesine sebep olmuştur. Ancak mutant allellerde heterojenlik mevcuttur. Somatik gen transferi ile temel sorunun çözümü için girişimler yapılmıştır (92). Gen transferi için aracı olarak rekombinant adenovirus kullanılarak FAH oluşturamayan fare karaciğerine yapılan transferin başarısı tam, ancak geçici olmuştur (93). Taşıyıcı rekombinan adenovirus, nötralizan antikolar tarafından yok edilmiştir (94, 95).

Gen tedavi yöntemlerinin ortak amacı FAH'ın ekspresyon seviyesini normale çıkartabilmektir. Farklı metodlar kullanılarak FAH genini içeren çeşitli vektörlerin (örneğin, adeno-assosiyasyon virüsü: AAV, gibi) hepatik hücrelere veya dokulara gönderilmesi ile azalmış olan gen ekspresyonunun tersine döndürülmesi hedeflenmiştir. Ancak gen tedavi çalışmaları genelde başarısızlıkla sonuçlanmıştır (41,42).

2.18.3. Enzim Tedavisi

Sorunun ikinci basamağını oluşturan enzim eksikliğinin düzeltilmesi de bir başka çözüm olabilir. FAH sentezi bir çok kofaktör gerektiren kompleks bir işlem olup, sentetik üretim pahalı bir yöntemdir (96). Bu nedenle gen terapisi ile enzimi hastanın kendi organizmasına ürettirmek veya sağlam karaciğer transplantı ile enzim yapan organı sağlamak yoluna gidilmiştir (97, 98). Varjo ve arkadaşları İtalya'da 10 yaşında sirozlu bir çocukta karaciğer transplantasyonu ile kan fenilalanin düzeyini 9.5 mg/dl değerinden 1.0-1.2 mg/dl'ye kadar indirmiştir (99, 100). Ancak toplumda mevcut FKÜ sıklığı ve organ transplantasyonu zorlukları düşünülürse, rutin FKÜ tedavisi için karaciğer transplantasyonunun uygun bir yaklaşım olmayacağı açıktır (101).

2.18.4. Madde Birikimini Önlemek

Bu amaç için en yaygın kullanılan fenilalanin kısıtlı diyet tedavisidir. Uygulamalardan biri fenilalanin hidrosilaz yerine "fenilalanin amonyak liyaz" (PAL) kullanımıdır (102, 103). Mikroalg kaynaklı bu enzim oral yoldan verilerek, vücutta biriken fenilalanini zararsız

maddelere parçalayıp vücuttan attırmaktadır. PAL, FAH'ın aksine kendi kendini katalizler, kofaktör gerektirmez (104). Sarkissian ve arkadaşları tarafından geliştirilen prototip üretimi pahalıydı; ancak aynı ekip daha bol ve ucuz üretim metodu geliştirdiğini bildirmektedir (105). PAL kan fenilalanin düzeyini farelerde %76 düzeyinde düşürebilmektedir (106). Diyet + PAL tedavisi önemli bir yer tutacak gibi görünmektedir (106, 107).

2.18.5. Oluşmayan Son Ürünü Yerine Koymak

Fenilketonüride oluşmayan tirozin, esansiyel aminoasit olarak kabul edilmelidir. Bunun yanı sıra düşük fenilalaninli besinin tadını iyileştirmek ve zihinsel aktivite artışına katkıda bulunmak amacı ile fazla tirozin verilmesini önerenler olduğu gibi, bunun tedavi sonucunu etkilemekte anlamlı fark yaratmadığını vurgulayanlar da mevcuttur (109). Yukarıdaki metinden de anlaşıldığı gibi gen ve enzim tedavisi rutine girecek kadar geliştirilinceye kadar, fenilalanin kısıtlı diyetle devam etmek gerekmektedir. Bu hastalar için üretilen düşük proteinli, düşük fenilalaninli diyet gıdalar dünyada büyük bir sanayi kolu haline gelmiştir. Bu hastalıkların tanısı ve tarama çalışmaları konusunda ülkemizde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Ancak gittikçe daha fazla sayıda tanı konulan bu hastaların tedavisini dış ülkelere bağımlı sürdürmeye çalışmak, ulusal ekonomi ve sağlık stratejisi açısından ülke çıkarlarına aykırıdır. Bu konuda çok sayıda yeni çalışmaya ve devam eden çalışmaların desteklenmesine ihtiyaç vardır (110).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇLER

Çalışmada kullanılan demirbaş listesi EK 1’de verilmiştir.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1. Örneklerin Alınması

Bu tez çalışmasına Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mustafa Eraslan ve Fevzi Mercan Çocuk Hastanesi Beslenme ve Metabolizma polikliniğinde FAH enzim eksikliği tanısı ile takip edilen 40 hasta dahil edilmiş, DNA izolasyonları yapılmıştır. EDTA’lı 2 ml kan DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.2. Periferik kandan DNA izolasyonu

- 1- 20 µl proteinaz K epandorf tüplere aktarılarak üzerlerine antikoagüle hasta kanından 100 µl eklendi.
- 2- 200 µl buffer A1 eklendi ve 5-10 sn vortexlendi, 56 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
- 3- 200 µl etanol (%96-100) eklenip vortexlendi.
- 4- Karışım spin kolonlu tüplere aktarıldı, 8000 devirde 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 5- Spin kolonlar yeni toplama tüplerine aktarıldı, eskiler atıldı, 500 µl buffer AW1 eklendi ve 8000 devirde 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 6- Spin kolonlar yeni toplama tüplerine aktarıldı, eskiler atıldı, 500 µl buffer AW2 eklenip 1400 devirde 3 dakika santrifüj yapıldı.

7- Spin kolonlar yeni epandorf tüplere aktarılıp üzerine 200 µl buffer AE eklendi, oda ısısında 1 dakika beklendi, 8000 devirde 1 dakika santrifüj yapıldı, epandorf tüplerde DNA elde edildi.

3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları

FKÜ paneli pyrosekans primerleri ile her bir mutasyon analizi için bir PCR reaksiyonu yapıldı ve bu reaksiyon kullanılarak o mutasyona özgü sekans primeriyle sekans analizi gerçekleştirildi. Okunan dizilimler şekil de verilen şablonla karşılaştırılarak mutasyonlar saptandı.

Tablo 3.1. Fenilalanin Hidroksilaz Mutasyon Dizilimleri

Assay (yön)	Mutasyon	Dizilim	
FKÜ S1 (forward)	Wt E221G P225T	GAAGATAACATTCCCCAGCTGG GGAGATAACATTCCCCAGCTGG GAAGATAACATTACCCAGCTGG	Seq. to analyze
FKÜ S2-1 (forward)	Wt R241C R243L R243Q	TTCCGCCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCT TTCTGCCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCT TTCCGCCTCCTACCTGTGGCTGGCCTGCT TTCCGCCTCCAACCTGTGGCTGGCCTGCT	Seq. to analyze
FKÜ S2-2 (forward)	Wt R261X R261Q	CCGAGTCTTCCACTGCACACAGTACAT CTGAGTCTTCCACTGCACACAGTACAT CCGAATCTTCCACTGCACACAGTACAT	Seq. to analyze

3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA üzerinde istenilen bölgenin, o bölgeye özgü primerler kullanılarak çoğaltılması işlemidir. Isı ile denatüre edilerek tek zincir haline getirilen DNA molekülüne, primerlerin bağlanması ve bu primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur. Bu aşamalar 45 döngü halinde tekrarlanarak istenilen bölge çoğaltılmış olur.

PCR reaksiyonu için pyromark PCR kiti kullanıldı, her bir mutasyon için aynı PCR protokolü uygulandı.

1- DNA hariç tüm bileşenleri içeren bir reaksiyon miksi hazırlandı

Tablo 3.2. PCR reaksiyon kompozisyonu

Bileşen	Hacim/ reaksiyon
Reaksiyon miksi	
Pyromark pcr mastermix	12.5 µl
Pcr primer çifti	1 µl
H ₂ O	6.5 µl
DNA	5 µl
Toplam	25 µl

2- Reaksiyon miksleri hazırlandıktan sonra 20 µl PCR tüplerine dağıtıldı.

3- Her bir reaksiyon tüpüne konsantrasyonu yaklaşık 2ng/µl 'ye ayarlanmış DNA örneğinden 5'er µl koyuldu.

4- Pcr reaksiyonu aşağıdaki protokole göre uygulandı.

Tablo 3.3. PCR Cihaz Protokolü

Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 aşamalı döngü		
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Annealing(bağlanma)	60°C	30 saniye
Extension (uzama)	72°C	30
Döngü sayısı : 45		
Final extension	72°C	10 dakika

3.2.3.2. Pyrosekans

Pyrosekans, DNA sentezi esnasında salınan pirofosfatların yakalanması esasına dayanan bir tekniktir. Enzimatik reaksiyonlar kaskadı ile eklenen nükleotidlerin görülebilir ışığa çevrilmesi ile karakterizedir. Bu kaskat polimeraz tarafından bir nükleotidin eklenmesi sonucu inorganik pirofosfatın (Ppi) salınması ile başlar. Salınan PPI luciferaz enzimi ile ATP ile birleşip ışığa dönüştürülür. Eklenen nükleotidin bilinmesi ile birlikte, çalışılan örneğin sekansıda belirlenmektedir. Kolay uygulanabilmesi, gereksiz nükleotid, primer harcanmaması, nispeten daha kolay, ucuz ve otomatize edilmesi nedeniyle, son yıllarda özellikle farmakogenetik çalışmalarda tercih edilen bir metoddur. Bu metodun,

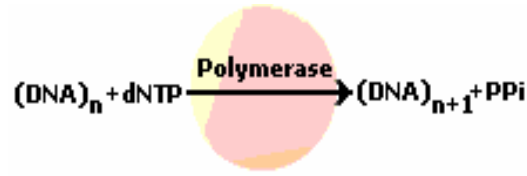
mutasyonların taranmasında, cDNA analizlerinde, hastalık ile ilişkili genlerin tekrar dizilenmesinde, mikrobiyal tiplerede ve tek nükleotid polimorfizmlerinin analizlerinde uygun olduğu gösterilmiştir (111). Günümüzde pyrosekans'da kullanılan dört farklı kimyasal vardır ve bunlar polimeraz, sulfiraz, lusiferaz ve apiraz enzimlerini içermektedir. Bu dört enzimin bulunduğu otomatize sistemde apiraz enzimi sayesinde dizileme esnasında kullanılmayan nükleotidler ortamdan uzaklaştırılır. Otomatize olmayan metodlarda bu enzimin işini manuel olarak yıkama ile yapılırdı (112). Sekanslama işlemi, dizilenecek bölümün PCR ile çoğaltılması ile başlar. Bu metodda PCR ile çoğaltılmış bölgeler streptavidin kaplı sefaroze tanecikleri ile kaplanarak örnek tek zincirli hale getirilir ve böylece dizileme tek zincir üzerinden çalışır. Elde edilen sinyaller sinyalin gücüne göre tasarlanmış bir software ile değerlendirilmektedir. Aynı zamanda eğri altında kalan alanlarda değerlendirmede kullanılmaktadır.

Pyrosekans metodunun diğer genotiplleme teknolojileri ile kıyaslanması

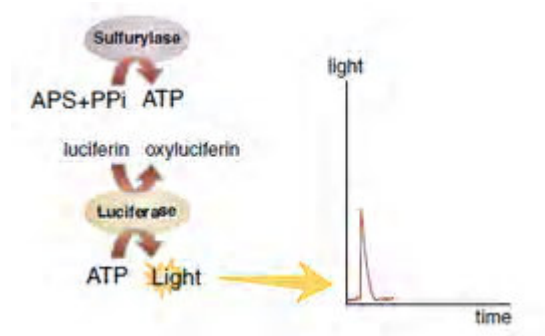
RFLP, Sanger DNA dizileme, Taqman, SSCP ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarında pyrosekans metodunun %99 daha güvenilir, uygulama kolaylığı ve daha ucuz olduğu saptanmıştır (113, 114).

Pyrosekans Teknolojisinin Esasları

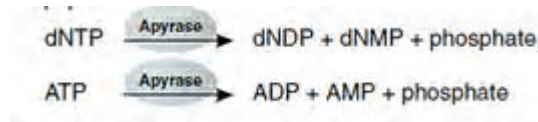
1. Adım; Sekanslama primeri, PCR ile çoğaltılmış ve tek zincir haline getirilmiş hedef bölgesine, DNA polimeraz, ATP sulfiraz, lusiferaz ve apirazla, adenozin 5'fosfosülfat ve lusiferin substratlarıyla hibridize edilir.
2. Adım; Öncelikle 4 nükleotidden biri reaksiyona katılır . DNA polimeraz nükleotidin DNA zincirine entegre olmasını sağlar DNA polimeraz her sağladığı birleşmeden pirofosfat salınmasına neden olur.
3. Adım; Salınmış pirofosfatları ATP sulfurilaz adenozin 5' monofosfat varlığında ATP'ye dönüştürür. Bu salınan ATP ise lusiferaz aracılığı ile lusiferini oksilusiferine dönüştürerek ışığın oluşmasına neden olur. Bu ışık CCD kamerası ile pikograma dönüştürülür.
4. Adım; Nükleotid degradasyonu sağlayan apiraz enzimi, sürekli birleşmeyen dNTP'leri degrade eder. Degradasyon bittiğinde ise diğer dNTP eklenir.
5. Adım; dNTP eklenmesi sırayla yapılır. Eklenen nükleotidler ekranda izlenebilir.



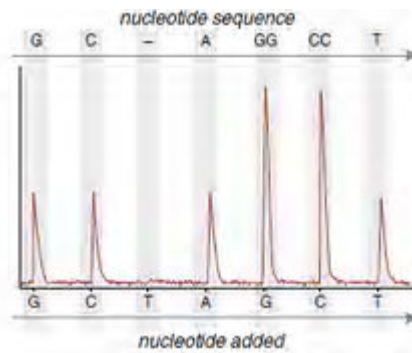
Şekil 3.1. Ppilerin açığa çıkması (www.adelaide.edu.au)



Şekil 3.2. Nükleotid bağlanmalarının ışığa dönüşmesi (www.adelaide.edu.au)



Şekil 3.3. Apiraz enziminin bağlanmayan nükleotidleri degrade etmesi (www.adelaide.edu.au)



Şekil 3.4. Eklenen nükleotidlerin ekrandan izlenmesi (www.adelaide.edu.au)

Pyrosekans Metodun Uygulanması

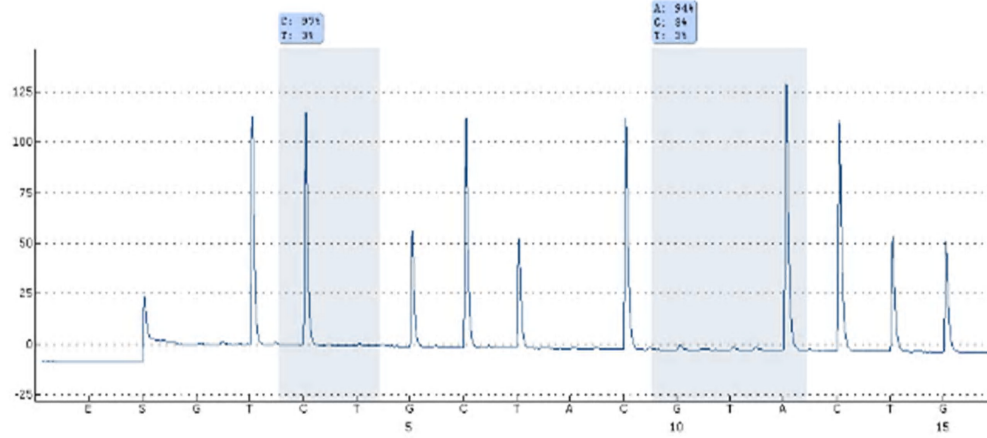
Bağlanma solüsyonu, su ve streptavidin seforoz bilyelerden bir mastermix hazırlanıp, vortekslenir.

Tablo 3.4. Mastermix Kompozisyonu

Bileşen	Miktar/örnek
Streptavidin sepharose bilyeler	2 µl
Binding buffer	40 µl
Ultra saf su	28 µl
Toplam	70 µl

PCR platelerine bu karışımdan 70 µl konulur. 10 µl PCR ürünü karışıma eklenir. Platein üzeri plate örtüsü ile kapatılır. Hazırlanan 2.5 µl sekans primerlerine 22.5 µl primer bağlanma solüsyonu eklenir, PCR ürününün olduğu PCR plate DNA zincirlerinin ayrılması için vakumlanır. Vakum esnasında, öncelikle 2 dk suyu vakumlayarak vakumun filtrelerinin temizlenmesi ve PCR plateninde sallayıcıya konulması gerekir. Daha sonra sırasıyla distile su, %70 etanol, denaturasyon sıvısı ve yıkama solüsyonu vakumlanır. Vakum kapatılır. Vakum filtreleri dikkatlice dizileme primerlerinin bulunduğu pyrosekans plateine emdirilir. Sonrasında ısıtıcı blokta 2 dk bekletilir. Böylece sekanslama primerleri tek zincirli DNA ile bağlanır. Plate ısıtıcı blokdan kaldırılıp 5 dk oda ısısında bekletilir. Bu arada software'in diziye uygun verdiği sayılarla nükleotidler, enzim ve substratlar cihazın tüplerine konulur. Örneklerin isimleri kaydedilerek analiz için cihaz başlatılır. Öncelikle enzim arkasından substrat PCR örneklerinin bulunduğu platelere akar, ardı sıra salınan nükleotidler tek zincirli DNA'ya bağladıkları zaman pikogramları ekrandan izlenir ve bu şekilde sentez edilen DNA dizisi analiz edilir.

Well: B1
 Assay: PKU S2-1
 Sample ID: 1
 Note:
 Analysis version: 2.0.6



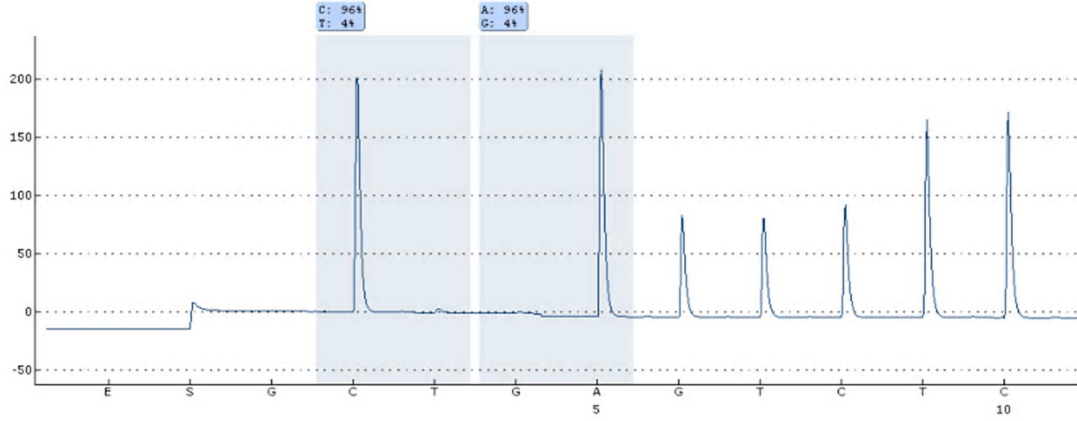
Sequence to analyze

TTCC/TGCCTCCG/A/TAACTGTGGCTGGCCTGCT

Position	1	2
Quality	Passed	Passed
A(%)		94
C(%)	97	
G(%)		3
T(%)	3	3

Şekil 3.5. R243Q homozigot mutasyonu, ekzon 7' de görülen c.728 G>A değişimi

Well: C1
Assay: PKU S2-2
Sample ID: 12
Note:
Analysis version: 2.0.6



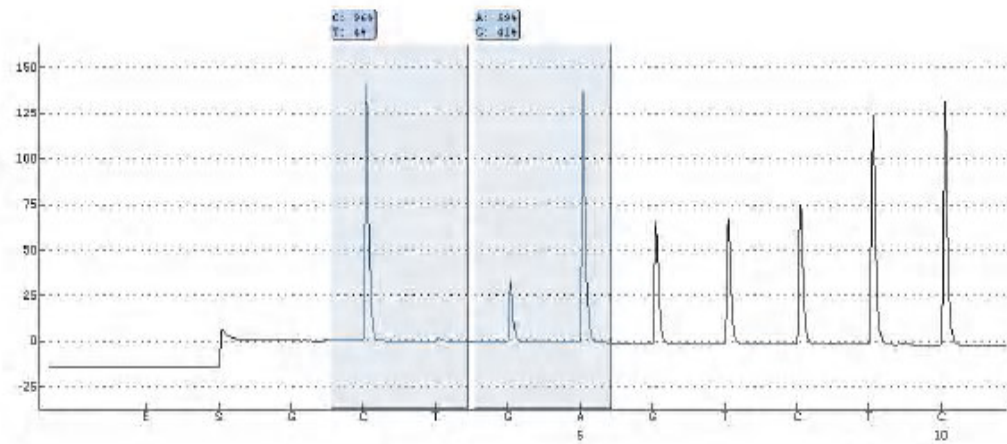
Sequence to analyze

CC/TG/AAGTCTTCCACTGCACACAGTACAT

Position	1	2
Quality	Passed	Passed
A(%)		94
C(%)	97	
G(%)		3
T(%)	3	3

Şekil 3.6. R261Q homozigot mutasyonu, ekzon 7' de görülen c.782 G>A değişimi

Well: B3
Assay: PKU S2-2
Sample ID: 3
Note:
Analysis version: 2.0.6



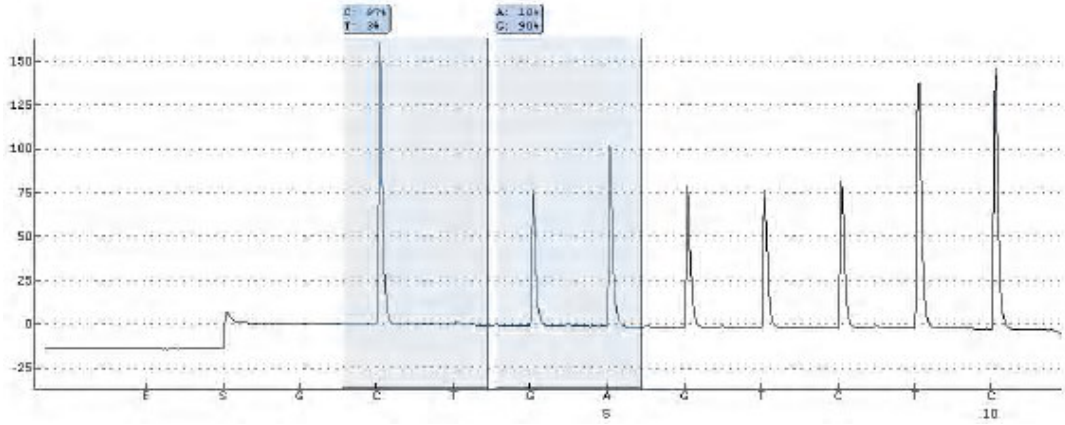
Sequence to analyze

CC/TG/AAGTCTTCCACTGCACACAGTACAT

Position	1	2
Quality	Passed	Passed
A(%)	-	59
C(%)	96	-
G(%)	-	41
T(%)	4	-

Şekil 3.7. R261Q heterozigot mutasyonu.

Well: B1
Assay: PKU S2-2
Sample ID: 1
Note:
Analysis version: 2.0.6



Sequence to analyze

CCGAGTCTTCCACTGCACACAGTACAT

Position	1	2
Quality	Passed	Passed
A(%)	-	10
C(%)	97	-
G(%)	-	90
T(%)	3	-

Şekil 3.8. Normal genotip dizisi

3.3. KULLANILAN KİMYASALLAR VE HAZIRLANIŞLARI

Kullanılan Kitler

1- DNA izolasyon kiti (Qiagen manuel)

MALZEMENİN ADI	MİKTARI	HAZIRLANIŞI
Buffer AL (lisis buffer)	12ml	
Buffer AW1 (wash buffer1)	19ml	Üzerine 25 ml etanol (%96-100) eklendi.
Buffer AW2 (wash buffer2)	13ml	Üzerine 30 ml etanol (%96-100) eklendi.
Proteinaz K	1.25ml	
Buffer AE (elution buffer)	22ml	

2- PCR kiti

Pyromark pcr mastermix	Taq DNA polimeraz tampon, MgCl ₂ , dNTP Solüsyonu, Taq DNA Polimeraz Enzimi
Pcr primer çifti	PCR1,PCR2,PCR3
Su	

3- PCR Purifikasyon Kiti (Qiagen)

Bağlama solüsyonu: (Binding Buffer)	3M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, % 5 Etanol, pH 6,6
Yıkama solüsyonu: (Wash Buffer) :	% 20 Etanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5
Elisyon solüsyonu : (Elution Buffer)	10 mM Tris-HCl, pH 8,5

4- Pyrosekans kit içeriği

Pyromark gold Q24 reagent (5*24)	Qiagen
Pyromark binding buffer (200 ml)	Qiagen
Pyromark denaturation solution (500ml)	Qiagen
Pyromark wash buffer (200ml)	Qiagen
Pyromark annealing buffer (250 ml)	Qiagen
Pyromark vacuum prep filter probe(100)	Qiagen
Pyromark pcr kit(200 * 25 µl rxn)	Qiagen
Pyromark sepharose high performance	Qiagen
Absolut etanol	
Enzimler (Dna polymerase , Atp sulfilirase,lusiferace,apyrase)	

4. BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mustafa Eraslan ve Fevzi Mercan Çocuk Hastanesi Beslenme ve Metabolizma Polikliniğ'in'de takip edilmekte olan 40 hiperfenilalaninemi hasta örneğinde ve hastalığı taşımayıp benzer özellikleri olan 20 kişilik kontrol grubunda, FAH genindeki mutasyon analizleri gerçekleştirildi.

- Bu çalışma FKÜ tanısı konmuş hastalarda pyrosekans moleküler yöntemini kullanarak E221G (RS62514934), P225T (RS119475589), R241C (RS76687508), R243Q (RS62508588), R243L (RS62508588), R261X (RS5030850), R261Q (RS5030849), R413P (RS79931499), D415N (RS62644499) mutasyonlarını taşıyıp taşımadıklarının tespitini içermektedir.
- 40 bireyin tamamı informatif bulunmuştur.
- Hastaların 21'i (%52.5) kız, 19'u (47.5) erkektir.
- Hastalar 3 gün ve 8 ay arası bir yaşta FKÜ tanısı almış olup, ortalama tanı yaşı 49 gündür.
- 26 bireyin anne- babaları arasında akrabalık söz konusu değilken, 14'ü I. Derece kuzen evliliği sonucu dünyaya gelmiştir.
- 40 çocuktan 11 tanesi mental retardasyona uğramıştır. Bu hastaların tanı yaşı çok geçtir (4- 8 aylık)
- Hastaların tanı anındaki kan FA düzeylerinin ortalama değeri 23,24 mg/dl'dir. (3 hastanın tanı anındaki kan FA düzeyi bilinmemektedir.)

- Tanı anında ki kan fenilalanin düzeyine göre yapılan sınıflandırmada hastaların 27'si klasik, 11'i hafif fenilketonüri iken 2 'si ise atipik fenilketonüridir.
- Taranan 9 mutasyondan R261X nonsense, diğer 8'i missense mutasyon grubuna girmektedir.
- Hastaların 6'sında heterozigot, 1'inde birleşik heterozigot, 2'sinde ise homozigot mutasyon tespit edilmiştir. 2 hastada R241C, 1 hastada R243L, 1 hastada R261X ve 2 hastada R261Q mutasyonları heterozigot bulunmuştur aynı zamanda, bir hasta R243L ve R261Q açısından birleşik heterozigottur (iki farklı hastalık yapan allele sahip). Homozigot mutasyonlardan birisi R243Q olup, diğeri R261Q' dur.

Tablo 4.1. FAH geninde tanımlanan mutasyonlar ve allel sıklığı (n=80).

MUTASYON	DİZİLİM	EKZON	MUTASYON TİPİ	ALLEL SAYISI	%
E221G	gaa>gga	6	missense	0	0
P225T	ccc>acc	6	missense	0	0
R241C	cgc>tgc	7	missense	2	2,5
R243L	cga>cta	7	missense	2	2,5
R243Q	cga>caa	7	missense	2	2,5
R261X	cga>tga	7	nonsense	1	1,25
R261Q	cga>caa	7	missense	5	6,25
R413P	cgc>ccc	12	missense	0	0
D415N	gac>aac	12	missense	0	0

Tablo 4.2. HFA hastalarının klinik bulguları.

ÖZELLİKLER	ORTALAMALAR
YAŞ	8 yaş (min: 2 – maks: 19 yaş)
TANI YAŞI	49 gün (min: 3 gün – maks: 8 ay)
CİNSİYET • Kız • Erkek	%52.5 (21/40) Kız %47.5 (19/40) Erkek
KLİNİK FENOTİP • Klasik FKÜ • Hafif FKÜ • Atipik FKÜ	%67.5 (27/40) %27.5 (11/40) %5 (2/40)
TANI ANINDAKİ FA DÜZEYİ	23.24 mg/dl (min: 10 – maks: 43 mg/dl)
AKRABALIK DERECEİ • I. Derece kuzen evliliği • Yok • Bilinmiyor	%30 (12/40) %65 (26/40) %5 (2/40)
KLİNİK SONUÇ • MR (mental retarde) • Hafif MR • Normal	%20 (8/40) %7.5 (3/40) %72.5 (29/40)

Tablo 4.3 Anamnez özeti

Hasta no	Cinsiyet	Tanı yaşı(gün)	Tanı anındaki fenilalanin düzeyi mg/dl	Zeka düzeyi	Gözlenen klinik fenotip	Beklenen klinik fenotip	Akrabalık
1	KIZ	40	22	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
2	ERKEK	20	30	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
3	KIZ	30	25	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
4	KIZ	17	25	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
5	ERKEK	13	24	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
6	ERKEK	240	21,5	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
7	KIZ	30	20	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
8	KIZ	14	11	HAFİF GERİ	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	I.derece kuzen
9	KIZ	30	13	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
10	ERKEK	120	26	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
11	ERKEK	15	43	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
12	ERKEK	11	12,4	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	I.derece kuzen
13	KIZ	30	17	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
14	ERKEK	-	-	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Bilinmiyor
15	ERKEK	30	28	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
16	ERKEK	13	33	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
17	KIZ	30	14	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
18	KIZ	3	32	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
19	KIZ	90	30	HAFİF GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
20	KIZ	-	-	GERİ	Atipik FKÜ	-	Bilinmiyor
21	KIZ	180	25	HAFİF GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
22	KIZ	15	20	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
23	KIZ	30	10	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
24	KIZ	-	26	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
25	ERKEK	22	22,2	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
26	KIZ	30	22	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
27	ERKEK	30	13	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
28	KIZ	15	29	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
29	ERKEK	30	12	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
30	ERKEK	-	-	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
31	ERKEK	15	41	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
32	ERKEK	15	25	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
33	KIZ	25	24	GERİ	Atipik FKÜ	-	I.derece kuzen
34	KIZ	180	25	GERİ	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
35	KIZ	30	13	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
36	ERKEK	60	36	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
37	ERKEK	240	11,7	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	Yok
38	ERKEK	-	26	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	Yok
39	KIZ	30	37	NORMAL	Klasik FKÜ	Klasik FKÜ	I.derece kuzen
40	ERKEK	5	15,3	NORMAL	Hafif FKÜ	Hafif FKÜ	I.derece kuzen

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fenilketonüri (FKÜ), fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliği ile gelişen entellektüel fonksiyonlarda bozulma ile ilerleyen ve tedavi edilmez ise ağır mental motor gerilikle sonuçlanan otozomal resesif geçişli doğuştan metabolik bir hastalıktır. FAH enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşemeyen fenilalanin ve onun metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenil laktik asit, fenil asetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır. FAH geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda FAH enzimi, aktivitesini ya tamamen ya da tama yakın olarak kaybetmektedir. Enzim aktivitesi %1'in altında olan hastalarda klasik FKÜ fenotipi gözlenirken, klasik FKÜ'ye nazaran daha hafif olan fenotiplerde ise, enzim aktivitesi %1'den %30'lara kadar çıkmaktadır.

E221G mutasyonu, Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada tek hastada ve onun babasında görülmüş (114), mısır popülasyonundan seçilen 90 FKÜ hastalı başka bir çalışmada ise bu mutasyona hiç rastlanılamamıştır (115).

P225T mutasyonu Hacettepe üniversitesinde 200 HFA alleli ile yapılan çalışmada, sadece 2 allelde rastlanmış, sıklığı %1 olarak kaydedilmiştir (116). Çek Cumhuriyetinde yapılan çalışmada ise sıklığı %1.5 bulunmuştur (117).

Bizim çalışmamızda E221G ve P225T mutasyonlarına rastlanılamamıştır.

Kore, Japonya, Tayvan popülasyonlarında R241C mutasyonunun allel sıklığı sırasıyla %5.7 (118), %7.3 (119), %32 (120) olarak bildirilmiş, Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada bu mutasyona rastlanılamamışken (121), 2007 yılında kuzey Çin popülasyonu ile yapılan çalışmada %2.2 allel sıklığı bulunmuştur (122). Türkiye' de

yapılan çalışmada R241C mutasyon sıklığı %1.5 olarak bulunmuşken (116), bizim çalışmamızda sıklığı %2.5 bulunmuştur.

R243L mutasyonunun allel sıklığı daha önce Türk popülasyonu ile yapılan çalışmada %0.5 bulunmuştur (116). Bizim çalışmamızda bir hasta R243L ve R261Q açısından birleşik heterozigot bulunmuştur ve sıklığı %2.5'dur. Yapılan çalışmalarda bu mutasyonları her iki allelinde taşıyan bireyler klasik FKÜ fenotipine sahipken birleşik heterozigot çıkan bu hasta hafif FKÜ fenotipi göstermektedir. Bu durumun en önemli sebebi R243L mutasyonunun, R261Q mutasyonunun tek allelde yarattığı olumsuz etkiyi diğer allelde telafi etmesidir. Çünkü bu hastalıkta allelik heterojenite söz konusudur. Allelik heterojenitenin en önemli sebebi ise fenilalanin hidroksilaz enziminin tetramer olarak işlev görmesidir. Böylece farklı allellerden sentezlenen monomerler enzimin aktivitesine tek başlarına bir etkide bulunamazlar. Bu nedenle enzim tetramer formuna yani aktif olduğu forma geçtiğinde aktivitesinde fazla bir düşüş gözlenmemektedir.

Her toplumda FAH mutant popülasyonunda önemli ölçüde genetik heterojenite vardır. Lokustaki yüksek allelik heterojenite nedeni ile toplumların çoğunda FKÜ' li hastalar genetik 'birleşik' dir ve FAH bozukluklarında görülen enzimatik ve klinik bulgularıyla fenotipik farklılıklarla uyumlu bir bulgudur.

R261X nonsense bir mutasyondur, arjinin aminoasiti stop kodona dönüşmüştür bunun sonucunda fenilalanin hidroksilaz fonksiyonunu yitirmiş olur. Güney Brezilyada %9.5 (123) sıklıkla görülen bu mutasyon, Batı İran'da %8 sıklıkla en fazla görülen mutasyon bulunmuştur (124).

Çalışmamızda R261X mutasyonu heterozigot olan hasta klinik olarak hafif FKÜ dur ve allel sıklığı % 1.25'dir.

R243Q yapılan çeşitli çalışmalarda allel sıklığı sırasıyla, Kore'de %12 (118), Fas'da %4.1 (125), İran'ın batısında %4 (124), Türkiye'de %3 (116) bulunmuştur. Çin' de yapılan bir çalışmada kuzey bölgesinde %24, güney bölgesinde ise %9.5 sıklıkla görülen bu mutasyon (126), 2012 yılında Çinin Şansi eyaletinde yapılan çalışmada %12.7 ile en sık görülen mutasyon bulunmuştur (127). Yapılan araştırmalar bu mutasyonun güney Asya ülkelerin de daha sıklıkla (%7-18) görüldüğünü ortaya koymuş ve mutasyonun bu bölgeden köken alıp yayıldığını düşündürmüştür (118). Bizim çalışmamızda bu mutasyon bir hastada homozigot olarak saptanmıştır ve allel sıklığı %2.5'dir. Hastanın tanı anındaki kan FA düzeyi 22mg/dl' dir ve hasta klasik FKÜ

fenotipine sahiptir, yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bulgular uyumlu bulunmuştur. 40 günlük iken tanı konmuş olan hasta; akraba evliliği sonucu dünyaya gelmiş, zeka geriliği yoktur.

R243Q mutasyonu enzim aktivitesinin tamamen kaybolmasına ve bu mutasyona sahip olan hastalarda çok ağır bir klasik fenilketonüri fenotipinin gözlenmesine sebep olmaktadır.

R261Q mutasyonu FAH enziminin katalitik alt biriminde meydana gelen bir yanlış anlamlı (missense) mutasyondur. Tüm Akdeniz ülkelerinde yaygın mutasyonlar arasında yer alan bu mutasyon ülkemizde de ikinci yaygın mutasyondur. Çukurova bölgesinden seçilen 23 hasta ile yapılan bir çalışmada ikinci en yaygın mutasyon olan R261Q mutasyonunun görülme sıklığı % 15.2 olarak bulunmuştur (128). Hacettepe üniversitesinin yaptığı çalışmada ise %9.5 sıklığa sahip yaygın mutasyonlardan biridir (116). İtalya’da Daniele A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en yaygın mutasyon (%20.2) bulunmuştur (129). Brezilyanın farklı bölgelerinden seçilen hastalarla yapılan çalışmada sıklık %4-16 arasında değişmektedir (130). Ayrıca Portekiz’de % 10, (131) Mısır’da %11.5 (115), Küba’da %15.8 (132) , İspanya’da %10.3 (133), Sırbistan’da %6 (134), Almanya’da yapılan bir çalışmada R261Q mutasyonunun Alman hastalarda görülme sıklığının %5.8, Almanya’da yaşayan Türk hastalarda ise %7.7 olduğu bildirilmiştir (128).

Bizim çalışmamızda 2 hasta R261Q açısından heterozigot, bir hasta R243L ve R261Q açısından birleşik heterozigot, bir hasta homozigottur ve allel sıklığı %6.25’dir.

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki R261Q mutasyonu tüm Akdeniz ülkelerinde yaygın iken Uzak Doğu Ülkelerinde allel sıklığı %1 ‘in altındadır. Türkiye’de klasik FKÜ vakalarında en sık izlenen mutasyonlardan biri R261Q’ dur.

CpG adacıkları, genel kromozom yapısında alışlagelmemiş yüksek konsantrasyonda 5’-CG-3’ dinükleotidi bulundurur. FAH geninin 7. Ekzonu da sitozin ve guanin bazlarından zengin olup mutasyona açık bir bölgedir (hypermutable CpG site) ve bu mutasyonlar tekrarlayan (recurrent) mutasyonlardır. Bununla beraber enzimin katalitik domaininde bulunan R261Q ve R243Q mutasyonları hastalarda homozigot formda bulunduklarında FKÜ fenotipine neden olmaktadır. Ancak bir hasta R261Q mutasyonunu homozigot olarak her iki allelinde taşısa da, klasik FKÜ fenotipi yerine hafif (mild) FKÜ fenotipine sahip olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, kişiden kişiye

değişen metabolik ve enzimatik farklılıklar ile açıklanmaktadır. Hastaların, sahip oldukları saperonların ve proteazların aktiviteleri, karaciğerdeki dekarboksilasyon seviyesi, fenilalaninin kan-beyin bariyerinden geçiş hızı, bazal metabolizma hızı farklı olabileceğinden genotipte her ne kadar ciddi bir enzim aktivitesi kaybı yaratan bir mutasyona sahip olsalar da, farklı fenotipik özellikler göstermektedirler.

12. ekzonda bulunan R413P mutasyonu Kuzey Çin’ de %13.8, Japonya’da %30.5 (126), Türkler’ de ise %1’dir (116).

D415N mutasyonu GAC (asp) - AAC (asn) değişimiyle meydana gelir ve 12. ekzon’da lokalizedir. 17 Danimarkalı non FKÜ hiperfenilalaninemi olan aile ile gerçekleşen çalışmada 3 çocukta bu mutasyona rastlanmıştır (134). Türkler’de ise bu mutasyon %1’ in altında bulunmuştur (116).

Bizim çalışmamızda 12. ekzonda bulunan R413P ve D415N mutasyonlarına rastlanılamamıştır.

Heterozigot formda taşınan bazı mutasyonlar fenotipi açıklayamamaktadır. Bu hastalarda genin çalışma kapsamında değerlendirilemeyen bölgelerinde olası bir heterozigot ve ya homozigot mutasyonu taşımaları olasıdır. Bu hastalarda araştırma genişletilerek daha fazla mutasyona bakılmalıdır.

Dikkat edilmelidir ki; tarama testleri sağlıkla ilgili bir sorun olabileceği konusunda uyarır. Tek başına kesin olarak hastalığın olduğunu söylemez. Şüphe edilen sağlık sorununun olup olmadığının anlaşılabilmesi için kesin tanı koydurucu testlerin uygulanması gerektiğini bildirir. Bu nedenle sadece tarama testi sonuçlarına dayanarak ailelere genetik danışma verilmemeli, konvansiyonel laboratuvar testleri ile tanının doğrulanması beklenmelidir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile HFA tablosuna sıklıkla neden olan mutasyonların belirlenmesi ile ilerleyen dönemlerde HFA’ya yönelik oluşturulacak genetik tarama programlarına katkı sağlayabilmek amaçlanmıştır. Ayrıca homozigot mutasyon tespit edilen hastaların ailelerine bu konuda genetik danışma verilmiş ve bir sonraki gebelikleri için preimplantasyon genetik tanı hakkında da bilgilendirilmişlerdir. Uygulanan pyro-sekans yönteminin, RFLP, Sanger DNA dizileme, Taqman, SSCP ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarında %99 daha güvenilir, uygulama kolaylığı ve daha ucuz olduğu saptanmıştır (113, 114). Bu avantajlarından dolayı bilinen mutasyonların

taranmasında pyrosekans kullanılabilir fakat mutasyon bulunamayan bireylerde tüm gen analizi yapılması için başka bir yönteme başvurmak gerekir.

6.KAYNAKLAR

1. Coşkun T. Amino Asit Metabolizması Bozuklukları. Alp Ofset ve matbaacılık, Ankara, 2003: 181-286.
2. Devlin TM. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Wiley-Liss, New York, 1992.
3. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (8th ed), Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). New York, 2001:1667-1724.
4. Web_1.(2013). Fenilalanin, <http://www.kirklareli.saglik.gov.tr>, Erişim Tarihi (13.06.2013).
5. Çoker M, Darcan S, Mavi E. Metabolik Hastalıklara Yaklaşım. In: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, E.Ç.V. Yayınları 6, İzmir, 1999.
6. Jenkins J, Lea D. Nursing Care in The Genomic Era. Jones and Barlett Publishers, Cura A. (Eds.), Canada
7. Web_2. (2013). www.newbornscreening.info, Erişim Tarihi (5.10.2013).
8. Madden M. Defects in Amino Acid Metabolism. SCJMM 5, Canada, p 57-61.
9. Brown E. Metabolic Screening. Clin Perinatol 25, 1998: p 371-88.
10. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. Am J Hum Genet 1997; 61: 1309-1317.

11. Smith I, Lee P. The hyperphenylalaninemias. In: *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* (2nd ed), J. Fernandes, J.M. Saudubray, G. Van Den Berghe (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York 2000; p 171-184
12. Cedaerbaum SD, Scott CR, Wilcox WR. Amino Acid Metabolism. In: *Emery and Romin's Principles and Practice of Medical Genetics* (3rd ed), Romin DL, Connor JM, Pyeritz RE. (eds), Churchill Livingstone, New York, 1997; 1867-1870.
13. Scriver CR. Phenylketonuria-Genotypes and Phenotypes. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 324: 1280-1281.
14. Lidsky AS, Law ML, Morse HG et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1985; 82: 6221-6225.
15. Ponzzone A, Spada M, Ferraris S, et al. Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment, *Med Res Reviews* 2004; 24: 127-150.
16. Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia In: the position of the metabolic error, *J Biol Chem* 1947; 169: 651-656.
17. Özalp İ. Fenilketonürlü Hastanın Tedavi ve İzlemi. *Katkı Pediatri Dergisi*, 1985: 409-21.
18. Christ SE. Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci*. 2003; 12: 44-54.
19. Hendriksz C, Walter J. Update on Phenylketonuria. *Current Paediatrics* 1985; 14: 400-6.
20. Lundstedt G. Growing up with a Chronic Disease. A Survey of Children with FKÜ in Sweden. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Social Sciences*, Uppsala, 1985.
21. Centerwall Sa, Centerwall Wr. The Discovery of Phenylketonuria. In: *The story of a young couple, two retarded children, and a scientist*. *Pediatrics* 1985; p 89-103.
22. Zeybek Ç. Fenilketonürlü Tarama Programı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2003; p 65-71.
23. Penrose LS. Inheritance of phenylpyruvic amentia phenylketonuria. *Lancet*. 1935; 2: 192-194.
24. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenyl-oxidizing system. *Proc Soc Exper Biol Med*. 1953; 82: 514-515.

25. Bickel H. The first treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 1996; p 2-3.
26. Özalp İ. Yenidoğanda fenilketonuri ve hiperfenilalaninemilerin taranması. *Katkı Pediatri Dergisi* 2000; 21: 176-177.
27. Mitoma C. Studies on partially purified phenylalanine hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 1985; 60: 476-484.
28. Kaufman, S. The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 50: 1085-1093.
29. Kaufman S, Berlow S, Summer GK, et al. Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of biopiterin In: A variant form of phenylketonuria. *N Engl J Med* 1978; 299: 673-679.
30. Erlandsen H, Stevens RC. A structural hypothesis for BH₄ responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 213-230.
31. Eisensmith RC, Woo SL. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum Mutat* 1992; 1: 13-23.
32. Dahl HH, Mercer JF. Isolation and sequence of a cDNA clone which contains the complete coding region of rat phenylalanine hydroxylase: Structural homology with tyrosine hydroxylase, glucocorticoid regulation and use of alternate polyadenylation sites. *J Biol Chem* 1986; 261: 4148- 4153.
33. Lidsky AS, Robson KJH, Thirumalachary C, et al. The FKÜ locus in man is on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 527-533.
34. Eiken HG, Knappskog PM, Guldborg P, et al. DGGE analysis as supplement to SSCP analysis of the phenylalanine hydroxylase gene: detection of eight (one de novo, seven inherited) of nine remaining Norwegian FKÜ mutations. *Hum Mutat* 1996; 8: 19-22.
35. Liu J, Jia X, Zhang J, et al. Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2002;30: 243-57.
36. John H, Walter PJJ, Peter B. Hyperphenylalaninaemia. In: *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* (4th bs) J.-M. S. John Fernandes, Georges Van Den Berghe, John H. Walter (Ed.), Heidelberg: Springer.
37. Özalp İ, Coskun T, Tokatli A, ve ark. Newborn FKÜ screening in Turkey In: at present and organization for future. *Turk J Pediatr* 2001; 43: 97-101.

38. Scriver C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 2007; 28; 831-845.
39. Avigad S, Cohen BE, Bauer S, et al. A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 1990; 344; 168-170.
40. Kaufman, S. The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1971; 35; 245-319.
41. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J*, 1995; 311; 353-366.
42. Thony B, Auerbach GB. Tetrahydrobiopiterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 2000; 347; 1-16.
43. Gold RJ, Mag UR, Neal JL, Scriver CR. The use of biochemical data i screening for mutant alleles and in genetic counselling. *Ann Hum Genet* 1974; 37: 315-26
44. Guttler F. Hyperphenylalaninemia In: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediat Scand* 1980; 280: 1-80.
45. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, et al. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics* 2003; 112: 1557-1565.
46. Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, et al. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 1985; 29: 556-561.
47. Ledley FD, Koch R, Jew K, Beaudet A, et al. Phenylalanine hydroxylase expression in liver of a fetus with phenylketonuria. *J.Pediat* 1988; 113: 463-468.
48. Lichter KU, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 308-16.
49. Rao DN, Kaufman S. Purification and state of activation of rat kidney Phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1986; 5: 8866-8876.
50. DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, et al. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1986; 25: 743-749.
51. Web_1(2013). Memorial university. <http://www.mun.ca/> Erişim Tarihi (8.1.2013)

52. Marvit J, DiLella AG, Brayton K. GT to AT transition of a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5613-5628.
53. Robert L. Nussbaum, MD, et al. Thompson And Thompson Genetics In Medicine (Çeviri) Coşkun T. Öncü Basım Evi 6: 207-208.
54. Blau N. A Differential Diagnosis and International Database of Tetrahydrobiopterin Deficiencies, N. Blau (eds.) , Tectum Verlag, Marburg 1996; 5-57.
55. Treacy E, Pitt JJ, Seller J, et al. In vivo disposal of phenylalanine in phenylketonuria: a study of two sblings. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 595-602.
56. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Phenylketonuria: Screening and management, October 16-18, 2000. *Pediatrics* 2001; 108: 972-982.
57. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999; 15: 267-272.
58. Tokatlı A. Maternal fenilketonuri. *Katkı Pediatri Dergisi* 1991; 12: 20-22.
59. Rouse B, Matalon R, Koch R. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly and developmental outcome. *J Pediatr* 2000; 36: 57–61.
60. Gungor N, Tokatlı A, Coskun T, ve ark. Microcephaly in a hyperphenylalaninemic infant leading to the diagnosis of maternal hyperphenylalaninemia. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 257-258.
61. Lenke RL, Levy HL. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia In: an international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *New Eng J Med*. 1980; 303: 1202-1208.
62. Koch R, Hanley W, Levy H, et al. The maternal phenylketonuria international study: 1984-2002. *Pediatrics* 2003; 112: 1523-1529.
63. Maillot F, Lilburn M, Baudin J, Morley DW, Lee JP. Factors influencing outcomes in the offspring of mothers with phenylketonuria during pregnancy: the importance of variation in maternal blood phenylalanine. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 700 –705.
64. Trefz FK, Blau N. Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria. *Pediatrics* 2003; 112: 1566-1569.

65. Gizewska M, Bich W, Cryowski L. The course of pregnancy and 6- month observation of offspring from mother with a late diagnosis of 6-pyruvoylterahydropterin synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2001; 24 (suppl 1): 31.
66. Koch R, Moseley K, Guttler F. Tetrahydrobiopterin and maternal FKÜ. *Mol Genet Metab.* 2005; 86: 139-141.
67. Trefz FK, Burgard P, König T, et al. Genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 1993; 217: 15-21.
68. Demirkol M. Metabolizma Hastalıkları. In: *Pediatric 1*, Neyzi O, Ertugrul T. (eds.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001; 3: 651-731.
69. Coşkun T. Kalıtsal Metabolizma Hastalıklarının Taranması. In: *Neonatoloji*, Yurdakök M, Erdem G. (eds) Neonatoloji, Ankara 2004; 18: 523-528.
70. Özenoglu A. 0-1 Yaşta Farklı Şekillerde Beslenen Fenilketonürlü Bebeklerin Büyüme Durumları. *Göztepe Tıp Dergisi* 2003; 18: 98-105. Stephen D. Cederbaum et al. Amino acid metabolism. In: *Emery and Rimoin's principles and practice of Medical Genetics* (3rd ed), David L. Rimoin, Michael J, Reed E. Pyeritz, 1996: 1867-1869.
71. Okano Y, Eisensmith RC, Butler F, et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 1991; 324: 1232-1233.
72. Wong D, Eaton M. *Essentials of Pediatric Nursing*. Mosby, St. Louis (eds.) 2001; 6: 762-766.
73. Cowie V. Phenylpyruvic oligophrenia. *J Mental Sci* 1951; 97: 505.
74. Verkerk PH, Van Spronsen FJ, Smith GPA, et al. Prevalance of congenital heart disease in patients with phenylketonuria. *J Pediatr* 1991; 119: 282-285.
75. Zeman J, Bayer M, Stepan J. Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1999; 88: 1348-51.
76. Perez DB, Cambra FJ, Vilaseca MA, et al. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 2002; 91: 899-904.
77. Marshall G, Letcher MA. *Gale Encyclopedia of Medicine: Phenylketonuria*.
78. American Academy of Pediatrics Committee On Genetics Newborn Screening Fact Sheets. *Pediatrics* 1989; 83: 449-64.
79. Wright S, Steiner R. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening. *J Perinat Neonat Nurs* 2004; 18: 41-58.

80. Keklioglu M. Amino Asit Metabolizması Anormallikleri (Çeviri) Artan S. The Merk Manual of Diagnosis and Therapy, İstanbul 2002; 40: 371-7.
81. Clarke JTR. A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases (2nd Ed). Cambridge University Press, 2002, UK.
82. Özalp İ. Fenilketonuri ve ülkemizde görülme sıklığı. Katkı Pediatri Dergisi 1991; 12: 5-12.
83. Özer I. Fenilketonüri Örneğinde Doğumsal Metabolik Hastalıklarda Genel Tedavi Yaklaşımı. Klinik Pediatri 2005; 3: 26-30.
84. Demir G. Metabolik Hastalıklarda Beslenme. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci 2005; 81-8.
85. Matalon R. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylketonuria. Trends Genet 1999; 15: 267-272.
86. Endres W. Diet in Phenylketonuria: How Long?. Annals of Nutrition and Metabolism 1998; 42, 63-7.
87. Medical Research Council Working Party on FKU. Recommendations on the dietary management of PKU. Arch Dis Child 1993; 68: 426-7.
88. Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P, et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. Eur J Pediatr 1999; 158: 46-54.
89. Griffiths P. Neuropsychological approaches to treatment policy issues in phenylketonuria. Eur J Pediatr 2000; 159: 587-8.
90. Kaufman S, Max EE, Kang ES. Phenylalanine hydroxylase activity in liver biopsies from hyperphenylalaninemia heterozygotes: deviation from proportionality with gene dosage. Pediatr Res 1975; 9: 632-635.
91. Kawashima H, Kawano M, Masaki A, et al. Three cases of untreated classical FKÜ: a report on cataracts and brain calcification. Am J Med Genet 1988; 29: 89-90.
92. Acosta PB, Yannicelli S. The ross metabolic system nutrition support protocols. Ohio, Ross Laboratories Publication 1993; 9: 11-13.
93. Asplin D, Brenton D, Davidson DC, et al. Management of PKU (2nd ed). National Society for Phenylketonuria, Londra 1999; 17: 14-16.

94. Stemerding BA, Kalverboer AF, Meere JJ, et al. Behaviour and school achievement in patients with early and continuously treated phenylketonuria. *J Inher Metab Dis*, 2000, 23: 548-550.
95. Thompson S. Protocol for the use of XP analog in the dietary management of Phenylketonuria, The new Children's Hospital, Sydney, 1996. Tokatlı A. Metabolik hastalıklarda beslenme. *Katkı Pediatri Dergisi* 1996; 2: 356-360.
96. Auerbach VH, DiGeorge AM, Carpenter GG. Phenylalaninemia In: a study of the diversity of disorders which produce elevation of blood concentrations of phenylalanine. *Aminoacid Metabolism and Genetic Variation*. McGraw-Hill, Nyhan WL (ed), New York, 1967, p: 11.
97. Vajro P, Strisciuglio P. Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. (Letter) *N Eng J Med*, 1993; 5: 329-363.
98. Mitchell JJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Funded by the NIH. Developed at the University of Washington, Seattle, 2007; 86: 197-201.
99. Singh RH, Kable JA, Guerrero NV et al. Impact of experience on phenylalanine levels, knowledge, attitudes, and health beliefs relevant to nutrition management of phenylketonuria. *J Am Diet Assoc*, 2000; 100: 797- 800.
100. British Guidelines for PKU Management: Report of Medical Research Council Working Party on PKU and Recommendations of the European Society for PKU on Dietary Management of PKU, National PKU News: www.FKÜnews.org, Ekim 2000.
101. Eisensmith RC, Woo SLC. Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 16-20.
102. van Spronsen FJ, van Rijn M, Bekof J, et al. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine- restricted diets. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 150-153.
103. Phenylketonuria: Screening and Management. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement October 16 - 18, 2000. Statement Online 2000; 17: 1-16.
104. Rezvani I, Rosenblatt DS. Metabolic Diseases. *The Textbook of Pediatrics*. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). 16th ed. WB Saunders, Philadelphia, 2000; 81: 343-344.

105. Phenylketonuria, Report of the Medical Research Council Working Party on PKU, Arch Dis Child 1993; 68: 424- 426.
106. Hanley WB, Lee AW, Hanley AJG, et al. Hypotyrosinemia in phenylketonuria. Mol Genet Metab 2000; 69: 280-286.
107. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 2330- 2339.
108. Kang ES. Clinical and laboratory approach to a neonate suspected of an inborn error of metabolism. Turk J Pediatr 1999; 41: 16-19.
109. Ris MD, Williams SE, Hunt MM, et al. Early-treated phenylketonuria: adult neuropsychologic outcome. J Pediatr 1994; 124: 388-390.
110. Memisoglu A, Pharmacogenomics, GSAS Harvard Biotechnology Club.
111. Langaee T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. Mutation Research 2005; 573: 96-102.
112. Nordfords L, Jansson M, Sandberg G, et al. Large scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by pyrosequencing trade mark and validation against the 5' nuclease (Taqman(R)) assay. Hum Mutat 2002; 19: 395-401.
113. Aquilante CL, Lobmeyer MT, Langaee TY, et al. Comparison of cytochrome P450C9 genotyping methods and implications for the clinical laboratory, Pharmacotherapy 2004; 24: 720-726.
114. Konecki DS, Schlotter M, Trefz FK, et al. The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. Hum Genet 1991; 87: 389-393.
115. Effat L, Kuzmin A, Kasem N, et al. Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with FKÜ. Eur J Hum Genet 1999; 7: 259-62.
116. Yılmaz E ve Türel B. Türk Hiperfenilalaninemi Hastalarında Fenilalanin Hidroksilaz Gen Mutasyonlarının Taranması, Mini Haplotiplerin Oluşturulması Ve Genotip- Fenotip İlişkisinin Kurulması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006: 64.
117. Kozak L, Blazkova M, Kuhrova V, et al. Mutation and haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: identification of four novel mutations. J Med Genet 1997; 34: 893-898.

118. Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. *J Hum Genet* 2004; 49: 617-21.
119. Okano Y, Asada M, Kang Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. *Hum Genet*.1998; 103:613–618.
120. Chien YH, Chiang SC, Huang A, et al. Mutation spectrum in Taiwanese patients with phenylalanine hydroxylase deficiency and a founder effect for the R241C mutation. *Hum Mutat* 2004; 23: 206-210.
121. Okano Y, Hase Y, Lee DH, et al. Frequency and distribution of phenylketonuric mutations in Orientals. *Hum Mutat* 1992; 1: 216–220.
122. Song F, Qu YJ, Yang YL, et al. The mutant spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in Northern Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007; 24: 241-6.
123. Santana LC, Carvalho TS, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol. Genet Metab* 2003; 79: 17-24.
124. Moradi K, Alibakhshi R, Ghadiri K, et al. Molecular analysis of exons 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in Phenylketonuria patients in Western Iran. *Indian J Hum Genet* 2012; 18: 290-3.
125. Dahri S, Desviat LR, Pérez B, et al. Mutation analysis of phenylketonuria patients from Morocco: High prevalence of mutation G352fsdelG and detection of a novel mutation p.K85X. *Clin Biochem*. 2010; 43: 76–81.
126. Zhang M, Hsiao K, Su T, et al. Two novel mutations in phenylalanine hydroxylase gene and in vitro expression analysis of mutation Arg252Glu. *Chin Med Sci J* 1997; 12: 22-25.
127. Zhou YA, Ma YX, Zhang QB, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. *Genet Mol Biol*. 2012; 35: 709-13.
128. Lüleyp HU, Alptekin D, Pazarbas A, ve ark. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenylalanine hydroxylase gene. *Mutat Res* 2006; 601: 39–45.
129. Daniele A, Cardillo G, Pennino C, et al. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet*. 2007; 71: 185-93.

130. Luciana S, Myrian CM, Adriana OR, et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C and IVS 12nt1 in Minas Gerais. *Brazil Genet Mol Res* 2006; 5: 16-23.
131. Leandro P, Rivera I, Ribeiro V, et al. Mutation analysis of phenylketonuria in south and central Portugal: prevalence of V388M mutation. *Hum Mutat* 1995; 6: 192–194.
132. Desviat LR, Pérez B, Gutierrez E, et al. Molecular basis of phenylketonuria in Cuba. *Hum Mutat* 2001; 18: 252-255.
133. Desviat LR, Pérez B, Gámez A, et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain. Molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 386-392.
134. Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular diagnosis of phenylketonuria: From defective protein to disease-causing gene mutation. *JMB* 2009; 28: 262-267.

EKLER

EK 1: Demirbaş Malzemeler

1. Vorteks (MS1 Minishaker IKA)
3. Mikrosantrifüj (Mikro 200)
4. Hassas Terazı (Libror AEG-220)
5. Derin Dondurucu (Arçelik)
6. Buzdolabı (Profilo)
7. Otomatik Pipet (Dragon lab)
8. Saf Su cihazı (Millipore)
9. PCR (Sensoquest)
- 10- Pyrosekans cihazı (Qiagen Pyromark Q 24)

Ek 2:

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı

İmza:

Ek 3:

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırma Yürütücüsü: ŞERİFE ERDEM

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIBBİ GENETİK A.D Tel no:

Araştırmanın Adı: Fenilalanin hidroksilaz geninde görülen yaygın mutasyonların taranması

Araştırmanın Amacı: Kalıtsal metabolik bir hastalık olan fenilketonürinin sebebini ortaya koyacak ileri ve ayırıcı bir genetik tanı yöntemi elde etmek. Araştırmanın süresi 12 ay olarak düşünülmektedir. Araştırma için gönüllü sayısı 40 olarak tasarlanmıştır.

Fenilketonüri kalıtım yolu ile geçen metabolik bir hastalıktır. Diğer bir deyişle doğuştan enzim eksikliğidir. Fenilalanin, diyetle dışarıdan vücudumuza aldığımız bir aminoasittir. Bu aminoasiti parçalayan enzim fenilalanin hidroksilaz enzimidir. Bu enzimi kodlayan gen, hem anneden hem de babadan çocuğa aktarılır. Her iki aktarılan gende de hata varsa, bu genin kodladığı enzim de hatalı olur. Bu hatalı enzim fenilalanini parçalayamaz ve vücutta fenilalanin birikir. Fenilketonuride kan fenilalanin düzeyi 20 mg/dL'nin üzerindedir. Fenilalanin düzeyi sağlıklı bebeklerde 2 mg/dL'nin altındadır. Erkek ve kız çocuklarının fenilketonüri'ye yakalanma olasılığı eşittir. Araştırmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden dört mililitre kan alınacaktır. Kandan DNA elde edilecek ve daha sonra genetik yöntemlerle hastalığınıza neden olan bozukluk ortaya konacaktır. İsimleriniz tamamen gizli tutulacaktır. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Yapmak istediğimiz çalışmanın size bir risk getirmesi beklenmemektedir. Kan aldırmanın genelde hiçbir zararı olmamasına karşın, kolunuzda nadiren çok az kanama veya morarmaya yol açabilir. Araştırmanın sonucunda aranan bilgi elde edildiğinde size sonuçlar verilecektir. Bu formu imzalamadan önce veya imzaladıktan sonra çalışma ile ilginiz varsa lütfen aşağıda adı yazılı kişilere sorularınızı sorunuz:

Prof. Dr. MUNİS DÜNDAR

ERCİYES ÜNİ. Tıbbi Genetik AD 03524374938

Şerife Erdem

Gönüllü olur bölümü:

Bana anlatılanları ve yukarda yazılanları anladım. Bu formun bir kopyasını aldım. Bu araştırma hakkında yeterli bilgiyi aldım, yapılacak işlemleri yan etkilerini göze alarak kabul ediyorum. Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllü ismi ve imzası:

Tanık ismi ve imzası:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Şerife ERDEM

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 26 Mart 1986 KAYSERİ

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 0544 760 66 23

email: altunok@hotmail.com

Yazışma Adresi: Detagen Genetik Tanı Merkezi Melikgazi Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi	2012
Lisans	İşletme Yöneticiliği Çukurova Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	75. Yıl Cumhuriyet Lisesi Kayseri	2005

YABANCI DİL

İngilizce