

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ECTODERMAL DYSPLASIA TANISI ALMIŞ AİLELERDE
HASTALIĞIN KALITSAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Banu GÜVEN EZER

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**

ADİYAMAN, 2024

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen ADYÜ FEFDP/2022-0001 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

ECTODERMAL DYSPLASIA TANISI ALMIŞ AİLELERDE HASTALIĞIN KALITSAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Banu GÜVEN EZER
Biyoloji Anabilim Dalı
Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Nisan/2024
Danışman: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Ectodermal dysplasia (ED) sendromu ektoderm kaynaklı gelişen organlarda anormallikler ile seyreden kompleks genetiksel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. ED, hipohidrotik, anhidrotik ve hidrotik olmak üzere üç şekilde görülür. Daha önce yapılan çalışmada Bir Türk ailesinde hastalığa EDARADD geninin (NM_080738) 6.ekzonda c.439G>A bölgesinde meydana gelen mutasyonun sebep olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın amacı Ectodermal dysplasia (ED) hastalığına sebep olan EDARADD gen mutasyonunun kan bağı ile akrabalığı olan tüm ailelerde saptanması ve taşıyıcıların belirlenmesidir. Ayrıca saptanan nokta mutasyonun sekanslama işlemlerine gereksinim duymayacak şekilde teşhisini hızlı ve ucuz yollarla saptamak amacıyla PCR tabanlı metotlar geliştirmektir. Elde edilecek veriler Tıbbi Genetikçilerin prenatal tanı yöntemlerini geliştirmelerine ve genetik danışmanlık vermelerine yardımcı olacaktır. Ayrıca bu çalışmanın sonucunda doğumsal ED vakalarının sayısının azaltılması veya tam olarak yok edilmesi hedeflenmektedir. Daha önce saptanana hasta bireyin kan bağı olan akrabalarından toplam 61 kişi çalışmaya gönüllü katılmıştır. Gönüllülerin tamamında hem RFLP (MnII endonükleaz ile kesim) yöntemi hem de sekanslama çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre toplam 14 kişi taşıyıcı olarak saptanmıştır. 46 kişi normal homozigot ve bir kişi de hasta olarak belirlenmiştir. Genin otozomal resesif olarak kalıtıldığı ve gen frekansının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ectodermal dysplasia; Anhidrotik; Genetik; Mutasyon; MnII restriksiyon endonükleaz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE HEREDITARY FEATURES OF THE DISEASE IN FAMILIES DIAGNOSED WITH ECTODERMAL DYSPLASIA

Banu GÜVEN EZER

Department of Biology

Adıyaman University, Graduate Education Institute, April/2024

Supervisor: Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Ectodermal dysplasia (ED) syndrome is defined as a complex genetic disease characterized by abnormalities in organs originating from ectoderm. ED occurs in three forms: hypohidrotic, anhidrotic, and hidrotic. In a previous study, it was determined that the disease was caused by the mutation occurring in the c.439G>A region in the 6th exon of the EDARADD gene (NM_080738) in a Turkish family. The aim of this study is to detect the EDARADD gene mutation that causes Ectodermal dysplasia (ED) in all families with blood relatives and to determine the carriers. In addition, it is to develop PCR-based methods in order to detect the point mutation in a fast and inexpensive way without the need for sequencing processes. The data to be obtained will help Medical Geneticists to develop prenatal diagnosis methods and provide genetic counseling. In addition, as a result of this study, it is aimed to reduce or completely eliminate the number of congenital ED cases. A total of 61 blood relatives of the previously identified patient volunteer participated in the study. Both RFLP (MnII endonuclease cutting) method and sequencing studies were performed on all volunteers. According to the results obtained, a total of 14 people were determined to be carriers. 46 people were determined to be normal homozygous and one person was determined to be patient. It has been determined that the gene is inherited in an autosomal recessive manner and the gene frequency is in Hardy-Weinberg balance.

Keywords: Ectodermal dysplasia; Anhidrotic; Genetic; Mutation; MnII restriction endonuclease.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince yardım ve desteklerde bulunan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Süleyman BAYRAM'a, Prof. Dr. Ahmet GENÇ'e ve Doç. Dr. Muhsin AYDIN'a;

Doktora eğitimim boyunca her daim yanımda olan, hiçbir desteğini ve yardımını esirgemeyen çok sevgili eşim Doç. Dr. Sabahattin EZER'e;

Hayatım boyunca her zorlukta bana güç ve destek veren, başaracağıma inanan ve güvenen canım annem Semiha GÜVEN ve canım babam Rafi GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Projemizi maddi yönden destekleyen Adıyaman Üniversitesi BAP komisyonuna da teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı” ile tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Banu GÜVEN EZER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL ve METOT.....	10
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	10
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	10
3.1.1.1. Taq DNA polimeraz (ThermoFisher Scientific EP0406).....	10
3.1.1.2. DNA izolasyon kiti (ThermoFisher Scientific GeneJet).....	10
3.1.1.3. dNTP mix (ThermoFisher Scientific R72501).....	10
3.1.1.4. Primer 200 nmol HPLC pure.....	10
3.1.1.5. MnII restriksiyon endonuclease (ThermoFisher Scientific).....	10
3.1.1.6. Agaroz (Sigma A9539).....	11
3.1.1.7. Ethidium bromide (Sigma E8751).....	11
3.1.1.8. 10X Tris-boric acid-EDTA (10X TBE) tamponu.....	11
3.1.1.9. DNA loading dye (ThermoFisher Scientific R0611).....	11
3.1.1.10. DNA ladder (marker) (ThermoFisher Scientific).....	11
3.1.1.11. MgCl ₂ (magnezyum klorür) (ThermoFisher Scientific).....	11
3.1.1.12. Saf su (dH ₂ O, distile su).....	11
3.1.1.13. ddH ₂ O (double distilled water).....	12
3.1.1.14. Etil alkol (ethanol absolute) (Merck 100983).....	12
3.1.2. Kullanılan deney ekipmanları.....	12

3.1.2.1. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320R).....	12
3.1.2.2. İnkübatör (Nüve EN120).....	12
3.1.2.3. Steril (flow) kabin (ESCO Class II BSC).....	12
3.1.2.4. Hassas terazi (Ohaus Pioneer).....	12
3.1.2.5. Thermal cyclers (termal döngüleyici) (Applied Biosystems).....	12
3.1.2.6. Vortex (karıştırıcı) (Labart Multi-Mixer).....	12
3.1.2.7. Saf su cihazı (Millipore RIOS 8).....	13
3.1.2.8. Isıtıcı manyetik karıştırıcı (VELP Scientifica).....	13
3.1.2.9. Jel elektroforezi ve güç kaynağı (ThermoFisher Scientific).....	13
3.1.2.10. UV-görüntüleme kabini (fotoğraf makineli) (Quantum ST4)....	13
3.1.2.11. Mikrodalga fırın (Arçelik MD564).....	13
3.1.2.12. Mikropipetler (Gilson) ve mikropipet uçları (Axygen).....	13
3.1.2.13. Otoklav (WiseClave).....	13
3.1.2.14. Sıcak su banyosu (Wisebath).....	13
3.1.2.15. Vakumlu tüp.....	14
3.1.2.16. Eppendorf tüpleri	14
3.1.2.17. Erlenmeyer.....	14
3.1.2.18. Mezür (dereceli silindir).....	14
3.1.2.19. Kroze maşası.....	14
3.1.2.20. Spatül.....	14
3.1.2.21. Parafilm.....	14
3.1.2.22. Eppendorf tüp standı.....	15
3.1.2.23. Asetat kalemi.....	15
3.2. Etik İzin.....	15
3.3. Materyal.....	15
3.4. Metot.....	16
3.4.1. Periferal kandan DNA izolasyonu.....	16
3.4.2. DNA nükleotit dizisi amplifikasyonu (PCR, polimeraz zincir reaksiyonu).....	16
3.4.3. Elektroforez ve jelde yürütme.....	17
3.4.4. MnII ile genotiplendirme ve mutasyon analizi (RFLP, restriction fragment length polymorphism).....	18
3.4.5. Sekanslama ile mutasyon analizi.....	19

3.4.6. ARMS (amplification refractory mutation system).....	19
3.5. İstatistiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	21
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	31
KAYNAKÇA.....	32
ÖZGEÇMİŞ	



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. PCR karışımı.....	17
Çizelge 3.2. PCR sıcaklık ve süre döngüleri.....	17
Çizelge 3.3. MnII restriksiyon endonükleazlı kesim karışımı.....	19
Çizelge 4.1. EDARADD (ECTD11B) geni ekzonları, nükleotit dizileri ve translasyon ürünü.....	26



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. MnII restriksiyon endonükleaz kesimi için elde edilen amplifikasyon ürünü. Marker (ortada) 100 bç, PCR ürünleri 128 bç.....	21
Görsel 4.2. Sekanslama çalışmaları için elde edilen amplifikasyon ürünü. Marker (sağda) 100 bç, PCR ürünleri 317 bç.....	21
Görsel 4.3. MnII kesimi sonrası elde edilen jel görüntüleri. M: Marker (100 bç), H: Hasta, T: Taşıyıcı ve N: Normal bireyler.....	22
Görsel 4.4. Sağlıklı bireylerde sekans görüntüsü.....	23
Görsel 4.5. Hasta bireylerde sekans görüntüsü.....	23
Görsel 4.6. Heterozigot bireylerde sekans görüntüsü.....	23
Görsel 4.7. Hem MnII ile kesim hem de sekanslama yoluyla yapılan genotiplendirme çalışmaları sonuçlarına göre çizilen aile ağacı.....	24
Görsel 4.8. ARMS yöntemine göre mutasyon analizi.....	25
Görsel 4.9. EDA, EDAR ve EDARADD sinyal iletim yolu. Ligand (EDA), reseptör (EDAR) ve sinyal iletilci (EDARADD) birbirlerinin sinyalleri için spesifiktirler. Sitoplazma içinde diğer sinyal iletilciler sinyal iletimi için başka diğer reseptörler tarafından kullanılabilir. Üç gendeki mutasyonlar ED sendromuna neden olmaktadır	27
Görsel 4.10. EDARADD gen ürününün proteininin tersiyer yapısı.....	28

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACMG	: The American College of Medical Genetics and Genomics
AD-HED	: Autosomal Dominant-Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia
AD	: Autosomal Dominant
AR	: Autosomal Recessive
Arg	: Arginin
AR-HED	: Autosomal Recessive-Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System
ATGC	: Adenin-Timin-Guanin-Sitozin
bç	: Baz Çifti
CADD	: Combined Annotation Dependent Depletion
Chr	: Chromosome
ddH ₂ O	: Sterile Double Distilled Water
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
ddNTP	: Di-deoxynucleotides Triphosphates
ED	: Ectodermal Dysplasia
EDA	: Ectodysplasin-A
EDAR	: Ectodysplasin A Receptor
EDARADD	: EDAR-Associated Death Domain
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
F ve R	: Forward ve Reverse
g	: Gram
GJB6	: GAP (Glyceraldehyde-3-Phosphate) Junction Protein, Beta-6
Gly	: Glisin
gDNA	: Genomic DNA
gnomAD	: Genome Aggregation Database
H	: Hasta
HED	: Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia
HED-ID	: HED Immunodeficiency
HGVS	: Human Genom Variation Society

His	: Histidin
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
HW	: Hardy-Weinberg
IKB	: Inhibitor Kappa B
IKK	: NF- κ B kinaz inhibitörü
IKK1	: Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit Alpha
IKK2	: Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit Beta
MD	: Moleküler Dinamik
M	: Molar
Met	: Metiyonin
Mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mM	: Milimol
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
N	: Normal
NEMO	: NF-Kappa-B Essential Modulator
NF- κ B	: Nukleer Factor Kappa-B
Nmol	: Nanomol
NSTA	: Non-Syndromic Tooth Agenesis
OL-HED-ID	: Osteopetrosis, Lymphoedema, HED and Immunodeficiency
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PK	: Proteinaz K
Pmol	: Pikomol
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RSPO4	: R-Spondin-4
sn	: Saniye
T	: Taşıyıcı
TAB2	: TGF β ile Aktifleştirilen Kinaz 1 Bağlanma Proteini
TAK1	: TGF β ile Aktifleştirilen Kinaz 1
TBE	: Tris- Boric Acid -EDTA
TGF β	: Transforming Growth Factor Beta

Thr	: Treonin
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNFR	: Tumour Necrosis Factor Receptor
TP63	: Tumor Protein p63
TRAF	: TNF Receptor Associated Factor 1
TRAF6	: TNF Receptor Associated Factor 6
UTR	: Untranslated Region
UV	: Ultraviyole
WNT10A	: Wnt (Wingless and Int-1) Family Member 10A
XIST	: X-Inactive Specific Transcript
XL	: X-Linked
XL- HED	: X Linked- Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia

1. GİRİŞ

İlk defa 1968 yılında Frias ve Smith tarafından inceleme için yeni bir metot arayışı ile adı duyulan Ectodermal dysplasia (ED) sendromu ektoderm kaynaklı gelişen organlarda anormallikler ile seyreden kompleks genetiksel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Frias ve Smith, 1968: 606). Bu tarihten itibaren 500'ün üzerinde bilimsel çalışmaya konu olan ED'nin çok çeşitli klinik belirtilerle seyrettiği belirtilmiştir. Ektodermal displazi, hipohidrotik, anhidrotik ve hidrotik olmak üzere üç şekilde görülür. ED'nin en yaygın görülen tipleri hipohidrotik ve hidrotik displazidir. Anhidrotik ektodermal displazi, ter ve yağ bezlerinin yokluğu ile karakterizedir ve diğerlerine göre daha seyrek görülür (Başkan Ülkü ve Yavuz, 2011: 59).

ED hastalarında deri ile birlikte ektoderm tabakasından oluşan saçlar, tırnaklar, dişler ve ter bezlerinin gelişim bozukluğu görülmektedir (Shoenfeld vd., 1975: 279; Spfaer, 1981. 459; Rodewald ve Zahn-Messow, 1982. 455; Potter ve Bowie, 1984: 232; Keng, 1984: 553; Norval vd, 1988: 162). Etkilenen kişilerde saçlar zayıf ve seyrek, dişler ise anormal ve eksik (oligodontia) olabilmektedir (Vierucci vd., 1994: 295; Tape ve Tye, 1995: 526; Nijs ve Huisman, 2001: 256; Zhang ve Feng, 2003: 266; Feng vd., 2007: 15; Lexner vd., 2007: 14; Başkan Ülkü ve Yavuz, 2011: 59; Callea vd., 2013: 1801). Başkan Ülkü ve Yavuz (2011) yayınladıkları makalelerinde ED'li hastaların %90'ında saçlar, kaşlar ve kirpiklerin ince ve seyrek olduğunu, %42 oranında hastada, ter ve yağ bezlerinin kısmen veya tamamen olmaması nedeniyle cildin yumuşak, kuru, düz ve ince olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ED hastalarının tırnaklarında kalınlaşma, renk değişikliği, koyu pigmentasyon ve şekil bozukluğu gibi defektlerin görülebileceğini saptamışlardır.

Yukarıda bahsedilen deri ve türevlerindeki gelişim bazı kişilerde farklılık gösterebilir (Freire-Maia vd., 1975: 308). Hipohidrotik tip ED hastalarında az da olsa terleme durumu söz konusu iken anhidrotik tipte ise ter bezlerinin gelişmemesi sonucunda terleme oluşmamaktadır (Viljoen ve Winship, 1988: 29; Norval vd, 1988: 162). Terleme olmaması durumunda ise çocukların vücut sıcaklığının kontrolünde sorunlar oluşmakta, tehlikeli derecede yüksek ateş sorunu olabilmektedir (Dittmer vd., 1992: 239; Nijs ve Huisman, 2001: 256; Segurado Rodríguez vd., 2002: 255).

ED'nin X kromozomuna bağlı resesif ile otozomal resesif ve otozomal dominant geçişli olmak üzere üç tipi vardır (Mikkola, 2009: 2035; Başkan Ülkü ve Yavuz, 2011: 59). Hemizigotluktan dolayı erkeklerde daha sık görülen ve ED vakalarının yaklaşık %95'inden sorumlu olan X'e bağlı resesif geçişte hastalar hipohidrotiktir, ter ve yağ bezleri

hipoplaziktir (Mikkola, 2009: 2035; Başkan Ülkü ve Yavuz, 2011: 59; Liu vd., 2012: 246; Wawrzynek vd., 2013: 1122; Kowalczyk-Quintas vd., 2014: 4280). Daha az oranda görülen otozomal resesif tipte ise hastalar anhidrotiktir ve ter bezleri yoktur (Mikkola, 2009: 2035; Başkan Ülkü ve Yavuz, 2011: 59; Naqvi vd., 2011: 157; Bashyam vd., 2012: 825). Ter bezlerinin normal olmasına neden olan hidrotik tipi ise otozomal dominant geçiş göstermektedir.

Mikkola (2009) derleme çalışmasında EDA (Ectodysplasin-A), EDAR (Ectodysplasin-A Receptor) ve EDARADD (EDAR-Associated Death Domain) genlerinin ve sitoplazmada sinyali ileten DNA (Deoksiribonükleik asit)'nın diğer ilgili genlerinin [TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6), TAB2 (Transforming Growth Factor-Beta ile aktive edilen kinaz 1 bağlama proteini, TAK1 (Transforming Growth Factor-Beta ile aktive edilen kinaz 1)] transkripsiyonunu düzenleyen NF-κB (Nükleer Faktör kappa B) ile birlikte ED oluşumuna neden olduklarını bildirmiştir. NF-κB sinyal proteini deri gelişimi için temel proteindir. X'e bağlı resesif bir gen olan ve EDA proteinini sentezleyen EDA geni ligand görevi görerek sinyal iletiminden sorumludur. Plazma zarında yerleşen ve bir transmembran protein olan reseptör ise EDAR proteindir. EDAR geni otozomal resesiftir ve liganddan gelen sinyali alarak plazma zarının sitoplazma tarafında yerleşmiş olan ve otozomal dominant gen tarafından sentezlenen EDARADD proteinine iletir. Aslında EDARADD, EDAR geninin TNFR (Tumour Necrosis Factor Receptor) ile ilişkili genler olan TRAF (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor)'ların aşağı yöndeki stimülatörleridir. EDARADD ile sitoplazmaya aktarılan sinyaller sinyal ileticiler olan TRAF6, TAB2 ve TAK1 tarafından işlenerek bir transkripsiyon faktörü olan ve çekirdekte bulunan NF-κB proteinine iletilir. NF-κB hedef gen ekspresyonunu düzenler.

EDA, EDAR ve EDARADD genlerinde oluşacak herhangi bir mutasyon hipohidrotik, anhidrotik veya hidrotik tip ile birlikte daha önce bahsedilen ve deri ile ilişkili diğer yapılarıdaki anormalliklerle birlikte ED oluşumuna neden olmaktadır.

Dünyanın birçok ülkesinde ED vakaları mevcuttur. Türkiye'de de birçok ED hastasının mevcut olduğu ve bunların dentolojik olarak tedavi şekilleri ile ilgili çalışmalar yapıldığı bilinmektedir (Başkan vd., 2006: 174; Yavuz vd., 2006: 403; Yavuz vd., 2008: 81; Bani vd., 2010: 216; Bulut vd., 2010: 150; Bildik vd., 2012: 230; Yıldırım vd., 2012: 28; Gün vd., 2012: 86; Aydınbelge vd., 2013: 444).

ED sendromunun genellikle Mendelien kalıtlı olduğu bilinmekle birlikte bazı çalışmalarda yeni bir mutasyon sonucu normal ebeveynlerden ED'li çocukların doğduğu bildirilmiştir (spontan mutasyon) (Yoshioka vd., 2013: 1170; Sun vd., 2013: 270; Yang vd., 2013: 501; Haghighi vd., 2013: 1353; Giampietro vd., 2013: 1432; Hernández-Martín vd., 2013: 787). Bununla birlikte birçok ülkede mutasyon tipleri saptanarak prenatal tanıları geliştirilmiş ve hastalığın önlenmesi ile ilgili olarak genetik danışmanlık çalışmaları başlatılmıştır (Shi vd., 2005: 1845; Li vd., 2006: 619; Chen vd., 2012: 3177; Liu vd., 2013: 408; Zhu vd., 2013: 400). Bazı çalışmalarda ise ED ilişkili hastalıkların prenatal tanısında allel spesifik oligonükleotit tanı yönteminin geliştirildiği bildirilmiştir (Barbaro vd., 2012: 40). Dolayısıyla prenatal tanı ile ilgili metotlar geliştirmek için popülasyonun mutasyon profilinin ortaya çıkarılması gereklidir (Chen vd., 2012: 3177).

X kromozomunda lokalizasyon (Xq13.1) gösteren EDA geni (OMIM 300451) (<http://omim.org>, 15.01.2016). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1016841220>, 12.01.2016) toplam 9 ekzondan ve 4141 nükleotitten oluşmuş, 391 aminoasitten ibaret ectodysplasin A proteinini sentezlemektedir (Bayes vd., 1998: 1661; Monreal vd., 1998: 390; Liu vd., 2012: 246) 1/100.000 (Yin vd., 2013: 105). Bayes vd. (1998) EDA geninin 8 izoformunun bulunduğunu bildirmişlerdir.

İkinci kromozomda lokalize olan EDAR geni ise (2q12.3) (OMIM 604095) 12 ekzondan oluşmuştur (Monreal vd., 1999: 366). Ekzonlar toplam 1779 nükleotitten oluşmakta ve 448 aminoasitten oluşmuş ectodysplasin A-reseptör proteinini sentezlemektedir.

EDARADD (OMIM 606603) (NM_080738) geni 1. kromozomda lokalizedir (1q42-q43). En az 7 ekzon içerdiği bildirilse de (Bal vd., 2007: 705) incelemeler sonucunda 6 ekzondan oluştuğu saptanmıştır. 6 ekzon ve 3097 nükleotit uzunluğunda olan EDARADD geni farklı formlarda olsa da 206 aminoasit uzunluğunda protein molekülü sentezlemektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1036031426>, 26.11.2020).

EDA geni ile ilişkili 100 civarında mutasyon bildirilmişken EDAR geni ile ilgili 20 ve EDARADD geni ile ilişkili 2 mutasyon bildirilmiştir (Mikkola, 2009: 2035; Yin vd., 2013: 105). Yanlış anlamlı (missense), anlamsız (nonsense) ve çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları en çok saptanan mutasyonlar arasında değerlendirilmekle beraber, daha az olarak delesyonlara hatta splay noktalarında oluşan ve hatalı splay oluşumuna neden olan mutasyonlara da rastlanmıştır (Ersoy-Evans vd., 2006: 157; Rifai vd., 2010: 113; Zhu vd., 2013: 400; Mousumi vd., 2013: 761; Wang vd., 2014: 158; Sun

vd., 2013: 270; Nikopensius vd., 2013: 510; Farooq vd., 2013: 578; Yin vd., 2013: 105; Schindler vd., 2013: 1606; Hayashi vd., 2013: 281). Bazı ED vakalarında kısmi somatik mosaizm bildirilmiş (Nishikomori vd., 2004: 4565; Kawai vd., 2012: 5458), bazı vakalarda ise kromozomlar arası translokasyon sonucunda ED vakalarının görüldüğü rapor edilmiştir (Zankl vd., 2001: 296; Asamoah vd., 2003: 82).

Türkiye’de ED sendromu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Fakat yapılan çalışmaların hemen hemen tamamına yakını vaka sunumu veya dentolojik tedavi ile ilgili konulardan oluşmaktadır.

Görüldüğü gibi ED çok kompleks ve farklı fenotipik belirtiler veren kalıtsal bir hastalıktır. Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki gelişmeler bu hastalığa sebep olan gen mutasyonlarının saptanmasına olanak vermiştir. Buna rağmen günümüzde de ED sendromu gösteren çocuklar hâlâ doğmaktadır. Bunun nedeni popülasyona özgü mutasyonların saptanamaması ve dolayısıyla prenatal tanı tekniklerinin geliştirilememesinden kaynaklanmaktadır. Halbuki yukarıda da belirtildiği gibi birçok ülkede spesifik mutasyonların prenatal tanısında önemli ilerlemeler sağlandığı görülmektedir. Ülkemizde spesifik mutasyonların saptanması üzerine ilk çalışma Rencüzoğulları ve Güven Ezer (2023) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar ED hastası bir birey ile onun 7 kişilik ailesinde gerçekleştirdikleri sekans çalışmalarında hastalığa sebep olan mutasyonu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca oluşan yeni mutasyon noktasının MnII restriksiyon endonükleaz için yeni bir kesim noktası oluşturması dolayısıyla RFLP yöntemi ile de genetik analizler yapmışlardır. Yapılan genetik analizlerde EDARADD (gen sinonim: ECTD11A; ECTD11B; ED3; EDA3) geni 6.ekzonda c.439G>A bölgesinde nükleotit değişimi saptanmış ve hastanın bu gen lokusu için homozigot olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonun sentezlenen proteinde yanlış anlamlı mutasyona sebep olduğu (p.Gly147Arg) ve bu değişimin “in silico” analiz sonuçlarına göre hastalık fenotipiyle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır (Rencüzoğulları ve Güven Ezer, 2023: 175).

Dolayısıyla bu çalışmanın amacı bir önceki çalışmada saptanan mutasyonun kan bağı ile akrabalığı olan tüm aile bireylerinde saptanması ve taşıyıcıların belirlenmesidir. Ayrıca saptanan nokta mutasyonun sekanslama işlemlerine gereksinim duymayacak şekilde teşhisini hızlı ve ucuz yollarla saptamak amacıyla PCR (Polymerase Chain Reaction) tabanlı metotlar geliştirmektir. Elde edilecek verilerin Tıbbi Genetikçilerin prenatal tanı yöntemlerini geliştirmelerine ve genetik danışmanlık vermelerine yardımcı olacağı

düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmanın sonucunda doğumsal ED vakalarının sayısının azaltılması veya tam olarak yok edilmesi hedeflenmektedir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ectodermal dysplasia (ED) adı ilk defa Frias ve Smith (1968) tarafından duyurulmuştur. Araştırmacılar inceleme için yeni bir metot araştırırken tesadüfen ektoderm kaynaklı gelişen organlarda anormallikler ile seyreden kompleks genetiksel bir hastalık olarak ED sendromunu tanımlamışlardır. Bu tarihten itibaren 500'ün üzerinde bilimsel çalışmaya konu olan ED'nin çok çeşitli klinik belirtilerle seyrettiği belirtilmiştir. Ektodermal displazi, hipohidrotik, anhidrotik ve hidrotik olmak üzere üç şekilde görülür.

Mikkola (2009) EDA, EDAR ve EDARADD genlerinin ve sitoplazmada sinyali ileten (TRAF6, TAB2, TAK1) DNA'nın diğer ilgili genlerinin transkripsiyonunu düzenleyen NF- κ B ile birlikte ED oluşumuna neden olduklarını bildirmiştir.

Fazelzadeh Haghighi vd. (2023) EDARADD geninde c161-162 nükleotitinde A>T substitüsyon tip mutasyonu saptayarak (c161-162 A>T) proband ve ailesinde hiperkeratotik plaklar, yavaş büyüyen saçlar, tekrarlayan enfeksiyon ve "Pektus ekskavatum" (Göğüs kafesinin içeriye doğru çöküntü oluşturması) gibi olağan dışı semptomların varlığını göstermişlerdir. Ayrıca probandın annesinde hipohidrozis, yaygın diş çürüğü, kırılğan tırnaklar ve seyrek saçların mevcut olduğu görülmüştür.

Gao vd. (2023) yaptıkları derleme çalışmalarında EDA/EDAR/NF- κ B sinyal yolunun patojenik etkilerine ve gelişimsel diş defektlerinde EDA, EDAR ve EDARADD mutasyonlarının rolüne odaklanarak NSTA (Non-Syndromic Tooth Agenesis, Sendromik Olmayan Diş Agenezisi)'nın genetik temeli hakkındaki mevcut bilgilere genel bir bakış sunmuşlardır. Araştırmacılar NSTA ve ilgili ektodermal bozuklukların teşhis ve tedavisinde genetik analizin önemini ve bu koşullara ilişkin anlayışımızı geliştirmek için devam eden araştırmalara duyulan ihtiyacı vurgulamışlardır.

Rencüzoğulları ve Güven Ezer (2023) bir Türk ailede EDARADD (NM_080738) geninde c.439G>A'da (p.Gly147Arg) homozigot nükleotit substitüsyonunun ED sendromuna neden olduğu yeni bir mutasyon saptamışlardır. Fenotipik olarak probandın dişlerinin keskin ve eksik (oligodonti) olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte probandda normal tırnaklar, kuru cilt, seyrek saçlar, dışa dönük alt dudak vermilyonu, hiperpigmente göz kapakları ve göz çevresi ile anormal burun köprüsü morfolojisi gözlenmiştir. Ayrıca, bu genetik bozukluğun, MnII restriksiyon endonükleazı ile kesimi sonrasında restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP) yöntemi kullanılarak kolaylıkla teşhis edilebileceği gösterilmiştir.

Maier-Wohlfart vd. (2022) diş malformasyonları, tırnak defektleri ve ektodermal displazi şüphesine yol açan birden fazla diş eksikliği olan 204 çocukta yaptıkları genetiksel analizlerde ilginç sonuçlara ulaşmışlardır. Patojenik WNT10A (Wingless and Int-1 Family Member 10A) veya GJB6 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Junction Protein, Beta-6) varyantları olan 18 kişiden 17'sinde distrofik veya başka şekilde anormal tırnakların belirgin olduğunu, ancak X'e bağlı hipohidrotik ektodermal displazinin altında yatan EDA varyantları olan 161 çocuğun hiçbirinde bu anormalliğin olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, ektodisplazin A sinyal yolunda yer alan diğer iki gen olan EDAR veya EDARADD genlerinde mutasyon taşıyan 17 çocukta ikisinde kırılğan veya hipoplastik tırnaklar gibi tırnak anormallikleri görülmüştür. TP63 (Tumor Protein p63) varyantları düzenli olarak tırnak bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir. Bir kız çocuğuna, RSPO4 (R-spondin-4) geninin bileşik heterozigot varyantının neden olduğu “Anonychia congenita” (Doğuştan ya da sonradan oluşan tırnak yokluğu) teşhisi konulmuştur. Bu nedenle tırnak displazisinin, ektodermal displazili hastalarda sanıldığından daha nadir olduğu sonucuna varılmıştır.

Asano vd. (2021), EDARADD geninde dominant olarak kalıtılan üç yanlış anlamlı mutasyonu (p.D120Y, p.L122R ve p.D123N) ve resesif olarak kalıtılan bir yanlış anlamlı mutasyonu (p.E152K) tanımlamak için bir dizi genetik analizler yapmışlardır. Sonuçta EDARADD genindeki tüm mutasyonların nükleer faktör-kappa B (NF-κB) geninin aktivitesinde azalmaya neden olduklarını saptamışlardır. Araştırmacılar immünopresipitasyon analizleri sonucunda p.D120Y-, p.L122R- ve p.D123N-mutasyonlarının EDARADD ile EDAR arasındaki etkileşimi belirgin şekilde önlediğini ortaya çıkarmışlardır. Çalışmada son olarak p.D120Y-, p.L122R- ve p.D123N-mutant EDARADD'nin TRAF6 ile bağlanma yeteneğini tamamen kaybetmiş olduğunu, p.E152K-mutant EDARADD'nin ise afinitede hafif bir azalma gösterdiğini bulmuşlardır.

Sadia vd. (2019) ekzom analizi ile Hindistan'da iki hastada kalıtsal ED sendromuna sebep olan mutasyonları saptamışlardır. Araştırmacılar EDAR geni 12. ekzonunda homozigot yanlış anlamlı mutasyonu (NM_022336 c.1300 T>C; p.W434) sonucunda fenotipik anormalliklerin ortaya çıktığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarda iki farklı aile üyelerinin EDAR geninin taranması sonucunda aile içindeki kalıtım şekilleri saptanmıştır. Bu sonuçlar EDAR ile ilişkili bozuklukları olan ailelere yeni yaklaşımlara, doğum öncesi tanıya ve genetik danışmanlık yapılmasına katkı sağlayabileceği düşüncesinin oluşmasına yol açmıştır.

Okita vd. (2019) EDAR genindeki mutasyonların EDARADD afinitesinin etkileme derecesini izlemek amacıyla EDAR gen mutasyonlarını analiz etmişlerdir. EDAR geni p.F398 mutasyonu sonucunda EDAR geninin EDARADD afinitesini tamamen kaybettiğini ve mutant olmayan tip EDAR tarafından indüklenen nükleer faktör-κB aktivasyonunu negatif bir şekilde baskıladığını göstermişlerdir.

Parveen vd. (2019), hipodonti, oligodonti, genelleştirilmiş odontodisplazi (diş dokusunun mezoderm ve ektodermini birlikte etkileyen gelişimsel bir anomalidir, süt ve kalıcı dişlenmeyi aynı anda etkileyebilir) ve diş çarpıklığı dahil olmak üzere farklı sendromik ve sendromik olmayan diş anomalilerine sahip Pakistan, Mısır, Suudi Arabistan ve Suriye dahil dünyanın farklı coğrafi bölgelerinden toplam 57 hastayı (17 aile, A-Q) dahil ettikleri çalışmalarında fenotipik anormalliklerinin nedenleri hakkında önemli bilgiler elde etmişlerdir. A ailesinden üç oligodontia hastasında WNT10A geninde yeni bir yanlış anlama varyantı (c.311G>A; p.Arg104His), sırasıyla B ailesinden üç hastada ve C ailesinden dört hastada EDAR geninde iki yeni dizi varyantı (c.207delinsTT, p.Gly70Trpfs*25 ve c.1300T>G; p.Try434Gly) belirlemişlerdir. WNT10A ve EDAR genlerinde yanlış anlamalı varyantların proteinlerin stabilitesi üzerindeki yapısal ve fonksiyonel sonuçlarını daha iyi anlamak için kapsamlı moleküler dinamik (MD) simülasyonlar gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca daha önce bildirilen EDA genindeki üç patojenik varyantı (c.1076T>C, p.Met359Thr; (c.1133C>T, p.Thr378Met; ve c.594_595insC; Gly201Argfs*39) sırasıyla D ailesinde dört hastada, E ailesinde iki hastada ve F ailesinde ise bir hastada tanımlamışlardır. Araştırmacıların bu veriler ile altı otozomal resesif ve X bağlantılı soy ağacındaki (A-F) 18 sendromik ve non-sendromik diş agenezisi hastasının genetik nedenlerini açıklamışlardır.

Cluzeau vd. (2019) akraba evliliği yapmış büyük bir Tunuslu aileyi EDARADD gen mutasyonları için taramışlardır. Araştırmacılar yaptıkları detaylı analizlerde hastalığa neden olan EDARADD geninde büyük bir delesyonun varlığını (c.131-?189+? del) göstermişlerdir.

Güven vd. (2019) ED tanısı alan Türk bireylerden oluşan bir popülasyonda hastalığa neden olan moleküler değişimleri saptamak amacıyla WNT10A, EDA, EDAR ve EDARADD genlerini analiz etmişlerdir. 27 ailenin 17'sinde (%63) iyi bilinen 4 ektodermal displazi geninde 8'i yeni olmak üzere 17 patojenik varyant tespit etmişlerdir. EDAR ve EDA varyantlarının her biri 6 ailede, WNT10A varyantları 4 ailede ve EDARADD varyantı ise 1 ailede tanımlanmıştır.

Martínez-Romero vd. (2019), İspanyol popülasyonunda sendromik olmayan diş agenezine (NSTA) sebep olan ve birbirleriyle ilişkili 4 genin (EDA, EDAR, EDARADD ve WNT10A) mutasyonlarını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmalarda toplam 72 kişi ile çalışmışlardır. En fazla mutasyonun EDA geninde olduğu, daha az olarak WNT10A ve EDAR genlerinde mutasyona rastladıkları ve en az olarak da EDARADD geninde mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir.

Escoufflaire vd. (2019) insan dışı diğer memelilerde de ED sendromuna neden olan gen mutasyonlarının insanlarla aynı fenotipik anormalliklere sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Fransa’da bir dişi buzağında “Homojen hipotrikoz” (Genetik özellik gösteren bir kıllanma tipi) ve oligodonti görülmüştür. Işık mikroskobu altında, etkilenen hayvanda saç foliküllerinin daha ince olduğu ve ön derinin dermisinde kontrole göre daha yüksekte yer aldığı görülmüştür. Ayrıca, etkilenen hayvanda kıl foliküllerinin sayısında beş kat artış ve pilary kanallarının çapında dört kat azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar tüm genom dizileme verilerini analiz ederek, EDA ve XIST (X-İnactive Specific Transcript) genlerinin ilk intronlarında bulunan kırılma noktalarına sahip büyük bir kromozomal inversiyon belirlemişlerdir. Vakanın ve ebeveynlerinin PCR-elektroforezi ile genotiplendirilmesi, bu inversiyonun “de novo” kökenli olduğunu göstermelerini sağlamıştır. Son olarak, çeşitli bilgi kaynaklarını kullanarak, bu mutasyonun X’in rastgele olmayan bir şekilde inaktive edilmesinden (Non-randomly X-inactivation) sorumlu olduğu ve yalnızca normal X’in inaktive edilebileceği hipotezini destekleyen bir kanıt bütünü sunmuşlardır.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

Çalışmanın tamamlanması için birçok kimyasal madde ve deney ekipmanı kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve laboratuvar cihazları aşağıda açıklanmıştır.

3.1.1. Kimyasal maddeler

3.1.1.1. Taq DNA polimeraz (ThermoFisher Scientific EP0406)

DNA amplifikasyonu için kullanılan enzimdir. Tamponları ile birlikte satın alınmıştır.

3.1.1.2. DNA izolasyon kiti (ThermoFisher Scientific GeneJet, K0721)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)'lı periferik kandan DNA izolasyonu için kullanılmıştır. İçerisinde hücre parçalama (lisis) tamponu, proteini parçalama (proteinaz K) enzimi, yıkama ve saflaştırma tamponları ile elüsyon tamponlarının içermektedir.

3.1.1.3. dNTP Mix (ThermoFisher Scientific R72501)

Thermal Cycler'da DNA amplifikasyonu sırasında kullanılan ve 4 çeşit nükleotit içeren karışımdır.

3.1.1.4. Primer 200 nmol HPLC pure

DNA amplifikasyonunda amplifikasyon başlangıcını ve sonunu belirleyen nükleotit dizileridir. Forward (F) ve Reverse (R) olacak şekilde amaca uygun farklı baz uzunluklarında üretilmiştir.

3.1.1.5. MnII restriksiyon endonükleaz (ThermoFisher Scientific ER1071)

Amplifiye olan DNA'nın spesifik bölgelerden kesilmesinde kullanılmıştır. MnII restriksiyon endonükleaz enzimi 5'-GAGG-3' baz dizilerinden tanıyarak DNA'yı 5'-ucundan 6 baz ve 3'-ucundan 7 baz ileriden kesmektedir (5'-(N)₆GAGG-3'/3'-(N)₇CTCC-5'). Eğer gen normal baz dizilerini içeriyorsa (5'-GGGG-3') kesim gerçekleşmemektedir (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>, 02.12.2016).

3.1.1.6. Agaroz (Sigma A9539)

1X TBE'nin içine toz agaroz eklenerek agaroz jel hazırlanmış ve DNA amplikonları bu jele yüklenip jel elektroforez cihazında yürütülmüştür.

3.1.1.7. Ethidium bromide (Sigma E8751)

Agaroz jellerde DNA molekülünün iplikleri arasına girerek UV ışık altında bantlar halinde kolay bir şekilde görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.1.8. 10X Tris-boric acid-EDTA (10X TBE) tamponu

10X TBE solüsyonu, Tris-Base (Merck 648311), Boric Acid Merck B7660) ve EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Merck E9884) ile stok tamponu olarak hazırlanmıştır. 10X TBE saf su ile seyreltilerek 1X TBE hazırlanmıştır Daha sonra agaroz jel hazırlanırken ve elektroforez tank solüsyonunda kullanılmıştır.

3.1.1.9. DNA loading boyası (6X, ThermoFisher Scientific R0611)

DNA'yı elektroforez tamponundan daha yoğun hale getirerek DNA'nın jele yüklenmesini ve jelin kuyucuklarında aşağıya batmasını sağlayan boyadır. Ayrıca elektroforez sırasında DNA'ya benzer bir oranda göç ederek ve DNA'nın jelde yürümesini görünür kılarak DNA hareketinin takip edilmesini sağlar.

3.1.1.10. DNA ladder (marker) (ThermoFisher Scientific 156280019)

100 bp boyutlu marker DNA merdiveni olarak kullanılmıştır.

3.1.1.11. MgCl₂ (magnezyum klorür) (ThermoFisher Scientific R0971)

Primerlerin bağlanması ve Taq DNA polimerazın çalışması için uygun pH ve iyon koşullarını sağlamak üzere PCR karışımına MgCl₂ eklenmiştir.

3.1.1.12. Saf su (dH₂O, distile su)

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan distile su Millipore RİOS 8 marka saf su cihazı tarafından üretilmiştir.

3.1.1.13. ddH₂O (double distilled water)

Eczaneden temin edilen enjeksiyonluk sudur. Amplifikasyon işlemi sırasında PCR karışımında kullanılmıştır.

3.1.1.14. Etil alkol (ethanol absolute) (Merck 100983)

DNA izolasyonu sırasında su banyosundan çıkarılan tüplere 200 µl saf etil alkol eklenmiştir.

3.1.2. Kullanılan deney ekipmanları

3.1.2.1. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320R)

Devir sayısı ve süresi ayarlanabilen ve DNA izolasyonu amacıyla kullanılan araçtır. Çalışmamızda 24 eppendorf tüp kapasiteli, sabit başlık, soğutabilen ve zaman ayarlayıcı özelliklerine sahip santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.2. İnkübatör (Nüve EN120)

37°C±1 hassasiyetinde olan inkübatör restriksiyon endonükleaz MnlI'nin inkübasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.3. Steril (flow) kabin (ESCO Class II BSC)

Amplifikasyon için tüplerin hazırlanmasında steril bir ortam sağlanması amacıyla kullanılmıştır. Flow kabin UV ampülü bulunan ve % 99,99 partikül tutma özellikli filtreye sahiptir.

3.1.2.4. Hassas terazi (Ohaus Pioneer)

0,0001 g hassasiyetindeki terazi her türlü kimyasal maddenin tartım işlerinin yapılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.5. Thermal cycler (termal döngüleyici) (Applied Biosystems)

Thermal cycler cihazı spesifik DNA bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılmıştır.

3.1.2.6. Vortex (karıştırıcı) (Labart Multi-Mixer)

Vortex hazırlanan çözelti ve numunelerin homojenize edilmesinde kullanılmıştır.

3.1.2.7. Saf su cihazı (Millipore RIOS 8)

Saf su cihazı çözelti, tampon ve besiyeri hazırlamada kullanılacak olan suyun distile hale gelmesini sağlamaktadır.

3.1.2.8. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (VELP Scientifica)

Manyetik ısıtıcılı kimyasalların çözülmesi ve jel hazırlanması işlemlerinde kullanılmıştır.

3.1.2.9. Jel elektroforezi ve güç kaynağı (ThermoFisher Scientific EC 1000 XL)

Çoğaltılan DNA bölgelerinin boyutlarına göre yürütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.10. UV-görüntüleme kabini (fotoğraf makineli) (Quantum ST4)

Elektroforez ile yürütülen DNA bölgelerinin UV ışık altında incelenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.11. Mikrodalga fırın (Arçelik MD564)

Mikrodalga fırın agaroz jellerin hazırlanması için kullanılmıştır.

3.1.2.12. Mikropipetler (Gilson) ve mikropipet uçları (Axygen)

Farklı hacimlere sahip (0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-100 µl ve 100-1000 µl) olan mikropipetler agaroz jele yükleme yapılması, PCR yükleme örneklerinin hazırlanıp PCR tüplerine yüklenmesi ve DNA izolasyonu gibi çalışma esnasındaki her türlü sıvı örneklerin ölçülmesinde kullanılmıştır. Çeşitli büyüklükteki pipet uçları da mikropipetlerin baş kısmına takılarak sıvı madde alımı sağlanmıştır.

3.1.2.13. Otoklav (WiseClave)

Pipet uçlarının ve eppendorf tüplerinin steril edilmesinde kullanılmıştır.

3.1.2.14. Sıcak su banyosu (Wisebath)

Kan örneklerinden DNA izolasyonu çalışmalarında ısıtma işlemi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.15. Vakumlu tüp

Hasta birey ile kan bağı akrabalığı olan aile bireylerinden toplanan yaklaşık 1 ml periferik kan 0.5 molar (M) etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (5,4 mg) içeren vakumlu tüplerde toplanmıştır.

3.1.2.16. Eppendorf tüpleri

DNA izolasyonu esnasında 1,5 ml'lik Eppendorf tüpleri içerisinde karışım hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.2.17. Erlenmeyer

Agaroz jel ve TBE tamponu hazırlanırken erlenmeyer kullanılmıştır.

3.1.2.18. Mezür (dereceli silindir)

Ölçü silindiri ya da dereceli silindir olarak da adlandırılan mezür, sıvıların hacimlerini ölçmekte kullanılan yaygın bir laboratuvar ekipmanıdır. Çalışmalarımızda 10X TBE tamponunun distile su ile 1X TBE tamponuna seyreltilmesi esnasında ölçü almak için mezür kullanılmıştır.

3.1.2.19. Kroze maşası

Kromaj kaplı çelikten üretilen kroze maşaları, krozelerin kolay kavranmasına ve taşınmasına olanak sağlarlar. Çalışmalarımızda agaroz jel hazırlanırken mikrodalga fırınından çıkarılan kaynar sıcaklıktaki erlenmeyerin tutulması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.20. Spatül

Toz veya macun kıvamındaki maddeleri taşımak ve ölçümlemek amacı ile kullanılır. Toz agaroz, TBE hazırlanmasında kullanılan kimyasalların ve çalışmalarımızda kullanılan diğer tüm toz kimyasalların hassas terazide tartımı sırasında kullanılmıştır.

3.1.2.21. Parafilm

Arkası kâğıt kaplı plastik film şeklindeki üründür. Genellikle flask veya beher gibi malzemelerin sızdırmaya karşı veya koruma amaçlı örtünmesinde kullanılır. Bazı

durumlarda DNA örneklerinin jele yüklenmeleri sırasında loading dye boyası ile karıştırılması için de kullanılır. Çalışmamızda parafilm bu iki amaç için kullanılmıştır.

3.1.2.22. Eppendorf tüp standı

Eppendorf tüplerinin dizilmesi ve karışımlar hazırlanırken tüplerin dik bir şekilde sabit durması için kullanılmıştır.

3.1.2.23. Asetat kalemi

Kullanılan kan toplama tüplerinin, eppendorf tüplerinin ve diğer bütün kapların işaretlenmesinde ve etiketlerinin yazılmasında kullanılan cam yazar kalemidir.

3.2. Etik İzin

Bu çalışma Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik izinleri Fırat Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Etik Kurulundan alınmıştır (Tarih ve karar no: 27.06.2019/11-14).

3.3. Materyal

Bu çalışmada hasta birey ile kan bağı akrabılığı olan aile bireylerinden toplanan periferik kan kullanılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilmesi düşünülen aile bireyleriyle yapılan ön görüşmelerde 61 kişinin bu çalışmaya gönüllü olarak destek verebileceği saptanmıştır. Onam formu imzalandıktan sonra aile bireylerinden kan alınmıştır. Yaklaşık 1 ml kan, 0.5 molar (M) etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (5,4 mg) içeren vakumlu tüplerde toplanmıştır. Kan bağı akrabılığı olmayan diğer aile bireyleri (gelin veya damat olarak aileye giren bireyler) bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Toplanan kanlar DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

Bu çalışmada 61 gönüllü dahil edilebileceği düşünülerek etki büyüklüğü ile güç ve anlamlılık düzeyi belirlenmiştir. Gönüllük sayısı QUANTO 1.1 programı (<http://hydra.usc.edu/gxe>, 02.12.2016/) kullanılarak hesaplanmıştır. Programa genetik kalıtım modeli olarak resesif genetik model girilmiştir. İstatistiksel güç %90 ve anlamlılık düzeyi 0,05 olarak saptanmıştır.

3.4. Metot

3.4.1. Periferal kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için ThermoFisher Scientific GeneJet marka DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Su banyosu 56 °C'ye ayarlanıp ısınmaya bırakılmıştır. Santrifüj 6000 devirde 1 dk.'ya ayarlanmıştır. Buzdolabından çıkarılan kan tüpleri erimeye bırakılmıştır. 1,5 µl'lik eppendorf tüplerine 400 µl lizis, 200 µl kan ve 20 µl proteinaz K (PK) eklenip tüpler vortekslenmiştir. Vortekslenen tüpler 56 °C'lik su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüplere 200 µl etil alkol eklenip tüpler vortekslenmiştir. Mikropipet 1000 µl'ye ayarlanıp tüplerin içeriği filtreli eppendorf'lara (genejet tüpleri) aktarılmıştır. 6000 devirde 1 dk. santrifüjlendikten sonra genejet tüplerinin altı atılmış ve üst tarafları kapakları açılmadan yeni tüplere yerleştirilmiştir. Yeni tüplere 500 µl buffer 1 eklenmiş, 8000 devirde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl buffer 2 eklenmiş 12000 devirde 3 dk. santrifüj edilmiştir. Tüpler bir kerelik olmak üzere santrifüjde 12000 devirde çevrilmiş ve 12000 devire ulaşır ulaşmaz santrifüj durdurulmuştur. Alttaki tüp atılmış, filtre 1,5 µl'lik yeni steril tüplere eklenmiştir. Üzerlerine 150 µl'lik elution buffer eklenmiş ve 2 dk. oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Daha sonra bu tüpler 8000 devirde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüpün üstü atılmış, DNA içeren tüplerin alt kısmı bırakılmıştır. Her tüp ayrı ayrı pipetaj yapılarak izole edilmiş olan DNA'lar küçük steril tüplere aktarılmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.2. DNA nükleotit dizisi amplifikasyonu (PCR, polimeraz zincir reaksiyonu)

Mutasyonun saptanması için mutasyon noktasının olduğu bölgeyi kapsayacak şekilde toplam 128 bç büyüklüğünde DNA nükleotit dizisi amplifiye edilmiştir. Bunun için her birisi 22 bç uzunluğunda iki primer dizayn edilmiştir (Rencüzoğulları ve Güven Ezer, 2023: 175) (Forward 5'-tgacttgctcaatgatcaggac-3' ve Reverse 5'-ggaagcacaattcgcatagga-3'). Primerler "Primer3 Output" veri tabanında kontrol edilmiştir (http://bioinfo.ut.ee/cgi-bin/primer3-0.4.0/primer3_results.cgi, 05.09.2019). PCR toplam 25 µl içeren tüplerle gerçekleştirilmiştir. Her PCR tüpü **Çizelge 3.1**'de görülen kimyasallar içermektedir. DNA hariç diğer kimyasallar steril tüpte karıştırıldıktan sonra 20 µl olacak şekilde steril PCR tüplerine paylaştırılmıştır. Her PCR tüpüne 5 µl gDNA (genomic DNA) ilave edilmiş, vorteks ile karıştırılarak Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiştir. PCR şartları **Çizelge 3.2**'de görülmektedir.

Çizelge 3.1. PCR karışımı

PCR mix	Hacim (µl)
ddH ₂ O	10.5
10X Taq Buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	2.0
dNTP mix (25mM)	2.5
Primer (50 pmol) (F ve R)	0.5-0.5
Taq DNA Polimeraz (300 Ünite/µl)	1.5
DNA (125 ng/ml)	5
Toplam hacim	25

Çizelge 3.2. PCR sıcaklık ve süre döngüleri

İşlem sırası	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	5 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	45 sn	30
2.2	Primerlerin bağlanması	59	45 sn	
2.3	Uzama safhası	72	45 sn	
3.	Son uzama safhası	72	7 dk	1
4.	Soğutma	4	∞	

3.4.3. Elektroforez ve jelde yürütme

Amplifikasyon işleminin başarılı olup olmadığı PCR ürünlerinin elektroforezi sonucu kontrol edilmiştir. Önce 10X TBE (Tris-Base, Boric acid, EDTA) stok tamponu hazırlığı için hassas terazide 108 gr Tris-Base, 55 gr Boric acid ve 7,5 gr EDTA tek tek tartılmıştır. Bu kimyasallar sırasıyla ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda tutulan ve içinde distile su bulunan erlen içerisinde sırasıyla çözdürülmüştür. Kimyasalların tamamı çözdürüldükten sonra çözelti distile su ile 1 lt'ye tamamlanmış ve ağzı kapalı cam şişede saklanmıştır. Hazırlanan bu 10X TBE stok tamponundan mezür kullanılarak 10 ml alınıp üzeri 100 ml distile su ile tamamlanmış ve 1X TBE tamponu hazırlanmıştır.

Elektroforez için 1X TBE ile hazırlanan %1,5'luk agaroz jel kullanılmıştır. 1,5 g toz agaroz'un üstüne eklenen 100 ml 1X TBE tamponu ile oluşturulan karışım, bir erlenmeyerin içinde 2-3 dk boyunca mikrodalga fırınında ısıtılıp çözdürülmüştür. Mikrodalga fırından kroze maşası yardımıyla çıkarılan kaynar sıcaklıktaki jel, oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Jel 45 °C derecenin altına düşmeyecek şekilde soğutulmuştur ve donmaması sağlanmıştır. Jel kaba dökülmeden önce jelde kuyucuklar elde etmek amacıyla jel kabının baş kısmına uygun büyüklükteki jel tarağı yerleştirilmiştir. Daha sonra jel döküm kabına dökülen jelin katılaşması beklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra taraklar jelden kaldırılmıştır. Jel, içi 1X TBE tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına

yerleştirilmiştir. Agaroz jeldeki kuyucuklardan birine 100 bç uzunluğunda 5 µl DNA Ladder (marker), diğer kuyucukların da her birine 5 µl PCR ürünü alınıp bir parafilm bandı üzerine damlatılmış olan 3'er µl DNA Loading Dye (6X) ile karıştırılarak bir mikropipet yardımıyla yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankının ağzı kapatılmış ve güç kaynağına bağlanmıştır. Yüklendiği olan jel elektroforez cihazında 150 voltta 30 dk boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jel 20 sn boyunca Ethidium Bromide (5 µg/ml) çözeltisinde bekletilmiş ve temizlenmesi için ise saf suya alınarak 30 dk yıkanmıştır. Daha sonra agaroz jel UV (Ultraviyole)-jel görüntüleme kabinine alınmış ve DNA profillerinin fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.4. MnII ile genotiplendirme ve mutasyon analizi (RFLP, restriction fragment lenght polymorphism)

RFLP metodu PCR'a dayalı bir metottur. Restriksiyon enzimlerinin DNA'da spesifik kesme işlemleri sonucunda ortaya çıkan DNA fragmentlerinin uzunluk farklarının elektroforezde büyüklüklerine ayrılması esasına dayanır (Kolören vd., 2017). Oluşan mutasyonlar restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini yok edebileceği gibi yeni kesim yerleri de oluşturabilir. Oluşan bu DNA fragmentleri elektroforetik olarak saptanabilir. Bu çalışmada EDARADD geninin 6. ekzonda c.439G>A bölgesinde G bazının A bazına dönüşmesi sonucunda MnII restriksiyon enzimi için yeni bir kesim noktası oluşmaktadır. Normal gende 5'-GGGGG-3' olan baz dizisi mutasyon sonucunda 5'-GGAGG-3' olmaktadır. MnII enzimi DNA'yı 5'-GAGG-3'/3'-CTCC-5' baz dizilerinden tanımakta ve DNA'yı kesmektedir.

MnII ile genotiplendirme işlemleri üreticinin yöntemine göre yapılmıştır (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1071>, 29.10.2018). Bu amaçla 15 µl PCR ürünü alınarak 2 µl MnII (300 ünite), 2 µl 10X buffer ve 11 µl bidistile su ile karıştırılarak 30 µl'ye tamamlanmıştır (**Çizelge 3.3**). Hazırlanan karışım 37°C'de bir gece (16 saat) inkübe edilerek kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından inkübatörden çıkarılan ürünler 1X TBE ile hazırlanmış %4 agaroz jelde 2 saat elektroforeze tabi tutulmuştur. Etidyum Bromür muamelesinden sonra jel, UV-jel görüntüleme cihazında bant profilleri incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 3.3. *MnII* restriksiyon endonükleaz ile kesim karışımı

MnII Restriksiyon Endonükleazlı Mix	Hacim (µl)
PCR Ürünü	15
MnII R.E. Enzim	2.0
10X MnII Buffer	2.0
Bidistile Su (ddH ₂ O)	11
Toplam Hacim	30

3.4.5. Sekanslama ile mutasyon analizi

MnII ile genotiplendirmenin doğruluğunu teyit etmek amacıyla örneklerle sekanslama yapılmıştır. Sekanslama Sanger ddNTP (Di-deoxynucleotides Triphosphates) yöntemine göre hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Mutasyon noktasını amplifikasyon noktasının ortasında tutmak için RFLP metodunda kullanılan primerlerden farklı primerler dizayn edilmiştir (Forward 5'-tgacttgctcaatgatcaggac-3' ve Reverse 5'-aagagctctagaagtgcc-3'). Primerler “Primer3 Output” veri tabanında kontrol edilmiştir (http://bioinfo.ut.ee/cgi-bin/primer3-0.4.0/primer3_results.cgi, 05.09.2019). PCR karışımı, PCR sıcaklık ve süre döngüleri **Çizelge 1** ve **Çizelge 2**'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinden 5 µl alınarak 3 µl 6X DNA Loading Dye ile karıştırılmış ve 10X TBE ile hazırlanmış agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez 150 voltta 30 dk gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda agaroz jel 20 sn Etidyum Bromür (5 µg/ml) çözeltisinde bekletilmiş ve temizlenmesi için ise saf suya alınarak 30 dk yıkanmıştır. Daha sonra agaroz jel UV-jel görüntüleme cihazına alınmış ve DNA profillerinin fotoğrafı çekilmiştir. Amplifikasyonun doğruluğu gözlemlendikten sonra PCR ürünleri Nucleogene firmasına gönderilerek sekanslama işlemleri tamamlanmıştır. Sekans sonuçları görseller şeklinde verilmiştir (**Görsel 4.4, 4.5 ve 4.6**).

3.4.6. ARMS (amplification refractory mutation system) yöntemi ile mutasyon analizi

Çalışmamızda ARMS yöntemi de uygulanmıştır. ARMS, allele spesifik primerler kullanılan bir PCR yöntemidir. Nokta mutasyonlarının belirlenmesinde etkili ve güvenilir bir yöntemdir (Najmabadi vd., 2001). Primerlerden biri normal alleli belirlerken diğeri mutant alleli belirlemektedir. ARMS için PCR tüpleri **Çizelge 3.1**'e göre hazırlanmıştır. Her birey için iki PCR tüpü hazırlanmıştır. Tüplerden birisine normal alleli amplifiye edecek primer (mutant alleli amplifiye etmez), diğerine de mutant alleli amplifiye edecek primer (normal alleli amplifiye etmez) ilave edilmiştir. PCR sıcaklık ve süre döngüleri **Çizelge 3.2**'ye göre gerçekleştirilmiştir. Fark olarak sadece primerlerin bağlanma ısısı 57

ile 64°C arasında değiştirilerek çalışılmıştır. PCR ürünleri her birey için yan yana jelle yüklenmiş ve elektroforeze tabi tutulmuştur.

Çalışmamızda mutasyonu belirleyen ve aşağıda görülen hem F hem de R primerleri dizayn edilmiş ve çalışılmıştır.

F primerleri

Hem normal G alleli hem de mutant A allelini saptamak için dizayn edilen F primerleri:

F: 5'-GGAATTTTGCAAGCAAATGGG-3' (G alleli için)

F: 5'-GGAATTTTGCAAGCAAATGGA-3' (A alleli için)

R: 5'-AAGAGCTCTAGAAGTGCCT-3'

R primerleri

Hem normal G alleli hem de mutant A allelini saptamak için dizayn edilen R primerleri:

R: 5'-ACAATTCGTCATAGGACATCCC-3' (G alleli için)

R: 5'-ACAATTCGTCATAGGACATCCT-3' (A alleli için)

F: 5'-GCAGAGATCAGCAAGGACAA-3'

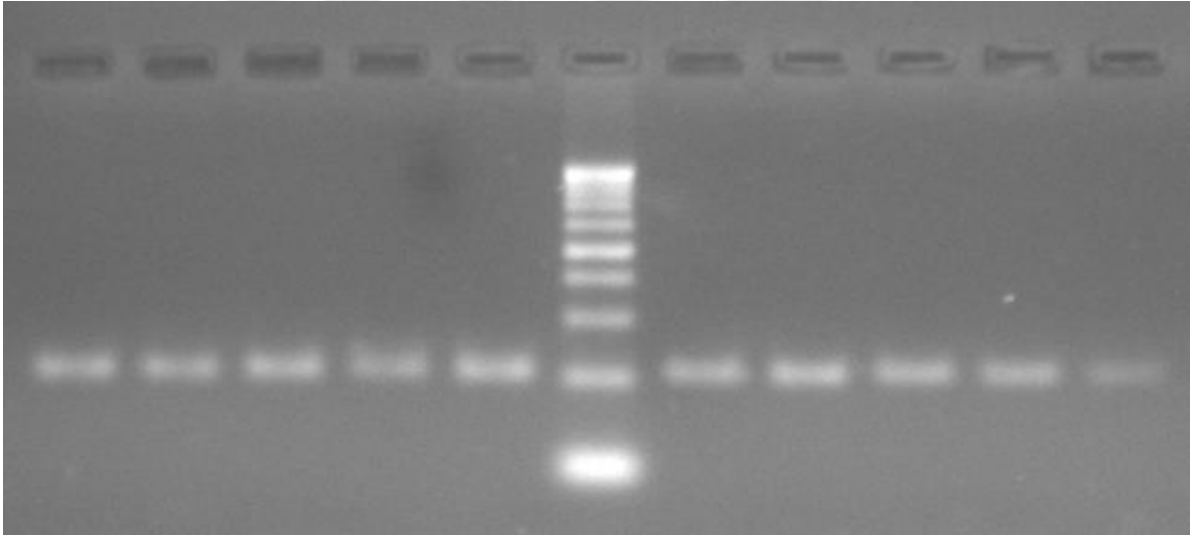
3.5. İstatistiksel Analiz

Gen frekanslarının Hardy-Weinberg dengesinde (HW dengesi) olup olmadığını kontrol etmek için X^2 -test sistemi kullanılmıştır. X^2 -testi, gözlenen ve gen frekansları için dengede olan bir popülasyonda beklenen frekanslar arasındaki sapmanın istatistiksel bakımdan önemli olup olmadığını belirlemek için uygulanmıştır.

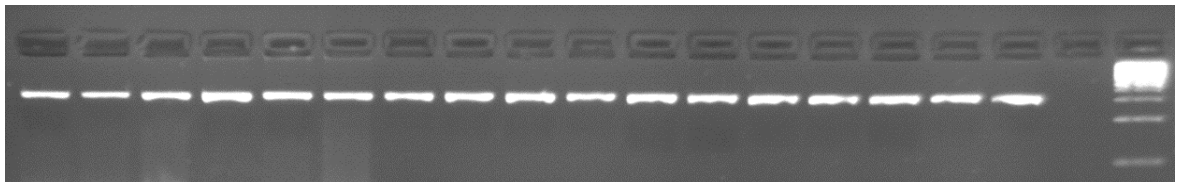
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Daha önce yapılan mutasyon analizinde EDARADD geninin 6. ekzonda c.439G>A bölgesinde nükleotit değişimi saptanmış ve hastanın bu gen lokusu için homozigot olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyon sentezlenen proteinde yanlış anlamlı mutasyona sebep olmaktadır (Rencüzoğulları ve Güven Ezer, 2023: 175). Bu çalışmada hasta bireyin akrabalarında EDARADD geninin 6. ekzonda c.439G>A bölgesinde mutasyon taraması yapılmıştır. Çalışmaya hasta bireyle birlikte toplam 61 kişi dahil edilmiştir. Mutasyonlar hem RFLP (MnII restriksiyon enzimi ile kesim), hem sekanslama ve hem de ARMS yöntemlerine göre çalışılmıştır.

Hem MnII ile yapılacak kesim işlemleri için yapılan amplifikasyon ürünlerinin (128 bç) hem de sekanslama çalışmaları için kullanılacak amplifikasyon ürünlerinin (317 bç) jel görüntüleri **Görsel 4.1** ve **Görsel 4.2**'de görülmektedir.

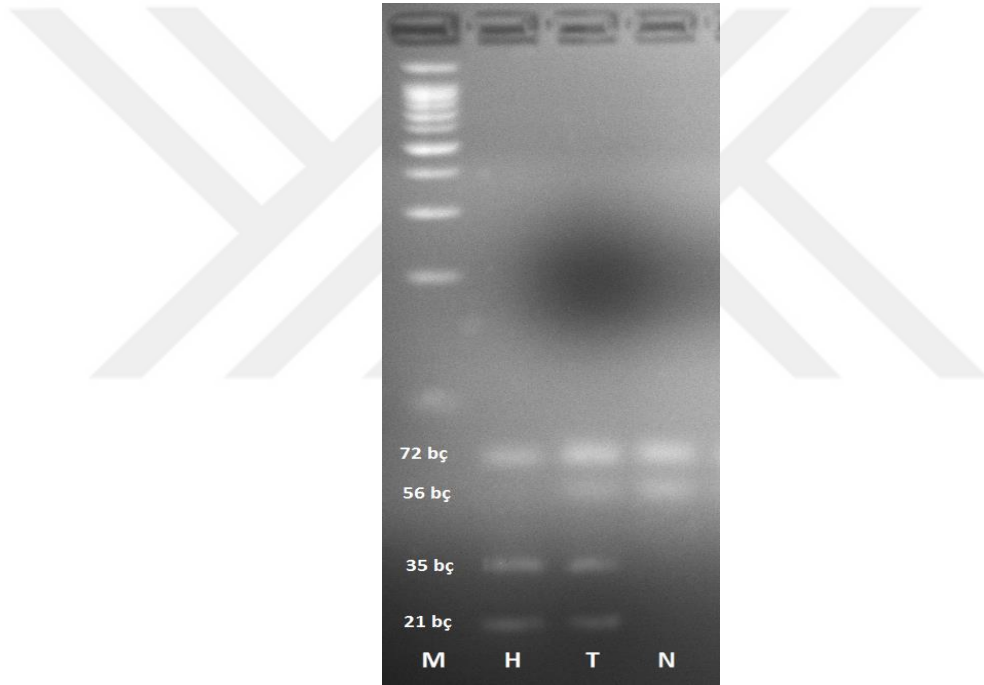


Görsel 4.1. *MnII restriksiyon endonükleaz kesimi için elde edilen amplifikasyon ürünü. Marker (ortada) 100 bç, PCR ürünleri 128 bç.*

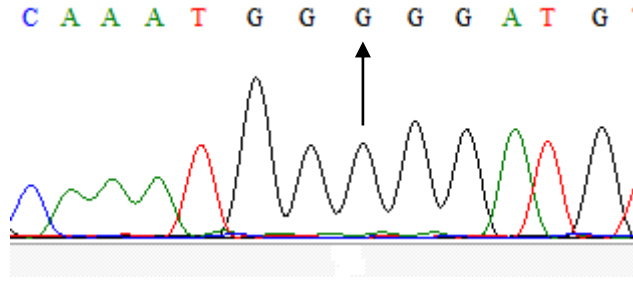


Görsel 4.2. *Sekanslama çalışmaları için elde edilen amplifikasyon ürünü. Marker (sağda) 100 bç, PCR ürünleri 317 bç.*

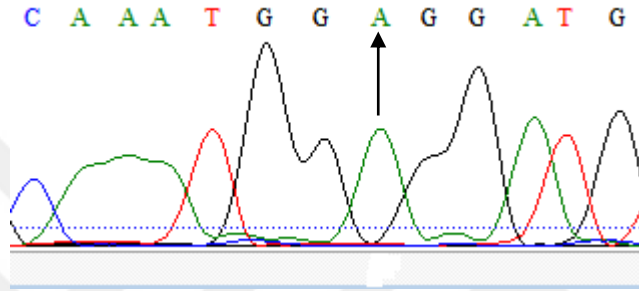
MnII restriksiyon endonükleaz ile kesim işlemleri sonucunda sağlıklı bireylerde sadece 72 ve 56 baz çifti büyüklüğünde iki bant oluşmaktadır (**Görsel 4.3** ve **Görsel 4.4**). Çünkü normal bireylerde 128 bç büyüklüğündeki amplifikasyon ürünü ve çalışılan mutasyon bölgesinin dışında başka bir yerde MnII için bir kesim noktası bulunmaktadır (5'-(N)₆GAGG-3'/3'-(N)₇CTCC-5'). Bundan dolayı tüm bireylerde 128 bç DNA parçası 72 bç ve 56 bç olarak bölünmektedir. Hasta bireylerde ise 56 bç büyüklüğündeki parçada ikinci bir kesim noktası oluşmakta ve sonuçta 35 ve 21 bç büyüklüğünde iki bant daha oluşmaktadır (**Görsel 4.3** ve **Görsel 4.5**). Taşıyıcı (heterozigot) bireylerde ise 72, 56, 35 ve 21 bç büyüklüğünde 4 bant profili görülmektedir (**Görsel 4.3** ve **Görsel 4.6**).



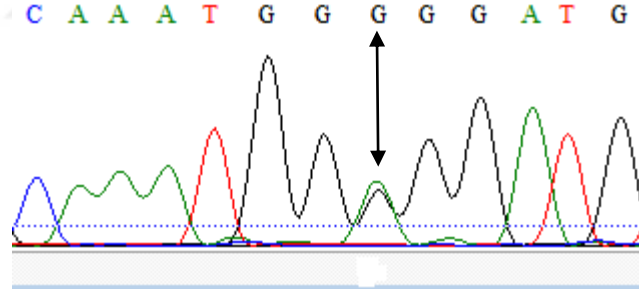
Görsel 4.3. *MnII* kesimi sonrası elde edilen jel görüntüleri. M: Marker (100 bç), H: Hasta, T: Taşıyıcı ve N: Normal bireyler.



Görsel 4.4. Sağlıklı bireylerde sekans görüntüsü

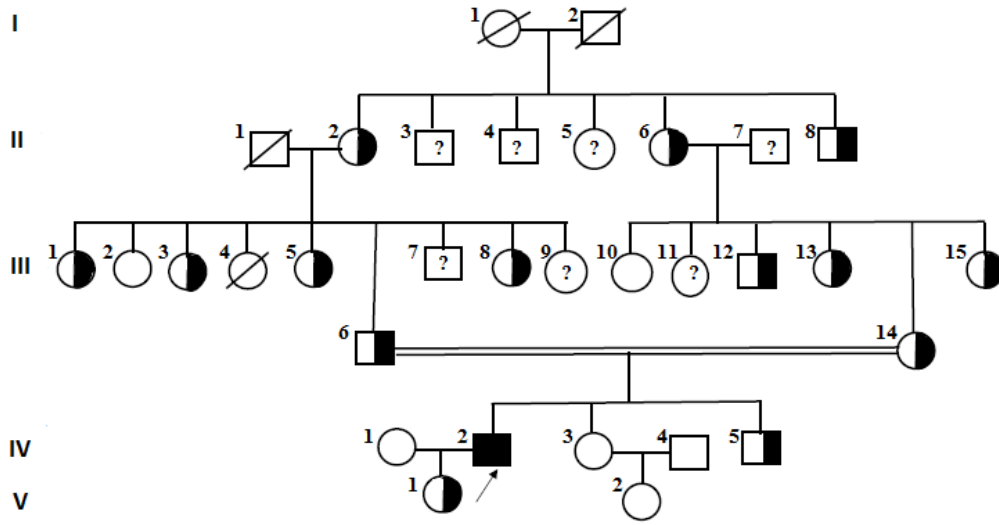


Görsel 4.5. Hasta bireylerde sekans görüntüsü



Görsel 4.6. Heterozigot bireylerde sekans görüntüsü

Hem MnII kullanılarak hem de sekanslama yoluyla yapılan genotiplendirme çalışmalarında kan bağı akrabalığı olan ailede 46 kişinin homozigot sağlıklı (**Görsel 4.4**), 1 kişinin hasta (**Görsel 4.5**) ve 14 kişinin ise heterozigot (taşıyıcı) (**Görsel 4.6**) oldukları saptanmıştır. Hasta bireyin anne-babasının akraba olduğu (teyze çocukları) ve her ikisinin de taşıyıcı oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Hastanın büyük annelerinin de (anneanne ve babaanne) taşıyıcı oldukları gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre gen mutasyonunun otozomal resesif kalıtıldığı görülmektedir (**Görsel 4.7**). Açıklama görsel altında verilmiştir.



Görsel 4.7. Hem *MnII* ile kesim hem de sekanslama yoluyla yapılan genotiplendirme çalışmaları sonuçlarına göre çizilen aile ağacı.

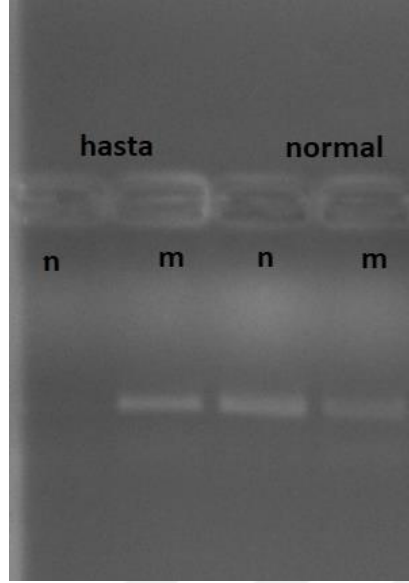
? : Kan vermeyen bireylerdir, analizleri yapılmamıştır.

II-8, III-2,8,10: Bu bireylerin kan veren tüm çocukları normal olarak saptanmıştır.

III-1,3,5,12,13: Bu bireylerin çocukları kan vermemişlerdir.

Yapılan istatistiksel analizlere göre gen frekansının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu, gen frekansları arasındaki farkın istatistiksel anlamda önemsiz olduğu ($P \leq 0.05$) görülmüştür.

ARMS yöntemi için dizayn edilen hem F hem de R primerlerinde yüksek oranda tamamlayıcı bazlar (high end self complementarity) nedeniyle spesifik bantlar elde edilememiştir. Genin hem 5'-ucundaki mutasyonu saptayan F allelinde hem de 3'-ucundaki mutasyonu saptayan R allelinde saç tokası yapısı oluşumu nedeniyle belirleyici bantlar bulunamamıştır. Spesifik bağlanmayı sağlamak için primer bağlanma ısısı 57 ile 64 °C arasında çalışıldığı halde başarılı amplifikasyon elde edilememiştir. **Görsel 4.8'**de görüldüğü gibi hasta bireyde doğru bir şekilde normal primer amplifiye olmamış fakat normal bireyde mutant primer amplifiye olmaması gerekirken hata sonucu amplifikasyon göstermiştir.



Görsel 4.8. *ARMS yöntemine göre mutasyon analizi.*

EDARADD geni A ve B olarak adlandırılan iki izoform kodlamaktadır (ectodysplasin A receptor associated death domain A and B). Bu iki izoform arasındaki tek fark sadece birinci ekzonu ilgilendiren seçenekli splaysonucu oluşmaktadır. Dolayısıyla iki izoform arasında sentezlenen proteinin N-terminal ucunda farklılık bulunmaktadır (Yan vd., 2002: 410). Mutasyon saptanan EDARADD geni 6 ekzon ve toplam 648 nükleotit uzunluğunda olan bir gendir. 215 aminoasit uzunluğunda protein molekülü sentezlemektedir (<https://www.omim.org/entry/614941>, 22.08.2019, 11.05.2016) (**Çizelge 4.1**).

EDAR geni, EDA geni tarafından sentezlenen ligand ektodisplazin A için hücre yüzeyinde bulunan bir reseptör proteinini sentezlemektedir. Bu sinyal, dermal gelişimi başlatmak üzere nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) sinyal yolunu aktive etmek için bir adaptör olarak çalışan EDARADD proteinine iletilir (Bibi vd., 2011: 40). EDARADD ürünü ve NF- κ B geni etkileşime girerek dermal gelişim başlatılmaktadır.

Çizelge 4.1. *EDARADD (ECTD11B) geni ekzonları, nükleotit dizileri ve translasyon ürünü (Rencüzoğulları ve Güven Ezer, 2023).*
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcbsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS1610.1>).

Nükleotit Sekansları (648 bç):

Exon 1 (1-61, toplam 61 bç)

ATGGGCCTCAGGACGACTAAACAGATGGGGAGAGGCACTAAAGCTCCTGGTC
ACCAAGAGG

Exon 2 (62-120, toplam 59 bç)

ATCATATGGTAAAGGAACCAGTGGAAGACACAGACCCTAGCACTTTATCCTTT
AATATG

Exon 3 (121-160, toplam 40 bç)

TCAGACAAATATCCCATTTCAAGATACGGAACTCCCTAAAG

Exon 4 (161-219, toplam 59 bç)

CTGAAGAATGTGATACAATTACTTTGAACTGCCCACGAAATTCAGATATGAAA
AATCAG

Exon 5 (220-265, toplam 46 bç)

GGAGAAGAAAATGGCTTTCCAGATAGCACTGGAGATCCTCTTCCAG

Exon 6 (266-645, toplam 380 bç ve stop kodon)

AGATCAGCAAGGACAACTCCTGCAAAGAAAAGTGTACTTGTTCCTCCTGCTTG
CTCCGGGCCCCCACCATAAGTGACTTGCTCAATGATCAGGACTTACTAGACGT
GATCAGGATAAAGCTGGATCCGTGTCACCCAACGGTGAAAACTGGAGGAATT
TTGCAAGCAAATGGG(A)*GGATGTCCTATGACGAATTGTGCTTCTGAGCAG
AGGCCACAGAGCCCCACCTTGGAGTTCTTGCTCCGGAACAGTCAGAGGACGGT
GGGCCAGCTGATGGAGCTCTGCAGGCTCTACCACAGGGCCGACGTGGAGAAG
GTTCTGCGCAGGTGGGTGGACGAGGAGTGGCCCAAGCGGGAGCGTGGAGACC
CCTCCAGGCACTTCTAG

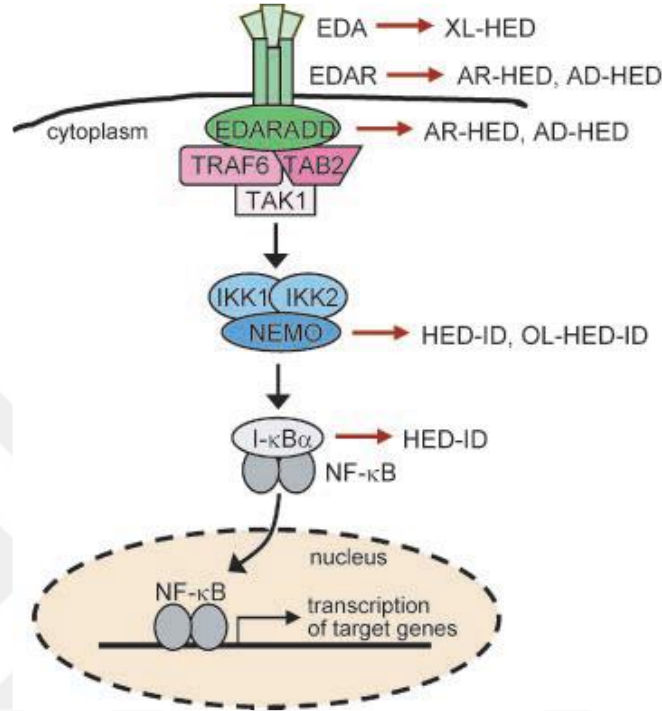
Translasyon (215 aa):

MGLRTTKQMGRGTKAPGHQEDHMKVKEPVEDTDPSTLSFNMSDKYPIQDTELPKA
EECDTITLNCPRNSDMKNQGEENGFPDSTGDPLPEISKDNSCKENCTCSSCLLRAPT
ISDLLNDQDLLDVIRIKLDPCHPTVKNWRNFASKWG(R)*MSYDELCFLEQRPQSPT
LEFLLRNSQRTVGQLMELCRLYHRADVEKVLRRWVDEEWPKRERGDPSRHF

*Parantez: Yer değişen nükleotit ve yeni aminoasit

EDARADD, EDAR geninin TNFR ile ilişkili genler olan TRAF'ların aşağı yöndeki stimülatörüdür. EDARADD, farklı TNFR'ler tarafından kullanılan ortak adaptör moleküller olan TNFR ile ilişkili faktörler (TRAF faktörleri) aracılığıyla EDAR'ı sitoplazmadaki yollara bağlamaktadır (Headon vd., 2001: 913; Yan vd., 2002: 410). EDARADD ile sitoplazmaya aktarılan sinyaller sinyal ileticiler olan TRAF6, TAK1 ve

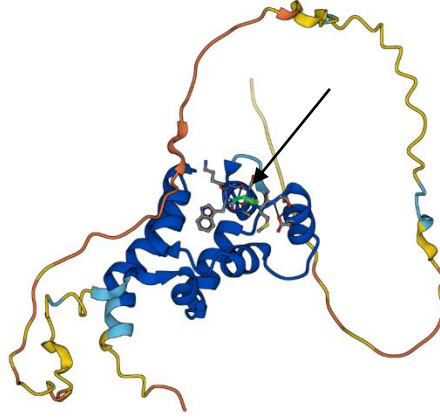
TAB2 tarafından işlenerek bir transkripsiyon faktörü olan ve çekirdekte bulunan NF- κ B proteinine iletilir. NF- κ B gen ürünü de hedef gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Mikkola, 2009: 2035; Bibi vd., 2011: 40; Lefebvre ve Mikkola, 2014: 226) (**Görsel 4.9**).



Görsel 4.9. EDA, EDAR ve EDARADD sinyal iletim yolu. Ligand (EDA), reseptör (EDAR) ve sinyal iletili (EDARADD) birbirlerinin sinyalleri için spesifikler. Sitoplazma içinde diğer sinyal iletiliciler sinyal iletimi için başka diğer reseptörler tarafından kullanılabilir. Üç gendeki mutasyonlar ED sendromuna neden olmaktadır (Kaynak: Mikkola, 2009: 2033, fig. 1).

NF- κ B'nin sinyali alması deri ek gelişimi için gereklidir ve "in vivo" EDAR aktivitesinin ayrılmaz bir parçasıdır (Mikkola, 2008: 220). NF- κ B ve IKK (NF- κ B kinaz inhibitörü) kalıtsal ve kazanılmış bağışıklık tepkileri, hücre ölümü ve iltihaplanma dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci düzenler. NF- κ B veya IKK fonksiyonunun bozulması, kanser de dahil olmak üzere birçok insan hastalığına katkıda bulunur. Ancak NF- κ B ve IKK yolları tek başına görev yapmazlar. Bunların aktivitesini diğer hücre sinyal ağlarıyla bütünleştiren birçok mekanizma vardır. Bu iki faktör hücre kaderini belirleyen karar verme sürecini oluşturmaktadırlar (Perkins, 2007: 50). Sinyal alamamış (uyarılmamış) hücrelerde NF- κ B, sitoplazmada I κ B (İnhibitör Kappa B) proteinleri tarafından tutulur. I κ B, IKK tarafından fosforile edilir. IKK, iki kinaz alt biriminden IKK1 (Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit Alpha) ve IKK2 (Inhibitor of

Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit Beta)] ve zorunlu bir düzenleyici bileşen NEMO (NF- κ B Essential Modulator)'dan oluşan kompleks bir bileşiktir. I κ B fosforile olarak bozulduğunda NF- κ B serbest kalır ve çekirdeğe geçerek hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine olanak sağlar (Perkins, 2007: 50).



Görsel 4.10. EDARADD gen ürününün proteininin tersiyer yapısı, Okun ucunda glisin amino asidi bulunmaktadır.

(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDARADD#proteins-structures>)

Rencüzoğulları ve Güven Ezer (2023) yaptıkları çalışmada EDARADD geni 6.ekzonunda yer alan bir baz substitüsyonu saptamışlardır (c.439G>A). Bu değişimin mRNA 147 kodonunun (GGG) değişmesine neden olduğunu (AGG) ve bunun sonucunda Gly amino asitinin Arg şekline dönüştüğünü bildirmişlerdir (p.Gly147Arg) (**Çizelge 4.1.** parantez içinde). Glisin amino asiti katlanan protein yapısının merkezinde yer almaktadır (**Görsel 4.10**, ok). Tersiyer protein yapısının merkezinde bulunan glisin amino asitinin yerine arginin amino asitinin girmesi proteinin fonksiyonunu bozmaktadır. Bulunan bu mutasyon EDARADD gen proteinin görevini yapmasını engelleyerek EDAR gen proteinini tarafından hücre içine iletilen sinyallerin NF- κ B gen proteinine iletilmesine engel olmaktadır. Dolayısıyla ter bezlerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef genlerin transkripsiyonu yapılamamaktadır. Çünkü Gly nonpolar, yüksüz (nötr) ve hidrofobik bir amino asittir fakat Arg polar, pozitif yüklü ve hidrofiliktir. Aminoasitlerin işlevsel tersiyer yapılarının stabil kalmasında disülfid (S-S) köprülerinin önemi ne kadar fazla ise hidrofob-hidrofil aminoasitlerin yerleşimi de o kadar önemlidir (Rencüzoğulları, 2020: 45). Mutasyon sonucunda hidrofob bir amino asitin hidrofil başka bir aminoasite dönüşümü

proteinin tersiyer yapısının değişmesine neden olarak molekülün işlevsel yapısını yok edebilmektedir (Aydın vd., 2017: 54). Bu çalışmada EDARADD geninde oluşan mutasyonun EDARADD geni tarafından sentezlenen proteinin üçboyutlu katlanmasını bozduğu ve reseptör EDAR geni tarafından iletilen sinyalin tanınmadığı söylenebilir. Bu sonuç başka araştırmacılar tarafından da desteklenmektedir (Okita vd., 2019: 710; Asano vd., 2021: 1535). Araştırmacılar EDA, EDAR ve EDARADD genlerinde meydana gelen herhangi bir patojenik mutasyonun genlerin birbirlerine olan afinitesinin yitirilmesine ve EDARADD geninin TRAF6 ile bağlanma yeteneğini tamamen kaybetmesine sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

EDARADD geni c.439G>A (p.Gly147Arg) için tespit edilen mutasyon, Mendel kurallarına göre resesif olarak kalıtılır ve hastalarda ter bezlerinin gelişimini engeller. EDARADD geninin A izoformu, 215 amino asit içeren reseptörle ilişkili protein üreten altı kodlayıcı ekzona (toplam 648 nükleotit uzunluğunda) sahiptir (**Çizelge 4.1**) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1036031426>, 26.11.2020). Mutasyona uğramış nükleotit, birinci kromozomun 236482440 pozisyonunda lokalizedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/128178>, 26.11.2020).

Bu çalışmada incelenen varyantın daha önce Rencüzoğulları ve Güven Ezer (2023) tarafından genel popülasyonundaki allel frekansının Genome Aggregation Database (gnomAD) veri tabanında doğrulandığı ve varyantın patojenitesinin The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG, American Molecular Pathology) yönergesine göre olası patojenik (likely Pathogenic) olarak sınıflandırıldığı saptanmıştır. Araştırmacılar yeni varyantı ClinVar veritabanında SCV002817173 erişim numarasıyla kaydetmişlerdir. HGVS terminolojisine göre de (Human Genom Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org>, 15.04.2023), varyant NM_145861.4:c.439G>A,p.(Gly147Arg) şeklinde tanımlanmıştır. Bu yeni mutant protein, hücre içi sinyallerin NF-κB proteinine iletilmesini önlemektedir.

CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) puanı 31 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç varyantın daha önce açıklandığı gibi insan genomundaki en zararlı mutasyonlar arasında ilk %1'lik dilimde olduğunu göstermektedir (Chr 1, Pozisyon 236482440, CADD GRCh38-v1.5) (Rentzsch vd., 2019: 886; Ahmed vd., 2021: 1389).

EDARADD geninde çoğu patojenik ve hastalık nedeni olan toplam 17 varyant saptanmıştır. Ayrıca gnomAD veri tabanında (<https://gnomad.broadinstitute.org/gene>, 12.4.2023) EDARADD geninin 400 varyantı tanımlanmıştır.

ENSG00000186197?dataset=gnomad_r2_1). (Rencuzoğulları ve Güven Ezer, 2023: 175). 5'-UTR ve 3'-UTR bölgelerinde 39 varyant tespit edilirken, 112 varyantın yanlış anlamlı mutasyon olduğu belirlenmiştir. Bunlardan dördünde başlangıç kodonunun delesyonu şeklinde tanımlanmıştır. İntron bölgelerinde toplam 187 varyant bulunurken, intron-ekzon eklenme bölgelerinde 24 varyant saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışılan varyantın Mendelien kalıtımına uygun olarak otozomal resesif olarak kalıtıldığı ve homozigot formda ter bezleri oluşumunu tamamen engellenmesinden kaynaklanan anhidrotik ED sendromunun ortaya çıktığı söylenebilir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ectodermal dysplasia (ED) sendromu ektoderm kaynaklı gelişen organlarda anormallikler ile seyreden kompleks genetiksel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. ED, hipohidrotik, anhidrotik ve hidrotik olmak üzere üç şekilde görülür. EDARADD, EDAR geninin TNFR ile ilişkili genler olan TRAF'ların aşağı yöndeki stimülatörüdür. EDARADD ile sitoplazmaya aktarılan sinyaller sinyal ileticiler olan TRAF6, TAB2 ve TAK1 tarafından işlenerek bir transkripsiyon faktörü olan ve çekirdekte bulunan NF-κB proteinine iletilir. NF-κB gen ürünü de hedef gen ekspresyonunu düzenlemektedir

Çalışmamızda ED sendromuna sahip proband ve ailesinde gen mutasyon çalışmaları yapılmıştır. Ailede c.439G>A pozisyonundaki nokta mutasyonu [NM_145861.4:c.439G>A,p.(Gly147Arg)] (ClinVar SCV002817173) hem MnII ile kesim (RFLP) hem de sekanslama yoluyla tanımlanmıştır.

Yapılan genotiplendirme çalışmalarında kan bağı akrabalığı olan ailede 46 kişinin homozigot sağlıklı, 1 kişinin hasta ve 14 kişinin ise heterozigot (taşıyıcı) oldukları saptanmıştır. Hasta bireyin anne-babasının akraba olduğu (teyze çocukları) ve her ikisinin de taşıyıcı oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Hastanın büyük annelerinin de (anneanne ve babaanne) taşıyıcı oldukları gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre bu gen mutasyonunun otozomal resesif kalıtıldığı görülmektedir.

MnII restriksiyon enzimi ile genotiplendirme daha ucuz ve daha hızlı sonuç alınması için uygun bir metottur. Bu yöntem prenatal tanı çalışmalarında kullanılarak doğumsal ED vakalarının sayısının azaltılması veya tam olarak yok edilmesi için kullanışlı ve güvenilir bir yöntem olarak saptanmıştır.

KAYNAKÇA

Ahmed, H. A., El-Kamah, G. Y., Rabie, E., Mostafa, M. I., Abouzaid, M. R., Hassib, N. F., Mehrez, M. I., Abdel-Kader, M. A., Mohsen, Y. H., Zada, S. K., Amr, K. S., Sayed, I. S. M. (2021). "Gene Mutations of the Three Ectodysplasin Pathway Key Players (EDA, EDAR, and EDARADD) Account for More than 60% of Egyptian Ectodermal Dysplasia. A Report of Seven Novel Mutations". *Genes (Basel)*, 12 (9), 1389.

Asamoah, A., Decker, A. B., Wiktor, A., and Van Dyke, D. L. (2003). "Child with De Novo t(1;6)(p22.1;p22.1) translocation and features of ectodermal dysplasia with hypodontia and developmental delay". *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 118A (1), 82-85.

Asano, N., Yasuno, S., Hayashi, R., Shimomura, Y. (2021). "Characterization of EDARADD gene mutations responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia". *The Journal of Dermatology*, 48 (10), 1533-1541.

Aydın, M., Rencüzoğulları, E., Bayram, S., Sevgiler, Y., and Genç, A. (2017). "Alterations on high HbF levels may be associated with KLF1 gene mutations". *Cellular and Molecular Biology*, 63 (8), 51-57.

Aydınbelge, M., Gümüş, H. O., Şekerci, A. E., Demetoğlu, U., Etoz, O. A. (2013). "Implants in children with hypohidrotic ectodermal dysplasia: an alternative approach to esthetic management: case report and review of the literature". *Pediatric Dentistry*, 35 (5), 441-446.

Bal, E., Baala, L., Cluzeau, C., El Kerch, F., Ouldim, K., Hadj-Rabia, S., Bodemer, C., Munnich, A., Courtois, G., Sefiani, A., and Smahi, A. (2007). "Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus". *Human Mutation*, 28 (7), 703-709.

Bani, M., Tezkirecioglu, A.M., Akal, N., Tuzuner, T. (2010). "Ectodermal dysplasia with anodontia: a report of two cases". *European Journal of Dentistry*, 4 (2), 215-222.

Barbaro, V., Confalonieri, L., Vallini, I., Ferrari, S., Ponzin, D., Mantero, G., Willoughby, C.E., Parekh, M., and Di Iorio, E. (2012). "Development of an allele-specific real-time PCR assay for discrimination and quantification of p63 R279H mutation in EEC syndrome". *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14 (1), 38-45.

Bashyam, M. D., Chaudhary, A. K., Reddy, E. C., Reddy, V., Acharya, V., Nagarajaram, H. A., Devi, A. R., Bashyam, L., Dalal, A. B., Gupta, N., Kabra, M., Agarwal, M., Phadke, S. R., Tainwala, R., Kumar, R., and Hariharan, S. V. (2012). "A founder ectodysplasin A receptor (EDAR) mutation results in a high frequency of the autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia in India". *The British Journal of Dermatology*, 166 (4), 819-829.

Başkan, Z., Yavuz, I., Ulku, R., Kaya, S., Yavuz, Y., Basaran, G., Adiguzel, O., and Ozer, T. (2006). "Evaluation of ectodermal dysplasia". *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 22 (4), 171-176.

Başkan Ülkü, S. Z., Yavuz, İ. (2011). “Ektodermal displazili hastalarda protetik yaklaşımlar”. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 21 (1), 57-61.

Bayes, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispas, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K., Kere, J. (1998). “The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats”. Human Molecular Genetics, 7 (11), 1661-1669.

Bibi, N., Ahmad, S., Ahmad, W., and Naeem, M. (2011). “Molecular genetic analysis of consanguineous Pakistani families with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia”. The Australasian Journal of Dermatology, 52 (1), 37-42.

Bildik, T., Ozbaran, B., Kose, S., Koturoglu, G., Gokce, B., Gunaydin, A., and Altintas, I. (2012). “Hypohidrotic ectodermal dysplasia: a multidisciplinary approach”. The International Journal of Psychiatry Medicine, 44 (3), 225-240.

Bulut, E., Guler, A. U., Sen Tunc, E., Telcioglu, N. T. (2010). “Oral rehabilitation with endosseous implants in a child with ectodermal dysplasia: a case report”. European Journal of Paediatric Dentistry, 11 (3), 149-152.

Callea, M., Teggi, R., Yavuz, I., Tadini, G., Priolo, M., Crovella, S., Clarich, G., and Grasso, D. L. (2013). “Ear nose throat manifestations in hypohidrotic ectodermal dysplasia”. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 77 (11), 1801-1804.

Chen, L., Zhao, Y. Y., Wei, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y. Q., Liu, J. Y., Yang, Y., and Tan, Y. H. (2012). “Prenatal diagnosis of anhidrotic ectodermal dysplasia with unconventional loci abnormalities, a case report”. Chinese Medical Journal, 125 (17), 3177-3179.

Cluzeau, C., Marrakchi, S., Picard, C., Munnich, A., Smahi, A., Turki, H. (2019). “First homozygous large deletion in EDARADD gene associated with a severe form of anhidrotic ectodermal dysplasia”. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 33 (2), e55-e57.

Dittmer, A., Erler, T., Gurski, A., Müller, P. (1992). “Hypohidrotic ectodermal dysplasia as the cause of recurrent hyperthermia in a young infant”. Kinderärztliche Praxis, 60 (8), 239-242.

Ersoy-Evans, S., Erkin, G., Fassihi, H., Chan, I., Paller, A. S., Surucu, S., and McGrath, J. A. (2006). “Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1”. Journal of the American Academy of Dermatology, 55 (1), 157-161.

Escoufflaire, C., Rebours, E., Charles, M., Orellana, S., Cano, M., Rivière, J., Grohs, C., Hayes, H., Capitan, A. (2019). “A de novo 3.8-Mb inversion affecting the EDA and XIST genes in a heterozygous female calf with generalized hypohidrotic ectodermal dysplasia”. BMC Genomics, 20 (1), 715.

Farooq, M., Kurban, M., Fujimoto, A., Fujikawa, H., Abbas, O., Nemer, G., Saliba, J., Sleiman, R., Tofaili, M., Kibbi, A. G., Ito, M., Shimomura, Y. (2013). "A homozygous frameshift mutation in the HOXC13 gene underlies pure hair and nail ectodermal dysplasia in a Syrian family". *Human Mutation*, 34 (4), 578-581.

Fazelzadeh Haghighi, N., Kamal, N., Jafari Khamirani, H., Fazelzadeh Haghighi, M., Dastgheib, S. A., Dianatpour, M., Tabei, S. M. B. (2023). "Novel insight into the ectodermal dysplasia 11A: Splicing variant of the EDARADD gene in a family with clinical variability and literature review". *The Journal of Dermatology*, 50 (10), 1357-1362.

Feng, H. L., Zhang, X. X., and Wu, H. (2007). "Research advances in tooth agenesis". *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 39 (1), 13-17.

Freire-Maia, N., Fortes, V. A., Pereira, L. C., Opitz, J. M., Marcalle, F. A., and Cavalli, I. J. (1975). "A syndrome of hypohidrotic ectodermal dysplasia with normal teeth, peculiar facies, pigmentary disturbances, psychomotor and growth retardation, bilateral nuclear cataract, and other signs". *Journal of Medical Genetics*, 12 (3), 308-310.

Frias, J. L., and Smith, D. W. (1968). "Diminished sweat pores in hypohidrotic ectodermal dysplasia: a new method for assessment". *The Journal of Pediatrics*, 72 (5), 606-610.

Gao, Y., Jiang, X., Wei, Z., Long, H., and Lai, W. (2023). "The EDA/EDAR/NF- κ B pathway in non-syndromic tooth agenesis: A genetic perspective". *Frontiers in Genetics*, 14:1168538.

Giampietro, P. F., Baker, M. W., Basehore, M. J., Jones, J. R., and Seroogy, C. M. (2013). "Novel mutation in TP63 associated with ectrodactyly ectodermal dysplasia and clefting syndrome and T cell lymphopenia". *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161A (6), 1432-1435.

Gün, I., Kizilaslan, C., Atalay, M. A. (2012). "Familial ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome". *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 119(1), 86-87.

Güven, Y., Bal, E., Altunoglu, U., Yücel, E., Hadj-Rabia, S., Koruyucu, M., Tuna, E. B., Çıldır, Ş., Aktören, O., Bodemer, C., Uyguner, Z. O., Smahi, A., Kayserili, H. (2019). "Turkish Ectodermal Dysplasia Cohort: From Phenotype to Genotype in 17 Families", *Cytogenetic and Genome Research*, 157 (4), 189–196.

Haghighi, A., Nikuei, P., Haghighi-Kakhki, H., Saleh-Gohari, N., Baghestani, S., Krawitz, P. M., Hecht, J., and Mundlos, S. (2013). "Whole-exome sequencing identifies a novel missense mutation in EDAR causing autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia with bilateral amastia and palmoplantar hyperkeratosis". *The British Journal of Dermatology*, 168 (6), 1353-1356.

Hayashi, R., Farooq, M., Fujikawa, H., Fujimoto, A., Hashimoto, T., Ito, M., and Shimomura, Y. (2013). "Case of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by a large deletion mutation in the EDA gene". *The Journal of Dermatology*, 40 (4), 281-283.

Headon, D.J., Emmal, S.A., Ferguson, B.M., Tucker, A.S., Justice, M.J., Sharpe, P.T., ZonanaJ., and Overbeek, P.A. (2001). "Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development". *Nature*, 414, 913-916.

Hernández-Martín, A., Torrelo, A., Ciria, S., Colmenero, I., Aguilar, A., Grimalt, R., and González-Sarmiento, R. (2013). "Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome: a novel mutation in the PKP1 gene". *Clinical and Experimental Dermatology*, 38 (7), 787-790.

Kawai, T., Nishikomori, R., Izawa, K., Murata, Y., Tanaka, N., Sakai, H., Saito, M., Yasumi, T., Takaoka, Y., Nakahata, T., Mizukami, T., Nunoi, H., Kiyohara, Y., Yoden, A., Murata, T., Sasaki, S., Ito, E., Akutagawa, H., Kawai, T., Imai, C., Heike, T. (2012). "Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency". *Blood*, 119 (23), 5458-5466.

Keng, S. B. (1984). "Oro-facial manifestation of hypohidrotic ectodermal dysplasia-case report". *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 13 (3), 552-555.

Kolören, Z., Çil, E., Ayaz, E., Karaman, Ü. (2017). "RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları". *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7 (2), 215-225.

Kowalczyk-Quintas, C., Willen, L., Dang, A. T., Sarrasin, H., Tardivel, A., Hermes, K., Schneider, H., Gaide, O., Donzé, O., Kirby, N., Headon, D. J., and Schneider, P. (2014). "Generation and Characterization of Function Blocking Anti-Ectodysplasin A (EDA) Monoclonal Antibodies that Induce Ectodermal Dysplasia". *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (7), 4273-4285.

Lefebvre, S., and Mikkola, M. L. (2014). "Ectodysplasin research--where to next?". *Seminars in Immunology*, 26 (3), 220-228.

Lexner, M. O., Bardow, A., Hertz, J. M., Nielsen, L. A., and Kreiborg, S. (2007). "Anomalies of tooth formation in hypohidrotic ectodermal dysplasia". *International Journal of Paediatric Dentistry*, 17 (1), 10-18.

Li, W., Gao, B. D., Li, L. Y., Xiao, H. M., and Lu, G. X. (2006). "Mutation screening and prenatal diagnosis of hidrotic ectodermal dysplasia in a Chinese family". *Chinese Journal of Medical Genetics*, 23 (6), 618-621.

Liu, N., Shi, H. R., Wu, Q. H., Jiang, M., and Kong, X. D. (2013). "Mutation analysis and first-trimester prenatal diagnosis for a Chinese family with hidrotic ectodermal dysplasia". *Chinese Journal of Medical Genetics*, 30 (4), 407-409.

Liu, Y., Yu, X., Wang, L., Li, C., Archacki, S., Huang, C., Liu, J.Y., Wang, Q., Liu, M., and Tang, Z. (2012). "Mutation p.Leu354Pro in EDA causes severe hypohidrotic ectodermal dysplasia in a Chinese family". *Gene*, 491 (2), 246-250.

Maier-Wohlfart, S., Aicher, C., Willershausen, I., Peschel, N., Meißner, U., Götz, L., Schneider, H. (2022). "Congenital Nail Disorders among Children with Suspected Ectodermal Dysplasias". *Genes*, 13 (11), 2119.

- Martínez-Romero, M. C., Ballesta-Martínez, M. J., López-González, V., José Sánchez-Soler, M., Serrano-Antón, A. T., Barreda-Sánchez, M., Rodríguez-Peña, L., Martínez-Menchon, M. T., Frías-Iniesta, J., Sánchez-Pedreño, P., Carbonell-Meseguer, P., Glover-López, G., Guillén-Navarro, E., and GIEDE (Spanish multidisciplinary research group for ectodermal dysplasia). (2019). “EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population”. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14 (1), 281.
- Mikkola, M.L. (2008). “TNF superfamily in skin appendage development”. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 219-230.
- Mikkola, M. L. (2009). “Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 149A (9), 2031–2036.
- Monreal, A. W., Zonana, J., Ferguson, B. (1998). “Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations”. *American Journal of Human Genetics*, 63 (2), 380-399.
- Monreal, A. W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A., and Zonana, J. (1999). “Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Nature Genetics*, 22 (4), 366-369.
- Mousumi, T., Xiong, Z., Lu, L., Liu, S., Xia, K., and Hu, Z. (2013). “Identification of a known GJB6 mutation in an autosomal dominant inherited Chinese family with hidrotic ectodermal dysplasia”. *Journal of Central South University. Medical Sciences*, 38 (8), 761-765.
- Najmabadi, H., Teimourian, S., Khatibi, T., Neishabury, M., Pourfarzad, F., Jalil-Nejad, S., Azad, M. (2001). “Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations”. *Archives of Iranian Medicine*, 4 (4), 165–170.
- Naqvi, S. K., Wasif, N., Javaid, H., and Ahmad, W. (2011). “Two novel mutations in the gene EDAR causing autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 14 (3), 156-159.
- Nijs, E. L., and Huisman, T. A. (2001). “Recurrent fever and lack of tooth buds. a case of ectodermal dysplasia in a 9 months old boy”. *JBR-BTR*, 84 (6), 256-257.
- Nikopensius, T., Annilo, T., Jagomägi, T., Gilissen, C., Kals, M., Krjutškov, K., Mägi, R., Eelmets, M., Gerst-Talas, U., Remm, M., Saag, M., Hoischen, A., Metspalu, A. (2013). “Non-syndromic tooth agenesis associated with a nonsense mutation in ectodysplasin-A (EDA)”. *Journal of Dental Research*, 92 (6), 507-511.
- Nishikomori, R., Akutagawa, H., Maruyama, K., Nakata-Hizume, M., Ohmori, K., Mizuno, K., Yachie, A., Yasumi, T., Kusunoki, T., Heike, T., and Nakahata, T. (2004). “X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival”. *Blood*, 103 (12), 4565-4572.

Norval, E. J., van Wyk, C. W., Basson, N. J., and Coldrey, J. (1988). "Hypohidrotic ectodermal dysplasia, a genealogic, stereomicroscope, and scanning electron microscope study". *Pediatric Dermatology*, 5 (3), 159-166.

Okita, T., Asano, N., Yasuno, S., Shimomura, Y. (2019). "Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia". *Journal of Dermatology*, 46 (8), 710–715.

Parveen, A., Khan, S. A., Mirza, M. U., Bashir, H., Arshad, F., Iqbal, M., Ahmad, W., Wahab, A., Fiaz, A., Naz, S., Ashraf, F., Mobeen, T., Aziz, S., Ahmed, S. S., Muhammad, N., Hassib, N. F., Mostafa, M. I., Gaboon, N. E., Gul, R., Khan, S., Froeyen, M., Shoaib, M., Wasif, N. (2019). "Deleterious Variants in WNT10A, EDAR, and EDA Causing Isolated and Syndromic Tooth Agenesis: A Structural Perspective from Molecular Dynamics Simulations". *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (21), 5282.

Perkins, N.D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 49-62.

Potter, P. C., and Bowie, M. D. (1984). "Dysphagia in hypohidrotic ectodermal dysplasia. A case report". *South African medical journal*, 66 (6), 232-234.

Rencüzoğulları, Eyyüp, *Sitoloji*, Nobel Yayınları, 3. Baskı, Ankara, 2020.

Rencüzoğulları, E., and Güven Ezer, B. (2023). "A new variant of the ectodysplasin A receptor death domain gene associated with anhidrotic ectodermal dysplasia in a Turkish family and its simple diagnosis by restriction fragment length polymorphism". *Genes and Genetic Systems*, 98 (4), 171–178.

Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J., and Kircher, M. (2019). "CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome". *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D886-D894.

Rifai, L., Port-Lis, M., Tabet, A. C., Bailleul-Forestier, I., Benzacken, B., Drunat, S., Kuzbari, S., Passemard, S., Verloes, A., and Aboura, A. (2010). "Ectodermal dysplasia-like syndrome with mental retardation due to contiguous gene deletion, further clinical and molecular delineation of del(2q32) syndrome". *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A (1), 111-117.

Rodewald, A., and Zahn-Messow, K. (1982). "Dermatoglyphics findings in families with X-linked hypohidrotic (or anhidrotic) ectodermal dysplasia (HED)". *Progress in Clinical and Biological Research*, 84, 451-458.

Sadia, Foo, J. N., Khor, C. C., Jelani, M., Ghazanfar, A. (2019). "A recurrent missense mutation in the EDAR gene causes severe autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia in two consanguineous Kashmiri families". *The Journal of Gene Medicine*, 21 (9), e3113.

Schindler, A., Guazzarotti, L., Mameli, C., Urbani, E., Mozzanica, F., Guerrini, L., and Zuccotti, G. V. (2013). "Vomer aplasia in a patient carrying a de novo mutation of the

TP63 gene (3q27)". *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77 (9), 1606-8160.

Segurado Rodríguez, M. A., Ortiz De Frutos, F. J., Cornejo Navarro, P., Rodríguez Peralto, J. L., Sánchez Del Pozo, J., Guerra Tapia, A., and Iglesias Díez, L. (2002). "Hypohidrotic ectodermal dysplasia: A cause of fever of unknown origin". *Anales Espanoles de Pediatria*, 56 (3), 253-257.

Shi, H. J., Fang, Q., and Wang, L. T. (2005). "Prenatal diagnosis of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with X-chromosome inversion". *Chinese Medical Journal*, 85 (26), 1845-1848.

Shoenfeld, Y., Shapiro, Y., Fisher, B. K., and Dvoretzky, I. (1975). "Sweating in the 'anhidrotic type' of congenital ectodermal dysplasia". *Dermatologica*, 150 (5), 277-282.

Spfaer, J. A. (1981). "A dental approach to carrier screening in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia". *Journal of Medical Genetics*, 18 (6), 459-460.

Sun, X., Shen, J., Wu, W., Xie, J., Gao, C., Qin, L., Cui, Y., and Liu, J. (2013). "Identification of a novel c.822 G>T mutation of EDA gene in a Chinese family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia". *Chinese Journal of Medical Genetics*, 30 (3), 270-273.

Tape, M. W., and Tye, E. (1995). "Ectodermal dysplasia, literature review and a case report". *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 16 (5), 524-528.

Vierucci, S., Baccetti, T., and Tollaro, I. (1994). "Dental and craniofacial findings in hypohidrotic ectodermal dysplasia during the primary dentition phase". *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 18 (4), 291-297.

Viljoen, D. L., and Winship, W. S. (1988). "A new form of hypohidrotic ectodermal dysplasia". *American Journal of Medical Genetics*, 31 (1), 25-32.

Wang, H. J., Tang, Z. L., Lin, Z. M., Dai, L. L., Chen, Q., and Yang, Y. (2014). "Recurrent splice-site mutation in MBTPS2 underlying IFAP syndrome with Olmsted syndrome-like features in a Chinese patient". *Clinical and Experimental Dermatology*, 39 (2), 158-161.

Wawrzynek, A., Słezak, R., Wiśniewski, S. A., Trzeciak, W.H. (2013). "A novel mutation in the ED1 gene in a patient with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia". *International Journal of Dermatology*, 52 (9), 1121-1124.

Yan, M., Zhang, Z., Brady, J. R., Schilbach, S., Fairbrother, W. J., and Dixit, V. M. (2002). "Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice". *Current Biology*, 12 (5), 409-413.

Yang, Y., Luo, L., Xu, J., Zhu, P., Xue, W., Wang, J., Li, W., Wang, M., Cheng, K., Liu, S., Tang, Z., Ring, B. Z., Su, L. (2013). "Novel EDA p.Ile260Ser mutation linked to non-syndromic hypodontia". *Journal of Dental Research*, 92 (6), 500-506.

- Yavuz, I., Başkan, Z., Ulku, R., Dulgergil, T. C., Dari, O., Ece, A., Yavuz, Y., and Dari, K. O. (2006). "Ectodermal dysplasia: Retrospective study of fifteen cases". *Archives of Medical Research*, 37 (3), 403-409.
- Yavuz, I., Kiralp, S., Başkan, Z. (2008). "Hypohidrotic ectodermal dysplasia: a case report". *Quintessence international*, 39 (1), 81-86.
- Yıldırım, M., Yorgancılar, E., Gun, R., Topcu, I. (2012). "Ectodermal dysplasia: otolaryngologic evaluation of 23 cases". *Ear, Nose, and Throat Journal*, 91 (2), E28-33.
- Yin, W., Ye, X., and Bian, Z. (2013). "The second deletion mutation in exon 8 of EDA gene in an XLHED pedigree". *Dermatology*, 226 (2), 105-110.
- Yoshioka, T., Nishikomori, R., Hara, J., Okada, K., Hashii, Y., Okafuji, I., Nodomi, S., Kawai, T., Izawa, K., Ohnishi, H., Yasumi, T., Nakahata, T., Heike, T. (2013). "Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p.Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation". *Journal of Clinical Immunology*, 33 (7), 1165-1174.
- Zankl, A., Addor, M.C., Cousin, P., Gaide, A.C., Gudinchet, F., Schorderet, D.F. (2001). "Fatal outcome in a female monozygotic twin with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) due to a de novo t(X;9) translocation with probable disruption of the EDA gene". *European Journal of Pediatrics*, 160 (5), 296-299.
- Zhang, X. X., and Feng, H. L. (2003). "Cases analysis and clinical classification of oligodontia". *Chinese Journal of Stomatology*, 38 (4), 266-268.
- Zhu, H. I., Wang, W. J., Zhu, R. F., Zhu, X. Y., Yang, Y., and Wu, X. (2013). "Molecular genetics study of ED1 gene for two X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia families". *Chinese Journal of Medical Genetics*, 30 (4), 399-402.