

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SKOLYOZ, KÖRLÜK VE ARAKNODAKTİLİ GÖSTEREN
GENİŞ BİR TÜRK AİLESİNDE BAĞLANTI ANALİZİ İLE
YENİ GEN ARAŞTIRILMASI**

Proje No:TSA-09-1046

Proje Türü
Bilimsel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Prof.Dr. Munis Dünder
Tıbbi Genetik AD./Dahili Tıp Bilimleri Böl.

Dr. Seda Örenay
Tıbbi Genetik AD./Dahili Tıp Bilimleri Böl.
Yrd.Doç.Dr. Korhan Arslan
Genetik AD./Veterinerlik Fak.

Haziran 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
1. GİRİŞ AMAÇ VE KAPSAM.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 SKOLYOZ, KÖRLÜK VE ARAKNODAKTİLİ SENDROMU.....	3
2.1.1. Sendroma Genel Bakış.....	3
2.1.2. Aile Öyküsü ve Kalıtım Modeli.....	3
2.1.3. Klinik Özellikler.....	4
2.1.3.1.Vaka 1 (Proband).....	4
2.1.3.2.Vaka 2.....	5
2.1.3.3 Vaka 3.....	5
2.1.3.4.Diğer aile bireyleri.....	6
2.2.GENETİK HARİTALAMA.....	6
2.2.1. Model Bağımlı (<i>parametric</i>) Metodlar.....	7
2.2.2.Modelden Bağımsız (<i>non-parametric</i>) Metodlar.....	8
2.2.3.Aday Gen Belirleme Stratejisi.....	13
2.3 GENETİK HARİTALAMADA SNP MİKROARRAYLERİ (AFFYMETRIX ARRAY) İLE GENOTİPLENDİRME	16
2.4.GENETİK HARİTALAMADA DNA DİZİ ANALİZİ.....	18
2.4.1. Sanger Dizi Analiz Yöntemi.....	18
2.4.2.DNA Dizi Analizinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar.....	20
2.4.3.Maxam – Gilbert Kimyasal Degredasyon Yöntemi.....	21
2.4.4.DNA Dizi Analizinde Kullanılan Enzimler.....	21
2.4.5.Non Radyoaktif İşaretleme İle DNA Dizi Analizi.....	22
2.4.6.Elektroforez.....	23
2.4.7 Otomatik DNA Dizi Analizi.....	23
2.5. <i>LTPB2</i> (LATENT TGF-BETA BINDING PROTEIN-2) GENİ.....	24
3. GEREÇ - YÖNTEM.....	26
3.1.GEREÇ.....	26
3.1.1 Çalışmanın Yapıldığı Yer.....	26
3.1.1 Çalışma Grubu.....	26
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Gereçler.....	27
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	28

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların ve Tamponların Hazırlanışı.....	30
3.2 YÖNTEM.....	32
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	32
3.2.1.1.Cihazla Yapılan DNA İzolasyon Yöntemi.....	32
3.2.1.2. Fenol-Kloroform Yöntemi.....	32
3.2.2. 250 K Genotiplendirme Analizi.....	33
3.2.2.1. DNA' nın Nanodrop Spektrofotometre ile Konsantrasyon Ölçümü	33
3.2.2.2.İzole DNA Örneklerinin Agaro Jelde Yürütülmesi.....	34
3.2.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi.....	35
3.2.2.4.250 K Fast Digest <i>NspI</i>	35
3.2.2.5. <i>NspI</i> restriksiyon enzim kesim ürünlerinin görüntülenmesi.....	35
3.2.2.6. Ligasyon.....	36
3.2.2.6.1. Ligasyon Reaksiyonu.....	37
3.2.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	37
3.2.2.7.1. PZR Prosedürü.....	38
3.2.2.8. PZR Ürünlerinin Agaro Jelde Yürütülmesi.....	39
3.2.2.9. Pürifikasyon.....	39
3.2.2.9.1. PZR Pürifikasyonu ve Clean-Up Plate İle Elüsyon.....	39
3.2.2.10.Pürifikasyon Sonrası PZR ürünlerinin Nanodrop Spektrofotometre ile konsantrasyonlarının Ölçümü.....	40
3.2.2.11.Fragmantasyon.....	41
3.2.2.11.1 Fragmentasyon Prosedürü.....	41
3.2.2.12 Fragmentasyon Ürünlerinin Agaro Jelde Yürütülmesi.....	41
3.2.2.13 İşaretleme.....	42
3.2.2.13 Hibridizasyon.....	42
3.2.2.14 Yıkama ve Tarama.....	43
3.2.2.15 Veri Analizi.....	44
3.2.3.Homozigotluk Haritalaması.....	44
3.2.4. LOD Skor Analizi.....	46
3.2.5.Aday Genlerin Belirlenmesi.....	49
3.2.6.Primer Dizaynı.....	49
3.2.7 DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi.....	51
3.2.7.1 Dizi Analizi İçin DNA Örneklerinin PZR İle Çoğaltılması.....	52
3.2.7.2 PZR Sonrası Agaro Jel Elektroforezi.....	52
3.2.7.3 PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	52
3.2.7.4 DNA Dizi Analizi İçin PZR.....	53

3.2.7.5 Etanol Presipitasyonu.....	54
3.2.7.6 Sekansa Yükleme İçin Örnek Hazırlanması.....	54
3.2.7.7.DNA Dizi Sonuçlarının Analiz Edilmesi.....	54
4.BULGULAR.....	55
4.1.Affymetrix Array Sonuçları.....	55
4.2.Homozigotluk Haritalaması Verileri.....	56
4.3 LOD Skor Analiz Sonuçları.....	56
4.4..Aday Genlerin Belirlenmesi.....	57
4.5. DNA Dizi Analizi Verileri.....	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	63
6. KAYNAKLAR.....	71

SKOLYOZ, KÖRLÜK VE ARAKNODAKTİLİ GÖSTEREN GENİŞ BİR TÜRK AİLESİNDE BAĞLANTI ANALİZİ İLE YENİ GEN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Giriş: Skolyoz, körlük ve araknodaktili sendromu (OMIM ID 612445) kan bağı olan bir ailede Dünder ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yirmidokuz yaşındaki erkek proband da skolyoz, iki el ve ayak parmaklarında araknodaktili ve ilerleyici görme kaybı ve şaşılık vardı. Probandın 33 yaşındaki erkek kardeşinde şiddetli kifoskolyoz, ayak ve parmaklarda araknodaktili ve iki taraflı körlük mevcuttu. Otuzdokuz yaşındaki kız kardeş sadece göz bulgularına sahipti. Altmış yaşında ölmüş baba, hafif skolyoz, körlük ve araknodaktiliye sahip idi. İki kız kardeşte hafif skolyoz var iken, anne ve iki erkek kardeş normaldi. Ebeveynler ilk kuzendiler. Biz bu projede, sendromdan sorumlu gen lokusunu tespit etmek için bir strateji sunduk.

Metod: Tüm genom SNP leri 250K Affymetrix Array ile tarandı. Bazı kardeşlerin açık olmayan etkilenmiş durumları yüzünden farklı kombinasyonlu tüm pedigrinde segregasyon ve 2 etkilenmiş erkek kardeşler tarafından paylaşılan homozigotluk görünür olarak değerlendirildi. İki ve çoklu nokta LOD skor analizleri easyLINKAGE plus v5.08. tarafından yapıldı.

Sonuç-Tartışma: İki etkilenmiş kardeş tarafından paylaşılan 2 Mb üzerindeki 5 homozigot bloğun belirgin anne fenotipinde ve 2 etkilenmiş ve 3 etkilenmemiş kardeşlerde fenotiple segrage olduğu bulundu. İlk analizlerde en uzun homozigot blok 14. kromozom üzerinde 67817621bp (rs7148416) ve 82508151bp (rs17117757) arasında bulundu. Analize pozitif göz bulgulu diğer kız kardeş eklendiğinde bu bölge 67817621bp (rs7148416) ve 75657598bp (rs11626830) arasına daraldı ve bu bölge için iki noktalı analiz ile maksimum LOD skor 2.3956 olarak hesaplandı. Bu bölgede 3 aday gen belirlendi. Aday genlerden *LTBP2* (*Latent TGF-Beta Binding Protein-2*) geninin 17 ekzonunun dizi analizi yapıldı ve mutasyon saptanılmadı.

Anahtar Kelimeler: Skolyoz, Körlük, Araknodaktili, Bağlantı analizi

SEARCHING NEW GENE WITH LINKAGE ANALYSIS IN LARGE TURKISH FAMILY INDICATING SCOLIOSIS, BLINDNESS AND ARACHNODACTYLY

ABSTRACT

Introduction: Scoliosis, blindness, and arachnodactyly syndrome (**OMIM ID 612445**) has been described by Dundar *et al* in a family with parental consanguinity. The 29-year-old male proband had scoliosis, arachnodactyly of both fingers and toes, and progressive visual loss and strabismus. His 33-year-old brother had severe kyphoscoliosis, arachnodactyly of fingers and toes, and was bilaterally blind. His 39-year-old sister had only eye findings. Late father, 60-year-old, had mild scoliosis, blindness, and arachnodactyly. Mother and 2 more brothers were normal while 2 sisters had mild scoliosis. Parents were first cousin. In this project we present the strategy employed to determine the gene locus responsible for the syndrome.

Method: Whole genome SNPs were scanned using 250K Affymetrix Arrays. Runs of homozygosity shared by two affected brothers and segregating in the entire pedigree with different combinations due to unclear affected status of some siblings were visually evaluated. Two and multiple-point LOD score analyses were performed by easyLINKAGE plus v5.08.

Result and Discussion: Five homozygous blocks over 2 Mb shared by two affected brothers were found to be segregating with phenotype in 2 affected and 3 unaffected siblings and in mother whose phenotypes were unequivocal. The longest homozygous block in this first analysis was found to be on the 14th chromosome between 67817621bp (rs7148416) and 82508151bp (rs17117757). When another sister with positive eye findings was added to the analysis, this region was narrowed down to between 67817621bp (rs7148416) and 75657598bp (rs11626830) for which a maximum LODscore of 2.3956 was calculated with two-point analysis. Three candidate genes were detected in this region. Seventeen exons of *LTBP2* (*Latent TGF-Beta Binding Protein-2*) gene were sequence analyzed and no mutations were found.

Key words: Scoliosis, Blindness, Arachnodactyly, Linkage analysis

1.GİRİŞ|AMAÇ VE KAPSAM

Hastalıklarda yatkınlık yaratan genler son yıllarda üzerinde çok çalışılan bir konudur. Geniş aile çalışmaları, ikiz ve evlat edinme çalışmalarının yanı sıra, moleküler biyolojik yaklaşımlar hastalık etiyolojisine katkısı olan genetik etkenlerin varlığını desteklemektedir. Buna rağmen, hastalıkların ortaya çıkışından tek bir genin sorumlu olmadığı durumlarda mevcuttur. Bu alandaki çalışmalar kalıtsal geçişin temelinde çok etkenli (multifaktoriyel) ve çok genli (oligojenik-polijenik) mekanizmaların rol aldığını düşündürmektedir. İster tek gen, isterse karmaşık etiyolojili olsun bir hastalıktan sorumlu genin saptanmasına yönelik yaklaşımlardan en yaygın olarak kullanılanları, genetik belirleyicilerin (DNA marker) hastalıkla ilişkisini test eden bağlantı (linkage) ve ilişkilendirme (association) çalışmalarıdır (1,2). Her ikisi de matematiksel kavramlardır, farklı olasılıkları verirler. Bağlantı analizi ile aynı kromozom üzerinde birbirine yakın iki yerleşimin ana-babadan çocuğa aktarılırken bir arada geçiş olasılığı hesaplanmaktadır. Bu iki yerleşim birbirlerine ne kadar yakın ise, bir arada kalıtılmaları olasılığı o kadar yüksektir. Bu tip çalışmalar esas olarak geçiş şekli, gen frekansı ve penetransı bilinen basit Mendelyan geçiş gösteren hastalıkların genetiğini anlamada başarılı olmaktadır. İlişkilendirme ise kalıtım kalıbı tam olarak belirlenemeyen hastalıklarda tercih edilen yöntemdir. Bu yöntemle hasta ve kontrol gruplarında belirli bir genetik belirleyiciye ilişkin alellerin frekansları karşılaştırılır. Hasta ve kontrol grupları arasında alel dağılımında istatistiksel bir fark varsa; başka bir deyişle hastalar

hep aynı aleli alırken sağlamlar başka bir aleli alıyorsa hastalık ile aleller arasında bir ilişki (asosiyasyon) olduğu söylenebilir.

Özetlenecek olursa, bağlantı analizinde hastalığın bir kromozom bölgesine bağlı olup olmadığı sınırlanırken, ilişkilendirme analizinde tiplendirilen genetik belirleyicinin bir tek alel ile sıkı bir ilişki içinde olup olmadığı araştırılır. Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları göz önüne alınarak son yıllarda bu yöntemlerin iç içe kullanıldığı iki aşamalı gen haritalama stratejileri önerilmektedir (3). Bu tip yaklaşımda genom geniş bir ya da birkaç aile üzerinden taranır ve bağlantı analizi ile aday bölgeler belirlenir. Daha sonra sadece ilgili kromozom bölgelerine yönelik olarak ilişkilendirme ve/veya bağlantı çalışmaları düzenlenir. Bağlantı analizlerinin başarısı istatistik analizlere yetecek genişlikte ailelerin saptanabilmesine bağlıdır ve gen haritalama alanında çalışanların hiçbir zaman vazgeçemediği en klasik yöntemdir. Uygun aile bulunabildiği zaman, ilişkilendirme çalışmalarına göre daha önemli bulgular saptanabilir (4).

Geniş aile çalışmalarındaki varsayım, ailede hastalıktan sorumlu en azından bir adet major gen olduğudur. Ancak yeteri kadar büyük aile saptanmış olsa bile, karmaşık etiyolojili hastalıklarda bu varsayımı sınarken göz önüne alınması gereken sorunlar vardır. Bu sorunlardan biri ailelerde birden fazla hastalık için yüklülük görülebilmesidir (5,6). "Aynı ailede birden fazla hastalık olduğunda bu hastalıklara yatkınlık yaratan ortak bir genin mi, yoksa, her hastalıktan sorumlu farklı genlerin mi söz konusu olduğu" sorusuna yanıt bulunmaksızın gen araştırmaları için uygun bir varsayım oluşturmak olası değildir.

Projemizde çalışılacak skolyoz, körlük, araknodaktili sendromu; Dünder ve arkadaşları tarafından ilk defa tanımlanmış ve Fibrillin1 (FBN1), Transforme growth factor beta receptor 1 (TGFB1) ve Transforme growth factor beta receptor 2 (TGFB2) gen mutasyon taraması ile Marfan sendromundan ayrımlanmış yeni bir sendromdur (7). Bu anlamda çalışmamızda bağlantı analizi ile sendromdan sorumlu olabilecek aday genlerin tespiti ve sorumlu genin bulunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Skolyoz, Körlük ve Araknodaktili Sendromu

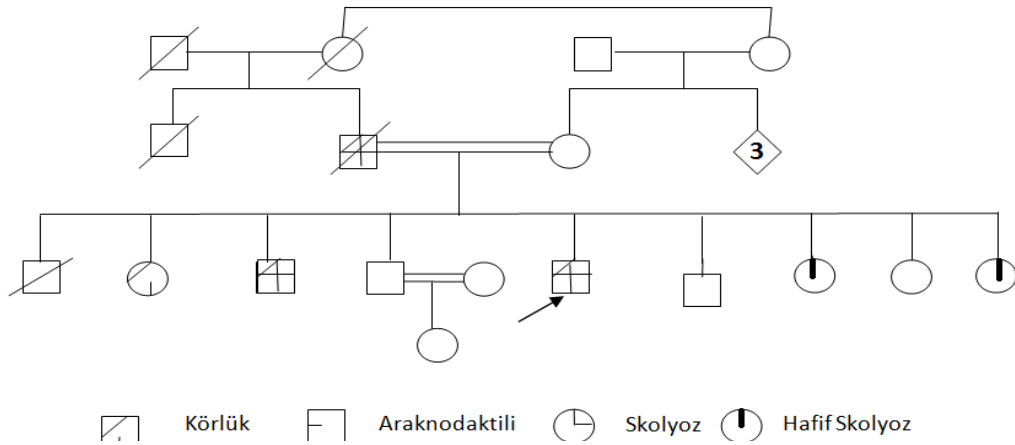
2.1.1. Sendroma Genel Bakış

Skolyoz, körlük ve araknodaktili sendromu; 2008 yılında Dünder ve arkadaşları tarafından geniş bir Türk ailesinde tanımlanmış (**OMIM ID 612445**); körlük, araknodaktili ve progressif skolyoz bulgularının eşlik ettiği parental geçişli bir sendromdur. Dünder ve arkadaşları tarafından 1996’ dan beri takip edilen sendrom olgularının sitogenetik,biyokimyasal ve aminoasidüri idrar analizleri ekokardiyografileri normaldir. Zeka seviyeleri ve psikomotor gelişimleri normal düzeydedir. Bütün etkilenen bireylerde körlük, araknodaktili ve değişik seviyelerde skolyoz mevcuttur. Vakaların çocuklukta ki görüş seviyeleri yeterli iken, 8-12 yaşlarında bilinmeyen sebepten ötürü lens luksasyonunu takiben görüşleri kaybolmaya başlamıştır. Olguların oküler gelişimi; total retinal ayrılma, opak küçük kornea ve en sonunda retinal ayrılma nedeniyle körlüğü içermektedir.Sendrom bulguları Marfan ve marfanoid özellikteki sendromları kapsadığından olgular Marfan veya marfanoid sendromlarından FBN1, TGFB1 ve TGFB2 genlerinde mutasyon saptanmaması ile ayırt edilmiştir (7).

2.1.2.Aile Öyküsü ve Kalıtım Modeli

Proband ilk Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine geldiğinde annesi ve babası 55 ve 60 yaşlarındaydı. Ebeveynler ilk kuzendiler. Aile hikayesi normaldir. Proband benzer klinik özellikler gösteren 2 kardeşe ve 5 tane de normal kardeşe sahiptir. Ölmüş baba da aynı klinik özellikleri taşımaktaydı. Bu açıdan Dünder

ve arkadaşları tanımladıkları bu sendromun çok yüksek olasılıkla değişken ekspresyonlu bir otozomal gen hatası ile meydana gelen ve şimdiye kadar bildirilmemiş bir durum tarafından etkilenmekte olduğunu belirtmişler; ancak multigenik eklentileri ayırt edememişlerdir. Hastanın kızkardeşinin erkek kardeşi ve babasından daha az etkilenmesi nedeniyle cinsiyet etkisinin de muhtemelen bu hastalığın kalıtımına katkıda bulunmakta olacağını ileri sürerek sendromun tahmini kalıtım kalıplarını sunmuşlardır (7). Çalışmamızda anne ve baba arasında kan bağı olması açısından sendrom otozomal resesif geçişli olarak düşünülmüştür (Şekil 2. 1).



Şekil 2.1. Ailenin pedigrisive pedigri sembolleri

2.1.3.Klinik Özellikler

2.1.3.1.Vaka 1 (Proband)

Proband (I.B.), şiddetli skolyoz tanısıyla Tıbbi Genetik polikliniğine yönlenderilen ve bu durumdan dolayı ameliyat edilen 16 yaşında (şuan 29 yaşında) bir erkekti . Vakanın bir kaç yıl sonraki 2. randevusu sırasında önceki operasyona nazaran daha belirgin skolyozu mevcuttur. Proband ilk başvurusunda 153 cm boyunda (<P25) üst bölge 76 cm, üst: alt segment oranı 0.987(+1SD) ve kol açıklığı 156 cm dir. Her iki el ve ayak parmaklarında araknodaktili vardır (>P 95) ve 5. ayak parmaklar bilateral olarak arka pozisyonda yerleşmiştir. Fakat, ne eklem laksisitesi ne de bilek ve baş parmağı işaretleri vardır. Herhangibir deri, yüz, diş, damak malformasyonu yoktur. Tüm vücut radyografisinde Marfan sendromu ile alakalı iskeletsel bulgu elde edilememiştir. Sekiz

yaşından beri hasta, ilerleyen görüş kaybı ve şaşılıktan muzdariptir. Oftalmik muayenede; sağ gözde ezotropi, retinal elementlerin vitröz ve atrofisi yoluyla bilateral lens luksasyonu ve retinal pigment epitelyumunda hipertrofi mevcudluğu ortaya çıkmıştır. Görüş netliği her iki gözde +6 camlarla 0,2 idi. Bu bulgular çocuklukta şiddetli miyop ile uyumludur ve lens luksasyonu olduktan sonra proband hipermetropik olmuştur. Korneal çaplar yatay 10 mm dir. Bu da mikrokorneanın sınırındadır. 2 yıl sonra sağ gözde total retinal ayrılma gözlenmiştir (7).

2.1.3.2.Vaka 2

Probandın 20 yaşındaki (şuan 33 yaşında) erkek kardeşinin fiziksel muayenesinde (S.B.) şiddetli kifoskolyoz ve her iki ayak ve el parmaklarında bilateral olarak araknodaktili ortaya çıkmıştır. Vaka 130 cm boyundadır. Oftalmik muayenesinde bilateral küçük ve opak lensler mevcuttur. Tam körlük görülmüştür. Deri ve yüz bozukluğu veya eklem laksitesisi yoktur (7).

2.1.3.3.Vaka 3

Probandın 23 yaşındaki (şuan 39 yaşında) kız kardeşinde de (U.B.) sadece göz bulguları vardır. Araknodaktili ve skolyoz yoktur . Vaka 150 cm boyundadır. Oftalmik muayenesi bilateral fitisis tamamen opak ve küçük lensler ve tam körlük görülmüştür. Deri ve yüz bozukluğu veya eklem laksitesisi yoktur (7).

Tablo 2.1. Vakaların klinik bulguları (7)

<i>Aile numarası</i>	<i>Proband IB</i>	<i>Vaka UB</i>	<i>Vaka SB</i>
<i>Yaş</i>	16	25	20
<i>Boy uzunluğu</i>	153 cm	150 cm	130 cm
<i>Araknodaktili</i>	+	-	+
<i>Gözlerin klinik muayenesi</i>	8 yaşından beri ilerleyen görüş kaybı, mikrokornea, 10 yaşında lens luksasyonu ve ilerleyen körlük	Bilateral pititis, opak,küçük lens ve total körlük	Bilateral pititis, opak,küçük lens ve total körlük
<i>Radyografik iskelet bulguları</i>	Toraksik skolyozis	-	Kifoskolyozis
<i>Ekokardiyografi</i>	Normal	Normal	Normal

2.1.3.4.Diğer aile bireyleri

Probandın anne ve babası ilk başvuruda 55 ve 60 yaşlarında, ilk kuzenlerdir. Probandla

aynı bulguları taşıyan baba ex olmuştur. Proband benzer klinik özellikler gösteren 2 kardeşten başka 5 normal kardeşe sahiptir (7).

2.2.GENETİK HARİTALAMA

Genetik haritalama, genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimlerinin gösterilmesine yönelik bir yöntemdir. Genetik haritalama, insan genetik hastalıklarının nesiller boyu kalıtımında etkin olan genlerin tespit edilmesi, işlevlerinin ortaya konulması ve ileri süreçte bu hastalıklara yönelik gen tedavisinin gerçekleştirilebilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Genetik haritalamada genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimleri bulunurken çeşitli moleküler genetik teknikler ve istatistiksel analizlerden yararlanılmaktadır. Bilindiği üzere kardeş kromozomlar mayozun I. Profaz aşamasında karşı karşıya gelerek parça değişimine (*crossing-over*) uğrarlar. Parça değişimleri sırasında birbirlerine çok yakın yerleşimli genler yavru kuşağa sıklıkla birlikte aktarılırlar. Birbirine uzak yerleşimli genler ise Mendel'in "Bağımsız Ayrılma Kuralı" na göre rastgele olarak bir arada olabilir ya da ayrılırlar. Böylece yavru kuşaklarda ebeveynlerinde olmayan yeni yapılanmalar ortaya çıkar. Bu olaya rekombinasyon denir (8,9).

Rekombinasyon, genetik haritalamanın temelini oluşturur. Buna göre, kromozom yerleşimi kesin olarak bilinen bir genetik belirleyici ile hastalık aleli birbirine uzak yerleşimli ise %50 rekombinasyon riski ile birlikte kalıtılmayacaklardır. Buna göre genetik haritalamada çok sayıda rekombinant bireye rastlanması aradığımız genden uzaklaştığımız anlamına gelecektir. Bunun yanı sıra hastalık aleli ile kromozom üzerindeki yerleşimi bilinen genetik belirleyici birbirine yakın yerleşimli ise hastalık aleli ve genetik belirleyici kuşaklar arasında daima birlikte kalıtılacaktır.

Rekombinasyon meydana gelme sıklığı yani rekombinasyon oranı (θ) genetik haritalamada önemli bir faktördür. Rekombinasyon oranları $\theta = 0$ (sıkı bir bağlantı olduğunu gösterir) ve $\theta = 0.5$ (genetik bağlantı olmadığını gösterir) arasında değişir. Eğer rekombinasyon oranı $\theta = 0$ ise çalışmada kullanılan genetik belirleyici ve hastalık arasında sıkı bir bağlantı vardır, nesiller boyu birlikte kalıtılırlardır.

Rekombinasyon birimi santimorgan (cM) ile ifade edilir. 1 cM ya da 1 harita ünitesi %1 rekombinasyon sıklığını belirten yani, 100 kişide 1 rekombinant birey olduğunu gösteren genetik harita birimidir. Bu birim sadece genetik belirleyici ile hastalık aleli

arasında gözlenen rekombinasyon olasılığını ifade eder. DNA'da 0.7-1 Mb'lık uzunluğa karşılık gelir (9).

Belirli sayıda gerçekleşen mayozda rekombinasyonların tespit edilmesiyle kromozom yerleşimi bilinen bir genetik belirleyici ile aradığımız genin genetik olarak bağlı olup olmadığı belirlenebilir.

Temel olarak istatistiksel analizlere ve moleküler genetik tekniklere dayalı olan genetik haritalamada verilerin son derece belirgin olması gerekir. Buna göre, genetik etkenlere bağlı olduğu düşünülen bir hastalığa ait genin yerleşimini bulabilmek yani geni haritalamak için izlenecek aşamalar vardır. Bunlar;

1. Klinik olarak hastaların aile hikayelerinin alınması ve hastalık fenotipinin en doğru şekilde tanımlanabilmesi,
2. Üzerinde çalışılan hastalığa ait ailedeki kalıtım modelinin mümkün olduğunca kesin olarak belirlenmesidir (8,9).

Kalıtım modeli bilgisine bağlı olarak gen haritalama işlevi için hangi metodla çalışılacağı da belirlenmelidir. Bu amaçla yararlanılabilecek 2 ayrı gen haritalama metodu vardır (10-12);

2.2.1. Model Bağımlı (*parametric*) Metodlar:

Bağlantı (*linkage*) analizi olarak bilinmektedir. Bu tip bir analizin yapılabilmesi için değişmez parametrelere ihtiyaç vardır (8-12).

I. Analizin yapılabilmesi için kalıtım modeli kesin olarak bilinmelidir. Kalıtım modelinin belirlenmesinde, gen haritalama çalışmalarında istatistiksel verilerin elde edilmesi amacıyla kullanılan programlardan yararlanılabilir. İki ve üç-noktalı LOD skor analizlerinin yapılabildiği *Superlink Pedtool version 0.9 (Bayesian Network)* bu amaçla kullanılabilen bir programdır. Kalıtım modelinin belirlenmesinde *Superlink Pedtool version 0.9*'un "*Segregation Analysis*" programından yararlanılır. Burada aileye ait bireyleri, anne-babalarını, bireylerin eşey durumlarını ve hastalıktan etkilenip etkilenmediklerini belirten rakamlar kullanılarak bir aile dosyası oluşturulur ve programa tanıtılır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sıfıra en yakın çıkan değer anlamlı kabul edilir ve bu değere karşılık gelen aileye ait kalıtım modeli 0.99 olasılıkla belirlenir.

II. Çalışmada bir kaç kuşaklı geniş aileler tercih edilmelidir.

III. Yeterli sayıda örnek toplanmasına dikkat edilmelidir. Örneğin; otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa, taşıyıcı olan anne-baba ve tüm çocuklar çalışmaya dahil edilmelidir. Eğer otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa hasta bireyler, varsa eşleri, tüm çocukları ve normal bireylerin sadece kendisi ile çalışılması yeterlidir. Ailedeki bireylerin ölmüş olması, bazı bireylerden örnek toplanamaması ve ailedeki birey sayısının yeterli olmaması istatistik analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu amaçla ailedeki mayoz sayısının genetik haritalama için yeterli olup olmadığını belirleyebilmede çalışmaya başlamadan önce genetik belirleyici bilgileri için simulasyon yapılarak azami LOD skor değeri tahmin edilir. Otozomal resesif kalıtılan durumlarda hastalar için 1 1, sağlıklılar için 1 2 tanımlaması yapılır (1, hastalıkla ilişkili alel) ve LOD skor hesaplanır. Elde edilen LOD skor değerinin 3 ve 3'ün üstünde olması ailenin genetik haritalama için uygun sayıda mayoz içerdiğini göstermektedir.

IV. Penetrans; hastalığın bireyde görülme oranı belirlenmelidir.

V. Fenokopi; mutasyon görülmemesine rağmen çevresel etmenler sonucunda benzer fenotipin bireylerde görülme sıklığı belirlenmelidir.

VI. Mutasyonun popülasyonda görülme sıklığı belirlenmelidir (10-13).

2.2.2. Modelden Bağımsız (*non-parametric*) Metodlar: Özellikle belirgin bir kalıtım modeline sahip olmayan kompleks hastalıklar için kullanılan metodlardır. Bu metod daha önce belirtilen parametrelerden bağımsızdır ve çoğunlukla ilişkilendirme (*association*) çalışmalarında etkindir. İlişkilendirme çalışmalarında hastalık ve genetik belirleyici alelleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmaya çalışılır.

I-Bu metodla yapılan çalışmalarda hastalık aleli ve genetik belirleyicinin kuşaklar arası kalıtımını incelemek yerine hastalığın ortaya çıkmasında etkin olabilecek aday genler belirlenir.

II- Genetik haritalamada kullanılacak genetik belirleyiciler doğru bir şekilde seçilmeli ve mevcut olan genetik belirleyici haritaları etkin olarak kullanılmalıdır (8-13).

Genetik haritalamada çeşitli polimorfik genetik belirleyiciler kullanılmaktadır.

Bunlar;

- **RFLP- “Restriction Fragment Length Polymorphism”:** Restriksiyon enzimi tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan tek baz çifti değişimleridir. Bu polimorfizmleri belirleyebilmek için bakterilerden elde edilen, DNA’da yer alan 4-6 nükleotidlik özgül dizileri tanıyarak bağlanan ve DNA’yı bu özgül dizilerden kesen enzimlerden yararlanılmaktadır. DNA’da meydana gelen mutasyon bir restriksiyon enzimi kesim bölgesini ortadan kaldırıyor veya yeni bir kesim bölgesi oluşturuyorsa DNA’nın bu enzim ile kesilmesi sonucunda ortaya farklı uzunluklarda DNA fragmentleri çıkar. Böylece mutasyonun varlığı ya da yokluğu test edilebilir (8).
- **VNTR- “Variable Number Tandem Repeat”:** Minisatellit tekrarlardır, uzunlukları 9-70 bp arasında değişmektedir. Kodlanmayan bölgelerde bulunurlar (8).
- **SNP- “Single Nucleotide Polymorphism”:** Tek bir nükleotitte meydana gelen baz değişiklikleridir. SNP’ler insan genomunda yaklaşık her 1000 baz çiftinde bir bulunurlar. STR’lere (*Short Tandem Repeat*) oranla heterozigotluk dereceleri düşüktür ve bu nedenle SNP haritalarında genetik belirleyici yoğunluğu çok daha fazladır (8,14). Her ne kadar günümüzde array sistemlerinin geliştirilmesiyle SNP kullanımı artsa da, böyle bir çalışmada deney sisteminin uygulanmasındaki zorluklar ve maliyetinin oldukça yüksek olması, SNP’ler yerine, STR’lerin haritalama çalışmalarında tercih edilmesine neden olmaktadır.
- **STR/STRP/SSLP- “Short Tandem Repeats”** Mikrosatellit tekrarlardır, uzunlukları 2-5 nükleotid arasında değişmektedir (8,14). Gen üzerinde rastgele dağılım gösteren ve art arda tekrarlanan dizilerdir. STR’ler genomda ikili, üçlü, dördü, beşli tekrarlar halinde bulunabilirler. Bunlar içinde en sık görülenleri (CA)_n dinükleotid tekrarlarıdır ve insan genomunda ortalama her 3000 bazda bir bulunurlar. Genomda sık bulunmaları ve diğer genetik belirleyicilere oranla heterozigotluk derecelerinin oldukça yüksek olması mikrosatellitleri genetik bağlantı analizleri için çok uygun genetik belirleyiciler haline getirmiştir.

Bir kromozom bölgesinde farklı sayılarda STR tekrarları bulunabilir ve bu tekrar sayılarına bağlı olarak da genetik belirleyicilerin heterozigotluk derecesi değişir. Bir genetik belirleyicinin heterozigotluk yüzdesi (bireylerin heterozigot bulunması yüzdesi) ne kadar yüksekse kullanılan genetik belirleyici o derece bilgi vericidir. Böyle bir

durumda iki kromozomu birbirinden ayırt etmek mümkündür ve alel geçişi aile ağacında kolaylıkla izlenebilir. Bu nedenlerle genetik bağlantı analizi çalışmalarının başarılı olabilmesi için alel sayısı 5'ten fazla olan genetik belirleyicilerin kullanılması oldukça önemlidir (14).

İnsan genom projesi kapsamında özellikle 3 kuşaklı ailelerin kullanılmasıyla (*CEPH* aileleri (*Centre d'Etudes du Polymorphisme Humaine*) (15); genomda polimorfik genetik belirleyicilerin tespit edilmesi ve birbirlerine göre kromozomdaki yerleşimlerinin saptanması hedeflenmiştir. Böylece tüm genomu 1-2 cM aralıklarla tarayabilecek haritalar oluşturulmuştur. Birinci kuşak genetik haritalar, 21 CEPH ailesinin ve çoğunluğu RFLP genetik belirleyicilerinden oluşan 403 adet genetik belirleyicinin kullanılmasıyla oluşturulmuş, tüm insan kromozomlarını içeren ilk genetik haritalardır (16). İkinci kuşak genetik haritalardaki genetik belirleyicilerin büyük çoğunluğu STR'lerden olmuştur. Genetik belirleyicilerin büyük çoğunluğu sekiz adet büyük CEPH ailesi için genotiplendirilmiştir. Bu aileler 184-188 mayoz içermektedir (14). Bugün yaygın olarak kullanılan ikinci kuşak genetik haritalar;

- *Marsfield* (17)
- *CHLC-Cooperative Human Linkage Center* (18-23)
- *deCODE* (20,24)
- *Genethon Map* (23,25)
- *Rutgers Combined Linkage- Physical Map* (21,26)

Genetik haritalar kullanılırken dikkat edilecek bazı hususlar vardır.

I- Haritalar genetik belirleyicilerin kromozomlar üzerindeki sırasını ve birbirlerine göre genetik uzaklıklarını vermelidir. Genotipleme yapılırken kullanılan genetik belirleyicilerin sıralanmasında ve fiziksel harita uzaklıklarının tespitinde yapılabilecek hatalar, gen haritalama çalışmalarını başarısız kılmaktadır. İnsan Genom Projesinden elde edilen veriler doğrultusunda, genetik belirleyiciler arasında hatalı yerleşimlerin yapılmaması amacı ile genetik belirleyicilere ait genetik harita uzaklıkları (cM) yerine, DNA'yı oluşturan bazların sırasını belirten fiziksel harita uzaklıkları (bç=baz çifti) etkin olarak kullanılmaktadır.

II- Farklı merkezler tarafından oluşturulan genetik haritalar (*Marsfield, Genethon, deCODE*) farklı sayıda *CEPH* ailesinin kullanılması, çalışma sırasında genotipleme hatalarının yapılabilmesi ve bilgi verici mayoz sayısındaki yetersizlikler nedeniyle birbirleriyle uygunluk göstermeyebilir ve hatalı genetik harita uzaklıkları hesaplanabilir. Bu amaçla oldukça geniş polimorfik genetik belirleyici ($N \approx 16.000$) setine sahip ve yüksek çözünürlüklü bir harita oluşturulmuştur. Birçok genetik belirleyicinin bu haritada belirtilen kromozom yerleşimleri, hem fiziksel harita uzaklıkları hem de rekombinasyona dayalı bilgilerle desteklenmiştir. Farklı genotip bilgilerinin ve diğer genetik haritaların birleştirilmesiyle oluşan *Rutgers* fiziksel haritası bilgisayar ortamında oluşturulmuş bir harita olan *MAP-O-MAT* sistemi içine dahil edilmiştir. *MAP-O-MAT*, *CRI-MAP* programının kullanılmasıyla genetik belirleyicilerin hesaplanan harita uzaklıklarının ve kromozom üzerindeki yerleşim sıralarının doğruluğunun kontrolünü kolaylaştırmaktadır (20-26).

Genetik haritalama çalışmasının kullanım alanları:

Bilinen Kromozom Lokuslarına Bağlantının Taranması: Bu yaklaşımda hastalık fenotipinin ortaya çıkmasından sorumlu geni saptamak için öncelikle daha önceden benzer klinik tabloyu gösteren ailelerde, belirlenmiş olan kromozom lokuslarına genetik bağlantının olup olmadığına bakılır. Kromozom lokusu çevresinde veya içinde yerleşmiş polimorfik genetik belirleyiciler kullanılarak aranılan özelliğin bu kromozom lokuslarıyla ilişkili olup olmadığı ortaya konur.

Yapılan istatistiksel analizler ile aranılan özellik ve gen arasındaki bağlantının ne derece güçlü olduğu araştırılır. Genetik haritalama sürecinde rekombinant bireylerin varlığı ile kromozom aralığının daraltılması genin tanımlanmasını sağlayabilecektir (19).

Genom Taraması (*Random Genome-Wide Search*): Hastalığın hangi kromozomda ya da hangi aday gen ile ilişkili olacağına dair bir bilgi yoktur. Bu bilgilere erişebilmek için genomu 10-20 cM aralıklarla tarayan, kromozom üzerinde yerleri belirli genetik belirleyici panelleri kullanılarak tüm genom rastgele taranır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç veren kromozom parçası bulunmaya çalışılır. Eğer tüm genom tarandıktan sonra hastalıkla bağlantılı olabilecek kromozom lokusu/lokusları saptanamamış ise, genomu daha sık aralıklarla tarayan genetik belirleyici panelleri ile çalışılır. Genomu 20 cM aralıkla taramak için yaklaşık 200, 8-10 cM aralıkla taramak için yaklaşık 400 ve 5 cM aralıkla taramak için yaklaşık 750 genetik belirleyici gereklidir (2).

İstatistiksel Değerlendirme (LOD skor Analizi): Genetik bağlantının değerlendirilmesinde LOD skor (*Logarithm of Odds Ratio*) analizi uygulanır. LOD skor, ilgilenilen hastalık geni ile kromozom yerleşimi bilinen genetik belirleyici arasındaki genetik bağlantının derecesini ifade eder (9,13,19).

Buna göre;

LOD skor = $10 \log = \frac{\text{Bağlantı Gözlenmesi Olasılığı}}{\text{Bağlantı Gözlenmemesi Olasılığı}}$

Bağlantı Gözlenmemesi Olasılığı

Bir diğer deyişle, LOD skor; aranılan genin, test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının olmama olasılığına oranıdır. Hastalığın genetik belirleyiciye karşı analizinde iki-noktalı (*two-point analysis*) LOD skor analizinden yararlanılır. Elde edilen LOD skor değerlerine göre genetik belirleyiciler ve aranılan gen arasında bağlantı olup olmadığı değerlendirilir.

Analiz sonucunda çıkan değer pozitif ve doğru arttıkça kromozom yerleşiminin saptanması olasılığı da artar. Eğer bu değer 5 gibi bir sayı ise, aranılan genin test edilen kromozom lokusunda seçilen genetik belirleyiciye bağlantı göstermesi olasılığı, bağlantı olmaması olasılığından 105 kez (100.000 kez) daha fazla olacaktır.

Sonucun negatif bir değer çıkması, aranılan kromozom lokusundan uzaklaşıldığını gösterirken, 3 ve 3' ün üstünde çıkan değerler anlamlıdır ve genetik bağlantıyı destekler.

Bağlantı Analizleri ve LOD skor değerlerinin hesaplanabilmesi için kullanılan birtakım programlar vardır (14,19,27). Bunlar;

- Elston Stewart Algoritması (büyük aile ağaçları ve az sayıda genetik belirleyici kullanıldığında),

I. LINKAGE

II. FASTLINK

- Lander-Green Algoritması (küçük aile ağaçları ve çok sayıda genetik belirleyici kullanıldığında),

I. MAPMAKER

II. GENEHUNTER

III. ALLEGRO

IV. MERLIN

• Diğer Analiz Programları

I. SUPERLINK (Bayesian network)

II. SIMWALK 2

III. LOKI (19)

2.2.3. Aday Gen Belirleme Stratejisi

Genetik bağlantı analizi sonucunda LOD skor değerleri pozitif ve özellikle 3 ve 3'ün üstünde olan genetik belirleyicilerin bulunduğu kromozom aralığında yerleşmiş olan tüm genler veri bankaları *NCBI-Map Viewer (The National Center for Biotechnology Information Map Viewer)* ve *Ensembl (EMBL-EBI and Sanger Institute)* aracılığı ile belirlenmektedir. Tespit edilen kromozom aralığında bulunan genlerin aranan fenotipten sorumlu olma ihtimalleri araştırılır ve aday gen/genler belirlenir. Aday genleri belirlemede çeşitli yaklaşımlardan yararlanılabilir. Ancak genel olarak, bir hastalıktan sorumlu olabilecek aday genleri tespit etmede izlenecek strateji sırasıyla aşağıda belirtildiği gibidir (19):

I. Dokuya özel cDNA kütüphanelerinin araştırılması

Dokuya özel cDNA kütüphaneleri, ifade edilen nükleotid dizilerini (EST:*Expressed sequence tags*) veya cDNA'nın tamamını içermekte olup belirli bir kromozom aralığında bulunan hastalıktan sorumlu aday genlerin tespit edilmesinde çok önemli kaynaklardır.

Dokuya özgül cDNA kütüphanelerinden elde edilecek dizi bilgisinin genom içerisinde benzerlik gösterdiği bölgeler *NCBI-BLAST (The National Center for Biotechnology Information The Basic Local Alignment Search Tool)* programı ile belirlenir. cDNA kütüphanesinden elde ettiğimiz dizi/dizilerin bir gen dizisinin belirli bir kısmı veya tamamı ile %100'lere varan nükleik asit dizisi benzerliği göstermesi bu genin hastalıktan sorumlu aday gen olması olasılığını arttırmaktadır. Hastalarda bu gen dizi analizine alındığında ve mutasyonun saptanması durumunda hastalıktan sorumlu gen

saptanmış olacaktır. Mutasyonun bulunmaması aday genlerin saptanması için elektronik veri bankalarının kullanımını gerektirir (19).

II. Elektronik veri bankalarının kullanımı

Elektronik veri bankaları özellikle insan genom projesinin tamamlanmasından sonra aday genlerin saptanmasında çok sık başvurulmuş kaynaklar olmuştur. Genom taraması sonucunda tespit edilen kromozom aralığında bulunan genler, ifade edildikleri dokuları ve gen ürünlerinin işlevlerini belirlemek amacıyla elektronik veri bankalarında incelenir ve aday gen olabilme nitelikleri ortaya konur. Bu aşamada taradığımız kromozom aralığındaki genlerin herhangi bir hastalıkla ilişkisi için *NCBI-OMIM (The National Center for Biotechnology Information -Online mendelian inheritance in man)*, genin kromozomdaki yerleşimi için *NCBI-BLAST*, *NCBIMap Viewer*, *Ensembl*, *Human Genome Browser* ve *NCBI-Gene*, ifade edildikleri dokular ve ifade edilme düzeyleri için *NCBI-Gene*, *Ensembl*, *Bioinformatic Harvester*, gen ürününün yapı ve işlev bilgisi için, *NCBIProtein*, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *NCBI-Conserved Domain*, *Pfam*, *ProDomain* sıklıkla kullanılan veri bankalarıdır. Ayrıca aday gen taraması yapmak üzere daraltılan kromozom aralığında, ilgilendiğimiz dokuda ifade edilip edilmediğini belirleyemediğimiz bir gen var ise bu gene ait EST'lerin tespit edildiği doku bilgisine bakılır. Eğer sorumlu dokuda gene ait bir veya birden fazla sayıda EST tespit edilirse, o genin hastalıkla ilgili dokuda ifade edildiği belirlenmiş olur. Bu amaçla *NCBI-UniGene* veri bankasından yararlanılır. Böylece genler içerisinde ilgili hastalıktan sorumlu olma ihtimali yüksek olan aday gen/genler, ifade edildiği dokular ve protein ürünlerinin işlevi açısından araştırıldıktan sonra elde edilen bilgiler doğrultusunda seçilir ve bu genler için DNA dizi analizi yapılarak kontrol ve hasta bireyler arasında herhangi bir baz değişikliği olup olmadığına bakılır. KIAA, FLJ ve LOC kodlu genler henüz gen ürünleri karakterize edilememiş genlerdir. Bu genlerin de elektronik veri bankalarından yararlanılarak aday olabilme niteliklerinin araştırılması gerekmektedir. KIAA'lar, 4 kb'dan büyük cDNA'lardır, 0-9 arası verilen dört numara ile adlandırılır (KIAA0400 gibi) ve Kazusa cDNA dizi analizi projesinde tanımlanmışlardır. Bu proje ile önceden tanımlanamamış insan gen ifadelerinin tanımlanması ve tanımlanamamış insan gen ifadeleri tarafından kodlanan gen ürünlerinin primer yapılarının tahmini hedeflenmiştir. KIAA'lar proteine kodlanan genlerdir; ancak protein ürünleri bilinmemektedir. Bir başka deyişle, gen ifadesi bilgisi

ve protein bilgisi arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Gene ait ifade bilgisinin protein bilgisi ile ilişkilendirilebilmesi için cDNA'lara ait gen ürünleri işlevleri açısından aminoasit dizileri düzeyinde bilgisayar analiz programlarına alınırlar. Böylece, aminoasit dizileri benzerliğinden yararlanılarak kodlanan diziye ait protein ürünü belirlenmeye çalışılır. Yaklaşık 10 yıldır süren Kazusa Dizi Analizi Projesi kapsamında birçok gen ifadesi bilgisi tespit edilebilmiştir. Bu şekilde ikinci isimlendirmeleri KIAA kodlu olan birçok gen veri bankalarına girmiştir. Ör: *KIAA0161-RNF144* (28). FLJ kodlu genler de tıpkı KIAA'lar gibi büyük cDNA dizileridir (29). KIAA'larda olduğu gibi bu diziler için de nükleotid ve aminoasit dizilerinin genomdaki diğer dizilerle olan benzerliğine bakılarak, henüz tanımlanamamış gen ürününün işlevleri ortaya çıkarılmaya çalışılır. Bu nedenle KIAA ve FLJ kodlu genler her ne kadar ürünleri bilinmiyor olsa da proteine kodlanıyor olmaları nedeniyle gen sınıfına alınması gereken nükleotid dizileridir.

Aday gen belirlenmesinde en son aşamada araştırılacak genler LOC kodlu genlerdir (*LOC400942* gibi). Bu genlere ait nükleotid dizileri veri bankaları (*NCBIGNOMON*) aracılığı ile bilgisayar ortamında belirlenmiştir. Bu diziler için kesin olarak tanımlanmış herhangi bir gen ürünü bilgisi veri bankalarında bulunmamaktadır. Bu nedenle LOC genleri hipotetik olarak adlandırılmaktadır. LOC kodlu genlere ait protein ürünleri bilinmiyor olsa da proteini açıklamaya ya da protein işlevi hakkında çeşitli varsayımlarda bulunmaya yönelik her türlü çalışma genin cDNA dizisi üzerinden yapılabilir. Böyle bir durumda hipotetik bir genin ilgili hastalıktan sorumlu aday gen olup olamayacağını belirlemek bu dizinin işlevlerini belirtilen veri bankaları aracılığıyla cDNA dizisi üzerinden tahmin edebilmekle mümkün olacaktır. Bu amaçla hipotetik genlerin genomda bilinen gen dizileriyle olan nükleotid ve aminoasit dizisi benzerliğine ve bu dizilerin herhangi bir dokuda ifade edilip edilmediklerini belirten EST verilerine bakılır ve LOC kodlu dizinin gen ürünü ve ifade edildiği dokular hakkında bilgi edinilir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda LOC kodlu dizi ya da dizilerin hastalıktan sorumlu olabilecek aday gen listesine alınıp alınmayacağına karar verilir (30).

2.3.GENETİK HARİTALAMADA SNP MIKROARRAYLERİ (AFFYMETRIX MIKROARRAY) İLE GENOTİPLENDİRME

Tanımlanmış SNP'lerin güvenilir, kısa ve verimli bir metodla tespiti özellikle rutin tanı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bugüne kadar geliştirilen metodlar PZR

(Polimeraz Zincir Reakasyonu) teknolojisinin sunduğu olanaklardan yararlanmışlardır. SNP'lerin teşhisinde yaygın olarak kullanılan metodlar arasında RFLP ve alel spesifik PZR analizi sayılabilir. Bu metodlar arasında RFLP' nin her SNP için uygulanamaz oluşu (SNP'in bulunduğu bölgede herhangi bir restriksiyon enziminin tanyıp kesebileceğı dizinin olmaması) ve alel spesifik PZR ise özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu bölgelerde kesin güvenilirlikle optimizasyonunun zorluklar çıkarması açısından uygulamalarda güçlükler yaşanan tekniklerdir.

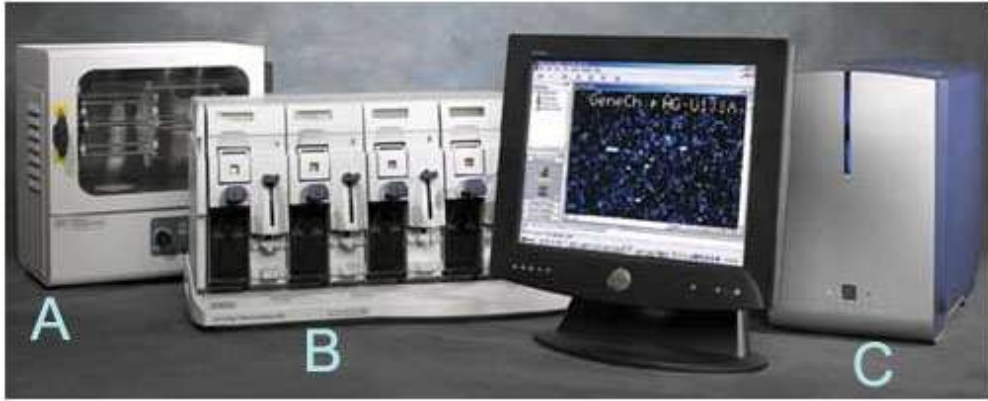
Son yıllarda geliştirilen array teknolojisinin otomasyona adapte edilmesiyle rutin analizlerde kullanma imkanı teknolojinin keşfinden bu yana üzerinde çalışılmış bir konu olmuştur. Affymetrix array platformu cam bazlı tasarımıyla rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Affymetrix array, SNP analizlerinin yanı sıra gen ekspresyonu analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında güvenilirlikle kullanılan bir teknolojidir. Yeni bir teknik olması ve kısa sürede rutine girmesi nedeniyle, günden güne gelişmektedir. Modifiye edilebilmeye elverişli olması nedeniyle yeni uygulamalarda da kolaylıkla kullanıma açıktır.

Affymetrix firması tarafından üretilen her çip 1,28 x 1,28 cm alanda 6,8 milyon 5 x 5 µm okuma alanı içerir. Bu alan içerisinde 1 milyon tane 25 bp prob kopyası bulunur. Bu problemler cam yüzey üzerinde sentetik olarak sentez edilmiştir (Şekil 2.2). 1.8 milyondan fazla marker bölgesi bulunmaktadır. Bunlardan 906,600'i tek hücre polimorfizmi bölgesi iken 945,826 polimorfik olmayan bölge içermektedir. Bu sayede SNP tabanlı ilişkilendirme çalışmalarının yanında kopya sayısı değişiklikleri de bu array ile tanınabilmektedir. 200-1100 bp uzunluğundaki Nsp ve Sty endonükleaz enzimleri ile kesilmiş örnekler kullanılmaktadır (31,32).



Şekil 2.2. Affymetrix 250K Nsp Array (31)

Sistem üç ana cihazdan oluşmaktadır: GeneChip® Scanner 3000 7G, GeneChip® Fluidics Station 450, GeneChip® Hybridization Oven 640. Ayrıca sistemi çalışması için gerekli bir bilgisayar sistemi ve GeneChip® Operating yazılımına sahiptir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Affymetrix donanımı (A:GeneChip® Hybridization Oven 640, B:GeneChip®Fluidics Station, 450, C:GeneChip® Scanner 3000 7G (31)

Laboratuvar çalışmasından sonra çip verileri tarayıcı tarafından taranır. Elde edilen görüntü yazılımsal olarak önceden bilinen çip çerçeve verileri ile ilişkilendirilir. Bundan sonra ilgili her tarama noktası için elde edilen ışık verilerine göre duyarlılık verileri

hesaplanır. Bu aşamadan sonra elde edilen veriler normalize edilir, ayrıca problemler yüzeydeki yerleşimleri ve hibridizasyon sırasında oluşabilecek dalgalanma etkilerini azaltan düzeltmeler uygulanır. Daha sonra veriler normal polipulasyon verileri ile karşılaştırılarak Log2 değeri hesaplanır.

Analiz için Board enstitüsü tarafından geliştirilen “Birdsuit” algoritması kullanılmaktadır. Bu algoritma SNP genotipleme için “Birdseed” CNV analizi için “Canary” algoritmalarından oluşmaktadır. Algoritma hidden Markov modelini temel almaktadır. Bu algoritmada sık görülen kopya sayısı polimorfizmi bilgileri ile SNP genotiplemesinden elde edilen ender görülen CNV bilgisi entegre edilerek genotiplendirme yapılır (31,32).

Affymetrix array’in başlıca kullanım alanları:

- Gen ekspresyon analizleri
- Mutasyon taraması
- Genotipleme
- Genlerin ve klonların haritalanması
- Kromozom mikrodensasyonlarının incelenmesinde kullanılmaktadır (31,32).

2.4.GENETİK HARİTALAMADA DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizleri yada sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif yada radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti yada rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir. Preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde oldukça kullanılır. Kalıtsal hastalık taşıyan çiftlerde tüp bebek embriyolarından alınan DNA’lar bu yöntemle analiz edilerek taşıyıcı embriyolar elenip genetik hastalık taşımayanların doğması sağlanmaktadır. Yine aynı şekilde doku uygunluğu saptanmış embriyolardan sağlıklı doğacaklardan elde edilen kordon kanı ve kemik iliği hasta kardeşlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

İlk dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlanmıştır. İlk olarak maya alanin tRNA dizi analiz teknikleride gelişmektedir. Nükleotit dizilein belirlenmesinde iki temel teknik kullanılmaktadır.

- Sanger dideoksi yöntemi (33)
- Maxam-Gillbert kimyasal degradesyon yöntemi (34)

Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA'nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Yüksek voltajlı jel elektroforezi

Her iki analiz sırasında da tek iplikçikli DNA parçaları hazırlanıp DNA dizi analiz yöntemi sırasındaki temel fark, DNA fragmentlerinin üretilme biçiminden kaynaklanır. Jel elektroforezi yüksek çözünürlükteki DNA moleküllerini ayırttığı için her iki metotta da kullanılır (33,34).

2.4.1.Sanger Dizi Analiz Yöntemi

Dideoksi yada zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir. Bu yöntem için:

- Tek iplikçi kalıp DNA'ya
- dNTP'lere
- ddNTP
- DNA polimeraz
- Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır

ddNTP'ler dideoksinükleosittrifosfatlardır. OH grubu taşımayan modifiye nükleotit substratlardır. Bunlar riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan fosfodiester bağının oluşumu engellenir yeni nükleotitler yapıya katılmaz. DNA zincir uzaması sonlanır. Bu Sanger yönteminin en can alıcı noktasıdır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. Bu amaçla dizi analizinin yapılacağı kolun primer derişimi komplementer kolunkinden

daha yüksek tutulur. Döngü ilerlediğinde sınırlayıcı primerin bittiği anda yalnızca uzama kolu çoğalır. Amplifikasyon bitiminde ürün ortamdaki maddelerden arındırılır. Artık tek zincirli kalıp DNA olarak kullanılmaya hazırdır. İlk olarak reaksiyon sonunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için DNA molekülü işaretlenir. İşaretleme işlemi için genelde S35, P33 yada P32 kullanılır. İşaretleme ya gama pozisyonuna yapısında bulunduran nükleotitleri kullanarak yada alfa pozisyonunda işaretli dNTP'leri kullanarak yapılır. DNA polimeraz, primer kalıp DNA ve dNTP'ler ortama konuplup işaretli nükleotitin yapıya katılması sağlanır. Kullanılan ddNTP'lerin konsantrasyonu diğer maddelerden dah düşük olmalıdır.

İşaretleme primerde yapılabilir. İşaretlemede sonra zincir sonlanması reaksiyonlarına geçilir. Karışım dört kısma ayrılarak dört tüpe konulur. Her tüpe gerekli enzim faktörleriyle birlikte düşük derişimli farklı ddNTP'ler konulur ve inkübe edilir. ddNTP'ler ve dNTP'ler aynı karışıma konduğunda aralarında bir yarışma olur. Substrat olarak dNTP'ler kullanıldığı sürece uzama devam eder. Sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde reaksiyon durur. Her tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon olmuştur. Sonuçta primer sonundan başlayıp prematüre sonlanmaların olduğu bölgelere kadar çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşur. Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için yüksek rezülasyonlu denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kurutularak otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. Otoradyogramdan elde edilen basamak şeklindeki bantlar radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. Birbirine en yakın iki bant arasında tek bir nükleotitlik fark vardır. Elektroforezde mobilitesi en hızlı olan bant primere en yakındır yani radyoaktif elemente en yakın bant en küçük DNA fragmentidir. Bu fragmen hangi ddNTP ile oluşturulmuş ise işareten sonra gelen ilk bazdır. İlk bantta en yakın ikinci bazı verir. Böylece aşağıdan yukarı doğru çıktıkça hareketi azalan bantların hangi ddNTP ile oluşturulduğu belirtilir. Sonuçta otoradyogramda ki bu bant verilerden yararlanılarak 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur (33,35).

2.4.2.DNA Dizi Analizinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

- 1-Asimetrik DNA amplifikasyonunda sınırlayıcı primer 1-2 pmol'dan (10⁻⁶) fazla olmamalıdır,
- 2-Amplifikasyon ürünleri temizlenmeden kullanılmamalıdır,
- 3-Kalıp DNA ile primerin birbirine oranı 1 olmalıdır,

4-Guanin ve sitozince zengin bölgeler sekanslanırken yüksek annealing sıcaklığı seçilmeli, DNA ve primer birleşmesi oda sıcaklığında en az 20 dakika olmalı, Sequenazlar yerine Tag polimeraz kullanılmalıdır (tag polimeraz 72 derecede polimerizasyon kullanılmalıdır)

5-Jelde saf ve kaliteli kimyasallar kullanılmalıdır,

6-Eğer radyoaktif işaretleme yapacaksa S35 tercih edilmelidir (yarılanma ömründen dolayı) (33)

2.4.3.Maxam –Gilbert Kimyasal Degredasyon Yöntemi

Çok yönlü sekans olarak da bilinen bu yöntem de bazı kimyasallarla DNA özgül baz dizilerinden kesilerek değişik uzunlukta fragmentler elde edilir. Bu metotta bir sekans jelinden kırk klon analizi yapılabilir. Yine de çok fazla tercih edilmeyen metottur. Ana mantık DNA'daki bazların tahrip edilip hasar görmüş bölgelerden piperidin ile fosfodiester bağlarının kırılmasıdır. İlk olarak DNA parçası bir ucundan işaretlenir. İşaretleme sonrası DNA dört parçaya ayrılır. Her bir örneğe bazlardan birini tahrip edilebilecek kimyasallar eklenir. Genelde ilk pürin ve pürimidinlerin ayrımı ardında bazların ayrımı şeklinde olur. Dimetilsülfat ile müdahale pürinlerin hidrozin ile müdahale de pürimidinlerin arasındaki glikozit bağlarının kırılması sağlanır. Piperidin de fosfodiester bağlarının kırınımını katalizler.

- Dimetilsülfat, piperidine guanini bağlarken, • Dimetil sülfat, piperidine formik asit guainin ve adenini bağlar.
- Hidrozin ve piperidin birlikte timin ve sitozini bağlarken, • Hidrozin piperidin ve 1.5 M'lık NaCl yalnızca sitozini bağlar.

Yukarıdaki kimyasalların uygulanmasıyla oluşan çeşitli uzunlukta fragmentler yüksek voltajlı elektroforez sonunda X-ray duyarlı film ile kaplanarak otoradyograma alınır. Otoradyografik bantlar 5'-3' yönünde en alttan en üste doğru okunduğunda bize 5'-3' yönündeki baz dizilimini verir (34,35).

2.4.4.DNA Dizi Analizinde Kullanılan Enzimler

DNA dizi analizinde çeşitli polimerazlar kullanılabilmektedir:

- Klenow Fragment/E.Coli DNA polimeraz
- Reverse Transkriptaz

- Bakteriofaj T7 DNA polimeraz
- Taq DNA polimeraz
- Sequenazlar

Klenow Fragment/E.Coli DNA polimeraz kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları vardır; Bu enzim standart olarak 250-300 nükleotitlik bir dizi analizi edebilir çok zincirlerde etkisini gösteremez, homopolimerik bölgeleri etkin olarak çoğaltamaz (Homopolimer DNA segmentlerinin uçlarına ilave edilen poli A, poli T'lerden) İkincil yapının olması durumunda da etkili değildir (Dyad simetri)

Reverse Transkriptaz enzimi de çok fazla kullanılmamakta dizi homopolimerik bölgeler (A/T veya G/T) bakımından zenginse tercih edilmektedir.

Tag polimeraz Klenow'un yapamadığı tüm işlevleri yapabilmektedir ve özellikle G/C bakımından zengin bölgelerde daha etkindir.

Sequenazlar Bakteriofaj T7 DNA polimerazın bir formu olup 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi kısıtlanmış bir enzimdir. Bu özelliği ddNTP'lerin bağlanmasını kolaylaştırdığından çoklukla tercih edilmektedir. Bu enzimin tamamıyla modifiye bir formu olan Sequenaz ver 2'de üç kat daha fazla aktivitesi olan bir enzimdir. Polimerizasyon oranı 300 dür. Bir reaksiyonda yaklaşık 3000 nükleotit sentezi yapılabilir. Burada sınırlayıcılar poliakrilamid jelleridir. Bu avantajlardan yararlanabilmek için iki kademeli dizilenme reaksiyonu yapılır (36).

2.4.5.Non Radyoaktif İşaretleme İle DNA Dizi Analizi

Radyoaktivitenin pahalı ve zararlı olması gibi dezavantajları olduğundan nonradyoaktif yöntemler kullanılarak DNA dizi analizi yapılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler:

- Gümüş boyama tekniğiyle
- Biotinlenmiş primer kullanılarak
- Floresans işaretleme tekniğiyle
- Magnetik parçacıklar kullanılarak
- DNA bağlayan proteinlerle
- Digoxigeninle DNA dizi analizi (35)

2.4.6.Elektroforez

DNA molekülleri fosfat grubu taşıdıkları için (-) yüklüdür ve anoda doğru (+) hareket eder. Bu hareket DNA' nın yapısına ve uzunluğuna bağlıdır. Jel boyunca kısa DNA fragmentleri daha hızlı yol alırken uzunluk arttıkça DNA' nın hızı azalır. Her iki dizi analizi yöntemi ile elde edilen farklı uzunluklardaki fragmentlerin birbirlerinden ayrılması ve tanımlanmasında DNA'nın bu özelliği kullanılır. Birbirlerinden farklı sonlanmalara sahip reaksiyon ürünleri dört ayrı kulvarda söz konusu jel matrikse yüklenir. DNA fragmentleri oluşturulacak elektriksel alanda uzunluklarına göre sıralanırlar ve DNA dizisi jelden okunur. Poliakrilamid jeller her iki teknik için de kullanılır ve yüksek ayırım gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller uygun süre ve uygun voltajda tek bir nükleotit farkını bile ayırabilir. DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jel üzerinde gümüş boyama, radyoaktif veya floresan boyalarla işaretlenerek tespit edilebilir. Otomatik DNA cihazlarının gelişmesi ile poliakrilamid jellerin yerini polikarbon bileşikler olan polimerler almıştır. Bu polimerler yoğunluklarına göre farklı ayırım gücüne sahiptirler. Kullanılan polimer otomatik cihazlarda çapları milimetreden küçük olan cam kapillerler içine yüklenirler. Böylece poliakrilamid jellerde meydana gelen problemler en aza indirilmiş olur (36).

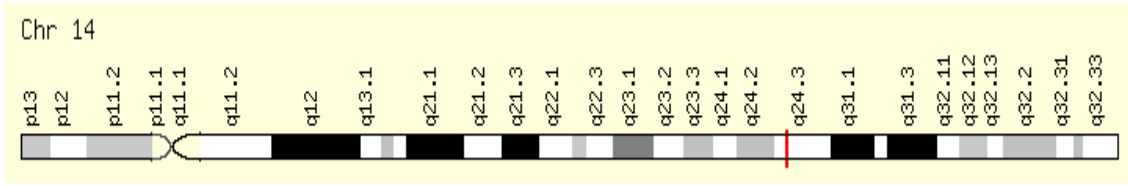
2.4.7.Otomatik DNA Dizi Analizi

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek

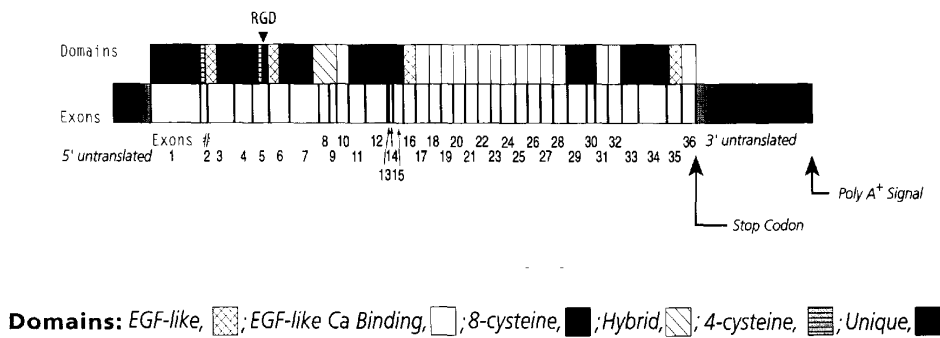
sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (36,37).

2.5. *LTBP2*(Latent TGF- β Binding Protein-2) Geni

LTBP2 geni insanlarda Latent TGF- β Binding Protein 2' yi kodlayan 14q24.3 te (Şekil 2.4) lokalize bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan protein, latent transforming growth factor (TGF)- β binding protein (*LTBP*) ailesine aittir ve bu proteinler multi-domain yapısında ekstrasellüler matriks proteinidir. Ekstrasellüler matriksin (ECM) bileşenleri ve onların farklı ekspresyon modelleri doku formasyonunda önemli rol oynarlar. *LTBP* ailesi, fibrillin-1 ve fibrillin-2 mikrofibrin proteinleri ile güçlü benzerlik gösteren iki farklı sisteince zengin tekrar sekansı, EGF (Epidermal Growth Factor) benzeri tekrarlar ve 8 sistein rezüdüründen oluşan çoklu domain yapısına sahiptir (Şekil 2.5). Matriks içinde TGF- β aktivitesinin kontrolü, hücre adezyonu ve mikrofibrillerde yapısal bir rol oynar (38-50).



Şekil 2.4. *LTBP2* geninin genomik lokasyonu (50)



Şekil 2.5. *LTBP2* geninin domainleri (48)

Fibrillin proteini, bağ dokuda elastik liflerin oluşumunda yapısal destek sağlayan kritik bir rol oynamaktadır. Fibrillin proteininin eksikliği veya defektif olması sonucu özellikle

aort damarı, akciğerler ve göz küresi gibi elastik liflerden zengin organların bağ dokularında zayıflık oluşmaktadır. Marfan Sendromu, 15. kromozoma lokalize fibrillin genindeki defekt sonucu mikrofibrillerin yapısal glikoproteini olan fibrillin sentezinde kalitatif ve kantitatif bozuklukla karakterizedir. Fibrillinlere yapısal olarak benzerliği sebebiyle literatürde *LTBP2* geni mutasyonları da, bağ dokusunda etkili olarak Marfan sendromunda gözlenen özellikle gözde lens dislokasyonlarına (mikrosferofaki ve ektopia lentis), miyopi, megalokorneya, glakomaya, uzun boy ve kol oluşumu gibi marfanoid özelliklerin oluşumuna neden olmaktadır (38-50).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Genom Bilim Araştırma Ünitesinde yapılmıştır.

3.1.2 Çalışma grubu

Bu çalışmanın deneysel aşamaları Temmuz 2009 – Eylül 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Ankara Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez laboratuvarı Genom Bilim Araştırma Ünitesin'de yapılırken, LOD skor hesaplamaları Doç.Dr. Mustafa Tekin' nin yönetiminde gerçekleştirildi.

Çalışmamız skolyoz, körlük ve araknodaktili bulguları gösteren, otozomal resesif geçişli genetik modele sahip bir ailede bu bulguları verecek yeni gen keşfi için bağlantı analizi yapılması planlanmıştır.

Anabilim Dalımız kliniğine 2001 yılında başvuran skolyoz, araknodaktili ve körlük bulgularının eşlik ettiği 9 hasta çalışmaya dahil edildi. İki erkek kardeşte (29 yaş ve 33 yaş) körlük, araknodaktili ve skolyoz mevcuttur. Otuzdokuz yaşındaki kız kardeşte körlük mevcuttur. Çalışmaya katılan diğer aile bireyleri fenotipik olarak normaldir. Marfan sendromundan ayrılmak için ailede daha önce FBN1, TGFB1 ve TGFB2 gen mutasyon taraması yapılmış ve mutasyon saptanamamıştır. Konvansiyonel sitogenetik analizleri normaldir (7).

Yukarıda bahsedilen klinik semptomlara sahip 9 hastanın aydınlatılmış onamları alınarak; periferik venöz kandan K₃EDTA'lı steril tüplere [Venoject®] 5 cc kan örneği alınmıştır.

3.1.3. Kullanılan Gereçler

Çalışmada kullanılan cihaz listesi aşağıdaki gibidir:

Aletler	Markası
Yatay Elektroforez düzeneği	Biozym TC
Distile Su cihazı	Millipore
Doğru akım güç kaynağı	Biometra PP4000
Hassas Terazı	Libror AEG-220
Laminar air flow	Heraus
Manyetik karıştırıcı	Sanyo
Mikrodalga Fırın	Simens
Thermal cycler	MJ Research DNA EngineTetrad 2
Mikrosantrifüj	Heraus
Otomatik Mikropipetler (10,20,100,200,1000 µl'lik)	Eppendorf Gilson
Soğutmalı santrifuj	Sigma
Jel Görüntüleme Sistemi	Gene Genius
Spektrofotometre	Nanodrop
Buzdolabı(+4 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	Bosh
Aspiratör	Qiagen
Yatay çalkalayıcı	Sanyo
Vorteks	Vortexmixer VM20 Chiltern Scientific
Hibridizasyon fırını	GeneChip® Hybridization Oven 640
Array yıkama istasyonu	GeneChip® Fluidics Station 450
Affymetrix Array	GeneChip® Scanner 3000 7G
Hassas Terazı	Sartorius 13P 2215
Dizi Analizi Cihazı	Beckman Coulter 8000CE
Otomatik DNA izolasyon cihazı	Qiagen Bio Robot M48

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal, sarf malzeme ve kitlerin listesi aşağıda verilmiştir.

<u>Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri</u>	<u>Markası</u>
Mag Attract [@] DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Sodyum asetat	Sigma
Fenol	Merck
Kloroform	Merck
İzoamil alkol	Merck
Etanol	Merck
Sucrose	Sigma
MgCl ₂	Fermantas
Triton-X	Sigma
NaCl	Merck
Sodyum dodesil sülfat(SDS)	Sigma
Agaroz	Sigma
DNA boyut markırı	Bionexus
Loading Buffer	Sigma
10X TBE Buffer	Merck
Etidyum Bromid	Sigma
dNTP	Takara
PCR primer	Affymetrix
TITANIUM Taq DNA Polimeraz	Clontech
TITANIUM Taq DNA Polimeraz Buffer	Clontech
G-C Melt	Clontech
Nsp I restriksiyon enzimi	New England Biolab
BSA	New England Biolab
H ₂ O(Molecular Biology Grade Water)	BioWhittaker Molecular Applications
Fast Digest Buffer	New England Biolab
T4 DNA Ligaz	New England Biolab
T4 DNA Ligaz Buffer	New England Biolab
Adaptör Nsp	Affymetrix

Recovery Buffer	Clontech
EDTA	Ambion
Pürifikasyon plate(Clean-Up Plate)	Qiagen
Aliminyum Folyo	Beckman
Fragmentation Reagent(Dnase I)	Affymetrix
Fragmentation Buffer	Affymetrix
DNA Labelling Reagent	Affymetrix
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	Affymetrix
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Buffer	Affymetrix
Tetramethyl Ammonium Chloride	Sigma
Tween 20	Surfact-Amps
MES hydrate Sigma Ultra	Sigma
MES sodium salt	Sigma
DMSO	Sigma
Denhardt s Solution	Sigma
Human Sperm DNA(HSDNA)	Promega
Human Cot-1 DNA	Invitrogen
Oligo Control Reagent	Affymetrix
TMACL	Affymetrix
OCR	Affymetrix
SSPE	Surfact-Amps
Anti-Streptavidin Antibody	Sigma
MES hydrate	Sigma
MES Sodium Salt	Sigma
Stain Buffer	Sigma
Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)	Sigma
Biotinylated antibody	Sigma
DTCS kit	Beckman Coulter
Seperation Gel	Beckman Coulter
Sequencing Seperation Buffer	Beckman Coulter
DNA seperation capillary array	Beckman Coulter
Clean SEQ	Beckman Coulter
10 x PCR Tamponu	Fermentas

Steril Falkon tüpler	Sigma
Taq DNA polimeraz	Sigma
TEMED	Sigma
Tris	Sigma
Tris / HCl pH : 8,0	Sigma

3.1.5 Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar ve Tamponların Hazırlanması

Reagent A

5 ml. 500 mM Tris HCl

27,4 g Sükroz (MW:342,3)

0,12 g MgCl₂ (MW:95,21)

2,5 ml. Triton X-100

250 ml' ye kadar dH₂O ile tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

Lizis Buffer

200 µl Tris 500 µM

200 µl EDTA 500 µM

300 µl NaCl 5 M

200 µl SDS % w/v 20

dH₂O ile 50 ml' ye tamamlandı.

TE Buffer

10mM TrisCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

1 ml 500 mM Tris (pH 8.0)

100 µl 500 mM EDTA

50 L dH₂O ile tamamlandı.

Etidyum Bromid

0,2 gr Etidyum Bromid hassas terazide dikkatlice tartılarak 20ml dH₂O ile tamamlandı.

Wash A:

6X SSPE, 0.01% Tween 20 (1 litre için)

300 ml 20X SSPE

1.0 ml 10% Tween-20

699 ml disitile su

Karışım hazırlanıp ve 0.2 µm filtre ile süzülür. Kullanılincaya kadar oda sıcaklığında bekletilir.

Wash B:

0.6X SSPE, 0.01% Tween 20 (1 litre için)

30 ml 20X SSPE

1.0 ml 10% Tween-20

969 ml disitile su

Karışım hazırlanıp ve 0.2 µm filtre ile süzülür. Karışımın pH değeri 8 olmalıdır. Kullanılincaya kadar oda sıcaklığında bekletilir.

0.5 mg/mL Anti-Streptavidin Antibody

0.5 mg Anti-Streptavidin Antibody 1 ml disitile su içinde çözülür ve kullanılincaya kadar 4°C'de bekletilir.

12X MES Stok Buffer:

1.25 M MES, 0.89 M [Na⁺]

70.4g MES hidrat

193.3g MES Sodyum Salt

800 ml disitile su

Toplam hacim 1000 ml ye tamamlanır. Karışım hazırlanıp ve 0.2 µm filter ile süzülür. Karışımın pH değeri 6.5-6.7 arası olmalıdır. Kullanılincaya kadar 2-8°C'de bekletilir.

1X Array Holding Buffer

100 mM MES, 1M [Na⁺], 0.01% Tween-20 (100 ml için)

8.3 ml 12X MES Stok Buffer

18.5 ml 5 M NaCl

0.1 ml 10% Tween-20

73.1 ml disitile su ile tamamlanır. Kullanılincaya kadar 2-8°C'de bekletilir.

Stain Buffer

H₂O 800.04 µl

SSPE (20X) 360 µl

Tween-20 (3%) 3.96 µl

Denhardt's (50X) 24 µl

SAPE (Streptavidin Phycoerythrin) Stain Solüsyonu

Stain Buffer 594 µl

1 mg/ml Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) 6.0 µl

Toplam 600 µl olarak alınıp 1500 µl Eppendorf örnek tüpünde hazırlanır ve ışığa hassas olan bu karışım folyo ile sarılarak ışıktan korunur.

Antibody Stain Solüsyonu

Stain Buffer 594 µl

0.5 mg/ml biotinylated antibody 6 µl

Toplam 600 µl olarak alınıp 1500 µl Eppendorf örnek tüpünde hazırlanır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Kandan DNA izolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu iki farklı yöntemle çalışıldı. Bunlardan ilki Otomatik İzolasyon cihazı ile yapılan izolasyon, ikincisi fenol-kloroform ile yapılan DNA izolasyonudur.

3.2.1.1.Cihazla Yapılan DNA İzolasyonu Yöntemi

DNA izolasyonu, Qiagen Bio Robot M48 marka\ model otomatik DNA izolasyon cihazı ile yapıldı. İzolasyon kiti olarak “Mag Attract DNA Blood Mini M48” kiti kullanıldı. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın lökosit sayısı dikkate alınarak 200 - 300 µl kan örneği 2 ml’lik eppendorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirildi. Cihaz çalıştırılarak 20 dk içinde 100 µl izole edilmiş DNA elde edildi.

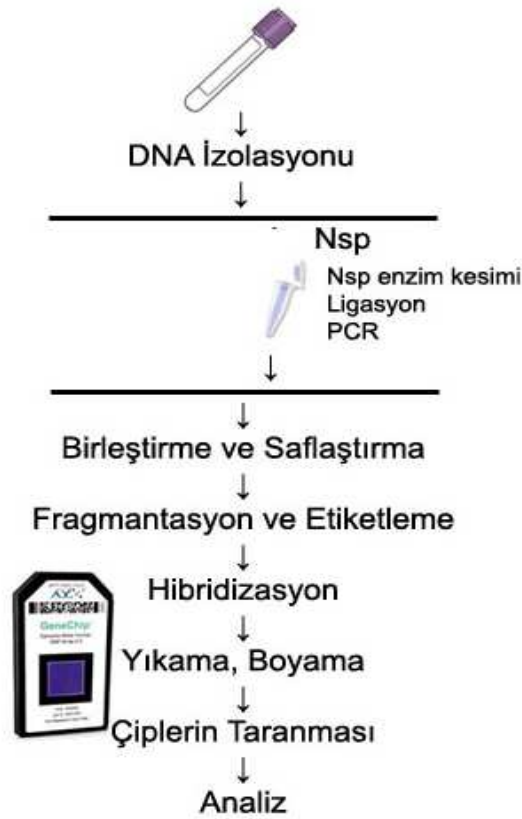
3.2.1.2.Fenol-Kloroform Yöntemi

EDTA’ lı tüplere alınan kan örnekleri 50 ml polipropilen santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 40 ml Reagent A ilave edildi. 10 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. 2700 rpm 4 dk santrifüj edildi. Süpernetan atıldı. Ayrılan hücrelerin üzerine 1000 µl Lizis buffer ve 50 µl (1 mg) proteinaz K ilave edildi. 37 °C’ de su banyosunda 14-16 saat bekletildi. Üzerine 500 µl Kloroform:İzoamilalkol (24:1), ve 500 µl Fenol ilave edildi.10 dk oda ısısında ters düz edilerek karıştırıldı. 10 dk 3000 rpm de santrifüj edildi. Oluşan 2 fazdan üstteki faz alındı. Üzerine 500 µl Kloroform:İzoamilalkol (24:1), 500 µl Fenol ilave edildi. 10 dk oda ısısında ters düz edilerek karıştırıldı. 10 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi. Üst faz pipetle toplandı. Toplanan kısmın üzerine 1000 µl Kloroform:İzoamilalkol eklendi. 10 dk oda ısısında yüz edilerek karıştırıldı. 10 dk 3000

rpm' de santrifüj edildi. Üst faz toplandı. Üzerine 100 µl 3M NaAsetat ve 2000 µl 100% v/v Etanol eklenerek karıştırıldı. (-20°C)' de bekletildi. Pellet mikrosantriföj tóponé alúnarak ózerine 2000 µl %80 v/v Etanol eklendi. 5 dk 13000 rpm' de yıkandı. Supernetant atıldı ve 5 dk ekletilerek Etanol uzaklaştırıldı. Pellet 400 µl TE içerisinde çözöldü. DNA +4 °C' de saklandı.

3.2.2.250K Genotiplendirme Analizi

Çalışma, üretici firma tarafından tanımlanan protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma basamaklarının tamamı şekil 3.1' de özetlenmiştir (31).



Şekil 3.1. Affymetrix GWS 6.0 array çalışmasının basamakları

3.2.2.1.DNA'nın Nanodrop Spektrofotometre ile Konsantrasyonunun Ölçümü

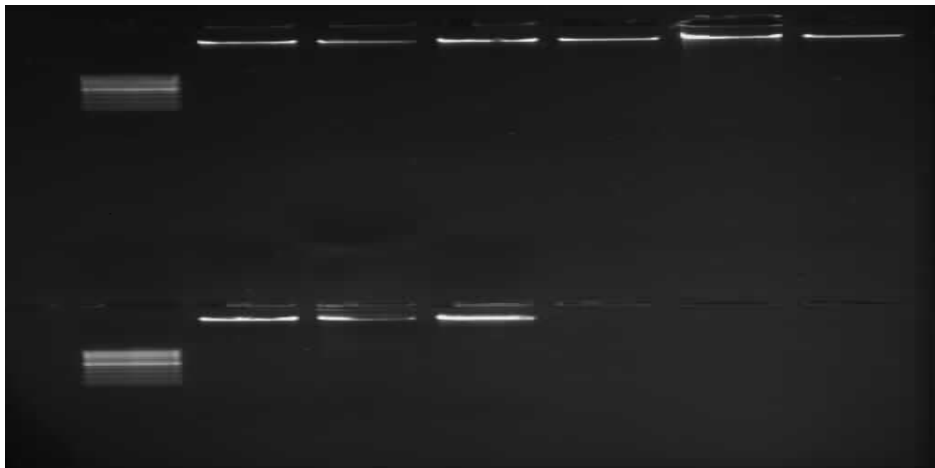
İzole edilen DNA'ların Nanodrop spektrofotometresi ile 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. 250K genotipleme metodunda başlangıç materyali 250 ng

(50ng/ul) genomik DNA olduğu için, DNA'lar nükleaz içermeyen steril deiyonize su ile 50 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı (51).

3.2.2.2. İzole edilen DNA örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi

İzole edilen DNA örneklerinin degrave olup olmadığının ölçülmesi % 1 lik agaroz jel elektroforezinde 200 V(Volt)' ta DNA örnekleri yatay elektroforezde koşturularak görüntülenmek suretiyle kontrol edildi.

Jeli hazırlamak için, 1 gr Agaroz, TBE tamponu ile 100 ml' ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 °C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 4,5 μl Etidyum Bromid eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TBE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna izole DNA'yı karşılaştırmak amacıyla DNA boyut belirleyicisi yüklendi. İzole DNA ürününden 0,5'lik Ependof tüpe 5 μl alındı ve üzerine 2 μl loading buffer eklendi . Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla herbir DNA örneği kuyucuğa yüklendi. Ürünler 15 dakika yürütüldü. Daha sonra jel, transilüminatörde değerlendirildi (Şekil 3.2). DNA örneklerinin smear ve dimer görüntüsü vermemesine dikkat edildi.



Şekil 3.2: İzole edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

3.2.2.3 Restriksiyon enzim kesimi

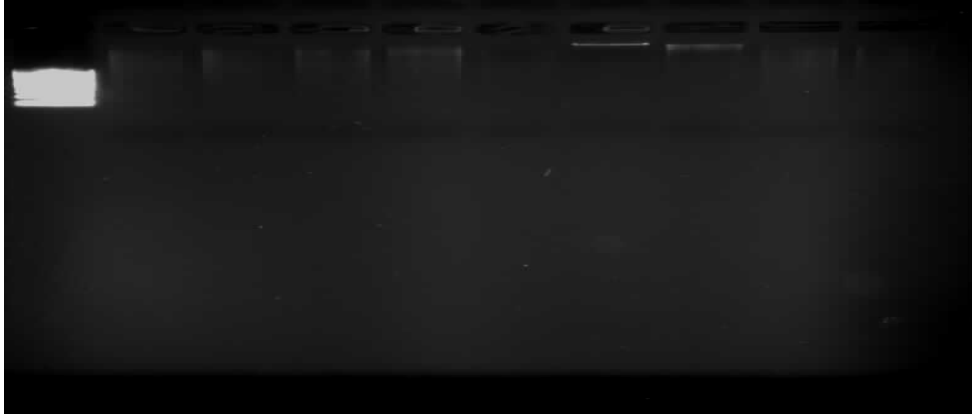
Restriksiyon enzimleri, çift sarmal DNA'yı özgün parçalara kesen ve bu şekilde özellikle tek nükleotid polimorfizmlerinin çalışılmasını sağlayan enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon enzimleri sentezler. Asıl görevleri, bakteriye dışarıdan giren yabancı genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları önlemek ve böylece bakteri DNA'sını korumaktır. Bakteriye özgü olan bu enzimler, çift iplikli DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift iplikli DNA'nın her iki zincirindeki fosfo-diester bağına keserek DNA'yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırırlar. Günümüzde 500'e yakın restriksiyon enzimi değişik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. İsimleri izole edildikleri bakterilerin ilk üç harfi; aynı bakteriden birkaç enzim elde edildi ise Roma rakamı ile belirtilir (52).

3.2.2.3.1 250 K Fast Digest *NspI*

Konsantrasyonu 50 ng/μl ye ayarlanan ve degrave olmadığı saptanan DNA örnekleri arraya uygun bir restriksiyon enzimi olan *Nsp I* enzimi ile kesildi. *Nsp I* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi 5' RCATG↓Y 3' dir. Bunun için buz üzerinde toplam reaksiyon hacmi 25μl olacak şekilde herbir 50ng/μl olan DNA örneğinden 6,25 μl, 10X Fast Digest bufferdan 2,5μl, *NspI* fast digest enzimden 0,31 μl, steril distile sudan 15,94 μl alınarak kesim karışımı hazırlandı. 37° C da 5 dakika ve 65° C da 5 dakika inkübasyon programında kesim reaksiyonu yapıldı. Inkübasyon programı thermal cycler cihazında uygulandı.

3.2.2.4. Restriksiyon enzim kesimi ürünlerinin görüntülenmesi

NspI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürün, yatay jel elektroforezinde (Şekil 3.3) %1 lik agaroz jelde 30 dak. yürütülerek, translüminatörde görüntülenerek değerlendirildi.



Şekil 3.3. *Nsp I* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünün, yatay jel elektroforezinde görüntüsü. **1-5,7,8,9** *NspI* kesim smear görüntüsü.

3.2.2.5 Ligasyon

Bağlama veya ligasyon, rekombinant DNA teknolojisinde klonlanacak geni taşıyan DNA parçaları ile vektörün bir enzim aracılığıyla birbirlerine bağlanması işlemine denir. Bu işlem için ligaz cinsi enzimler görev yapar.

Bağlamadaki sorunlardan biri vektörün yabancı DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır, bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri, vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir. Bağlama için uygun uçların bulunması ya da oluşturulması gerekir. Değişik yöntemlerle bu gerçekleştirilebilir:

Kesme enzimleri tarafından meydana getirilen yapışkan uçların birbirini tanıması şeklinde bağlanma

Aynı cins enzimle kesilmiş DNA parçaları ve doğrusal konuma getirilmiş taşıyıcı DNA molekülleri biraraya getirildiğinde, farklı kökenlere sahip olsalar bile, birbirlerini tamamlayıcı özellikteki (yapışkan) uçları taşımalarından dolayı uçlar arasındaki baz eşleşmeleriyle moleküller bağlanır. Sonrasında ligaz enzimi nükleotidler arasında fosfodiester bağları kurarak açık uçları kapatır. Bu yöntem rDNA elde etmek için kullanılan en basit ve etkili yoldur. Ligaz yüksek yoğunlukta kullanılırsa rekombinant oranı artarken, düşük yoğunlukta kullanıldığında DNA parçaları halka şeklini alırlar.

Bağlayıcı ya da aracı moleküller kullanarak bağlanma

Bu yöntem küt olan uçların bağlanmasında kullanılır. Aracı olarak yapay bağlayıcı moleküller kullanılmaktadır. Bu sentetik aracı moleküller 6-10 baz çiftinden oluşan oligonükleotidlerdir. Bu moleküller 5' uçları polinükleotid kinaz ile fosforlanma sonrası T4 DNA ligaz yardımıyla küt uçlu parçalara bağlanır ve bir kesme enzimi yardımıyla yapışkan uçlar oluşturulur. Bu şekilde oluşturulmuş diğer bir taşıyıcıya bağlanma ve aralıkların ligazla kapatılmasıyla bağlanma işlemi tamamlanır.

Homopolimerik tek zincirli kuyruklar kullanarak bağlanma

Bu yöntemle de küt uçların bağlanması sağlanmaktadır. Küt uçların 3' uçlarında terminal transferaz enzimi yardımıyla homopolimerik tek zincirli kuyruklar takılır. Bu yöntem özellikle ökaryotik genlerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Ökaryotik cDNA parçalarının taşıyıcılara bağlanmasında kuyruklama yöntemi başarılı sonuçlar vermektedir (53).

3.2.2.5.1.Ligasyon reaksiyonu

Nsp I restriksiyon enzimi ile kesilen DNA örneklerinin ligasyonu T4 DNA ligaz enzimi ile yapıldı. Bunun için buz üzerinde toplam reaksiyon hacmi 25,25µl olacak şekilde 20 µl kesilmiş DNA ürünü, 2 µl T4 DNA ligaz, 2.5 µl 10X T4 DNA ligaz buffer, 0.75 µl *NspI* restriksiyon enzimine uygun 50µm lık adaptor *NspI* ile reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 16 °C 180 dakika, 70° C 20 dakika ve 4 ° C soğutma olan PZR inkübasyon programında ligasyona bırakıldı.

3.2.2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu

PZR; bir organizmaya ait deosiribonükleik asit veya ribonükleik asit dizilerinin in vitro çoğaltılmasına imkan veren bir yöntemdir. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (54-57).

PZR yöntemi kısaca bir gen yada DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç kısımlarına bağlanan ve hedef diziye komplementer oligonükleotid primerler kullanılarak ardışık bir dizi replikasyonla (siklus) çoğaltılması işlemidir. PZR'ın gerçekleşebilmesi için ortamda amplifiye olacak çift iplikli DNA yada komplementer DNA (cDNA) fragmenti, iki adet tek sarmallı oligonükleotid ve bunlara ek olarak bir protein bileşeni olan DNA polimeraz enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), bir tampon ve tuz

solüsyonlarının bulunması gerekmektedir. Reaksiyondaki her döngü 3 evreden oluşmaktadır (56,57).

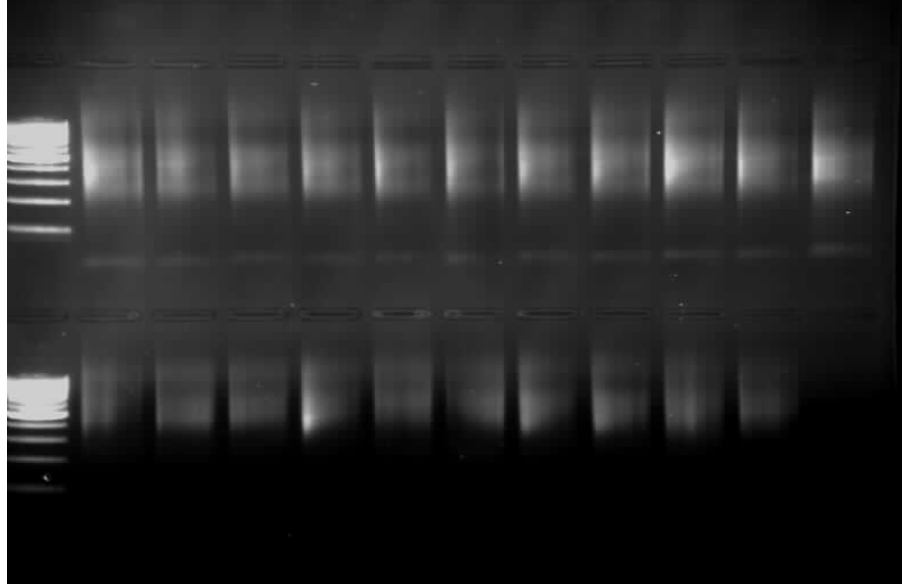
i. Denatürasyon Evresi: Bu evrede çift iplikli DNA 90°C üzerinde tek iplikli hale getirilmektedir. ii. Primerlerin Bağlanma (annealing) Evresi: Bu evrede primer olarak adlandırılan ve çoğaltılmak istenen DNA dizisinin uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidler, denatürasyon evresinde tek iplikli hale DNA üzerinde kendilerine komplementer olan nükleotid dizilerine hibridize olmaktadır. Primerlerin bağlanması 50-75°C'ta gerçekleştirilmektedir. iii. Uzatma (extension) Evresi: Bağlanma evresi tamamlandıktan sonra primerlerin uzatılmasıyla tek sarmallı DNA'nın kopyası sentezlenmektedir. Bu sentez işlemi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzim PZR için ilk defa 1988 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Enzim 72-78°C'ta optimum düzeyde işlev görmektedir ve saniyede 150 nükleotid ilave edebilmektedir. Ancak çeşitli ortam koşullarına bağlı olarak bu oran saniyede 35-100 nükleotid civarındadır (54-57). PZR reaksiyonunda bu 3 evre bir döngü olarak kabul edilmektedir. Bir döngü yaklaşık olarak 3-5 dakika sürer ve tipik bir PZR reaksiyonu için 20-40 defa tekrarlanır. PZR'da bir döngü sonunda oluşan ürün miktarı bir önceki döngüde oluşan ürün miktarının iki katıdır. Döngü sayısı 'n' olarak kabul edilirse '2ⁿ' çoğaltılmış DNA miktarını verir. PZR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla 1980'lerin sonlarında her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan otomatik aletler (thermal cyclers) geliştirilmiştir (56,57).

3.2.2.6.1 PZR prosedürü

Ligasyon sonrası ürünler çok yoğun genomik DNA içeriğine sahip olduklarından dilüe edilerek PZR aşamasına hazırlanıldı. Bunun için son hacmi 25 µl ligasyon ürünleri 75 µl steril distile su ile dilue edildi. PZR ile ürünün 90 ng/µl den daha az olmaması için her hastadan 3 PZR reaksiyonu çalışıldı. 90 µl'lik PZR karışımı içerisinde bir hasta için; 10 X dream Taq Bufferdan 10 µl, Primer 002 100 pM'lükden 4,5 µl, MgCl₂ (25 mM'lık) 14 µl, dNTP (2,5 mM'lık) 14 µl, DNA örneği 10 µl, Dream Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 4 µl, Betain(GC kontingi olarak kullanıldı) 20 µl konuldu ve toplam volüm distile su ile 90 µl' ye tamamladı. PZR programı ise 94°C'de 5 dakika, 94°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye , 68°C'de 15 saniye, son üç siklusun 29 kere tekrarı, 68°C'de 7 dakika ve 16°C'de forever şeklinde uygulandı, ürünler thermal cyclers cihazına yüklendi.

3.2.2.7 PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Her hasta için yapılan 3 PZR sonucu oluşan 3 PZR ürünü % 2 lik agaroz jelde ayrı ayrı kuyucuklara yüklenerek 120 voltta 20 dakika koşturularak (Şekil3.4) kontrol edildi. 200-110 bp aralığında ürünler görülmesi beklendi.



Şekil 3.4. PZR ürünlerinin %2 lik agaroz jelde görüntülenmesi.

1: 100 bp lik marker **,2,3,4:**1. hastanın PZR ürünleri; **4,5,6:** 2. hastanın PZR ürünleri;**7,8,9:** 3. hastanın PZR ürünleri; **9,10,11:** 4. hastanın PZR ürünleri; **12,13,14:** 5. hastanın PZR ürünleri; **15,16,17:** 6. hastanın PZR ürünleri; **18,19,20:** 7. hastanın PZR ürünleri.

3.2.2.8. Pürifikasyon

DNA'nın saflaştırılması olarak da adlandırılan DNA pürifikasyonu, PZR` dan çıkarılan ampliconun kullanımında en ideal sonucu alabilmeyi sağlamak için yapılan işlemler bütünüdür. DNA pürifikasyonu ile PZR ampliconları primer, DNA artıkları ve tuzlardan temizlenir ve saflaştırılır (58,59).

3.2.2.8.1 PZR Pürifikasyonu ve Clean-Up Plate ile Elüsyon

Bu amaçla milipore filtrelerle yapılan, molekülleri boyut ve biçimlerine göre ayırt edebilen pürifikasyon plate'ler kullanılır. Ampliconların dışarıdan oluşturulan negatif hava basıncıyla bu filtrelerden süzülmesi sağlanır. Ampliconlar, diğer primer ve DNA artıklarına nazaran daha büyük oldukları için zardan geçemezler ve plate'in dibinde kalırlar.

Her bir PZR tübüne 0,1 M EDTA dan 8 µl eklenildi. EDTA eklenen PZR tüpleri

vortekslenerek 2000 rpmde 2 dakika santrifüj edildi. Her hastaya ait 3 PZR ürünü pürifikasyon sonrası DNA içeriğinin 90ng/μl olması için pürifikasyon tablasının (Clean Up Plate) tek bir kuyucuğuna yüklendi ve tabla üstü aliminyum folyo ile kapatıldı. Pürifikasyon için uygun aspiratör cihazı kullanıldı. Aspiratör negatif hava basıncı 600 mbar olacak şekilde ayarlanarak çalıştırıldı ve pürifikasyon tablası cihaza yerleştirildi (Şekil3.5). Plağın kurumaması önemlidir bunun için 5-10 dk beklendi. Sıvı bitmeden veya bitimine yakın mutlaka kontrol edildi ve üzerine dH₂O eklendi. Aksi taktirde amplikonlar da porlardan geçecektir veya porlara yapışınca çıkarılamayacaktır. Göz kararı yaklaşık 5 μl sıvı kaldığı düşünüldüğünde aspiratör kapatıldı, üzerine tekrar 50 μl dH₂O eklenerek işlem yeniden uygulandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada 45 μl Recovery buffer eklenerek yatay çalkalayıcıya yerleştirildi, 10 - 15 dk çalkalandı.



Şekil 3.5. Pürifikasyon plate ve aspirator

Amplikonların miliporlardan çözünerek Recovery buffera karışması sağlandı. Amplikonlar iyice pipetaj yapılarak pürifikasyon plate'lerden alındı ve her hasta için hazırlanmış eppendorf tüpüne kondu.

3.2.2.9 Pürifikasyon sonrası PZR ürünlerinin Nanodrop Spektrofotometre ile Konsantrasyonunun ölçümü

Pürifiye edilen ürünler 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu. 1 OD'nin 50 ng/μl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerinden, ürünlerinin konsantrasyonu hesaplandı. 90μg ulaşılmayacak düşük konsantrasyonlarda ek PZR ve pürifikasyon işlemleri yapıldı.

3.2.2.10 Fragmantasyon

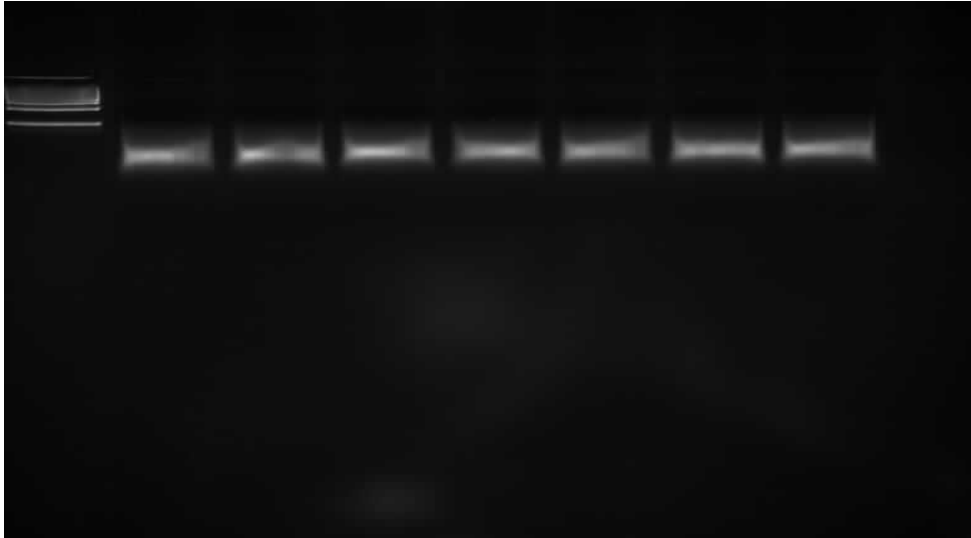
Fragmantasyon prosedürü

Pürifikasyon sonrası ampikon kaybının var olup olmadığını anlamak için fragmentasyon işlemi için tekrar bir hesaplama yapıldı. Pürifikasyon tablasından toplanan miktar (μl) ile konsantrasyon miktarı ($\text{ng}/\mu\text{l}$) çarpıldığında toplanan miktardaki μg cinsinden PZR ürünü hesaplandı. PZR ürünlerinin toplanan μl deki μg miktarı gözönünde bulundurularak, PZR ürünlerinin fragmentasyon reaksiyonu için gerekli 90 μg olması için ürünlerden kaç μl alınması gerektiği hesaplandı. Fragmentasyon reaksiyonu için toplam PZR ürün hacmi 45 μl kullanılacağı için 45 μl olmayan hacimler recovery buffer ile 45 μl ' ye tamamlandı.

Fragmantasyon işlemi için toplam hacim 55 μg olacak şekilde 45 μl PZR ürünü üzerine 5 μl 10X reaksiyon buffer ve 5 μl dilue fragmentation reagent eklendi. Reaksiyon karışımı vortekslenerek 2000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. PZR programı ise 37°C'de 35 dakika, 95°C'de 15 dakika, 4°C'de hold şeklinde uygulandı, ürünler thermal cycler cihazına yüklenerek inkübe edildi.

3.2.2.11 Fragmantasyon ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Fragmente PZR ürünleri % 4 lik agaroz jelde 120 voltta 30 dakika- 1 saat koşturularak (Şekil3.6) kontrol edildi. 180 bp'den küçük ürünlerin görülmesi beklendi.



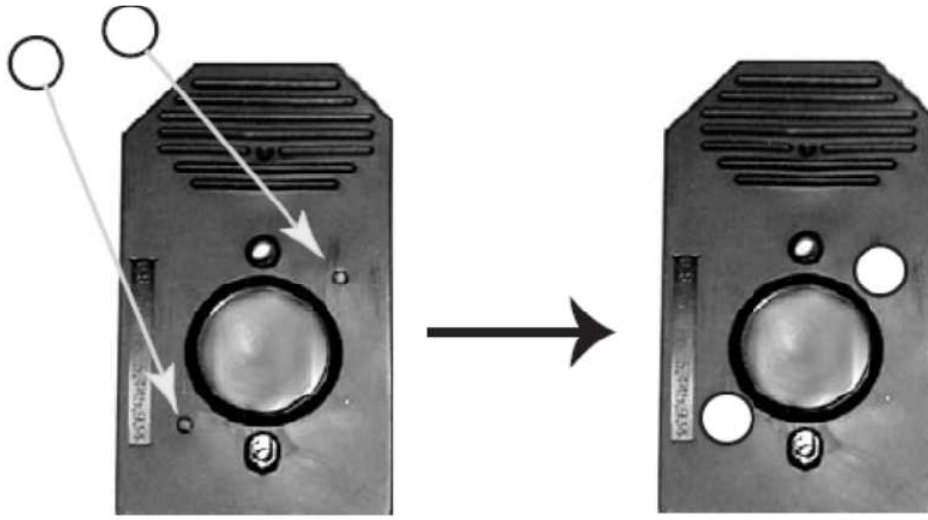
Şekil 3.6. Fragmente PZR ürünlerinin %4 lik agaroz jelde görüntülenmesi.

1:100 bp lik marker **2:**1. hastanın fragmente PZR ürünleri; **3:** 2. hastanın fragmente PZR ürünleri; **4:** 3. hastanın fragmente PZR ürünleri; **5:** 4. hastanın fragmente PZR ürünleri, **6:** 5. hastanın fragmente PZR ürünleri; **7:** 6. hastanın fragmente PZR ürünleri; **8:**7. hastanın fragmane PZR ürünleri

3.2.2.12 İşaretleme

Fragmente örnekler bu aşamada standart adaptörlerle işaretlendi. İşaretleme reaksiyonunda için toplam hacim 70 μ l olacak şekilde 50,5 μ l fragmente DNA ya 14 μ l 5X TdT Buffer, 2 μ l 30 mM DNA labeling reagent, 3,5 μ l 30U μ l TdT eklendi. Reaksiyon karışımı vortekslenerek 2000 rpmde 1 dakika santrifüj edildi. PZR programı ise 37°C'de 4 saat, 95°C'de 15 dakika, 4°C'de hold şeklinde uygulandı, ürünler thermal cycler cihazına yüklenerek işaretleme yapıldı.

3.2.2.13 Hibridizasyon



Şekil 3.7.Array yükleme delikleri ve etiketle kapatılması

Bu aşamada örnekler array çipe yüklenilmek üzere hazırlandı. 70.4 g MES hidrat, 193.3 g MES sodium salt, 800 mL, nükleaz içermeyen disitile su kullanılarak 1000 mL 12X MES stok solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonun 6.5 ila 6.7. pH'ya sahip olması beklenildi. Hazırlanan solüsyon kullanılıncaya kadar 4°C'de bekletildi. Bu sırada hibridizasyon fırını 50°C ve 60 rpm dönüş hızına ayarlandı ve önceden ısınması için çalıştırıldı. 12 μ l MES (12X; 1.25 M), 13 μ l Denhardt's solüsyonu (50X), 3 μ l EDTA (0.5 M), 3 μ l HSDNA (10 mg/mL), 2 μ l OCR, 0100, 3 μ l Human Cot-1 DNA® (1 mg/mL), 1 μ l Tween-20 (3%), 13 μ l DMSO (100%), 140 μ l TMACL (5 M) karışım miktarları kullanılarak örnek başına 190 μ l hibridizasyon master miksi hazırlandı, vorteks cihazı ile 3 saniye karıştırıldı ve 73 μ l işaretlenmiş örneğin üzerine eklendi. PZR cihazına yüklenildi. 95 °C'de 10 dakika ve 49 °C'de bekleme ayarlanmış program çalıştırıldı. Böylelikle örnekler denatüre edildi. Örnekler bu aşamada çipe yüklenmeye hazır hale getirildi. Yükleme öncesi arraylar hazırlandı. Yükleme delikleri 200 μ l pipet

ucu ile delinmiş ve yukarıda kalan tarafı arrayin içindeki havanın çıkmasını sağlamak için pipet ucuyla açık bırakıldı. Daha sonra zaman kaybetmeden 200 µl örnek 49 °C'den alınarak diğer yükleme deliğinden arraye enjekte edildi. Bu aşamadan sonra array delikleri yapışkan etiket ile hızlıca kapatıldı (Şekil 3.7). Örnekler bekletilmeden hibridizasyon fırınına konuldu. Örnekler hibridizasyon fırınında 16-18 saat 50 °C'de bekletildi.

3.2.2.14. Yıkama ve Tarama

Bu aşamada GeneChip® Fluidics Station 450 cihazı kullanılarak arrayler yıkanır ve boyanır (Şekil 3.8). Bu aşama tarama öncesi son aşamadır. Wash A ve Wash B solüsyonları yerlerine yerleştirildi. Bu aşama yıkama istasyonunu her çalıştırma öncesi yapılması gereken ön yıkama işlemini başlattı. 16-18 saat hibridizasyon fırınında kalan arrayler fırından çıkartılmış ve içlerindeki hibridizasyon karışımı 200 µl pipet ile alınıp 1500 µl eppendorf örnek tüpüne konuldu ve -80°C'de saklanmıştır. Arraylerin içi daha sonra 270 µl Array holding buffer ile dolduruldu. Arrayler yıkama öncesi oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Bu sırada boyama için kullanılacak solüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan SAPE (Streptavidin Phycoerythrin) Stain solüsyonundan toplam 600 µl olarak alınıp 1500 µl eppendorf örnek tüpünde hazırlandı ve ışığa hassas olan bu karışım folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Bu tüp yıkama istasyonunda 1 numaralı yerine yerleştirildi. Antibody Stain Solution ve Array Holding Buffer aynı şartlarda yıkama istasyonunda 2 ve 3 numaralı yerlerine yerleştirildi. Daha sonra arrayler yıkama istasyonuna yerleştirildi ve önceden yüklenmiş GenomeWideSNP6_450 programı kullanılarak yıkama ve boyama işlemleri yapıldı. Tarama işlemi hemen yapılmayacaksa örnekler 4°C'de bekletildi.



Şekil 3.8. GeneChip® Fluidics Station 450

Tarama istasyonu çalıştırdı ve kullanmadan önce 10 dakika otomatik test sürecinin tamamlanması beklenildi. Yazılımda kullanılacak deney parametreleri tanımlanmış ve örnek taranmak için cihaza yerleştirildi. Cihaz netlik ayarını ve tarama işlemini otomatik olarak gerçekleştirmekte ve sonucu dat uzantılı bir dosya olarak kaydetmektedir.

3.2.2.15 Veri Analizi

Analiz için Affymetrix firması tarafından sağlanan GeneChip® Operating Software (GCOS) ve Affymetrix Genotyping Console™ 4.0 yazılımları kullanıldı. Yazılımlar Microsoft Windows Vista işletim sisteminde kullanıldı. Yine analiz için gerekli kütüphaneler: Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 library files (GenomeWideSNP_6), Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 SNP Annotation files from NetAffx firmanın web sayfasından yararlanıldı. Taranan örnekler GCOS yazılımı ile girdileme işlemi uygulandı ve CEL dosyaları oluşturuldu. CEL dosyaları taranmış array görüntüsünün duyarlılık verilerine dönüştürüldü. Bu aşamada yazılım tarafından array başarısını değerlendirmek üzere “contast QC” değerleri hesaplanmış ve contast QC değeri 0,4 ve üzerinde olan okumalar çalışmaya alınmıştır. Daha sonra örnekler GeneChip®Data Transfer Tool (DTT) yazılımı ile operatör bilgisayardan taşınıp analiz bilgisayarına yüklenmiştir. Örnek dosyaları daha sonra Affymetrix Genotyping Console™ 4.0 yazılımına transfer edildi ve bu yazılımla üretici tarafından önerilen “Canary” algoritmi ile CNV analizi gerçekleştirildi. Genotiplendirme için ise “Birdseed” algoritması kullanıldı. Referans olarak üretici tarafından sağlanan GenomeWideSNP_6.hapmap270.na29.r1.a5” dosyası kullanıldı. Yine algoritma tarafından hesaplanan MAPD kontrol değeri 0.35 ve altında olanlar analize alınmıştır. Ayrıca “Segment Reporting Tool” kullanılmış ve en az 5 marker içeren en az 100 kbp bölgelerin işaretlenmesi sağlandı. Örnekler GTC Browser yazılımı kullanılarak incelendi.

3.2.3. Homozigotluk Haritalaması

Otozomal resesif kalıtım modeline uyan bir genetik hastalığı olan ailelerde, etmen genin saptanması için, her iki allelin de hastalığa yol açan mutasyonu taşıdığı varsayımından yola çıkılarak, ilk aşamada seçilen aday gene informatif bir bağlantının kurulması ve ardından bu gende mutasyon analizinin yapılması yöntemleri izlenir. Özellikle akraba evliliklerinde ortak ata nedeniyle gen içi ve yakın çevresinde rekombinasyon olasılığı

düşük olduğundan polimorik markör analizlerinde homozigotluk (bağlantı eşitsizliği) gösterilebilmektedir. Homozigot bölgelerin belirlenmesi bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili gen/lerin araştırılmasına yardımcı olur. Bu incelemeye “homozigotluk haritalaması” adı verilir. Bu teknik, akraba evliliği yapmış ailelerde daha informatif olmakla birlikte, genomun başka bölgelerinin de homozigot olabilmesi güçlükler yaratabilmektedir. Teorik olarak, birinci dereceden kuzen evlilikleri sonucunda dünyaya gelen çocukların genomlarının 1/16’sı homozigot olacaktır. Hastalık geninin içinde bulunduğu bölge için sağlıklı kardeşlerin farklı (heterozigot) ve hasta kardeşlerin ise aynı (homozigot) olması beklenmektedir.

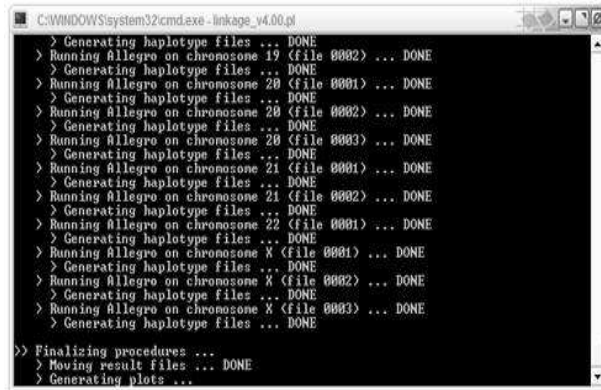
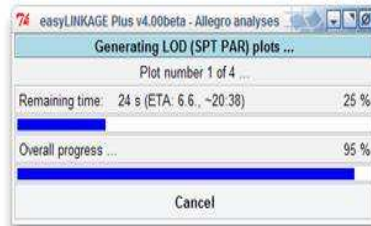
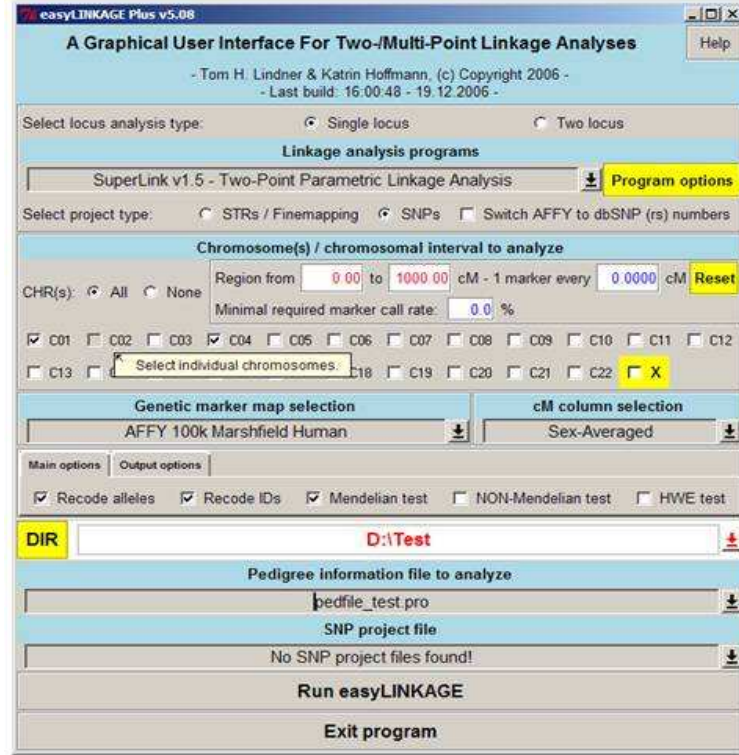
Homozigotluk haritalaması, otozomal resesif hastalıkların haritalanmasındaki istatistiksel analizin gücünü arttırmakta ve küçük ailelerde bile yüksek LOD skor değerlerinin elde edilmesini olası kılmaktadır (60,61).

Homozigotluk haritalanmasında, “DNA havuzlama” tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemde; otozomal resesif bir hastalığın görüldüğü akraba evliliği yapmış ailelerdeki etkilenmiş çocukların esit konsantrasyondaki DNA’ları bir araya toplanmakta, genom-boyu taramada kullanılan SNP markörleri ile çoğaltılmakta ve genotiplenmektedir. Bu yöntemin temelinde, etkilenmiş çocukların hepsinin hastalıkla ilişkili markör/markörler için homozigot olacağı düşüncesi yatmaktadır. Bu teknik sayesinde otozomal resesif hastalıkların genom-boyu bağlantı analizinde gereken PZR amplifikasyonlarının ve kullanılan jel kuyucuklarının sayısı azaltılmış ve böylece genom-boyu bağlantı analizinin daha az maliyet ile daha kısa sürede yapılabilmesi sağlanmıştır. Ayrıca her birey için genotiplemeye gerek olmadığından genotipleme sadece havuzlanmış örneklerde yapılmaktadır (60-64).

Bu anlamda çalışmamızda anne baba akraba olduğu için aradığımız mutasyonun homozigot olduğunu farzederek, ortak bir atadaki heterozigot mutasyonu homozigot bölgeler içinde araştırıldı. Bu bölgelere "identity by descent" denir. Affymetrix Array sonuçları üzerinde oluşturulan Dr. Mustafa Tekin tarafından oluşturulan makrolu bir program arayıcılığıyla homozigot bloklar belirlendi. Bu homozigot bloklar 250K Affymetrix Array verileri üzerinde işaretlendi. İşaretlenen homozigot blokların aile bireyleri üzerindeki segresyonuna gözle yapılan bir taramayla bakıldı. Bu verilerle LOD skor analizi için gerekli dosyalar hazırlandı.

3.2.4. LOD Skor Analizi

Aranılan genin test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının, olmama olasılığına oranını (LOD skor değeri) hesaplayabilmek amacı ile *easyLINKAGE plus v5.08* programının iki ve çok noktalı LOD skor analizinden yararlandı (65,66) (Şekil 3.9).

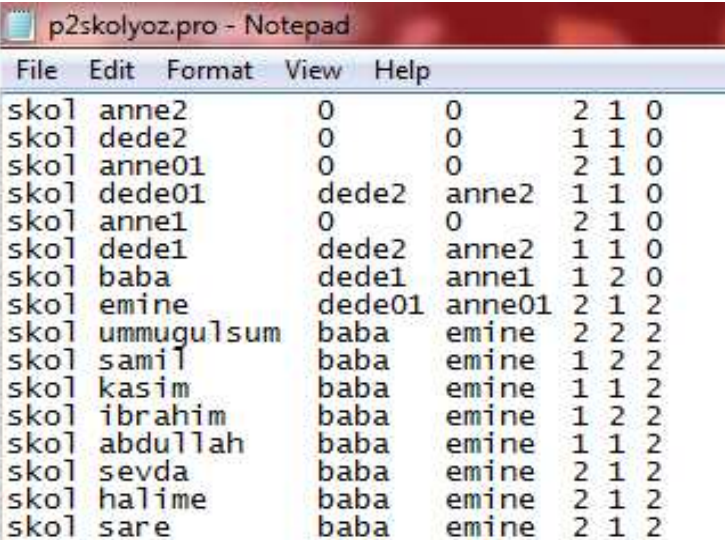


Şekil 3.9. esayLINKAGE v5.08 programının görüntüleri

Bu programla hastalığın her bir genetik belirleyiciye karşı LOD skor değerlerinin hesaplanabilmesi için öncelikli olarak aileye ait aile ağacı dosyası (*pedfile*) ve homozigot haritalaması verilerine göre data dosyası (*datafile*) aşağıda belirtilen kurallara göre oluşturuldu. Aile ağacı dosyası oluşturulurken, 1. sütunda bireyleri tanıttıcı rakamlar (*id=identification*), 2. sütunda bireylerin babalarını tanıttıcı rakamlar, 3. Sütunda bireylerin annelerini tanıttıcı rakamlar, 4. sütunda bireylerin eşey durumlarını belirten rakamlar (1: Erkekler, 2: Dişiler, 0: Cinsiyet bilinmediği durumlarda kullanılır), 5. sütunda bireylerin hastalıktan etkilenip etkilenmediğini belirten rakamlar (0: Hastalıktan etkilenip etkilenmediği bilinmiyor, 1: Sağlıklı, 2: Hasta), geriye kalan sütunda ise çalışmada kullanılan DNA örneklerine ulaşıp ulaşılmadığının bilgisi (0: DNA yok, 1: DNA ya ulaşılmış) oluşturuldu. Bu olusturulan excel dosyası isminin “ p” ile başlayıp “pro” ile biten dosya olarak tekrar kaydedildi.(Tablo3.1) .

Data dosyası için 1. sütunda homozigotluk haritalamasından elde edilen SNP ID ler, diğer sütunlarada tek tek aile bireylerinin yine homozigotluk haritalamasından elde edilen genotipleri yazılır(A veya B yada allel yoksa 00).Bu excel dosyası “snp” uzantılı olarak tekrar kaydedildi.(Tablo3.2).

Tablo3.1.: PEDFILE dosyası



ID	Father	Mother	Sex	Affected
sk01	anne2		0	0
sk01	dede2		0	0
sk01	anne01		0	0
sk01	dede01	dede2	anne2	1 1 0
sk01	anne1		0	0
sk01	dede1	dede2	anne2	1 1 0
sk01	baba	dede1	anne1	1 2 0
sk01	emine	dede01	anne01	2 1 2
sk01	ummugulsum	baba	emine	2 2 2
sk01	sami1	baba	emine	1 2 2
sk01	kasim	baba	emine	1 1 2
sk01	ibrahim	baba	emine	1 2 2
sk01	abdullah	baba	emine	1 1 2
sk01	sevda	baba	emine	2 1 2
sk01	halime	baba	emine	2 1 2
sk01	sare	baba	emine	2 1 2

Tablo3.2. DATAFILE dosyası

SNP_ID	emine	halime	ummugulsum	samil	kasim	ibrahim	abdullah	sevda	halime	sare
SNP_A-4234551	AB	AB	BB	BB	AB	BB	AB	AB	AB	AB
SNP_A-2233141	AB	AB	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1943144	AB	AB	BB	BB	AB	BB	AB	AB	AB	AB
SNP_A-4238217	AB	AB	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AB	AB
SNP_A-1933840	AB	AB	BB	BB	AB	BB	AB	AB	AB	AB

LOD skor değerleri *easyLINKAGE plus v5.08* ile hesaplanırken aile ağacı ve data dosyası dışında programa veri girişleri yapıldı. Programın program options bölümünde öncelikle hastalığın ailedeki kalıtım modeli otozomal resesif olarak işaretlendi. Alel frekansı algoritması Affymetrix reference-Caucasian yada Codominant olarak işaretlendi.. Ayrıca, hastalığa ait mutant gen frekansı 0.001 olarak kabul edildi (Şekil 3.10).

SuperLink Options - easyLINKAGE Plus v5.02

Please adjust the following fields according to your needs
(default values model a dominant trait)

Inheritance model

☐ Dominant ☒ Recessive ☐ >1 liability class LC file: NONE

Allele frequency algorithm: AFFYMETRIX Reference - Caucasian

Frequency of the disease: 0.0010
I.e. 0.001 means that the population prevalence is 0.1%..

Recombination increment step: 0.05

Recombination finishing value: 0.45

Autosomal genotypes	wt/wt	wt/mt	mt/mt
Penetrance vectors	0.0000	0.0000	1.0000

X chromosomal genotypes	wt/wt	wt/mt	mt/mt
Penetrance vector female	0.0000	0.0000	0.9900
Penetrance vector male	0.0000	0.9900	

Advanced output handling of LOD plots

☒ Only "TOTALS" plot ☐ Plots for all families ☐ LOGging

Note: All fields are required for the analysis.
Missing fields result in program termination.

Reset to predefined (INI) options Ok Exit

Şekil 3.10. SuperLink Options bölümü

Programda lokus analiz tipi seçimi *single lokus* olarak seçilirken, linkaj analiz programı bölümüne hem iki noktalı hesaplamalarımız için *SuperLinkv1.5-Two Point Parametric Linkage Analysis*, çok noktalı hesaplamalarımız için *GeneHunter-Multi Point Linkage*

Analysis parametreleri işaretlendi. Proje tipi *SNP chip project* olarak seçildi. Programın taranacak kromozom ve kromozom aralıkları bölümünde taranacak kromozom ve aralığı işaretlendi. Genetik marker map bölümünde cinsiyet kısmı işaretlendi. İki nokta analizi için bu bölümde AFFY10k Marshfield, AFFY100k Marshfield, AFFY500k Marshfield, çok noktalı analiz için AFFY10k Marshfield her bir ayrı hesaplama için işaretlendi. Additional options bölümü için gerekli işaretlemeler (Recode alleles ve Recode ID) yapıldıktan sonra programa oluşturulan PEDFILE ve DATAFILE dosyaları yüklenerek program çalıştırıldı.

3.2.5. Aday Genlerin Belirlenmesi

EasyLINKAGE programından çıkan en yüksek LOD skor değerinin saptandığı marker aralığındaki göre tüm genler, elektronik ortamda veri bankaları (*NCBI-Map Viewer*, *Ensembl*) kullanılarak tespit edildi. Aday genleri belirleyeceğimiz kromozom aralığında bulunan genlerin aday gen nitelikleri aşağıdaki veri bankaları aracılığı ile araştırıldı.

NCBI-OMIM, genlerin herhangi bir hastalıkla ilişkili olup olmadığını belirlemede, *NCBI-Map Viewer*, *Ensembl*, *Human Genome Browser* ve *NCBI-Gene*, genlerin kromozom yerleşimlerini belirlemede, *NCBI-Gene*, *Ensembl*, *Bioinformatic Harvester*, genlerin ifade edildikleri dokular ve ifade edilme düzeylerini tespit etmede, *NCBI-Protein*, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *NCBI-Conserved Domain*, *Pfam*, gen ürünlerinin yapı ve işlev bilgisini tespit etmede, yolak bilgisi için *KEGG* veri bankası kullanıldı ve sendromla ilişkili olabilecek aday genler bulundu.

3.2.6. Primer Dizaynı

Belirlenen aday genlerden sendromla en yakın ilişkisi olabilecek *LTBP2* geni seçildi ve *LTBP2* geninin 2-17 aralığındaki ekzonlara özgü forward ve reverse primerler dizayn edildi. Primerler tasarlanırken, seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP üzerine gelmemesine, tekrarlayan diziler üzerinde bulunmamasına, ileri geri oligonükleotidlerin bağlanma ısılarının birbirleri ile aynı ya da en fazla $\pm 2^{\circ}\text{C}$ farklı olmasına, içerdigi AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-22 nükleotid içermesine ve gen bölgesi için özgün olmasına özen gösterildi (67). Özgünlük, USCS Genome Browser'dan "in silico PCR" interaktif sistemi ile test edildi. IndelSNP markörleri için gerekli forward ve reverse primerler markör alanını kapsayacak ve yaklaşık 150-500 baz çiftlik bir bant bölgesini çoğaltacak biçimde tasarlandı. Aşağıda *LTBP2* geninin dizi analizi için tasarlanmış 16 ekzon ait forward ve reverse primer dizileri verilmiştir:

Ekzon 2

F Primer 5'-TAGATTTGCAAGTAGAATAG-3'

R Primer 5'-GTTGCCTCCACTTTAAATA-3'

Ekzon 3

F Primer 5'-CTCATATCTCTGGCCATGC-3'

R Primer 5'-TTCTGACAGGAAGGTGTG-3'

Ekzon 4

F Primer 5'-AGGAGTGGCACAGACACA-3'

R Primer 5'-ACAAGGTGACAACTCAGC-3'

Ekzon 5

F Primer 5'-GGAACCATCTGAGCAGGA-3'

R Primer 5'-CCTTGAGATGAATGCAGC-3'

Ekzon 6

F Primer 5'-CACTCTTCTTCACTCTACAT-3'

R Primer 5'-GATCATAAAGGAAGGACTAC-3'

Ekzon 7

F Primer 5'-ACACATAGCCAGTGGCCT-3'

R Primer 5'-ACAAGTCCATCCTGGAA-3'

Ekzon 8

F Primer 5'-GAGTGAGCTCTGTGTCCTA-3'

R Primer 5'-TACCAGCCTGTTCTACCT-3'

Ekzon 9

F Primer 5'-GAGAGGAGTCTGGTGAGAAC-3'

R Primer 5'-AGTCCCTGGATTTCCTTAGT-3'

Ekzon 10

F Primer 5'-GAATCCCACTGAATACATAG-3'

R Primer 5'-GAAGTGTCCTCTTGTCTC-3'

Ekzon 11

F Primer 5'-CTAAAGTTCTTGTGAGCATT-3'

R Primer 5'-CTACTTCAGTCTTCCAGATT-3'

Ekzon 12

F Primer 5'-GGAAGACTGAAGTAGCCT-3'

R Primer 5'-ACTTCTCTGAGGTGCTGG-3'

Ekzon13-14

F Primer 5'-GAGCTCACGCTGTTACCTT-3'

R Primer 5'-GAACCAGCTCACACATAG-3'

Ekzon 15

F Primer 5'-CTCTCAGATTCTCTAAGTGG-3'

R Primer 5'-GGGACTTTACCTAGTTGGA-3'

Ekzon 16

F Primer 5'-AGTTCTGGTCTCTCCTCCT-3'

R Primer 5'-GACTCTCAACTCGGCCT-3'

Ekzon 17

F Primer 5'-CTTCCAGCCTTAGAGATT-3'

R Primer 5'-AGTTCTGGTCTCTCCTCCT-3'

3.2.7. DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi

LTBP2 geninin 16 ekzonunun sekanslanması CEQTM 8000CE Genetik Analiz Sistem (BeckmanCoulter) otomatik kapiller DNA dizileyicisinde Ankara Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3.7.1 Dizi analizi için DNA örneklerinin PZR ile çoğaltılması

LTBP2 geninin 2-17 aralığındaki ekzonunlarını sekanslamak amacıyla genin bu ekzonlardaki dizayn edilen primerlerle belli kısımları PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Her bir örnek DNA'sına PZR reaksiyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla, 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 50 µl'lik PZR karışımı içerisinde bir hasta için; 10 x PZR Tamponu'ndan 5 µl, Primer 1 (sense) 10 pM'lükden 3 µl, Primer 2 (antisense) 10 pM'lükden 3 µl, MgCl₂ (25 mM'lık) 3 µl, dNTP (2,5 mM'lık) 3 µl, DNA örneği 3 µl, Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 0,5 µl, DMSO 5 µl konuldu ve toplam volüm distile su ile 50 µl' ye tamamladı. PZR programı ise ön denatürasyon 94°C'de 5 dakika, denatürasyon, 94°C'de 30 saniye, hibridizasyon 53°C'de 50 saniye ve sentez, 72°C'de 1 dakika, son üç siklusun 34 kere tekrarı ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde optimize edildi, ürünler thermal cycler cihazına yüklendi.

3.3.7.2 PZR sonrası agaroz jel elektroforezi

PZR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediği ürünlerin jelde koşturulması suretiyle kontrol edildi. Jeli hazırlamak için, 2 gr Agaroz, TBE tamponu ile 100 ml' ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 °C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 4,5 µl Etidyum Bromid eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TAE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna ürünün bant boyutunu karşılaştırmak amacıyla DNA boyut markırı yüklendi. PZR ürününden 0,5'lik Ependof tüpe 13 µl alındı ve üzerine 2 µl loading buffer eklendi . Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla herbir PZR ürünü kuyucuğa yüklendi. Ürünler 30 dakika yürütüldü. Daha sonra jel, transilüminatörde değerlendirildi.

3.3.7.3 PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Bu protokol; tek veya çift iplik DNA fragmentini PZR'dan ve diğer enzimatik reaksiyonlardan saflaştırmak amacıyla uygulanacaktır. PZR ürünlerinin saflaştırılması, pürifikasyon kiti kullanılarak yapıldı.

Bu işlemde yapılan basamaklar aşağıda sıralanmıştır; PZR ürünü (20-50 µl) 1.5 ml'lik ependorf tüpe konuldu ve üzerine 500µl Binding tamponu eklendi. El ile karıştırıldı. Oda ısısında 1 dakika bu tampon içerisinde beklenildi. Bu bekleme süresi içerisinde 2 ml'lik toplama tüpüne spin kolonu yerleştirildi. Örnek toplama tüpüne alınan spin kolona konuldu ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Spin kolona 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Toplama tüpü ile beraber içindeki spin kolon 13.000 rpm'de 1 dakika üzerine herhangi bir solüsyon eklenmeden santrifüj edildi.

Spin kolon steril ve temiz yeni bir santrifüj tüpüne konuldu. 50 µl Elution tamponu (10 mM Tris Cl, pH 8.5) veya distile su spin kolon üzerine konuldu ve 1 dakika beklenildi. Ardından 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj tüpüne geçen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80 V 'da 20 dakika yürütülerek kontrol edildi.

3.3.7.4 DNA dizi analizi için PZR

DNA dizi reaksiyonunun hazırlanması

Bu basamakta amaç, çoğaltılan DNA bölgelerindeki her bir bazı etiketlemektir. 20 µl dizi reaksiyonu 0.2 ml ince duvarlı tüplerde veya mikropate kuyucuklarda hazırlandı. Dizi reaksiyonu için gerekli aşağıda listesi verilmiş reaktanlar eklenirken buz üzerinde çalışıldı.

Premiksin Hazırlanması:

Bir ependorf tüp içerisine, 10x Dizi Reaksiyon Tamponundan 200 µl, 100 µl dNTP Mix, 200 µl ddUTP Dye Terminator, 200 µl ddGTP Dye Terminator, 200 µl ddCTP Dye Terminator, 200 µl ddATP Dye Terminator ve 100 µl Polimeraz enzimi eklenir. Daha sonra hasta başına bu premiksdan 12 µl, DNA template 0.5-4.0 µl, pUC18 kontrol template 0.5 µl, primer (1.6 pmol/µl ya da 1.6 µM) 2.0 µl alınır ve total volüm 20 µl olacak şekilde distile su eklenir. Daha sonra 30 döngü, 96°C'de 20 saniye, 56°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dakika sekans PZR'ı yapılmak üzere ürünler thermal cycler cihazına yüklenir.

3.3.7.5 Etanol Presipitasyonu

Her örnek için steril 0.5 ml'lik santrifüj tüpü hazırlandı. Taze stop solüsyonu/Glikojen karışımı şu şekilde hazırlandı: 2 µl 3 M Sodyum Asetat (pH 5.2), 2 µl 100 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 1 µl 20 mg/ml glikojen.-Her tüpe 5 µl Stop solüsyonu/Glikojen karışımından konuldu. Sekans reaksiyon karışımı da eklenerek elle alt-üst edilmek suretiyle karıştırıldı. 60 µl -20°C'de bekletilmiş soğuk %95'lik (v/v) etanol eklendi ve karıştırıldı. Ardında hemen 14000 rpm'de 4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde supernatant alındı ve atıldı. Pellet iki kez 200 µl -20°C'de bekletilmiş soğuk %70'lik etanolle yıkandı ve her yıkama sonrası 14000 rpm'de 4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde en az 2 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde supernatant mikropipetle alındı ve atıldı. Pellet kuruyuncaya kadar beklenildi.

Kuruyan pellet 40 µl örnek yükleme solüsyonu içerisinde resüspanse edildi.

3.3.7.6 Sekansa yüklemek için örnek hazırlanması

Sekans için önerilmiş olan polipropilen örnek plate'nin uygun kuyucuklarına resüspanse edilmiş örnekler transfer edildi. Mineral yağın bir damlası ile resüspanse edilmiş örneklerin herbirinin üzeri kapatıldı. Sekans içerisindeki plate örnekleri ve kapiller cihaza yüklendi ve istenilen metotla sekansa başlandı.

3.3.7.7. DNA Dizi Sonuçların Analiz edilmesi

Sonuçlar LTBP2 geninin toplam 16 ekzonunun dizileme sonuçları Chromas 2.32 (www.technelysium.com.au/chromas.html) ve NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programları kullanılarak 5'-3' ve 3'-5' referans dizileriyle karşılaştırılarak bilgisayar ortamında analiz edildi.

4.BULGULAR

4.1 Affymetrix Array Verileri

Dokuz bireye ait yapılan Affymetrix Array -dinamik model mapping analiz sonuçlarının ancak bir kısmı aşağıdaki tabloda (Tablo 4.1) gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Affymetrix Array Dinamik model Analiz Sonuçları

[illegible]

4.2. Homozigotluk Haritalaması Verileri

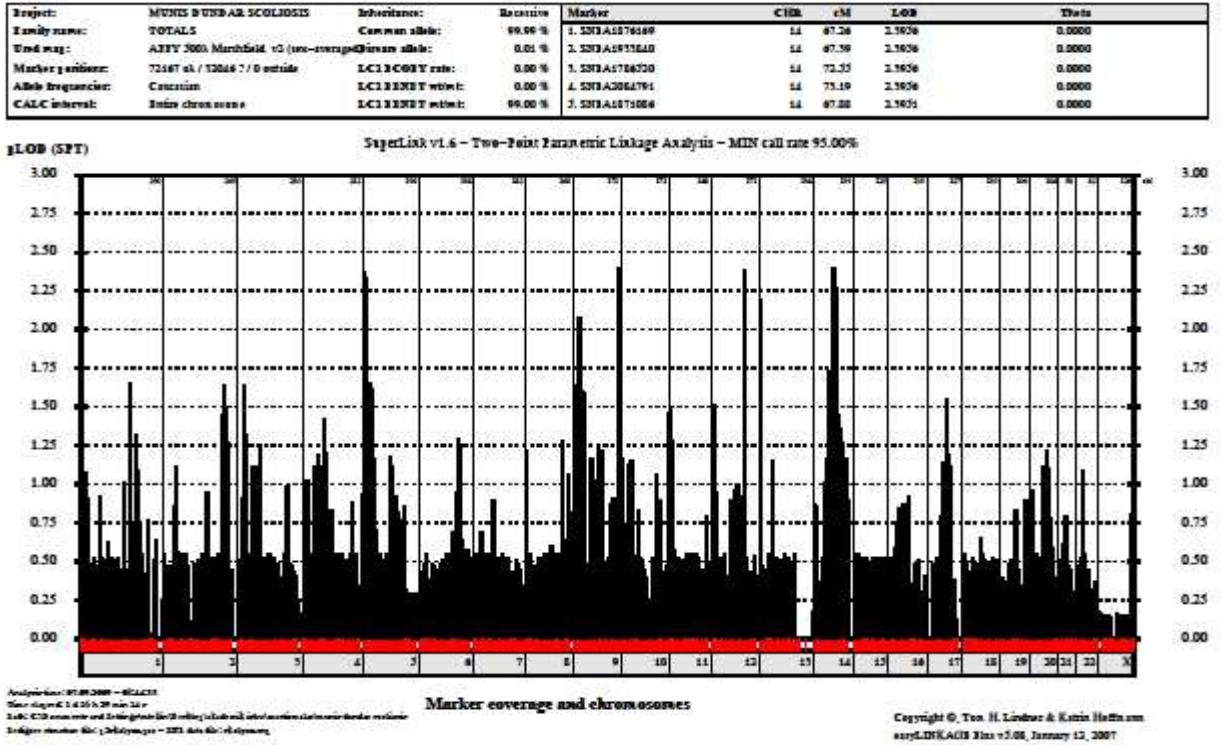
Affymetrix array verileri üzerinde tasarlanan makrolu program aracılığı ile blok boyutu, sonlanımı ve kromozom yerleşimi belli hasta kişilere ait homozigot bloklar belirlendi (Tablo 4.2). Boyut büyüklüğü en fazla olan bloklarda sendromdan sorumlu gen bulunacağından ilk beş blok değerlendirmeye alındı. Yani iki etkilenmiş ve 3 etkilenmemiş kardeşte 2MB üzerinde segrege olan 5 bölge saptandı. Bu ilk analize 3 kardeş dahil edilmedi. Bu bloklardan en büyüğü 5. kromozomda 29962835 bp (rs2914130) ile 16760837 bp (rs17501392) arasındaydı. Vaka 3 ve kız kardeşlerden biri (Se. B) hasta kabul edilip diğer kız kardeş (Sa.B) normal kabul edilince bu aralık daraldı. Eğer sadece Vaka 3 hasta kabul edilince bu aralık ortadan kalktı. İki. büyük blok 14.kromozom 67817621 bp (rs7148416) ve 82508151bp (rs17117757) aralıkları arasındaydı. Bir tane daha kardeş göz bulguları nedeniyle etkilenmiş kabul edilip (Vaka3) diğer iki kardeş etkilenmemiş kabul edilince (Se.B ve Sa. B) bu aralık 14. kromozomda 67817621 bp (rs7148416) ile 75657598 bp (rs11626830) arasına indi. Beşinci kromozomdaki bölge ise fenotiple birlikte segrege olmadığı kabul edildiğinden LOD skor analizlerine 14. Kromozom üzerinden devam edildi.

Tablo 4.2. Sendromdan sorumlu olabilecek homozigot bloklar

block size	block ends	chr.						
171	81943	5						
167	82237	5						
156	211654	14	SNP_A-1912069	14	74789526	SNP_A-2187350	14	72312223
120	605	1						
114	81771	5						
106	211323	14	SNP_A-4223404	14	70540593	SNP_A-1914043	14	69462045
99	143439	9						
95	105128	6						
95	211176	14	SNP_A-4225163	14	68751471	SNP_A-2214389	14	67817621
92	82069	5						
92	85466	5						
91	211415	14	SNP_A-2230635	14	71564561	SNP_A-4223404	14	70540593

4.3. LOD Skor Analiz Sonuçları

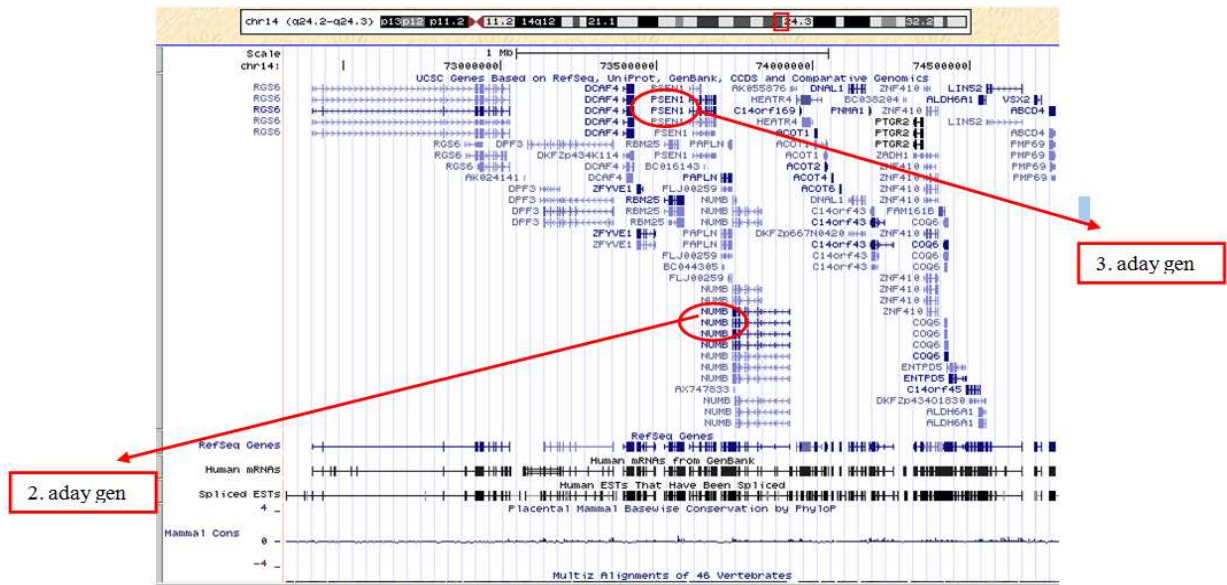
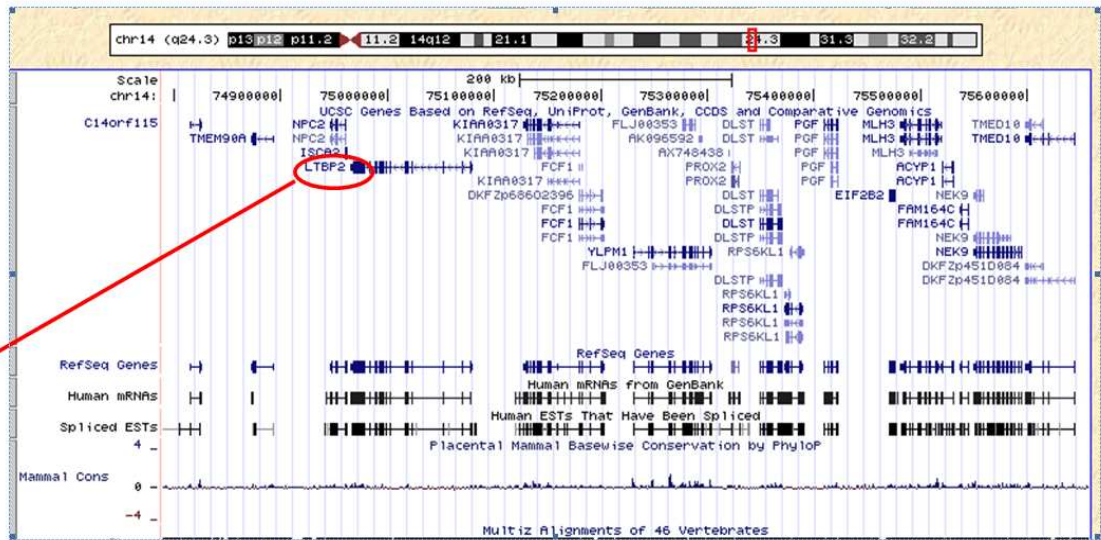
İki-noktalı LOD skor analizine göre, 14. Kromozomdaki bölge için en yüksek LOD skoru 2.3956 elde edildi (Şekil 4.1). LOD Skor değeri her ne kadar 3 ün altında olsa bile çalışmaya 14. kromozom üzerindeki genetik belirleyicilerden devam edilmiştir.



Şekil 4.1. Kromozoma yapılmış two- point analizi

4.4. Aday Genlerin Belirlenmesi

Çalışmamızda en yüksek LOD skorun saptandığı 14. Kromozomun 7817621bp (rs7148416) ve 75657598bp (rs11626830) aralığında *NCBI-Map Viewer* ve *Ensembl* veri bankaları ile (Şekil 4.2) toplam 87 gen belirlenmiştir (Tablo 4.3). *NCBI-OMIM* veri bankasıyla saptanan 87 adet geninin Skolyoz, Körlük ve Araknodaktili Sendromuyla ilişkili olup olmadığının belirlenmesinde sağlanmıştır. Sendromumuz marfanoid özellikte olduğundan, öncelikli olarak aday gen saptamada, marfanoid özelliklere ile ilişkili yollar tarandı. Yolak bilgisi için *KEGG* veri tabanından yararlanıldı. Bu anlamda, Marfan sendromunda önemli TGF- β yolağı, skolyoz oluşumunda önemli Notch yolları kullanıldı Yolak bilgisi belirlenmemiş genler, gen ürünü işlevleri açısından araştırıldı. Bu amaçla, *Bioinformatic Harvester*, *Swiss-Prot*, *Pfam* veri bankalarından yararlanıldı. Tüm bilgiler değerlendirildiğinde tanımladığımız kromozom aralığında Tablo 4.3’de görülen genlerden 3’ü otozomal resesif Skolyoz, Körlük ve Araknodaktili Sendromundan sorumlu olabilecek aday genler olarak belirlendi.



Şekil 4.2. Ensembl Genome Browser veri tabanında tarama

Tablo 4.3. Human Genom Browser tarama verileri**chr14:72312224-74789525**

RGS6
 DPF3
 DCAF4 (isoform 2)
 DCAF4 (isoform 3)
 DCAF4 (isoform 4)
 DCAF4 (isoform 5)
 ZFYVE1 (isoform 1)
 ZFYVE1 (isoform 2)
 PSEN1 (isoform 1-463)
 PSEN1(isoform 1-467)
 RBM25
 PAPLN
 NUMB (isoform 4)
 NUMB (isoform 2)
 NUMB (isoform 1)
 HEATR4
 C14orf169
 ACOT1
 ACOT2
 ACOT4
 ACOT6
 DNAL1
 C14orf43 (transcript variant 1)
 C14orf43(transcript variant 2)
 PNMA1
 PTGR2 (transcript variant 1)
 PTGR2 (transcript variant 2)
 PTGR2(transcript variant 3)
 ZNF410
 COQ5
 COQ6
 ENTPD5
 C14orf45
 ALDH6A1
 LIN52
 USX2
 ABCD4 (transcript variant 1)
 ABCD4 (transcript variant 2)
 FAM161B
 WDR21A

chr14:69,462,045-70,540,593

DCAF5
 GALNTL1
 EXD2
 ERH
 SLC3A9
 FLJ44817
 C14orf162
 KIAA0247

SFR55(transcript variant 1)
 SFR55(transcript variant 2)
 SLC10A1
 SMOC1(transcript variant 1)
 SMOC1(transcript variant 2)
 SLC8A3(transcript variant a)
 SLC8A3(transcript variant b)
 SLC8A3(transcript variant c)
 SLC8A3(transcript variant d)
 SLC8A3(transcript variant g)
 SLC8A3(transcript variant f)
 WDR22

chr14:67817621-68751471

ATP66V1D
 EIF2S1
 PLEK2
 C14orf83
 PLEKHH1
 RDH11
 VTI1B
 ARG2
 ZFYVE26
 RDH12
 RAD51L1(isoform 1)
 RAD51L1(isoform 2)
 RAD51L1(isoform 3)
 PIGH

chr14:70540593-71564561

SLC8A3(transcript variant a)
 SLC8A3(transcript variant b)
 SLC8A3(transcript variant c)
 SLC8A3(transcript variant d)
 SLC8A3(transcript variant g)
 SLC8A3(transcript variant f)
 ADAM21P
 COX16
 SYNJ2BP
 ADAM20
 ADAM21
 MED6
 TTC9
 MAP3K9
 PCNX

chr14:62315667-62865982

SYT16
 FLJ43390

chr14:74,789,526-75,657,598

C14orf115
 TMEM90A
 NPC2
 ISCA2
 LTBP2

KIAA0317

FCF1

YLPM1

PROX2

DLST

RPS6KL1

PGF

MLH3(isoform 1)

MLH3(isoform 2)

EIF2B2

ACYP1(isoform a)

ACYP1(isoform b)

FAM164C(isoform a)

FAM164C(isoform b)

TMED10

NEK9

chr14:71,564,561-72,040,112

PCNX

SNORD56B (non- coding RNA)

LOC145474 (non- coding RNA)

SIPA1L1

Bu aday genlerden 74,789,526-75,657,598 aralığında bulunan, *LTBP2* geni LTBP2 ekstrasellüler matriks proteinini kodladığı, fibrinlerle ile çok benzerlik gösteren domain yapısına sahip olduğu, matriks içinde ifade olarak, hücre adezyonunda, mikrofibrillerin yapısına katılmada ve TGF- β aktivitesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu veriler *LTBP2* geninin kuvvetli bir aday gen olarak belirlenmesinde önemli rol oynamıştır (*NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, KEGG*) (68,69).

İkinci aday gen 72,312,224-74,789,525 aralığında bulunan *Numb* genidir. Bu genin aday gen olarak seçilmesindeki sebepler, *NCBI-Gene, NCBI-UniGene, Bioinformatic Harvester, KEGG* veri bankaları ile *Numb* geninin Notch yolağında görevli, nöral gelişimden sorumlu genler arasında bulunduğu saptanmasıdır (70,71).

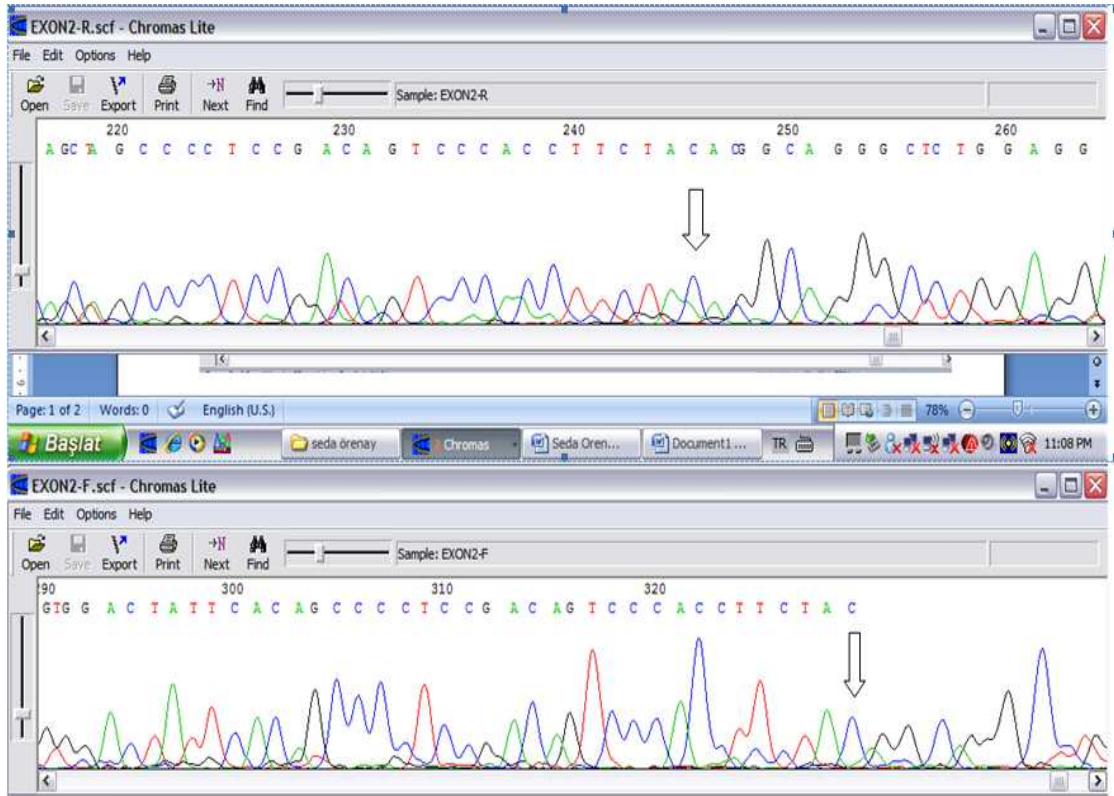
Üçüncü aday gen olarak bulunan *Numb* geni ile aynı aralıkta saptanan (72,312,224-74,789,525) *PSEN1* (*Presenilin 1*) genidir. Notch yolağında görevli ve spinal gelişimden sorumlu olduğu belirlendi. *PSEN1* geninin daha çok Alzheimer hastalığından sorumlu başlıca önemli genlerden biri olduğu da saptandı (72,73). Bu durum *PSEN1* genin aday gen olma derecesini diğer iki gene oranla düşürmüştür.

Sonuç olarak skolyoz, körlük ve araknodaktili sendromu marfanoid özellikleri taşıyan bir sendrom olduğundan Marfan sendromunda da çok önemli bir yolak olan TGF- β

yolağında görevli ve mutasyonları marfan sendromuna sebep olan fibrillin 1 geniyle homoloji göstermesi açısından 1. aday gen olarak kabul edilerek, *LTBP2* geninin dizi analizi yapılmasına karar verildi.

4.5. DNA Dizi Analizi Verileri

LTBP2 geninin literatur ışığı altında 2-17 aralığındaki 16 ekzonunu sekanslandı. Sonuçlar Chromas 2.32 ve *NCBI-BLAST* programları kullanılarak değerlendirildi. 2. ekzonda -85 de (2. ekzona 85 baz uzaklıkta (upstream -8)intronda) G/C değişimi saptandı (Şekil4.3). Ancak bu baz değişiminin protein kodlayan bölgede olmadığı kararına varıldı.Saptanan diğer ekzonlardaki değişimler ekarte edildi. Neticede *LTBP2* nin 2-17 aralığındaki ekzonlarda bir mutasyon saptanmadı.



Şekil 4.3 DNA dizi analizi verileri

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bireylerin sosyal gelişimlerini olumsuz yönde etkilemesi ve tüm dünyada yaygın olarak görülmesi genetik tabanlı sendromların ortaya çıkmasında etkin olan genlerin haritalanması ve tanımlanmasına yönelik yapılacak çalışmaları hızlandırmıştır. Genetik haritalama, kısaca genomun matematiksel analizi olarak bilinir ve genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının bulunmasında moleküler biyolojik yöntemler ve bir dizi karmaşık istatistiksel analizleri kullanır. Özellikle genetik etyolojili hastalıkların lokalizasyonlarının saptanması alanında son derece verimli bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir hastalık geninin tanımlanması ise, o genin fonksiyonu ile ilgili hücresel mekanizmaların daha iyi anlaşılmasında bize yardımcı olur ve hastalığın oluşumunu kavramamıza olanak sağlar. Hastalık geninin saptanması ayrıca ilaç üretilmesine ve doğum öncesi ve sonrası genetik tanıya da olanak sağlayacaktır. Otozomal resesif kalıtmalı Skolyoz,Körlük ve Araknodaktili sendromundan sorumlu aday gen\genlerin belirlenmesine yönelik yapılan bu tez çalışmasında, gen lokuslarını belirlemek amacıyla bağlantı analizi yöntemi uygulandı. Tüm genom SNP'leri 250K Affymetrix Array ile tarandı. Bazı kardeşlerin açık olmayan etkilenmiş durumları yüzünden farklı kombinasyonlu tüm pedigreede segregasyon ve 2 etkilenmiş erkek kardeşler tarafından paylaşılan homozigotluk görünür olarak değerlendirildi. İki noktalı LOD skor analizleri easyLINKAGEplus v5.08. tarafından yapıldı. Sonuç olarak 14. kromozomda 7817621bp (rs7148416) ve 75657598bp

(rs11626830) aralığında iki noktalı analiz ile maksimum LOD skor 2.3956 olarak hesaplandı. Bu bölgede lokalize *LTBP2* geninin 2-17 ekzon aralığında dizi analizi yapıldı. Bu ekzonlarda mutasyon saptanamadı.

Dünder ve arkadaşları tanımladıkları bu sendromun çok yüksek olasılıkla değişken ekspresyonlu bir otozomal dominant gen hatası ile meydana gelen ve şimdiye kadar bildirilmemiş bir durum tarafından etkilenmekte olduğunu bildirmişlerdir. Fakat multigenik eklentileri ayırt edememişlerdir. Hastanın kızkardeşinin erkek kardeşi ve babasından daha az etkilenmesi nedeniyle cinsiyet etkisinin de muhtemelen bu hastalığın kalıtımına katkıda bulunmakta olacağını ileri sürerek sendromun tahmini kalıtım kalıplarını sunmuşlardır(7). Bu anlamda projede segregasyon ve bağlantı analizleri otozomal dominant ve otozomal resesif modeller üzerinden yürütülmüştür. Aile bireyleri arasında belirsiz fenotiplerin bulunması (en küçük iki kız kardeşte hafif skolyozun bulunması [Sa. B ve Se. B] ,vaka 3 de skolyozun gözlenmemesi) etkilenmiş ve etkilenmemiş bireylerin farklı kombinasyonları oluşturularak bağlantı analizinin yapılması sağlanmıştır (Vaka 1 ,vaka 2, vaka 3 hasta, diğer aile bireyleri normal yada vaka 1 ve vaka 2 hasta diğer aile bireyleri normal yada vaka 1,vaka 2,vaka 3 ve hafif skolyozu olan iki en küçük kız kardeşler hasta, diğer bireyler normal kombinasyonları gibi). Otozomal dominant kalıtımın seçildiği LOD skor hesaplamaları anlamlı bulunmadığından ekarte edilmiş, ailedeki kan bağı nedeniyle otozomal resesif kalıtım modelinden bağlantı analizine devam edilmiştir.

Haritalamada, otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa, taşıyıcı olan anne-baba ve tüm çocuklar çalışmaya dahil edilmesi gerekirken, otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalığa ait gen haritalanmak isteniyorsa hasta bireyler, varsa eşleri, tüm çocukları ve normal bireylerin sadece kendisi ile çalışılması gerekmektedir. Ailedeki bireylerin ölmüş olması, bazı bireylerden örnek toplanamaması ve ailedeki birey sayısının yeterli olmaması istatistik analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır. Bizim çalışmamızda hasta bireylerle aynı fenotipi taşıyan baba ölmüş olduğu için bağlantı analizinde bilgi verici olamamıştır. Aile birey sayısının az olmasında analizi negatif yönde etkilemiştir.

Ailenin bağlantı analizinde otozomal dominant ve resesif modeller denenmesine rağmen anne ve baba arasında kan bağı (amca çocukları) olduğu için otozomal resesif model üzerinde fokuslanılmıştır. Anne baba akraba olduğu için aradığımız mutasyonun

homozigot olduğu farzedildi. Ortak bir atadaki heterozigot mutasyon homozigot bölgeler içinde arandı. Bu bölgelere "identity by descent" denmektedir. Otozomal resesif kalıtım modeline uyan bir genetik hastalığı olan ailelerde, etmen genin saptanması için, her iki allelin de hastalığa yol açan mutasyonu taşıdığı varsayılır. Özellikle akraba evliliklerinde ortak ata nedeniyle gen içi ve yakın çevresinde rekombinasyon olasılığı düşük olduğundan polimorik markör analizlerinde homozigotluk gösterilebilmektedir. Homozigot bölgelerin belirlenmesi bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili genlerin araştırılmasına yardımcı olur. Bu incelemeye "homozigotluk haritalaması" adı verilir. Bu haritalama, otozomal resesif hastalıkların haritalanmasındaki istatistiksel analizin gücünü arttırmakta ve küçük ailelerde bile yüksek lod skor değerlerinin elde edilmesini olası kılmaktadır.

Çalışmamızda aile bireylerin SNP tüm genom taraması için 250K Affymetrix array kullanılmıştır. Tanımlanmış SNP'lerin güvenilir, kısa ve verimli olarak Affymetrix array ile tespiti özellikle haritalama çalışmalarına hız kazandırmıştır. Aile içinde SNP segregasyonunun incelenmesi ile belirlenen kromozom aralığı daraltılabilmektedir. Ayrıca belirlediğimiz aday genlerin içine düşen SNP'leri kullanarak aday genin bağlantı analizi ile dışlanması sağlanabilmektedir. Polimorfik STR genetik belirleyicilerle RFLP ve allele spesifik PCR' in sınırlı kullanımlarını ve zaman kaybını gidermiştir.

Travmatik olmayan subluksasyon veya kristalin lenslerinin dislokasyonu en çok Marfan sendromunda gözlenir. Bunun yanında Homosistünüri, Weil Marchesani Sendromu ve bir kaç az karşılaşılan otozomal resesif bozuklukların ana belirtisidir (74). Radyografik olarak tanılanan skolyozisin pek çok nedeni vardır (75). Osteogenezis imperfekta (76), Marfan sendromu(77), Stickler Sendromu (78), Ehler Danlos Sendromu (79), Muskular distrofiler (80) gibi kalıtsal kas iskelet bozukluklarının hepsinde skolyozis bir belirti olarak görülür. Spina Bifida, Serebral Palsi ve Miyelomeningosel gibi nöromuskuler hastalıklar kas dengesizliğinin yanında skolyozis oluşumu ile de ilişkilidirler (81,82). Polio ve spinal travmadan kaynaklanan paralitik bozukluklar ilerleyici skolyozise neden olur. Radyasyon terapisi, tümörler, slinks oluşumu da skolyozisis nedenleri arasında sayılmaktadır. Bunun yanında skolyozis vakalarının en az %80' i hiç bir neden tanımlanamadığı için idiyopatik olarak sınıflandırılmıştır. İdiyopatik skolyozisin genetik bir bileşeni olduğuna dair kanıtlar çok güçlüdür. Fakat belli bir kalıtım modeline dair bilgiler sınırlıdır. Marfan sendromu pek çok sistemi (iskelet, okuler, kardiovasküler,

pulmonar, deri, beyin ve dura) içine alan bağ dokunun otozomal dominant kalıtsal bozukluğudur. Fakat en güçlü belirtileri iskelet,oküler ve kardiovaskülerdir. Marfan sendromu *FBN1* genindeki mutasyonlar sonucu oluşur (83). Bunun yanında önceki yapılan çalışmalarda geniş çaplı mutasyon analizleri yaklaşık olarak %10 yada daha fazla Marfan sendromu hastalarında *FBN1* bağlantısını gösterememiştir ki bu da GHNET kriteri ile uyuşur. Marfan sendromlu hastaların TGF β nın transmembran reseptör tip II proteinini kodlayan *TGFBR2* geninde mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (84). Marfan sendromunda oluşan çok çeşitli iskelet bozuklukları: dolikostelomedia, araknodaktili, skolyozis, göğüs duvarı deformasyonları (pektus kavinatum, ekskavatum),uzun görünüm, ligamentoz laksiti,anormal eklem oynaklığı ve protrusio asetabul' dur. Skolyozis cinsiyet ayrımı olmaksızın Marfan sendromu olan yetişkinlerin yaklaşık % 60 ında skolyozis görülür(85). Tüm Marfan sendromu hastalarının yaklaşık 3/2 sinde belirli ciddiye derecelerinde pektus ekskavatum oluşur ve ameliyatla düzeltilmeden sonra idiyotipik pektus ekskavatumdan daha yüksek seviyede bir eğilimle yeniden oluşabilir (86). Marfan sendromu hastalarının yaklaşık %80 ninde ektopia lentis oluşur ve her zaman bilateraldir (87). Marfan sendromunun en yaygın kardiovasküler belirtileri atrio ventriküler kapakları ve aortayı etkiler. Marfan sendromu tanısı GHENT nozolojisi kriterlerine uygun olarak yapılabilir (88,89). Marfan sendromunun azımsanmayacak derecede aile içi ve aileler arası değişkenliğinden dolayı tanısallık ikilemler yaşanabilir. Aynı zamanda Marfan sendromunun vitral kapakçık purolapsı veya skolyozis gibi pek çok özellikleri genel popülasyonda da yaygındır veya diğer bağ doku bozukluklarında da oluşabilir ve pek çok belirtileri de yaşa bağlıdır. Marfan sendromunda araknodaktili,skolyozis ve lens sublaksasyonu görülebilir, fakat erken çocuklukta zayıf görüş ve görüş kaybının ilerlemesi bu sendromda pek görülmez. Ek olarak bilateral anterior pitalmos, bilateral mikrokornea ve kornea opaklığı Marfan sendromunda mevcut değildir ve lens dislokasyonunun yönü superotemporaldir. Oysaki skolyoz,araknodaktili ve körlük sendromunu taşıyan bireylerde lens dislokasyonu yönü aşağı derecede ve zeka ve ekokardiyogramları normaldir ve GENTH kriterlerini tam olarak uymaz.

FBN1 mutasyonları Marfan Sendromunun, şiddetli neonatal Marfan Sendromu , dominant kalıtmıli ektopia lentis, kifo skolyozis gibi izole edilmiş iskeletsel özelliklerinide içeren tam ve tam olmayan çeşitlerinde tanımlanmıştır. Tip I fibrillopatilerin yeni moleküler grubu aralarında Sprintzen Goldberg Sendromu ve daha

yeni olarak ailevi veya izole aortik anevrizma formlarının bulunduğu üst üste binen bir hastalıklar dizisini içerir (90). Dündar ve arkadaşları vakalarında ne *FBN1* nede *TGFRBI* moleküler genetik testlerinde herhangi bir mutasyon ortaya çıkarmamışlardır (7). Bu demektir ki ya Dündar ve arkadaşlarının mutasyon taraması hastalığa neden olan bir mutasyonu tanımlayamamıştır yada rapor edilen klinik durumlar *FBNRI* ve *TGFR I* ve *II* nin eksiklik dizisinin bir parçası değildir. Bu ailede bütün aile üyeleri erken çocuklukta zayıf görüşten muzdarip olmuşlardır ve bir kaç yıl içinde görüşlerini kaybetmişlerdir. Benzer bulgular Stickler sendromunda da bulunabilir. Stickler sendromu aralarında miyopia, katarakt ve retinal ayrışma gibi oküler bulgular, hem kondaktive ve sensörinöral işitme kaybı, orta yüz gelişim azlığı ve yarı damak (kendi başına veya robin sekansına bağlı olarak), ılımlı spodiloepifisial artris (91) bulunan bir otozomal bağ doku sendromudur. Fakat lens dislokasyonu Stickler sendromunda görülmez ve sendrom vakalarında işitme kaybı, yarı damak ve katarakt yoktur. Kifozun skolyotik tipi Ehlers Danlos sendromu (EDS VIA) (MIM 22 5400) bir kalıtsal bağ doku bozukluğudur. Bu sendrom klinik olarak doğumdaki şiddetli kas hipotonisi, doğumda var olan veya erken bebeklikte başlayan ve gelişen kifoskolyozis ve şiddetli hiper mobilitesi ve luksasyon (92,93) ile karakterize edilir. Bunların yanında sıklıkla marfanoid habitus, kırılma eğilimsiz osteopenia, anormal yaralı deri kırılabilirliği, mikrokornea ve göz küresinde ve arterlerde yırtık görülür.(93) ve şiddetli kas hipotonisi ve genel motor gelişimindeki gecikmeden dolayı tanılama sıklıkla çok geç olur. Özellikle ayaklardaki deformasyonlar ve eklem dislokasyonları birlikte görüldüğünde bir nöromuskular bir hastalıktan şüphelenilir. Bunu takiben geniş çaplı ve sıklıkla invaziv bir nöromuskuler çalışma yapılsa da genelde hep normal sonuuc verir (93). Sendrom vakalarında klinik özellikler ve hastalığın başlangıç zamanlaması bu tanıya uymaz. Garsio et all. (94) dört Meksikalı kardeşle komple akromatopsia ve uzun parmaklar, pes planus gibi iskeletsel anormaliler ile karakterize edilen yeni ve muhtemelen otozomal resesif bir sendrom tarif etmiştir. Fakat lens luksasyonu yoktur. Buna karşın sendrom vakalarının renk görüşleri dahil oftalmolojik muayeneleri normaldir. Dündar ve arkadaşları ailede körlüğe ve fitisise muhtemelen miyop, lens dislokasyonu, retinal ayrışma ve diğer bilinmeyen nedenlerin yol açtığını düşünmüşlerdir. Sonuç olarak, diğer bilinen genetik durumların arasında belli benzerlikler olmasına rağmen körlük, skolyozis ve araknodaktili kombinasyonuna tam ve yaklaşık olarak karşılık gelen herhangi bir bilinen marfanoid özellikleri taşıyan

sendrom gösterememişlerdir.

Bu çalışmada en yüksek LOD skorun saptandığı 14. Kromozomun 7817621bp (rs7148416) ve 75657598bp (rs11626830) aralığında *NCBI-Map Viewer* ve *Ensembl* veri bankaları ile toplam 87 gen belirlenmiştir. Bu genlerin öncelikli olarak marfanoid özelliklere sebep olan yolaklar açısından araştırılmıştır. Bu taramada sendroma sebep olabileceği düşünülen Marfan sendromunda önemli TGF- β yolağı, skolyoz oluşumunda önemli Notch yolakları kullanıldı. Bunu takiben, belirtilen kromozom aralığında genler yolak bilgisi ve gen ürünü işlevleri açısından araştırılmıştır. Bu amaçla *KEGG*, *Bioinformatic Harvester*, *OMIM* veri bankalarından yararlanılmıştır. Tarama sonucunda, TGF- β yolağında görevli, 36 ekzonlu *LTBP2* geni, skolyozda önemli bir yolak olan Notch yolağında görevli ve spinal gelişimden sorumlu *PSEN1* geni ve yine Notch yolağında görevli *Numb* geni aday gen olarak belirlendi. *PSEN1* geninin daha çok Alzheimer hastalığından sorumlu başlıca önemli genlerden biri olduğu düşünülerek çalışılması uygun görülmedi. *Numb* geninin sadece skolyozdan sorumlu bir gen olduğu düşünüldüğünden 2. çalışılacak aday gen olabileceği kararına varıldı. Yapılan literatür taramasında *LTBP2* geninin lens dislokasyonlarına ve ek marfanoid özelliklere sebep olduğuna pek çok çalışma mevcuttur. Kumar ve arkadaşları kan bağı olan Marfan sendromu, Weill-Marchesani sendromlarıyla karakterize mikroferofakilili 2 hintli ailede yaptıkları çalışmada *LTBP2* genin homozigot duplikasyon mutasyonlarını (c.5446dupC) rapor etmişlerdir (95). Desir ve arkadaşları iki ailede (aileler içinde kan bağı mevcut) yaptıkları bağlantı analizinde lens dislokasyonu (mikroferofaki ve ektopia lentis), miyopili, uzun statürlü, anormal derece yüksek kol uzunluğuna sahip Marfan sendromuyla bağlantılı fenotipe sahip iki kardeşte *LTBP2* geninin homozigot mutasyonu saptanmışlardır (96). Azamanov ve arkadaşları Roman populasyonunda Marfan sendromunda gözlenen konjenital glakom ve ektopia lentisli bireylerde yaptıkları bir çalışmada *LTBP2* mutasyonlarına dikkat çekmişlerdir(97). Bu anlamda 1. aday gen olarak *LTBP2* geni belirlendi ve sekanslanmasına karar verildi.

LTBP2 geni insanlarda 14q24.3 te lokalize, Latent TGF-Beta Binding Protein 2 yı kodlayan 36 ekzonluk büyük bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan proteinler multi-domain yapısında ekstrasellüler matriks proteindir. ECM nin bileşenleri ve onların farklı ekspresyon modelleri doku formasyonunda önemli rol oynarlar. Latent TGF- β

proteinleri fibrinler ile güçlü benzerlik gösteren çoklu domain yapıları ile *LTBP* ailesinin en büyük üyesidir. *LTBP2* geninin, fibrinlerde de bulunan EGF like, EGF like Ca binding, 8 ve 4 sistein domainlerinin yoğun olduğu (1. ekzon hariç) ilk 16 ekzonu sekanslandı. Ancak çalışmada 1 ekzon çok uzun olduğu için uygun primer dizayn edilemediğinden çalışmaya dahil edilememiştir.

Literatürde skolyoz,araknodaktili ve körlük fenotipik bulgularını beraber taşıyan skolyoz, araknodaktili ve körlük sendromundan ve Marfan sendromundan başka araknodaktili, ektopia lentis ve kifoskolyozun eşlik ettiği Beals sendromu mevcuttur.Beals sendromu (konjenital araknodaktili) Marfan sendromundan daha hafif bulgular veren bir sendrom olup 5. kromozomda lokalize *FBN2* genindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (97-100). Literatürde progressif skolyoz ve horizontal gaze palsy (yatay bakış felci) bulgularını gösteren olgularda 11.kromozomda lokalize *ROBO3* mutasyonları dikkat çekmektedir (101,102).Yalnızca adalosent idiyopatik skolyoz bulgularını gösteren olgularda 1,6,7,8,14 ve 12. kromozomlarda bağlantı saptanmış (103), skolyoz ve sağırılığın eşlik ettiği bir çalışmada, *PPP1R9B* ve *COL1A1* genlerinin mutasyonu tespit edilmiş (104), adalosent idiyopatik skolyoz ve pektus ekskavatum bulgulu bir ailede 18q da bağlantı saptanmıştır (105). Bu anlamda skolyoz, araknodaktili ve körlük bulgularının eşlik ettiği sendromumuzda literatürde Marfan ve Beals sendromundan başka yaklaşık bulgu gösteren bir sendrom ve bağlantı saptanmış kromozom bölgesi bildirilmemiştir. Bu açıdan skolyoz,araknodaktili ve körlük sendromunda saptadığımız 14q3.3-q24.3 gen bölgesi literatürde ilk bildirilmiş bağlantı bölgesi olacaktır.

Araştırma sürecinde bilgilerin hızlı, doğru ve etkin bir şekilde elde edilebilmesinde elektronik veri bankaları en önemli kaynaklar olmuştur. Yapılan tez çalışmasında birden fazla farklı veri bankalarından yararlanılmış (*NCBI-OMIM*, *NCBI-Map Viewer*, *NCBI-UniGene*, *NCBI-Gene*, *NCBI-Conserved Domain*, *Ensembl*,*Human Genome Browser*, *Bioinformatic Harvester*,*KEGG*) ve farklı veri bankalarının kullanımı elde edilen bilgilerin doğruluğunu desteklemiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması sırasında ortaya konan ve takip edilen gen belirleme stratejisi sonunda 7817621bp (rs7148416) ve 75657598bp (rs11626830) aralığında skolyoz,araknodaktili,körlük sendromundan sorumlu olabilecek 3 adet aday gen belirlenmiştir.LTBP2 geninin 16 ekzonunda DNA dizi analizi ile incelenmesi sonucu

proteine kodlanan bölgelerindeki baz değışikliğı saptanamamış olup, bu sendromdan sorumlu yeni bir gen tespiti için *LTBP2* geninin diğer ekzonlarının ve diğer 2 aday genin sekanslanması zorunludur. Elektronik veri bankalarının takip edilerek literatüre yeni kazandırılan genlerin de aday gen olup olmayacakları yönünde değerlendirilmeleri gerekmektedir. Bunlara ek olarak düşünülen ikinci bir strateji, sendromdan sorumlu genin bulunması amacıyla bu vakalara başka bir yöntem olan STR marker uygulanmasıdır. Yeni bir genin literatüre kazandırılması bu süreç sonrasında sağlanacaktır. Ancak çalışmamız sendromdan sorumlu olabilecek kromozom bölgesi ve 3 aday gen bilgisi vermesi açısından literature katkıda bulunmuştur.

6.KAYNAKLAR

1. Akarsu AN, Kara-Ozer S, Yuncu Z, et al. Saturation mapping of bipolar affective disorder (BPAD) susceptibility locus on chromosome 20p11.2-q11.2. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 469.
2. Akarsu AN, Lüleci G.Gen haritalaması: ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl yorumlanıyor? *Dokuz Eylül Tıp Dergisi* 2002; (İnsan genomu projesi-özel sayısı): 29-39.
3. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennt ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130-136.
4. Griffiths G, Anthony JF, Miller M, Jeffrey H, Suzuki, David T, Lewontin RC, Gelbart WM. *An Introduction to Genetic Analysis*. (5th ed.) , W.H. Freeman and Company, New York 1993; Chap. 5.
5. Gershon ES, De Lisi LE, Hamovit J, et al..A controlled family study of chronic psychoses, schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45: 328-336.
6. Berrettini WH. Susceptibility loci for bipolar disorder: Overlap with inherited vulnerability to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 245-251.
7. Dunder M, Erkilic K, Argun M, et al. Scoliosis, Blindness and arachnodactyly in a large Turkish family: Is it a new syndrome? *Genetic Counseling* 2008;19 (3) : 319-330.
8. Akarsu AN, Çakır B. Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler: IV-A. Hastalık geni haritalaması. *3P Dergisi* 2004;12 (1) : 31-49.

9. Vink JM, Boomsma DI. Gene finding strategies, *Biological Psychology* 2002; 61: 53-71.
10. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, et al. Parametric and NonParametric Linkage Analysis: A Unified Multipoint Approach.. *American Journal of Human Genetics* 1996; 58: 1347-1363.
11. Ott J. *Analysis of Human Genetic Linkage*, Johns Hopkins University, Baltimore 1991; pp129-139.
12. Terwilliger JD. and Ott J. *Handbook of Human Genetic Linkage*. Johns Hopkins University, Baltimore 1994; pp 148.
13. Ott J. *Analysis of human genetic linkage* (3rd edition), The John Hopkins University Press, New York 1999; pp 60-64.
14. Leal SM, Müller-Myhsok B, Nothnagel M. Basic gene mapping linkage analysis course, Max Delbrück Centre for Molecular Medicine, Berlin, Germany 4-8 July 2005; pp15.
15. Dib C, Faure S, Fizames C, et al. Comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380(6570): 152-154.
16. Donis-Keller H, Green P, Helms C, et al. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 1987; 51(2): 319-337.
17. Broman KW, Murray CJ, Sheffield, RL, et al. Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *The American Journal of Human Genetics* 1998; 63: 861-869.
18. Murray JC, Buetow KH, Weber JL, et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC), *Science* 1994; 265 (5181) : 2049-2054.
19. Lathrop GM, Lalouel JM. Easy Calculations of Lod Scores and Genetic Risks on Small Computers. *American Journal of Human Genetics*, 1984; 36: 460-465.
20. Keats B, Ott J , Conneally PM. *Human Gene Mapping 10 - Report of the Committee on Linkage and Gene Order*, Cytogenetics and Cell Genetics 1989;

51: 459-502.

21. Paul D. Genetic Linkage Studies, Often Among the First Steps in These Efforts, Provide a Powerful Approach to Help Elucidate the Underlying Genetic Mechanisms for Inherited Disorders. *JAACAP* 1999; 38(7) : 932-35.
22. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, et al. Second Generation Linkage Map of the Human Genome. *Nature* 1992; 359: 794-801.
23. Sheffield VC, Weber JL, Buetow KH, et al. A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps, *Hum. Mol. Genet* 1995; 4(10):1837-1844.
24. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat. Genet* 2002; 31: 241-247.
25. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, et al. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet* 1994; 2 : 246-339.
26. Kong X, Murphy K, Raj T, et al. A combined linkage-physical map of the human genome. *Am. J. Hum. Genet* 2004; 75(6):1143-1148.
27. North Shore LIJ Research Institute (2006), An alphabetic list of genetic analysis software. Erişim: [<http://linkage.rockefeller.edu/soft/>], Erişim Tarihi: 14.10.2010
28. Suyama M, Nagase T, Ohara O. HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA Sequencing project. *Nucleic Acid Research* 1998; 27 (1) : 338-339.
29. Sugano S. FLJ cDNA project in Japan. Transcriptome : From functional genomics to systems biology meeting, Seattle, Washington, USA 10-13 March 2002.
30. Brent MR. Genome annotation past, present, and future: How to define an ORF at each locus. *Genome Research* 2005; 15: 1777-1786.
31. Affymetrix 2010. Erişim: [<http://www.affymetrix.com>], Erişim Tarihi: 11.01.2010.
32. Korn JM, Kuruvilla FG, McCarroll SA, et al. Integrated genotype calling and association analysis of SNPs, common copy number polymorphisms and rare

- CNVs. *Nat Genet* 2008; 40 (10) : 1253-1260.
33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74 (12) :5463-5467.
 34. Maxam A, Gilbert W. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977; 74: 560-564.
 35. Klug SW, Cummings WR. *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey, 2000; pp 745-756.
 36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York 1989.
 37. Perkin Elmer. *ABI 310 Genetic Analyzer Manual*, 2000.
 38. Gibson MA, Hatzinikolas G, Davis EC, et al. Bovine latent transforming growth factor β 1-binding protein-2: Molecular cloning, identification of tissue isoforms, and immunolocalization to elastin-associated microfibrils. *Mol Cell Biol*. 1995; 15: 6932–6942.
 39. Taipale J, Saharinen J, Hedman K. et al. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem*. 1996; 44: 875–889.
 40. Karonen T, Jeskanen L, Keski-Oja J. Transforming growth factor β 1 and its latent form binding protein-1 associate with elastic fibers in human dermis: Accumulation in actinic damage and absence in anetoderma. *Br J Dermatol*. 1997; 137: 51–55.
 41. Raghunath M, Unsold C, Kubitscheck U. et al. The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) and is a repository for latent TGF-beta 1. *J Invest Dermatol*. 1998; 111: 559–564.
 42. Dallas SL, Keene DR, Bruder SP. et al. Role of the latent transforming growth factor-beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo. *J Bone Mineral Res*. 2000; 15: 68–81.

43. Sterzel RB, Hartner A, Schlotzer-Schrehardt U. et al. Elastic fiber proteins in the glomerular mesangium in vivo and in cell culture. *Kidney Int.* 2000; 58: 1588–1602.
44. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S. et al. LTBP-1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 2750–2757.
45. Hyytiäinen M, Taipale J, Heldin C-H. et al. Recombinant latent transforming growth factor beta-binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release. *J Biol Chem.* 1998; 273: 20669–20676.
46. Unsold C, Hyytiäinen M, Bruckner-Tuderman L. et al. Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *J Cell Sci.* 2001; 114: 187–197.
47. Sinha S, Heagerty AM, Shuttleworth CA, et al. Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta 1 and fibrillin-1 following arterial injury. *Cardiovasc Res.* 2002; 53: 971–983.
48. Bashir MM, Han MD, Abrams WR, et al. Analysis of human gene encoding Latent TGF-beta binding protein 2. *Int J. Biochem Cell Biol.* 1996; 28 (5) : 531-542.
49. Shipley JM, Mecham RP, Maus E, et al. Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 4879–4887.
50. Cheung CL, Sham PC, Chan V, et al. Identification of *LTBP2* on Chromosome 14q as a Novel Candidate Gene for Bone Mineral Density Variation and Fracture Risk Association. *JCEM* 2007; 93 (11) : 4448-4455.
51. Heptinstall J, Rapley R. Spectrophotometric Analysis of Nucleic acids. In: *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Rapley R. (Ed.) Human Press Inc., Totowa, New Jersey 2000; pp 57-60.
52. Akar N. Klinik moleküler patolojiye giriş, Antıp A.S, Ankara 1995; ss143-162.
53. Ellenberger T, Tomkinson A.E. Eukaryotic DNA Ligases: Structural and Functional Insights. *Ann. Review of Biochemistry* 2008; 77: 313-338

54. Mullis K, Faloona ., Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction.Cold Spring Harbo Symposia on Quantitative Biology 1986; 51: 263-273.
55. Mullis K., Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987;155:335-350.
56. Saiki RK, Bugavan TL, Horn GT, et al. Analysis of enzymatically amplified beta globin and HLA-DQ alpha DNA with allelespecific oligonucleotide probs. Nature 1986; 13:163-166.
57. Saiki RK, Gelfand DL, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermastable SNA polymerase.Science 1998 ; 29:487-491.
58. Mark B., Greg A, Freyer, Micklos DA. Laboratory DNA Science : An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 1996.
59. Ralph R, Walker JM. Biomolecular Methods. NJ: Humana Press, Totowa, 1998.
60. Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. Science 1987; 236: 1567-70
61. Forsheew T. Johnson CA.SCAMP: A Spreadsheet to Collate Autozygosity Mapping Projects. J Med Genet 2004; 41: 125.
62. Fukushima K, Ueki Y, Smith RJ. Sensorineural hearing impairment, nonsyndromic: DFNB5, 6, 7. Homozygosity mapping to localize genes causing autosomal recessive non-syndromic hearing loss. Adv Otorhinolaryngol 2000;56:152-7.
63. Woods CG, Valente EM , Bond J, et al.A new method for autozygosity mapping using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and EXCLUDEAR. J Med Genet 2004; 41:101.
64. Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR, et al. Consanguineous nuclear families used to identify a new locus for recessive non-syndromic hearing loss on 14q. Hum Mol Genet 1995; 4: 1643-8.
65. <http://compbio.charite.de/genetik/hoffmann/easyLINKAGE/>

66. Lindner TH, Hoffmann K. Manual – easyLINKAGE Plus v5.05, Germany 2004.
67. Burpo FJ. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. 2001
68. Oklu, R., Hesketh, R. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem. J* 2000; 352: 601-610.
69. Moren A, Olofsson A., Stenman G, et al. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1994;269: 32469-32478.
70. Huang, EJ, Li H, Tang, AA, et al. Targeted deletion of numb and numlike in sensory neurons reveals their essential functions in axon arborization. *Genes Dev.* 2005 (19) : 138-151.
71. Li HS, Wang D, Shen Q, et al. Inactivation of Numb and Numlike in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis. *Neuron* 2003; (40) :1105-1118.
72. Alzheimer's Disease Collaborative Group The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genet.* 1995;11: 219-222.
73. Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 2004; 42: 23-36.
74. Traboulsi EI, Maumenee IH. Subluxation of the crystalline lens and associated systemic disease. Inc: *Genetic Diseases of the Eye*, Oxford University Press, New York 1998; pp 605-627.
75. Winter R. Posterior spinal fusion in scoliosis indications, techniques and results. *Orthoped. Clin. N. AM* 1979;10: 787-800.
76. Sillence DO, Barlow KK, Cole WG, et al. Osteogenesis imperfect type III delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am. J. Med. Genet* 1986;23:821-832.
77. Pyeritz RE, McKusick VA. The Marfan syndrome diagnosis and management. *N. Engl J. Med* 1979; 300:772-777

78. Ahmad N, Ala-Kokko L, Knowlton R, et al. Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the Sticker syndrome(arthroophthalmopathy). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88: 6624-6627
79. Steinmann B, Royce PM ,Superti-Furga A. The Ehlers-Danlos syndrome. In: *Connective Tissue and Heritable Disorders Molecular,Genetic and Medical Aspects*. Wiley –Liss, New York 2002; pp 431-523.
80. Emery AE. X-linked muscular dystrophy with early contractures and cardiomyopathy (Emery-Dreifuss type). *Clin Genet* 1987;32: 360-367.
81. Deluca PA. The musculoskeletal management of children with cerebral palsy. *Pediatr. Clin. N. Am* 1996; 43: 1135-1150.
82. Sarwark JF. Spina Bifida. *Pediatr. Clin. N. Am*. 1996; 43: 1151-1158.
83. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE,et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991;35: 2337-2339.
84. Summers KM,West JA,Peterson M, et al. Challenges in the diagnosis of Marfan syndrome. *Med J Aust* 2006;184: 627-631.
85. Sponseller PD, Hobbs W, Riley LH, et al. The thoracolumbar spine in Marfan syndrome. *J Bone Joint Surg* 1995;77: 867-876.
86. Arn PH ,Scherer LR, Haller JA, et al. Outcome of pectus excavatum in patients with Marfan syndrome and in the general population. *J. Pediatr* 1989;11: 5954-5958.
87. Cross HE,Jensen AD. Ocular manifestations in the Marfan syndrome and homocystinuria. *Am J. Ophthalmol* 1973;75: 405-420.
88. De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J. Med. Genet* 1996; 62: 417-426.
89. Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillinopathies.*J. Med. Genet* 2000;37: 9-25
90. Milewicz D, Michael K, Fisher N, et al. Fibrillin -1 mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 1996; 94: 2708-2711.
91. Rose PS, Ahn NU, Levy HP, et al. Thoracolumbar spinal abnormalities in

- Sticker syndrome. *Spine* 2001;15: 403-409.
92. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al.. Ehlers-Danlos syndromes. Revised nosology. *Am J. Med. Genet*,1997;7: 731-737.
 93. Steinmann B,Royce PM, Superti-Furga A. The Ehlers-Danlos syndrome. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Wiley –Liss, New York 2002; pp 431,523.
 94. Garcia-Ortiz JE, Garcia –Cruz D, Mendoza –Topete R, et al.Complete achromatopsia associated with skeletal anomalies: A new autosomal recessive syndrome. *Genet. Counsel* 2004; 15: 455-461.
 95. Kumar A, Duvvari MR, Prabhakaran VC, et al.A homozygous mutation in *LTBP2* causes isolated microspherophakia. *Hum. Genet.*2010; 128: 365-371.
 96. Désir J, Sznajder Y, Depasse F, Roulez F, et al. *LTBP2* Null Mutations In An Autosomal Recessive Ocular SyndromenWith Megalocornea, Spherophakia, And Secondary Glaucoma. *EJHG* 2010; 18, 761–767.
 97. Viljoen D. Congenital contractural arachnodactyly (Beals syndrome). *J Med Genet.* 1994 ;31(8):640-3.
 98. Park ES, Putnam EA, Chitayat D,et al. Clustering of *FBN2* mutations in patients with congenital contractural arachnodactyly indicates an important role of the domains encoded by exons 24 through 34 during human development. *Am J Med Genet.* 1998;78 (4) :350-5.
 99. Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, Milewicz DM. Fibrillin-2 (*FBN2*) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat Genet.* 1995 ;11 (4) :456-8.
 100. Tsipouras P, Del Mastro R, Sarfarazi M, et al. Genetic linkage of the Marfan syndrome, ectopia lentis, and congenital contractural arachnodactyly to the fibrillin genes on chromosomes 15 and 5. The International Marfan Syndrome Collaborative Study. *N Engl J Med.* 1992 ;326 (14) :905-9.
 101. Jen JC. Effects of failure of development of crossing brainstem pathways on ocular motor control. *Prog Brain Res.* 2008;171:137-41.
 102. Bosley TM, Salih MA, Jen JC. Neurologic features of horizontal gaze palsy

and progressive scoliosis with mutations in ROBO3. *Neurology*. 2005;64 (7) :1196-203.

103. Raggio CL, Giampietro PF, Dobrin S, et al. A novel locus for adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 12p. *J Orthop Res*. 2009 ;27 (10) :1366-72.
104. Zahir FR, Langlois S, Gall K, et al. A novel de novo 1.1 Mb duplication of 17q21.33 associated with cognitive impairment and other anomalies. *Am J Med Genet A*. 2009 ;149A (6) :1257-62.
105. Gurnett CA, Alaei F, Bowcock A, et al. Genetic linkage localizes an adolescent idiopathic scoliosis and pectus excavatum gene to chromosome 18 q. *Spine*. 2009 Jan 15;34 (2) :E94-100.

PROJE SONUÇ RAPORU YAZIMINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

Proje sonuç raporu yazımında A4 ebadında kağıt alanı kullanılmalı, sayfalardaki sağ, sol ve alt boşluk 2.5 cm, üst boşluk ise 3 cm olmalıdır.

Proje sonuç raporunun tam metni, **tek bir pdf dosyası** olarak elektronik ortamda ERÜ-PRODİS sistemi üzerinden birime sunulmalıdır. Dosya isimleri aşağıdaki formata uygun olmalı ve isim verilirken Türkçe karakter kullanılmamalıdır:

projeno.pdf (örnek: FBA_09_1236.pdf)

Proje sonuç raporu içeriği aşağıda belirlenen düzende olmalıdır:

KAPAK: Yukarıda verilen formata uygun olarak hazırlanmalıdır.

BOŞ SAYFA: Kapaktan sonra boş bir sayfa bırakılmalıdır.

TEŞEKKÜR: Bu kısım isteğe bağlı olarak eklenebilir.

İÇİNDEKİLER: Rapor içindeki başlıkları, alt başlıkları ve bunların sayfa numaralarını verecek şekilde hazırlanmalıdır.

ÖZET: Proje başlığı ile birlikte en az 100, en çok 250 sözcükten oluşan Türkçe özet verilmelidir. Zorunlu hallerde özet 400 sözcüğe kadar çıkabilir. Özet'in bitiminde "Anahtar Kelimeler" yer almalıdır.

ABSTRACT: Proje başlığı ile birlikte en az 100, en çok 250 sözcükten oluşan İngilizce özet verilmelidir. Zorunlu hallerde özet 400 sözcüğe kadar çıkabilir. Özet'in bitiminde "Keywords" yer almalıdır.

Önerilen Proje Metni Ana Bölümleri,

**GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM
GENEL BİLGİLER
GEREÇ VE YÖNTEM
BULGULAR
TARTIŞMA VE SONUÇ
KAYNAKLAR
EKLER**

Tartışma ve Sonuç bölümünde, projenin öneri aşamasında ortaya konulan hedeflere ne ölçüde ulaşıldığı açıkça ortaya konulmalı, ulaşılamayan hedefler var ise bunların gerekçeleri de tartışılmalıdır.

Araştırmacıların sonuç raporu yazımında ilgili enstitü veya uzmanlık eğitiminin yapıldığı fakültenin belirlediği tez yazım formatını kullanmaları önerilir.

Proje çalışmasından elde edilen veriler veya sonuçlar kullanılarak üretilmiş yayınlar var ise, rapor sonunda listelenmeli ve yayının bir örneği rapora eklenmelidir.

Hatırlatma
(Uygulama Yönergesinin Sonuç Raporu İle İlgili Maddesi)

Madde 15. Proje yürütücüsü, protokolde belirtilen bitiş tarihini izleyen 1 ay içerisinde, araştırma sonuçlarını içeren ve BAP Komisyonu tarafından belirlenen formata uygun olarak hazırlanmış Proje Sonuç Raporunu, tez projesi yürütücüsü ise tezin elektronik ortamdaki nüshasını proje değerlendirme ve izleme sistemi aracılığı ile BAP Koordinasyon Birimine sunar. Ayrıca, var ise proje kapsamında gerçekleştirilmiş yayınlar da rapora eklenir. Tez projeleri için, proje yürütücüleri tezin başarılı bulunarak tamamlandığına dair ilgili enstitüden alınmış bir belgeyi de birime teslim etmek zorundadır. Güdümlü projeler ve sempozyum düzenleme projeleri için, sonuç rapor formatına bağlı kalınmaksızın bu desteğin nasıl kullanıldığını açıklayan bir rapor hazırlanır ve BAP Birimi'ne sunulur. Araştırma projelerine ait sonuç raporları, hakem değerlendirmesi ışığında değerlendirilerek projenin başarılı sayılıp sayılmayacağına Komisyon tarafından karar verilir. Diğer projelerin sonuç raporları ise doğrudan Komisyon tarafından değerlendirilerek karara bağlanır. Araştırma projeleri kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar, yüksek lisans, doktora veya tıpta uzmanlık tezlerinde kullanılamaz. Bu kapsamdaki sonuçlar, ancak literatürdeki diğer kaynakların kullanıldığı oranda ve kaynak gösterilerek kullanılabilir.