

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FRAJİL X SENDROMU ÖN TANISI ALAN ÇOCUKLARDA
SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ve FMR 1 GENİ TRİNÜKLEOTİD
TEKRAR SAYILARININ ARAŞTIRILMASI

ONUR ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN

ADANA – 2010

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FRAJİL X SENDROMU ÖN TANISI ALAN ÇOCUKLARDA
SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ve FMR 1 GENİ TRİNÜKLEOTİD
TEKRAR SAYILARININ ARAŞTIRILMASI**

ONUR ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman DEMİRHAN**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri TF2009YL11 nolu proje olarak
desteklenmiştir.**

Tez No:.....

ADANA - 2010

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren ve katkılarını eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a, tezim süresince beraber çalışmalar yürüttüğümüz Arş. Gör. Bertan Yılmaz'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma, büyüklerime, arkadaşlarıma, Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan dostlarım Arş. Gör. Yunus Arıkan ile Burcu Çoban'a ve özellikle de aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Frajil X Sendromunun Genetiği	4
2.3. Görülme Sıklığı	6
2.4. Klinik Bulgular	6
2.5. Frajil X Sendromunun Moleküler Mekanizması	9
2.5.1. FMR 1 Geni ve Frajil X Mental Retardasyon Proteini (FMRP)	13
2.6. Tanı Yöntemleri	15
2.6.1. Sitogenetik Analiz	15
2.6.2. Moleküler Analiz	18
2.6.2.1. Southern Blot	18
2.6.2.2. PCR Yöntemi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Gereç	21

3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler	21
3.4. Yöntem	22
3.4.1. Sitogenetik Analiz Yöntemi	22
3.4.1.1. GTG Bantlama	23
3.4.2. Moleküler Analiz Yöntemi	23
3.4.2.1. DNA İzolasyonu	23
3.4.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	24
3.4.3.3. Abbott Frajl X Protokolü	24
4. BULGULAR	26
4.1. Araştırma Grubunda Saptanan Bulgular	26
4.1.1. Araştırma Grubunda Saptanan Sitogenetik Bulgular	26
4.1.2. Araştırma Grubunun FMR-1 Geni Moleküler Genetik Analiz Bulguları	48
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	54
EKLER	58
EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı	58
1.1. Lizis Tamponu	58
1.2. Fizyolojik Tampon	58
1.3. TE-9	59
1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat)	59
1.5. TE Tamponu	59
1.6. M199 Medyumu	59
EK-2. PCR	60
2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları	61
2.1.1. Kalıp Genomik DNA	61
2.1.2. Primerler	61
2.1.3. Reaksiyon Tamponu	62
2.1.4. DNA Polimeraz	62
2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 FMR 1 geninin yapısı

Şekil 2 X kromozomunda sitogenetik frajilite

Şekil 3 X kromozomu üzerinde bilinen frajil bölgeler

Şekil 4 9 nolu hastada Xq27.3 de frajil bölge

Şekil 5 9 nolu hastada 14q22 de kromatid kırığı bölgesi

Şekil 6 9 nolu hastada 9. ve 6. kromozomların kısa kollarının kaynaşması sonucu oluşan yeniden düzenlenmiş kromozom

Şekil 7 9 nolu hastada 5q31 de kromatid kırığı bölgesi

Şekil 8 11 nolu hastada 3p22 de gap bölgesi

Şekil 9 12 nolu hastada Xq26 da frajil bölge

Şekil 10 12 nolu hastada 3p14.2 de kromatid kırığı bölgesi

Şekil 11 12 nolu hastada 5q31 de kromatid kırığı bölgesi

Şekil 12 13 nolu hastada 1q44 de frajilite ve 2q31 de kromatid kırığı bölgesi

Şekil 13 13 nolu hastada 7p21.2 de frajil bölge

Şekil 14 14 nolu hastada Xq27.3 de frajilite ve 11p15.1 de gap bölgesi

Şekil 15 14 nolu hastada Xq27.3 de frajil bölge

Şekil 16 14 nolu hastada Xp22 de frajil bölge

- Şekil 17** 14 nolu hastada 8q22 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 18** 14 nolu hastada 5q31 de frajil bölge
- Şekil 19** 14 nolu hastada 6p23 de frajil bölge
- Şekil 20** 15 nolu hastada 6q25 de frajilite, 3q13.2 ve 19p13.1 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 21** 15 nolu hastada 3p21.1 de kromatid kırığı bölgesi ve 3p25 de frajilite
- Şekil 22** 15 nolu hastada 3p21 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 23** 15 nolu hastada 7q31.2 de ve 15q15 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 24** 15 nolu hastada 4q31 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 25** 15 nolu hastada 3p14 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 26** 16 nolu hastada 3p13 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 27** 16 nolu hastada 7q32 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 28** 16 nolu hastada 2q31 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 29** 16 nolu hastada 1p22.3 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 30** 16 nolu hastada 9q22.1 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 31** 18 nolu hastada 7q32 de frajil bölge
- Şekil 32** 19 nolu hastada 6q25.2 de frajil bölge

- Şekil 33** 19 nolu hastada 3p21.3, 6q21 ve 11q23.2 de frajil bölge
- Şekil 34** 19 nolu hastada 1q32.1 de frajil bölge
- Şekil 35** 19 nolu hastada 3p21.2 de kromatid kırığı ve 6q21 de gap bölgesi
- Şekil 36** 19 nolu hastada 7q22 de kromatid kırığı bölgesi
- Şekil 37** 19 nolu hastada 3p13 de kromatid kırığı ve 8q22 de gap bölgesi
- Şekil 38** İncelenen hastalarda rastlanan kromozom hasarlarının kısmi görünümleri
- Şekil 39** Normal bir hastaya ait FMR-1 geninin CGG tekrar dizilerinin moleküler analiz sonucu
- Şekil 40** Bazı hastaların çoğaltılan bölgelerinin agaroz jel görüntüsü

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 1** Vaka grubunun cinsiyet ve sitogenetik tanı grubuna göre dağılımı
- Çizelge 2** Hastaların; sitogenetik, moleküler genetik ve klinik bulguları

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bç	Baz çifti
BrdU	Bromodeoksiüridin
FMRP	Frafil X mental retardasyon proteini
FMR 1	Frafil X mental retardasyon geni
FUdR	Fluorodeoksiüridin
FXS	Frafil X sendromu
GABA	Gamaaminobutirik asit
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
Mb	Mega baz
MTX	Metataraksat
NES	Çekirdek eksport sinyali
NLS	Çekirdek lokalizasyon sinyali
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon uzunluk polimorfizmi
RNP	Ribonükleoprotein
YAC	Yapay maya kromozomu
ZG	Zeka geriliği
5-azad C	5-azadeoksisitidin

ÖZET

FRAJİL X SENDROMU ÖN TANISI ALAN ÇOCUKLARDA SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ve FMR 1 GENİ TRİNÜKLEOTİD TEKRAR SAYILARININ ARAŞTIRILMASI

Frajlil X sendromu, Down sendromundan sonra ikinci sırada yer alan ve toplumda kalıtsal zeka geriliğine neden olan bir hastalıktır. Frajlil X sendromunun tanısı, uzun yıllardır sitogenetik analizlerle verilmektedir. Ancak, hastaların tanımlanmasında; etkilenmiş bireyin bütün hücrelerinde frajlil bölgenin ortaya çıkmaması, taşıyıcı erkeklerin normal gözükmesi, taşıyıcı kadınların önemli bir oranının (%50) sitogenetik olarak normal çıkması ve X kromozomunun uzun kolunda folata duyarlı üç frajlil bölgenin bulunması gibi nedenlerden dolayı moleküler genetik teknikler tercih edilmektedir. Yine de tanımlanan bir indeks olguda, sitogenetik analiz klinik tanıyı onaylamak ve diğer kromozomal anomalileri göstermek için gereklidir. Frajlil X sendromuna neden olan FMR-1 geni Xq27.3'te yerleşiktir. Bu sendromda, bu genin promotor bölgesindeki CGG üçlü nükleotid tekrar sayısının artışı söz konusudur. Toplumdan topluma bu gendeki üçlü nükleotid tekrar sayısı değişmekle birlikte, 50'nin altındaki tekrar sayısı normal, 50-200 arasındaki tekrar sayısı premütasyon, 200 ve üzeri tekrar sayısı tam mutasyon olarak adlandırılır. Tam mutasyonlu bireylerde, FMR-1 geni çalışmaz ve Frajlil X Mental Retardasyon Proteinin (FMRP) üretimi yapılamaz.

Bu çalışmada; FXS ön tanısı ile gelen çocuklarda sitogenetik ve moleküler analizler ile hastalık oranını tayin etmek ve her iki analiz arasındaki uyumu göstermek amaçlandı. Çalışma kapsamında incelenen 107 çocuğun, 95'i (%88.8) erkek ve 12'si (%11.2) kız olup bunların, 8'inde (%7.5) X kromozomunda sitogenetik olarak fra X pozitif sonuç alındı. Buna göre; hastalık oranı erkek çocuklarda %4.7 bulunurken kızlarda bu oran %2.8 olarak tespit edildi. Hastaların karyotip analizlerinde; X kromozomu dışında yüksek oranda kromozom düzensizlikleri (frajilite, gapler, kromozom ve kromatid kırıkları) bulundu. Ayrıca, 26 hastada yapılan FMR-1 geninin

moleküler genetik analizleri sonucunda; tüm çocukların CGG tekrar sayılarının normal sayılarda olduğu (21 ile 39 CGG tekrar arasında), premutasyon taşıyıcıları ya da tam mutasyonlu bireylerin bulunmadığı rapor edildi.

Sonuç olarak; çalışmamızdaki sitogenetik fragil X sıklığı (%7.5) ile diğer araştırmacıların sonuçları arasında bir uyumun olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, bu hastalarda otozomal kromozom düzensizliklerinin sıklığı (%13.7) artmakta ve bu oran önem arz etmektedir. FXS taraması, ZGİ çocuklarda klinik açıdan önemli bir kriterdir. Öyküsü bilinmeyen ZGİ, gelişme bozukluğu ve konuşma güçlüğü olan çocuklarda ve ZG aile hikayesi olan hastalarda, FXSna yönelik sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler gereklidir. Böylece, gerekli bireylere uygun genetik danışma verilerek kişinin kendisinin, ailesinin ve gelecek kuşakların hastalık hakkında bilgi sahibi olması sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Zeka Geriliği, FMR-1 geni, Premutasyon, Full mutasyon, FMRP.

ABSTRACT

DETERMINING OF CYTOGENETIC DIFFERENCES AND NUMBER OF FMR 1 GENE TRINUCLEOTIDE REPEATS IN CHILDREN WITH FRAGILE X SYNDROME PREDIAGNOSIS

Fragile X syndrome, which causes mental retardation, is the second most common syndrome after Down syndrome. FMR-1 gene which causes Fragile X syndrome that is localized at Xq27.3 and it is characterized with increase of CGG trinucleotide repeats at its promoter region. Trinucleotide repeats, which are under 50, are accepted as normal while their numbers change in different populations at this region of the gene. Trinucleotide repeats, between 50 and 200, refer to premutation and 200 or higher than 200 refer to full mutation. FMR-1 gene of individuals who have full mutation is inactive and Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) can not be produced. Diagnosis of Fragile X syndrome has been available by means of cytogenetic analysis for many years, however, there have been some problems for cytogenetic diagnosis of the patients; not all cells in affected males show the fragile site, transmitting males have no cytogenetically abnormality, a significant percentage (%50) of carrier females are cytogenetically normal and the distal long arm of the X chromosome contains three folat sensitive fragile sites (FRAXD, FRAXE, FRAXF). But cytogenetic analysis is still be needed to confirm the clinical diagnosis and detect other chromosome abnormalities in the index case in a newly diagnosed fragile X family. For these reasons, alternative methods were pursued in many molecular laboratories during the past decade.

In this study, our goal was to determine the syndrome ratio of children who attended to our clinic with FXS pre-diagnosis using both cytogenetic and molecular analysis methods. In scope of our study, we investigated 107 children 95 (88.8%) of whom were male and 12 (11.2%) of whom were female. Of all subjects investigated, 8 (7.5%) of them had cytogenetically Fra X positive result. According to these findings, syndrome ratio in male children was 4.7% but in female children it was 2.8%. In karyotype analysis of subjects, we have also detected high frequency of chromosomal

abnormalities (fragility, gaps, chromosome and chromatide breaks). Moreover, molecular genetic analysis of FMR 1 gene of 26 subjects showed that the repeat numbers of subjects were in the normal range (21-39 CGG). However, any premutation carriers or subjects with full mutations were not detected.

In conclusion, the cytogenetic fragile X frequency findings in our study are consistent with other researchers' findings. Besides, there is 13.7% increase in autosomal chromosome aberration frequency. This increase, therefore is very significant. FXS screening is clinically very crucial for children with mental retardation. Cytogenetic and molecular genetic investigations to detect FXS is required for mentally retarded children who has unknown MR history, developmental disabilities, speech disorders and MR family history.

Key words: Mental Retardation, FMR-1 gene, Premutation, Fullmutation, FMRP.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Frajl X sendromu (FXS), kalıtsal zeka geriliğinin (ZG) bilinen en sık nedeni olup, etkilenen kişiler zihinsel, davranışsal ve fiziksel bazı farklılıklar gösterir. Bu sendrom, her iki cinsiyeti etkileyebildiği gibi dünyadaki tüm ırk ve etnik grupları da etkiler. Sitogenetik olarak dişilerde yaklaşık 1/3500 ve erkeklerde 1/2500 oranında görülürken, moleküler düzeyde dişilerde 1/6000 ve erkeklerde 1/4000 oranında görülür¹.

FXS'lu hastaların çoğunda ZG, uzun yüz, büyük dışa çıkık kulaklar ve büyük testisin bulunduğu tipik Martin-Bell fenotipi görülür. FXS, X kromozomunun uzun kolunun ucunda (Xq27.3'de) yer alan frajl bölge ile ilişkilidir. Özel kültür şartlarında frajl bölgenin sitogenetik görünümü mümkün olmaktadır. Buna rağmen, frajl bölgenin görülme oranı metafaz kromozomlarında %50'den azdır². Frajl nokta değerlendirilen her metafazda görülmemektedir. Bu bölgede yer alan folik asit yokluğuna duyarlı diğer frajl bölgeler (FRAXD, FRAXE ve FRAXF), sitogenetik tanıyı güçleştirmektedir. Aynı zamanda, premutasyon taşıyıcılarında sitogenetik inceleme yetersiz kalmaktadır. Frajl bölgenin oluşumuyla ilgili olarak ileri sürülen hipoteze göre, uyarılan kültür şartlarında frajl bölgenin çoğalması güçleşmekte ve bu dizideki DNA eksik olarak kopya edilmektedir. Bunun sonucunda; kromatinin yoğunlaşması lokal olarak zarar görmekte ve sitogenetik frajl bölge ortaya çıkmaktadır³. Başlangıçta, hastalığın X bağlantılı Mendeliyen kalıtım gösterdiği ileri sürülmüştür. Ancak, frajl X pedigrilerinin detaylı analizi sonucu hastalığın kalıtımının basit Mendeliyen kalıtımı ile uyuşmadığı görülmüştür. Çünkü, bu hastalıkta X'e bağlı kalıtımın aksine kadın ve erkek her ikisi de taşıyıcıdır.

Sitogenetik analiz yerine günümüzde artık moleküler DNA analizi kullanılmaktadır. Çünkü, kesin tanı moleküler analizlerle konmaktadır. Normal bireylerde, Xq27.3 bandında yer alan FMR 1 geninin 5' ucunun I. ekzonunda 6 ila 54 CGG (sitozin, guanin, guanin) üçlü nükleotid dizisi bulunur. Bazı bireylerde bu sayı, 50-200 arasındadır, premutasyona sahip taşıyıcı olan bu bireylerin zeka ve fenotipleri normaldir. Premutasyon, sonraki kuşaklara geçerken tam mutasyona dönüşüm riski yüksek olduğu için önemlidir. Tam mutasyonda, CGG tekrar sayısı 200'den fazla olup, 1000 ya da 2000'e kadar çıkabilmektedir. Bu kişiler, hastalık fenotipini tam olarak gösterirler. Mozaik vakalarda, zigot oluştuktan sonra premutasyonlu halde bulunan hücrelerden bir kısmı mitoz sırasında kararsız hale geçer ise tam mutasyon gelişebilir. Bu bireylerin fenotipleri hafif seyreder. Üçlü tekrar sayısı, 200'den büyük (CGG>200) olduğu durumda sitogenetik olarak frajl bölge gözlenebilmektedir.

FXS tanısı koymak önemlidir bu sayede, hastalıktan etkilenen çocukların risk altındaki akrabaları; genetik danışmanlık, taşıyıcı testi ve doğum öncesi tanı hizmetlerinden yararlanabilir. Aynı zamanda etkilenmiş çocuklar, eğitim, konuşma, dil gelişimi ve davranış gibi alanlarda uzman yardımı alabilirler. Yetişkinlerde ise FXS tanısı, bu kişilerin karşılaştıkları belirli sorunların anlaşılmasına ve yönetilmesine yardımcı olabilir.

Bu nedenle çalışmamızda; FXS ön tanısı ile gelen çocuklarda sitogenetik ve moleküler genetik analizler ile hastalık oranını tayin etmek ve her iki analiz arasındaki uyumun gösterilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİ

2.1. TARİHÇE

İlk olarak, 1938 yılında Penrose, kadınlarla karşılaştırıldığında erkeklerdeki artmış zeka geriliği yoğunluğuna dikkat çekmiştir. 1943 yılında Martin ve Bell adlı araştırmacılar, X'e bağlı kalıtım gösteren zeka geriliğine dikkat çektiler. Martin ve Bell, etkilenmiş erkek çocukların dedelerinin etkilenmemiş olmasında bazı baskılayıcı faktörlerin olabileceği hipotezini öne sürdüler. İlk kez 1969'da Lubs, üç kuşakta etkilenmiş kişileri gösteren bir ailede, X kromozomunun uzun kolunun ucunda, frajil noktaya dikkat çekti, bu kromozoma "marker kromozom" adını verdi ve X'e bağlı zihinsel geriliğe, bu bölgenin ya da bu bölgeye bağlı çekinik bir genin neden olduğunu ileri sürdü.

Sutherland (1977) çalışmalarında; daha iyi bant elde etmek için medium 199 yerine F-10 kültür medyumunu kullandığında, frajil X kromozomunu gösterememesi onun folatın kritik rolünü keşfetmesine yol açtı⁴. Sutherland ve arkadaşları, folat yokluğunda eksprese olan frajil bölgeyi Xq27.3-q28 bölgesi olarak belirlediler. Glover (1981), Tommerup ve arkadaşları (1981) normal folik asit düzeyli medyuma fluorodeoksiuridin (FUdR) eklenmesi ile frajil noktanın ekspresyonunun arttığını gösterdiler. Blomquist ve arkadaşları (1982) normal kültürlerle metataraksat (MTX) ilavesi ile de aynı etkinin gözlemlendiğini bildirdiler. 1983'te, restriksiyon uzunluk polimorfizm (RFLP) analizleri ile başlayan DNA incelemeleri frajil X ile G6PD ve hemofili B arasında yakın bir bağlantı olduğu gösterildi. Oberle ve arkadaşları (1991) RFLP analizlerinde en bilgi verici markerın St14 probu olduğunu bildirdiler. 1988'de Thibodeau ve arkadaşları DXS51, F9, DXS98 ve DXS52 markerları ile frajil X bölgesi arasında bağlantı olduğunu gösterdiler.

Fryns (1982 ve 1984), frajil X bölgesinin, normal erkekler tarafından aktarıldığını gösterdi. Johnson ve arkadaşları ise (1991) aynı şekilde geniş bir ailede normal erkeklerden kalıtılan, frajil X sendromlu kişiler bildirdiler. 1991 yılında Poustka ve arkadaşları, Xq27.3 bölgesinden telomere kadar olan bölgeyi kapsayan, 12Mb büyüklüğündeki fiziksel haritayı tanımladılar. Aynı yıl Yu ve arkadaşları, frajil bölgeyi içeren iki prob hazırlayarak YAC (Yeast Artificial Chromosome) kütüphanesini taradılar. Frajil bölgeyi ve muhtemelen ilgili geni içerdiğini düşündükleri, 275kb uzunluğundaki insan DNA'sını içeren YAC'ı izole ettiler ve geni 15kb'lık bir dizide saptadılar. Buradan elde ettikleri 15kb'lık bölgeyi, Eco RI ile kestikten sonra elde ettikleri 5kb'lık DNA parçasını izole ettiler. Bu parçayı, işaretleyip prob olarak kullanarak frajil X'li kişilerde DNA dizisindeki yeniden düzenlenmeleri gösterdiler. Bu

yeniden düzenlenmelerde, araştırma yapılan dizinin boyunda artmalar olduğunu ve aile içindeki bireyler arasında da boyutlarda farklılıklar olduğunu gösterdiler. Oberle ve arkadaşları (1991) da aynı yıl, metilasyonun muhtemelen CpG adasında olduğunu ve bunun CpG adasının ait olduğu genin ürününde eksikliğe yol açtığı ve böylece hastalık fenotipinin ortaya çıktığını ileri sürdüler. İki proba (StB12.3, F33) yaptıkları çalışmada, bu CpG adasının fragil bölgenin içinde ya da çok yakınında olduğunu gösterdiler. DNA'daki değişikliklerin, 550bç'lik zengin GC içeren bölgede olduğunu açıkladılar⁵. Fenotipik olarak normal olan taşıyıcı erkeklerde, 150-500bç uzunluğu olduğunu ve bunların bu parça uzunluğunu kızlarına hiç değişmeden veya çok küçük değişikliklerle kalıttığını bildirdiler. Aynı şekilde, Vincent ve arkadaşları (1991) ile Bell ve arkadaşları (1991) da fragil X geni yakınlarında DNA metilasyonunda artış olduğunu ve bu bölgelerde tekrarlayan CpG adacıkları olduğunu gösterdiler.

Verkerk ve arkadaşları 1991 de, ilk kez FMR 1 geninin cDNA'sını pozisyonel klonlama ile izole ettiler ve fragil bölge mental retardasyon (FMR 1) terimini kullandılar. Richard ve Sutherland (1992) yaptıkları çalışmada, fragil X sendromunda CGG tekrar sayısı artışı, Kennedy hastalığı ile miyotonik distrofide ise AGC tekrarları olduğunu ve bunların "dinamik mutasyon" özelliği taşıdığını açıkladılar. Eichler ve arkadaşları (1993), ekzon-ekzon PCR restriksiyon analizi ile FMR 1 geninin toplam 38kb'lık 17 ekzon'dan oluştuğunu ve dizileme çalışmaları ile de ekzon-intron sınırlarını belirlediler. Ayrıca, FMR 1'de alternatif kırılma görülebileceğine dikkat çektiler. Ashley ve arkadaşları (1993) ise sıçanda insan FMR 1 genine homolog gen bölgesini tanımladılar ve cDNA'sını izole ettiler.

2.2. FRAJİL X SENDROMUNUN GENETİĞİ

Frajil X sendromundan sorumlu olan gen, X kromozomu üzerinde yer aldığı halde bu sendromun kalıtımı klasik X'e bağlı kalıtım modeline uymamakta ve çok özgün karakterler göstermektedir. Sherman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (1985); fragil X sendromlu bireylerin ailelerinde yapılan pedigrî analizlerinde hastalığın, görülme oranları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Klinik olarak etkilenmiş ve sitogenetik olarak pozitif erkek olguların annelerinin ve babalarının fenotipleri ve sitogenetik sonuçları normal bulundu. Normal taşıyıcı erkek (NTE) olarak isimlendirilen bu erkeklerin erkek çocukları normal iken, kızların erkek çocuklarının %79'unda ve erkek kardeşlerinde %18 oranında hastalık riski olduğu bildirildi. Bu durum, Opitz (1986) tarafından "Sherman paradoksu" olarak tanımlandı. Sherman ve arkadaşlarının (1988) yaptıkları diğer bir çalışma sonuçlarına göre; fragil X

taşıyıcısı annelerin fenotipine bağlı olarak da zeka geriliği risklerinin değiştiği, zeka gerili bir taşıyıcının oğlunun zeka geriliği olma olasılığının %50, buna karşın kız çocuklarının hastalık riskinin %28, normal taşıyıcı kadınların erkek çocuklarının hasta olma olasılığının %38 ve kız çocukları için riskin %16 olduğu bildirildi.

Frajl X geninin moleküler yapısının belirlenmesi ile "Sherman Paradoksu" aydınlanmış oldu. Frajl X mutant genini taşıyan kızlar ve anneleri, sağlam bir X kromozomları olduğundan hastalıktan erkekler kadar etkilenmezler. Ancak, sağlam X kromozomunun rastgele inaktivasyonuna bağlı olarak, yaklaşık üçte birinde öğrenme güçlükleri, zeka geriliği, davranış bozuklukları ve otistik benzeri semptomlar görülmektedir. Bu sendromun etkileri her kuşakta artarak devam etmektedir. Vakaların büyük bir kısmında frajl X sendromu, "FMR 1" (Frajl X Mental Retardasyon 1) olarak adlandırılan genin I. ekzonunun ifade edilmeyen 5'ucundaki CGG tekrarının artışı ile oluşmaktadır⁶. FMR 1 geni, içinde 17 ekzonu olan yaklaşık 38kb'lık bir bölgeyi kapsar. Tekrar sayısı 200 kopyanın üzerinde olduğu zaman FMR 1 mRNA düzeyleri ve protein ifadesi azalır veya hiç olmaz. Gen ifadesindeki bu değişim, FMR 1 geninin 5' ucundaki 5'-CpG-3' dinükleotidlerindeki sitozinlerin metilasyonu ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalar sonucunda; FMR 1 gen ürünü olan FMRP'nin (Frajl X Mental Retardasyon Proteini) bir RNA bağlanma proteini olduğu belirlenmiştir. FMRP sitoplazmada lokalize olan bir proteindir⁷. Northern analiziyle, genin insan dokularının çoğunda beyin, testis, plasenta, akciğer, böbrek ve kalpte eksprese olduğu gösterilmiştir. Frajl X sendromunda, FMR 1 genindeki hasarların içinde, delesyonlar ve nokta mutasyonları da hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Bu şekilde, etkilenen bireylerin hücrelerinde FRAXA bölgesinde tekrar artışı ve metilasyon olmadığından sitogenetik frajl bölge ifade edilemez. Nadir gözlenen delesyonlar ve nokta mutasyonları, moleküler genetik yöntemler ile belirlenir. Sendrom, de novo olarak da ortaya çıkabilmektedir.

Frajl X sendromunun prenatal tanısı, taşıyıcı tayini ve klinik tanısında uygulanan DNA testi kısa sürede yapılabilmesi ve ekonomik oluşu nedeniyle sitogenetik testten daha kullanışlıdır. Ayrıca, sitogenetik teste göre daha güvenilir, çünkü taşıyıcılarda ve nadiren, CGG sayısının artmasına rağmen metilasyonun olmadığı etkilenmiş bireylerde sitogenetik anomali görülmez. Böyle kişiler ancak DNA testi ile belirlenebilir⁸. Frajl X'in moleküler tanısı PCR ve Southern blot ile yapılmaktadır. PCR ile normal ve premutasyonlu bireyler, Southern blot ile premutasyonlu ve full mutasyonlu bireyler belirlenmektedir. Southern blot özellikle tam mutasyonların tayini için zorunlu olan bir metoddur. FMR 1 geninin 5' ucunda bulunan CpG adasının DNA metilasyon analizi, doğum sonrası teşhiste ilave bir analiz olup

FMR 1 geninin baskılanmasını belirlemeye yardımcı olur. Bu durum tam mutasyonlularda meydana gelir.

Frajil X sendromu için özgül bir tedavi yoktur. Ancak, tıbbi tedavi konuşma tedavisi, özel eğitim, uğraşı tedavisi ve spor çalışmaları gibi uygulamalar hastalığın semptomlarını hafifletir. Yaygın olarak yapılan aile testleri ve genetik danışmanlık bu hastalığın sıklığının azaltılması için gereklidir.

2.3. GÖRÜLME SIKLIĞI

X'e bağlı zeka geriliği içinde %40 ile ilk sırada yer alan bu sendromun yoğunluğu 1982 yılında, sitogenetik analiz sonuçlarına dayanılarak, erkeklerde 0.5/1000 olarak bildirilmiştir. Demirhan ve arkadaşları (2003) bölgemizde, zeka geriliği olan çocuklarda yaptıkları sitogenetik analiz sonuçlarına göre frajil X oranını %11.7 olarak bildirmişlerdir⁴¹. 1996 yılında, moleküler verilerle yapılan bir çalışmada ise prevalansın erkeklerde 1:4000, kadınlarda 1:6000 olduğu bildirildi. Bu çalışmalardan, sitogenetik olarak pozitif tanı alan olguların yarısı moleküler tanı yöntemlerle doğrulanmakta olduğu ortaya çıkmaktadır. Rastgele seçilmiş bireylerde yapılan moleküler bir çalışmada, frajil X geni premutasyon prevalansı erkeklerde 1:500 ve kadınlarda 1:250 olarak gösterilmiştir⁹. Rastgele seçilmiş 3458 yeni doğanda frajil X gösterilemezken, zeka gerili olgularda sıklığı %1-2 oranında, özel eğitim alan zeka geriliği olan olgularda %3-5, otistik çocuklarda ise %10 oranında bulunmuştur. FMR 1 geninde, frajil bölge tekrarlarının kararlılığında rol aldığına inanılan AGG üçlüsü, normalde polimorfiktir. Bu üçlü, CGG tekrarlarını birkaç kez kesintiye uğrattığı, üçlünün yokluğu ise CGG tekrar artışına eğilimi arttırdığı görüşü yaygın olarak kabul görmektedir. Dünyanın çeşitli bölgelerine ait 9 farklı popülasyonda otomatik DNA dizileme işlemi ile 345 kromozomun CGG tekrar uzunluklarıyla ilgili yapılan bir çalışmada, FMR 1'in bu bölgesinin oldukça heterojen olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, Amerikan allellerinin 7000 yıl boyunca 3 adet AGG tekrarını koruduğu, Afrika yerlilerinin AGG tekrarlarını genelde kaybetmelerine rağmen CGG tekrarlarının yapısının stabil kaldığı bulunmuştur.

2.4. KLİNİK BULGULAR

Zeka geriliği, belirgin kulaklar, uzun ince bir yüz, davranış bozuklukları, pubertal dönemden itibaren makroorşidizm ile karakterize bu sendrom, olguların dişi veya erkek oluşu erkeklerin premutasyon veya tam mutasyon taşımaları ile yeni doğan, ergenlik öncesi ya da sonrası dönemde bulunmalarına göre klinik bulgular açısından değişkenlik gösterir. Mozaik

ya da tam mutasyon taşıyıcısı erkek hastaların tümünde zeka geriliği söz konusudur. Frajil X sendromunun yeni doğan dönemde tanısı çok zordur. Bu olguların, doğum kilosunun normal kardeşlerine göre daha fazla ve baş çevresinin normalin üstünde olduğu bildirilmektedir¹⁰. Göz etrafındaki şişlik ve hipotoni en önemli diğer bulgulardır. Ayrıca, frajil X yenidoğanların yarık dudak, yumru ayak, doğumsal kalça çıkığı ve fıtık için artmış riskleri olduğu ve bu bulguların frajil X sendromundaki bağ dokusu displazisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Fryns ve arkadaşları (1988), apne ve solunum güçlüğünün yol açtığı ani bebek ölümlerinin sık olduğunu bildirmişlerdir. Frajil X pozitif bebeklerin çoğunda sinirlilik, kucağa alınmaya-dokunmaya karşı aşırı hassasiyet ve beslenme güçlüğü olduğu gözlenmiştir.

Ergenlik öncesi erkeklerin fizik muayenesinde en dikkat çekici özellik dengesiz olmayan belirgin ya da büyük kulaklar, her yaştaki frajil X erkeklerin yaklaşık %80'inde görülür fakat, kulak genişliği tanıda daha sağlıklı sonuç verir ve anti helikal kıvrımın kaybolması ile bir çukurlaşma söz konusudur. Uzun ve dar yüz puberte öncesi bireylerde nadiren görülür. Metakarpoflangeal eklemlerde hiperekstansibilite sık rastlanılan (%60) diğer bir bulgudur. Genellikle tüm ligamentlerde anormal bir gevşeklik bulunabilir. Düztabanlılık olguların %50'sinden fazlasında ve göğüsteki hafif bir pektus ekskavatus deformitesi ise %43 oranında görülür. Deri biyopsilerinin mikroskopik incelemesinde anormal elastin fibril yapılarına rastlanmıştır.

Ergenlik öncesi dönemdeki çocukların 1/3'ünde testis hacmi normalden fazladır. Prepubertal erkeklerde anlamlı bir makroorşidizmden bahsedilebilmek için testis hacminin 4 ml'den fazla olması gerekir. Frajil X sendromunun, epilepsi hastalarının %20'sinde gözlenmesine rağmen, nedeni henüz kesin olarak bilinmemektedir. Serebellar vermis'deki hasarın olgularda yaygın olarak görülmesinin etiyolojisinin de etken olabileceği varsayılmaktadır. Ayrıca, serebellumdaki başlıca nörotransmitter olan gamaaminobutirik asitin (GABA) reseptör alt ünitesi geninin, Xq27.3'deki frajil bölgeye yakın olarak bulunması ve bazı epilepsilerin patofizyolojisinde GABA nöronlarının baskılanma eksikliğinin bulunması, frajil X mutasyonunun GABA reseptör alt ünite geninin fonksiyonunu da etkilediğini düşündürmektedir.

Okul öncesi dönemlerde daha hafif olan zeka geriliği ergenlik ve sonrasında belirginleşir. Etkilenmiş erkeklerde zeka düzeyleri, öğrenme güçlüğü olan normal zeka düzeyinden ağır zeka geriliklerine kadar çeşitlilik gösterir. Rousseau ve arkadaşlarının (1994) 274 tam mutasyon taşıyıcısı erkekte yaptıkları çalışmada olguların %87'sinde orta-ağır derecede zeka geriliği olduğu gözlenmiştir.

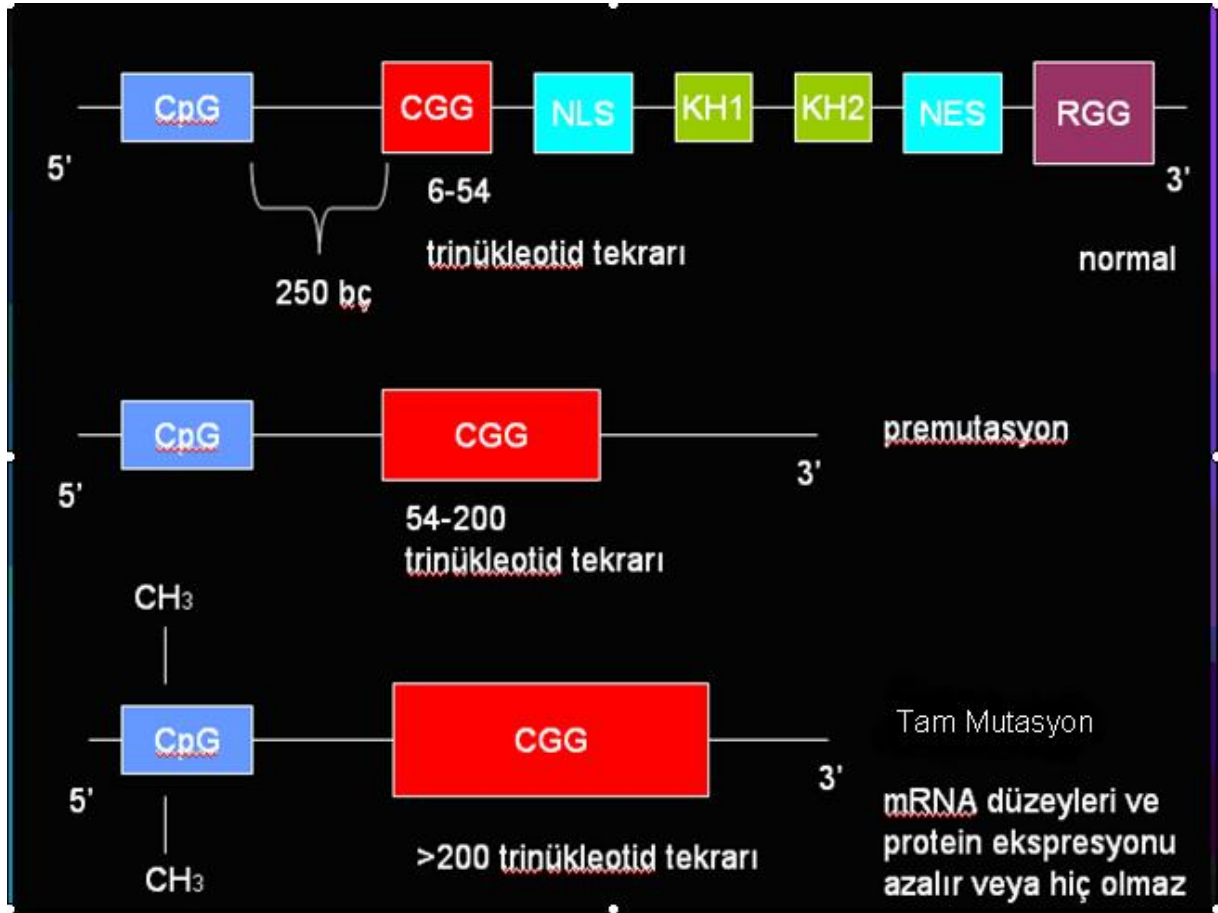
Fiziksel bulgulara oranla davranış bulguları ergenlik öncesi dönemde tanıda daha yardımcıdır. İki yaş civarı çocuklarda konuşma geriliği ve hiperaktivite dikkat çeker ve aileler genellikle bu nedenle doktora başvururlar. Hiperaktivite daha çok ergenlik döneme ait bir bulgudur ve ilerleyen yaşla azalır. Konuşma; zorlayıcı, dağınık, tekrarlayıcı, kekeleyerek ve patlayıcı bir tarzdadır. Dokunmaya aşırı duyarlılık, dikkat süresi azlığı, huzursuzluk, zayıf göz kontağı, çekingenlik, sosyal uyumsuzluk, ağlarken ya da sinirlendiğinde el ısırma, el çırpma, utanma ve stereotipik hareketler gibi otistik bulgular yaygındır. Otistik bulgular, pubertal erkeklerin önemli bir kısmında olmasına rağmen otizm, frajil X erkeklerin yaklaşık %16'sında görülür. Buna karşın, otistik erkeklerde yapılan frajil X sendromu taramasında, sendrom %10 oranında saptanmıştır. Demirhan ve arkadaşları (2003) bölgemizde, zeka geriliği olan çocuklarda yaptıkları sitogenetik analiz sonuçlarına göre frajil X oranını %11.7 olarak bildirmişlerdir⁴¹. Bu nedenle, etiyojisi bilinmeyen otizm veya zeka geriliği olgularının frajil X sendromu açısından değerlendirilmeleri önerilmektedir.

Prepubertede gözlenen fiziksel bulgular bu dönemde daha da belirginleşir¹¹. Kulaklar büyük, alın yüksek, çene belirgin ve yüz görünümü ince, uzun ve dardır. Büyük belirgin kulaklar ve olguların %80'inde büyük testisler gözlenir. Büyük testisler, postpubertal dönemde testiküler hacmin 30 ml'den daha fazla olması ile tanımlanır. Tipik olarak, yetişkin frajil X erkeklerin testis hacmi 50-60 ml olmasına rağmen 100 ml'lik testis hacmine sahip hastalarda bildirilmiştir. Büyük testisler, bu sendromda sıklıkla görülmekle birlikte özgün bir bulgu değildir. Araştırmalar, zeka geriliği olan erkeklerde büyük testisler sıklığı %29 gibi yüksek bir oranda olduğunu ve büyük testisli erkeklerin sadece %4-27'sinin frajil X pozitif olduğunu göstermiştir. Belirgin zeka geriliği olan frajil X sendromlu erkekler nadiren çocuk sahibi olurlar. Makroorşidiye, ikincil gelişen spermatogenezde azalma, bozuk spermatitlerin artışı ise fertilitenin azalmasına yol açmaktadır. On sekiz yaşın üzerindeki hastaların %80'inde mitral valf prolapsusu ve %18-52'sinde progresif olmayan hafif aort kökü dilatasyonu vardır. Bu bulgular, bağ dokusu displazisi ve anormal elastin yapısı ile açıklanmaktadır. Zeka gerilik ve öğrenme güçlüğü bu dönemde daha da belirginleşmiştir ve etkilenmiş olguların IQ değerleri değişkenlik gösterir. Postpubertal dönemde hiperaktivite azaldığı için frajil X'li hastalar daha sakinler. Konuşma bozukluğu ve otistik davranışlar bu dönemde de gözlenir. Premutasyon taşıyıcısı erkekler normal zeka düzeyine sahip olup klinik bulgu göstermezler.

2.5. FRAJİL X SENDROMU'NUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Son yıllardaki bulgular ile insan gen hastalıklarına neden olan, tekrarlayan üçlü tekrar dizilerine sahip olan genlerin, sadece mayozda değil aynı zamanda mitoz sırasında da yüksek düzeyde kararsız olduğu belirlenmiştir. Bu tekrarlayan dizilerin çok sayıda artması dominant bir mutasyonla oluşur. Frajil X sendromu, Huntington ve Miyotonik distrofi bu tip mutasyona en iyi örneklerdir¹².

Frajil X geninin yerinin tam olarak belirlenmesi, birkaç laboratuvarın çalışması ve birçok denemeden sonra, 1991'de yapılmıştır. Mandel ve Davies'in laboratuvarında, bağımsız olarak klonlanan bir bölgenin frajil bölge içinde yer aldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, yapay maya kromozomlarını (YAC) kullanarak X kromozomu üzerinde frajil bölge ve iki yanındaki komşu bölgeleri de içine alan yaklaşık 270 kb'lık bir bölgeyi klonlamışlardır. CpG adasının olduğu bölge sıklıkla bir promotorun varlığını ortaya koymakta ve genellikle eksprese olan gen dizisinin yanında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, DNA'nın CpG bölgesinin etkilenmiş frajil X erkeklerde, çok fazla metillenmiş olduğunu fakat normal etkilenmemiş erkeklerde metillenme olmadığını gösterdi. Oostra, Nelson ve Warren'ın grupları ortaklaşa çalışarak, frajil X genini klonlamayı başardılar. Gen, FMR 1 olarak adlandırıldı. X kromozomuyla ilgili, frajiliteye ve zeka geriliğine yol açan ilk gen olduğu için bu gen FMR 1 olarak adlandırılmıştır^{12,13}.



Şekil 1. FMR 1 geninin yapısı

FMR 1 geni, içinde 17 ekzonu olan yaklaşık 38 kb'lık bir bölgedir. CGG tekrar bölgesi, genin 1. ekzonu içinde ve CpG adasının 250 bç aşağısındadır. Bu bölge, fragil X sendromlularda anormal olarak metillenmiş olup FMR 1 geninin promotörü olarak görev yapmaktadır. FMR 1 genindeki CpG adasının metilasyonu, genin inaktive olmasına neden olmaktadır¹⁴. Genel olarak DNA metilasyonu, X inaktivasyonunda ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. FMR 1 'de dikkate değer birçok özellik vardır. Çoğunlukla, CGG içeren değişik sayıdaki üçlü nükleotid tekrarları 5' uca yakın başlar. Bu tekrar bölgesinin genişlemiş hali etkilenmiş erkek ve kadınlarda bulunur. Translasyonun başladığı bölge CGG tekrar bölgesinin 69 bç aşağısında yer alır.

FMR 1 geninin çok sayıda türün yapısında, yüksek düzeyde korunduğu bulunmuştur. Bunu; insan cDNA'sı, yuvarlak solucan (*Caenorhabditis elegans*), maya (*Saccharomyces cerevisiae*), tavuk, tavşan, hamster, sığır, domuz, maymun, goril ve şempanzelerden elde edilen genomik DNA'lar ile yapılan hibridizasyon çalışmaları açıkça göstermektedir. FMR 1 geni, sitoplazma ve nükleus arasında harekete karıştığı belirlenen çekirdek translokasyon sinyali için bir konsensüs dizisine (KKXK) sahiptir¹⁵. Genin hücre sitoplazması ve nükleus

arasında RNA translokasyonu ile ilgili olabileceği belirlenmiştir. Başlangıçta genin yapısı, fonksiyonu ve bilinen bir gen ile ilişkisi olup olmadığı bilinmiyordu. Birkaç yıl sonra, FMR 1 geni proteininin (FMRP), bazı KH domainleri ve RGG kutularına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu diziler, RNA'ya bağlanma bölgeleri olarak tanımlanmaktadır. Ashley ve Warren (1995) adlı araştırmacılar izole ettikleri proteinin kendi mRNA'sı da dahil olmak üzere beyin mRNA'sının %4'üne bağlandığını göstermişlerdir¹⁶.

Erişkin bir omurgalı hücresinin genomunda, CpG dinükleotidlerindeki sitozinlerin (C) %60-90'ı DNA metiltransferaz tarafından metillenmiştir. DNA metilasyonu, gen aktivitesini düzenlemektedir. Bundan başka DNA metilasyonu, X inaktivasyonu ve farklılaşmada rol oynar. DNA metilasyonu için öne sürülen ilginç bir görüşe göre; metilasyon yer değiştirebilen elementler gibi genomik parazitlere karşı genomu korumak için metazoalarda bir savunma mekanizması olarak geliştirilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Drosophila melanogaster*'in genomlarında CpG metillenmesinin hiç olmadığı ve onların yaşamlarını metilasyon olmadan devam ettirdikleri belirlenmiştir. DNA metilasyonuna bağlı gen düzenlenmesi, hücre bölünmesi veya metazoaların gelişiminde esas olarak zorunlu değildir. Çünkü, bu organizmalarda diğer gen düzenleme mekanizmaları DNA metilasyonu eksikliğini telafi etmektedir.

Farelerde; primordial germ hücreleri, embriyonal kök hücreleri ve blastosistlerde, aynı şekilde hücre siklusu ve bölünmesi sırasında metilasyonun olmadığı belirlenmiştir. Bununla beraber, embriyonik kök hücreleri ilk kez farklılaşmaya başladığında normal DNA metilasyon düzeyleri, hücrenin yaşamı için zorunludur. CpG ikili nükleotidlerinin *de novo* metilasyonu düzenlenmiş bir işlemdir. Embriyoda, normal DNA metilasyon düzeyleri, gastrulasyon sonrası gelişim için gereklidir, DNA metilasyonunun, memeli embriyonik germ hücrelerinin yaşam sürecinde önemli bir rolünün olmadığını, fakat somatik hücrelerin farklılaşmasında önemli bir role sahip olduğunu öne sürmüştür. Omurgalılar gibi kompleks organizmalar, çok sayıda dokuya özgü genler içerir. DNA metilasyonu, bu genlerin sürekli olarak ifadesini engellemek için mekanizmalar sağlar.

Frajl X sendromunun patogenezinde, FMR 1 promotorunun hipermetilasyonunun kritik rolünü belirlemek amacıyla, erkek frajl X hastaları lenfoblastoid hücre dizilerinde *in vitro* bir çalışmada; 5-azadeoksisitidin (5-azadC) kullanılarak hipermetillenmiş FMR 1 gen bölgesi demetile edilerek yeniden aktive edilmiş ve spesifik mRNA ve protein ürünü gösterilmiştir¹⁷. Ayrıca, promotorun demetile olup olmadığı metilasyona duyarlı enzimler ile yapılan restriksiyon analiziyle de belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, tam mutasyonlu

fakat metillenmemiş FMR 1 genine sahip IQ düzeyleri normal olan erkekler için de önemli bir açıklama getirmiştir.

Tekrar sayısı 230 civarında iken, büyüme bölgesinden yukarıda bulunan CpG adası ve büyüme bölgesi hipermetilasyona uğramaktadır. Hipermetilasyon, çok sayıda tekrar içeren FMR l'in baskılanmasına ve DNA'nın metile duyarlı restriksiyon enziminden korunmasına yol açmaktadır. Kopya sayısının saptanması ve gen aktivitesinin bir belirteci olan metilasyonun çalışılması ile fenotip belirlenebilmektedir. CGG tekrar sayısı kritik bir kopya sayısından sonra kararlılığını kaybetmektedir. Kopya sayısı, ebeveynden çocuğa geçerken değişmektedir. Bu değişkenliği tanımlamak için kullanılan "Dinamik Mutasyon" terimi, ilk mutasyonun gelecekte başka değişimlerin kaynağı olduğunu anlatmaktadır. Normal kopya sayısından tam mutasyona değişim, klasik mutasyonlardaki tek aşamalı olayın tersine çok aşamalı bir süreçle oluşmaktadır.

Frajl X sendromuna neden olan CGG tekrar sayısı artışlarındaki mekanizma, bu güne kadar tam olarak anlaşılamamıştır. CGG tekrar sayısındaki artışın bir sonucu olarak anormal metilasyon, embriyogenezin ilk aşamalarında olmaktadır ve FMR 1 geninin transkripsiyonunu baskılamaktadır^{17,18}. Tam mutasyonlu frajl X hastalarının artmış CGG sekanslarında somatik mozaizizm Southern Blot ile gösterilmektedir. Bu durum, lokusun tek bir dokuda da olsa farklı uzunluklarda polimorfik yapılara sahip olabileceğini gösterir. Aynı şekilde, farklı dokular arasında da mozaizizm gözlenmiştir. Kararsızlıkta, iki mozaizizm tipi ortaya çıkar. Birincisi, mutasyonal mozaizizmdir; bazı hücreler tam mutasyonlu olup metillenmiştir, bazı hücreler ise premutasyonlu olup metillenmemişlerdir. Böylesi kişilerin fenotipi, mutasyonun tuttuğu doku tipine bağlı olarak değişmektedir. Mutasyonal mozaizizmlerin bazı nadir tipleri normal sayıda kopya içermektedir. İkinci tip ise, metilasyon mozaizizmdir; kopya sayısı tipik tam mutasyon gibidir ancak, bütün hücrelerde metilasyon yoktur. Bu mutasyon tipi oldukça nadirdir. Genelde, tam mutasyon düzeyinde CGG tekrar sayısına sahip olmaktadır. Bu olgulara, gende metillenme olmadığından yüksek fonksiyonlu erkekler adı verilmiştir. Bu durum, tam mutasyona rağmen FMRP 1 proteininin ekspresyonunu açıklamaktadır. Frajl X sendromunun özelliklerinden birisi de mutasyonal homojenite göstermesidir.

Frajl X sendromu olgularının %95'inde rastlanan mutasyon şekli genin 5' ucunda bulunan üçlü CGG tekrarlarında meydana gelen sayısal artış mutasyonudur. Dinamik mutasyon şeklinde oluşan artış, en az 2 kuşak boyunca sürmekte ve kritik değerin üstüne çıktığında gende ve promotor bölgedeki CpG adasında hipermetilasyona neden olmaktadır. Tekrar sayısındaki artış, kadınlardan çocuklarına geçerken oluşmakta, erkekten çocuklarına

geçerken ya çok küçük düzeyde ya da hiç olmamaktadır. CGG tekrar sayısının normalde kararlı olduğu (5-55), kararlılığın bozulması ile artışın başladığı ve en az iki kuşak sonrası 200 tekrara ulaştığında hastalık fenotipinin ortaya çıktığı görülmektedir. 52-200 tekrar arasına premutasyon, 200'den büyük sayıdaki tekrarlara da tam mutasyon adı verilmektedir.

Mutasyon mekanizması hakkında çoğalma kayma teorisi ileri sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre; çoğalan zincir, CGG bölgesinin çoğalması sırasında belli bir artıştan sonra, bir loop oluşturarak aynı bölgeyi tekrar çoğaltmaktadır. Tipik frajil X fenotipi gösteren bir olgu, folatsız kültür ortamında sitogenetik olarak incelenmiş ancak frajil bölge gözlenememiştir. Bu olguda, yapılan mutasyon analizi çalışmaları, T-A transversiyonu ile kodon 367'deki ATT'nin, AAT'ye dönüştüğü göstermiştir. Frajil X açısından hiç bir fenotipik bulgusu ve zeka problemi olmayan anne, kardeş ve yeğenlerde bu mutasyona rastlanmamıştır. Bu vaka allelik varyant olarak değerlendirilmiştir. Bir bç'lik kayıp ve iki bç'lik değişim gözlenen, iki ayrı olguda da FMRP'de fonksiyon kaybı olduğu ortaya konulmuştur. Bir bç'lik kayıp gözlenen hastada CGG tekrar sayısı 25 olarak bulunmuş, yapılan mutasyon analizi çalışmaları ile ekzon 5'de +373 pozisyonundaki A bazının yok olduğu, okuma kalıbının kayması ile de transkripsiyonun erken sonlandırıldığı anlaşılmıştır. İki bç'lik değişim içeren bir mutasyon, ileri yaştaki frajil X fenotipli bir erkek hastada gösterilmiştir. Bu mutasyon ekzon 2'de meydana gelen (GG-TA değişimi) kırılma yerinin değişmesine sebep olmuş, RT-PCR analizi ile çerçeve kaymasına neden olan bir mutasyon olduğu ve 2. ekzondaki aminoasitlerin bir bölümünün üründe kaybolduğu anlaşılmıştır.

2.5.1. FMR 1 GENİ ve FRAJİL X MENTAL RETARDASYON PROTEİNİ (FMRP)

Yaklaşık, 38 kb'lık 17 ekzon içeren FMR 1 geni, 4.4 kb'lık bir mRNA kodlar ve bu mRNA 70 kDa'luk proteini sentezler¹⁹. Ashley ve arkadaşları (1993), sıçanda insan FMR 1 genine homolog gen bölgesini tanımladılar ve cDNA'yı izole ettiler. Homolog CGG tekrarı dahil, çok büyük bir dizi benzerliği gösterdiğini gözlemlediler. İnsan ve fare beyinde yaptıkları çalışmada, FMR 1 geninde alternatif kesilmeler saptadılar ve bunların bir tanesinde proteinin karboksil terminal ucunda, bir yapı değişimi gözlemlediler. Başka bir çalışmada, FMR 1 proteinindeki ribonükleoprotein domainini tanımlandı ve RNA'nın bu domainine sitokiyometrik oranlarda bağlandı gösterildi. Bu çalışmada, FMR 1 proteininin molekül başına iki RNA bağlama bölgesinin olduğu ve FMRP'nin kendine özgü mesaj varlığında, hedefi olan RNA'ya yüksek ilgi ile bağlandığı gösterildi.

FMR 1 proteininin amino asit dizisindeki bazı motifler ile daha önceden tanımlanmış olan hnRNP K proteinindeki KH domaini ve hnRNP U proteinindeki RGG (arg-gly-gly) kutusunun benzerlik gösterdiği, KH domaini ve RGG kutusunun, hnRNP'nin pre-mRNA'ya bağlanmada rol oynayan fonksiyonel motifler olduğu gösterildi. Yüksek doz konsantrasyonlarda FMR 1 proteini, in vitro koşullarda bilinen diğer RNA'ya bağlanan proteinler gibi RNA eş polimerlerine bağlanmaktadır. FMR 1 proteini, iki KH domaini içerir ve her biri ortalama 50 aa. uzunluktadır. KH domaini; maya, drosophila, E-coli, tavuk ve memelilerde B-I-G-X-X-G-X-X-B ortak dizisini içerir. KH domaininin önemi, frajil X sendromuna yol açan FMR 1 geninin protein ürünündeki KH domainin korunmuş dizilerindeki nokta mutasyonları gözlenerek değerlendirilmiştir.

FMR 1' deki ikinci motif olan RGG kutusu, hnRNP U proteininin RNA ya bağlanma aktivitesini gösteren kısımdır²⁰. FMR 1 proteini, bir çok dokuda gösterilmiştir. Fetus olgunlaştıkça, beyin ve testisler hariç diğer dokularda azalmaktadır. Merkezi sinir sistemi ve testisler, fetal yaşamda oldukça yüksek ekspresyonun görüldüğü ve erişkin yaşamda da sürdüğü dokulardır. RNA bağlanmasında KH domain'in rolünün ortaya çıkarılması için; hnRNP K ve FMR 1 KH domainlerinde yönlendirilmiş mutasyon tekniği ile yapılan çalışmalarda, bağlanma etkinliğinde azalma gözlenmiştir.

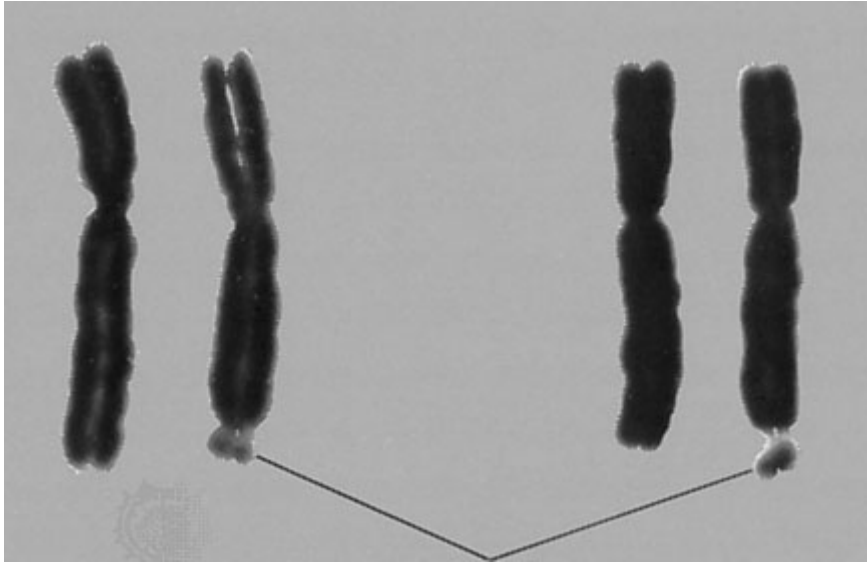
FMR 1 proteininin, daha çok sitoplazmada lokalize olduğu ancak bazen çekirdekte de bulunduğu belirlenmiştir. FMR 1 proteini, ribozomlarla ilişkili olduğu bilinen fakat fonksiyonu kesin olarak bilinmeyen bir RNA bağlanma proteindir³⁴. Sukroz yoğunluk analizi ile FMRP ribozom ilişkisinin RNA bağımlı olduğu gösterilmiş ve FMRP, EDTA işlemini takiben ribonükleoprotein partikülleri içinde bulunmuştur²¹. Bu çalışmaya göre FMRP, bir çekirdek lokalizasyon sinyali ve bir de çekirdek eksport sinyali içerir. RNA bağlanma özelliği ribozomlar ile ilişkilidir. Bu veriler birleştirildiğinde, FMRP önce ribonükleoprotein partikülleri içinde toplanarak çekirdeğe girer, bunu sitoplazma içine taşıma takip eder ve ribozomlar ile bağlantı kurar. FMR 1'in ekspresyonunun hücre siklusunu düzenlemediği ancak FMRP'nin house-keeping fonksiyona sahip olabileceği öne sürülmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmada, FMRP'nin poliribozom translasyonunda mRNP'ler ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve FMRP'nin mRNA kompleksleri ile etkileşime giren bir mRNA şaperonu olduğu öne sürülmüştür.

2.6. TANI YÖNTEMLERİ

Frajl X sendromuna neden olan genin klonlanmasından sonra bunun kararsız üçlü nükleotid tekrar sayısının artmasından kaynaklandığı gösterilmiş ve bunu takiben sitogenetik testin yerini moleküler test almıştır.

2.6.1. SİTOGENETİK ANALİZ

Frajl X sendromunun karakteristik sitogenetik bulgusu olan X kromozomunun uzun kolunun terminalinde q27.3 bant bölgesinde yer alan, kırılmaya eğilimli noktaya kromozomdan ayrı ya da bir ucundan kromozoma bağlı küçük bir parça veya iki kromatit üzerinde bir boğum, boya almayan bir aralık biçiminde görülür²². Çok daha ender olarak, bu nokta triradial figür, kayıp ya da asentrik bir parça biçiminde de ortaya çıkabilir (Şekil 2).

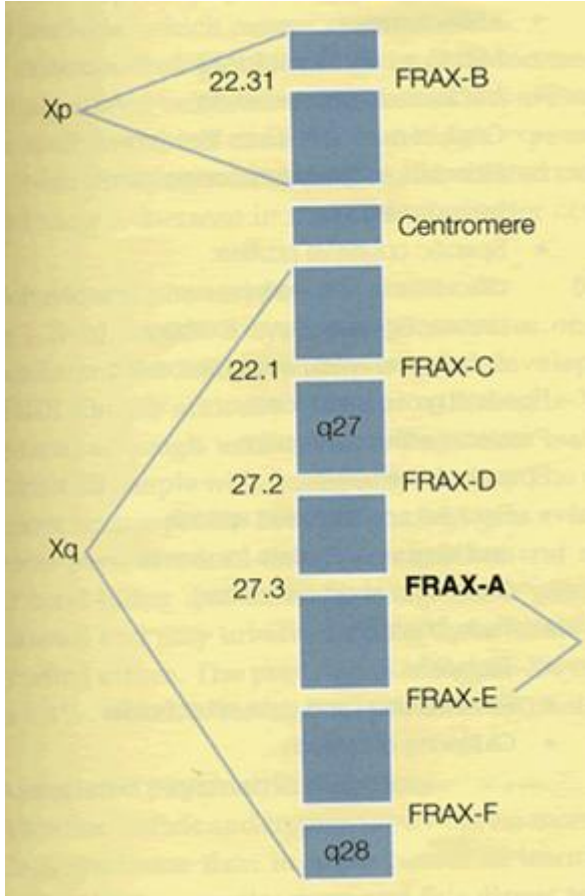


Şekil 2. X kromozomunda sitogenetik frajilite

Kromozomlar üzerinde sitogenetik analiz ile görülebilen frajl bölgeler rekombinojeniktirler. Frajl bölgenin olduğu yerde, DNA geç veya eksik çoğalmaktadır. Frajl bölge Xq27 için öne sürülen mekanizmalardan biri bu bölgenin geç çoğalması oluşudur. Drozofilla kromozomlarında frajl bölgeler, replikasyonda geciken veya eksilen bölgelerde meydana gelir. Kromozom yoğunlaşması geç replike olan bölgede tam değildir. Bu durum kromozom gap'ına (kromozom üzerinde aralıklı bölge) yol açar^{22,23}. Xq27'de görülen frajl bölge sendrom ile ilişkilidir. Frajl bölge, X'in uzun kolunun telomerik ucuna yakındır ve

frajil bölgede çok küçük asentrik parçanın kaybını görmek zordur. Bununla beraber, ara sıra gözlenmektedir. X üzerinde frajil bölgenin belirlenebilmesi biraz subjektiftir ve deneyimli bir gözlemciye ihtiyaç duyulur. Frajil bölge çalışmaları, ışık mikroskobu kullanılarak metafaz kromozomları üzerinde yapılır. Frajil bölge, FRAXA, elektron mikroskobu ile incelenmiş ve frajil bölgede distal fragmentin 25 nm'lik iplik ile kromozomun proksimal segmentine yapışmakta geri kaldığı gözlenmiştir (Şekil 3).

Frajil X sendromunun belirlenmesinde sitogenetik analiz daima kesin sonuç vermez. Çünkü, mutant genin geçtiği premutasyonlu erkekler ve kadınlarda frajil bölge ifade edilemez²⁴. Ancak, etkilenmiş erkeklerde frajil bölge daima gözlenir. Bundan başka, FRAXA uç bölgesindeki FRAXE'de frajil bölge ekspresyonu, FRAXA bölgesindeki ekspresyon gibi yanlış yorumlanabilir. Zeka geriliğine neden olan FRAXE ekspresyonunda da frajilite gözlenmiştir (Şekil 3). Frajil bölgelerin ekspresyonu, kültüre edilen hücrelerde ajanlar ile baskılanabilmektedir. Bunlar DNA sentezinde zorlanmaları azaltır. Örneğin, normal düzeyde timidin ve folat bu zorlanmayı önler. Frajil bölgenin oluşumu, geç S veya erken G2 fazı sırasında baskılanmaktadır³³. Bu sonuçlar, üç frajil bölgede de elde edilmiştir. Bunlar, folat ile baskılanabilen Xq27, 10q23 ve 2q13' dür. Folat veya timidin her biri baskılama ajanıdır.



Şekil 3. X kromozomu üzerinde bilinen frajil bölgeler

Frajil X sendromunun oluşumu ile ilgili iki model öne sürülmektedir. Birinci modelde, insanda frajil bölgelerin oluşumuna, *Drosophila melanogaster*' de olduğu gibi, araya giren heterokromatin neden olabilir. İkinci modelde ise frajil X'in normal olmayan kromozom imprinting'inden oluştuğu öne sürülmektedir. İnsan genomunda frajil bölgeler, nadir ve yaygın frajil bölgeler olarak iki grupta toplanmaktadır. Nadir görülen frajil bölgeler, popülasyonun çok küçük bir kesitinde bulunan frajil bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, % 1'den daha az olup kromozom çiftinin iki homologundan sadece biri sıklıkla etkilenir ve kodominant bir Mendeliyen kalıtım modeline göre kalıtılır. Şimdiye kadar tanımlanan ve nadir görülen 28 frajil bölge vardır ve aynı gruba giren X kromozomunun uzun kolu distal bölgesi üzerinde iki frajil bölge tanımlanmıştır (FRAXE ve FRAXF) (Şekil 3). Nadir frajil bölgelerin çoğu FRAXA gibi folata duyarlı olup, folik asit ve timidinin eksik olduğu kültür ortamları içinde uyarılırlar. Florodeoksiüridinli veya folat antagonisti metataraksat içeren ortamlar, timidilat sentetazın bir inhibitörü olarak addedilir. Nadir görülen frajil bölgeler, genellikle bir klinik fenotip ile ilişkilidir. Kanserler ve lösemilerde, tekrarlayan kırık noktaları ile frajil bölgeler arasında bir ilişki olduğu öne sürülmektedir²⁵.

Yaygın olarak gözlenen frajil bölgelerin sağlığa zararlı olmadığı gözlenmiştir. Sterik baskılanmak olarak adlandırılan bir durumda, DNA polimeraz kompleksi hala geç replike olan DNA üzerinde ise kondensasyonu bloke eder ve kromozom gap'ına neden olur³². Sterik baskılanmaya diğer bir örnek de nükleolusun replikasyonda geri kalması sonucu oluşan ikincil konstriksiyondur. Yaygın frajil bölgeler, popülasyonda tüm bireylerde veya çoğunluğunda bulunan bölgeler olarak tanımlanır ve kromozom çiftinin her iki üyesinde de bulunur. İnsan genomunda yaygın bir şekilde bulunan, toplam 87 frajil bölge belirlenmiştir²⁶. Bu bölgelerin çoğu özellikle, DNA polimeraz α 'nın bir inhibitörü olan afidikolin indüksiyonuna duyarlıdır. Çok az sayıda olmakla beraber 5-azasitidin veya bromodeoksiüridin (BrdU) tarafından da uyarılmaktadır.

Sutherland, frajil bölgeyi ilk gösteren araştırmacıdır ve kullanılan büyüme ortamına bağlı olarak periferik kan lenfositlerinde frajil bölgenin ekspresyonunu sağlamıştır. FRAXA, Medium 199 içinde indüklenmiştir. Ancak, ticari olarak kullanılan diğer mediumlar test edilememiştir. Daha sonraki çalışmalarda, bu mediumun esas olduğu gözlenmiştir. Düşük folik asit ve timidin düzeyi, folat antagonisti metataraksat indüksiyonu ile Xq27'de frajil bölge eksprese olmuştur. Folata duyarlı frajil bölgeler, FUdR ile de kuvvetle indüklenmektedirler. FUdR'nin metaboliti olan 5-florodeoksiüridin monofosfat, timidilat sentetazın kuvvetli bir inhibitörüdür. Ekspresyonu görmek için indüksiyon şartları, mitozdan önceki geç S fazı

sırasında hazır olmalıdır. Frajil X ekspresyonunu tam olarak baskılayan timidin veya folik asittir. Folik asit eksikliği veya metataraksat indüksiyonu ile frajil X eksprese olur. Timidinin yüksek konsantrasyonlarının da (1-2 mM) frajil X uyarılmasını (FRAXA) etkili bir şekilde uyardığı gözlenmiştir. Timidinin bu etkisinin dTTP'nin yüksek düzeyde olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Frajil X'in tayini için en az iki indüksiyon sistemi uygulanması önerilmektedir. Birkaç organizasyon, kadınlarda 100 ve erkeklerde 50 metafaz incelenmesini önerirken, bazı organizasyonlar, daha fazla metafaz incelenmesini önermektedirler. Buna karşın, bazı sitogenetikçiler rutin uygulamada çok fazla metafaz incelenmesine gerek görmemektedirler. Ancak genellikle, rutinde erkeklerde 50, kadınlarda ise 75 hücre analiz edilmesi uygun bulunmaktadır²⁷. Frajil X, % 4'ün altında ise çalışmanın tekrarlanması önerilmektedir. Sitogenetik adlandırma kurallarına (ISCN) göre kromozom kuruluşu frajil X erkekte 46,Y,fra(X)(q27.3), kadında ise 46,X,fra(X)(q27.3) şeklinde yazılmaktadır.

2.6.2. MOLEKÜLER ANALİZ

Frajil X mutasyonunun moleküler testi, sıklıkla iki metod kullanılarak yapılmaktadır. I. metod; doğrudan genomik Southern blot analizidir. Bu yöntemde, CGG tekrar bölgesine yakın olan bir prob kullanılır. II. metod, polimeraz zincir reaksiyonudur. Her iki metod ile de FMR l'in üçlü tekrar bölgesinin genişliği belirlenebilir. Yaygın olarak kullanılmayan diğer bir tanı yöntemi ise antikor testidir. Bu yöntemde, FMRP'nin varlığı anti FMR l antikoru ile belirlenir²⁸.

2.6.2.1. SOUTHERN BLOT YÖNTEMİ

Southern (1975) tarafından bulunan bu teknikte, agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılan DNA parçaları arasında spesifik diziler tayin edilir. DNA ilgili gen bölgesini tanıyan bir bakteriyel restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Oluşan DNA parçaları, agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldıktan ve denatüre edildikten sonra nitroselüloz veya naylon membrana aktarılır. Daha sonra, membran ilgili gene özgül olan radyoaktif veya non radyoaktif işaretli bir prob ile hibridizasyon sonucunda oluşan bantlar analiz edilerek sonuca gidilir.

Southern blot tekniği, başlangıçta radyoaktif işaretli problarla çalışılmaktadır. Radyoaktivitenin riskli olması, yarılanma ömrünün kısalığı ve blot süresinin uzun zaman

alıyor olması bu tekniğin dezavantajlarıdır. Daha sonraları, radyoaktif işaretli problemler yerine non radyoaktif (digoxigenin, biotin) işaretli problemlerin kullanılması ile bu teknikteki bir çok zorluk aşıldı. Southern transfer analizi ile FMR l'in premutasyon ve tam mutasyonda tekrar sayısı ve metilasyon durumunu belirlemek aynı çalışmayla elde edilebilmektedir. Metilasyona duyarlı bir enzim, metile olan bir allel ile olmayanı alleli ayırabilmektedir. Southern transfer analizi ile bütün boylardaki alleller doğrulukla çalışılabilmekte ancak artış sayısı kesin olarak belirlenememektedir²⁹.

Frajl bölgede tekrar eden DNA bölgesinin farklı prob ve çeşitli restriksiyon enzim kesimlerinden sonra, "Southern Blot Analizi" ile genotiplemesi yapılabilmektedir. Normal X kromozomu, Eco RI kesimi ve pfxa3 probu ile 5.2 kb'lık bir parça verir. Tekrar sayısı arttığında, 5.2 kb'ın üstünde bir fragman gözlenmektedir. Genin metilasyon durumunu öğrenmek için, Eco RI kesimi yapılan DNA kesim ürünlerine metilasyon varlığında kesim yapamayan Nru I enzimi ile ikinci kesim yapılır. Bu durumda, inaktif X kromozomu metillenmiş olduğundan Nru I tarafından kesilemeyecektir. Eco RI enziminin kesmiş olduğu 5.2 kb'lık bir fragman jelin yukarı kısmında görünürken, aktif X kromozomu metilasyon içermediğinden Nru I enzimi ile kesileceğinden 2.8 kb'lık bir parça jelin daha alt kısmında yer almaktadır. Her iki kromozomdan birinde olabilecek olası bir artış ise 5.2 ve 2.8 kb'lık büyüklüklerin üzerinde görülmektedir.

2.6.2.2. PCR YÖNTEMİ

Polimeraz zincir reaksiyonu, 1985'de Randall Saiki ve arkadaşları tarafından orijinal olarak geliştirilmiş ve ilgili DNA dizisinin *in vitro* amplifikasyonunda yüksek düzeyde etkili olan yeni bir tekniktir³⁰. DNA materyali çok az bile olsa bu yöntem, hedef DNA dizisinin hızlı bir şekilde analizini ve karakterizasyonunu sağlar. Yöntem, ilgili bölgeye komşu olan dizilerin kullanılmasına bağlıdır. Genellikle, 18-22 baz uzunluğunda iki oligonükleotid (primer çifti) kullanılarak yürütülür. DNA yüksek ısıda (sıklıkla 94°C) denatüre edilir ve sonra primerler ilgili diziye komplementer olarak bağlanır. Primerler, birbirlerine 3'uçları doğrultusunda düzenlenmiştir ve 4 deoksiribonükleotid trifosfatın varlığında, ilk enzimatik süre sonunda kalıp nükleik asit boyunca, hedef dizinin karşısında ona komplementer olan bir zincir sentezlenir. Diğer döngü için son ürün denatüre edilir ve sonra 20-40 kez bu üç aşamalı döngü tekrarlanır.

PCR için, orijinal olarak kullanılan enzim *Escherichia coli* DNA polimeraz l'in büyük parçasıdır. Enzimlerin çoğunda, katalitik aktivite yüksek ısıda kaybolur. Taq polimeraz,

termofilik bakteri türlerinden olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiş ve yüksek denatürasyon ısısında aktiftir. Taq polimeraz kullanımıyla, her döngüde enzim ilavesi gerekmeden işlem yapılmakta ve bundan dolayı otomasyonun basit olmasını sağlamaktadır. PCR için kullanılan otomatik termal döngü makinaları, örneklerin döngü ısılarını tekrarlar. Termal döngü makinalarının birkaç çeşidi kullanılmaktadır. Bunlar içinde programlanabilir alüminyum ısı bloklı, kontrollü akışkan su banyolu veya mekanik transferli olanlarda, örnekleri koymak için genellikle standart mikrofüj tüpleri kullanılır. Bu termal döngü makinalarında, 30 döngülük bir amplifikasyon genellikle 2-6 saati alır. Zamanın çoğu, plastik mikrofüj tüpleri içindeki örneklere ısı transferi ve yüksek ısı kapasitesine getirilmeye harcanır. Diğer bir termal döngü makinası ise hava termal döngüdür ve ince cam kapiller tüpler içine örnekler konulur ve ısı transferi için ortam olarak hava uygulanır. Hava ideal bir ortamdır. Çünkü, hava düşük yoğunluktadır ve hızlı bir şekilde ısıyı değiştirebilir. Cam kapiller tüplerin avantajı, çok ince duvarlı olması ve verilen bir hacim için çok yüksek yüzey alanına sahip olması sayesinde 10-30 dk. içinde 30 döngülük DNA amplifikasyonunun tamamlanabilmesidir. DNA amplifikasyonunun bu türü, hızlı DNA amplifikasyonu olarak adlandırılmaktadır.

Frajl X mutasyonları için PCR testi hızlı bir testtir ve çok az miktarda DNA kullanılır. Bununla beraber, yüksek CGG içeren özel bir bölgenin olması nedeniyle tam mutasyonların başarılı amplifikasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Başlangıç olarak, PCR ile frajl X lokusunda CGG tekrar bölgesinin amplifikasyonuna çalışılmıştır. Fu ve arkadaşları (1991), normal ve çoğu premutasyon boyundaki allellerin başarılı amplifikasyonu için bir PCR metodu geliştirdiler. Ancak, bu metod ile 200 CGG'den fazla olan tam mutasyonlu alleller amplifiye edilememektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, fragil X öntanısı alan 107 çocuk bireyden alınan kan örnekleri ile yapıldı.

3.2. Gereç

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. M-199 (Fra-X Medyumu)
2. Colcemid (10mg/ml)
3. Metanol (Merck)
4. Glasial Asetik Asit (Merck)
5. Giemsa (Merck)
6. RPMI 1640 (Sigma 0883)
7. Phytohemmaglutinin
8. Fetal Calf Serum

3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Santrifüjler (Techne Cambridge, Universal 16R)
2. Su Banyoları (Grant)
3. pH metre (Inolab)
4. Buzdolabı (Arçelik, Uğur)
5. Deepfreeze (Beko, Siemens)
6. Vorteks (Nüve NM 110)
7. Thermal Cyclers (Bioer XP cyclers, Eppendorf Mastercycler)
8. Otoklav (Trans)
9. Otomatik Pipetler (Socorex, Beta-Pette, Gilson, Rainin)
10. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160)

Bu teknik malzemeler, araştırmanın yapıldığı Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda bulunmaktadır.

3.4. Yöntem

Bu çalışmada; Frajil X ön tanısı ile gelen hastalarda öncelikle sitogenetik frajilitenin olup olmadığına bakıldı. İkinci olarak, moleküler analizleri yapıldı ve yapılan bu iki analiz arasındaki ilişki oranına bakıldı.

3.4.1. Sitogenetik Analiz Yöntemi

Sitogenetik analiz için lenfosit kültürü yöntemi kullanıldı. Bunun için sırasıyla şu işlemler yapıldı.

- Heparin ile yıkanmış enjektöre 1-2 cc kan alındı.
- Konik tabanlı kültür tüplerine 3'er cc daha önceden hazırlanan M199 medyumunu kondu.
- Her tüpe 3-4 damla kan damlatıldı.
- 37 santigrat derecelik etüvde 72 saat üremeye bırakıldı.
- 70.5 saat sonra bölünmenin durması ve iğ ipliklerinin yok olması için 4 damla kolçisin maddesi eklendi.
- 72 saat dolduğunda 1000 rpm de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant tüpün altındaki çizgiye kadar atıldı. Pipetaj yapıldı ve üzerine hücrelerin şişmesi için 5-6 cc kadar hipotonik solüsyon eklendi.
- 15 dakika 37 santigrat derecelik etüvde bekletildi.
- Her bir tüpe 7-8 damla (3 birim metanole 1 birim asetik asit oranında hazırlanan) fiksatif damlatıldı.
- 1000 rpm de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant tüpün altındaki çizgiye kadar atıldı. Pipetaj yapıldı ve üzerine 5-6 cc kadar fiksatif eklendi. 1000 rpm de 8 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki maddede belirtilen işlemler 3 kez tekrarlandı.
- Saf sudan geçirilen lamalar üzerine yayma yapıldı.
- Preparatlar etüvde birkaç gün bekledikten sonra bantlama yapıldı.

3.4.1.1.GTG Bantlama

- 75 cc serum fizyolojik içersine 1,5 cc tripsin konuldu ve pH metre yardımı ile (pH 7,5-7,8 arası) tripsin çözeltisi hazırlandı.
- Preparatlar 45 saniye süreyle tripsin çözeltisi içinde bırakıldı.
- Preparatlar fosfat tampon çözeltisi içersine batırılıp çıkartıldı.
- Preparatlar Giemsa boyasında 7 dakika bekletildi.

3.4.2. Moleküler Analiz Yöntemi

3.4.2.1.DNA İzolasyonu

- 700 µl tam kan 1.5 ml'lik ependorf tüp içersine alındı. Daha sonra 700 µl eritrosit lizis tamponu ile muamele edildi. Bir iki kez karıştırılıp 3 dk beklendi. Sonra santrifüj edilerek süpernatant pipet yardımı ile atıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandı.
- Eğer pellet yeterince temiz değilse 1 ml fizyolojik tamponla yıkandı. Bunun için pellet üzerine fizyolojik tampon eklendi, santrifüj edilerek süpernatant pipetle alındı ve atıldı.
- Pellet üzerine 300 µl TE-9 (pH:9) tamponu ilave edilerek pellet çözdürüldü. Daha sonra üzerine 100 µl %10'luk SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi. Tüp iyice karıştırılarak 65°C'de 1.5-2 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tüp içersine 200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisinden ilave edildi. Tüp iyice karıştırıldı ve süt beyazı rengine dönüştüğü gözlemlendi. Burada amaç; DNA dışındaki protein, lipid gibi moleküllerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra bu karışım santrifüj edildi ve böylece DNA diğer moleküllerden ayrıştırıldı.
- Bu kez süpernatant steril ependorf tüplerine alındı ve üzerine 900 µl saf alkol ilave edilerek DNA'nın yoğunlaşması gözlemlendi. DNA'nın tüpün dibinde çökmesi için santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve pellet üzerine %70'lik alkolden 1000 µl ilave edilerek iyice karıştırıldı ve santrifüj edildi. Pellet halinde kalan DNA'nın üzerindeki süpernatant döküldü ve DNA kurutuldu.
- Alkolü tamamen uçmuş DNA üzerine 200 µl TE ilave edilerek 65°C'de 15 dk bekletildi ve çalışmak üzere 4 °C'de bekletildi.

3.4.2.2.DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

PCR reaksiyonunun hazırlanması aşamasında bilmemiz gereken diğer bir temel konu da DNA'yı çözdüğümüz sıvı ortam içerisindeki DNA konsantrasyonu ve saflık derecesidir. Bunun belirlenmesi, UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle, 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir.

UV absorbansı, DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8$ 'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla, bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. Bu orandan düşük değerler, örnekte fenol ya da protein kontaminasyonunu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonunun varlığını gösterir. RNA için absorbans oranı ise $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8-2.0$ 'dir.

3.4.3.3. FRAGILE X MOLEKÜLER ANALİZ PROTOKOLÜ (Abbott)

Genomik DNA, standart protokoller kullanılarak izole edildikten sonra bir örnek için PCR amplifikasyonu aşağıdaki karışımlar hazırlanarak kuruldu.

- | | |
|----------------------|--------|
| • High GC PCR Buffer | 13 µL |
| • Gender primers | 0.6 µL |
| • Fragile X Primers | 0.8 µL |
| • TR PCR Enzyme Mix | 1.2 µL |
| • Distile Su | 1.4 µL |
| • DNA | 3 µL |
| ----- | |
| • TOPLAM | 20 µL |

PCR reaksiyonu için gerekli şartlar, thermal cycler cihazında aşağıdaki gibi ayarlandı.

SICAKLIK (°C)	ZAMAN (sn)	DÖNGÜ SAYISI	HACİM (µL)
98.5	0:10	15	20
58.0	1:00		
75.0	6:00		
98.5	0:10	15	
56.0	1:00		
75.0	6:00		
4.0	99:59		

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra, ürünler aşağıdaki şekilde saflaştırıldı.

- Cleanup Enzyme Mix 3 µl
- PCR ürünü 2 µl

Saflaştırma için thermal cycler cihazı aşağıdaki şekilde ayarlandı.

Sıcaklık	Zaman	Hacim
75°C	10 dak	5 µL
4°C	∞	

Örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi sırasında aşağıdaki sıra izlendi.

- Hi-Di™ Formamide 7 µL
 - ROX 1000 Size Standard 3 µL
 - Saflaştırılmış ürün 5 µL
 - TOPLAM 15 µL
- platelere dağıtıldı ardından 30 saniye 93 °C de denatürasyon yapıldı ve kapiller elektroforez cihazına yüklendi. Örnekler cihazda yürüdükten sonra mevcut piklere bakılarak gerekli değerlendirmeler araştırmacı tarafından yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Araştırma Grubunda Saptanan Bulgular

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında, frajil X ön tanısı alan toplam 107 erkek ve kız çocuğun sitogenetik ve 26 çocuğun FMR-1 geninin moleküler tanısı yapıldı. Ayrıca, hastaların klinik ön tanıları Çizelge 2’de gösterildi.

Çizelge 1. Vaka grubunun cinsiyet ve sitogenetik tanı grubuna göre dağılımı

Vaka Grubu	Fra X (+)	Fra X (-)	Toplam (%100)
Erkek	5 (%4.7)	90	95 (%88.8)
Kadın	3 (%2.8)	9	12 (%11.2)
Toplam	8 (%7.5)	99 (%92.5)	107 (%100)

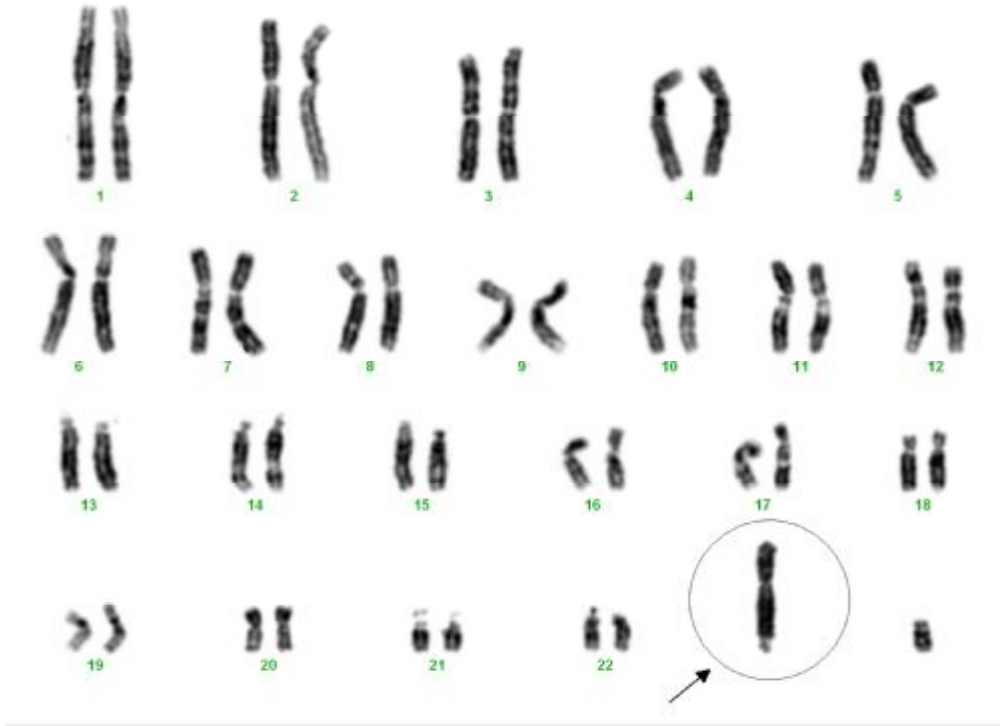
4.1.1. Araştırma Grubunda Saptanan Sitogenetik Bulgular

Çalışmaya alınan 107 çocuğun, 95 (%88.8) erkek ve 12 (%11.2) kız olup bunların, 8’inde (%7.5) X kromozomunda sitogenetik olarak fra X pozitif sonuç alındı. Buna göre; hastalık oranı erkek çocuklarda %4.7 bulunur iken kızlarda bu oran %2.8 olarak tespit edildi (Çizelge 1). Hastaların karyotip analizlerinde; X kromozomu dışında tespit edilen diğer frajil bölgeler, gapler, kromozom ve kromatid kırıkları gibi kromozom düzensizlikleri; fra(1)(q44), fra(3)(p2.7), fra(3)(p2.2), fra(6)(q25.2X2), fra(16)(q2.4), fra(7)(q32), fra(11)(q23.2), fra(12)q(2.9), fra(16)(q2.4), fra(16)(q22.2)X2, fra(x)(p22), fra(x)(q26), gap(3)(p22), chtb(3)(p14.2), chtb(2)(q31), gap(11)(p15.1), chtb(2)(q31), chtb(7)(q32), chtb(5)(q31), chtb(14)(q22), chtb(19)(p13.11), inv(9)(p11;q12) ve 3q+ şeklinde bulundu.

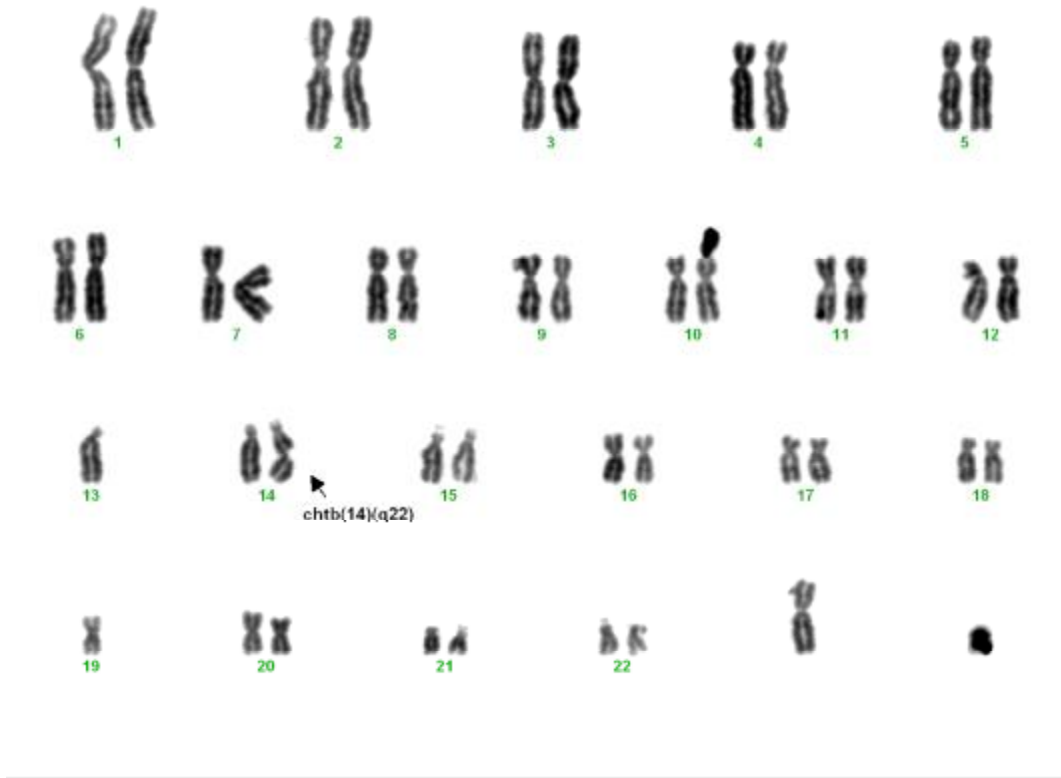
Çizelge 2. Hastaların; sitogenetik, moleküler genetik ve klinik bulguları

Has. no	E/K	Yaş	Sitogenetik	Moleküler genetik	Diğer Sitogenetik Bulgular	Klinik Bulgular
1	E	6	46,XY	Normal		MR
2	E	4	46,XY	Normal		Gelişme Geriliği
3	E	4	46,XY	Normal		Hiperaktivite,konuşma geriliği
4	E	7	46,XY	Normal		Epilepsi,MMR
5	E	10	46,XY	Normal		MR
6	E	5	46,XY	Normal		MR
7	E	11	46,XY	Normal		Cerebral Gigantizm
8	E	3	46,XY	Normal		MR
9	E	8	46,XY,frax(+),%5	Normal	chtb(14)(q22), chtb(5)(q31)	Büyüme Geriliği
10	E	8	46,XY	Normal		MR
11	E	9	46,XY	Normal	gap(3)(p22)	Epilepsi,MMR
12	E	10	46,XY	Normal	fra (x) (q26), chtb(3)(p14.2)	MR
13	E	5	46,XY	Normal	fra(1)(q44), chtb(2)(q31)	MR
14	E	5	46,XY,frax(+), %5	Normal	gap(11)(p15.1), fra(x)(p22)	Epilepsi
15	E	4	46,XY	Normal	chtb(19)(p13.1), fra(6)(q25)	MMR
16	K	3	46,XX	Normal	chtb(7)(q32), chtb(2)(q31)	Konuşamama
17	E	9	46,XY	Normal		MR
18	E	11	46,XY	Normal	fra(7)(q32)	MR
19	E	9	46,XY	Normal	fra(6)(q25.2), fra(11)(q23.2)	MR
20	E	3	46,XY	Normal		MMR
21	E	3	46,XY	Normal		Otizm
22	E	5	46,XY	Normal		MR
23	E	7	46,XY	Normal		MR
24	E	6	46,XY	Normal		MR
25	E	10	46,XY	Normal		MR
26	E	4	46,XY	Normal		MR
27	E	6	46,XY			MR
28	E	3	46,XY			MR
29	E	7	46,XY oto.fra.%6			MR
30	E	9	46,XY		fra(12)(q2.9)	MR
31	E	10	46,XY			MR
32	E	14	46,XY oto.fra.%8			MR
33	K	7	46,XX		fra(16)(q2.4)	MR
34	E	11	46,XY			MR
35	K	7	46,XX, frax(+),%10		fra(16)(q22.2)	MR
36	E	3	46,XY			MR
37	E	10	46,XY			MR
38	E	8	46,XY			MR
39	E	6	46,XY			MR
40	E	2	46,XY		fra(3)(p2.7)	MR
41	E	5	46,XY oto. Fra.%8			MR
42	E	8	46,XY			MR
43	E	9	46,XY oto. Fra.%8			MR
44	E	5	46,XY			MR
45	E	6	46,XY			MR
46	E	4	46,XY			MR
47	E	5	46,XY			MR
48	E	6	46,XY			MR
49	K	5	46,XX,oto.fra.%8			MR
50	E	3	46,XY			MR
51	E	4	46,XY		13q+	MR
52	E	8	46,XY			MR
53	E	3	46,XY			MR
54	E	7	46,XY oto.			MR

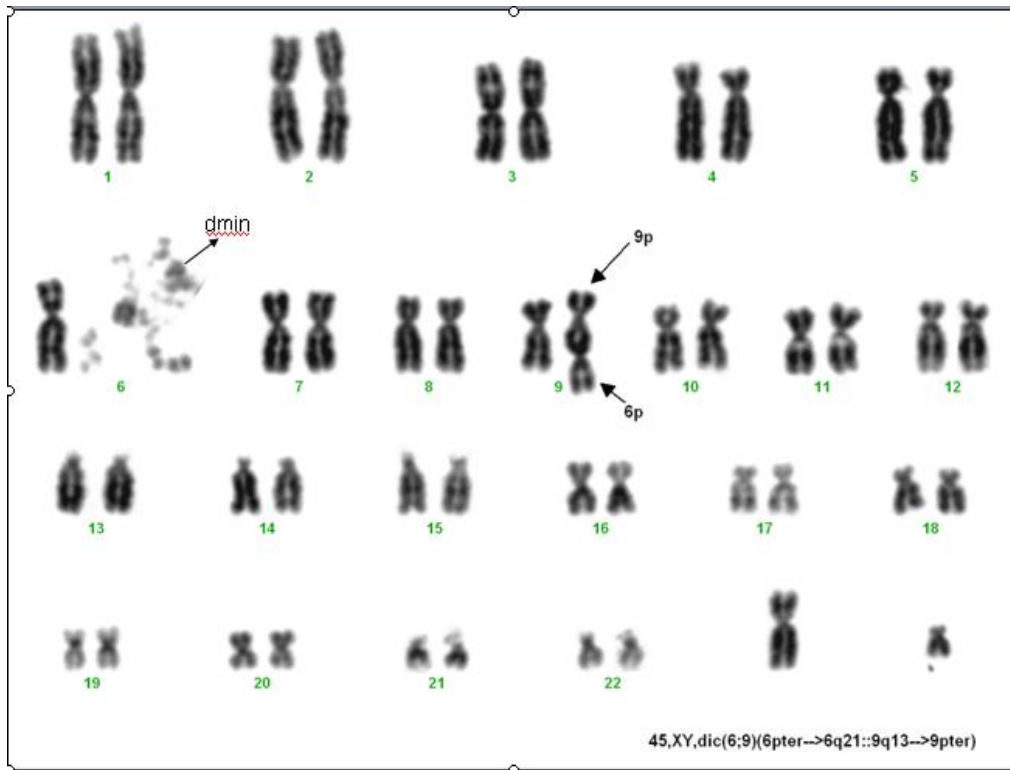
			fra.%20		
55	E	3	46,XY		MR
56	E	10	46,XY		MR
57	K	7	46,XX	fra(16)(q2.4)	MR
			46,XY oto.		
58	E	13	fra.%10		MR
59	K	7	46,XX,frax(+),%12	fra(16)(q2.2)	MR
60	E	14	46,XY oto fra.%10		MR
61	E	3	46,XY		MR
62	E	8	46,XY		MR
63	E	6	46,XY		MR
64	E	2	46,XY	fra(3)(p2.2)	MR
65	E	5	46,XY oto. fra.%6		MR
66	E	8	46,XY		MR
67	E	9	46,XY oto. fra.%8		MR
68	E	9	46,XY		MR
69	E	5	46,XY		MR
70	E	6	46,XY		MR
71	E	4	46,XY		MR
72	E	5	46,XY		MR
73	E	5	46,XY		MR
74	E	2	46,XY		MR
75	E	12	46,XY		MR
			46,XX,		
76	K	1	frax(+),%10		MR
77	E	11	46,XY, frax(+),%8		MR
78	E	7	46,XY		MR
79	K	6	46,XX		MR
80	E	12	46,XY		MR
			46,XY,		
81	E	11	frax(+),%12		MR
82	E	5	46,XY		MR
83	K	9	46,XX		MR
84	E	6	46,XY		MR
85	E	4	46,XY		MR
86	K	2	46,XX		MR
87	E	12	46,XY		MR
88	E	2	46,XY		MR
89	E	3	46,XY		MR
90	E	7	46,XY		MR
91	K	11	46,XX	inv(9)(p11;q12)	MR
92	E	9	46,XY		MR
93	E	11	46,XY		MR
94	E	4	46,XY		MR
			46,XY,		
95	E	8	frax(+),%15		MR
96	E	3	46,XYoto.fra.%15		MR
97	K	1	46,XX		MR
98	E	6	46,XY		MR
99	E	3	46,XY		MR
100	E	13	46,XY		MR
101	E	2	46,XY		MR
102	E	10	46,XY		MR
103	E	7	46,XY		MR
104	E	4	46,XYoto.fra.%15		MR
105	E	4	46,XY		MR
106	E	8	46,XY		MR
107	E	10	46,XY		MR



Şekil 4. 9 nolu hastada Xq27.3 de fragil bölge



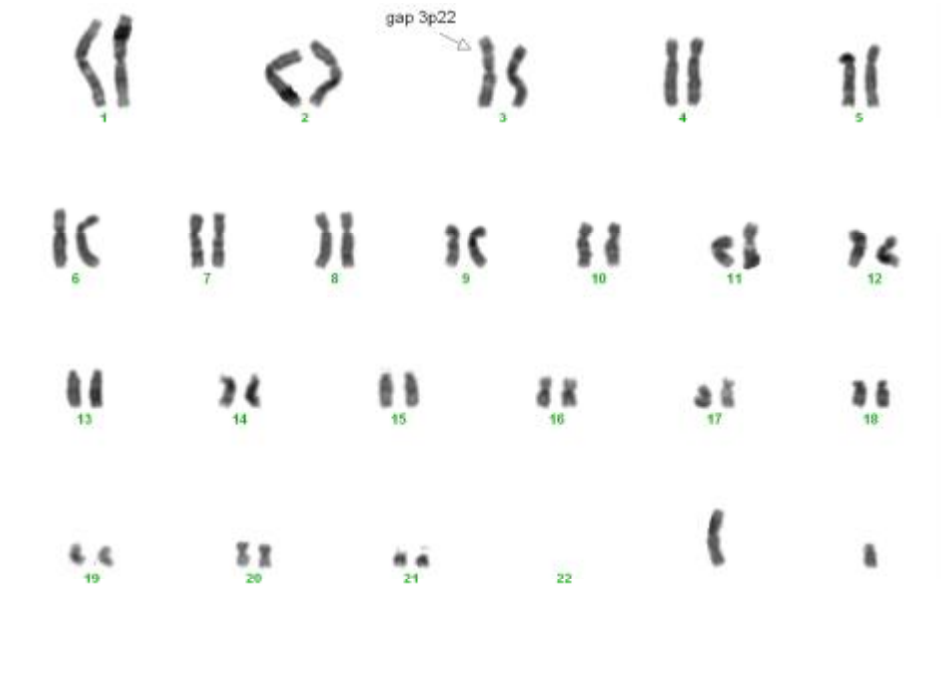
Şekil 5. 9 nolu hastada 14q22 de kromatid kırığı bölgesi



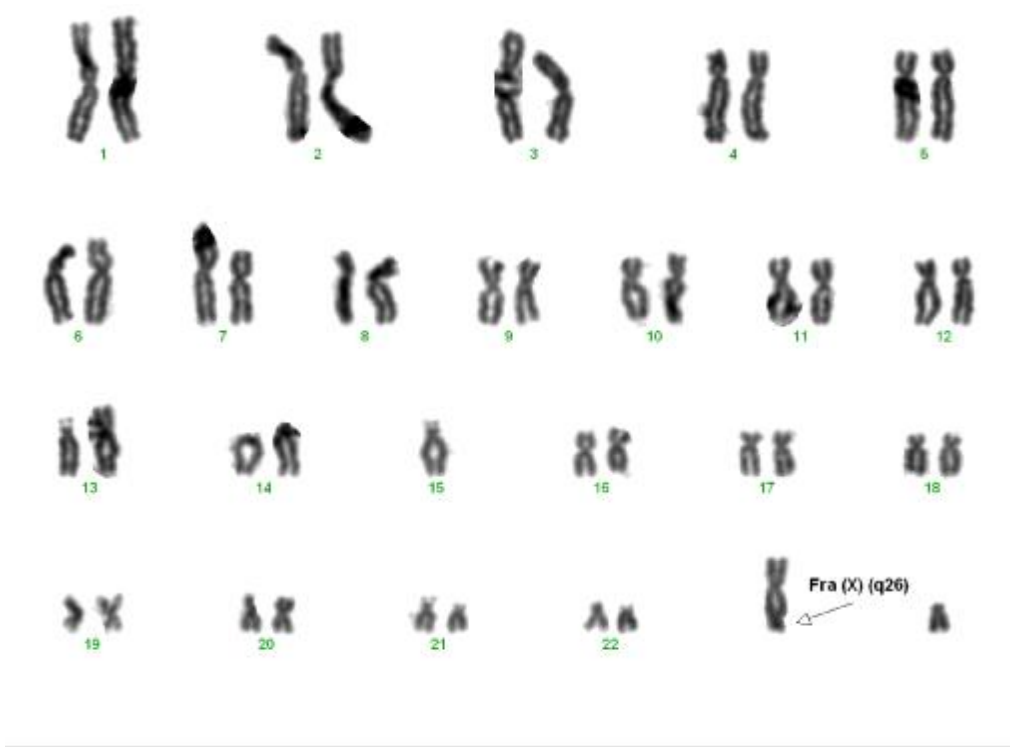
Şekil 6. 9 nolu hastada 9. ve 6. kromozomların kısa kollarının kaynaşması sonucu oluşan yeniden düzenlenmiş kromozom ve dmin kromozom parçaları



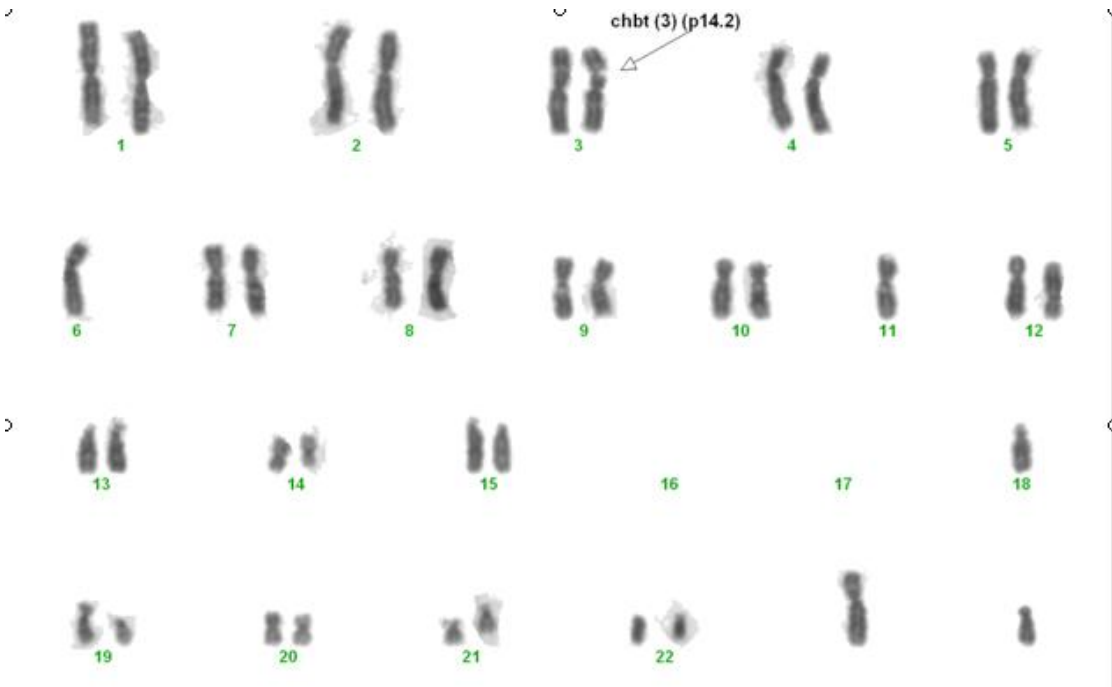
Şekil 7. 9 nolu hastada 5q31 de kromatid kırığı bölgesi



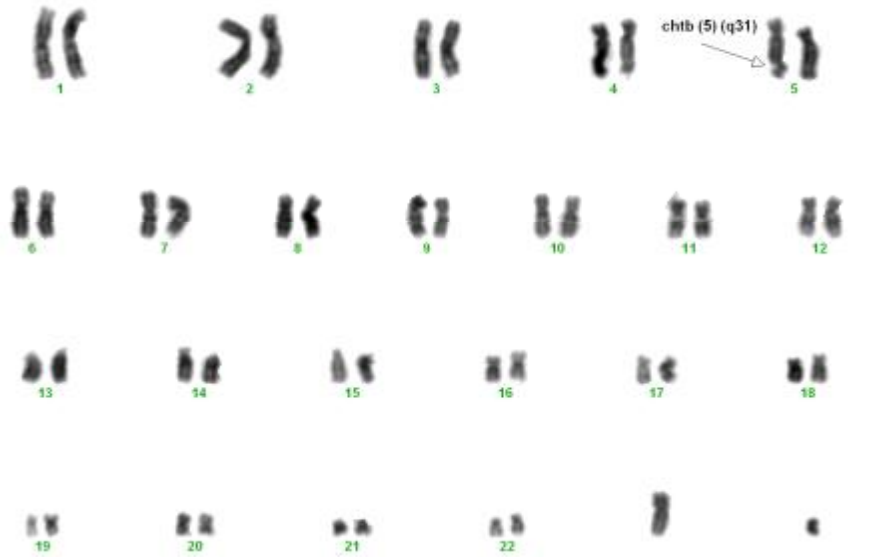
Şekil 8. 11 nolu hastada 3p22 de gap bölgesi



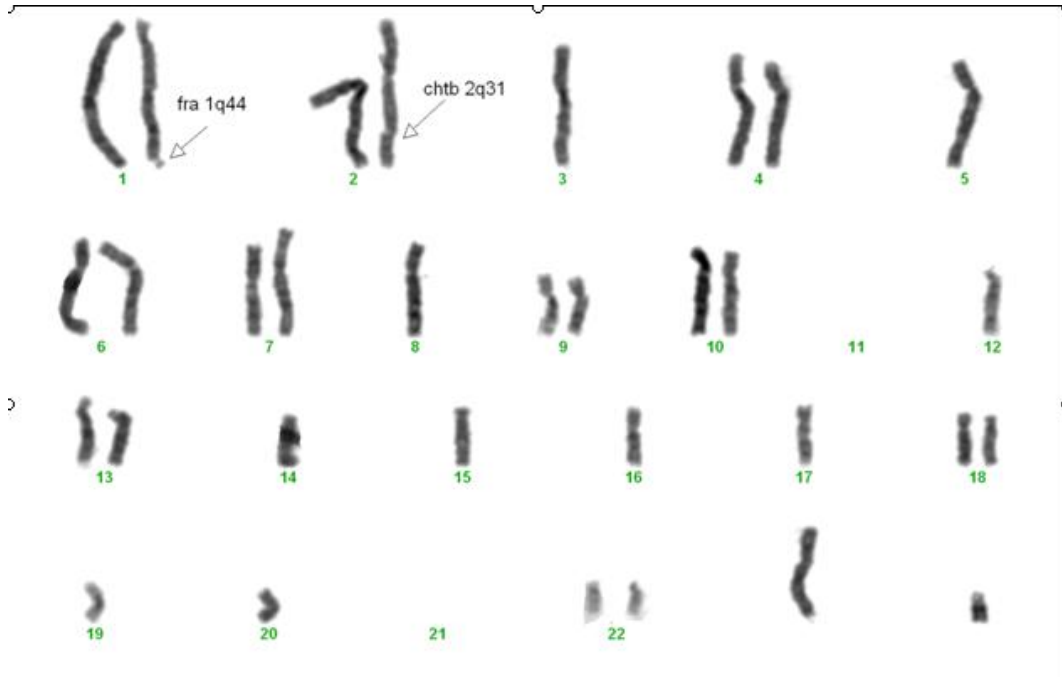
Şekil 9. 12 nolu hastada Xq26 da frajil bölge



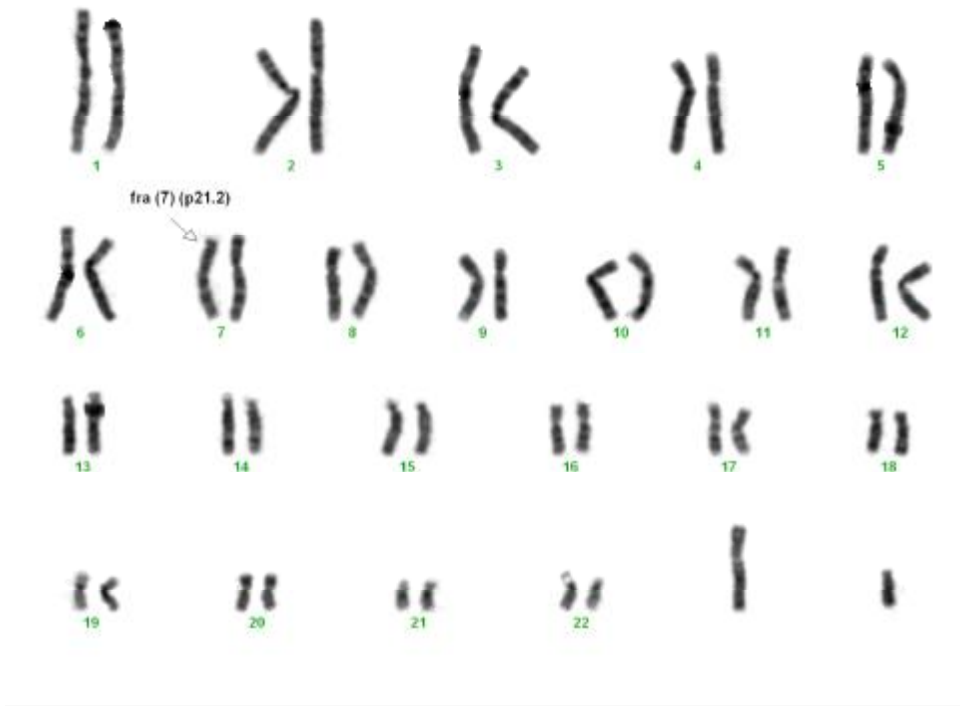
Şekil 10. 12 nolu hastada 3p14.2 de kromatid kırığı bölgesi



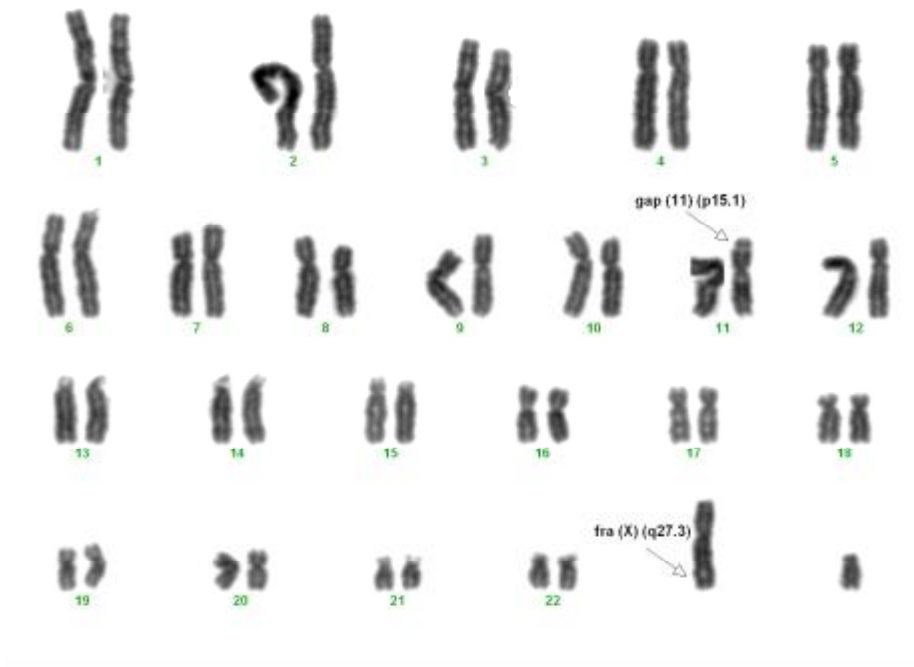
Şekil 11. 12 nolu hastada 5q31 de kromatid kırığı bölgesi



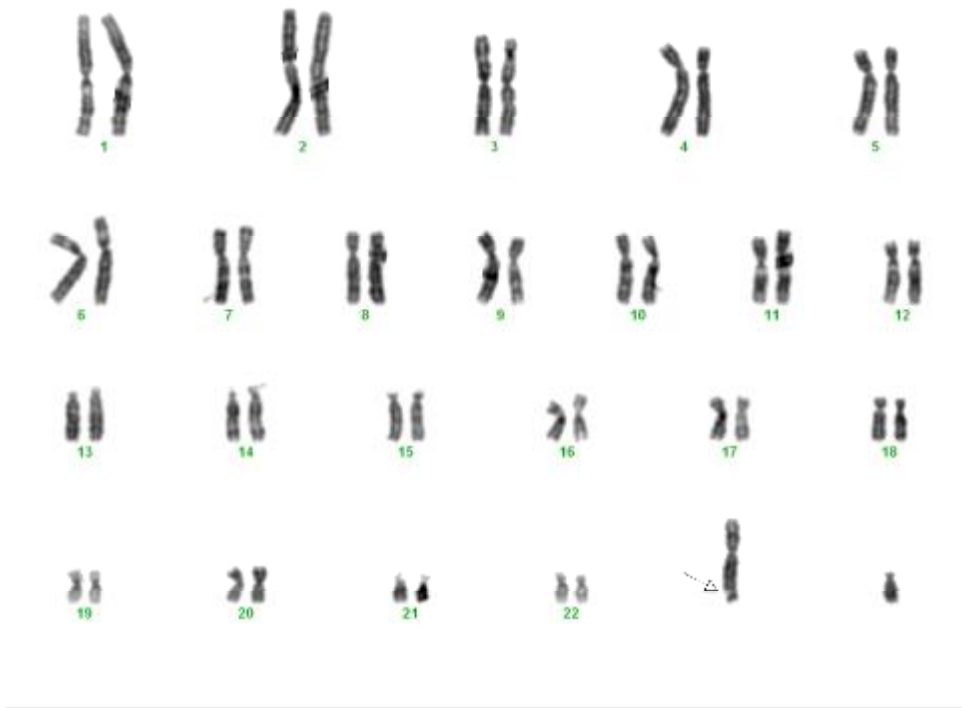
Şekil 12. 13 nolu hastada 1q44 de frajilite ve 2q31 de kromatid kırığı bölgesi



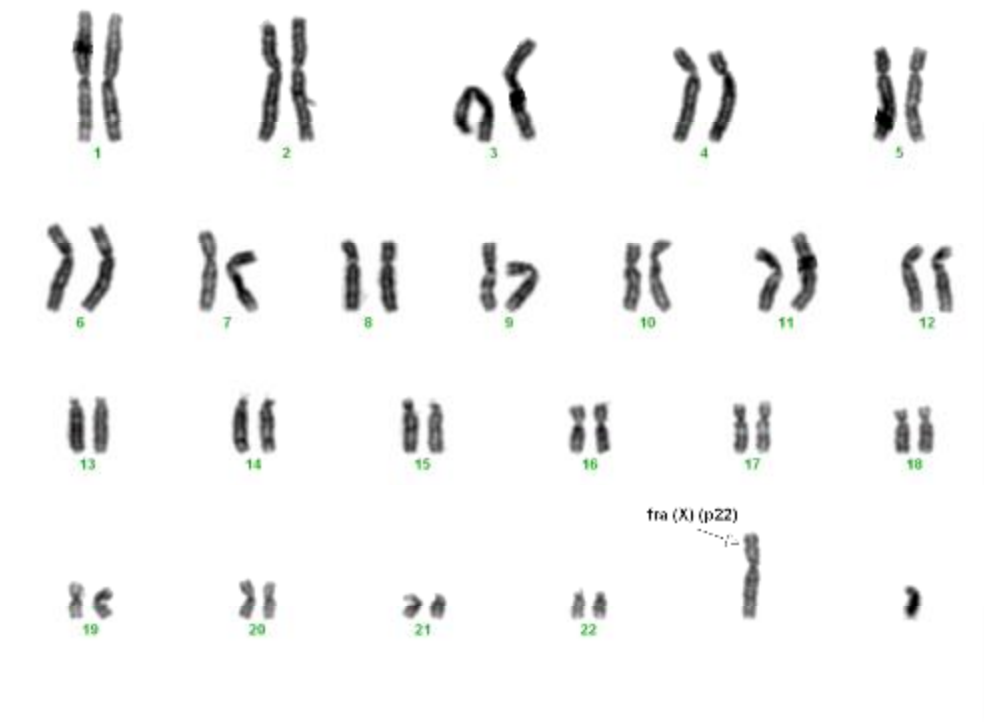
Şekil 13. 13 nolu hastada 7p21.2 de frajil bölge



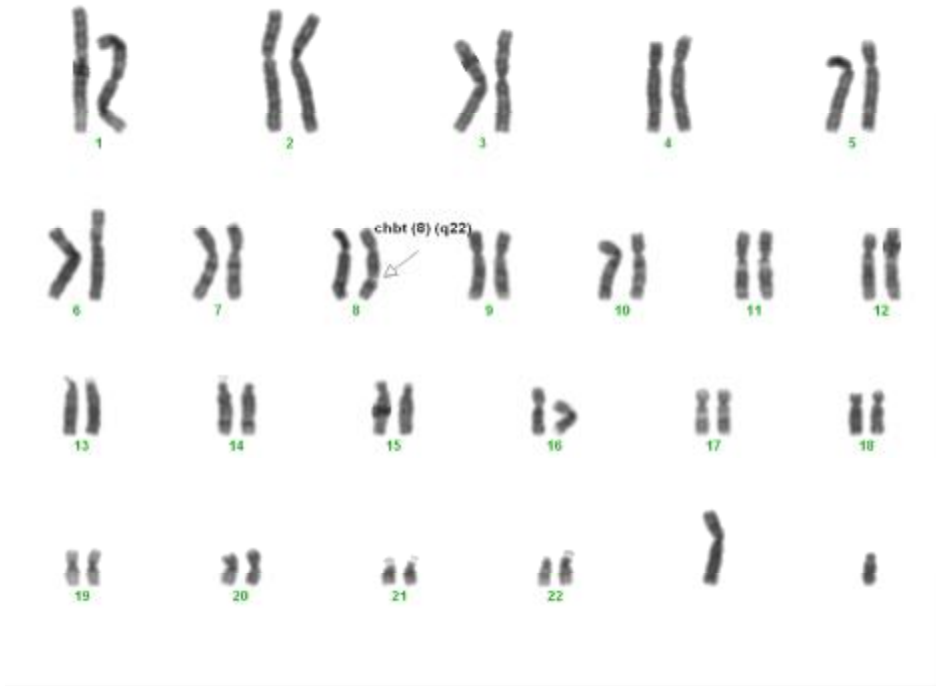
Şekil 14. 14 nolu hastada Xq27.3 de frajilite ve 11p15.1 de gap bölgesi



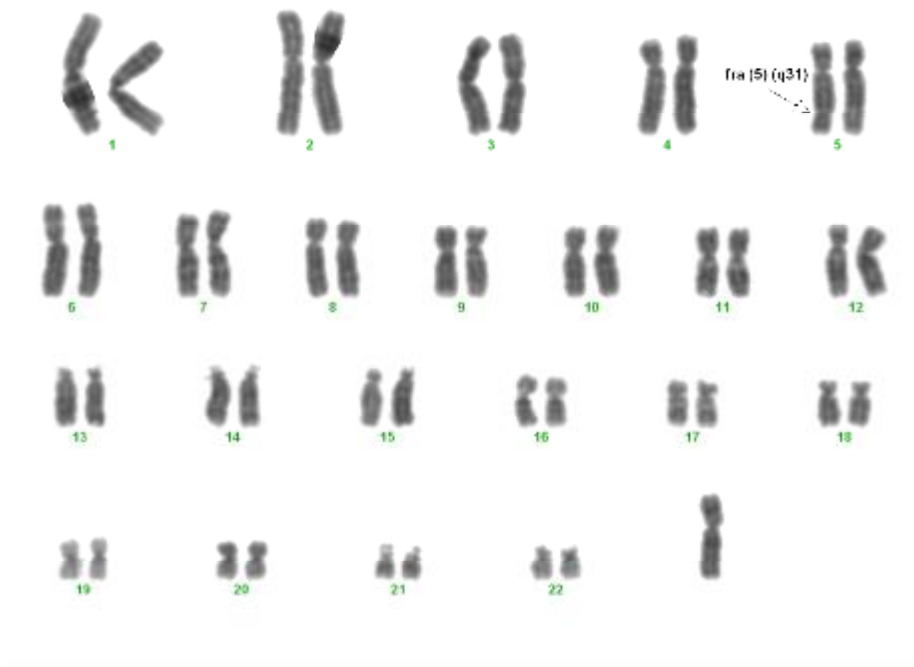
Şekil 15. 14 nolu hastada Xq27.3 de frajil bölge



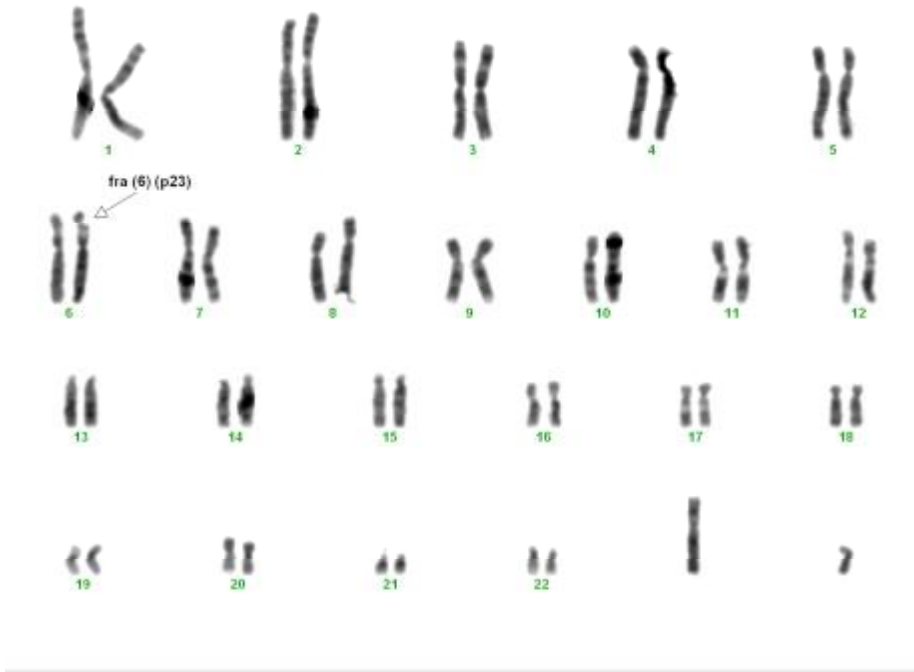
Şekil 16. 14 nolu hastada Xp22 de frajil bölge



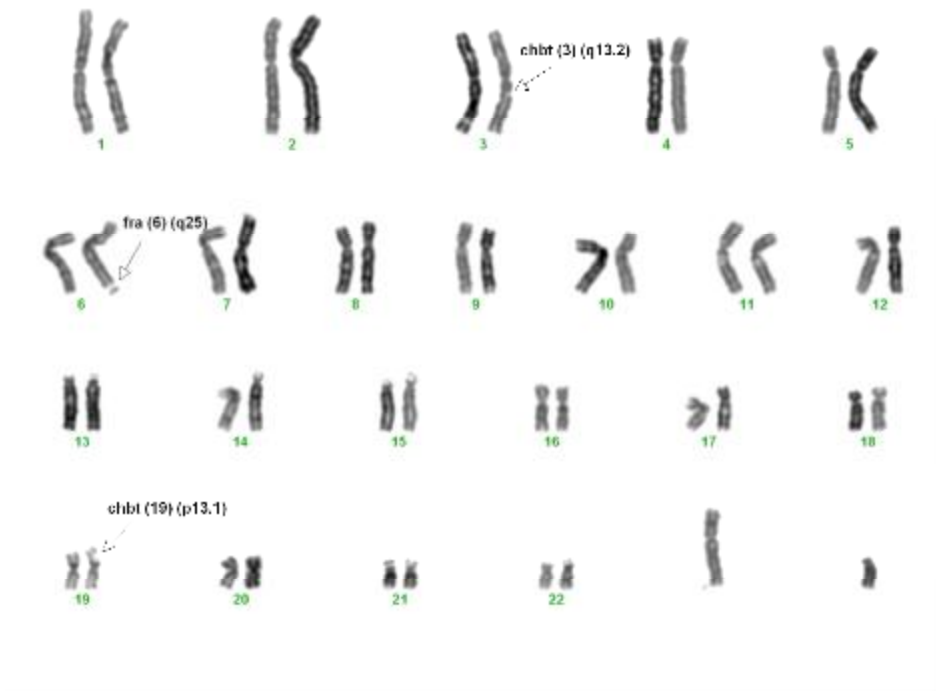
Şekil 17. 14 nolu hastada 8q22 de kromatid kırığı bölgesi



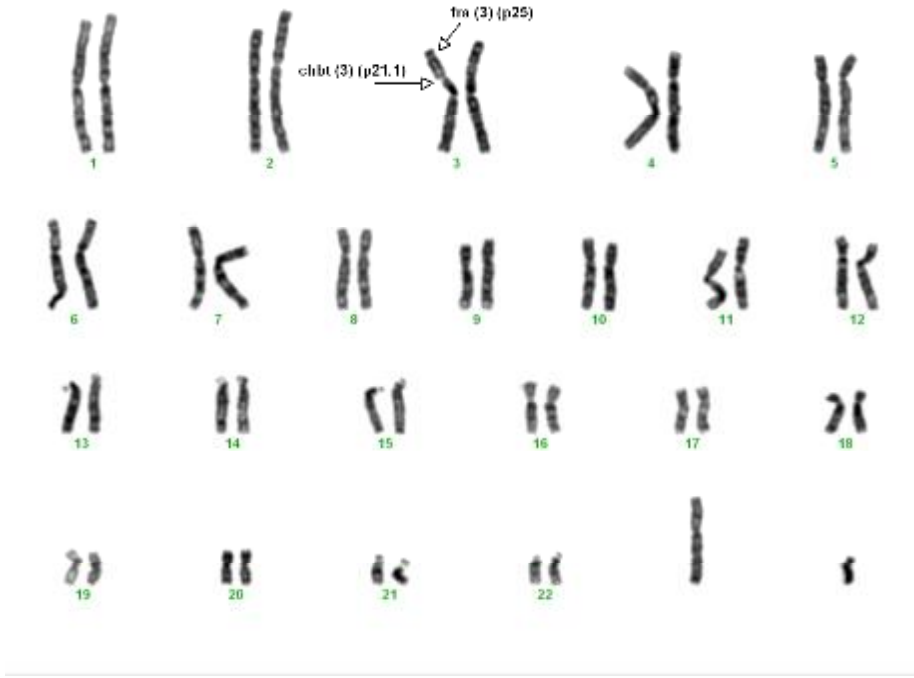
Şekil 18. 14 nolu hastada 5q31 de frajil bölge



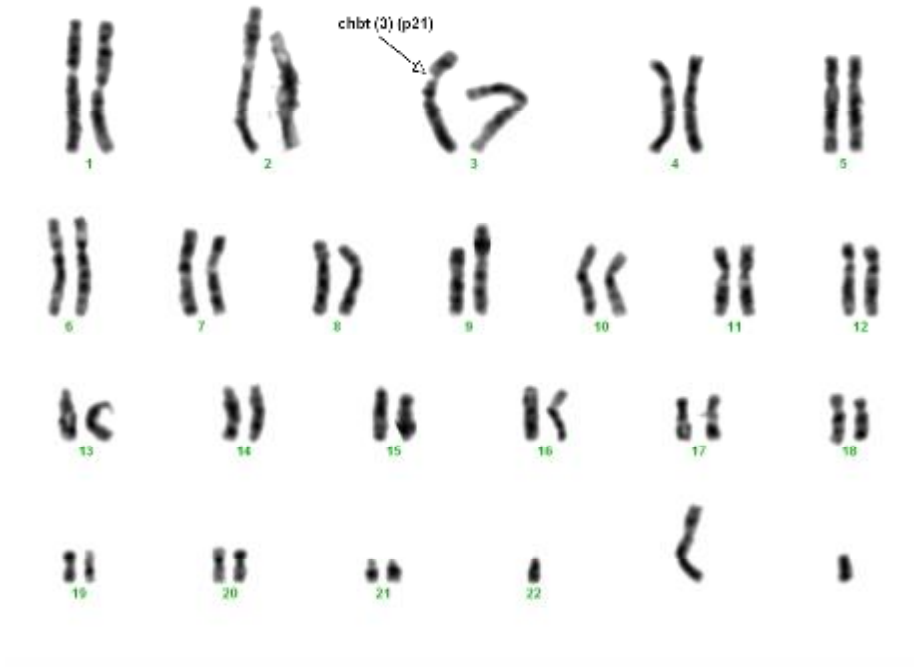
Şekil 19. 14 nolu hastada 6p23 de frajil bölge



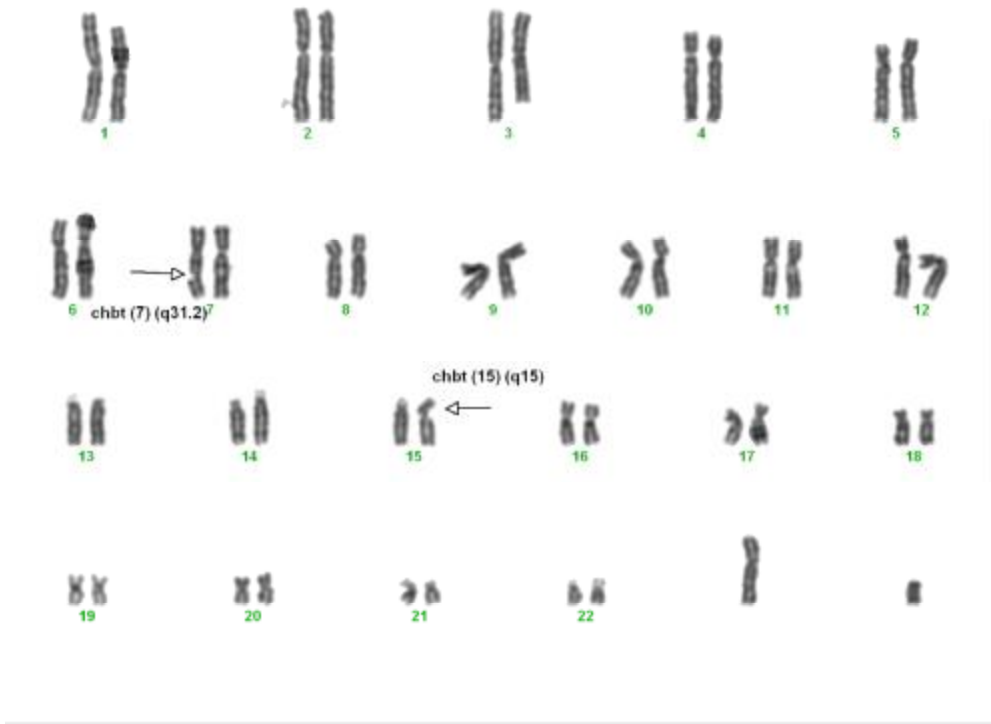
Şekil 20. 15 nolu hastada 6q25 de frajilite, 3q13.2 ve 19p13.1 de kromatid kırığı bölgesi



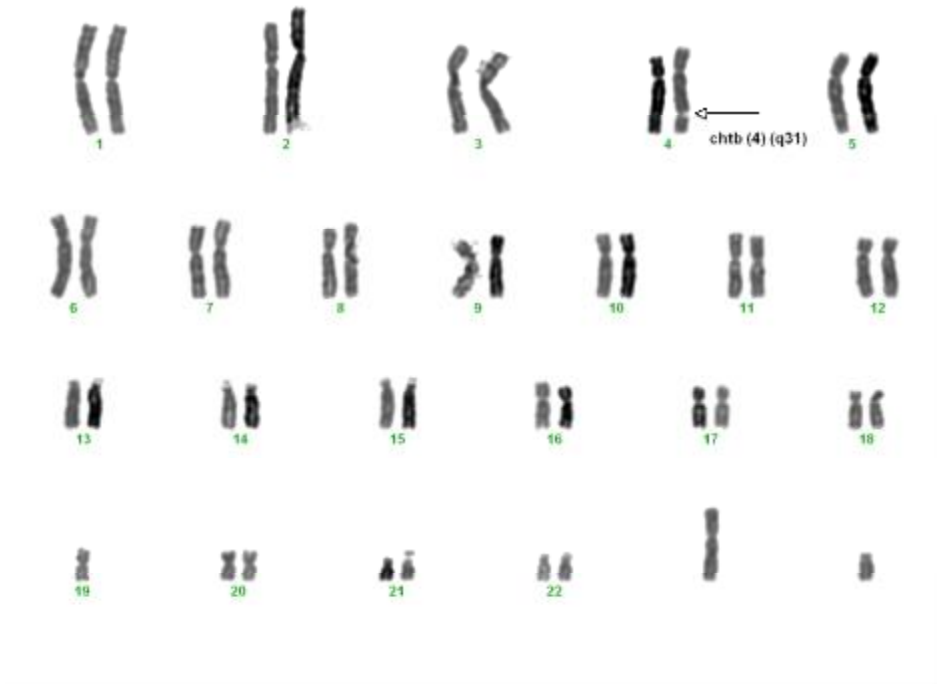
Şekil 21. 15 nolu hastada 3p21.1 de kromatid kırığı bölgesi ve 3p25 de fragilite



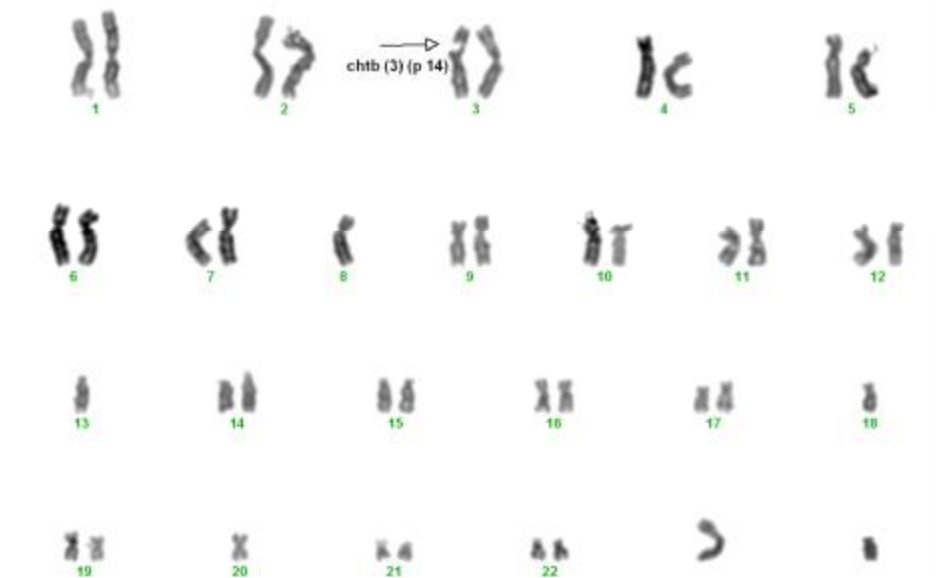
Şekil 22. 15 nolu hastada 3p21 de kromatid kırığı bölgesi



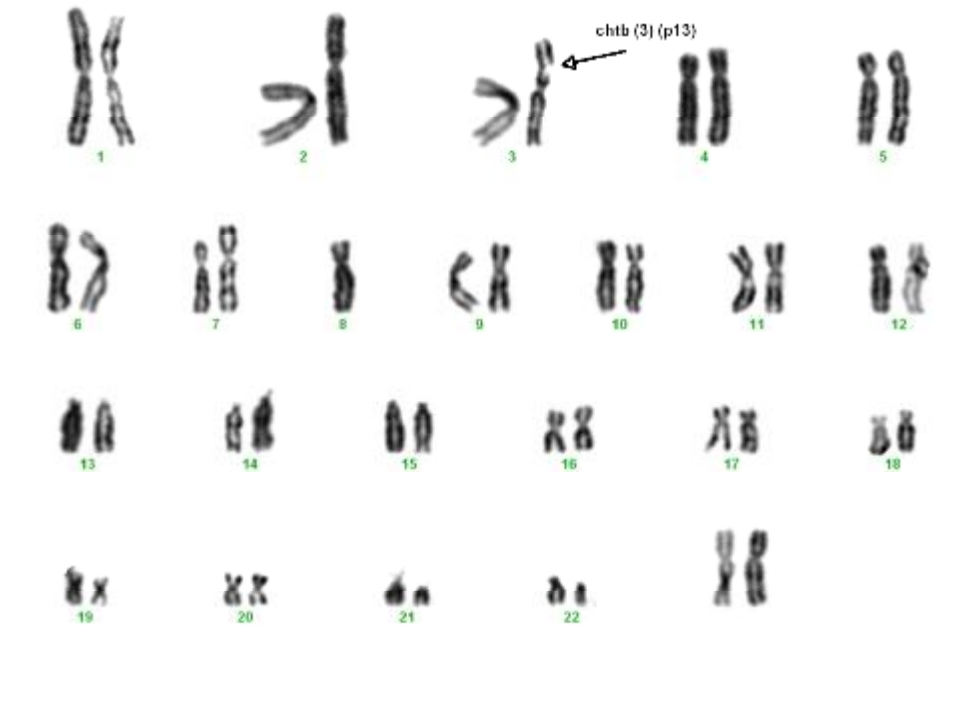
Şekil 23. 15 nolu hastada 7q31.2 de ve 15q15 de kromatid kırığı bölgesi



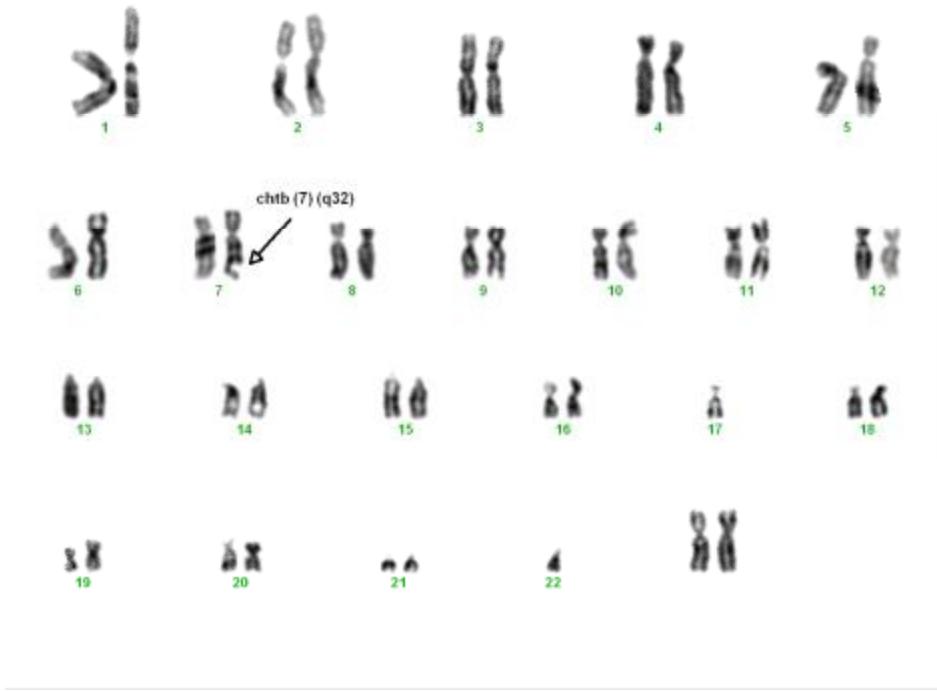
Şekil 24. 15 nolu hastada 4q31 de kromatid kırığı bölgesi



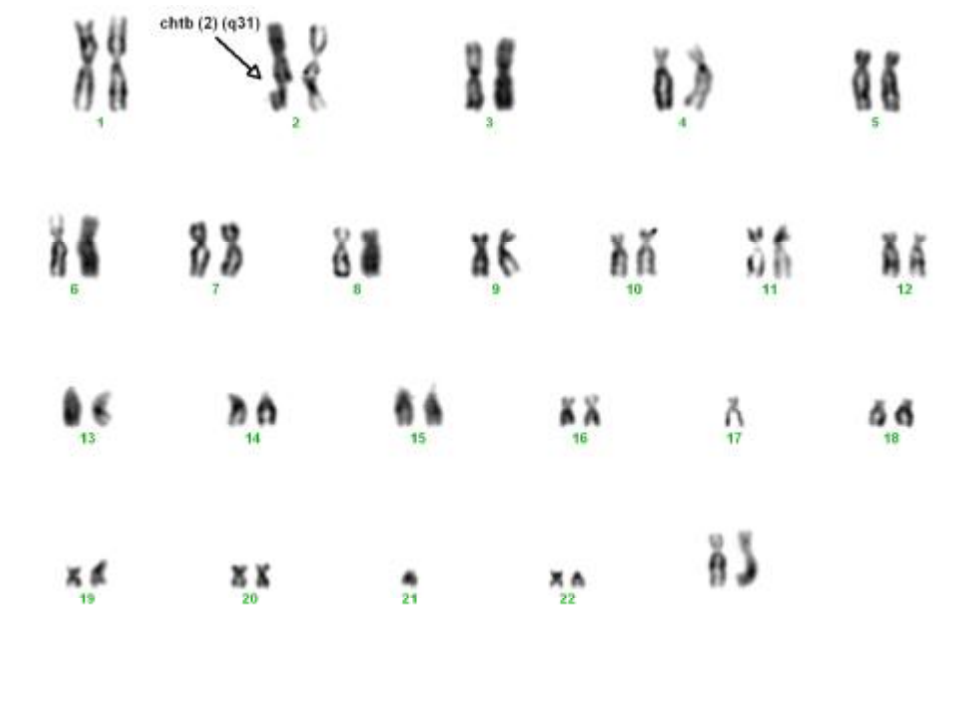
Şekil 25. 15 nolu hastada 3p14 de kromatid kırığı bölgesi



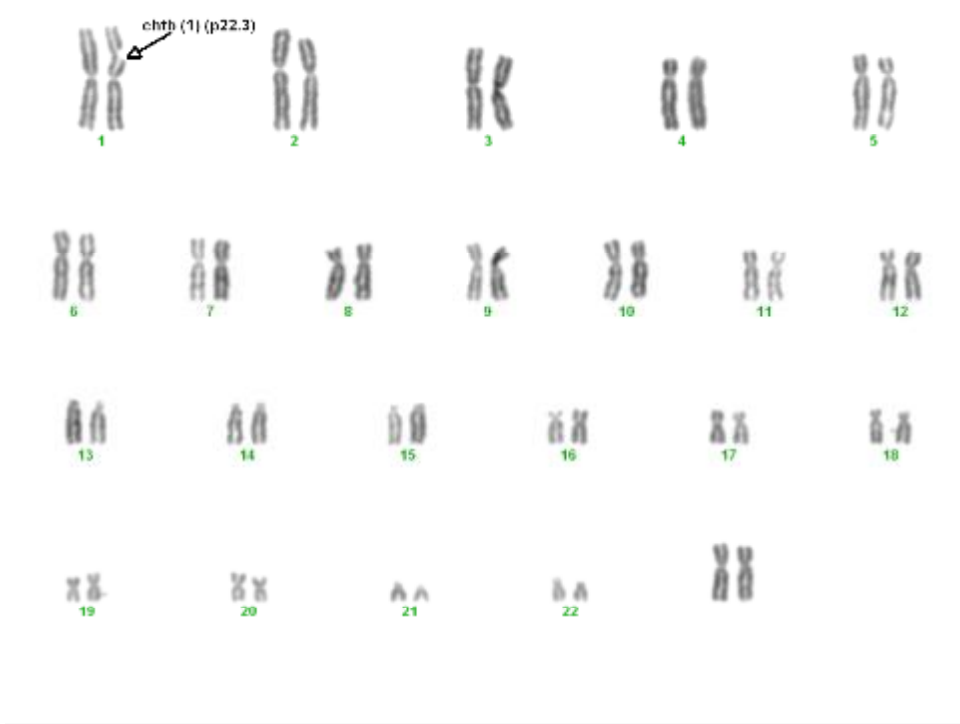
Şekil 26. 16 nolu hastada 3p13 de kromatid kırığı bölgesi



Şekil 27. 16 nolu hastada 7q32 de kromatid kırığı bölgesi



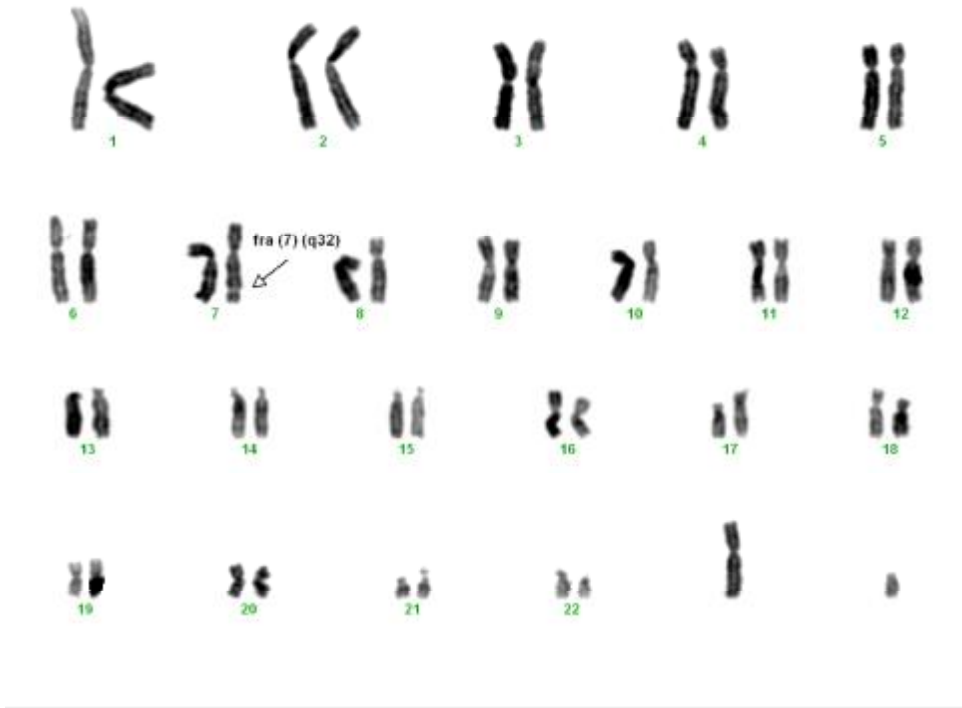
Şekil 28. 16 nolu hastada 2q31 de kromatid kırığı bölgesi



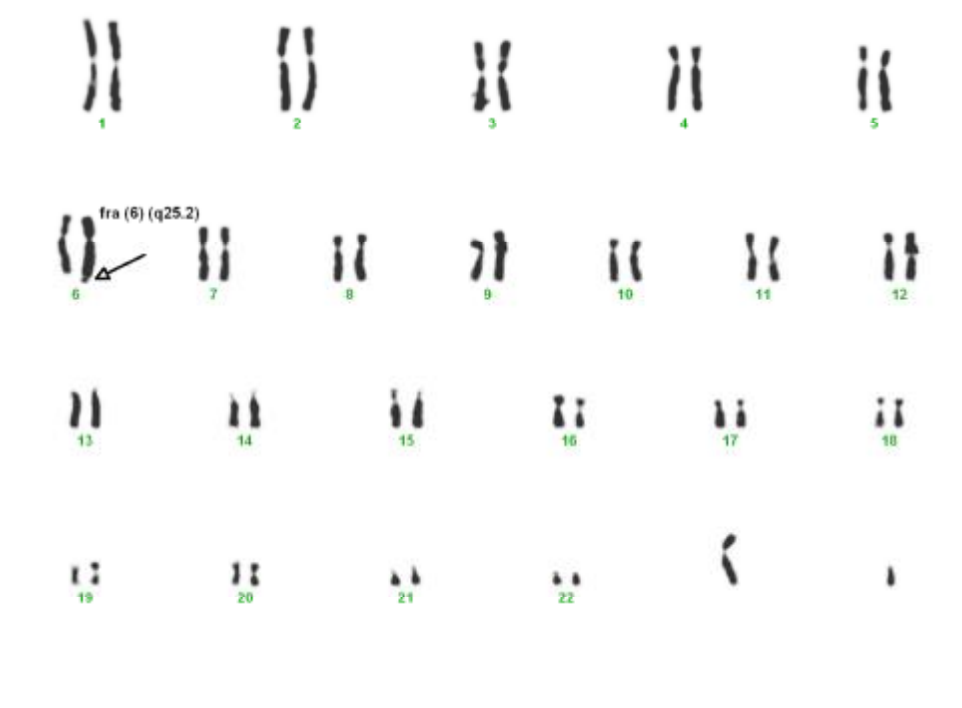
Şekil 29. 16 nolu hastada 1p22.3 de kromatid kırığı bölgesi



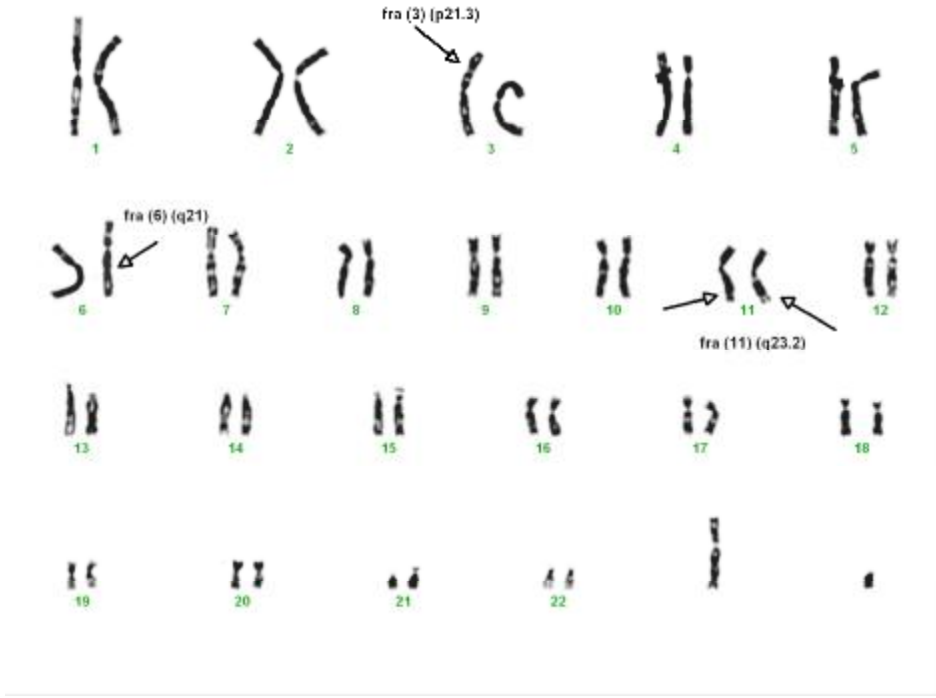
Şekil 30. 16 nolu hastada 9q22.1 de kromatid kırığı bölgesi



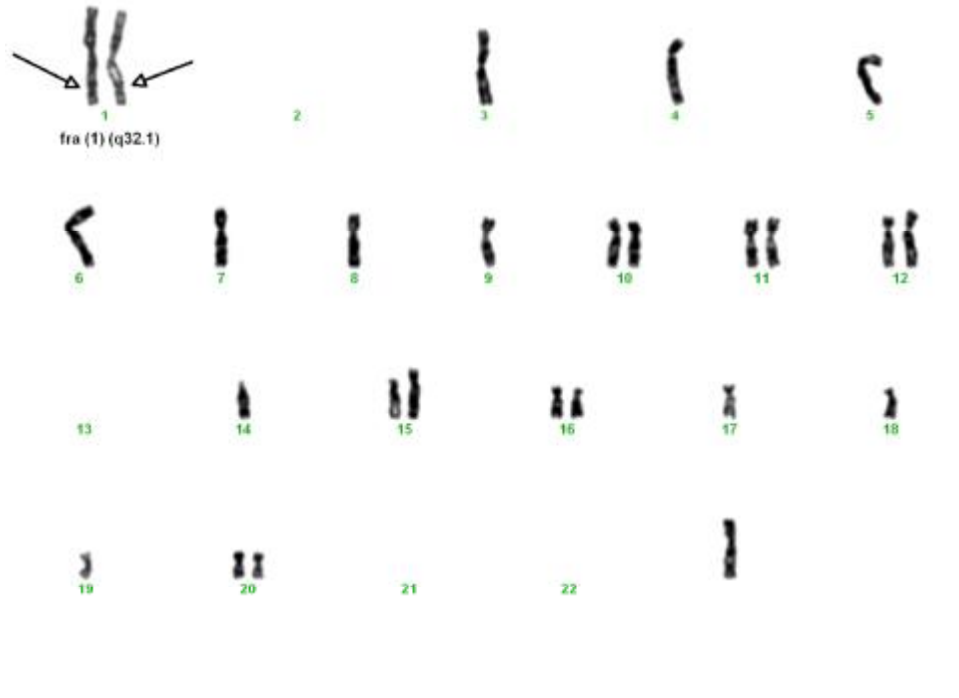
Şekil 31. 18 nolu hastada 7q32 de frajil bölge



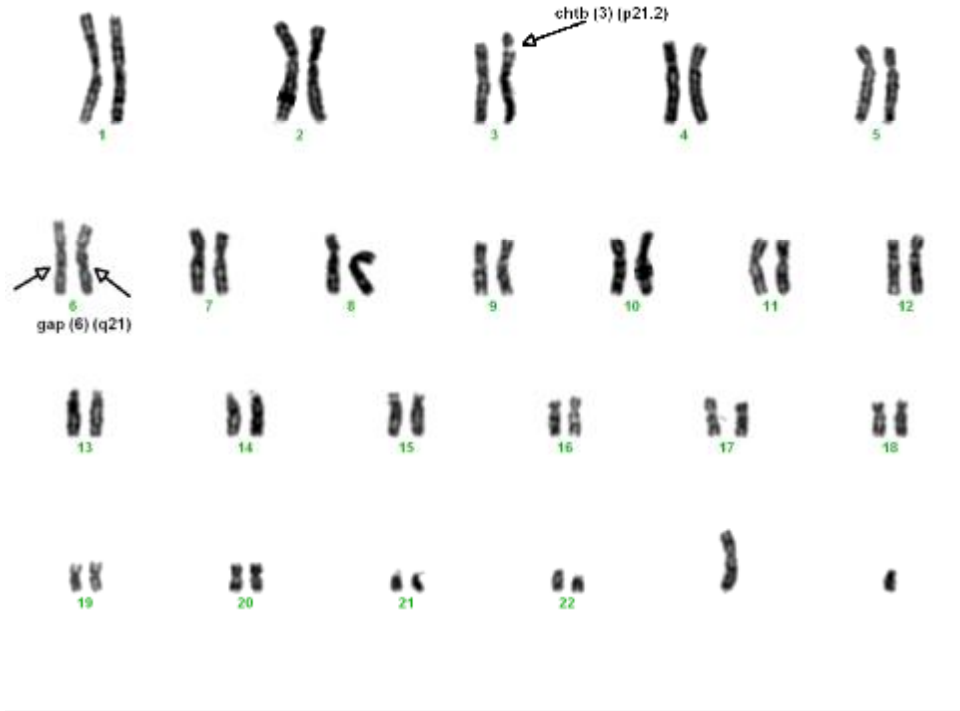
Şekil 32. 19 nolu hastada 6q25.2 de frajil bölge



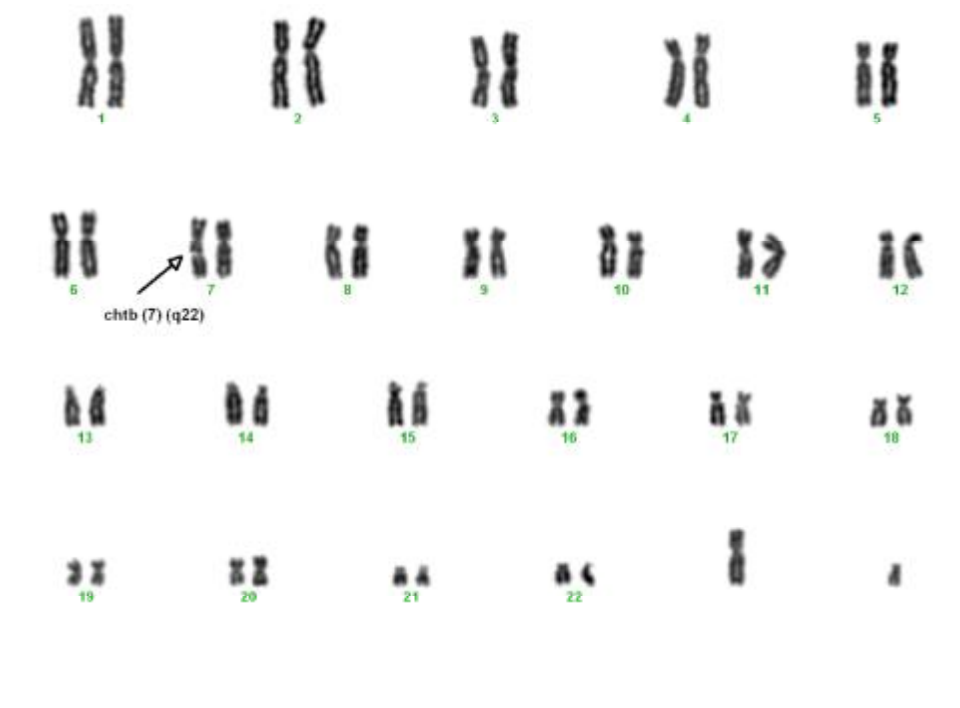
Şekil 33. 19 nolu hastada 3p21.3, 6q21 ve 11q23.2 de fragil bölge



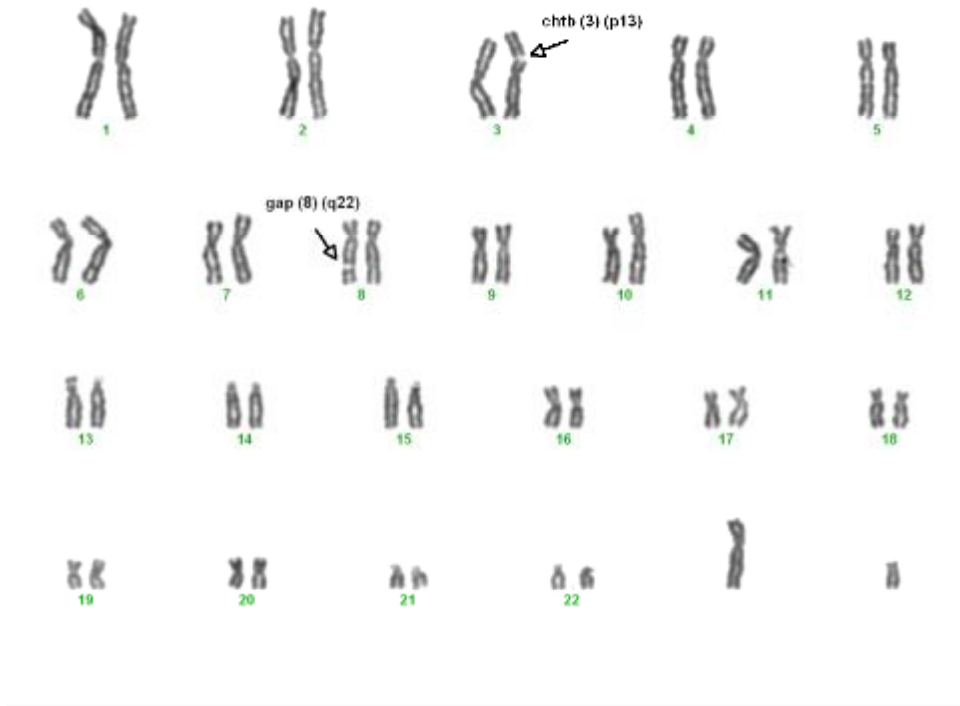
Şekil 34. 19 nolu hastada 1q32.1 de fragil bölge



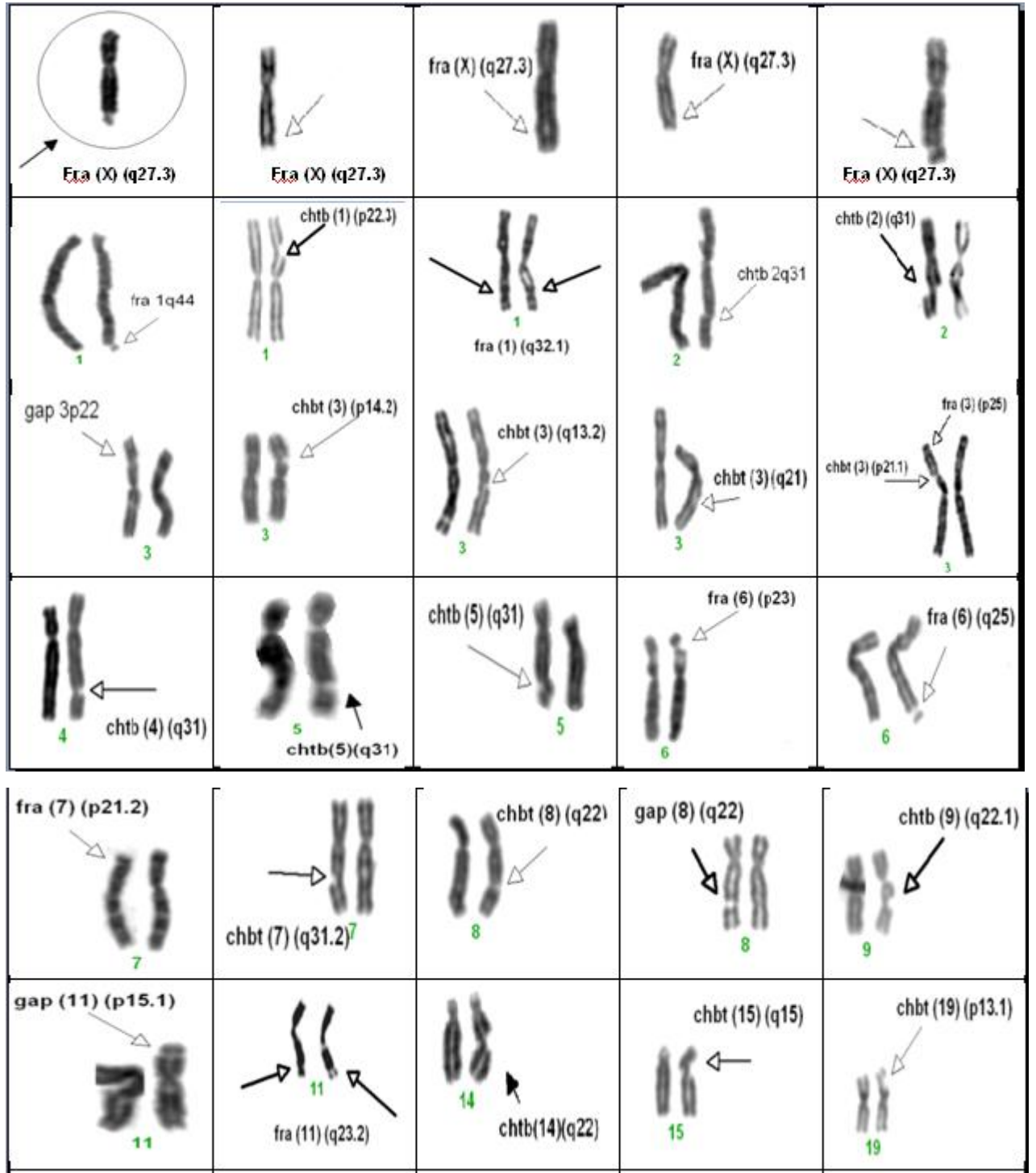
Şekil 35. 19 nolu hastada 3p21.2 de kromatid kırığı ve 6q21 de gap bölgesi



Şekil 36. 19 nolu hastada 7q22 de kromatid kırığı bölgesi



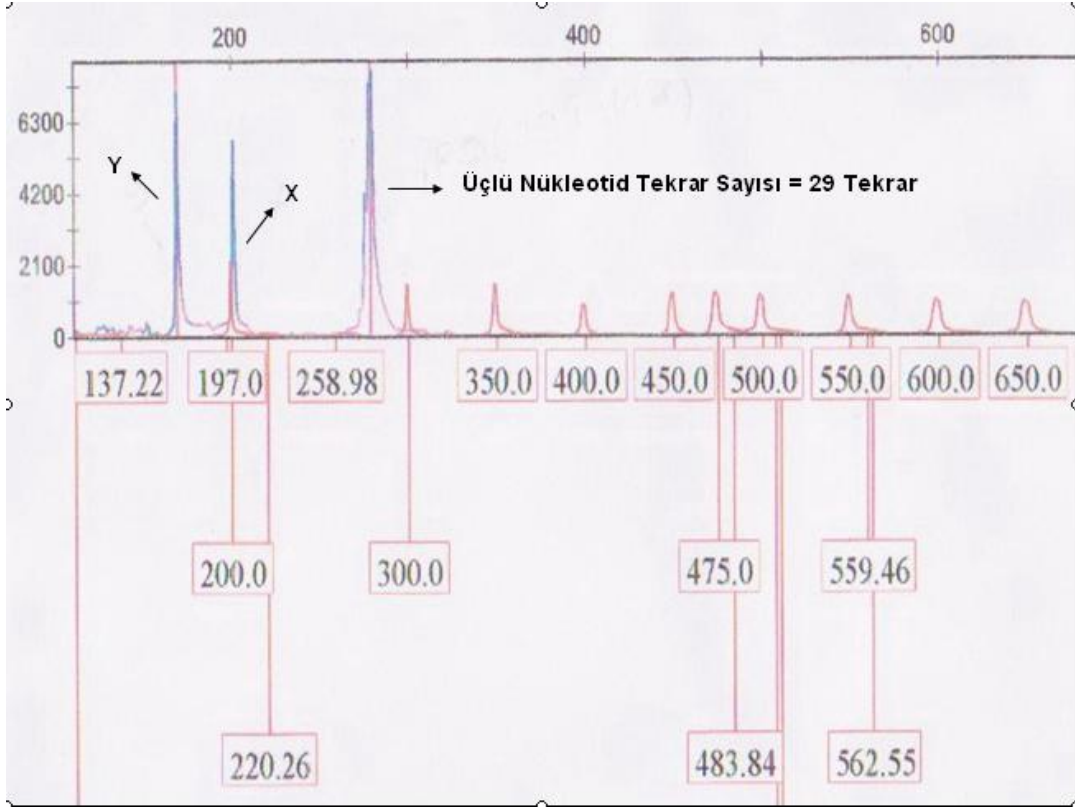
Şekil 37. 19 nolu hastada 3p13 de kromatid kırığı ve 8q22 de gap bölgesi



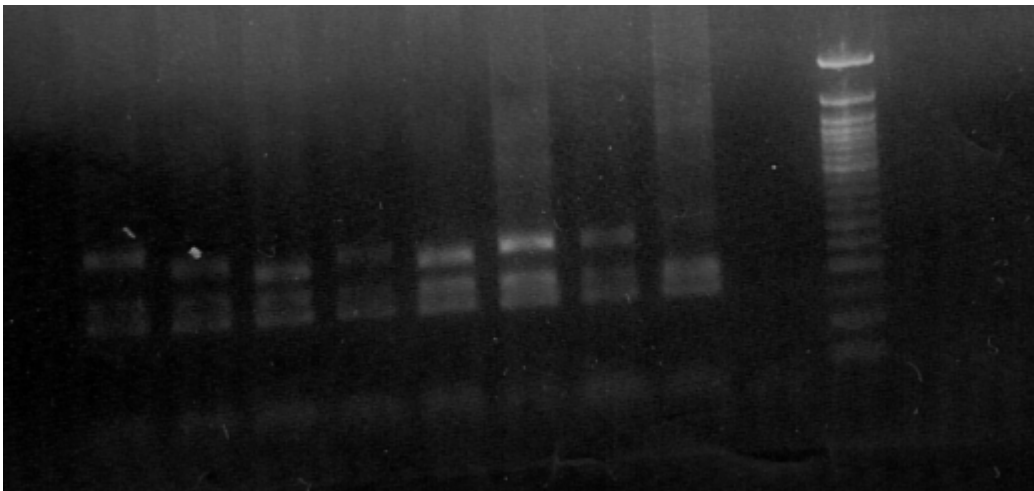
Şekil 38. İncelenen hastalarda rastlanan kromozom hasarlarının kısmi görünümüleri

4.1.2. Araştırma Grubunun FMR-1 Geni Moleküler Genetik Analiz Bulguları

Yirmi altı vakada yapılan FMR-1 geninin moleküler genetik analizleri sonucunda, tüm çocukların CGG tekrar sayılarının normal sayılarda olduğu (21 ile 39 CGG tekrar arasında), premutasyon taşıyıcıları yada tam mutasyonlu bireylerin bulunmadığı rapor edildi (Çizelge 2).



Şekil 39. Normal bir hastaya ait FMR-1 geninin CGG tekrar dizilerinin moleküler analiz sonucu



Şekil 40. Bazı hastaların çoğaltılan bölgelerinin agaroz jel görüntüsü

5. TARTIŞMA

Kromozom düzensizlikleri, ZG'nin (Zeka Geriliği) önemli bir nedeni olup görülme sıklığı ZG şiddetine bağlı olarak artmaktadır³⁵. ZG'nin en önemli nedenlerinden birisi olan FXS'nun tanınması; tanınan olguların izlenmesi ve en önemlisi ailede riskli bireylerin saptanarak prenatal tanı ile yeni olguların ortaya çıkmasını önlemek açısından önemlidir. FXS, oldukça karmaşık ve X kromozomu ile bağlantılı kalıtım gösteren genetik bir hastalıktır. FXS'lu erkek çocuklarının hemen hepsinde, hafiften ciddiye kadar değişebilen farklı derecelerde öğrenme güçlüğüne rastlanır. Kız çocuklarının ve kadınların çoğunun zekası normaldir. Ancak, neredeyse üçte birinde öğrenme sorunları görülmektedir.

Frajlil X ailelerinde yapılan pedigril analizlerinde, hastalığın görülme olasılıkları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Klinik olarak etkilenmiş ve sitogenetik olarak Xq27.3'te frajlilite gösterilmiş erkek olguların annelerinin babaları fenotipik ve sitogenetik olarak normaldir ve normal taşıyıcı bu erkeklerin erkek çocukları normal iken, kızlarının erkek çocuklarının %79'unda, erkek kardeşlerinde ise %18 oranında hastalık riski olduğu bildirilmiştir³¹. Frajlil X taşıyıcısı annelerin fenotipine bağlı olarak ZG riski değişmektedir. Hafif ZG taşıyıcı bir annenin oğlunun ZG'li olma olasılığı %50, buna karşın kız çocuklarının hastalık riski %28, normal taşıyıcı kadınların erkek çocuklarının hasta olma olasılığı %38 ve kız çocukları için risk %16'dır. Pedigril analizleri ile gözlenen ve klasik X'e bağlı resesif kalıtım modeline uymayan bu durum, Opitz (1986) tarafından "Sherman paradoksu" olarak isimlendirilmiştir. FXS'lu hastalarda frajlil bölgeler, sitogenetik analizlerle tespit edilebilir. X ve otozomal kromozomlar üzerinde, farklı yerlerde folata duyarlı frajlil bölgeler bulunmaktadır. Bunların bazıları ZG ile ilişkilidir. Günümüzde, tanı için kesin sonuç veren moleküler genetik analizler tercih edilmekte ve kullanılmaktadır. Çalışmamızda hem sitogenetik hem de moleküler genetik analizler kullanıldı. Sitogenetik analizleri yapılan 107 hasta çocuğun %7.5'inde X kromozomunda frajlilite saptandı. Bu çocuklarda frajlil X oranı, erkek çocuklarda %4.7 ve kızlarda %2.8 olarak tespit edildi (Çizelge 1). Moleküler genetik analizlerde ise 26 hastada FMR 1 genindeki CGG üçlü nükleotid tekrarlarının normal düzeylerde (21-39 nükleotid tekrar sayısı) olduğu bulundu. Daha önce, Demirhan ve arkadaşları (2003) 120 psikiyatrik hasta çocuk üzerinde yaptıkları sitogenetik bir çalışmada, frajlil X oranını %11.7 olarak rapor etmişlerdir⁴¹. Bununla birlikte, diğer kromozomlarda pek çok kromozom hasarına rastlamışlardır. Özbey ve arkadaşları tarafından yakın bir tarihte

yapılan çalışmada (2006); ZG'li 72 hasta, fragil X açısından sitogenetik ve moleküler analizler ile değerlendirildi, hastaların %16.7'sinde kromozom düzensizliği ve %9.7'sinde moleküler analiz ile fragil X pozitif sonuç tespit edildi. Bununla birlikte; fragil X pozitif hastaların %4.1'inin tam mutasyon ve %5.5'inin premutasyon taşıyıcısı oldukları bildirildi. Tunçbilek ve arkadaşları ise 232 ZG'li hastada skorlama yapılmaksızın moleküler yöntemle erkek hastaların %5,2'sinde FXS'nu ve annelerin tümünün premutasyon taşıyıcısı olduğunu rapor ettiler³⁶. Çalışmamızdaki fragil X oranı, diğer çalışmalardaki bulgular ile benzer değerde çıkmaktadır.

Rehabilitasyon merkezlerinden seçilen, fragil X şüphesi taşıyan 82 çocuk ve 72 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan sitogenetik ve moleküler genetik bir çalışmada ise hasta grubunda CGG tekrar sayısının 7 ila 60 arasında değiştiği, en sık gözlenen allelin 31 tekrar dizisine sahip olduğu ve sadece bir erkek çocukta premutasyon (60 tekrar) alleli bulunduğu bildirildi. Hasta çocuğa ait aile çalışmasında; iki erkek ve bir kız kardeşin de tam mutasyona (hasta), diğer kız kardeşin ve annenin ise premutasyona sahip olduğu rapor edildi. Aynı hasta çocukların sitogenetik analizlerinde ise tam mutasyonlu kişinin fragil X pozitif (%12) olduğu ve FXS'nun sıklığının incelenen popülasyonda yaklaşık %1 olduğu bildirildi¹⁸. Çalışmamızda ise fragil X şüphesi taşıyan ve Çocuk Nöroloji kliniğine ZG nedeniyle başvuran 107 çocuktan 26'sının moleküler genetik analizlerinde FMR 1 genindeki CGG üçlü nükleotid tekrar sayılarının 21 ila 39 arasında değiştiği ve en sık gözlenen (%50) allelin 29 tekrarlı olduğu belirlendi. Bunun sonucunda; sitogenetik olarak pozitif çıkan 2 hastanın normal tekrar sayılarına sahip olduğu yani hasta olmadıkları gösterildi. Hasta grubumuzda premutasyon ve tam mutasyonun gözlenememesi imkanların kısıtlı olmasından dolayı incelenen hasta sayısının az olmasına bağlanabilir.

Çalışmamızda bulduğumuz diğer kromozom düzensizlikleri arasında; 13 hastada yüksek oranda (%6 ile %20 arasında) otozomal fragiliteye rastlandı. İncelen 1070 hücrede, X kromozomu dışında diğer kromozomlardaki hasar oranı %13.7 olarak bulundu. Yapılan bir çalışmada; kromozom düzensizliklerin görülme sıklığının %11.3 olduğu, yapısal düzensizliklerin kız çocuklarına oranla erkek çocuklarda daha sık görüldüğü, erkek çocukların yapısal anormalliklere daha fazla yatkınlık gösterdiği ve konuşma yeteneği, zeka, sosyal ve fiziksel gelişim ile ilgili problemlerin kromozom analizi için temel klinik neden olabileceği ortaya konmuştur³⁷. Özbey ve arkadaşları ise (2006), Elazığ bölgesindeki ZG'li hastalarda, kromozom düzensizliklerinin yoğunluğunu %16.6 olarak bildirdiler⁴⁰. Bu çalışmalarda

bulunan kromozom düzensizliklerinin görülme sıklığı ile çalışmamızdaki oran benzerlik göstermektedir. Anormal kromozoma sahip bireyler arasında en yaygın olarak görülen klinik bulgu ZG'dir. Yapılan çalışmalarda; genç hastalarda yapısal kromozom düzensizliklerinin sayısal düzensizliklere göre daha fazla oranda tespit edildiği ortaya konmuş, yapısal düzensizliklerin görülme oranı %16 iken sayısal olanları %5.17 olarak bildirilmiştir⁴⁰. Bu durum, klinik uygulamada önemlidir. Psikiyatri ve Çocuk Nöroloji uzmanları; böyle anormalliklerin olabilme olasılığını göz önünde bulundurmalı ve genetikçilerle iş birliği içinde olmalıdırlar. Klinik olarak FXS tanısı atlanabileceği için, ZG'li çocuklara DNA analizini içeren kromozom çalışmaları yapılmalıdır. Klinik tanı, yeni doğan ve bebeklik çağında güç olabilir. Hastalığın fiziksel özellikleri yaş ile birlikte belirgin hale gelir. ZG'li erkeklerin, FXS yönünden de değerlendirilmesi gerekmektedir³⁸. Etiyolojisi bilinmeyen ZG ve ZG aile hikayesi olan hastalarda, FXS'na yönelik sitogenetik inceleme gereklidir. Sitogenetik analiz etkilenmiş erkeklerin saptanmasında faydalı bir yöntem olmasına rağmen, DNA-dayalı moleküler analizler hem tam mutasyon hem de premutasyon taşıyıcılarının tanımlanmasına imkan sağlar³⁹.

Günümüzde, doğum öncesi ve sonrası yapılan kromozom analizlerinde görülen en yaygın kromozom düzensizliği, kromozom 9'un perisentrik inversiyonudur (inv(9)(p11;q11-13). Kromozom 9'un yapısal düzenlenmelere çok fazla yatkınlık gösterdiği bilinmektedir. Perisentrik inversiyon, genel popülasyonda sık olarak (%1-3 arası) görülmektedir. ZG'de, şizofrenide, konjenital malformasyonda ve tekrarlayan düşüklerde tespit edilmiştir⁴¹. Klinik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Perisentrik inversiyon gibi polimorfizmlerin normal varyantlar olduğu düşünülmektedir⁴². Çalışmamızda; 1 hastada (%0.9) inversiyon 9 (hasta no: 91) tespit edildi. Özbey ve arkadaşları (2006) ise bu inversiyonu, ZG'li çocukların %2.8'inde (2/72) rapor ettiler⁴⁰. Bu hastalarda ZG'nin, inversiyon 9'a bağlı olup olmadığını söylemek zordur. Çünkü, bu oranlar normal popülasyonda görülen değerlerdedir. Bu hastalarda, değerlendirme yapılırken inversiyonun bir kromozom hasarı mı yoksa kromozomun polimorfik varyantı mı olduğunu saptamak zordur. Böyle bir sonuca varmak için çok geniş popülasyonların taranması gereklidir.

Sonuç olarak; çalışmamızdaki sitogenetik frajil X sıklığı (%7.5) ile diğer çalışmaların sonuçları arasında bir uyum bulunmaktadır. FXS'nun moleküler genetik oranının anlamlı çıkması için daha çok hastanın çalışılmasına gerek vardır. Bununla birlikte, bu hastalarda otozomal kromozom düzensizliklerinin sıklığı (%13.7) artmakta ve bu oran önem arz

etmektedir. Öyküsü bilinmeyen ZG’de, gelişme bozukluğu, konuşma güçlüğü olan çocuklarda ve ZG aile hikayesi olan hastalarda, FXS’na yönelik sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler gereklidir. Böylece, gerekli bireylere uygun genetik danışma verilerek kişinin kendisinin, ailesinin ve gelecek kuşakların hastalık hakkında bilgi sahibi olması sağlanabilir. Ayrıca, populasyonlar arası çalışmalar bazı bozuklukların aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, sitogenetik ve moleküler genetik analizleri yapılan 107 ZG'li hastadan elde edilen sonuçlara göre: Frajil X hastalığının tanısında sitogenetik test gereklidir ancak moleküler genetik analizlerle desteklenmesi zorunludur. Çünkü, premutasyon taşıyıcılarında ve bazı hasta dişilerde sitogenetik frajilite gözlenmemektedir. FXS tanısı koymak önemlidir, böylece hastalıktan etkilenen çocukların risk altında bulunan akrabaları; genetik danışmanlık, taşıyıcı testi ve doğum öncesi tanı gibi hizmetlerden yararlanabilir. Bununla birlikte, bu hastalarda otozomal kromozom düzensizliklerinin sıklığı önemli oranda artmaktadır. Bu nedenle, ZG'li çocuklarda FXS tanısı yanında otozomal kromozom düzensizlikleri de incelenmelidir. Nitekim, otozomal düzensizlikler ile ZG arasında bir ilişkinin bulunduğu bilinmektedir. Öyküsü bilinmeyen ZG, gelişme bozukluğu ve konuşma güçlüğü olan çocuklar ve ZG aile hikayesi olan hastalarda, FXS'na yönelik sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler gereklidir. Bu yolla çocuk eğitimi, konuşma ve dil gelişimi, davranış gibi alanlarda uzman yardımı alınabilir. Bu nedenle, Psikiyatri ve Çocuk Nörolojisi uzmanları, böyle anormalliklerin olabilme olasılığını göz önünde bulundurmalı ve genetik uzmanları ile iş birliği içinde olmalıdırlar. Premutasyon taşıyıcıları tespit edilmeli, hasta olmadıklarına dair bilgi verilmeli ve hastalığın sonraki nesillerde ortaya çıkabileceği yani doğacak çocuklarında risk faktörü bulunduğu genetik danışma verilerek uygun bir şekilde anlatılmalıdır. Ayrıca, bu kişilere ilerleyen yaşlarında frajil X bağlantılı bazı hastalıklarla karşılaşabilecekleri anlatılmalıdır. Hasta bireylerin aileleri ise detaylı bir şekilde genetik taramadan geçirilmelidir. Hasta birey, ailesinin aracılığıyla uygun rehabilitasyon merkezlerine yönlendirilip topluma kazandırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Gersen S. L.** The Principles of Clinical Cytogenetics, **2000**.
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=300624> **Eriřim Tarihi:** 8 Mayıs **2009**.
3. <http://fragilex.org/> **Eriřim Tarihi:** 9 Mayıs **2009**.
4. **Yao S. F.** Molecular Cytogenetics, **2002**.
5. **Passarge E.** Color Atlas of Genetics, **1995**; 336-337.
6. <http://www.gen.hun.edu.tr/frajil/> **Eriřim Tarihi:** 9 Mayıs **2009**.
7. **Basehore MJ, Friez MJ.** Molecular analysis of Fragile X syndrome, Curr Protoc Hum Genet. **2008**.
8. **Pieretti M, Zhang F.** Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. Cell, **1991**.
9. **D'Hulst C, Kooy RF.** Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy. J Med Genet. **2008**.
10. **Merlin LR.** The Fragile X Mental Retardation Protein: A Valuable Partner in the Battle against Epileptogenesis. Epilepsy Curr. **2008**.
11. **Paul J. Hagerman** Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research. **2008**.
12. **Turner G, Webb T.** Prevalence of Fragile X syndrome. Am J Med Genet. **1996**.
13. **JS Sutcliffe, DL Nelson** DNA methylation represses FMR-1 transcription in FXS.
14. **Abrams, M.T., Reiss, A.L., Freund, L.S., Baumgardner, T.L., Chase, G.A., Denckla, M.B.** Molecular-Neurobehavioral associations in females with in females with the fragile X full mutation. *Am J. Med. Genet.*, **1994**; 51,317-327.
15. **Abithol, M., Menini, C, Delezoide, A.L., Rhyner, T., Vekemans, M., Mallet, J.** Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat. Genet.*, 4,147-153.

16. **Antequera, F., Boyes, J., Bird, A.** High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, 503-514.
17. **Opitz, J.M.** On the gates of hell and a most unusual gene. *Am. J. Med Genet*, 23, **1986**.
18. **Kara N.** Frajl X Sendromlu Hastaların ve Taşıyıcıların Tanısında Sitogenetik ve Moleküler Genetik Yöntemlerin Kullanılması, Samsun, **1999**.
19. **Hagerman, R.J., Cronister, A.** *Fragile X Syndrome: Diagnosis. Treatment and Research. Second Edit.*, Baltimore, The Jhon Hopkins Univ. Press. 193-209.
20. **Macpherson, J.N., Nelson, D.L., Jacobs, P.A.** Frequent small amplification in the FMR-1 gene in fra(X) families: limits to the diagnosis of 'premutations'. *J. Med Gertet.*, 29, **1992**.
21. **Loesch, D.Z., Huggins, R, Petrovic, V, Slater, H.** Expansion of the CGG repeat in fragile X in the FMRI gene depends on sex of the offspring. *Am. J. Hum. Genet.*, 57, **1995**.
22. **Antequera, F., Bird, A.** Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 90, **1993**.
23. **Lindenbaum, R.H., Winter, R, Pembry, M., Thibodeau, S., Davies, K.E.** Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile x syndrome. *Cell*, 64, **1991**; 861-866.
24. **Brown, W.T.** Molecular analysis of fragile X syndrome. *Current Protocols in Human Genetics*. New York, Wiley, pp, **1994**; 9-14.
25. **Brown, W.T.** The molecular biology of the fragile X mutation: in *Fragile X Syndrome. Diagnosis, Treatment and Research*.
26. **Chiurazzi, P., Grazia Pomponi, M., Willemsen, R, Oostra, B.A., Neri, G.** In vitro reactivation of the FMRI gene involved in fragile X syndrome, **1998**.
27. **Hagerman, R.J., Cronister, A.** *Fragile X Syndrome: Diagnosis,. Treatment and Research* Second Edit., Baltimore, John Hopkins Univ. Press. **1996**; 251.
28. **Darby, J. K., Willems, P.J.** Fmr 1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. *Cell*, **1994**; 23-33.

29. **De Boule, K., Verkerk, A.J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, B., Van Roy, F., Van den Bos, F., De Graaff, E., Oostra, B.A., Willems, P.J.** A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile x mental retardation. *Nature Genet.*, 3, 31-35.
30. **Eichler, E.E., Richards, S., Gibbs, R.A., Nelson, D.L.** Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 1993.
31. **Escalante, J.A., Grunspun, H., Frote-Pessoa, O.** Severe sex-linked mental retardation. *J.Genet. Hum.*, 19,137-140.
32. **Sforza, L.L., Ciaranello, RD.** Molecular analysis and test of linkage between the FMR-1 gene and infantile autism in multiplex families, 1994.
33. **Hecimovic, S., Barisic, L, Müller, A., Petkovic, L, Baric, I., Pavelic, K.** Expand long PCR for fragile X mutation detection, 1997.
34. **Heitz, D., Devys, D., Imbert,G., Kretz, C, Mandel, J.L.** Inheritance of the fragile X syndrome, 1992.
35. **Yasseen AA, Al-Musawi TA.** Cytogenetics study in severely mentally retarded patients. Saudi Med J. 2001;22(5):444-9. 12. **Wassink TH, Piven J, Patil SR.** Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatr Genet.* 2001;11(2):57-63.
36. **Haris JC.** Mental and behavioral disorders. McMillan JA, DeAngelis CD, Feigin RD, Warshaw JB (editors). *Oski's Pediatrics Principles and Practice*. 3rd edition, Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 1999:790-794.
37. **Hong KE, Kim JH, Moon SY, Oh SK.** Chromosomal abnormalities in child psychiatric patients. *J Korean Med Sci.* 1999;14(4):377-85.
38. **Apak MY.** Tıbbi genetik ve genetik hastalıklar. Neyzi O, Ertuğrul T (editörler). *Pediatrici*. 3. baskı, İstanbul. Nobel tıp kitapları, 2002;1:133-162.
39. **Incorpora G, Sorge G, Sorge A, Pavone L.** Epilepsy in fragile X syndrome. *Brain and Development.* 2002; 24:766-9.
40. **Özbey Ü, Yüce H, Kara M, Kabaku N, Elyas H.** Elazığ Bölgesinde Mental Retardasyonlu Çocuklarda Sitogenetik İncelemeler, 2006; 293–296.

41. **Demirhan O, Taştemir D, Diler R, Fırat S, Avcı A.** A Cytogenetic Study in 120 Turkish Children with Intellectual Disability and Characteristics of Fragile X Syndrome. *Yonsei Medical Journal.* **2003**; 583-592.
42. **Hong KE, Kim JH, Moon SY, Oh SK.** Chromosomal abnormalities in child psychiatric patients. *J Korean Med Sci.* **1999**; 377-85.

EKLER

Ek-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning Kataloğu” esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılmıştır.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V).

1.1. Lizis Tamponu

0.32 M sukroz

10 mM Tris

5 mM $MgCl_2$

%1 TritonX100

Hazırlanacak hacim için sukroz, Tris, $MgCl_2$ ve TritonX100 hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.2. Fizyolojik Tampon

0.075 M NaCl

0.025 M EDTA

Hazırlanacak hacim için NaCl ve EDTA hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, pH 7.5-7.4’e ayarlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.3. TE-9

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH 9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris, EDTA, ve NaCl hesaplanarak tartılır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu

%10 SDS

20 ml için 2 gr SDS tartılır, 20 ml saf su ile bir şişe içerisinde iyice karıştırılır.

Kullanıncaya kadar buzdolabında veya oda ısısında tutulabilir.

1.5. TE Tamponu

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.6. M199 Medyumu

100 ml medyum M199

5ml fetal calf serum

1.5 ml fitohemmaglutinin

1.5 ml L-glutamin

1ml penicilin streptomisin

Steril bir ortamda karıştırılır ve +4 derecede saklanır.

EK-2. PCR

PCR ilk kez Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında, Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında icat edilmiştir. PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Her bir PCR döngüsü, reaksiyon karışımının, reaksiyonun gerçekleşmesi için daha önceden belirlenmiş olan en uygun üç sıcaklık derecesi arasında transfer edilmesi ile tamamlanır. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1 000 000 kez artış olur. Reaksiyon boyunca gereken sıcaklık, süre, döngü sayılarını kontrolü ve otomasyonu Thermal Cycler olarak bilinen cihazlarla yapılır. Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere, bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir.

DNA çift sarmalı üzerinde bulunan karşılıklı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak, primerlerin yapışabileceği tek iplikli DNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan sıcaklık denatürasyon sıcaklığıdır (genellikle 94 °C). Burada kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Bu süreç yaklaşık 5 dakikadır ve bu süreçte enzimler çalışmaz.

Primerlerin tek iplikli DNA molekülü üzerinde komplementer olduğu bölgelere hibridize olduğu sıcaklık annealing (yapışma) sıcaklığıdır. Annealing sıcaklığı primer uzunluğuna ve baz içeriğine göre değişir. Reaksiyonun özgülüğü için son derece önemlidir. Primer-kalıp DNA hibridizasyonu sıcaklığa bağlı bir olay olduğundan annealing sıcaklığı hibridizasyonun oluşumunu sağlayacak kadar düşük ve yanlış bağlanmalara izin vermeyecek kadar da yüksek olmalıdır. Bu sıcaklık 50-70 °C arasındadır.

DNA polimeraz için optimum olan sıcaklık ise uzama (sentez) sıcaklığı olarak belirtilir. Bu sıcaklık kullanılan DNA polimerazlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin Taq DNA polimeraz için 72 °C iken Pwo için 68 °C'dir. Polimeraz enzim, nükleotidleri 5'den 3'e doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar.

2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları

2.1.1. Kalıp Genomik DNA

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapar. Yapılacak olan çalışmaya göre herhangi bir canlının kanından ve dokusundan izole edilebilir.

2.1.2. Primerler

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir. Ayrıca polimerizasyon reaksiyonları için DNA polimeraz enzimine primer görevi yaparlar. Primerler sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin kanat bölgelerine komplementer olmalıdır. Aksi takdirde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenebilir. Bu nedenle reaksiyonun istenilen yönde gerçekleşmesini sağlayan en temel faktörlerden biridir ve seçiminde şu hususlara dikkat edilmelidir.

Primer dizisi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.

Kullanılan primerlerin kendi aralarında ve dizileri içerisinde komplementer bölgeler olmamalı.

Timin nükleotidi yanlış eşleşmeye daha toleranslı olduğundan 3' uçlarında bulunmamalı.

T_m'leri aynı veya çok yakın olmalı.

GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı.

Herhangi bir baz 4'den fazla arka arkaya tekrar etmemeli.

2.1.3. Reaksiyon Tamponu

PCR reaksiyonunda, reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (iyonik direnci, pH, Mg⁺² gibi) karışımdır.

2.1.4. DNA Polimeraz

PCR reaksiyonunda polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzimdir. Isıya dayanıklı termofilik bakterilerden izole edildiğinden ötürü yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır.

2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)

PCR reaksiyonunda, polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluşturur.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Adana'da Atatürk İlkokulunda, Orta ve Lise öğrenimini Seyhan Anadolu Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve buradan 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programını kazandı.