

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ASLAN TİP MULTİPLE PTERYGIUM SENDROMUNUN GENETİK
ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Orhan SEZGİN

TRABZON-2011

T. C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ASLAN TİP MULTİPLE PTERYGIUM SENDROMUNUN GENETİK
ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Orhan SEZGİN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14.06.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 05.07.2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ersan KALAY

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yakup ASLAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Figen CELEP

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Ağustos 2011

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden sürekli istifade ettiğim, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı saydığım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Ersan KALAY'a teşekkür ederim.

Çalışmanın genom boyu homozigotluk analizi aşamalarının gerçekleşmesine katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU'ya, çalışma kapsamındaki hastaların klinik değerlendirmelerini yapan sayın Prof. Dr. Yakup ASLAN'a ve sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet MUTLU'ya, çalışmaya örnek sağlayan ve hastaların klinik değerlendirmelerinin yapılmasına katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ'ye, yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e, sayın Prof. Dr. Figen CELEP'e, sayın Doç. Dr. Fahri UÇAR'a ve sayın Dr. Bayram TORAMAN'a teşekkür ederim.

Araştırma süreci ve tez yazım aşamasındaki katkılarından dolayı arkadaşlarım Arş. Gör. Ceren SÜMER'e, Adem YILDIRIM'a, Pelin KÜÇÜK'e, Sibel MOLLAMEHMETOĞLU'na ve Arş. Gör. Burcu YÜCEL'e teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden bütün bireylere ve bu araştırmayı 2009.114.001.5 kodlu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ağustos 2011, Trabzon

Orhan SEZGİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	<i>i</i>
İÇİNDEKİLER	<i>ii</i>
TABLO LİSTESİ	<i>vi</i>
ŞEKİL LİSTESİ	<i>vii</i>
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	<i>viii</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genetik Hastalıklar	3
2.2. Tek Gen Kalıtım Şekilleri	4
2.2.1. Otozomal Dominant Kalıtım	4
2.2.2. Otozomal Resesif Kalıtım	4
2.2.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım	5
2.2.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım	5
2.3. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar	5
2.3.1. Nükleotid Değişimleri	6
2.3.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar	7
2.3.3. Trinükleotid Tekrar Artışları	7
2.4. Limb Pterygium Sendromları	8
2.4.1. Popliteal Pterygium Sendromu	9
2.4.2. Ölümcül Tip Popliteal Pterygium Sendromu	10
2.4.3. Aslan Tip Multiple Pterygium Sendromu	11

2.5. Reseptör Etkileşimli Serin-Threonin Protein Kinazlar	11
2.6. RIPK4, NFκB Yolağı ve Keratinosit Farklılaşması	14
2.7. Moleküler Genetik Yöntemler	16
2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
2.7.2. Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi	16
2.7.3. DNA Dizi Analizi	18
2.7.3.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi	19
2.7.4. Genetik Haritalama	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilecek Aile Bireylerinin Belirlenmesi	20
3.1.2. Kimyasallar	22
3.1.3. Kitler	22
3.1.4. Cihazlar	23
3.1.5. Sarf Malzemeleri	24
3.1.6. Solüsyonlar	24
3.1.6.1. DNA İzolasyon Solüsyonları	24
3.1.6.2. Agaroze Jel Elektrophorezi Solüsyonları	27
3.1.6.3. Yükleme Tamponları	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	28
3.2.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre İle Konsantrasyonunun Ölçümü ve Ayarlanması	30
3.2.3. Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi	30

3.2.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması	30
3.2.3.2. Bağlantı Bölgesinin Bütün Aile Bireylerinde	
STRP Markırları İle Test Edilmesi ve Haplotip Oluşturulması	31
3.2.3.2.1. Haplotip Analizi İçin Polimeraz	
Zincir Reaksiyonu	32
3.2.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi	35
3.2.5. <i>RIPK4</i> Geni Mutasyon Analizi	35
3.2.5.1. <i>RIPK4</i> Geninin PCR İle Amplifikasyonu	35
3.2.5.2. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	38
3.2.6. <i>RIPK4</i> Geninde Bulunan Değişimlerin ARMS Yöntemi	
İle Taranması	39
3.2.6.1. c.362T>A Değişiminin ARMS Yöntemi İle Taranması	40
3.2.6.2. c.551C>T Değişiminin ARMS Yöntemi İle Taranması	41
3.2.7. Biyoinformatik Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Klinik Değerlendirme	44
4.2. Pedigri Analizi	47
4.3. Genom Taraması ve Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi	47
4.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması	47
4.3.2. Bağlantı Bölgelerinin STRP Markırları İle Test Edilmesi ve	
Haplotip Analizi	48
4.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi	50

4.5. <i>RIPK4</i> Geninde Mutasyon Taraması	51
4.5.1. TR_ATMPS Ailesinde <i>RIPK4</i> Mutasyon Analizi	51
4.5.2. TR_BPS Ailesinde <i>RIPK4</i> Mutasyon Analizi	55
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
7. ÖZET	66
8. ABSTRACT	67
9. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Limb pterygium sendromu alt grupları	8
Tablo 2. Popliteal pterygium sendromunun fenotipik özellikleri	9
Tablo 3. Ölümcül tip popliteal pterygium sendromunun fenotipik özellikleri	10
Tablo 4. RIP kinaz ailesi üyelerinin ekspresyon profili ve fonksiyonları	13
Tablo 5. ARMS primeri dizaynında kullanılacak yanlış eşlemelerinin destablizasyon güçleri	18
Tablo 6. TR_ATMPS ailesinde test edilen 21q22.3 kromozom bölgesindeki STRP markır dizileri ve ürün uzunlukları	32
Tablo 7. <i>RIPK4</i> geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları	36
Tablo 8. Döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan amplifikasyon primerleri	38
Tablo 9. c.362T>A değişiminin ARMS ile taranmasında kullanılan primer dizileri	40
Tablo 10. c.551C>T değişiminin ARMS ile taranmasında kullanılan primer dizileri	41
Tablo 11. ATMPS ve BPS'den etkilenmiş bireylerin klinik bulgularının karşılaştırmalı analizi	46
Tablo 12. TR_ATMPS ailesinde rs2838045-rs225444 SNP'lerinin sınırlandığı 0.71 cM'lik bağlantı bölgesi içinde yer alan genlerin ekspresyon profili ve fonksiyonları	51
Tablo 13. DB-1724 numaralı bireyde <i>RIPK4</i> geni üzerinde görülen değişiklikler	52
Tablo 14. DB-2094 (Baba) numaralı bireyde <i>RIPK4</i> üzerinde görülen değişiklikler	56
Tablo 15. DB-2119 (Anne) numaralı bireyde <i>RIPK4</i> üzerinde görülen değişiklikler	56

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bilinen RIP kinaz proteinlerinde görülen aktif bölgeler	12
Şekil 2. Klasik ve alternatif NFκB yolakları	15
Şekil 3. Normal ve mutant dizilere spesifik ARMS primerleri dizaynı	17
Şekil 4. Çalışmaya dahil edilen aileler	21
Şekil 5. 21q22.3 kromozom bölgesinde görülen bağlantı bölgesinin haplotipinin oluşturulmasında kullanılan STRP markırlarının fiziksel yerleşimleri	31
Şekil 6. Aslan tip multiple pterygium sendromlu hasta fenotipleri	45
Şekil 7. Bartsocas-Papas sendromlu hasta fenotipi	45
Şekil 8. TR_ATMPS ailesinde 250K SNP array sonuçlarının VIGENOS ile analizi	48
Şekil 9. TR_ATMPS ailesinde haplotip analizi	49
Şekil 10. TR_ATMPS ailesinde kritik bağlantı bölgesi içerisinde yer alan genler	50
Şekil 11. <i>RIPK4</i> geninin PCR ile amplifikasyonu	52
Şekil 12. <i>RIPK4</i> geninde tanımlanan c.362T>A değişimi kromatogramı	53
Şekil 13. c.362T>A değişiminin TR_ATMPS ailesindeki dağılımının ARMS ile gösterilmesi	53
Şekil 14. <i>RIPK4</i> 'te belirlenen p.Ile121Asn değişimi için <i>in silico</i> analiz	54
Şekil 15. p.Ile121Asn değişimi SIFT analizi	55
Şekil 16. <i>RIPK4</i> geninde tanımlanan c.551C>T değişimi kromatogramı	57
Şekil 17. c.551C>T değişiminin TR_BPS ailesinde ARMS ile gösterilmesi	57
Şekil 18. <i>RIPK4</i> 'te belirlenen p.Thr184Ile değişimi için <i>in silico</i> analiz	58
Şekil 19. p.Thr184Ile değişimi için SIFT analizi	59

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ARMS	Mutasyona Dayanıklı Amplifikasyon Sistemi
ASP	Allele Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ATMPS	Aslan Tip Multiple Pterygium Sendromu
BAFF	B Hücresi Aktivasyon Faktörü
BPS	Bartsocas-Papas Sendromu
chr	Kromozom
cM	Santimorgan
DB	DNA Bankası
dH ₂ O	Distile Su
DIK	Protein Kinaz C-Delta Etkileşimli Protein Kinaz
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik Asid
ELB	Eritrosit Lizis Tamponu
EST	Eksprese Edilmiş Dizi Etiket
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
HaCaT	Erişkin İnsan Keratinosit Hücre Hattı
IKK	İnhibitör Kappa B Kinaz
IRF6	İnterferon Regülatör Faktör 6
IκB	İnhibitor kappa B
LPPS	Ölümcül Tip Popliteal Pterygium Sendromu
MPS	Multiple Pterygium Sendromu
NEMO	Nüklear Faktör kappa B Esansiyel Modülatörü
NF-κB	Nüklear Faktör kappa B

OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
PKC	Protein Kinaz C
PKK	Protein Kinaz C İlişkili Kinaz
PPS	Popliteal Pterygium Sendromu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RIP	Reseptör Etkileşimli Serin-Treonin Protein Kinaz
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
STRP	Kısa Ardışık Tekrar Polimorfizmi
TNFR	Tümör Nekrozis Faktörü Reseptörü
TR_ATMPS	Aslan Tip Multiple Pterygium Sendromu Ailesi
TR_BPS	Bartsocas-Papas Sendromu Ailesi
VIGENOS	Visual Genome Studio
Y2H	Maya İkili Hibrid Taraması

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastalıkların önemli bir kısmını genetik bozukluklar sonucu ortaya çıkan kalıtsal hastalıklar oluşturmaktadır. Bu hastalıklardan sorumlu genlerin tanımlanması, gerek hastalıkların tedavisinde gerekse hastalara genetik danışmanlık verilmesi sürecinde belirleyici olmaktadır. İnsan Genom Projesi sonucunda insan genomunda yaklaşık 20-25.000 gen olduğu gösterilmiştir (1). Günümüze kadar 3000'in üzerinde gen ve 1771 adet gen lokusu hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Buna karşın tanımlanan 1947 hastalık ile ilişkili gen ve lokus bilinmemektedir (2).

Limb pterygium sendromları (LPSs) boyun, dirsek ve/veya dizde eklem hareketliliğini kısıtlayan ağ yapıları ve diğer ektodermal yapılarda kompleks konjenital anomaliler ile karakterize, klinik ve genetik olarak heterojenite gösteren bir grup hastalıktır (3). Popliteal pterygium sendromu (PPS), en iyi karakterize edilen LPS'lerden biri olup otozomal dominant kalıtım göstermektedir. PPS'nin en belirgin özellikleri; sıklıkla görülen dudak-damak yarıkları, popliteal pterygium, el-ayak ve genital bölge anomalileridir (3, 4). PPS'nin otozomal resesif kalıtım gösteren formu daha ağır fenotipik özelliklere sahip olup, genelde yaşamla bağdaşmadığı için ölümcül tip popliteal pterygium sendromu (LPPS) olarak tanımlanmıştır (5). Bartsocas-Papas sendromu (BPS) olarak da bilinen LPPS, popliteal bölgede eklem hareketliliğinde şiddetli kısıtlanmalara neden olan ileri seviyede ağ yapısı, el ve ayak kemiklerinde sinostoz, parmakların hipoplazisi ve sindaktilisi, alt ve üst çene arasında filliform bantlaşma, ankiloblefaron, hipoplastik burun gibi anomaliler ile karakterizedir (5, 6). BPS sıklıkla fetal ya da neonatal dönemde ölümle sonuçlanmasına rağmen, literatürde BPS'den etkilenmiş ve yaşayan vakaların da bulunduğu bildirilmiştir (7, 8, 9).

Aslan tip multiple pterygium sendromu (ATMPS) [OMIM: 605203]; dismofrik yüz görünümü, özellikle popliteal bölgede perdeli deri kıvrımları, bazı eklemlerde fleksiyon kontraktürleri ve multiple konjenital anomalilerle karakterize, otozomal resesif geçişli bir hastalık olup şimdiye kadar sadece bir Türk hastada tanımlanmıştır. ATMPS genel olarak

BPS ile benzerlik göstermekle birlikte, çene kemiklerinde füzyon, medial kant al ağ ve rektal polip gibi anomalilerin varlığı ile BPS'den ayrılmaktadır (10). Geline n aşamada LPPS (BPS) ve ATMP S'den sorumlu genler bilinmemektedir.

Genleri bilinmeyen ve otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıklar, Türkiye gibi akraba evliliklerinin yüksek olduğu toplumlarda önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bizim üzerinde çalıştığımız ATMP S ailesi (TR_ATMP S), akraba evliliğinden doğan ve ATMP S'den etkilenmiş altı bireyin bulunduğu bir ailedir. Bu etkilenmiş bireylerden ikisi halen yaşamaktadır. Ailede yaşayan hastaların ve genetik çalışmalarda informatif olabilecek sağlıklı bireylerin bulunması hastalıktan sorumlu genin tanımlanmasına büyük katkı sağlayacak niteliktedir.

Bu çalışmanın amacı ATMP S'nin tanımlandığı ailede genetik haritalama yöntemlerini kullanarak ATMP S'den sorumlu olan geni tanımlamaktır. Çalışmanın amacına ulaşması durumunda, ATMP S'den sorumlu gen tanımlanmış olacak ve bu durum aynı hastalıktan etkilenmiş olup çalışmamız dışında kalan aileler için de genetik danışma ve doğum öncesi tanı imkanı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genetik Hastalıklar

Hastalıkların önemli bir kısmının etiyolojisini genetik bozukluklar veya genetik bozukluklarla bir araya gelen çevresel olumsuzluklar oluşturmaktadır. Genetik bozuklukların rol oynadığı hastalıklar, genetik materyalin etkilenme şekline bağlı olarak üç grup altında değerlendirilmektedir (11).

Kromozomal hastalıklar, genellikle spontan olarak ortaya çıkmakta ve nadiren kalıtsallık göstermektedir. Spontan olarak gelişen kromozomal bozukluk hastalıklarında düzenli bir kalıtım görülmemektedir. Kromozomların etkilenme şekline bağlı olarak kromozomal bozukluklar, sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları olmak üzere iki alt grupta değerlendirilmektedir. Bu bozuklukların genom üzerinde etkiledikleri bölgeye bağlı olarak fenotipe yansımaları değişkenlik göstermektedir (11).

Multifaktöriyel hastalıklar, genetik bozukluklar ile çevresel olumsuzlukların etkileşimi, birden fazla genetik bozukluğun birlikteliği veya birden fazla genetik bozukluk ile çevresel etkilerin bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır. Bu grup hastalıklarda düzenli bir kalıtım görülmezken, hasta bir bireyin bulunduğu bir ailede ikinci bir bireyin hasta olma riski genel popülasyona göre artış göstermektedir (12).

Tek gen hastalıkları ise sıklıkla mendeliyen kalıtım kalıbı gösteren hastalıklar olup, bu tip hastalıkların ortaya çıkması için tek bir genin bozulması yeterlidir. Birçok hastalıkta birden fazla gen, birbirinden bağımsız olarak tek bir fenotipe neden olabilmektedir. Bu durum genetik heterojenite olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte bir genin farklı mutasyonları da farklı fenotiplere neden olabilmekte ve bu durum fenotipik heterojenite olarak adlandırılmaktadır (13, 14).

Günümüze kadar 3000'in üzerinde gen ve 1771 adet gen lokusu hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Buna karşın 1947 hastalık için sorumlu gen veya lokus tanımlanamamıştır (2).

2.2. Tek Gen Kalıtım Şekilleri

Hücrelerde bir çift olarak bulunan genler bir sonraki kuşağa, anne ve babadan birer allel olacak şekilde aktarılır. Bir bireyin, birbirinin aynısı bir çift allele sahip olması durumu *homozigotluk*, bir normal bir mutant allele sahip olması durumu *heterozigotluk*, iki farklı mutant allel taşıması durumu da *kompound heterozigotluk* olarak adlandırılır. Bu terimler hem bireyler için hem de genotip için kullanılmaktadır (13, 14).

Tek gen hastalıklarının kalıtım kalıbı iki önemli faktöre bağlıdır; a) gen lokusunun otozomal veya cinsiyet kromozomlarında lokalize olması ve b) özelliğin *dominant* veya *resesif* olması. Buna bağlı olarak tek gen hastalıklarının kalıtımı; otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı dominant ve X'e bağlı resesif olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır (13, 14).

2.2.1. Otozomal Dominant Kalıtım

Hastalığın ortaya çıkması için mutasyonun heterozigot olarak taşınması yeterlidir. Hastalık cinsiyet ayrımı yapmaz ve hasta bir bireyin çocuğunun hasta olma olasılığı %50'dir. Hastalık kuşak atlamadan kalıtılır. Ancak mutant allelin taşınmasına rağmen hastalığın fenotipe yansıtılmadığı halde hastalığın bir sonraki kuşakta ortaya çıktığı durumlar da vardır. Bu durum penetrans eksikliği olarak adlandırılır (13, 14).

2.2.2. Otozomal Resesif Kalıtım

Bu tip kalıtım kalıbı gösteren genetik özellikler hem anneden hem de babadan gelen mutant genin çocukta bir araya gelmesi sonucunda ortaya çıkar. Yani özelliğin fenotipe yansması için her iki allelin de mutant olması gerekmektedir. Akraba evliliklerinin sık olduğu toplumlarda bu tip özelliklerin ortaya çıkma ihtimali daha yüksektir. Hastalık cinsiyet ayrımı yapmaz. Taşıyıcı bir anne ve taşıyıcı bir babanın çocuklarının hasta olma olasılığı %25'dir. Aile ağacında, akrabalık hikayesi ve tek bir kuşakta birden fazla hasta bireyin görülmesi otozomal resesif kalıtımı desteklemektedir (13, 14).

2.2.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım

Dişilerde iki adet X kromozomu olduğu için genetik özelliğin tek bir X kromozomunda taşınması fenotipe yansması için yeterli değildir ancak bu bireyler taşıyıcı olurlar. Fakat çok nadir de olsa dişilerde aktif olan X kromozomundaki bir gende mutasyon olması durumunda ortaya çıkan genetik özellikler de bulunmaktadır. Erkekler ise bir X ve bir de Y kromozomu taşımaktadırlar. Erkeklerde X kromozomunda mutant bir genin bulunması halinde, söz konusu genin fonksiyonunu dengeleyecek ikinci bir X kromozomu bulunmadığı için özellik fenotipe yansır. Böylelikle bu kalıtım kalıbında genellikle erkeklerde hastalık fenotipe yansırken, dişiler ise normal fakat taşıyıcıdır (13, 14).

2.2.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım

Bu şekilde kalıtılan özelliklerde X kromozomundaki allellerden sadece birinin mutant olması özelliğin ortaya çıkması için yeterlidir. X'e bağlı resesif kalıttan farklı olarak heterozigot dişilerde özellik fenotipe yansır. Yani özellik erkeklerde hemizigot durumda ortaya çıkarken, dişilerde heterozigot durumda ortaya çıkar. X inaktivasyonu dişilerde genetik özelliğin şiddetinin daha hafif olmasına neden olur. Özelliğin ailesel geçişi tamamen otozomal dominant kalıttan benzer, tek fark hasta erkeklerin erkek çocuklarında hastalığın görülmeyişidir. Hasta annenin çocuklarında hastalığın görülme riski %50 olmakla birlikte hastalık dişi ve erkek çocuklarda eşit dağılım gösterir (13, 14).

2.3. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar

DNA molekülündeki kalıcı değişiklikler *mutasyon*, bu değişiklikler sonucu oluşan ürünler *mutant* olarak adlandırılmaktadır. Tek gen hastalıklarına neden olan mutasyonlar oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Tek bir nükleotidin değişmesi sonucu oluşan mutasyonlar “*nükleotid değişimleri*”, bir veya daha fazla nükleotidin kaybolması “*delesyon*”, artması ise “*insersiyon*” olarak adlandırılmaktadır. Splicing mekanizmasını bozan mutasyon “*splicing bölge mutasyonları*” ve tekrar dizilerindeki artışı ifade eden “*dinamik mutasyonlar*” da tek gen mutasyonlarına örnek olarak verilebilir (15).

2.3.1. Nükleotid Değişimleri

DNA dizisi üzerindeki tek bir bazın, başka bir baz ile yer değiştirmesine nükleotid değişimi denir. Nükleotid değişimi *transisyon* ve *transversiyon* olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Transisyon, baz değişikliğinin pürinden pürine ($A \leftrightarrow G$) veya pirimidinden pirimidine ($T \leftrightarrow C$) olması durumudur. Transversiyon ise baz değişikliğinin pürinden pirimidine ($A \rightarrow T$ / $A \rightarrow C$ / $G \rightarrow T$ / $G \rightarrow C$) veya pirimidinden pürine ($T \rightarrow A$ / $T \rightarrow G$ / $C \rightarrow A$ / $C \rightarrow G$) olması durumudur. Nükleotid değişimleri kodlanan protein üzerindeki etkilerine göre 4 farklı alt gruba ayrılmaktadır (15);

1. Sessiz (silent) mutasyon: Gen üzerindeki baz dizisinde görülen nükleotid değişiminin kodlanan protein üzerinde herhangi bir amino asit değişimine neden olmadığı nokta mutasyonu çeşididir. Bu tip mutasyonlar aynı amino aside karşılık gelen farklı kodonların oluşmasına neden olur (15).

2. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon: Bu tip mutasyonlarda DNA dizisindeki tek bir baz değişikliği bir kodonun farklı bir amino aside karşılık gelen başka bir kodonla yer değiştirmesine neden olur. Böylelikle gen ürünündeki bir amino asit farklı bir amino aside dönüşür (15).

3. Anlamsız (nonsense) mutasyon: Genetik kodda UAG, UGA, UAA olmak üzere 3 adet stop kodonu bulunmaktadır. Bu tip mutasyonlarda tek baz değişikliği bir amino aside karşılık gelen kodonu, sonlanma kodonlarından birine dönüştürür. Bu durum peptid zinciri sentezinin erken aşamada sonlanmasına ve olması gerekenden daha kısa ve/veya fonksiyonel olmayan bir peptid zinciri sentezlenmesine neden olur (15).

4. RNA İşlenmesi (Splicing) Mutasyonu: Transkripsiyon sonrasında DNA'dan sentezlenen işlenmemiş RNA'ya heterojen nüklear RNA (hnRNA) denir. hnRNA'da protein kodlayan ekzon ve protein kodlamayan intron bölgeleri bulunmaktadır. Splicing mekanizması, hnRNA'lardaki intronların kesilip çıkartılarak olgun mRNA sentezi işlemini tanımlamaktadır. İtronların kesilerek çıkartılması ve ekzonların birleştirilmesi, ekzon-intron (AG/verici bölge) ve intron-ekzon (GT/alıcı bölge) birleşme bölgelerindeki özel nükleotid dizileri sayesinde gerçekleşir (15).

Splicing bölge mutasyonları ile var olan splicing bölgesi bozulabilir veya yeni bir splicing bölgesi oluşabilir. Bu mutasyon tipi sonucunda bir ekzon, intron kabul edilerek mRNA dizisinden tamamen ya da kısmen kesilip çıkarılabileceği gibi introndaki bir kısım dizi de ekzon olarak kabul edilerek olgun mRNA'nın yapısına katılabilir. Bu tip mutasyonlar sıklıkla çerçeve kayması (frameshift) mutasyonlarına neden olurlar (15).

2.3.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar

DNA dizisindeki nükleotidlerin eksilmesine *delesyon*, artmasına ise *insersiyon* denilmektedir. Kodlayan bölgede üç ve üçün katları şeklinde olmayan delesyonlar ve insersiyonlar frameshift mutasyonu olarak adlandırılır ve mutasyon noktasından itibaren genetik kodu oluşturan kodonları kaydırarak okuma çerçevesini değiştirirler. Frameshift mutasyonları peptid zincirinin amino asit dizisini büyük ölçüde değiştirmekle birlikte sıklıkla peptid zincirinin erken aşamada sonlanmasına neden olur. Üç ve üçün katları şeklinde olan delesyon ve insersiyonlar ise yalnızca mutasyonun olduğu bölgeden amino asit kaybına veya ilavesine neden olarak peptid zincirinin bir kısmını etkiler. Delesyon ve insersiyonlar, bir nükleotid boyutunda olabildikleri gibi, genin bir kısmının veya tamamının kaybı veya duplikasyonu şeklinde de görülebilir (15).

2.3.3. Trinükleotid Tekrar Artışları

Trinükleotid tekrar artışları kuşaktan kuşağa aktarılırken trinükleotid tekrar dizilerindeki tekrar sayılarının artması durumudur. Trinükleotid tekrar dizilerindeki artışlar ilk olarak mental geriliğin en sık sebeplerinden biri olan frajil X sendromunda rapor edilmiştir. Zaman içerisinde Miyotonik distrofi, X-linked spinal ve bulbar muskular distrofi (Kennedy hastalığı), Huntington hastalığı gibi çeşitli kalıtsal hastalıkların oluşmasında da tekrar artışlarının etkin rol oynadığı görülmüştür (15).

2.4. Limb Pterygium Sendromları

Pterygium terimi, Grek kökenli bir terim olan “pterygion” (kanat) kelimesinden türetilmiş ve ilk olarak 1800’lü yıllarda iki eklem arasında oluşan “kanat benzeri” ağ yapısını tanımlamak için kullanılmıştır. Limb pterygium sendromları (LPSs), alt ve/veya üst ekstremitelerde görülen eklem hareketliliğindeki kısıtlılıklarla birlikte baş, boyun, yüz ve genital bölgelerde kompleks konjenital anomalilerle karakterize, hem genetik hem de klinik olarak heterojenite gösteren nadir bir grup hastalıktır. Hastalık, fenotipik bulgularına ve yaşamla bağdaşıp bağdaşmamasına bağlı olarak yaklaşık 15 farklı alt gruba ayrılmıştır. Bu hastalıklardan bir kısmının etiyojisinden sorumlu gen tanımlanmışken, bir kısmından sorumlu gen halen bilinmemektedir (Tablo 1) (3).

Tablo 1. Limb pterygium sendromu alt grupları (3).

	Sendromun Adı	Kalıtım	OMIM	Sorumlu Gen
1	Popliteal pterygium sendromu	OD	119500	<i>IRF6</i>
2	Antekubital pterygium sendromu	OD	161200	<i>LMX1B</i>
3	Multiple pterygium sendromu, Escobar varyant	OR	265000	<i>CHRNA1</i>
4	Ölümcül tip popliteal pterygium sendromu	OR	263650	Bilinmiyor
5	Ölümcül tip multiple pterygium sendromu	OR, X’e bağlı	253290	<i>CHRNA1, CHRNA1, CHRNA1</i>
6	Multiple pterygium sendromu, X’e bağlı	X’e bağlı, OR	312150	Bilinmiyor
7	Multiple pterygium sendromu, otozomal dominant	OD, OR	178110	Bilinmiyor
8	Multiple pterygium sendromu, Aslan tip	OR	605203	Bilinmiyor
9	Rosselli-Gulienetti sendromu	OR	225000	<i>PVRL1</i>
10	Kuskokwim sendromu	OR	208200	Bilinmiyor
11	Mietens-Weber sendromu	OR	249600	Bilinmiyor
12	Weyers ulnar/oligodaktili sendromu	OD	602418	Bilinmiyor
13	Roberts sendromu	OR	268300	<i>ESCO2</i>
14	Neu-Laxova sendromu	OR	256520	Bilinmiyor
15	Kromozomal defektler	---	---	---

OR; Otozomal resesif, OD; Otozomal dominant

2.4.1. Popliteal Pterygium Sendromu

Popliteal pterygium sendromu (PPS), en sık görülen limb pterygium sendromlarından biri olup otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. PPS'yi diğer limb pterygium sendromlarından ayıran en belirgin özelliklerden birisi popliteal bölgede gözlenen pterygium yapısıdır. Bunun dışında PPS'nin karakteristik özellikleri arasında çeşitli konjenital yüz, iskelet ve ektodermal orijinli doku anomalileri yer almaktadır (Tablo 2) (3, 4). PPS'nin genetik etiyolojisini araştırmaya yönelik olan bir çalışmada, van der Woude sendromu (VWS) [OMIM: 119300] ile ilişkilendirilmiş olan *IRF6* geni üzerindeki mutasyonların PPS'den de sorumlu olabileceği gösterilmiştir (16).

Tablo 2. Popliteal pterygium sendromunun fenotipik özellikleri (3, 4).

Özellik		Açıklama
Kalıtım	-	Otozomal dominant
Baş ve Boyun	Gözler	Konjenital ankiloblefaron
	Ağız	Yarık dudak
		Yarık damak
		Singnati
Genital	Dış genital	Parçalı skrotum
	Erkek,	Hipoplastik skrotum
	Dış genital	Hipoplastik labia majora
	Dişi,	
	İç genital	Kriptorşidizm
	Erkek,	
	İç genital	Hipoplastik vajina
	Dişi,	Hipoplastik uterus
İskelet	Omurga	Spina bifida occulta
	Ayak	Talipes equinovarus
Deri, saç, tırnak,		Popliteal pterygium
		El ve ayak parmaklarında sindaktili
		Ayak tırnaklarında piramit şeklinde deri katlanmaları
		Genital bölgedeki kıllanma anomalileri
Moleküler temel ve gen lokusu		1q32-q41, <i>IRF6</i> (607199) geninde mutasyon

2.4.2. Ölümcül Tip Popliteal Pterygium Sendromu

Ölümcül tip popliteal pterygium sendromu (LPPS), popliteal pterygium sendromunun daha şiddetli formu olup otozomal resesif kalıtım göstermektedir (5). Hastalık ilk olarak 1972 yılında tanımlanmış olup Bartsocas-Papas sendromu (BPS) olarak da adlandırılmaktadır (6).

BPS'nin en belirgin özelliği popliteal bölgede görülen ileri derecedeki ağ yapısıdır. Bu özelliği ile BPS, otozomal dominant kalıtım gösteren PPS'den ayrılmaktadır. Buna ek olarak BPS hastalarında el ve ayak kemiklerinde sinostoz, el ve ayak parmaklarında sindaktili, fasiyal yarık, alt ve üst çene arasında filiform bantlaşma, hipoplazik burun, total alopecia gibi ektodermal orijinli konjenital anomaliler görülmektedir (Tablo 3) (6).

Tablo 3. Ölümcül tip popliteal pterygium sendromunun fenotipik özellikleri (6).

Özellik	Açıklama
Kalıtım	Otozomal resesif
Deri ve iskelet	Belirgin popliteal pterygium
El ve ayaklar	El ve ayak kemiklerinde sinostoz El ve ayak parmaklarında sindaktili Başparmak aplazisi Falangeal hipoplazi Sindaktili
Yüz	Fasiyal yarık Ankiloblefaron Hipoplastik burun Yarık dudak Alt ve üst çene arasında filiform bantlaşma
Saç/tüy	Kaş ve kirpiklerin olmaması
Tırnak	Tırnakların olmaması
Diğer	Sıklıkla neonatal ya da bebeklik döneminde ölüm
Moleküler temel	Bilinmiyor

Literatürde bugüne kadar yaklaşık 30 BPS vakası tanımlanmış olup, bu vakaların büyük çoğunluğu Akdeniz ülkelerinden (Yunanistan, İtalya, İspanya, Türkiye vs.) rapor edilmiştir (6, 7, 8, 17). Ayrıca Akdeniz kuşağı ülkelerinin dışında kalan Hollanda, Güney Afrika, Hindistan, Pakistan ve Suudi Arabistan gibi ülkelere de BPS vakaları rapor edilmiştir (9, 18, 19).

BPS hastalarının genellikle intrauterin veya neonatal dönemde kaybedilmelerine karşın, çocukluk dönemine kadar yaşamış olan vakalar da bildirilmiştir (7, 8, 9).

$p63^{-/-}$ farelerde BPS fenotipine benzer olarak kranofasiyal ve epitel gelişimi anomalileri gözlenmiş ve bu nedenle $p63$ geninin BPS için aday gen olabileceği önerilmiştir (18). Ancak bu durumu doğrulayan bir çalışma yoktur. Geline aşamada BPS'nin genetik etiyolojisi bilinmemektedir.

2.4.3. Aslan Tip Multiple Pterygium Sendromu

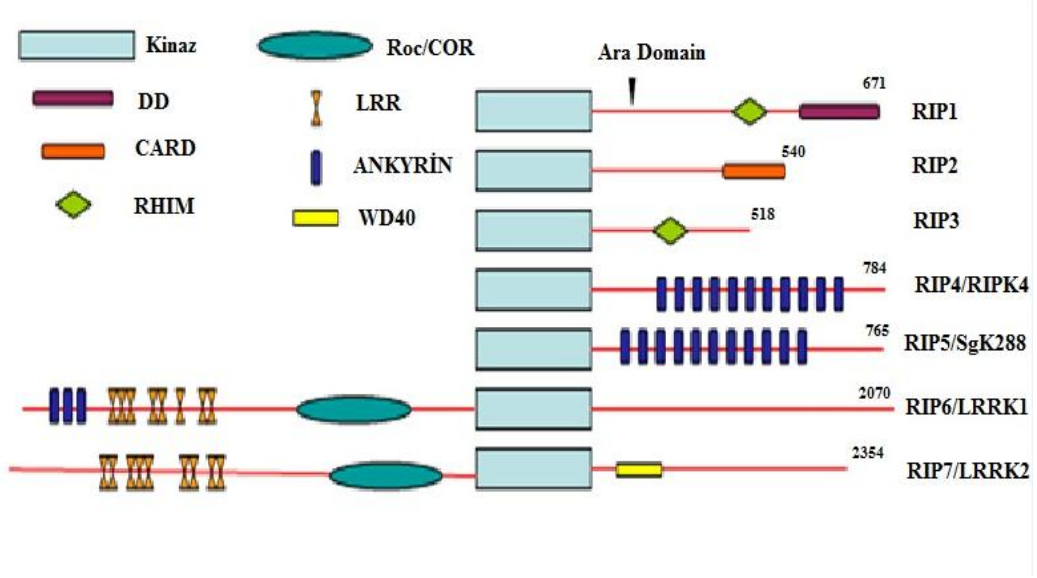
Multiple pterygium sendromunun yeni bir varyantı olarak tanımlanan Aslan tip multiple pterygium sendromu (ATMPS), *Aslan ve ark.* tarafından bir Türk hastada tanımlanmıştır (10). ATMPS otozomal resesif geçişli olup; ektropiyon, yetersiz kaş ve kirpik gelişimi ile birlikte tüm vücutta görülen tüy kayıpları, özellikle popliteal bölgede şiddetli pterygium, oral/nazofarangeal boşlukların hipoplazisi, çene kemiklerinde füzyon, burun hipoplazisi, avuç içi ve parmak çizgilerinin yokluğu, tüm parmaklarda sindaktili, el ve ayak kemiklerinde sinostoz, ayaklar arasında filiform band, skapula hipoplazisi, anormal parmak gelişimi, blefarofimozis, mikrognati, kısa boy ve boyun, rektal polip, medial kantal ağ ve hipoplazili labia majora gibi anomaliler ile karakterizedir (10).

ATMPS'nin fenotipik bulguları, BPS'nin fenotipik bulguları ile belirgin bir şekilde benzerlik göstermektedir. Ancak ATMPS'nin oral/nazofarangeal boşlukların hipoplazisi, çene kemiklerinde füzyon, ayaklar arasında filiform band, rektal polip ve medial kantal ağ gibi anomalilerin varlığına bağlı olarak BPS'den farklı bir sendrom olabileceği önerilmiştir (10). Geline aşamada ATMPS'den sorumlu gen bilinmemektedir.

2.5. Reseptör Etkileşimli Serin-Treonin Protein Kinazlar

Protein kinazlar sahip oldukları fosforilleme yeteneği ile ökoryotik hücrelerde dış uyaranlara verilen cevabın düzenlenmesinde görev alan geniş bir protein ailesidir (20). Günümüze kadar 500'ün üzerinde protein kinaz tanımlanmıştır. Korunmuş kinaz domainlerini oluşturan amino asit dizilerinin benzerliğinden hareketle farklı protein kinaz aileleri tanımlanmıştır (21).

Bu protein kinaz ailelerinden birini serin-treonin kinaz aktivitesine sahip olan *reseptör etkileşimli protein kinaz (RIP kinaz)* ailesi oluşturmaktadır. RIP kinaz ailesinin; RIP1, RIP2, RIP3, RIP4 (RIPK4), RIP5 (SgK288), RIP6 (LRRK1), RIP7 (LRRK2) olmak üzere günümüze kadar tanımlanmış yedi üyesi bulunmaktadır. RIP kinazların ortak özelliği hepsinin serin-treonin kinaz aktivitesine sahip bir kinaz domaini bulundurmalarıdır. Kinaz domainleri dışında her bir RIP kinazın kendine özgü aktif bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 1) (22).



Şekil 1. Bilinen RIP kinaz proteinlerinde görülen aktif bölgeler. Kinaz; Kinaz domaini, DD; Ölüm domaini, CARD; Kaspaz katılım domaini, RHIM; Reseptör homotipik etkileşim motifi, LRR; Lösin tekrarları, ANKYRİN; Ankyrin tekrarları, WD40; Triptofan-aspartik asit tekrarları (22).

RIP kinazlar insan ve farede eksprese olduğu dokulara göre hücre ölümü, DNA tamir mekanizması, inflamasyon ve farklılaşma gibi birçok metabolik olayda rol almaktadırlar (Tablo 4) (22).

Tablo 4. RIP kinaz ailesi üyelerinin ekspresyon profili ve fonksiyonları (22).

<i>RIP</i> kinaz üyesi	Kromozom		Eksprese olduğu dokular	Fonksiyonu
	<i>İnsan</i>	<i>Fare</i>		
RIPK1	6p25.2	13B3	Karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, kalp, lenf nodları, timüs, dalak, testis	TNF aracılı NF- κ B yolağı aktivasyonu
RIPK2	8q21.3	4A2	Beyin, böbrek, akciğer, kalp, lenf nodları, testis, dalak, prostat, pankreas, testisi, periferik kan	Kaspas-8 aracılı apoptosis NF- κ B yolağı aktivasyonu
RIPK3	14q11	14B1	Pankreasta yüksek seviyede, kalp, böbrek, akciğer, testis, dalak, iskelet kası	Apoptozun ilerletilmesi
RIPK4	21q22.3	16F2	Deri, Timüs, tiroid, prostat, kalp, bronş epitel hücreleri, karaciğer, böbrek , akciğer, testis	Keratinosit farklılaşması NF- κ B yolağı aktivasyonu
RIPK5	1q32.1	1E4	Akciğer, tiroid, uterus,	Hücre ölümü

RIPK4, ilk olarak insan keratinosit hücre hatlarından (HaCaT) elde edilen cDNA kütüphanesi ile fare orijinli protein kinaz C (PKC) izoformu olan PKC δ 'nın katalitik bölgesi arasındaki etkileşimin gösterildiği maya ikili hibrid (Y2H) taramasında klonlanmış ve *PKC-delta etkileşimli protein kinaz (DIK)* olarak adlandırılmıştır (23). Başka bir çalışmada RIPK4'ün faredeki ortoloğunun, PKC'nin diğer bir izoformu olan PKC β 'nın katalitik domaini ile etkileştiği gösterilmiş ve *PKC ilişkili kinaz (PKK)* olarak adlandırılmıştır (24). DIK ve PKK'nın kinaz domainleri arasındaki ve bu kinaz domainlerinin daha önce tanımlanmış olan RIP kinaz ailesi üyelerinin kinaz domainleri ile arasındaki benzerlikten yola çıkılarak DIK ve PKK insanlarda ve farelerde *reseptör etkileşimli serin-treonin kinaz 4 (RIPK4/Ripk4)* olarak yeniden isimlendirilmiştir (25, 26, 29).

RIPK4, 784 amino asitten oluşan, 87 kDa moleküler ağırlıklı, amino ucunda serin-treonin kinaz domaini ve karboksil ucunda 11 ankyrin tekrarı bulunan bir proteindir. Kinaz domaini ve ankyrin tekrarları arasında ise kaspazlar tarafından iki yerden kesilebilen bir ara bölge bulunmaktadır (Şekil 1) (23, 24).

Ripk4, farelerde birçok dokuda eksprese olmakla birlikte, en fazla ekspresyonunun bazal ve suprabazal epidermiste olduğu gösterilmiştir. *Ripk4* epidermis hücrelerinin

sitoplazmasında lokalize bir proteindir. Epidermisin farklı katmanlarındaki *Ripk4* ekspresyon düzeyi epidermal farklılaşma sürecine bağlı olarak azalmaktadır (24, 27).

Ripk4 knock-out (Ripk4^{-/-}) farelerin fetüs aşamasında ağız, yüz, burun, kuyruk gibi bölgelerinde anormal epidermal farklılaşma sebebiyle çoklu anomaliler rapor edilmiştir. Ayrıca ağız bölgesindeki birleşmeden dolayı farelerin çoğunun solunum yolu tıkanıklığı sebebiyle öldüğü belirtilmiştir (26, 28). Tüm bu veriler dikkate alındığında RIPK4'ün epidermal homeostasisin sağlanmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

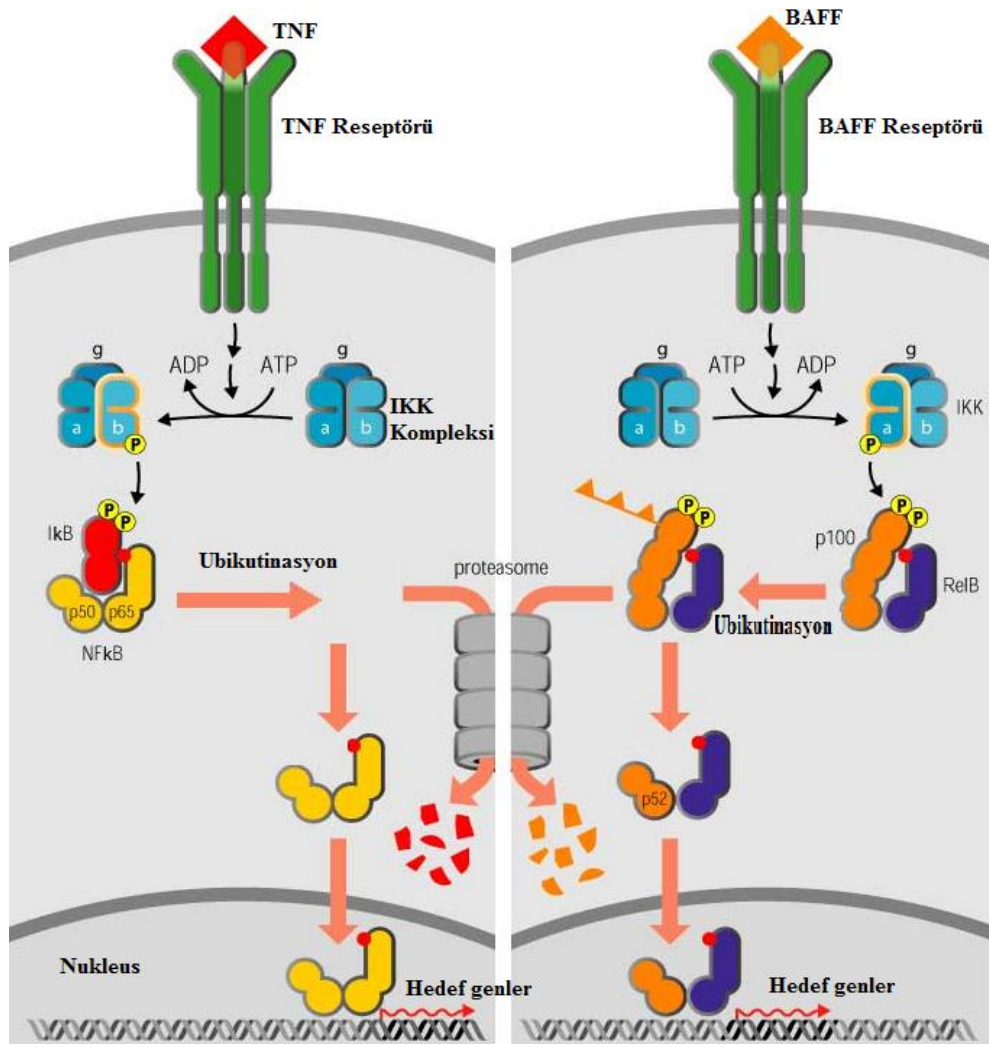
2.6. RIPK4, NF-κB Yolağı ve Keratinosit Farklılaşması

RIPK4'ün hangi molekül tarafından aktive edildiği ve hangi moleküllerin aktifleştirilmesinde rol aldığı hakkında sınırlı bilgiye sahip olmamıza rağmen, RIPK4'ün PKC bağımlı nükleer faktör kappa b (NF-κB) yolağında aracı bir molekül olarak epidermal farklılaşmada rol aldığı bilinmektedir (26, 27, 28). RIPK4'ün amino ucunda bulunan kinaz domaini NF-κB sinyal yolağının aktivasyonunda belirleyici role sahiptir (25, 29, 30).

Nükleer faktör-κB; birbiri ile benzer 5 farklı proteinin (NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100, p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel) homo veya heterodimerlerinden oluşmaktadır. NF-κB alt birimleri Rel homoloji domaini olarak adlandırılan korunmuş bölgeler içermektedirler (31). NF-κB ailesi üyelerinin oluşturduğu homodimer ya da heterodimer yapı, hücreye herhangi bir uyarının gelmediği durumlarda sitoplazmada inhibitör kappa B (IκB) moleküllerinden birine (IκBα, IκBβ, IκBε) bağlı olarak inaktif halde bulunur (32). TNFα, IL-1α, UV, γ radyasyonu ve patojen enfeksiyonu gibi uyarılarda, NF-κB alt birimlerine bağlı bulunan IκB'ler, iki adet katalitik alt birim (IKKα ve IKKβ) ve bir adet regülatör alt birimden (IKKγ/NEMO) oluşan IκB kinaz (IKK) kompleksi tarafından fosforillenir. IκB fosforillendikten sonra NF-κB alt birimleri serbest kalır. Serbest kalan NF-κB dimerleri, sitoplazmadan çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin eksprese edilmesini sağlar (33, 34, 35).

NF-κB ailesi üyeleri memelilerde immun sistem ve inflamasyonda görev aldıkları gibi farklı tipteki hücrelerin çoğalma, sağkalım ve apoptoz mekanizmalarında da rol almaktadırlar (31, 32, 36, 37). NF-κB ailesi alt birimlerinin oluşturduğu kombinasyonlar farklı fizyolojik olaylarda rol almaktadır (31, 32). Klasik NF-κB yolağında hücreye herhangi bir uyarının gelmediği durumlarda p50/p65 heterodimeri IκB molekülleri tarafından baskılanmaktadır. Hücrenin TNFα molekülü tarafından uyarılması ile IKKβ,

I κ B moleküllerini belirli rezidülerinden fosforillenmektedir. Fosforillenen I κ B molekülleri proteozomlar ubikutinlenerek tarafından   ertlenerek parçalanır. Serbest kalan p50/p65 heterodimeri nükleusa taşınarak hedef genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Alternatif NF- κ B yolağında ise NF- κ B alt birimleri I κ B molekülleri tarafından baskılanmamaktadır. Bu yolda p52'nin öncül molekülü olan p100 heterodimer oluşturduğu bir diğer NF- κ B alt birimi olan RelB'nin baskılanmasına neden olmaktadır. Hücrenin TNF ailesi  yesi olan B hücresi aktivasyon faktörü (BAFF) tarafından uyarılması ile p100 molekülü IKK α tarafından belirli rezidülerinden fosforillenmektedir. Fosforillenen p100 molekülünün belirli bölgesi kesilip atılarak p52 formuna dönüştürülür. Böylelikle serbest kalan p52/RelB heterodimeri nükleusa taşınarak hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir ( ekil 2) (37).



Şekil 2. Klasik ve alternatif NF- κ B yolakları
(<http://www.stat.rice.edu/~siefert/Research/NfKB.html>).

Ikk β ^{-/-} farelerde herhangi bir epidermal anomali gözlenmemekte ve bu fareler normal vücut büyüklüğü ve morfolojiye sahip olmaktadır (38, 39). Buna karşın *Ikk α ^{-/-}* farelerin kuyruk, ön ve arka ekstremiteleri ve çeşitli kranofasiyal kemikleri normal farelere göre daha kısadır. Ayrıca *Ikk α ^{-/-}* farelerin derilerinde parlaklık ve anormal tüy gelişimi gibi epidermal anomaliler gözlenirken, bu farelerin iç organlarında herhangi bir hasar oluşmamaktadır. Bu durum IKK α 'nın el-ayak gelişimi, epidermal keratinositlerin çoğalması ve farklılaşmasında görev alabileceğini göstermektedir (40, 41, 65).

2.7. Moleküler Genetik Yöntemler

2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA'nın *in vitro* koşullarda çoğaltılması işlemidir. PCR yeni bir teknik olarak, Kary Banks Mullis tarafından 1985'te keşfedilmiştir. PCR, aynı yıl *Saiki ve ark.* tarafından bir hastada orak hücre anemisi tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur (42). Yöntemde ilk olarak DNA'nın çoğaltılmak istenen bölgesi, karşılıklı her iki zincirin 3' ucuna komplementer olan yapay oligonükleotidler (primerler) ile sınırlandırılır. Sınırlandırılan bölgenin amplifikasyonu, çift zincirli kalıp DNA'nın ısı ile tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon), ısının düşürülmesiyle yapay oligonükleotidlerin kalıp DNA'ya bağlanması (annealing) ve DNA sentezi için gerekli dNTP ve DNA polimeraz'ın varlığında primerlerin 3'OH uçlarından uzaması (extention) olmak üzere üç basamakta gerçekleştirilir. Bu üç basamak bir döngü olarak kabul edilir ve her başarılı döngüde istenilen bölgedeki DNA miktarı iki katına çıkar. PCR ortalama 30-35 döngüde tamamlanır. Ortamdaki DNA miktarı 2ⁿ (n=döngü sayısı) şeklinde hesaplanır. PCR ile istenilen DNA fragmentinden milyarlarca kopya elde edilebilir. PCR tek başına bir mutasyon tarama metodu olmamakla birlikte, mutasyon tarama yöntemlerinin ön hazırlık aşamasını oluşturmaktadır (43, 44, 45).

2.7.2. Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi

Amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi (ARMS), DNA dizisinde bilinen bir nokta mutasyonunun (missense, nonsense değişimler ve küçük delesyon/insersiyonlar) var olup olmadığını göstermede kullanılan bir mutasyon tarama yöntemi olmakla birlikte allele spesifik PCR (ASP) olarak da adlandırılır. Yöntem ilk kez *Newton ve ark.* tarafından 1989

yılında uygulanmıştır (46). ARMS, PCR amplifikasyonunda kullanılacak primerlerin 3'-OH uçlarındaki nükleotidlerin komplementer DNA ile hibridize olup olmamaları prensibine dayanır. ARMS, PCR'a dayalı bir yöntem olmakla birlikte yapılan reaksiyonlarda normal diziye ve mutant dizisiye spesifik primerler kullanılır. PCR iki paralel reaksiyon şeklinde gerçekleştirilir. Birinci primerin 3'-OH ucu normal tip DNA'nın komplementeri, ikinci primerin 3'-OH ucu mutant tip DNA'nın komplementeri olacak şekilde tasarlanır. Bunların dışında yöntem her iki primer için ortak bir primer (common primer) gerektirir. Dizayn edilen primerler hedef DNA ile hibridize olabildiklerinde PCR'da primer olarak fonksiyon gösterebilmektedir. Ancak 3'-OH ucundaki yanlış eşleşmeler her zaman amplifikasyonu engellememektedir. Bu nedenle primer dizisinin 3'-OH ucundan ikinci, üçüncü veya dördüncü nükleotidi değiştirilerek kasıtlı yanlış eşleşmeler oluşturulur. Böylelikle primerin spesifikliği artırılır (Şekil 3) (47) .

	Normal sequence	Mutant sequence
Normal primer	$\begin{array}{c} \leftarrow C^C \text{ AGATAG} \dots 5' \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{G} \text{CTCTATCGCGAT} \dots 3' \\ 482 \end{array}$	$\begin{array}{c} X^C \text{ AGATAG} \dots 5' \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{A} \text{CTCTATCGCGAT} \dots 3' \\ 482 \end{array}$
Mutant primer	$\begin{array}{c} X^T \text{ AGATAG} \dots 5' \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{G} \text{CTCTATCGCGAT} \dots 3' \\ 482 \end{array}$	$\begin{array}{c} \leftarrow T^C \text{ AGATAG} \dots 5' \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{A} \text{CTCTATCGCGAT} \dots 3' \\ 482 \end{array}$

Şekil 3. Normal ve mutant dizilere spesifik ARMS primerleri dizaynı. Normal diziye spesifik normal primerde C/C yanlış eşleşmesine rağmen reaksiyon gerçekleşmiş iken; normal diziye spesifik mutant primerde bulunan C/C ve G/T yanlış eşleşmeleri zincirin sonlanmasına neden olmuştur. Mutant diziye spesifik normal primerde C/C ve A/C yanlış eşleşmesi zincirin sonlanmasına neden olurken; mutant diziye spesifik mutant primerde bulunan C/C yanlış eşleşmesi reaksiyonun sonlamasına içi yeterli olmamıştır. $\leftarrow$ normal veya mutant dizinin Taq DNA polimeraz enzimi tarafından uzatıldığını; X normal veya mutant dizinin uzamasının sonlandığını göstermektedir (47).

ARMS primerleri 30 veya daha fazla nükleotidden oluşmalı ve reaksiyon sonrasındaki PCR ürünlerinin uzunlukları 150-250 bp arasında olmalıdır. Bunların dışında ARMS primeri tasarlanmasındaki en kritik nokta, dizi ile primer arasındaki yanlış baz eşleşmelerin nasıl yapılması gerektiğidir. Normal diziye ya da mutant diziye spesifik primerlerdeki tek bazlık yanlış eşleşme reaksiyonun durdurulması için yeterli olmayacaktır (Şekil 3). Bu nedenle mutant diziye spesifik primer ve normal dizi ile yapılan reaksiyonun durdurulması için tasarlanan primerin son iki bazında destabilizasyon gücü yüksek yanlış eşleşmelerin yapılması gerekmektedir (Tablo 5) (47).

Tablo 5. ARMS primerlerindeki yanlış baz eşleşmelerin destabilizasyon güçleri (47).

Destabilizasyon gücü	Yanlış baz eşleşmesi
Maksimum	GA, CT, TT
Güçlü	CC
Orta	AA, GG
Zayıf	CA, GT
Yok	AT, GC

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile kolay ve hızlı bir şekilde görünür hale getirilir. Sonuç olarak normal ve mutant primerlerle yapılan reaksiyonlar sonrasında sadece normal primerlerle yapılan reaksiyonda ürün görülüyorsa birey homozigot normal; sadece mutant primerlerle yapılan reaksiyonda ürün görülüyorsa birey homozigot mutant; her iki reaksiyonda da ürün görülüyorsa birey heterozigot olarak değerlendirilir (48, 49).

2.7.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi günümüzde en sık kullanılan mutasyon tarama yöntemlerinden biridir. Mutasyonların belirlenmesi amacıyla uygulanan DNA dizi analizleri 1977 yılında *Alan Maxam-Walter Gilbert* tarafından geliştirilen “kimyasal” ve yine aynı yılda *Frederick Sanger ve ark.* tarafından geliştirilen “enzimatik” metotlar olarak ikiye ayrılır (50, 51). Kullanma kolaylığı ve hassasiyeti açısından günümüzde tercih edilen metot F. Sanger’in enzimatik yöntemi olup “Sanger” veya “dideoksinükleotid” yöntemi olarak da adlandırılmaktadır.

2.7.3.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi

Dideoksinükleotidler, şeker alt biriminin 2 ve 3 numaralı karbonlarında hidroksil (OH) grubu taşımayan, suni nükleotid molekülleridirler. Buna karşılık, doğal bir deoksiribonükleotid şeker alt birimi 3 nolu karbonunda hidroksil grubu taşımaktadır. DNA replikasyonu sırasında, replikasyona katılacak olan nükleotid kalıp DNA tarafından belirlenir. Kalıp DNA zinciri ile baz eşleşmesi yapabilen nükleosid trifosfat, 5'α- fosfat grubu ile büyüyen zincirin son nükleotidinin 3'-OH grubuna fosfodiester bağı ile bağlanır. Büyüyen zincirin sonuna dideoksinükleotid eklenecek olursa, daha sonra gelecek olan nükleotid, büyüyen zincir ile fosfodiester bağı kuramayacak ve DNA sentezi duracaktır. Sonuç olarak, Sanger yöntemi; dideoksinükleotidin DNA sentezini durdurması prensibi üzerine kurulmuştur (50). Sekans reaksiyonları, yeni teknolojiler sayesinde otomatize edilerek floresan boyalar ile görüntülenmektedirler (52).

2.7.4. Genetik Haritalama

Genetik haritalama en basit anlamıyla genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimlerinin (lokus) belirlenmesi işlemidir (54).

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler sayesinde, genomu yüksek çözünürlükte taramaya imkan veren birçok polimorfik markır tanımlanmıştır. Genom taraması için genom üzerinde bulunan kısa ardışık tekrar polimorfizmleri (STRP) ya da SNP'ler kullanılmaktadır. Ancak SNP markır panelleri çok sayıda markır içermeleri, hızlı ve etkin bir yöntem olan DNA çip teknolojisini kullanmaları yönü ile bugün en fazla tercih edilen yöntem olmuştur. Tüm yöntemlerde ortak nokta genomda lokalizasyonu bilinen polimorfik markırların kuşaklar arası aktarımını takip etmek ve bu markırların hastalıkla birlikte kalıtılıp kalıtılmadığını gözlemlemektir (54, 55).

Günümüzde bir çok biyoteknoloji firması tarafından, genom üzerinde binlerce SNP taraması yapabilecek cipler ve bu taramalardan elde edilen veriyi değerlendirebilecek bilgisayar yazılımları geliştirilmiştir. Bu sayede kısa bir süre içinde geniş bir ailedeki genetik bilginin kuşaklar arasındaki geçişi ve dağılımı haplotiplerle ortaya konulabilmektedir (56).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilecek Aile Bireylerinin Belirlenmesi

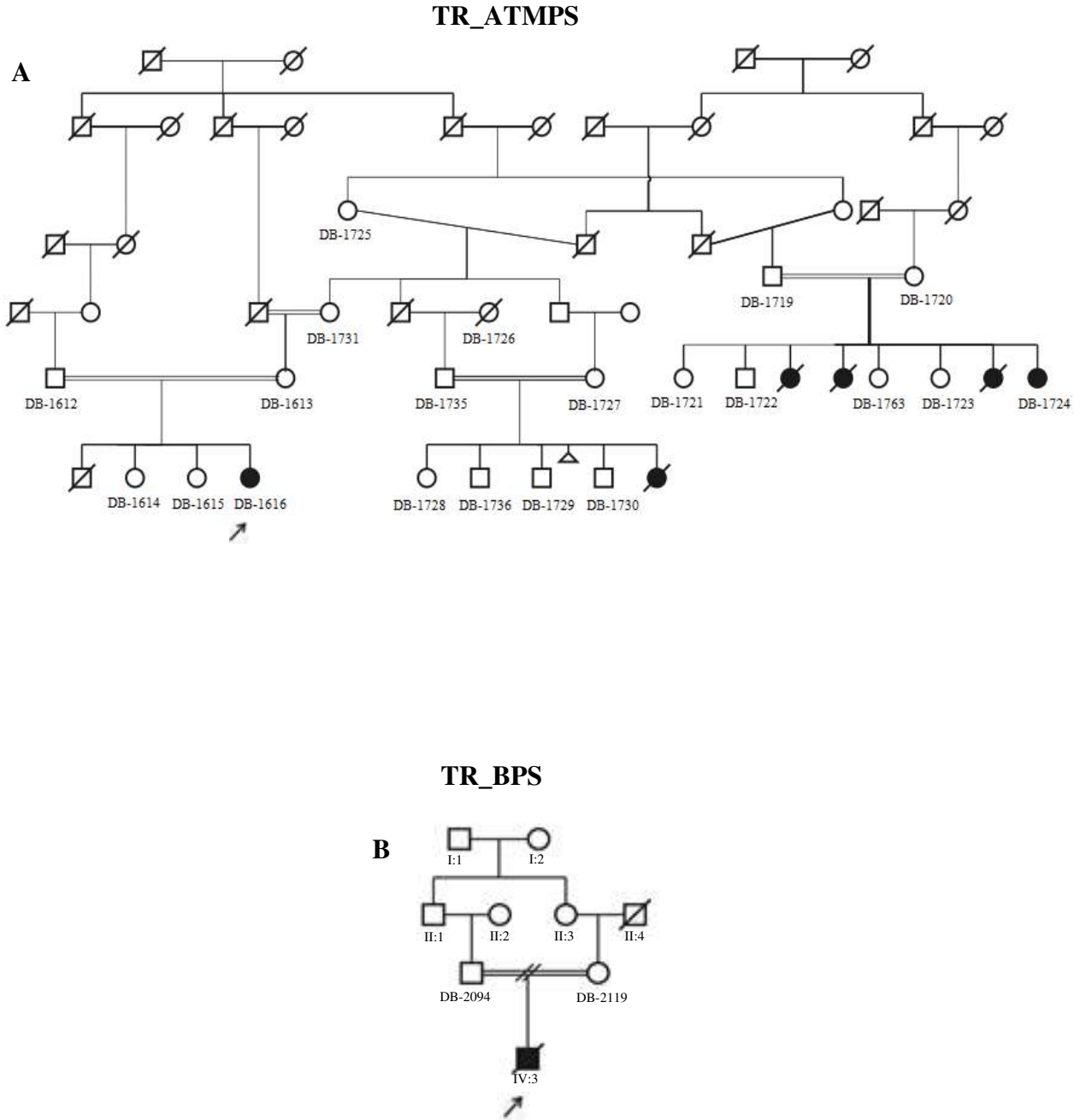
Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı arasındaki işbirliği ile gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi'ne 1998 yılında çok sayıda konjenital anomali ile müracaat eden ve multiple pterygium sendromunun yeni bir varyantı [OMIM: 605203] olarak rapor edilen bir hasta (10) ile yine aynı üniteye 2010 yılında başvuran, benzer fenotipik özelliklere sahip ikinci bir hastanın bulunduğu ve toplam 21 bireyden oluşan bir aile (TR_ATMPS) değerlendirildi (Şekil 4A).

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Genetik Bilim Dalı'na başvuran ve Bartsocas-Papas sendromu tanısı konulmuş ancak yaşamayan bir bireyin bulunduğu ikinci bir aile (TR_BPS) çalışmaya dahil edildi (Şekil 4B).

TR_ATMPS ve TR_BPS ailelerinin aile ağaçları Cyrillic v3.1 pedigree çizim programı kullanılarak oluşturuldu. Her bir bireyden alınan periferik kan örneğinden izole edilen DNA örneği DB-XXXX şeklinde kodlanarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı DNA bankasında kayıt altına alındı ve her bir bireye ait DNA örneğinin kayıt numarası ilgili aile ağacı üzerinde gösterildi (Şekil 4A ve Şekil 4B).

Ailesinde Aslan tip multiple pterygium ve/veya Bartsocas Papas sendromu öyküsü bulunmayan 335 birey bu çalışmanın kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen bütün bireylere çalışma ve olası sonuçları hakkında bilgi verilerek, her bireyden çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını belgeleyen *Gönüllü Onam Formu* alındı. Araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Dosya No: 2011/5).



Şekil 4. Çalışmaya dahil edilen aileler. A) TR_ATMPS aile ağacı, B) TR_BPS aile ağacı.

3.1.2. Kimyasallar

SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO ₃)	AppliChem, A2375.1000
Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	AppliChem, A2264.1000
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Merck, 1.01547.0.100
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Proteinaz K	Promega, V3021
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Glacial asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Orange G	Sigma, O-1625
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Mey, Türkiye
Deoksinukleotid triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
GoTaq® Flexi DNA polimeraz	Promega, M8305
Oligonucleotid primer	IDT
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, 4311320

3.1.3. Kitleler

NucleoSpin® Extract II	Macharey-Nagel, 740 609 250
ABI PRISM®BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, 4336917
3130 POP-7™ Polymer	Applied Biosystems, 4352759
GeneScan™ DS-33 Installation Standard 6-FAM™, VIC™, NED™ ve PET™ Floresan boyaları	Applied Biosystems, 4330397
GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard	Applied Biosystems, 4322682

3.1.4. Cihazlar

Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	CONSORT E833, Belçika
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet)	Eppendorf 5804, Almanya
Yüksek devirli santrifüj (2 adet)	Eppendorf 5810, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
UV translüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, KODAK, ABD
Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
Dijital otomatik pipet	Socorex, İsveç
Hassas terazi	AHAUS, ABD
pH metre	Hanna, Portekiz
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Buz makinesi	Scotmann, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD 554, Türkiye
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Derin dondurucu (-20)	Bosh, Türkiye
Derin dondurucu (-20)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-85)	Thermo, ABD
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Termocycler	GeneAmp PCR System 9700, AB, ABD
Termocycler	Techne Genius, İngiltere
Genetik analiz cihazı	3130 Genetic Analyzer, ABI
Termomikser (ısıtıcı blok)	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya

3.1.5. Sarf Malzemeleri

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Muhtelif Firma
Mikrosantrifüj tüpler	Axygene, ABD
K ₃ EDTA'lı tüpler (mor kapaklı)	Vacutainer
Falkon Tüpler (50 ml)	Greiner Bio-One, Almanya
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD

3.1.6. Solüsyonlar

3.1.6.1. DNA İzolasyon Solüsyonları

1. Eritrosit Lizis Tamponu (ELB) (10X) (pH 7.4)

155 mM	NH ₄ Cl
10 mM	KHCO ₃
0.5 M	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

82.9 g	NH ₄ Cl
10 g	KHCO ₃
20 ml	0,5 M Na ₂ EDTA

800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

10X stok solüsyonundan 50 ml alınıp son hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı. 121°C' de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

2. Nuclei Lizis Tamponu (NLB) (pH 8.2)

10 mM	Tris-Base
400 mM	NaCl,
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 g Tris-Base

23.4 g NaCl

0.74 g Na₂EDTA 800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

3. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris-HCl

1 mM CaCl₂***Hazırlanışı:***

0.788 g Tris-HCl

0.011 g CaCl₂ 80 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

4. Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)***Hazırlanışı:***

Proteinaz K çözeltisi buz üzerinde, 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda 100 mg Proteinaz K çözülerek hazırlandı. Proteinaz K çözeltisi 600 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere bölündükten sonra -20°C'de saklandı.

5. %10'luk (w/v) Sodyum Dododesil Sülfat (SDS) Solüsyonu***Hazırlanışı:***

10 g SDS tartıldıktan sonra son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68°C'de ısıtılarak çözüldü, 0.22 µm'lik mikrofiltre ile steril edildi.

6. Sodyum Klorür (6 M)

Hazırlanışı:

58.4 g NaCl 30 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

7. 0.1M Na₂EDTA (pH 8.0)

Hazırlanışı:

37,22 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü, 10M'lik NaOH ile pH 8.0'a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

8. 1M Tris-HCl (pH 7.4)

Hazırlanışı:

157.6 g Tris-HCl 800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

9. TE Tamponu (pH 7.5)

10 mM	Tris HCl
1mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

0.394 g Tris-HCl
0.093 g Na₂EDTA 100 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.5'ye ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize sui le 250 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

3.1.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH~ 8.5):

50X stok solüsyon hazırlanışı:

242 g Tris base

37.2 g Na₂EDTA·2H₂O

57.1 ml Glasial asetik asit deiyonize su kullanılarak 800 ml'de çözüldü, NaOH ile pH 8,5'e ayarlandı, son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

100 ml 50X TAE tamponuna 4900 ml deiyonize su eklenerek son hacim 5 L'ye tamamlandı.

2. Etidyum Bromid Solüsyonu:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan korunarak muhafaza edildi.

3.1.6.3. Yükleme Tamponları

1. 10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

20 g Sukroz 40 ml dH₂O içinde çözüldü.

100 mg (0.1 g) Orange G yukarıdaki solüsyon içerisinde çözüldükten sonra son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Gönüllü Onam Formu'nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden tüm bireylerden 10 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere periferik kan örneği alındı. DNA izolasyonu “yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme” (Salting Out) standart protokolü ile aşağıdaki gibi yapıldı (57);

I. Gün

1. 10 ml'lik K₃EDTA'lı steril tüplerdeki periferik kan, 50 ml'lik steril falkon tüplere aktarıldı.
2. Steril falkon tüplerdeki kan üzerine 40 ml ELB eklendikten sonra tüpler hafifçe çalkalandı.
3. Falkon tüpler buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
4. Santrifüjün sıcaklığı 4°C'ye ayarlandı.
5. Falkon tüplerde bulunan, üzerine ELB eklenmiş kanlar 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
6. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant %10'luk çamaşır suyu konulmuş behere döküldü. Bu şekilde bir gece bekletilerek dezenfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra atık uzaklaştırıldı.
7. Tüpte kalan pellet üzerine 40 ml ELB eklendi ve kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı.
8. İyice çalkalanan falkon tüpler 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
9. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
10. Falkon tüpte kalan pellet üzerine 25 ml ELB eklendikten sonra tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı ve 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
11. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
12. Eğer pellet temizlenmemiş ve tüpün dibinde halen fazla miktarda eritrosit var ise 10. ve 11. basamaklar tekrarlandı.
13. Süpernatantı uzaklaştırılmış pellet üzerine 4 ml NLB ve 120 µl proteinaz K eklendi.
14. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak pellet dağılına kadar tüpler çalkalandı.
15. Son olarak tüplere 425 µl SDS eklendi.

16. Falkon tüplerin kapakları kapatılarak birkaç kez köpürtülmeden alt-üst edilerek 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

II. Gün

17. Falkon tüpler etüvden çıkartıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
18. Genomik DNA'ların -80°C'de saklanabilmesi için 2 ml'lik contalı kriyotüplerin üzerlerine DNA banka numaraları yazıldı.
19. Her bir falkon tüpe 1.4 ml 6M NaCl eklendi, kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra 15 saniye çok hızlı bir şekilde çalkalandı.
20. Örnekler 20°C'de 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi.
21. Süpernatant yavaşça yeni 50 ml'lik temiz falkon tüplere aktarıldı. Altta kalan pelletin (tuz + protein) temiz tüpe alınan supernatant ile karışmamasına dikkat edildi.
22. Temiz tüpe alınan supernatant 20°C'de 15 dakika 6000 rpm'de tekrar santrifüj edildi.
23. Süpernatant tekrar temiz falkon tüpe aktarıldı.
24. Yeni falkon tüpe alınmış süpernatantların üzerine 3 katı kadar %96'lık etil alkol eklendi.
25. Kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler 1-2 dakika bekletildikten ve yavaş bir şekilde alt-üst edildikten sonra görünür hale gelen genomik DNA bir araya getirildi.
26. Falkon tüp içinde bir araya gelmiş olan genomik DNA pipet yardımıyla 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak üzerine 500 µl %70'lik etil alkol eklendi.
27. 1.5 ml'lik eppendorf tüpün kapağı kapatıldıktan sonra alt-üst edildi ve mikrosantrifüjde 45 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edilerek DNA pelletinin çöktürülmesi sağlandı.
28. Eppendorf tüplerde kalan %70'lik etil alkol pipetle uzaklaştırıldı.
29. Eppendorf tüpler, kapaklarındaki kalıntı alkol uçana kadar açık tutularak kurumaya bırakıldı. Alkol uçtuktan sonra genomik DNA'nın üzerine 500 µl TE buffer ilave edildi.
30. TE buffer eklendikten sonra tüpler genomik DNA'nın homojen hale gelmesi için 2 gün +4°C'de bekletildi. Tüpler aralıklarla alt-üst edildi.
31. Elde edilen genomik DNA'lar moleküler analizlerde kullanılıncaya kadar -20°C'lik veya -80°C'lik derin dondurucularda saklandı.

3.2.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre İle Konsantrasyonunun Ölçümü ve Ayarlanması

Elde edilen genomik DNA örneklerinden çalışma solüsyonu hazırlamak için “1 hacim” stok genomik DNA, “3 hacim” enjeksiyonluk su ile dilüe edildi ve karışım +4°C’de bir gün bekletildi. Çalışma konsantrasyonlarını hazırlamak için dilüe edilmiş genomik DNA örnekleri “5 μ l sulandırılmış stok DNA örneği + 95 μ l enjeksiyonluk su” olacak şekilde tekrar sulandırılarak, spektrofotometrede 260/280, 260/230 absorbans değeri oranları ve DNA konsantrasyonları ölçüldü. Spektrofotometrede okunan değerler göz önüne alınarak stok genomik DNA’lar 12.5 ng/ μ l, 25 ng/ μ l ve 50 ng/ μ l konsantrasyonlarda sulandırılarak çalışma solüsyonları hazırlandı.

3.2.3. Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi

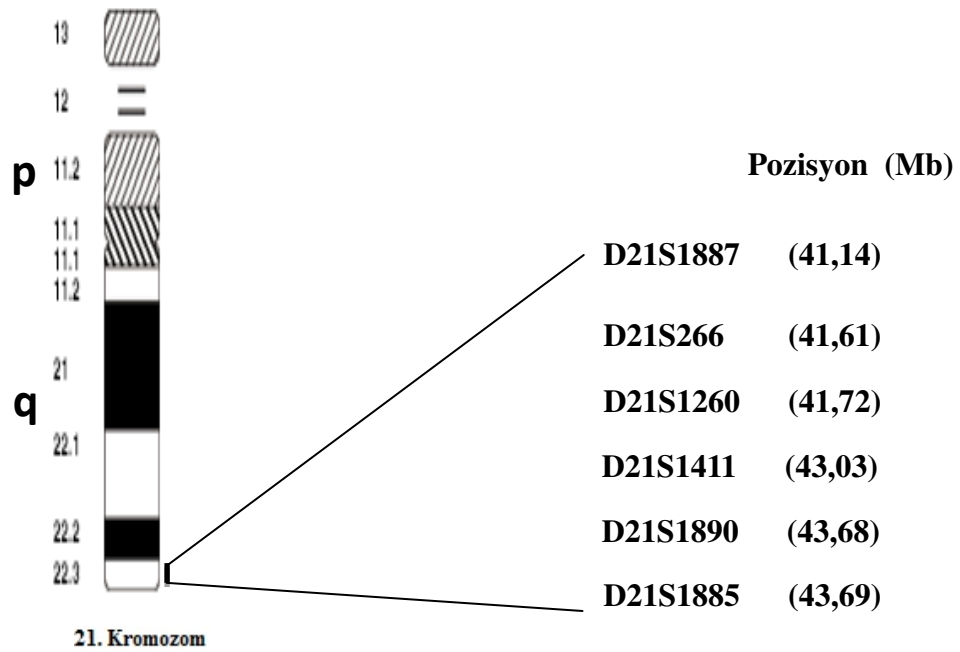
3.2.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması

TR_ATMPS ailesinden ikisi hasta (DB-1616, DB-1724) ve on biri sağlıklı (DB-1612, DB-1613, DB-1614, DB-1615, DB-1719, DB-1720, DB-1721, DB-1722, DB-1763, DB-1723 ve DB-1730) olmak üzere toplam 13 bireyde Affimetrix GeneChip 250K SNP array platformu kullanılarak genom taraması yapıldı. Genom taraması işlemi hizmet alımı şeklinde AY-KA Ltd. Şti.’de gerçekleştirildi.

Genom üzerindeki lokalizasyonları bilinen 250.000 SNP için elde edilen genotip verileri doğrudan VIGENOS programına aktarılarak, ailede hastalıkla birlikte kalıtılan homozigot bölgeler belirlendi. VIGENOS programı kullanılarak yapılan homozigotluk haritalaması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda, Prof. Dr. A. Nurten AKARSU tarafından gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Bağlantı Bölgesinin Bütün Aile Bireylerinde STRP Markırları İle Test Edilmesi ve Haplotip Oluşturulması

Genom boyu homozigotluk haritalamasına göre belirlenen bağlantı bölgesi için *UCSC Human Genome Browser* veri tabanı (<http://genome.ucsc.edu/>, NCBI 36/hg18 Mar. 2006) kullanılarak, bölgeyi kapsayan STRP markırları ve markır dizileri belirlendi (Şekil 5) (Tablo 6). Ailede hastalıkla birlikte kalıtılan bölgeler SNP'lerden daha informatif olan STRP markırları ile bütün aile bireylerinde test edildi. SNP ve STRP markır verileri kullanılarak ailede hastalıkla birlikte kalıtılan bölgenin haplotipi oluşturuldu. Hastalıkla birlikte kalıtılan bölgenin sınırlarının belirlenmesi ile kritik bölge içinde kalan genlerin sayısı en aza indirgendi.



Şekil 5. 21q22.3 kromozom bölgesinde görülen bağlantı bölgesinin haplotipinin oluşturulmasında kullanılan STRP markırlarının fiziksel yerleşimleri.

Tablo 6. TR_ATMPS ailesinde test edilen 21q22.3 kromozom bölgesindeki STRP markır dizileri ve ürün uzunlukları. D21S1887, D21S266 ve D21S1260 *RIPK4* genine göre sentromer tarafındaki markırlar olup; D21S1411, D21S1890 ve D21S1885 *RIPK4* genine göre telomer tarafındaki markırlardır.

Markır	Forward Revers	Primer Dizileri (5'-3')	Ürün (bp)
D21S1887	F	tgtaaaacgacggccagtCAGACAAACAGAATGATGAAG	123-147
	R	caggaaacagctatgaccAAAGATGATGTCAGGAATGC	
D21S266	F	tgtaaaacgacggccagtGGGGACATTGAGTCATCACA	153-173
	R	caggaaacagctatgaccAGGCAAATGAAGACCTGAAC	
D21S1260	F	tgtaaaacgacggccagtTCCAAGGGGTTCATCC	200-214
	R	caggaaacagctatgaccCCCAAGGCACTGTTCC	
D21S1411	F	tgtaaaacgacggccagtATGATGAATGCATAGATGGATG	239
	R	caggaaacagctatgaccAATGTGTGTCCTTCCAGGC	
D21S1890	F	tgtaaaacgacggccagtGGTCTGACCACAGATTTCC	143-173
	R	caggaaacagctatgaccAAAAACACTCTGAACGATTAAGG	
D21S1885	F	tgtaaaacgacggccagtAGCATGGCACTGGCATC	165-185
	R	caggaaacagctatgaccAGGACAAGTTTGGCCCC	

3.2.3.2.1. Haplotip Analizi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Fragman Analizi

Her bir markırın amplifikasyonunda kullanılacak primer çiftlerinden forward primerin 5' ucuna üniversal M13 (-21) ileri (forward) primer dizisi (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') ve geri (revers) primerin 5' ucuna üniversal M13 (-21) geri primer dizisi (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') eklendi (Tablo 6). Her bir primer çifti için ön PCR ve işaretleme PCR'ı olmak üzere iki aşamada PCR gerçekleştirildi.

Ön PCR, genomik DNA kullanılarak istenilen bölgenin amplifikasyonu için yapılırken; ikinci PCR, ön PCR ürünlerinin uç kısımlarına floresan boyalarla işaretlenmiş dizilerin takılması için yapıldı. Ön PCR işlemi 25 µl son hacimde gerçekleştirildi ve bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

Ön PCR Karışımı1X

5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0,4 µl
Pr F (10 pmol/µl).....	0,4 µl
Pr R (10 pmol/µl).....	0,4 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)...	0,1 µl
DNA (12,5 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	14,7 µl
Toplam: 25 µl	

Ön PCR, Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

Ön PCR Koşulları

94°C	6'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C	30"	Denatürasyon	} 26 döngü
60°C	30"	Bağlanma	
72°C	30"	Sentez	
72°C	7'	Son sentez	
10°C	∞	Bekleme	

Ön PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. Ön PCR ürünlerinin 2 µl'si, 2 µl yükleme tamponu ve 4 µl dH₂O ile karıştırılarak 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde incelenerek PCR ürünlerinin kalitesi belirlendi.

Ön PCR sonucu elde edilen ampikonlar, ikinci PCR olan işaretleme PCR'ı için kalıp olarak kullanıldı. İşaretleme PCR'ında D21S1887 ve D21S1885 PCR ürünleri VIC™ (yeşil), D21S1411 ve D21S1890 PCR ürünleri NED™ (sarı), D21S266 ve D21S1260 PCR ürünleri ise PET™ (kırmızı) floresan boyaalarının takılı olduğu M13 (-21) primerleri aracılığı ile işaretlendi. İşaretleme reaksiyonundaki ileri ya da geri primerlerden sadece biri işaretlenmiş olup diğer primer herhangi bir floresan ile işaretli değildir. İşaretleme PCR'ında kalıp olarak kullanılan ön PCR ürünlerinden reaksiyona ne kadar konulacağı ön PCR ürünlerinin konsantrasyonlarına göre ayarlandı. İşaretleme PCR'ı için yapılan bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>İşaretleme PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu (Promega).....	2 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	0,6 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0,2 µl
M13 (-21) Pr F (10 pmol/µl).....	0,1 µl
M13 (-21) işaretli Pr R (10 pmol/µl):	0,1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega).....	0,02 µl
PCR ürünü.....	2 µl
dH ₂ O.....	4,98 µl
	Toplam: 10 µl

İşaretleme PCR'ı Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

İşaretleme PCR Koşulları

94°C	1'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C	30"	Denatürasyon	} 11 döngü
58°C	30"	Bağlanma	
72°C	30"	Uzama	
72°C	1'	Son uzama	
10°C	∞	Bekleme	

Yukarıdaki reaksiyondan sonra elde edilen ve farklı floresan boyalarla işaretlenmiş PCR ürünlerinden oluşan birinci panel için, işaretlenmiş PCR ürünlerinin pre-run sonucundaki sinyal şiddetleri dikkate alınarak, D21S1887 (yeşil)'den 1.5 µl, D21S1411 (sarı)'den 3 µl ve D21S1260 (kırmızı)'dan 2 µl PCR ürünü alınarak toplam 6,5 µl'lik bir karışım hazırlandı. İkinci panel için ise D21S1885 (yeşil)'den 1.5 µl, D21S1890 (sarı)'dan 3,5 µl ve D21S266 (kırmızı)'dan 2 µl işaretlenmiş PCR ürünü alınarak toplam 7 µl'lik karışım elde edildi. Hazırlanan bu karışımlardan 2.5 µl, Hi-Di™ Formamid'ten 7 µl ve GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard markırından 0,5 µl alındı ve fragman analizi için kullanılacak platelerdeki kuyucuklara her bir örnek için 10 µl olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan fragman analizi plateleri kapiller elektroforez işlemi için 3130 genetik analizör cihazına tanıtıldı. Kapiller elektroforez işlemi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar, *GeneMapper® v4.1 & Data Collection v3.1* programı kullanılarak analiz edildi. Böylece çalışmaya dahil edilen TR_ATMPS ailesindeki tüm bireylerin haplotipleri belirlendi.

3.2.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi

TR_ATMPS ailesinin haplotip analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen bağlantı bölgesi içinde yer alan genler *UCSC Human Genom Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>), *Ensembl Genom Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>) ve *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gibi veri tabanları kullanılarak belirlendi.

Bu genlerin bilinen hastalıklarla ilişkilerinin olup olmadığı, fonksiyonları, eksprese oldukları dokular, etkileşime girdiği diğer proteinler ve etkileşime girdiği proteinlerin fonksiyonları, hastalıklarla olan ilişkileri ve eksprese olduğu embriyonik dönemler değerlendirildi.

3.2.5. *RIPK4* Geni Mutasyon Analizi

3.2.5.1. *RIPK4* Geninin PCR İle Amplifikasyonu

Aday gen olarak seçilen *RIPK4* geni DNA dizi analizi tarandı. DNA dizi analizinde TR_ATMPS ailesindeki hastalardan DB-1724 nolu birey ile TR_BPS ailesindeki etkilenmiş fakat yaşamayan bireyin annesi (DB-2119) ve babasına (DB-2094) ait genomik DNA örnekleri kullanıldı. *RIPK4* geninde bulunan 8 ekzonun ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılacak primer dizileri *Primer3* programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) kullanılarak hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7. *RIPK4* geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları.

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı	PCR Ürün (bp)
467	ctattcatccgtccgcagtc	<i>RIPK4</i> _Ex1F	488
468	cctcgccggcaattggttc	<i>RIPK4</i> _Ex1R	
469	cgtgatgtgacattgaagtgtg	<i>RIPK4</i> _Ex2F	578
470	tcaagctctttcctccaagaag	<i>RIPK4</i> _Ex2R	
471	ctacctggagaggcacagacac	<i>RIPK4</i> _Ex3F	496
472	aaactcctgggctcaagtaatc	<i>RIPK4</i> _Ex3R	
473	tgacatctgagctatcaacatgc	<i>RIPK4</i> _Ex4F	395
474	ttcctgcatgcaaattacacc	<i>RIPK4</i> _Ex4R	
475	gtcgatttcaaaaccaggaaac	<i>RIPK4</i> _Ex5F	487
476	tgttacacgccttgtttctcac	<i>RIPK4</i> _Ex5R	
477	ggtgaggccttcaaattgattac	<i>RIPK4</i> _Ex6F	469
478	catgggacctacacttctaattgg	<i>RIPK4</i> _Ex6R	
479	aggttatctgcattgcttcag	<i>RIPK4</i> _Ex7F	588
480	gacataagacggagccaaatg	<i>RIPK4</i> _Ex7R	
481	ttaatcacgaggcacagacaac	<i>RIPK4</i> _Ex8F1	1592
482	agcacaacgaaatgattctgac	<i>RIPK4</i> _Ex8R1	

RIPK4 geninin her bir ekzonun amplifikasyonu için PCR işlemi 25 µl son hacimde gerçekleştirildi ve bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<i>PCR Karışımı</i>	<i>1X</i>
5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	1 µl
Pr F (10 pmol/µl).....	1 µl
Pr R (10 pmol/µl).....	1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega):	0,1 µl
gDNA (25 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	12.9 µl
Toplam: 25 µl	

Amplifikasyon Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

94°C	6'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C	30"	Denatürasyon	} 35 döngü
58°C	1'	Bağlanma	
72°C	1'	Sentez	
72°C	6'	Son sentez	
10°C	∞	Bekleme	

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. PCR ürünlerinin 2 µl'si, 2 µl yükleme tamponu ve 4 µl dH₂O ile karıştırılarak 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde incelenerek PCR ürünlerinin kalitesi belirlendi.

Kaliteli PCR ürünleri Nucleospin® Extract II kiti ile üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokol doğrultusunda temizlendi;

1. 25 µl olan PCR ürünlerin üzerine 200 µl Buffer NT (DNA bağlayıcı tampon) eklendi.
2. PCR ürünü + Buffer NT karışımı 2 ml'lik toplama tüpü üzerindeki Nucleospin®Extract Column tüplerine aktararak, 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Toplama tüplerindeki sıvı döküldükten sonra, Nucleospin®Extract Column tüpler tekrar toplama tüplerinin üzerine alındı.
4. Nucleospin®Extract Column tüplerindeki membran üzerine 600 µl Buffer NT3 (yıkama tamponu) eklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ikinci kez 11.000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek Buffer NT3'ün membrandan tamamen uzaklaşması sağlandı.
6. Nucleospin®Extract Column tüpleri 1.5 ml'lik eppendorf tüplerin üzerine alınarak membran üzerine PCR ürünlerinin konsantrasyonlarına göre 30-50 µl enjeksiyonluk su eklendi ve 1 dakika bekletildikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

3.2.5.2. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

Temizlenen PCR ürünleri, her bir bandındaki DNA miktarı bilinen ile markır (NEB 100 bp DNA ladder, Kat. No: N3231L) ile birlikte %2'lik agaroz jelde yürütülerek her bir dizileme reaksiyonuna konulacak kalıp PCR ürününün miktarının 50-100 ng arasında olması sağlandı. Döngüsel dizileme reaksiyonunda her bir ekzon için kullanılan amplifikasyon primerlerinden sadece biri kullanıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan amplifikasyon primerleri.

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Dizilenen Ekzon
467	ctattcatccgtccgcagtc	<i>RIPK4_</i> Ex1F
469	cgtgatgtgacattgaagtgtg	<i>RIPK4_</i> Ex2F
471	ctacctggagaggcacagacac	<i>RIPK4_</i> Ex3F
473	tgacatctgagctatcaacatgc	<i>RIPK4_</i> Ex4F
475	gtcgattcaaaaccaggaaac	<i>RIPK4_</i> Ex5F
477	ggtgaggccttcaaatgattac	<i>RIPK4_</i> Ex6F
479	aggttatctgcattgcttcag	<i>RIPK4_</i> Ex7F
481	ttaatcacgaggcacagacaac	<i>RIPK4_</i> Ex8F1
482	agcacaacgaaatgattctgac	<i>RIPK4_</i> Ex8R1
483	gatgaggaccagtggacagc	<i>RIPK4_</i> Ex8F2
484	gctcgtcgaacaggtcaatg	<i>RIPK4_</i> Ex8R2

BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kiti kullanılarak yapılan döngüsel dizileme reaksiyonu için bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

PCR Karışımı

1X

BigDye.....	2 µl
5X Buffer.....	1 µl
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/µl)...	0.5 µl
Temizlenmiş PCR ürünü.....	2 µl
dH ₂ O.....	4.5 µl
Toplam: 10 µl	

Döngüsel dizileme reaksiyonu Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

96 °C	1'	Başlangıç denatürasyonu	
96 °C	15''	Denatürasyon	} 25 döngü
50 °C	15''	Bağlanma	
60 °C	2'	Sentez	
10 °C	∞	Bekleme	

Döngüsel dizileme reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 ile aşağıdaki temizleme protokolü kullanılarak saflaştırıldı;

1. 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 12-13 ml dH₂O içerisinde çözülür ve çalışmaya başlamadan önce en az 30 dakika +4°C'de bekletildi.
2. Kolon tüpler 2 ml'lik toplama tüpleri üzerine alındı.
3. Kolon tüplere 600 µl Sephadex®G-50 eklendi ve 750 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
4. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve kolon tüpler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerin üzerine alındı.
5. PCR ürünleri kolon tüpteki Sephadex®G-50 üzerine, Sephadex®G-50'nin yapısını bozmadan, dikkatli bir şekilde eklendi.
6. 750 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

Saflaştırılan PCR ürünleri ABI 3130 genetik analiz cihazı üzerindeki platelere aktararak dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları *Chromas 2.32* (www.technelysium.com.au/chromas.html) ve *SeqScape® software v2.5* programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler gen bankasından alınan referans *RIPK4* dizisi (GenBank Kayıt No: NC_000021.8) ile karşılaştırıldı.

3.2.6. *RIPK4* Geninde Bulunan Değişimlerin ARMS Yöntemi İle Taranması

TR_ATMPS ailesindeki DB-1724 numaralı hastanın *RIPK4* geni 2. ekzonunda belirlenen c.362T>A ve TR_BPS ailesindeki hastalıktan etkilenmiş fakat yaşamayan bireyin ebeveynlerinin *RIPK4* geni 3. ekzonunda belirlenen c.551C>T değişimlerinin nadir görülen polimorfizmler olabilecekleri göz önünde bulundurularak, ATMPS ve/veya BPS öyküsü bulunmayan 335 sağlıklı bireyde aynı değişimler için heterozigot/homozigotluk taraması yapıldı. Bu tarama işlemi, söz konusu değişimler için enzim tanıma bölgesi bulunmadığından dolayı ARMS yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.2.6.1. c.362T>A Değişiminin ARMS Yöntemi İle Taranması

DNA dizi analizi sonucuna göre belirlediğimiz c.362T>A değişiminin TR_ATMPS ailesi ve kontrol grubundaki dağılımı ARMS yöntemi kullanılarak belirlendi. ARMS için mutant allele spesifik *RIPK4_MR* (Pr-487), normal allele spesifik *RIPK4_NR* (Pr-486) ters yön primerleri ve bu primerlerin her ikisi ile de kullanılmak üzere *RIPK4_CF* (Pr-485) ileri yön primeri tasarlandı (Tablo 9).

Tablo 9. c.362T>A değişiminin ARMS ile taranmasında kullanılan primer dizileri.

Primer No	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR Ürünü
485	<i>RIPK4_CF</i>	cagggagcgcacatggagcttttgaagaagccaag	216 bp
486	<i>RIPK4_NR</i>	aggaagtcatgccaccgccgtctcgtggat CA	
487	<i>RIPK4_MR</i>	aggaagtcatgccaccgccgtctcgtggat CT	

Örneklerde c.362T>A değişimi dağılımının ARMS ile belirlenebilmesi için *RIPK4_CF* ve mutant allele spesifik *RIPK4_MR* primerleri kullanılarak son hacim 25 µl olacak şekilde bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0.5 µl
Pr F: <i>RIPK4_CF</i> (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Pr R: <i>RIPK4_MR</i> (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)....	0,1 µl
DNA (25 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	14.4 µl
Toplam: 25 µl	

Normal allele spesifik ARMS reaksiyonunda ise *RIPK4_NR* ve *RIPK4_CF* primerleri kullanıldı ve son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı;

PCR Karışımı1X

5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0.5 µl
Pr F: <i>RIPK4</i> _CF (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Pr R: <i>RIPK4</i> _NR (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)...	0,1 µl
DNA (25 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	14.4 µl
Toplam: 25 µl	

ARMS reaksiyonları Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

94°C	6'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C	30''	Denatürasyon	} 35 döngü
58°C	30''	Bağlanma	
72°C	30''	Sentez	
72°C	1'	Son sentez	
10°C	∞	Bekleme	

3.2.6.2. c.551C>T Değişiminin ARMS Yöntemi İle Taranması

TR_BPS ailesindeki anne ve babanın *RIPK4* geni 3. ekzonu üzerinde DNA dizi analizi sonucunda belirlediğimiz heterozigot c.551C>T değişiminin kontrol grubunda taranması için ARMS yöntemi kullanıldı. ARMS için mutant allele spesifik *RIPK4*_MR2 (Pr-489), normal allele spesifik *RIPK4*_NR2 (Pr-488) ters yön primerleri ve bu primerlerin her ikisi ile de kullanılmak üzere *RIPK4*_CF2 (Pr-490) ileri yön primeri tasarlandı (Tablo 10).

Tablo 10. c.551C>T değişiminin ARMS ile taranmasında kullanılan primer dizileri.

Primer No	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR Ürünü
488	<i>RIPK4</i> _NR2	atgcgctctggaggaggtaggcgat <u>GG</u>	250 bp
489	<i>RIPK4</i> _MR2	atgcgctctggaggaggtaggcgat <u>GA</u>	
490	<i>RIPK4</i> _CF2	acctggagaggcacagacacggctcttag	

Örneklerde c.551C>T değişimi dağılımının ARMS ile belirlenebilmesi için *RIPK4*_CF ve mutant allele spesifik *RIPK4*_MR primerleri kullanılarak son hacim 25 µl olacak şekilde bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0.5 µl
Pr F: <i>RIPK4</i> _CF2 (10 p mol/µl).....	0.5 µl
Pr R: <i>RIPK4</i> _MR2 (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega).....	0,1 µl
DNA (25 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	14.4 µl
	Toplam: 25 µl

Normal allele spesifik ARMS reaksiyonunda ise *RIPK4*_NR ve *RIPK4*_CF primerleri kullanıldı ve son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu (Promega).....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	0.5 µl
Pr F: <i>RIPK4</i> _CF2 (10 p mol/µl).....	0.5 µl
Pr R: <i>RIPK4</i> _NR2 (10 pmol/µl).....	0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega).....	0,1 µl
DNA (25 ng/µl).....	2,5 µl
dH ₂ O.....	14.4 µl
	Toplam: 25 µl

PCR işlemi Applied Biosystems 9700 thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

<u>PCR Koşulları</u>	
94°C 6'	Başlangıç denatürasyonu
94°C 30"	Denatürasyon
58°C 45"	Bağlanma
72°C 30"	Sentez
72°C 1'	Son sentez
10°C ∞	Bekleme

} 35 döngü

Her bir reaksiyon için PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. PCR ürünlerinin 2 µl'si, 2 µl yükleme tamponu ve 4 µl dH₂O ile karıştırılarak 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde incelenerek PCR ürünlerinin kalitesi belirlendi.

3.2.7. Biyoinformatik Analizler

RIPK4'de amino asit seviyesinde tespit edilen p.Ile121Asp ve p.Thr184Ile değişimlerinin protein üzerinde korunmuş bir bölgede olup olmadığı, proteinin farklı türlerdeki ortologları ile karşılaştırılarak belirlendi. Bu işlem için ClustalW Multiple Sequnces Alignment programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) kullanıldı.

RIPK4'de amino asit düzeyindeki değişimlerinin protein üzerindeki etkilerinin ne derece yıkıcı olduğunu belirlemeye yönelik olarak Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) analizi yapılarak söz konusu değişimlerin tolere edilebilirliği değerlendirildi.

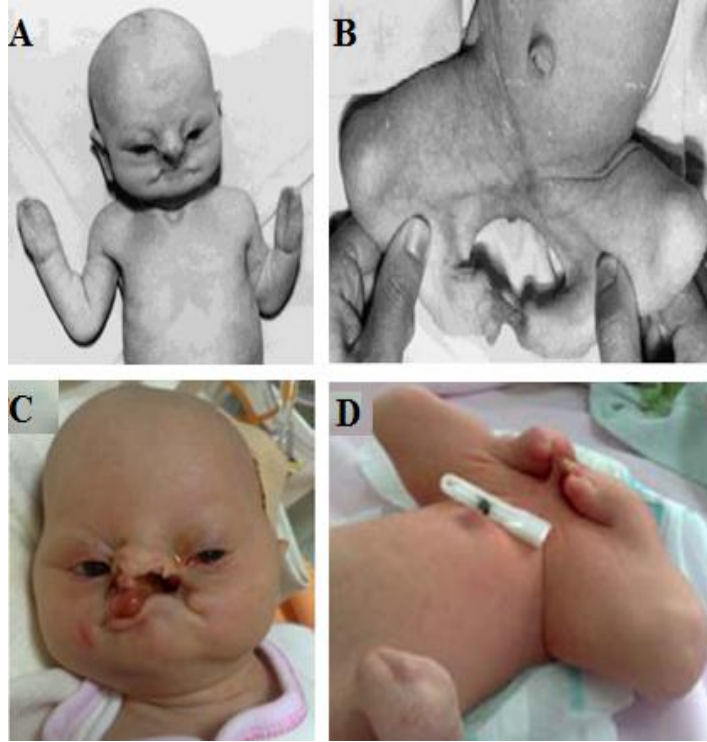
4. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na müracaat eden ve Aslan tip multiple pterygium sendromu tanısı konulmuş hastaların bulunduğu TR_ATMPS ailesinde (Şekil 4A) ATMPS'nin genetik etiyolojisi araştırıldı. Ayrıca ilerleyen aşamalarda, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Genetik Bilim Dalı'na başvuran ve ATMPS ile benzer klinik bulgulara sahip, Bartsocas-Papas sendromu tanısı konulmuş bir hastanın bulunduğu TR_BPS ailesi (Şekil 4B) çalışmaya dahil edildi.

4.1. Klinik Değerlendirme

TR_ATMPS ailesi, akraba evlilikleri sonucu hastalıktan etkilenmiş toplam altı bireyin doğduğu bir ailedir. Ailedeki hastalardan ikisi (DB-1724 ve DB-1616) halen yaşamakta olup diğer dördü doğumdan kısa bir süre sonra ölmüştür (Şekil 4A).

Hastaların dismorfik özelliklerinin değerlendirilmesi sonucu DB-1724 numaralı hastanın, Bartsocas-Papas sendromunun karakteristik özelliklerini taşımakla birlikte; daha önce Bartsocas-Papas sendromunda rapor edilmemiş olan çene kemiklerinde füzyon, ayaklar arasında filiform band, oral ve nazofarangeal boşlukların hipoplazisi, medial kantal ağ, rektal polip gibi farklı klinik bulgulara da sahip olduğu gösterildi (Şekil 6 A-B) (Tablo 11). Bu farklılıklardan dolayı hastalık, 2000 yılında *Aslan ve ark.* (10) tarafından multiple pterygium sendromunun yeni bir varyantı olarak rapor edildi. Ailede 2010 yılında dünyaya gelen DB-1616 numaralı hastada şiddetli popliteal pterygium yapısı, el ve ayaklarda sindaktili, fasiyal yarık, alt ve üst çene arasında filiform bantlaşma, hipoplazik burun, total alopecia gibi Bartsocas-Papas sendromunun tipik özellikleri arasında sayılabilecek bulgular bulunmaktaydı. DB-1724'den farklı olarak DB-1616 numaralı bireyde rektal polip bulunmadığı, bununla birlikte bu bireyde dudak-damak yarığı gibi anomalilerin olduğu gözlemlendi (Şekil 6 C-D) (Tablo 11).



Şekil 6. Aslan tip multiple pterygium sendromlu hasta fenotipleri. TR_ATMPS ailesinden A-B) DB-1724 numaralı (10), C-D) DB-1616 numaralı bireyler.

TR_BPS ailesi, hala-dayı çocuklarının evliliği sonucu Bartsocas-Papas sendromu tanısı konulmuş bir bireyin dünyaya geldiği bir ailedir (Şekil 4B). Ailedeki IV:3 nolu etkilenmiş birey şiddetli popliteal pterygium, çift taraflı dudak-damak yarığı, el ve ayak parmaklarının sindaktilisi gibi Bartsocas-Papas sendromunun tipik dismorfik özelliklerini barındırmaktadır ve bu hasta doğumdan 57 gün sonra ölmüştür (Şekil 7) (Tablo 11).



Şekil 7. Bartsocas-Papas sendromlu hasta fenotipi. A) TR_BPS ailesinden IV:3 nolu bireyde A) kranofasiyel anomaliler, B) popliteal bölgede şiddetli pterygium.

Tablo 11. ATMPS ve BPS'den etkilenmiş bireylerin klinik bulgularının karşılaştırmalı analizi (+: Var, -: Yok, ?: Bilinmiyor).

Klinik Bulgular	TR_BPS	DB-1616	DB-1724
Genel Bilgiler			
Akrabalık	+	+	+
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Kadın
Yaş	57 gün (Ex)	9	12
Doğumdaki ağırlık	2200 gr	2350gr	3.050 g
Doğumdaki boy	35 cm	?	37.4 cm
Kranofasiyal Bulgular			
Total alopesi	+	+	+
Ektropion/lagoftalmia keratitis	+/+	+/+	+/+
Korneal ülser	+(bilateral)	+	+
Ankiloblefaron /blefarofimosis	-/-	+/+	+/+
Medial kant al ağ	-	+	+
Kırpık/kaş yokluğu	+/+	+/+	+/+
Hipoplastik burun	?	+	+
Çene kemiklerinde füzyon	-	+	+
Oral/Nazofaringeal boşlukların hipoplazisi	-	+/+	+/+
Düşük kulaklar	+	+	+
Orolabial sineşi (yapışıklık)	+	+	+
Mikrognati	?	+	+
Yarık dudak/damak	+(bilateral) /+	+(unilateral)/+	-/-
Palpebral fisür	+	+	+
Kısa boyun	-	+	+
El ve Ayaklar			
Parmak hipoplazisi/başparmak aplazisi	+/+	+/+	+/+
El ve ayak parmaklarında sindaktili	+/+	+/+	+/+
Avuç içi çizgilerinin yokluğu	+	+	+
Çoğul fleksiyon kontraktürü (Artrogripozis)	?	+	+
Ayaklar arasında filiform band (Halka bacak)	?	+	+
Deri ve İskelet			
Popliteal / aksillar / inguinal pterygia	+/+ /+	+/-/+	+/-/+
Ayakla pelvik bölge arasında filiform band	+(unilateral)	+	-
Anal stenoz /atrezi/rektal polip	-/-/-	-/-/-	+/+ /+
Genital Bölge			
Bikornuat uterus	?	+	-
Hipoplastik labia majora	-	+	+
Mikropenis/hipoplastik skrotum	+ /+		
Radyolojik Bulguları			
Radius aplazisi	+(unilateral)	?	-
Ulnar eğrilik	+	?	-
Metakarpal/falang kemik hipoplazisi	+(4Metakarpal)	+	+
El ve ayak kemiklerinde sinostoz	?	+	+
İliak kanat/pelvik kemik/skapul hipoplazisi	+ /? /?	?	+ /+ /+
Kraniyal MRI	?	normal	normal
Abdominal ve Renal USG	?	normal	normal
Ektopik böbrek	+	-	-
Diğer			
Kuru ve pullu deri	+	+	-
Kalp mürmürü	-	+	-
Ekokardiyogram (EKG)	?	mitral kapak yetmezliği	normal
Mental retardasyon	?	-	-
Karyotip	46,XY	46,XX	46,XX
Moleküler Genetik Temel			
RIPK4 geni mutasyonları	c.551C>T (p.Thr184Ile)	c.362T>A (p.Ile121Asn)	c.362T>A (p.Ile121Asn)

4.2. Pedigri Analizi

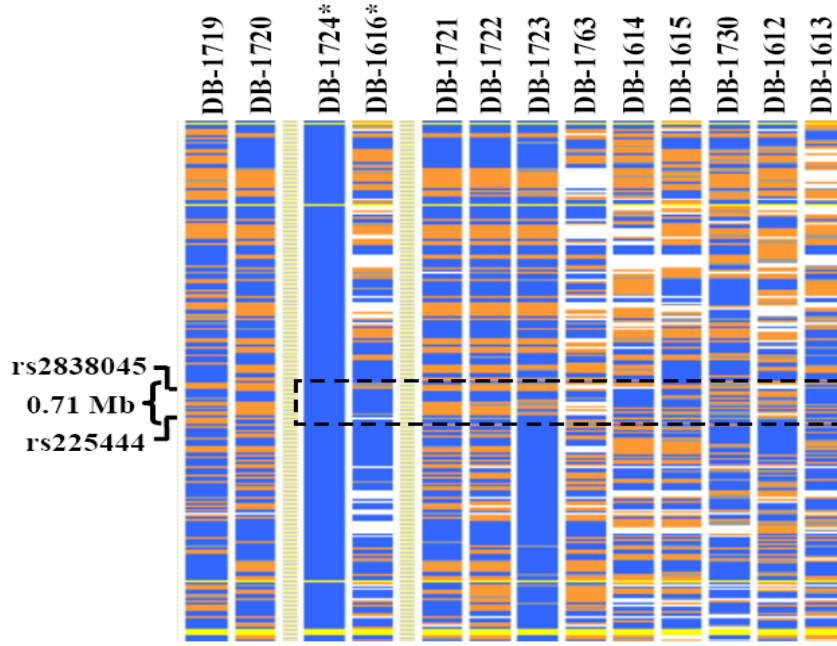
TR_ATMPS ailesi, akraba evliliği yapan üç çekirdek aileden oluşmaktadır (Şekil 4A). Yapılan aile ağacı analizi sonucunda hastalığın ailede otozomal resesif olarak kalıtıldığı gözlemlendi. Genetik haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere, ailede bilgi verici olabileceği düşünülen ikisi hasta toplam 21 birey çalışmaya dahil edildi.

TS_BPS ailesi de yukarıda belirtildiği gibi akraba evliliğinden doğan tek bir hasta çocuğun bulunduğu bir çekirdek ailedir (Şekil 4B). Hastanın doğumdan kısa bir süre sonra ölmüş olmasından dolayı DNA örneğine ulaşılamamıştır. Bu sebeple çalışma, TR_BPS ailesinde hastalıktan etkilenmiş ancak yaşamayan bireyin anne ve babasının DNA örnekleri üzerinden yürütülmüştür.

4.3. Genom Taraması ve Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi

4.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Haritalaması

TR_ATMPS ailesi için genom boyu homozigotluk taraması Affymetrix GeneChip 250K SNP array platformu kullanılarak yapıldı. Genom taramasında, ailede hastalıktan etkilenmiş iki bireye (DB-1616, DB-1724) ve bu hastaların anne, baba ve kardeşlerinden oluşan on bir sağlıklı bireye (DB-1612, DB-1613, DB-1614, DB-1615, DB-1719, DB-1720, DB-1721, DB-1722, DB-1763, DB-1723 ve DB-1730) ait DNA örneği kullanıldı. Elde edilen SNP verileri VIGENOS genetik analiz programıyla değerlendirildi ve 21q22.3 kromozom bölgesinde rs2838045 ve rs225444 SNP'leri arasında kalan 0.71 cM'lik bölgenin ailede hastalıkla birlikte kalıtılan en geniş bölge olduğu belirlendi (Şekil 8).

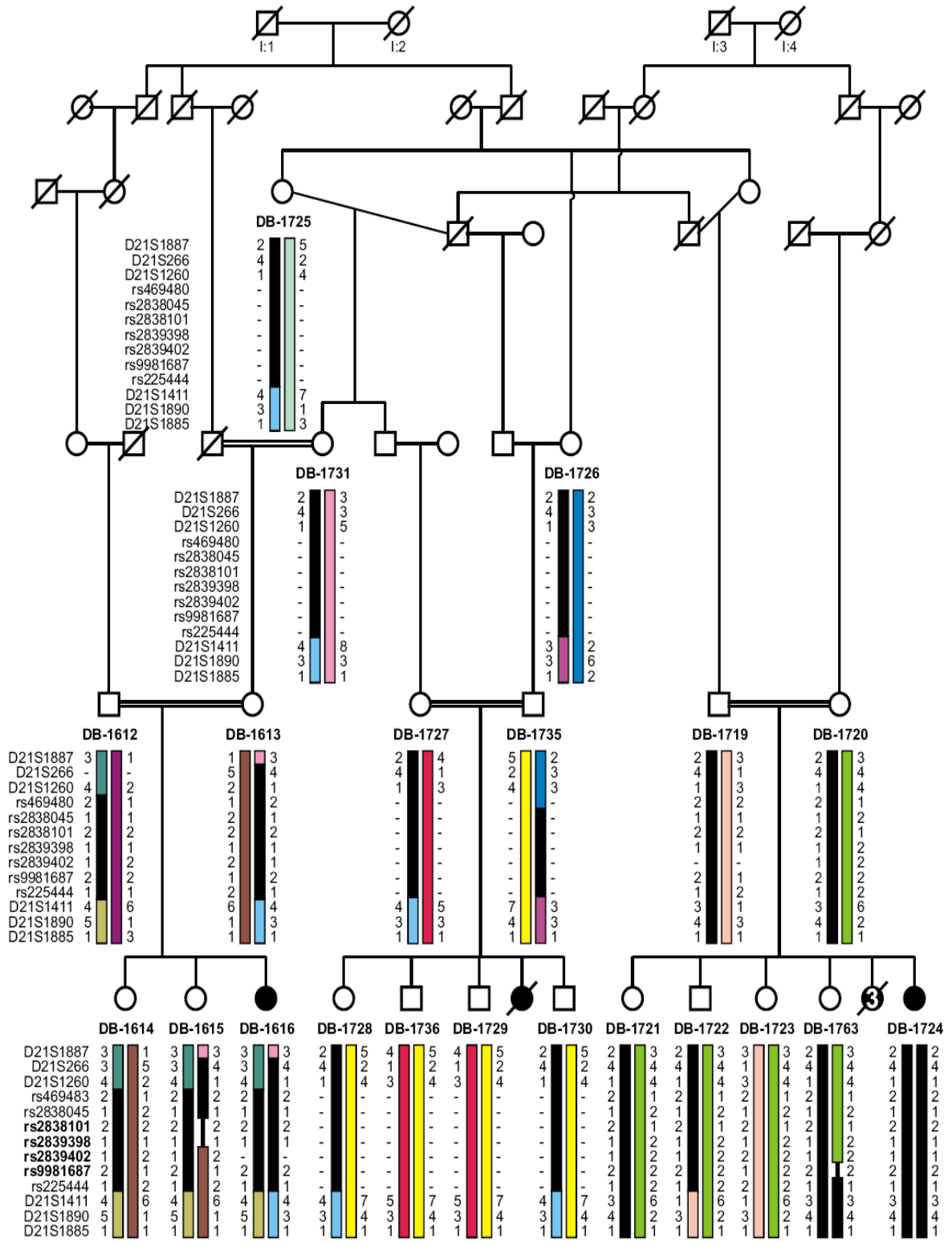


Şekil 8. TR_ATMPS ailesinde 250K SNP array sonuçlarının VIGENOS ile analizi.

İndeks vaka ile aynı homozigot genotipi (AA, BB gibi) paylaşanlar mavi, indeks vakanın tam karşıtı homozigot genotipi gösteren bireyler (indeks vakanın AA, diğer bireylerin BB olduğu durumlar) beyaz, heterozigot olanlar (AB) turuncu, bilgi alınamayan genotipler (anne-baba ve indeks vakanın her üçünün de AB olduğu genotipler) ise sarı renkte işaretlendi. Genom taramasına alınan her bir bireyin DNA banka numaraları şeklin üzerinde gösterildi. Hasta bireyler “*” ile vurgulandı. Hastalıkla birlikte kalıtılan 0.71 cM’lik bölgenin sınırlarını belirleyen SNP’ler şeklin sol tarafında gösterilmiştir.

4.3.2. Bağlantı Bölgesinin STRP Markırları İle Test Edilmesi ve Haplotip Analizi

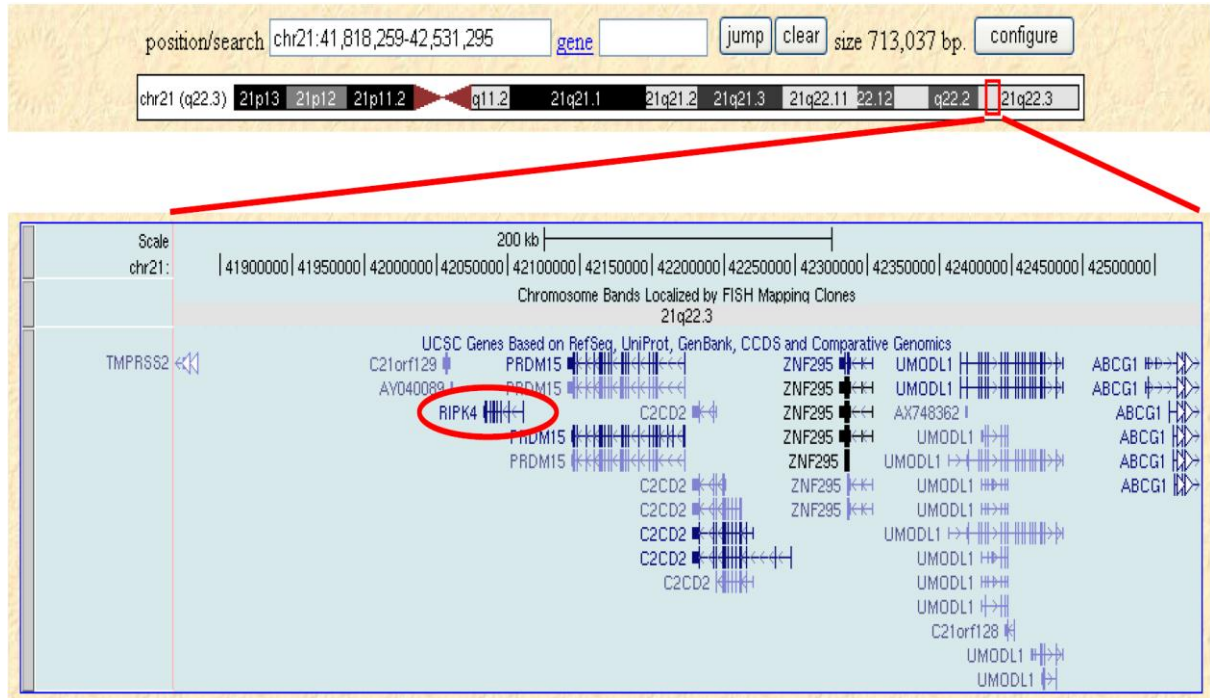
TR_ATMPS ailesinden toplam 13 bireyin DNA örnekleri kullanılarak yapılan genom boyu homozigotluk haritalaması sonucunda elde edilen ve rs2838045-rs225444 SNP’leri arasında kalan 0.71 cM’lik kritik bölgenin hastalıkla birlikte kalıtılıp kalıtılmadığı, çalışmaya dahil edilmiş olan ailedeki toplam 21 bireyde STRP markırları kullanılarak test edildi. Ailede hastalıkla birlikte kalıtılan rs2838045 ve rs225444 SNP’leri arasında kalan bölgede test edilebilecek informatif STRP markırı bulunmamaktadır. Bu nedenle kritik bölgenin haplotipini oluşturmak için test edilen STRP markırlarına ek olarak genom taramasından elde edilen informatif SNP verileri kullanıldı. Oluşturulan haplotipe göre; sentromerik taraftan DB-1615 numaralı bireyde rs2838045 SNP markırı ve telomerik taraftan DB-1763 numaralı bireyde rs225444 SNP markırı ile sınırlandırılan bölgenin hastalıkla birlikte kalıtıldığı doğrulandı (Şekil 9).



Şekil 9. TR_ATMPS ailesinde haplotip analizi. TR_ATMPS ailesinde 21q22.3 kromozom bölgesindeki D21S1887 ve D21S1885 markırları arasında kalan bölgenin haplotipi. Siyah bar ailede hastalıkla birlikte kalıtılan mutant haplotipi göstermektedir. STRP ve SNP markırları *UCSC Human Genome Browser* veri tabanı (<http://genome.ucsc.edu/>, NCBI 36/hg18 Mar. 2006) kullanılarak belirlendi.

4.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi

TR_ATMPS ailesinde rs2838045 ve rs225444 SNP'lerinin sınırlandığı 0.71 cM'lik bağlantı bölgesi içinde yer alan genler *UCSC Human Genom Browser* veri tabanı (<http://genome.ucsc.edu/>) kullanılarak araştırıldı. Bölge içerisinde yedi adet gen (*TMPRSS2*, *RIPK4*, *PRDM15*, *C2CD2*, *ZNF295*, *UMODL1* ve *ABCG1*) ve iki adet EST (*C21orf129* ve *AY040089*) bulunmaktadır (Şekil 10). Bu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonları, eksprese oldukları dokular ve herhangi bir hastalıkla ilişkili olup olmadıkları belirlendi (Tablo 12). *Ripk4*^{-/-} farelerde ATMPS ve BPS fenotipine benzer şekilde çoklu epidermal anomalilerin ortaya çıktığı ve heterozigot farelerin normal fenotipe sahip olduğu bildirilmiştir (26, 28). *Ripk4*^{-/-} fareler ile hastalarımızın fenotipik özellikleri arasında görülen dikkat çekici fenotipik benzerliklerden yola çıkarak TR_ATMPS ailesi için *RIPK4* en önemli aday gen olarak seçildi.



Şekil 10. TR_ATMPS ailesinde kritik bağlantı bölgesi içerisinde yer alan genler. 21q22.3 kromozom bölgesi, rs2838045-rs225444 SNP'leri arasında 0.71 Mb'lık aralıkta lokalize genler ve EST'ler. *RIPK4* geni kırmızı daire içinde gösterilmektedir.

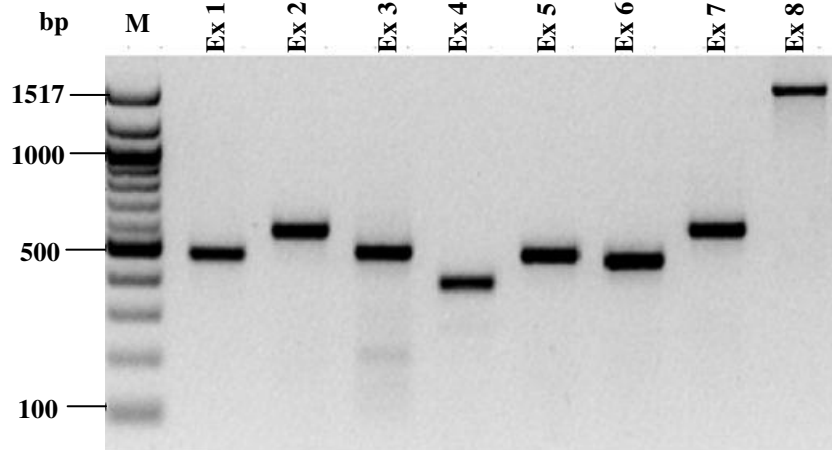
Tablo 12. TR_ATMPS ailesinde rs2838045-rs225444 SNP'lerinin sınırlandırdığı 0.71 cM'lik bağlantı bölgesi içinde yer alan genlerin ekspresyon profili ve fonksiyonları.

<i>Gen</i>	<i>Ekprese olduğu dokular</i>	<i>Fonksiyonu</i>	<i>Kaynak</i>
<i>TMPRSS2</i>	İnce bağırsak, prostat, kolon ve mide	Prostat kanseri gelişimi	58
<i>RIPK4</i>	Deri, timüs, tiroid, prostat, kalp, bronş epitel hücreleri, karaciğer, böbrek, akciğer, testis	Epidermal farklılaşma	26, 27, 28
		NFκB yolağı aktivasyonu	25, 29, 30
<i>PRDM15</i>	Fetal akciğer, kalp, karaciğer, adrenal korteks	Pankreas kanseri gelişimi	59
<i>C2CD2</i>	Adrenal bez, adrenal korteks, dalak, prostat	Bilinmiyor	---
<i>ZNF295</i>	Meme, testis	Transkripsiyonel regülasyonun kontrolü	60
<i>UMODL1</i>	Böbrek, testis ve fetal timus	Koklama ve duyu nöronlarının uyarılması	61
<i>ABCG1</i>	Akciğer, dalak, timüs, adrenal bez	Glukoz ve lipid homeostasisi	62

4.5. *RIPK4* Geninde Mutasyon Taraması

4.5.1. TR_ATMPS Ailesinde *RIPK4* Mutasyon Analizi

TR_ATMPS ailesinde *RIPK4* (NM_020639) geni mutasyon analizi için DB-1724 numaralı hastanın genomik DNA'sı kullanıldı. Amplifikasyon *RIPK4* geninin bütün ekzonları ve ekzon-intron bağlantı bölgelerini kapsayacak şekilde tasarlanan intronik primerler kullanılarak yapıldı (Tablo 7). Gen üzerinde bulunan sekiz ekzonun her biri ayrı ayrı amplifiye edildi (Şekil 11).

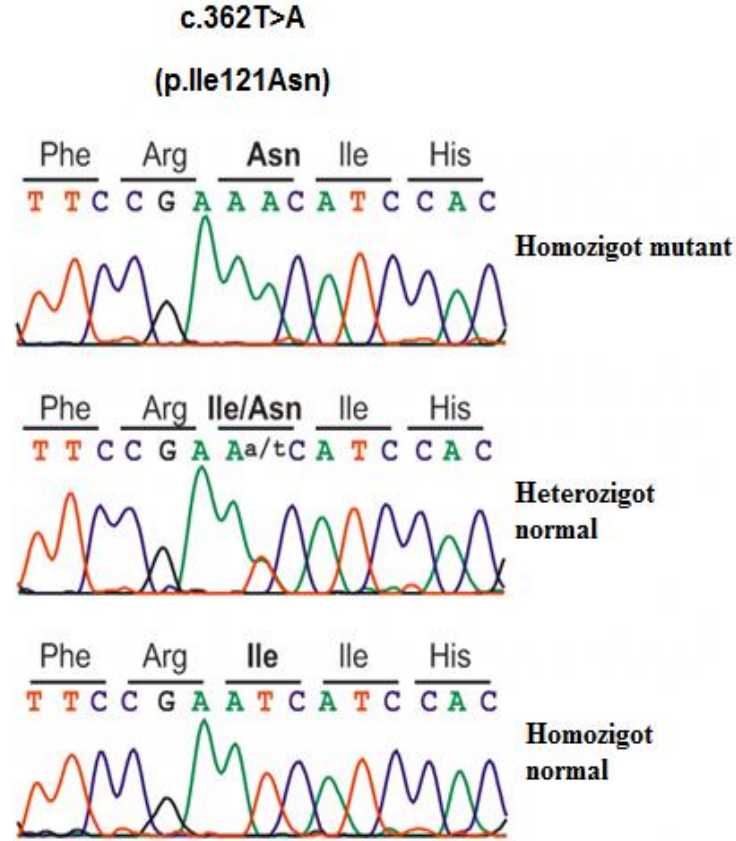


Şekil 11. *RIPK4* geninin PCR ile amplifikasyonu. Her bir ekzona ait PCR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütüldü. M; NEB 100 bp Marker, Ex; Ekzon.

Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra amplifikasyon primerleri kullanılarak dizilendi. DNA dizileri *RIPK4*'ün referans dizisi ile karşılaştırıldı ve *RIPK4* geni üzerinde 8 farklı homozigot değişiklik gözlemlendi. Bunlardan yedisi daha önce tanımlanmış olan SNP'lere karşılık gelirken *RIPK4* geni ikinci ekzonunda görülen c.362T>A değişimi bilinen herhangi bir SNP'e karşılık gelmemektedir (Şekil 12) (Tablo 13).

Tablo 13. DB-1724 numaralı bireyde *RIPK4* geni üzerinde görülen değişiklikler.

No	Nükleotid Değişikliği	Protein Seviyesinde	SNP No	Ekzon/İntron
1	c.362T>A	p.Ile121Asn	-	Ex2
2	IVS6- 45T>G	-	rs2277790	Int6
3	c.1005G>T	p.Leu335Leu	rs2277789	Ex7
4	c.1203C>T	p.Gly401Gly	rs3746894	Ex8
5	c.1476G>A	p.Ala492Ala	rs3746893	Ex8
6	c.1548C>T	p.Asp528Asp	rs2838113	Ex8
7	c.1996A>G	p.Pro665Pro	rs3746891	Ex8
8	c.2331G>A	p.Thr777Thr	rs7276592	Ex8



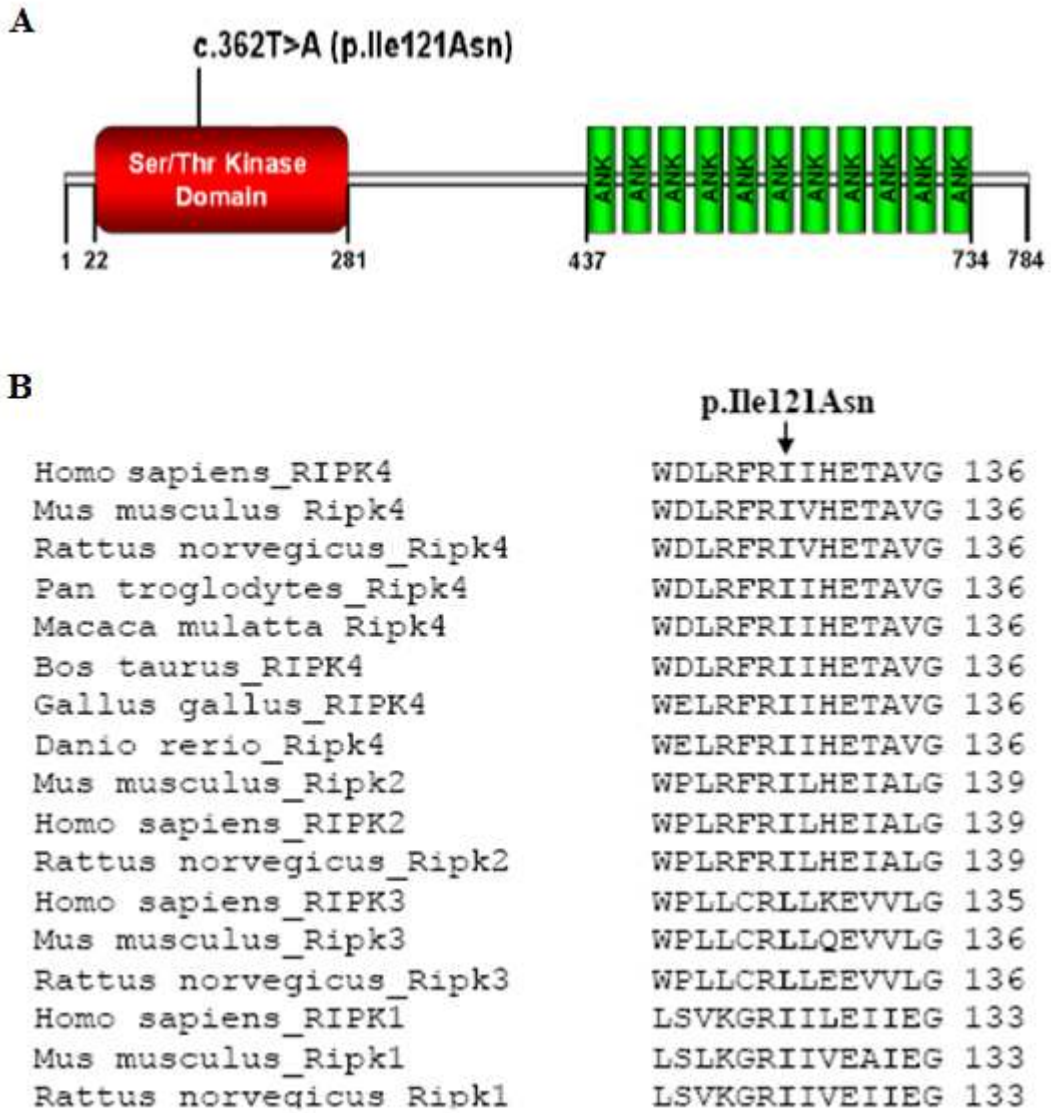
Şekil 12. *RIPK4* geninde tanımlanan c.362T>A değişimi kromatogramı. Üst panel; homozigot mutant birey, orta panel; heterozigot normal birey, alt panel; homozigot normal birey.

ARMS yöntemi kullanılarak yapılan taramada c.362T>A değişimi DB-1616 ve DB-1724 numaralı hasta bireylerde homozigot olarak görülürken; DB-1723, DB-1729 ve DB-1736 numaralı sağlıklı bireylerde gözlenmedi. Çalışmaya dahil edilen diğer bireylerde ise c.362T>A heterozigot olarak tespit edildi (Şekil 13). Etnik olarak örtüşen 335 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda yapılan taramada ise c.362T>A değişimi hiçbir bireyde görülmedi.



Şekil 13. c.362T>A değişiminin TR_ATMPS ailesindeki dağılımının ARMS ile gösterilmesi. Üst panel NA; normal allel, alt panel MA; mutant allel, “*”; hasta bireyler.

TR_ATMPS ailesinde tanımladığımız *RIPK4* geni üzerindeki c.362T>A değişimi, proteinin kinaz domaini üzerinde yer alan 121. pozisyonundaki izolösün amino asidinin asparajine dönüşümüne (p.Ile121Asn) neden olmaktadır (Şekil 14A). *ClustalW Multiple Sequences Alignment* programı kullanılarak yapılan analiz ile *RIPK4*'ün 121. pozisyonunda bulunan izolösün amino asidinin farklı türlerdeki RIP kinaz ailesi üyeleri arasında yüksek düzeyde korunmuş olduğu gösterildi (Şekil 14B).



Şekil 14. RIPK4'te belirlenen p.Ile121Asn değişimi için *in silico* analiz. A) p.Ile121Asn amino asit değişiminin proteinin serin-treonin kinaz domaini üzerindeki yerleşimi, **B)** p.Ile121Asn değişiminin RIP kinaz ailesi arasındaki korunmuşluğunun *ClustalW Multiple Sequences Allignment* programı kullanılarak gösterilmesi.

SIFT analizi ise *RIPK4*'ün 121. pozisyonundaki izolösün amino asidinin asparajin ile yer değiştirmesinin, proteinin fonksiyonu açısından tolere edilemeyeceğini göstermektedir (Şekil 15).

Tolere edilemeyecek aminoasitler	Pozisyon	Tolere edilebilir aminoasitler
c w f m y i l v h r	116D	g n t s k A P Q D E
y w v t s r q p n m k i h g f e d c a	117L	L
c w f d m i y v g p h l n a t e q	118R	S K R
h k q n r d g e p c t s a m v i l y	119F	W F
y w v t s q p n m l k i h g f e d c a	120R	R
h d w q p n e c r s g k y a t f	121I	M L V I
d h w n g y r e c k s q p t f m	122I	v A L I
y w v t s r q p n m l k i g f e d c a	123H	H
c w f m i y l v h r g n t s p a k d	124E	Q E
w h g d y n r q e k s e p f	125T	a l M V I T
w h v f i m q r n d e l k e v t p	126A	G S A

Şekil 15. p.Ile121Asn değişimi için SIFT analizi. SIFT programı ile *RIPK4*'ün 121. pozisyonundaki izolösün (I) amino asidi kalıntısının asparajin (N) ile yer değiştirmesinin değerlendirilmesi.

4.5.2. TR_BPS Ailesinde *RIPK4* Mutasyon Analizi

TR_ATMPS ailesinde *RIPK4* geninin 2. ekzonunda c.362T>A değişiminin tanımlanması üzerine, Bartsocas-Papas sendromu tanısı konulmuş ancak yaşamayan bireyin bulunduğu TR_BPS ailesindeki sorumlu mutasyonun da *RIPK4* geni üzerinde olup olmadığı, DNA dizi analizi yöntemi ile araştırıldı. Bu süreçte etkilenmiş bireyin hayatta olmaması ve elimizde bu bireye ait DNA örneği bulunmaması sebebiyle hasta bireyin hem babasına (DB-2094) hem de annesine (DB-2119) ait genomik DNA örnekleri kullanılarak, *RIPK4* geninin her bir ekzonu ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri amplifiye edilerek dizilendi. DNA dizi analizi sonuçlarının *RIPK4*'ün referans dizisi ile karşılaştırılması sonucunda hastanın babasında 14 farklı değişiklik gözlemlendi (Tablo 14). Bunlardan on üçü daha önce tanımlanmış olan SNP'lere karşılık gelirken, üçüncü ekzonda görülen ve bilinen SNP'ler ile eşleşmeyen c.551C>T değişimi heterozigot olarak görüldü (Şekil 16).

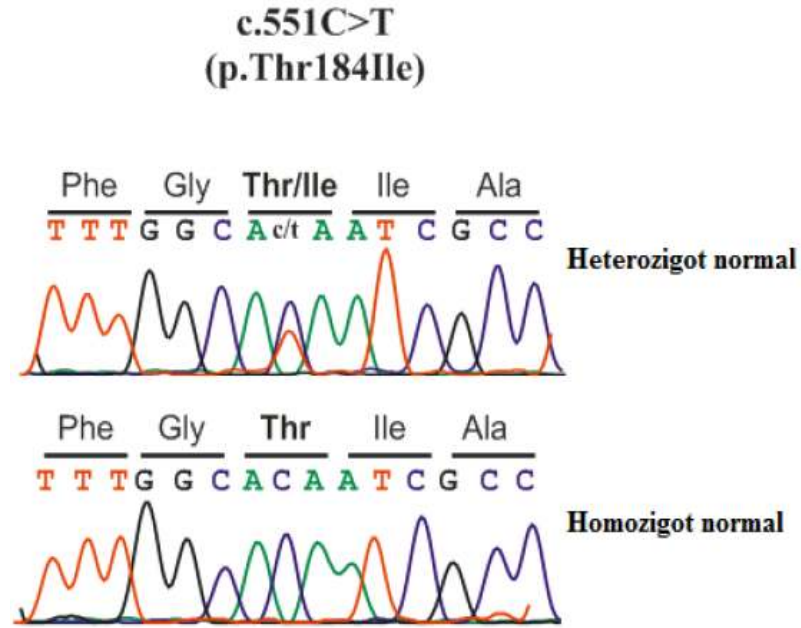
Tablo 14. DB-2094 (Baba) numaralı bireyde *RIPK4* üzerinde görülen değişiklikler.

No	Nükleotid değişikliği		Protein Seviyesinde		SNP	Ekzon/ İntron
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2		
1	c.35C>G	-	p.Ala12Gly	-	rs6586239	Ex1
2	c.159G>A	-	p.Ser53Ser	-	rs6586238	Ex1
3	c.551C>T	-	p.Thr184Ile	-	--	Ex3
4	c.630G>A	-	p.Ala210Ala	-	rs2838114	Ex4
6	c.1203C>T	-	p.Gly401Gly	-	rs3746894	Ex8
7	c.1476G>A	-	p.Ala492Ala	-	rs3746893	Ex8
8	c.1548C>T	-	p.Asp528Asp	-	rs2838113	Ex8
9	c.1996A>G	c.1996A>G	p.Pro665Pro	p.Pro665Pro	rs3746891	Ex8
10	c.2331G>A	-	p.Thr777Thr	-	rs7276592	Ex8
11	c.2445T>C	-	-	-	rs6586232	Ex8
12	IVS6-19C>T	-	-	-	rs73906243	Int6
13	IVS6- 45T>G	-	-	-	rs2277790	Int6
14	IVS7-43A>G	-	-	-	rs3746895	Int7

Hastanın annesinde ise *RIPK4* geni üzerinde 13 farklı değişiklik görüldü (Tablo 15). Bu değişikliklerden on ikisi bilinen SNP'lere karşılık gelirken, hastanın babasında olduğu gibi üçüncü ekzonda görülen ve bilinen SNP'ler ile eşleşmeyen c.551C>T değişimi heterozigot olarak görüldü (Şekil 16).

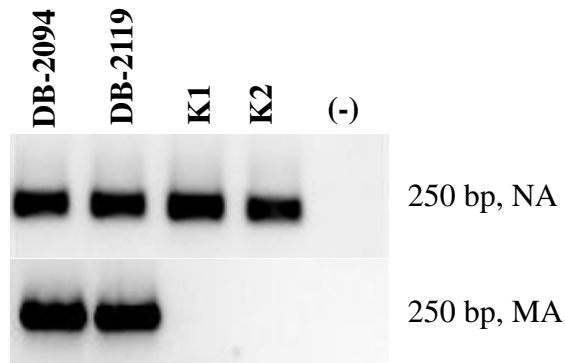
Tablo 15. DB-2119 (Anne) numaralı bireyde *RIPK4* üzerinde görülen değişiklikler.

No	Nükleotid değişikliği		Protein Seviyesinde		SNP	Ekzon/İntron
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2		
1	c.35C>G	-	p.Ala12Gly	-	rs6586239	Ex1
2	c.551C>T	-	p.Thr184Ile	-	-	Ex3
3	c.1005G>T	-	p.Leu335Leu	-	rs2277789	Ex7
4	c.1203C>T	-	p.Gly401Gly	-	rs3746894	Ex8
5	c.1476G>A	-	p.Ala492Ala	-	rs3746893	Ex8
6	c.1548C>T	-	p.Asp528Asp	-	rs2838113	Ex8
7	c.1996A>G	-	p.Pro665Pro	-	rs3746891	Ex8
8	c.2331G>A	-	p.Thr777Thr	-	rs7276592	Ex8
9	c.2445T>C	-	-	-	rs6586232	Ex8
10	IVS4-135T>G	-	-	-	rs13048502	Int4
11	IVS6-19C>T	-	-	-	rs73906243	Int6
12	IVS6-45T>G	IVS6-45T>G	-	-	rs2277790	Int6
13	IVS7-43A>G	IVS7-43A>G	-	-	rs3746895	Int7



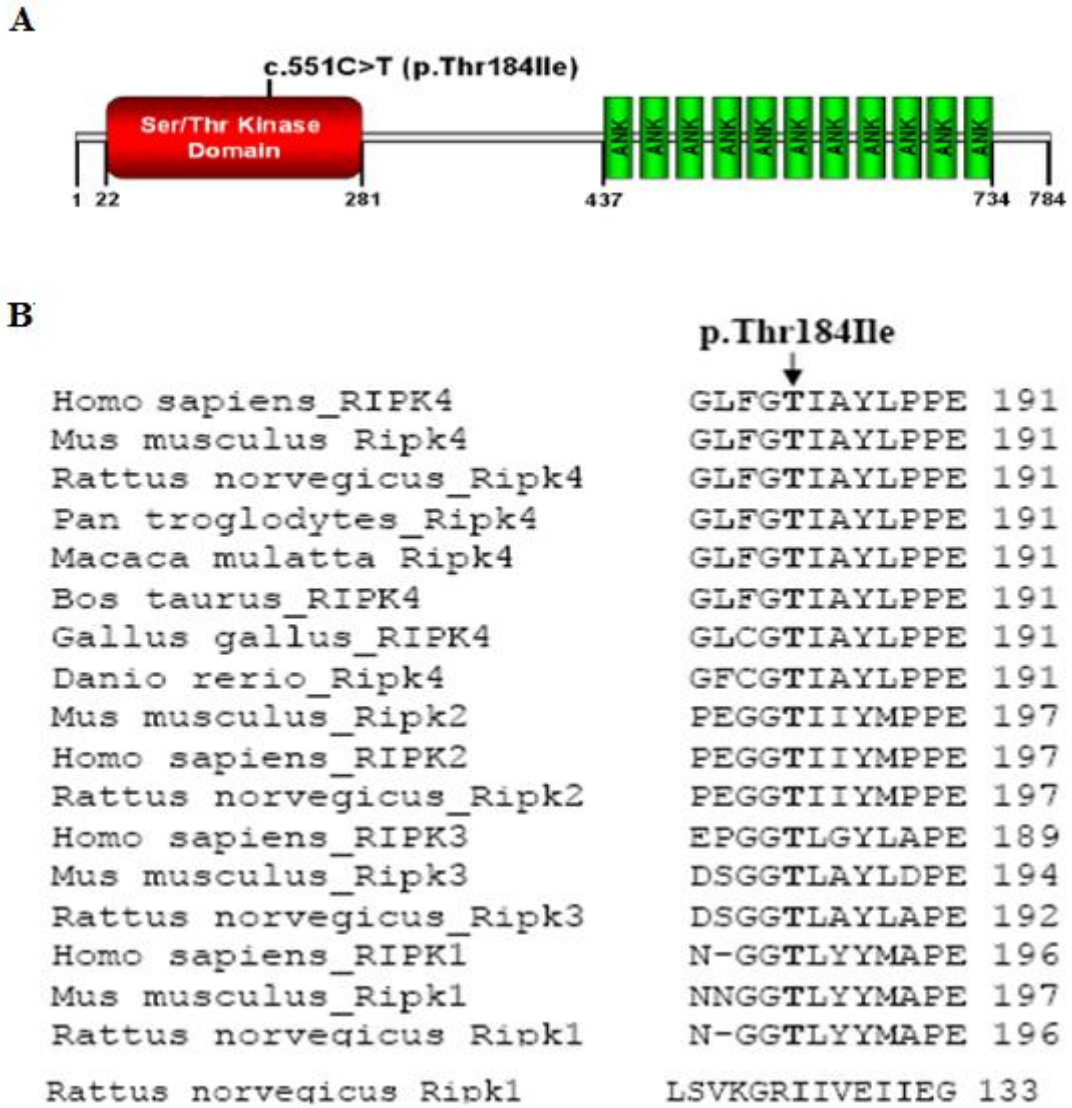
Şekil 16. *RIPK4* geninde tanımlanan c.551C>T değişimi kromatogramı. Üst panel; heterozigot normal birey, alt panel; homozigot normal birey.

ARMS yöntemi kullanılarak yapılan taramada c.551C>T değişiminin anne ve babada heterozigot olarak bulunduğu doğrulandı (Şekil 17). Etnik olarak örtüşen 335 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda yapılan taramada ise c.551C>T değişimi hiçbir bireyde görülmedi.



Şekil 17. c.551C>T değişiminin TR_BPS ailesindeki dağılımının ARMS ile gösterilmesi. DB-2094; Heterozigot normal baba, DB-2119; Heterozigot normal anne, K1 ve K2; Homozigot normal bireyler, (-); Negatif kontrol, NA; Normal allel, MA; Mutant allel.

TR_BPS ailesinde tanımladığımız *RIPK4* geni üzerindeki c.551C>T değişimi, proteinin kinaz domaini üzerinde bulunan 184. pozisyonundaki treonin amino asidinin izolösine dönüşümüne (p.Thr184Ile) neden olmaktadır (Şekil 18A). *ClustalW Multiple Sequences Alignment* programı kullanılarak yapılan değerlendirmede *RIPK4*'ün 184. pozisyonunda bulunan treonin amino asidinin farklı türlerdeki RIP kinaz ailesi üyeleri arasında yüksek düzeyde korunmuş olduğu gösterildi (Şekil 18B).



Şekil 18. RIPK4'te belirlenen p.Thr184Ile değişimi için *in silico* analiz. A) p.Thr184Ile amino asit değişiminin proteinin serin-treonin kinaz domaini üzerindeki, B) p.Thr184Ile değişiminin RIP kinaz ailesi ve RIPK4 ortologları arasındaki korunmuşluğunun *ClustalW Multiple Sequences Alignment* programı kullanılarak gösterilmesi.

SIFT ile yapılan bir diğer analiz, RIPK4'ün 184. pozisyonundaki treonin amino asidi kalıntısının izolösün ile yer değiştirmesinin tolere edilemeyeceğini göstermektedir (Şekil 19).

Tolere edilemez aminoasitler	Pozisyon	Tolere edilebilir aminoasitler
w	179D	y f c m h i v l p g r n q t A D S K e
w	180G	f m y c h i l v P r q t d k N e G S A
wh g	181L	c d n p r y q s k f m E t A v I L
	182F	w c m p d i e q t v n h G F s l R y a k
y w v t s r q p n m l k i h f e d c a	183G	G
wh y c f q r d e g p k r i	184T	l a v s M T
d h g w n c e r s y k q	185I	t P a f m v I L
w	186A	c f y m h p l l g n r V q d t S k A E
q k n r h d g e p c t s m a v i w l	187Y	F Y
h d w n q e p c r g s k y t a	188L	f M L V I
wh y f m i n q r c d l k e t v	189P	s g A P

Şekil 19. p.Thr184Ile değişimi için SIFT analizi. SIFT programı ile RIPK4'ün 184. pozisyonundaki treonin (T) amino asidi kalıntısının izolösün (I) ile yer değiştirmesinin değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Limb pterygium sendromları; boyun, diz arkası, dirsek pterygiumları ve eklemlerde hareket kısıtlılığı gibi multiple konjenital anomaliler ile karakterize, hem genetik hem de fenotipik olarak heterojenite gösteren nadir bir grup hastalıktır (3). Limb pterygium sendromları, fenotipik bulgularından olan pterygium yapısının bulunduğu bölgeye göre farklı alt gruplara ayrılmış olup, pterygium yapısının hem alt hem de üst ekstremitelerde görülebildiği durumlarda multiple pterygium; özellikle diz arkasında bulunduğu durumlarda ise popliteal pterygium sendromu olarak isimlendirilmişlerdir (19, 63). Bir diğer sınıflandırma ise pterygium sendromlarının ölümcül olup olmama özelliklerine göre yapılmıştır (5). Bu hastalık grubu ile ilgili olarak farklı fenotipik bulgulara sahip yeni vakaların tanımlanması ve hastalığın gerek klinik gerekse genetik olarak yüksek heterojenite göstermesi nedeniyle sınıflandırılması halen daha netleşmemiştir.

Araştırmamızın konusunu oluşturan Aslan tip multiple pterygium sendromu (ATMPS), diğer pterygium sendromlarında daha önce tanımlanmamış olan çene kemiklerinde füzyon, medial kantal ağ ve rektal polip gibi anomalilerin varlığına bağlı olarak multiple pterygium sendromlarının yeni bir varyantı olarak rapor edilmiştir (10). Ancak daha sonraları, ATMPS vakası ile ilgili olarak vücudun üst kısmında pterygium bulunmaması, popliteal bölgede belirgin pterygium yapısının olması ve BPS'nin karakteristik özelliklerinden olan ankiloblefaron, el ve ayaklarda sindaktili ve çeşitli kraniyofasiyel anomalilerin bulunması gibi sebeplerden dolayı ATMPS'nin BPS ile aynı sendrom olabileceği önerilmiştir (63). TR_ATMPS ailesinde, yaşayan ikinci hasta çocukta medial kantal ağ ve rektal polip gözlenmemesi ve bu bireyin Bartsocas-Papas sendromu ile uyumlu klinik fenotip sergilemesi ATMPS'nin BPS ile aynı hastalık olduğu yönündeki önerileri güçlendirmiştir.

Bartsocas-Papas sendromu sıklıkla ölü doğum veya doğumdan kısa bir süre sonra ölümle sonuçlanmaktadır (3, 5, 6, 18). BPS hastalarının ölüm sebeplerinden biri atipik fasiyal yarıklara bağlı olarak gelişen pnömoni olmakla birlikte, solunum yetmezliği ve

sepsis diğer nedenler olarak sıralanmıştır (6, 9, 18). Bununla birlikte çocukluk dönemine kadar yaşayan BPS'li bireyler de rapor edilmiştir (7, 8, 9). TR_ATMPS ailesinde, uzun bir yoğun bakım süresinden sonra biri 2, diğeri 13 yaşında olan iki hastanın halen yaşıyor olması, doğumdan sonraki tedavi sürecinin hastaların yaşama şansını arttırdığını göstermektedir.

IRF6 geni üzerindeki mutasyonların popliteal pterygium sendromunun daha hafif formu olan ve otozomal dominant kalıtım gösteren popliteal pterygium sendromuna neden olduğu gösterilmiştir (16). Ancak PPS'nin daha ölümcül formu olan ve otozomal resesif kalıtım gösteren Bartsocas-Papas sendromlu hastalarda *IRF6* geninde mutasyon bulunmamıştır (64). Geline aşamada Aslan tip multiple pterygium sendromu ve Bartsocas-Papas sendromu ile ilişkilendirilmiş bir gen bilinmemektedir.

Çalışma kapsamında değerlendirdiğimiz TR_ATMPS ailesinde yapılan genetik haritalama çalışmalarında hastalıkla birlikte kalıtılan kritik bölgedeki genlerden olan *RIPK4*, RIP kinaz ailesinin bir üyesi olup, *reseptör etkileşimli serin-treonin kinaz 4* proteinini kodlamaktadır. *RIPK4*, amino ucunda serin-treonin kinaz domaini, karboksil ucunda 11 ankyrin tekrarı ve bu iki bölgeyi birbirine bağlayan bir ara bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1) (23, 24). *RIPK4*'ün eksikliği (*Ripk4*^{-/-}) farelerde ağız, yüz, burun ve kuyruk bölgelerinde anormal epidermal farklılaşma sebebi ile çoklu anomalilere neden olmaktadır. Ayrıca damak ve dudaklar arasındaki yapışıklıktan dolayı *Ripk4*^{-/-} fareler solunum yolu tıkanıklığı sebebiyle doğumu takiben kısa bir sürede ölmektedir. Ancak *Ripk4*'ün heterozigot mutant (*Ripk4*^{+/-}) olduğu durumlarda fareler normal fenotip ile doğmaktadır (26, 28). *Ripk4*^{+/-} farelerde bu anomalilerin ortaya çıkmaması otozomal resesif kalıtım kalıbı ile uyum göstermektedir. *Ripk4*^{-/-} farelerde ATMPS ve BPS fenotipi ile benzer epidermal anomalilerin görülmesinden yola çıkılarak *RIPK4* geni bu çalışmada ATMPS'den sorumlu aday gen olarak seçilmiştir.

TR_ATMPS ailesinde yapılan *RIPK4* geni mutasyon taraması sonucunda belirlenen c.362T>A (p.Ile121Thr) missense mutasyonu, *RIPK4*'ün serin-treonin kinaz domaini üzerinde korunmuş olan 121. pozisyonundaki izolosin amino asidininin, treonin amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır (Şekil 14A, 14B). TR_ATMPS ailesindeki hastaların her ikisinde de c.362T>A (p.Ile121Thr) mutasyonunun homozigot olarak görülmesi ve ailedeki sağlıklı bireylerin hiçbirinde söz konusu mutasyonun görülmemesi, bu mutasyonun ailede hastalıktan sorumlu olabileceğini göstermektedir (Şekil 13). Ayrıca

değişikliğinin proteinin fonksiyonu açısından tolere edilemediği *SIFT* analizi ile de desteklenmiştir (Şekil 15).

TR_BPS ailesinde yapılan *RIPK4* geni mutasyon taraması sonucunda ise yine proteinin serin-treonin kinaz domaini üzerinde korunmuş bir amino asidin değişmesine (p.Thr184Ile) neden olan bir mutasyon c.551C>T belirlenmiştir (Şekil 16). TR_BPS ailesindeki hastanın doğumdan kısa bir süre sonra ölmüş olması ve elimizde bu hastaya ait DNA örneğinin mevcut olmamasından dolayı hastada c.551C>T mutasyonunu test etme imkânımız olmamıştır. Ancak hastanın, aralarında akrabalık bağı olan, annesi ve babasında bu mutasyonun heterozigot olarak görülmesi, c.551C>T mutasyonunun ailede hastalıktan sorumlu olabileceğini fikrini desteklemektedir (Şekil 17). Diğer taraftan *RIPK4*'ün faredeki ortoloğu olan *Ripk4* proteininin 184. pozisyonunda bulunan treonin amino asidinin, site-directed mutagenesis yöntemi ile alanine dönüştürülmesi sonucunda *Ripk4*'ün kinaz aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir (30). Bu durum *RIPK4*'ün kinaz aktivitesi için Thr184 amino asit kalıntısının son derece önemli role sahip olduğunu gösterirken, TR_BPS ailesinde gördüğümüz değişimin de mutasyon olduğuna işaret etmektedir.

RIPK4, PKC bağımlı NF-κB sinyal yolağı üzerinden epidermal gelişimi ve keratinosit farklılaşmasını kontrol etmektedir (26, 27, 28). *RIPK4* aracılı NF-κB aktivasyonunda *RIPK4* proteininin serin-treonin kinaz domaini belirleyici role sahiptir (25, 29, 30). *Ripk4*'ün kinaz domainin inaktivasyonu durumunda keratinositlerde NF-κB aktivasyonu azalmaktadır ve epidermal gelişim ile birlikte keratinosit farklılaşması bozulmaktadır (27, 28). Bu çalışmada tanımlamış olduğumuz her iki mutasyon da (p.Ile121Asn ve p.Thr184Ile) proteinin serin-treonin kinaz domaini üzerinde bulunmaktadır. Bu durum epidermal gelişim ve keratinosit farklılaşması için gerekli olan NF-κB sinyal yolunun bozulduğunu göstermektedir.

Nüklear faktör-κB ailesi üyeleri memelilerde immun sistem ve inflamasyonda görev aldıkları gibi farklı tipteki hücrelerin çoğalma, sağkalım ve apoptoz mekanizmalarında da rol almaktadırlar (31, 32, 36, 37). Nüklear faktör-κB transkripsiyon faktörü olup birbirine benzer beş farklı proteinin (NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), c-Rel ve RelB) farklı kombinasyonları sonucu oluşan homo veya heterodimer bir yapıya sahiptir (31, 32). c-Rel embriyolojik gelişim sürecinde mezodermal hücrelerle birlikte ekstremiteleri meydana getirecek olan tomurcukların oluşumunda önemli göreve sahip olan apikal ektodermal sırtta (AER) yüksek seviyede eksprese olmaktadır. c-Rel'in

eksikliğinde AER'in ve ekstremitelerin gelişimi bozulmaktadır (70, 71). Diğer taraftan RelA (p65)'nın da epidermal gelişim sürecinde c-Rel ile birlikte rol oynadığı gösterilmiştir (69).

Nüklear Faktör- κ B çok çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive olmasına rağmen bu sinyal yolları inhibitör kappa kinaz (IKK) kompleksi seviyesinde birleşmektedir (34, 37, 68). NF- κ B yolağında rol alan IKK kompleksi iki adet katalitik alt birim (IKK α ve IKK β) ve bir adet regülatör alt birimden (IKK γ /NEMO) oluşmaktadır (33, 34). IKK'nın katalitik alt birimlerinden IKK β 'nin yokluğu fare embriyonik gelişiminde şiddetli apoptoz sonucu karaciğer dejenerasyonuna neden olmaktadır (38, 39). Buna karşın, IKK α 'nın yokluğunda farelerde epidermal hücrelerin gelişiminde ve keratinositlerin farklılaşmasında şiddetli sorunlar yaşandığı ve buna bağlı olarak ekstremit ve kraniofasial anomaliler ortaya çıktığı gösterilmiştir (40, 41, 65). Yakın bir geçmişte IKK α 'nın insanlardaki ortoloğu olan CHUK, epidermal gelişimin, keratinosit farklılaşmasının, el ve ayak gelişiminin bozulması ile karakterize ve otozomal geçiş gösteren Cocoon sendromu [OMIM: 613630] ile ilişkilendirilmiştir (67). Bu veriler NF- κ B sinyal yolağının epidermis ve ekstremitelerin embriyonik gelişiminde önemli rol aldığını ve RIPK4'ün CHUK ile birlikte bu sinyal yolağında yer aldığını göstermektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile Aslan tip multiple pterygium sendromunun, Bartsocas-Papas sendromunun bir varyantı olduğu ve bu hastalığın oluşumuna NF- κ B sinyal yolağı üzerinden keratinosit farklılaşması sürecinde rol alan RIPK4 proteinini kodlayan *RIPK4* geni mutasyonlarının neden olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Otozomal resesif kalıtım gösteren Aslan tip multiple pterygium sendromunun genetik etiyolojisinin belirlenmesini amaçlayan bu çalışma kapsamında TR_ATMPS ailesinde genetik haritalama yapıldı ve hastalığın 21q22.3 kromozom bölgesinde rs2838045 ve rs225444 SNP'leri arasındaki 0.71 cM'lik bölge ile kalıtıldığı belirlendi.
2. Bağlantı bölgesinde bulunan yedi adet genin fonksiyonları incelendi. Farelerde *Ripk4* geninin eksikliği sonucu Aslan tip multiple pterygium sendromuna benzer klinik bulguların ortaya çıkmış olmasından hareketle bağlantı bölgesinde yer alan ve *Ripk4*'ün insanlardaki ortoloğu olan *RIPK4* hastalıktan sorumlu olabilecek aday gen olarak seçildi.
3. Hasta bireylerin genomik DNA'sı kullanılarak *RIPK4* geninde yapılan mutasyon taraması sonucunda gen üzerinde hastalıkla birlikte kalıtılan c.362T>A (p.Ile121Asn) değişimi tespit edildi.
4. Aslan tip multiple pterygium sendromunun Bartsocas-Papas sendromu ile aynı sendrom olabileceği yönündeki önerilerden yola çıkılarak, Bartsocas-Papas tanısı almış ancak yaşamayan bir hastanın bulunduğu TR_BPS ailesindeki anne ve babada yapılan mutasyon taraması sonucunda yine *RIPK4* üzerinde, patolojik olduğu fare çalışmalarında gösterilmiş c.551C>T (p.Thr184Ile) değişimi tespit edildi.
5. Kontrol grubumuzu oluşturan 335 sağlıklı bireyde c.362T>A ve c.551C>T değişimleri görülmedi.
6. *ClustalW Multiple Sequences Alignment* programı ile Ile121Asn ve Thr184Ile amino asit değişimlerinin *RIPK4* proteinin farklı canlılardaki ortologlarında korunmuş olarak bulunan amino asitlere karşılık geldiği; SIFT analizi ile de yine bu amino asit değişimlerinin, *RIPK4* proteininin fonksiyonu açısından tolere edilemeyecek değişimler olduğu gösterildi.

7. Sonuç olarak bu tez kapsamında Aslan tip multiple pterygium sendromundan sorumlu gen tanımlanmış ve bu genin RIPK4 olduğu gösterilmiştir.

8. Geline aşamada birbirinden farklı sendromlar olarak tanımlanan Aslan tip multiple pterygium ve Bartsocas-Papas sendromlarının aynı gen üzerindeki mutasyonlar sonucu oluşmuş, birbirinin varyantı olan sendromlar olabileceği fikrine varıldı. İleride yapılacak olan çalışmalar bu konuya daha da netlik kazandıracaktır.

9. RIPK4 proteini, NF- κ B sinyal yolağı üzerinden keratinosit proliferasyonu ve farklılaşması sürecine katılmaktadır. Ancak bu süreçteki tam rolü bilinmemektedir. İleride bu konuları aydınlatmaya yönelik fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

Multiple pterygium sendromunun bir varyantı olan Aslan tip multiple pterygium sendromu (ATMPS) [OMIM: 605203]; kraniyofasiyal yarık, el-ayak malformasyonu ve şiddetli popliteal pterygium ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Yalnızca bir hastada tanımlanmış olan ATMPS'nin, fenotipik benzerliklerinden yola çıkılarak, Bartsocas-Papas sendromu ile aynı hastalık olabileceği yönünde görüşler bildirilmiştir. Geline aşamada ATMPS ve Bartsocas-Papas sendromundan sorumlu genler bilinmemektedir. Bu çalışmada ATMPS'den sorumlu genin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında ATMPS'nin ilk kez tanımlandığı ve ikisi hayatta toplam altı etkilenmiş bireyin bulunduğu aile değerlendirildi. Genom boyu homozigotluk taraması ve takip eden ayrıntılı haritalama sonucunda hastalığın ailede 21q22.3 kromozom bölgesinde rs2838045 ve rs225444 SNP'leri arasında kalan 0.71 cM'lik bir bölge ile kalıtıldığı gösterildi. Seçilen aday gende yapılan mutasyon taraması ile NF-κB sinyal yolağı üzerinden epidermis gelişimi ve keratinosit farklılaşmasında kritik rol oynayan, *reseptör etkileşimli serin-treonin kinaz 4* proteinini kodlayan *RIPK4* geni üzerinde homozigot c.362T>A (p.Ile121Asn) mutasyonu belirlendi. Bartsocas-Papas sendromu tanısı almış bir bireyin bulunduğu ailede yapılan mutasyon taramasında yine *RIPK4* geni üzerinde c.551C>T (p.Thr184Ile) mutasyonu belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada ATMPS'nin Bartsocas-Papas sendromunun bir varyantı olabileceği ve embriyonik gelişimde kritik öneme sahip *reseptör etkileşimli serin-treonin kinaz 4* proteinini kodlayan *RIPK4* geni mutasyonlarının ATMPS ve BPS'den sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aslan Tip Multiple Pterygium Sendromu, Bartsocas-Papas Sendromu, *RIPK4*, RIP, NF-κB

8. ABSTRACT

Investigation of The Genetic Etiology of Aslan Type Multiple Pterygium Syndrome

Aslan type multiple pterygium syndrome (ATMPS) [OMIM: 605203], a variant of multiple pterygium syndrome (MPS), is an autosomal recessive disorder and characterized by craniofacial cleft, limb malformations and severe popliteal pterygium. ATMPS has been described only in one patient and depending on the phenotypic similarities it was suggested that it might be the same disorder with Bartsocas-Papas syndrome (BPS). The causative genes for ATMPS and Bartsocas-Papas syndrome are still unknown. In this thesis it was aimed to identify the causative gene of the ATMPS.

In this study, we evaluated the original ATMPS family in which the syndrome was described. In ATMPS family there are six affected individuals and only two of them are still alive. Genome-wide homozygosity mapping and subsequent fine mapping revealed co-segregation of 0.71 cM interval between SNPs rs2838045 and rs225444 on chromosome 21q22.3 with disease in family. Mutation screening of the candidate gene revealed a homozygous c.362T>A (p.Ile121Asn) mutation in *RIPK4* gene encoding *receptor interacting serine threonine kinase 4* which has a critical role in NF- κ B induced epidermal development and keratinocyte differentiation. Mutation screening in a family which there was an affected individual suffering from Bartsocas-Papas syndrome revealed a missense mutation, c.551C>T (p.Thr184Ile), in *RIPK4* gene.

In conclusion, here we suggested that ATMPS might be the variant of Bartsocas-Papas syndrome and mutations in *RIPK4* gene encoding *receptor interacting serine threonine kinase 4* protein which has a critical function in embryonic development cause ATMPS and BPS.

Keywords: Aslan Type Multiple Pterygium Syndrome, Bartsocas-Papas Syndrome, *RIPK4*, RIP, NF- κ B

9. KAYNAKLAR

1. Cooper, G.M., Hausman, R.E.: The Cell: A Molecular Approach. Fifth Edition, ASM Press, Washington, 2009, Sf. 186-188.
2. OMIM Statistics Homepage, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html> (Son güncelleme: Ağustos 2011).
3. Hall, J.G., Reed, S.D., Rosenbaum, K.N., Gershanik, J., Chen, H., Wilson, K.M.: Limb pterygium syndromes: a review and report of eleven patients. Am J Med Genet., 12(4):377-409, 1982.
4. Gorlin, R.J., Cohen, M.M., Levin, L.S.: Popliteal pterygium syndrome (facio-genito-popliteal syndrome). Syndromes of the Head and Neck. Oxford Univ. Press., New York, 1990, Sf. 629-631.
5. Hall, J.G.: The lethal multiple pterygium syndromes. Am. J. Med. Genet., 17: 803-807, 1984.
6. Bartsocas, C.S., Papas, C.V.: Popliteal pterygium syndrome. Evidence for a severe autosomal recessive form. J Med Genet., 9(2):222-6, 1972.
7. Dolan, S.M., Shanske, A.L., Marion, R.W., Gross, S.J.: First-trimester diagnosis of Bartsocas-Papas syndrome (BPS) by transvaginal ultrasound: case report and review of the literature. Prenat Diagn. 23(2):138-42, 2003.
8. Maganzini, A.L., Rios, A., Shanske, A.: Craniofacial characteristics evidenced in Bartsocas-Papas syndrome from birth to five years. N Y State Dent J., 72(4):34-7, 2006.

9. Massoud, A.A., Ammaari, A.N., Khan, A.S., ven Katraman, B., Teebi, A.S.: Bartsocas-Papas syndrome in an Arab family with four affected sibs: further characterization. *Am J Med Genet.*, 79(1):16-21, 1998.
10. Aslan, Y., Erduran, E., Kutlu, N.: Autosomal recessive multiple pterygium syndrome: a new variant? *Am J Med Genet.*, 93(3):194-7, 2000.
11. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Tıbbi Genetik. 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2005, Sf. 1-3.
12. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Tıbbi Genetik. 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2005, Sf. 299-310.
13. Strachan, T., Read, A.: Human Molecular Genetics. Fourth Edition, Garland Science, New York, 2011, Sf. 64-73.
14. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Tıbbi Genetik. 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2005, Sf. 51-77.
15. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F.: Thompson & Thompson: Tıbbi Genetik. 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 2005, Sf. 79-86.
16. Kondo, S., Schutte, B.C., Richardson, R.J., *et al.*: Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.*, 32(2):285-9, 2002.
17. Kalender, A.M., Dogan, A., Sebik, A., Gokalp, M.A.: "Ring leg deformity" in Bartsocas-Pappas syndrome. *Eur J Med Genet.*, 52(4):269-70, 2009.
18. Veenstra-Knol, H.E., Kleibeuker, A., Timmer, A., Ten Kate, L.P., Van Essen, A.J.: Unreported manifestations in two Dutch families with Bartsocas-Papas syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 123(3):243-248, 2003.
19. Al-Sawan, R.M., Soni, A.L., Al-Nakkas, E.M., Gang, R.K.: Bartsocas-Papas syndrome in a Pakistani family from Kuwait. *Indian Pediatr.*, 41(7):725-7, 2004.
20. Alberts, B., Johnson, A., *et al.*: Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Dördüncü Baskı, TÜBA, Ankara, 2008, Sf. 177-180.

21. Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T.: The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 1988.
22. Meylan, E., Tschopp, J.: The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci.*, 30(3):151-9, 2005.
23. Bähr, C., Rohwer, A., Stempka, L., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M.: DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase C δ . Cloning, characterization, and gene analysis. *J. Biol. Chem.*, 275, 36350–36357, 2000.
24. Chen, L., Haider, K., Ponda, M., Cariappa, A., Rowitch, D., Pillai, S.: Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem.*, 276(24):21737-44, 2001.
25. Meylan, E., Martinon, F., Thome, M., Gschwendt, M., Tschopp, J.: RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep.*, 3(12):1201-8, 2002.
26. Holland, P., Willis, C., Kanaly, S., Glaccum, M., Warren, A., Charrier, K., Murison, J., Derry, J., Virca, G., Bird, T., Peschon, J.: RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr Biol.*, 12(16):1424-8, 2002.
27. Adams, S., Pankow, S., Werner, S., Munz, B.: Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol.*, 127(3):538-44, 2007.
28. Rountree, R.B., Willis, C.R., Dinh, H., Blumberg, H., Bailey, K., Dean, C., Peschon, J.J., Holland, P.M.: RIP4 Regulates Epidermal Differentiation and Cutaneous Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 130:102–112, 2010.
29. Muto, A., Ruland, J., McAllister-Lucas, L.M., Lucas, P.C., Yamaoka, S., Chen, F.F., Lin, A., Mak, T.W., Núñez, G., Inohara, N.: Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem.* 277(35):31871-6, 2002.
30. Moran, S.T., Haider, K., Ow, Y., Milton, P., Chen, L., Pillai, S.: Protein kinase C-associated kinase can activate NFkappaB in both a kinase-dependent and a kinase-independent manner. *J Biol Chem.*, 278(24):21526-33, 2003.

31. Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S.: Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, 9(22):2723-35, 1995.
32. Moynagh, P.N.: The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.*, 118:4589-92, 2005.
33. Karin, M., Delhase, M.: The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.*, 12(1):85-98, 2000.
34. Perkins, N.D.: Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(1):49-62, 2007.
35. Hayden, M.S., Ghosh, S.: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3):344-62, 2008.
36. Karin, M., Lin, A.: NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.*, 3(3):221-7, 2002.
37. Solt, L.A., May, M.J.: The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling. *Immunol Res.*, 42(1-3):3-18, 2008.
38. Li, Q., van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., Verma, I.M.: Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*, 284(5412):321-5, 1999.
39. Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L., Goeddel, D.V.: Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*, 10(4):421-9, 1999.
40. Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., Karin, M.: Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, 284(5412):316-20, 1999.
41. Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., Akira S.: Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science*, 284(5412):313-6, 1999.
42. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350-4, 1985.

43. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
44. Erlich, H.A.: PCR technology, principles and applications for DNA amplification: New York, W. H. Reeman and Company, 1992, Sf. 17-23.
45. Kolmodin, L.A., Williams, J.F.: Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practices In *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Rapley, R. (Eds.) Totowa, New Jersey, Human Press Inc., 2000, Sf. 569-580.
46. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E.: Analysis of any point mutation in DNA. Amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17:2503-2516, 1989.
47. Ferrie, R.M., Schwarz, M.J., Robertson, N.H., Vaudin, S., Super, M., Malone, G., Little, S.: Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet.*, 51(2):251-62, 1992.
48. Nollau, P., Wagener, C.: Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical chemistry*, 43 (7): 1114-1128, 1997.
49. Tan, K.L., Tan, JAMA., Wong, Y.C., Wee, Y.C., Thong, M.K., Yap, S.F.: Combine-ARMS: A rapid and cost-effective protocol for molecular characterization of (β -Thalassemia in Malaysia. *Genetic Testing*, 5 (1): 17-22, 2001.
50. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 74(12):5463-7, 1977.
51. Maxam, A.M., Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci.*, 74(2):560-4, 1977.
52. Technical Manual: Silver SequenceTM DNA sequencing System Promega Corporation, Q4100, USA.
53. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. Thompson & Thompson *Genetics in Medicine*, Seventh Edition, 2007, Sf 46-48.

54. Akarsu, A.N., Lüleci, G.: Gen Haritalaması: Ne Demek, Haritalar Nasıl Oluşturuluyor, Neler İçeriyor, Nasıl Yorumlanıyor? Dokuz Eylül Üniv.Tıp Fak. Dergisi, Özel Sayı:29-39, 2002.
55. Strachan, T., Read, A.: Human Molecular Genetics. Fourth Edition, Garland Science, New York, 2011, Sf. 209-211.
56. Affymetrix Genome-Wide Genotyping Homepage:
http://www.affymetrix.com/estore/browse/level_three_category_and_children.jsp?parent=35621&expand=true&category=35894&fromAccordionMenu=true&subCategory=35894.
57. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 16:1215, 1988.
58. Mehra, R., Tomlins, S.A., Shen, R., Nadeem, O., Wang, L., Wei, J.T., Pienta, K.J., Ghosh, D., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M., Shah, R.B.: Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. Mod Pathol., 20(5):538-44, 2007.
59. Bashyam, M.D., Bair, R., Kim, Y.H., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Karikari, C.A., Tibshirani, R., Maitra, A., Pollack, J.R.: Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. Neoplasia, 7(6):556-62, 2005.
60. Wang, J., Kudoh, J., Takayanagi, A., Shimizu, N.: Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with ZFP161. Biochem Biophys Res Commun., 327(2):615-27, 2005.
61. Di Schiavi, E., Riano, E., Heye, B., Bazzicalupo, P., Rugarli, E.I.: UMODL1/Olfactorin is an extracellular membrane-bound molecule with a restricted spatial expression in olfactory and vomeronasal neurons. Eur J Neurosci., 21(12):3291-300, 2005.
62. Matsuo, M.: ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. Biosci Biotechnol Biochem., 74(5):899-907, 2010.

63. Teebi, A.S.: Not a new variant of the autosomal recessive multiple pterygium syndrome but the Bartsocas-Papas syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 101(1):78-78, 2001.
64. Shanske, A.L., Hoper, S.A., Krahn, K., Schutte, B.C.: Mutations in IRF6 do not cause Bartsocas-Papas syndrome in a family with two affected sibs. *Am J Med Genet A*, 128A(4):431-3, 2004.
65. Hu, Y., Baud, V, Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K., Karin, M.: IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature*, 410:710-4, 2001.
66. Stevenson, R.E., Saul, R.A., Collins, J., Davis, W.M., Lanford, C.: Cocoon fetus; fetal encasement secondary to ectodermal dysplasia. *Proc Greenwood Genet Center*, 6:10-5, 1987.
67. Lahtela, J., Nousiainen, H.O., Stefanovic, V., Tallila, J., Viskari, H., Karikoski, R., Gentile, M., Saloranta, C., Varilo, T., Salonen, R., Kestilä, M.: Mutant CHUK and severe fetal encasement malformation. *N Engl J Med*, 363(17):1631-7, 2010.
68. Häcker, H., Karin, M.: Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*; (357):3, 2006.
69. Gugasyan, R., Voss, A., Varigos, G., Thomas, T., Grumont, R.J., Kaur, P., Grigoriadis, G., Gerondakis, S.: The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, (13):5733-45, 2004.
70. Bushdid, P.B., Brantley, D.M., Yull, F.E., Blaeuer, G.L., Hoffman, L.H., Niswander, L., Kerr, L.D.: Inhibition of NF- κ B activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature*, 392(6676):615-8, 1998.
71. Kanegae, Y., Tavares, A.T., Izpisua Belmonte, J.C., Verma, I.M.: Role of Rel/NF- κ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature*, 392(6676):611-4, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Orhan SEZGİN, 08.11.1987 tarihinde Van ili Özalp ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini Van-Özalp Y. Dönerdere Köyü İlköğretim Okulu'nda 1997 yılında, ortaokul ve lise eğitimini Van Milli Piyango Anadolu Lisesi'nde 2004 yılında ve lisans eğitimini Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği programında 2009 yılında tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 1 Temmuz-1 Ekim 2010 tarihleri arasında Fritz Lipmann Enstitüsü (Jena, Almanya) Moleküler Biyoloji Bölümü'nde ERASMUS staj öğrencisi olarak bulundu. KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 22.11.2010 tarihinde araştırma görevlisi olarak atanmış olup halen bu görevi sürdürmektedir.