



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ-MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MUKOPOLİSAKKARİDOZ TİP I (MPS I) HASTALARINDA IDUA GEN
MUTASYONLARININ ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazente ATÇEKEN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA

AKSARAY, 2013

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KABUL ve ONAY BELGESİ

Nazente ATÇEKEN'in MUKOPOLİSAKKARİDOZ TİP I (MPS I) HASTALARINDA IDUA GEN MUTASYONLARININ ANALİZİ başlıklı lisansüstü tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji-Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Karaca (Aksaray Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Afife İzbirak (Hacettepe Üniversitesi)

Üye : Doç.Dr. Kamile Öztürk (Aksaray Üniversitesi)

Tezin Savunulduğu Tarih : 09.12.2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Selçuk Reis
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kalıtsal metabolik bir hastalık olan mukopolisakkaridoz Tip I'in (MPS I) Türk hastalardaki moleküler patolojisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. MPS Tip I hastalığı α -L-iduronidaz enziminin eksikliği nedeniyle oluşmaktadır. Bu çalışmada α -L-iduronidaz enzimini kodlayan IDUA geninde meydana gelen mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Hastalara ait biyolojik örnekler ve klinik değerlendirme Hacettepe Üniversitesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Metabolizma Bilim Dalı tarafından sağlanmış, deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı, Metabolizma Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması Aksaray Üniversitesi-Bilimsel Araştırma Birimi, 2012/05 nolu projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her konuda destek olan, bana inanan, ufkumu genişleten tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya,

Deneysel çalışmalarım sırasında bana tüm laboratuvar olanaklarını sunan teknik konularda ve karşılaştığım zorluklarda desteğini esirgemeyen, eş danışmanım Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL'e,

Hastaların klinik özelliklerinin belirlenmesinde ve hasta materyallerinin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Metabolizma Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali DURSUN'a,

Laboratuvar çalışmalarımda bana teknik konularda destek sağlayan Dr. Didem YÜCEL YILMAZ'a ve tekniker Esin GÖKSUN'a,

İçtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Güzel annem ve canım babama...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları.....	3
2.2. Ekstrasellüler Matriks ve Mukopolisakkaritler.....	4
2.3. Mukopolisakkaridozlar ve Tipleri.....	7
2.3.1. MPS Tip I.....	9
2.3.1.1. α -L-iduronidaz enziminin yapısı ve özellikleri.....	11
2.3.2. MPS Tip II	13
2.3.3. MPS Tip III.....	14
2.3.4. MPS Tip IV.....	14
2.3.5. MPS Tip VI.....	15
2.3.6. MPS Tip VII	15
2.3.7. MPS Tip IX.....	15
2.4. IDUA Mutasyon Çalışmaları	16
2.5. Tanı ve Tedavi	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	20
3.2. DNA Konsantrasyonu.....	20
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	21
3.3.1. Standart PCR Aşamaları.....	21
3.3.2. Touchdown PCR Aşamaları.....	21
3.3.3. PCR Döngü Şartları.....	22
3.4. Amplifikasyon Primerleri.....	24
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.5.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler	25
3.6. PCR Ürün Pürifikasyonu	25
3.7. DNA Dizi Analizi.....	26
3.7.1. IDUA geni dizileme reaksiyonu	26

3.7.2. Dizileme reaksiyon koşulları.....	27
3.8. Sekans Ürün Pürifikasyonu	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Mutasyonlar ve polimorfizmler	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR	38
EK 1	
cDNA dizisi	
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Mukopolisakkaridoz Tip I (MPS I) Hastalarında IDUA Gen Mutasyonlarının Analizi

Nazente ATÇEKEN

T.C.

Aksaray Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji (Moleküler Biyoloji) Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA
İkinci Danışman : Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

MPS Tip I hastalığı IDUA geni tarafından kodlanan α -L-iduronidaz enziminin eksikliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında klinik olarak MPS Tip I tanısı almış olan 15 hastada tanıyı moleküler düzeyde kesinleştirmek ve hastalığa neden olan IDUA genindeki mevcut mutasyonları belirlemek amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Hastalardan 10'unda, 3 yanlış anlamlı (p.M1L, p.A327P, p.P533L), 3 anlamsız (p.Y64X, p.W402X, p.R628X) ve üç kırılma (c.494-1G>A, c.793-6C>G, c.793-5C>A) mutasyonu olmak üzere, toplam 9 farklı IDUA gen mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlardan 7'si farklı toplumlarda daha önce rapor edilmiş, 2'si ise (c.793-6C>G, c.793-5C>A) ilk kez bu çalışma kapsamında bulunmuştur. Hastalardan 9'u mutasyonları homozigot, 1'i birleşik heterozigot durumda taşımaktadır. Yeni varyasyonların enzim aktivitesi üzerine zararlı etkisinin olduğu 2 farklı analiz programı kullanılarak tespit edilmiştir. Klinik belirtilerine göre MPS Tip I tanısı almış olmalarına karşın, 5 hastaya ait DNA dizi analizi sonucunda hastalık nedeni olabilecek herhangi bir mutasyonun bulunamaması ve α -L-iduronidaz enzim analiz sonuçlarının olmayışı nedeniyle bu hastaların farklı bir MPS tipine ait oldukları düşünülmüştür. Ayrıca, taranan hastalardan 3'ünde daha önce tanımlanmış olan 7 farklı IDUA gen polimorfizmi (p.A8A, p.A20A, p.H33Q, p.R105Q, p.A314A, p.T410T ve IVS5-8C>T) belirlenmiştir. Sonuç olarak ön tanısı MPS Tip I olan 15 hastadan 10'unda DNA dizi analizi ile klinik tanı moleküler düzeyde doğrulanarak, farklı mutant alleler saptanmıştır.

2013, 45 Sayfa

Anahtar Kelimeler : Mukopolisakkaridoz tip I, Mutasyon taraması, IDUA geni, α -L-iduronidaz enzimi

ABSTRACT

Master of Science / Ph.D. Thesis

Analysis of IDUA Gene Mutations in Patients with Mucopolysaccharidosis Type I (MPS I)

Nazente ATÇEKEN

T.R.

Aksaray University Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology (Molecular Biology)

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Mehmet Karaca
Co-Supervisor : Prof. Dr. Rıza Köksal Özgül

MPS Type I resulted from a lack of α -L- iduronidase enzyme encoded by IDUA gene. In this study, 15 patients clinically diagnosed with MPS Type I were screened using DNA sequence analysis to confirm of diagnosis at the molecular level and to identify disease-causing IDUA gene mutations. Ten of screened patients have 9 different IDUA gene mutations which of three (p.M1L , p.A327P , p.P533L) were missense, three (p.Y64X , p.W402X , p.R628X) were nonsense and three (c.494-1G > A, c.793-6C > G, c.793-5C > A) were splicing one. Seven of these mutations have already been reported in different populations and two are novel (c.793-6C > G, c.793-5C > A). Nine patients have carried the mutations as homozygous and one has it in compound heterozygous state. A putative deleterious effect of novel mutations on protein function has detected using two different computational programs. Even 5 patients have diagnosed with MPS Type I according to their clinical symptoms, absence of α -L-iduronidase enzyme analyses results and having no disease causing IDUA gene mutations means these patients may have different MPS type. Meanwhile, 7 different previously described IDUA gene polymorphism (p.A8A, p.A20A, p.H33Q, p.R105Q, p.A314A, p.T410T and IVS5-8C > T) are determined in 3 of screened patients. Consequently, clinical diagnosis was verified at the molecular level using DNA sequence analysis and 10 of 15 patients with the diagnosis of MPS type I had different IDUA gene mutant alleles.

2013, 45 Pages

Keywords: Mucopolysaccharidosis type I, Mutation screening, IDUA gene, α -L iduronidase enzyme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal lizozom degradasyonu ve lizozomal enzim eksikliği.....	4
Şekil 2.2. GAG'ların moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.3. IDUA geninin 4p16.3 bölgesindeki yerleşimi.....	9
Şekil 2.4. α -L-iduronidaz enziminin gag katabolizmasındaki işlevi.....	10
Şekil 2.5. MPS tip I de görülen bazı semptomlar	11
Şekil 2.6. α -L-iduronidaz enziminin kristallografik yapısı.....	12
Şekil 2.7. İnsan α -L-iduronidaz enzimi aminoasit dizisi	13
Şekil 4.1. 1953 nolu hastada p.M1L (ATG>CTG) değişimi	29
Şekil 4.2. 1955 nolu hastada p.Y64X (TAC>TAA) değişimi.....	29
Şekil 4.3. 1955 nolu hastada p.A327P (GCG>CCG) değişimi.....	29
Şekil 4.4. 1954 nolu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi	29
Şekil 4.5. 1956 nolu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi	30
Şekil 4.6. 2070 nolu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi	30
Şekil 4.7. 2371 nolu hastada c.793-5C>A ve c.793-6C>G nükleotid değişimleri.....	30
Şekil 4.8. 1949 nolu hastada p.P533L (CCG>CTG) değişimi.....	30
Şekil 4.9. 1950 nolu hastada p.W402X (TGG>TAG) değişimi	31
Şekil 4.10. 2080 nolu hastada p.W402X (TGG>TAG) değişimi	31
Şekil 4.11. 1957 nolu hastada p.R628X (CGA>TGA) değişimi	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Glikozaminoglikanların Temel Bazı Özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. Mukopolisakkaridozların Sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.3. Mukopolisakkaridozlarda Kullanılan Tedavi Seçenekleri.....	19
Çizelge 3.1. Hasta genomik DNA konsantrasyonları	21
Çizelge 3.2. PCR döngü şartları.....	22
Çizelge 3.3. IDUA ekzonlarını amplifiye etmek için kullanılan primer dizileri	24
Çizelge 4.1. MPS tip I hastalarında tespit edilen mutasyonlar	28
Çizelge 4.2. MPS tip I hastalarında tespit edilen mutasyonlarınfenotipik etkisi	32
Çizelge 4.3. MPS tip I hastalarında tespit edilen polimorfizmler	32

SİMGELER DİZİNİ

bp	Bazpair
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
µl	Mikrolitre
ng/µl	Nonogram/mikrolitre
pmol	Pikomol

KISALTMALAR DİZİNİ

CNS	Merkezi Sinir Sistemi
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ERT	Enzim Replasman Tedavisi
GAG	Glikozaminoglikan
Gal	Galaktoz
GalNac	N-asetilgalaktozamin
GlcA	Glukoronik asit
GlcN	Glukozamin
GlcNAc	N-asetilglukozamin
HSCT	Hemotopoietik kök hücre transplantasyonu
IdoA	Iduronik asit
IDUA	α -L-iduronidaz enzimini kodlayan gen
LDH	Lizozomal depo hastalığı
MPS	Mukopolisakkaridoz
MPS IH	Hurler sendromu
MPS IH-S	Hurler-Scheie sendromu
MPS IS	Scheie sendromu
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	Tris-Borik asit-EDTA

1. GİRİŞ

Çocukluk yaş grubunda tek gen mutasyonu sonucu oluşan metabolik hastalıkların sayısı moleküler biyoloji ve genetik alanında elde edilen ilerlemelere bağlı olarak giderek artmaktadır. Toplu olarak değerlendirildiğinde görülme sıklıkları % 1 civarında olan kalıtsal metabolik hastalıklar çocukluk yaş grubunda önemli bir sağlık sorunu oluşturur.

Bugüne kadar 480 kadar metabolik hastalık tanımlanmış olup her yıl buna yenileri eklenmektedir. Metabolik hastalıkların görülme sıklığı genel olarak 1/5.000 olarak rapor edilmesine rağmen, bu oran hastalığa göre toplumlar arasında büyük değişiklik gösterir. Hastalıkların büyük çoğunluğunun otozomal çekinik kalıtılması nedeniyle kalıtsal metabolik hastalıklar özellikle akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda çok daha fazla görülür. Türk toplumunda akraba evliliği insidansı % 22 olarak rapor edilmiştir (Koç 2008). Bu oran doğu ve güneydoğu illerinde % 40'a kadar yükselmektedir. Bu nedenle Türk toplumu kalıtsal metabolik hastalıkların en sık görüldüğü toplumlardan biridir. Sonuç olarak görülme sıklığı açısından metabolik hastalıklar Türk toplumu için en önemli halk sağlığı problemlerinin başında gelir.

Kalıtsal metabolik hastalıklar protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezi ya da katabolizmasındaki bozukluklar sonucu gelişen patolojik olaylardır. Hücre sitoplazması ya da organelindeki biyokimyasal reaksiyonlarda rol alan enzim ya da reseptör yapısındaki proteinlerin fonksiyon bozuklukları kalıtsal metabolik hastalıkların patofizyolojisini oluşturur. Proteinleri kodlayan genlerdeki yapısal bozukluklar (mutasyonlar), protein fonksiyon bozukluğu ve biyokimyasal bozukluğa sebep olarak hastalık fenotipinin oluşmasına neden olur.

Enzim, protein, DNA temelli biyokimyasal ve genetik belirteçler metabolik hastalıkların tanımlanması ve izlenmesinin yanı sıra prenatal tanı, preimplantasyon genetiği, taşıyıcı bireylerin belirlenmesi, genetik danışmanlık ve değişik tedavi seçeneklerinin uygulanması gibi temel sağlık hizmetlerinin sunulabilmesinde oldukça önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu nedenle moleküler genetik analizler kalıtsal metabolik hastalıklarda hayati önem taşır ve tanısal açıdan altın standart olarak kabul edilir.

Kalıtsal metabolik hastalıkların bir grubu olan mukopolisakkaridozlar (MPS), çeşitli organ ve dokularda glikozaminoglikan (GAG) olarak da bilinen mukopolisakkaritlerin birikimi ile karakterize, ilerleyici bir hastalık grubudur.

MPS'ler, glikozaminoglikanların yıkımında görev alan enzimleri kodlayan genlerdeki değişik mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. řu ana kadar tanımlanmış yedi ana tipi vardır. Bu hastalığın ülkemizdeki insidansı ve prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Klinik bulgular MPS tiplerine göre karakteristik özellikler göstermekle birlikte, hastalığın sınıflandırılmasında ve kesin tanı konulmasında yeterli gelmemektedir. DNA dizileme gibi moleküler analizler özellikle fenotipik olarak tanımlanmasında güçlük çekilen alt tiplerin ayırt edilmesinde ve hastalığa neden olan ilgili gen mutasyonlarının tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mutasyonların tipi ve gen üzerindeki yerleşimine bağlı olarak gösterdiği etki; enzimin hiç sentezlenememesi, aktivitesi azalmış bir enzim sentezlenmesi, miktarı yeterli olmayan enzim sentezlenmesi (mutasyon enzim üretim hızını düzenleyen gen/gen dizilerinde olmuştur) ya da anlamsız işlevsiz enzim sentezlenmesidir.

Çalışma konusu olan MPS Tip I hastalığı fenotipik görünümüne göre; ağır form (H sendromu), orta formu (H-S sendromu) ve hafif form (S sendromu) olarak üç alt forma ayrılır. Genotipte görülen mutasyonların α -L-iduronidaz enzimi üzerindeki etkisine göre fenotipik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. IDUA geni tarafından kodlanan α -L-iduronidaz enzimi lizozomlarda dermatan sülfat ve heparan sülfat katabolizmasında görev alır.

Bu tez kapsamında klinik olarak MPS Tip I n tanısı almış olan 15 hasta bireyde IDUA geninde, hastalığa neden olan mutasyonları tespit etmek için PCR ve DNA dizi analizi yapılmış ve ilgili literatür bilgileri de dikkate alınarak bulunan nükleotid değişimlerinin enzim üzerindeki muhtemel etkileri tartışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları

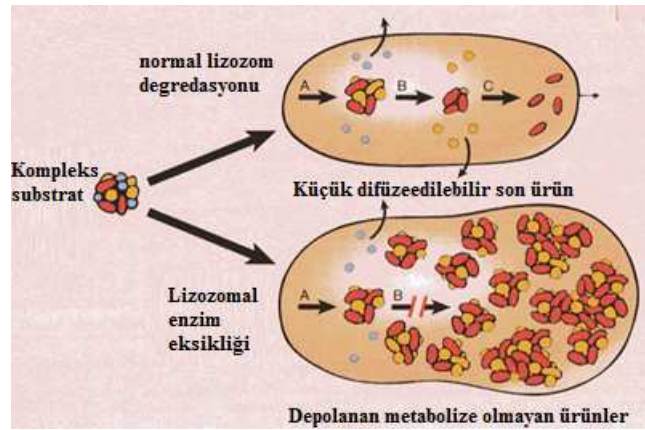
Lizozomal depo hastalıkları (LDH), 50'den fazla kalıtsal hastalıktan oluşan metabolizma bozukluklarını kapsamaktadır. Glikojenozlar (Pompe hastalığı), Sfingolipidozlar (Gaucher hastalığı, Tay-Sachs hastalığı, Nieman-Pick Hastalığı), glikoproteinozlar (Mukolipidozis) ve mukopolisakkaridozlar (MPS) vb. bu gruba dâhil olan patolojik durumlardır. Bu bozukluklar genellikle protein, nükleik asit, sfingolipid, nötral lipid ve glikojen gibi hücre metabolizmasında kullanılan kompleks biyomoleküllerin, lizozom içerisinde yıkımını sağlayan asit hidrolazları kodlayan genlerdeki bozukluklar sonucunda gelişirler. Bu enzimlerin fonksiyon görememesi nedeniyle substratlarının zamanla birikimiyle karakterizedirler (Şekil 2.1.). LDH, Fabry hastalığı ve mukopolisakkaridoz Tip II dışında otozomal resesif kalıtım modeli göstermektedirler. Fabry hastalığı ve MPS Tip II ise X'e bağlı (X-linked) geçiş göstermektedir (Ezgü, 2011).

Eritrositler hariç, bütün hücrelerde lizozom bulunduğundan, LDH'lar tüm organları etkileyen ilerleyici bozukluklardır ve yaşla birlikte patolojik semptomlar artar. LDH'ların diğer bir özelliği de klinik ve genetik heterojenite göstermeleridir. Bir gendeki farklı defektler (allel heterojenite) farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. LDH'larının herbiri nadir olmasına rağmen, sıklık olarak 1/7000-8000 oranında görülür (Meikle vd., 1999; Poorthuis vd., 1999).

LDH gruplandırılması depo edilen substratı ya da sorunlu enzimi temel alarak yapılmaktadır (Wilcox, 2004). Merkezi sinir sistemi (CNS) defektlerini de içeren LDH'ları ilk atağını çeşitli yaşlarda gösterebilir. Ağır semptomlardan hafif semptomlara kadar çok değişken ve geniş bir aralıkta fenotip ortaya çıkarabilirler. LDH'larının çoğunda semptomlar ilk görülme dönemine göre; çocukluk döneminde daha ağır ve gençlik ile yetişkinlik döneminde daha hafif (ılımlı) formlar sergiler. Çocuklarda CNS etkileyen formlar sık görülür.

LDH'ların tedavisinde son on yılda kayda değer gelişmeler yaşanmaktadır. Tedavilerin hedefleri depo edilen substrat miktarını düşürmektir. Bu da iki yolla olur: 1-substrat yıkımını artırmak ya da 2-degrede substrat miktarını düşürmektir. Substrat yıkımını artırmaya yönelik çalışmalarda iki farklı yaklaşım elde edilmiştir. İlki olan

hemotopietik kök hücre transplantasyonunda (HSCT), sağlıklı bireylerden alınan hücreler, hücrelerinde enzim eksikliği bulunan alıcıya verilir. HSCT çok sayıda farklı LDH'larının tedavisi için kullanılmaya çalışılmaktadır. Ancak şu anda çok az hastalıkta etkisi onaylanmıştır (Boelens vd., 2010). İkincisi de enzim replasman tedavisidir (enzyme replacemant therapy, ERT, enzim yerine koyma tedavisi). Bu tedavi şeklinde, eksik olan enzim direk damardan (intravenöz) verilir ve eksik enzimin kapasitesi kısmen artırılmaya çalışılır (Barton vd., 1991; Hollak vd., 1995; Bijsterbosch vd., 1996).



Şekil 2.1. Normal lizozom degradesyonu ve lizozomal enzim eksikliği

2.2. Ekstrasellüler Matriks ve Mukopolisakkaritler

Ekstrasellüler matriks (ECM), memeli dokularında hücrelerin arasında bulunan ve onları destekleyen kompleks bir yapıdır. ECM, sıklıkla bağ doku olarak adlandırılır. Bağ doku; deri, tendonlar, kıkırdak ve kemikte yaygın olarak bulunur. Bağ doku, kemik, kıkırdak gibi dokularda dağınık hücrelerin etrafında yaygın bir şekilde izlenir. Epitel dokuda hücreler birbirlerine bitişik ve sıkı bir şekilde tabakalar yaparlar. Bu durumda ECM, hücre tabakasının altında ince bir destek tabakası oluşturur (bazal lamina). Su tutar, yumuşak doku gerginliğini ayarlar. Mineral tutar, iskelet dokusunun sağlamlık ve sertliğini sağlar. Büyüme faktörlerini saklar. Hücrelerin yapışma, göç ve proliferasyonunu düzenler. ECM, başlıca üç biyomolekül sınıfından oluşmuştur: yapısal proteinler, özelleşmiş proteinler ve proteoglikanlar. Proteoglikanlar, bir glikozaminoglikan olan hiyalüronatın çok uzun ipliklerine yaklaşık 40 nm aralıklarla ve nonkovalent olarak iç protein moleküllerinin bağlanması ve her iç proteine de kondroitin sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve dermatan sülfat gibi birçok daha kısa glikozaminoglikan molekülü bağlanmasıyla oluşan makromoleküllerdir. Ekstrasellüler

proteoglikanlar ile kollajen ve elastin gibi fibröz proteinler, bir çapraz bağla ağ yapıda örülürler. Böylece ekstrasellüler matriksin dayanıklılık ve elastikiyeti sağlanır. Proteoglikanların polipeptid zinciri, pürtlü endoplazmik retikulumun ribozomlarında sentezlenir. Polipeptid zincirine Golgi aygıtında polisakkarit zincirleri katılır. Dokulardaki proteoglikanlar sürekli olarak farklı oranlarda parçalanmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Bir proteaz olan katepsin D, proteoglikan yıkılımını başlatır. Lizozomal sülfatazlar, endoglukozidazlar ve ekzoglukozidazlar ile endositoz yolu ile lizozomlara gelen degradasyon ürünlerini monomerlerine kadar parçalanmayı sürdürürler. Proteoglikanların polisakkarit zincirlerinin yıkılımında hiyaluronidaz, β -glukuronidaz, β -D-asetilheksozaminidaz, β -galaktozidaz, α -L-iduronidaz, heparin ve heparan sülfat spesifik endoglukozidazlar, aril sülfatazlar, iduronat sülfataz, α -N-asetilglukozaminidaz, heparan-N-sülfataz gibi enzimler görev alırlar. İnsanlarda genetik bir bozukluk sonucu bazı lizozomal enzim eksikliklerine bağlı olarak proteoglikan oligosakkaritlerinin aşırı birikmesi veya idrarla atılımı ile karakterize, mukopolisakkaridozlar (MPS) olarak tanımlanan hastalık tabloları ortaya çıkar. Glikozaminoglikanlar (GAG) olarak da bilinen mukopolisakkaritler ekstrasellüler matriksin (ECM) temel bileşenlerinden birisi olan proteoglikan yapısının büyük bir bölümünü oluşturur (Heinegard ve Oldberg, 1989). Proteoglikan molekülleri ise bağ dokunun diğer birçok protein bileşeni ile etkileşime girerek, ECM'in organize edilmesinde, hücrelerin göçü ve ölümlerinde, hücreler arası etkileşimlerde rol oynamaktadırlar. GAG'lar, tekrar eden disakkarid birimlerinden oluşan, dallanmamış polimer yapıdaki polisakkaridlerdir. GAG kelimesi ile disakkarid birimlerinden birinin (D-galaktozamin ya da glukozamin gibi) amino şeker olduğu ifade edilir. Bu iki amino şekerin amino grubu asetillenebilir. Bu durumda N-asetilgalaktozamin (GalNAc) ya da N-asetilglukozamin (GlcNAc) yapıları oluşur. Disakkaridin diğer bileşeni çoğunlukla D-glukuronik asit (GlcA) ya da L-iduronik asit (IdoA)'dır. GAG'ların çoğu sülfat grupları da içerebilir. Bu sülfatlar şekerin hidroksil gruplarına (O-sülfatlar) ya da amino şekerlerden birinin amino grubuna (N-sülfatlar) bağlanabilir. GAG'lar proteoglikan yapısını oluştururken özel kor ve bağlantı (link) proteinleri ile ilişki kurarlar. GAG'lar kor proteinlerine Gal-Gal-Xyl-Ser, GalNAc-Ser/Thr ve GlcNAc-Asn bağları aracılığı ile bağlanır.

Şimdiye kadar altı farklı glikozaminoglikan izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bunlar kondroitin sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat, heparin, hyaluronik asit ve keratan sülfattır. GAG ana şeker omurgası üzerinde gerçekleştirilen sülfatlanma, deasetilasyon

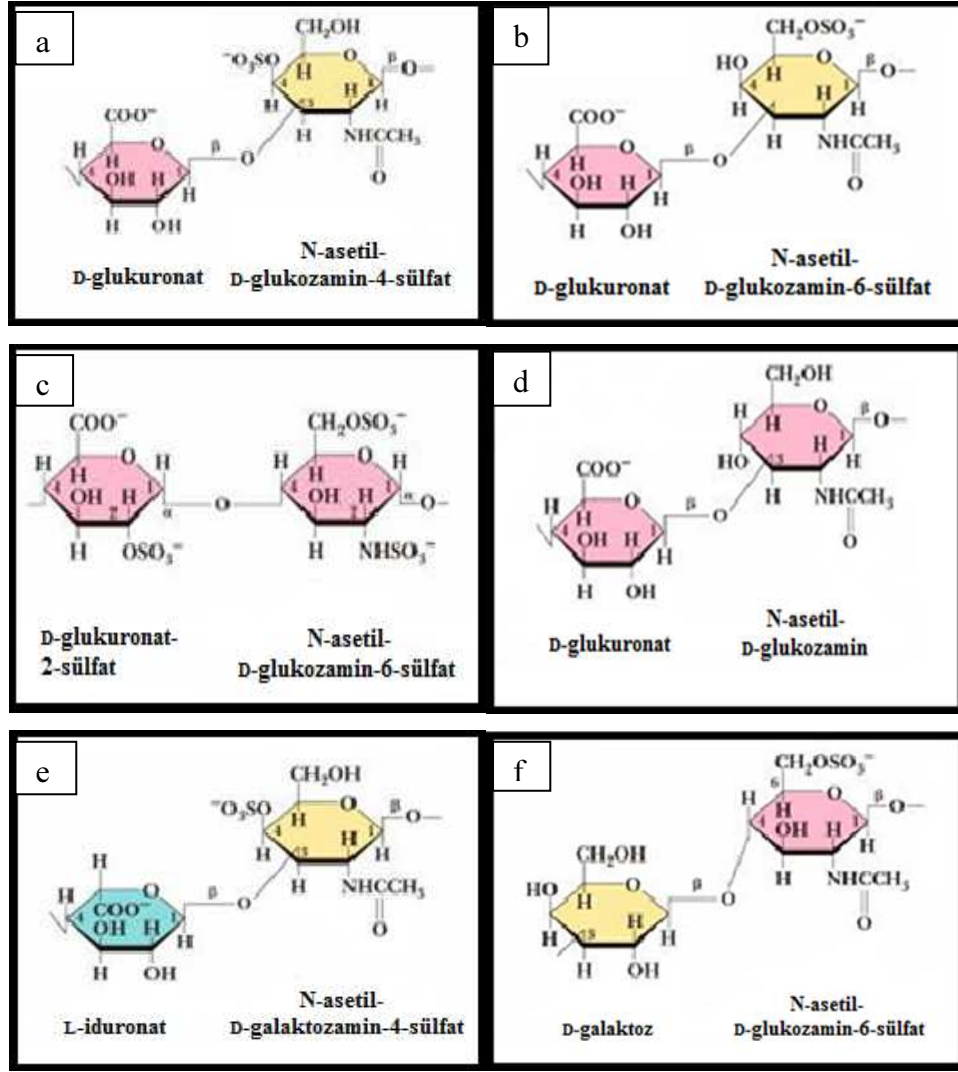
ve epimerizasyon modifikasyonları ile GAG zincirlerinin farklılaşması sağlanır. GAG'lar yapılarındaki sülfat ve karboksil gruplarından dolayı negatif yüklü moleküllerdir. Her bir GAG kendisine özgü şeker bileşenine, bağlantılara, proteine, doku dağılımına ve fonksiyona sahiptir (Çizelge 2.1., Şekil 2.2.). Örneğin, diğer GAG'ların tersine, hyaluronik asit şekere kovalent bağlı protein birimi ve sülfat içermez. Keratan sülfat ise uronik asit birimi yerine galaktoz içerir.

Proteoglikanların bünyesindeki mukopolisakkaridler bulundukları hücre ve dokularda oldukça farklı görevleri üstlenmişlerdir. Örneğin, polianyon olarak polikasyonları tutarlar ve doku turgoruna katkıda bulunurlar. Kondroitin sülfat ve hyaluronik asid ağırlık taşıyan eklemlerde kıkırdak dokunun sıkışabilirliğini ayarlamaktadırlar. Dermatan sülfat ve keratan sülfat korneal saydamlığa katkıda bulunmaktadırlar. Heparan sülfat plazma membranının bir bileşeni olarak görev alır ve reseptör ve hücre-hücre etkileşimlerine katılır. Heparin antikoagülandır. Plazma protein antitrombin III'e bağlanarak kan pıhtılaşmasını engeller. Antitrombotik terapi gerektiren klinik uygulamalarda yaygın şekilde kullanılır. Hyaluronik asi belirli hücrelerin ECM içinde göç etmesinde, doku oluşumu ve düzenlenmesinde önemlidir (Kjellen ve Lindahl, 1991).

Çizelge 2.1. Glikozaminoglikanların temel bazı özellikleri

GAG	Uronik asit	Amino şeker	Hekzos şeker	Sülfat rezidusu	Doku dağılımı
Kondroitin sülfat	GlcA	GalNAc	-	GalNAc	Kıkırdak, kemik, kornea
Dermatan sülfat	IdoA, GlcA	GalNAc	-	GalNAc, IdoA	Dermis, tendon, ligament, fibröz kıkırdak, kalp kapakları ve kan damarları
Heparan sülfat	GlcA	GlcN	-	GlcN	Bazal lamina, kan damarı, akciğer ve karaciğer
Heparin	IdoA, GlcA	GlcN, GlcNAc	-	GlcN, IdoA	Mast hücreleri
Hyaluronik asit	GlcA	GlcNAc	-	-	Sinovial sıvı, vitreous humor, gevşek bağ doku, göbek bağı ve bazı tümörlerde
Keratan sülfat	-	GlcNAc	Gal	GlcNAc, Gal	Kornea, kıkırdak ve intervertebral disk

IdoA: Iduronik asit, GlcA: Glukoronik asit, GlcN: Glukozamin, GlcNAc: N-asetilglukozamin, Gal: Galaktoz, GalNAc: N-asetilgalaktozamin



Şekil 2.2. GAG'ların moleküler yapısı a)Kondroitin-4-sülfat b)Kondroitin-6-sülfat c)Heparin ve Heparan sülfat d)Hyaluronik asit e)Dermatan sülfat f)Keratan sülfat

2.3. Mukopolisakkaridozlar ve Tipleri

Mukopolisakkaridozlar (MPS) lizozomal depo hastalıkları içinde en sık görülen grubu oluşturur. MPS'lerin yenidoğanlarda görülme sıklığı 1:10.000 ile 1:25.000 arasındadır. MPS'ların en sık bulunanları MPS I ve MPS II'dir (Solyom, 1996; Meikle, 1999).

Otozomal resesif kalıtılırlar (X'e bağlı kalıtılan MPS Tip II hariç) ve lizozomlarda GAG birikimiyle karakterizedirler. Bu birikim GAG katabolizmasında görev alan lizozozomal enzim aktivitesinin düşük veya hiç olmaması yüzünden olur (Neufeld ve Muenzer, 2001).

Şu ana kadar MPS'lerin 7 farklı tipi (MPS Tip I, II, III, IV, VI, VII ve IX) tanımlanmıştır (Çizelge 2.2.) (Hopwood ve Morris, 1990; Clarke, 1997; Neufeld ve

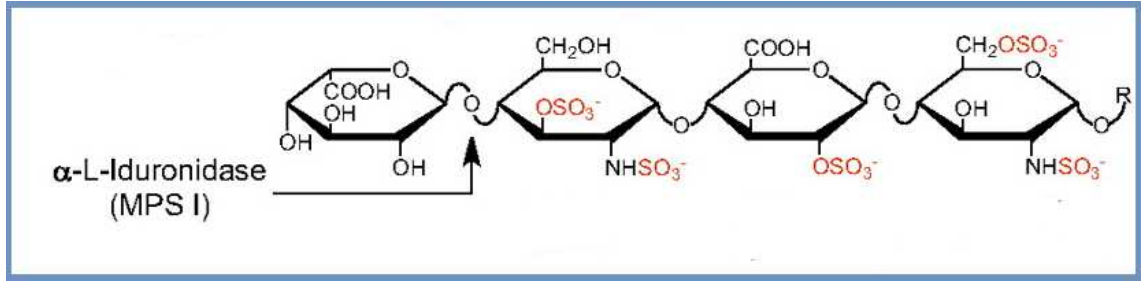
Muenzer, 2001). MPS hastalarında klinik özellikler progressive ve kronik benzerlik gösterir, fakat semptomları tipine bağlı olarak çeşitlenebilir (Neufeld ve Muenzer, 2001). Daha önceden MPS Tip V ve MPS Tip VIII olarak adlandırılan tipler artık MPS Tip IX olarak tek tip şeklinde adlandırılmıştır (Natowicz vd., 1996). Yedi MPS tipinden iki tipi (MPS Tip III ve MPS Tip IV) alt tiplere sahiptir. Aynı tip içerisinde alt tiplerin yer almasının sebebi, aynı klinik özellikleri gösterirken farklı genetik temele sahip olmalarıdır. Örneğin, MPS Tip III (Sanfilippo sendromu) dört alt tipe (A, B, C, D) sahiptir, bu tiplenmenin nedeni herbirinde aynı depo materyali ve çok benzer fenotip görülürken farklı enzim eksikliği olmasıdır (Muenzer, 2004).

Çizelge 2.2. Mukopolisakkaridozların sınıflandırılması

Tip ve Alt Tip	Adı	Eksik olan enzim	Depolanan GAG
MPS I (Ağır)	Hurler Sendromu	α -L-iduronidaz	Dermatan sülfat, Heparan sülfat
MPS I (Orta)	Scheie Sendromu	α -L-iduronidaz	Dermatan sülfat, Heparan sülfat
MPS I (Hafif)	Hurler- Scheie Sendromu	α -L-iduronidaz	Dermatan sülfat, Heparan sülfat
MPS II (Ağır)	Hunter Sendromu	İduronat sülfataz	Dermatan sülfat, Heparan sülfat
MPS II (Hafif)	Hunter Sendromu	İduronat sülfataz	Dermatan sülfat, Heparan sülfat
MPS IIIA	Sanfilippo A Sendromu	Heparan N-sülfataz	Heparan sülfat
MPS IIIB	Sanfilippo B Sendromu	α -N-asetil-glukozaminidaz	Heparan sülfat
MPS IIIC	Sanfilippo C Sendromu	Asetil CoA: α -glukozaminidasetiltransferaz	Heparan sülfat
MPS IIID	Sanfilippo D Sendromu	N-asetilglukozamin 6-sülfataz	Heparan sülfat
MPS IVA	Morquio Sendromu Tip A	Galaktoz 6-sülfataz	Keratan sülfat, Kondroitin sülfat
MPS IVB	Morquio Sendromu Tip B	β -galaktozidaz	Keratan sülfat
MPS VI	Maroteaux-Lamy Sendromu	N-asetilglukozamin 4-sülfataz	Dermatan sülfat
MPS VII	Sly Sendromu	arilsülfataz B	Dermatan sülfat, Heparan sülfat, Kondroitin 4-,6-sülfat
MPS IX		β -glukuronidaz	Hyaluronik asit

Hastalarda tipik olarak kaba yüz görünümü, korneal bulanıklık, organ büyümesi, eklem katılığı, iskelet şekil bozuklukları, kısa boy, fitik ve bazı hastalarda zeka geriliği oluşur. GAG'lar bağ dokunun temel bileşenlerinden olduğu için, MPS'lerde kemik değişiklikleri karakteristiktir. Hastalarda ayrıca kardiovasküler sistem, karaciğer, dalak, tendon, eklem ve cilt etkilenmektedir (Wang vd., 2011; Neufeld ve Muenzer, 2001).

MPS'lerde tanı amacıyla lökositlerde ve fibroblast kültürlerinde hatalı enzim aranır. Koryonik villus veya amniosit kültürleri prenatal tanıda yararlıdır. 24 saatlik idrarda



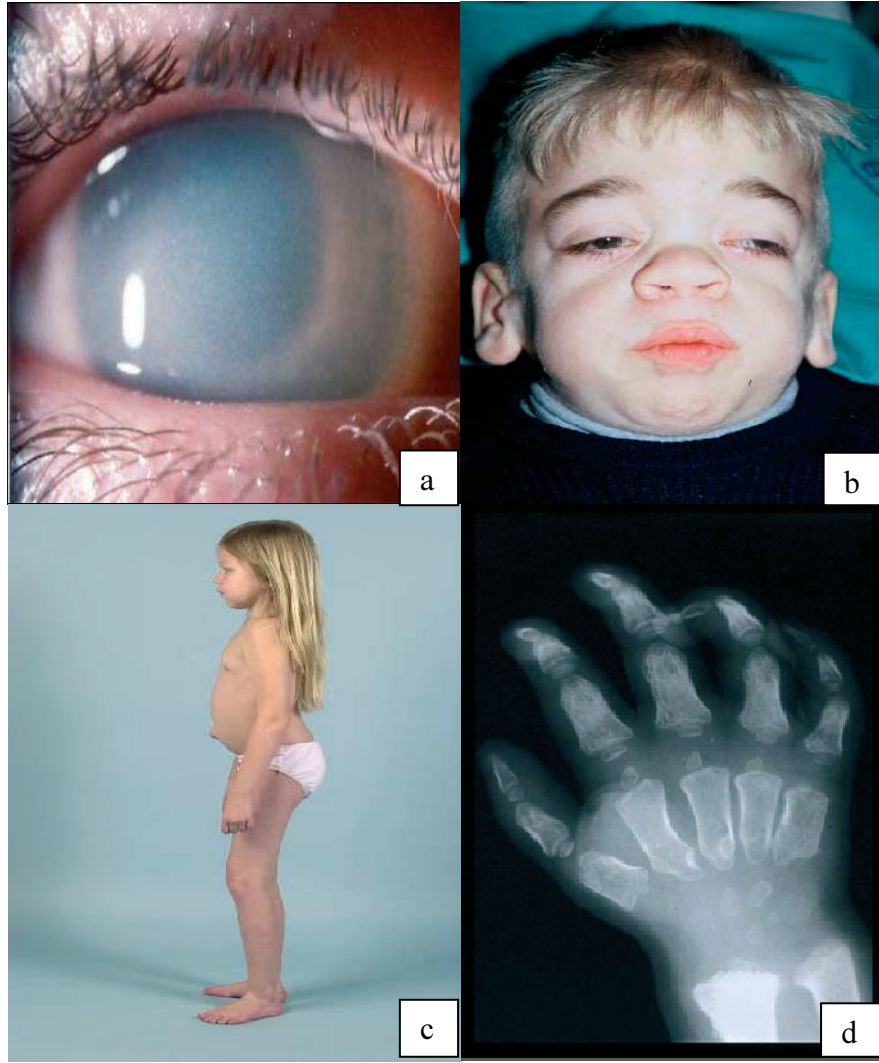
Şekil 2.4. α -L-iduronidaz enziminin dermatan GAG katabolizmasındaki işlevi

MPS Tip I yaklaşık olarak 1/100 000 sıklıkta görülür. MPS Tip I-H en yaygın ve MPS Tip I-S en nadir görülen formlarıdır (Baehner vd., 2005; Murphy vd., 2007). Klinik semptomların hasta üzerindeki etkisine ve şiddetine göre formlara ayrılır.

Hurler sendromunda hasta doğumda normaldir. İlk semptomlar 12 aydan önce ortaya çıkar ve hızla ilerler. Büyüme ilk yılda hızlanmış olarak izlenir daha sonra yavaşlar ve kısa boy meydana gelir. Zamanla zeka geriliği, multiple progresif organ yetmezliği, iç organlarda anormal büyüme, göbek, kasık ve karın boşluğu fıtıkları, korneal bulanıklık, kaba yüz görünümü, iri dil oluşumu, iskelet displazisi, eklem katılığı, işitme kaybı, kronik solunum yolu enfeksiyonları, artmış kafa içi basıncı, kalp kapakçık hastalıkları ve kalp krizi gelişir. On yaş altında ölümle karakterizedir (Şekil 2.5).

Hurler-Scheie sendromu ara formudur. Semptomları göbek, kasık ve karın boşluğu fıtıkları, hepatosplenomegali, öğrenmede yetersizlik, dikkat eksikliği, kronik solunum yolu enfeksiyonları, işitme kaybı, kalp kapakçık hastalıkları, artmış kafa içi basıncı ve iskelet displazisidir. Zeka geriliği görülmez.

Scheie sendromunda ilk semptomlar çocukluk döneminde çıkar. Göbek, kasık ve karın boşluğu fıtıkları, kalp kapakçık hastalıkları, korneada bulanıklık, eklem katılığı, retinal dejenerasyon görülür. Hastalar normal zeka ve yaşam süresine sahiptir. İskelet displazisi daha az ortaya çıkar ve ekstremiteleri normalden daha kısa olur. Zeka geriliği görülmez.

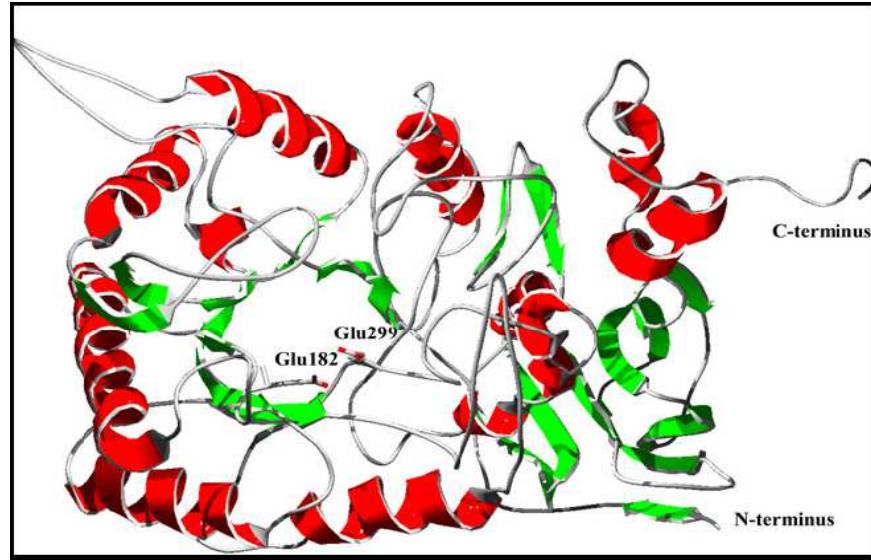


Şekil 2.5. MPS Tip I de görülen bazı semptomlar a) korneal bulanıklık b) kaba yüz görünümü c) göbek fıtığı ve kısa boy d) iskelet bozukluğu ve kısa ekstremiteler (URL-1.).

2.3.1.1. α -L-iduronidaz enziminin yapısı ve özellikleri

IDUA geni tarafından kodlanan α -L-iduronidaz enzimi, glikozidaz ailesinin bir üyesidir. Enzim 27 amino asitlik bir sinyal peptid içerir. Enzim üzerindeki asparajin rezidularının altı tanesi glikozilasyon bölgesi oluşturmaktadır (N110, N190, N336, N372, N415 ve N451). 182. ve 299. pozisyonlarda bulunan glutamik asit rezidularının aktif merkezi oluşturdukları rapor edilmiştir (Şekil 2.6.) (Durand vd., 1997; Brooks vd., 2007). Enzimin moleküler ağırlığını tespit etmek için yapılan çalışmalardan ise literatürde çelişkili sonuçlar alınmıştır. İnsan karaciğer ekstraktları kolon kromatografisine uygulandığında enzimin ağırlığı 65 kDa olarak bulunmuştur (Clements vd., 1985). Bir diğer çalışmada ise yedi farklı α -L-iduronidaz polipeptidi tespit edilmiştir (74, 65, 60, 49, 44, 18 ve 13 kDa). Bunun nedeni olarak ise enzimin olgunlaşma/işlenme süreci

içerisinde farklı ağırlıklar oluşturacak şekilde proteolitik kesimlere maruz kalması gösterilmektedir (Scott vd., 1991). İnsan fibroblast hücreleriyle yapılan bir diğer çalışmada ise ağırlığı 81 kDa olarak bulunmuştur (Taylor vd., 1991). Enzim, optimum aktivitesini 2,7 ile 5,8 pH değerleri arasında gösterebilmektedir (Mandelli vd., 2002; Prince vd., 2004). Optimum çalışma sıcaklığı ise 32 ve 37 °C'ler olarak bulunmuştur (Yogalingam vd., 2004; Belichenko vd., 2005). Amniyotik sıvı, beyin, fibroblast, böbrek, lökosit, karaciğer, akciğer, deri, deri fibroblastı, nöron ve idrar gibi değişik dokularda, hücrelerde ve vücut sıvılarında enzim aktivitesine rastlanabilmektedir.



Şekil 2.6. α -L-iduronidaz enziminin kristallografik yapısı. Kırmızı bölgeler α -heliksi, yeşil bölgeler β -plakaları göstermektedir (Rempela vd., 2005).

10	20	30	40
MRPLRPRAAL	LALLASLLAA	PPVAPAEAPH	LVHVDAARAL
50	60	70	80
WPLRRFWRST	GFCPPLPHSQ	ADQYVLSWDQ	QLNLAYVGAV
90	100	110	120
PHRGIKQVRT	HWLLELVTTT	GSTGRGLSYN	FTHLDGYLDL
130	140	150	160
LRENQLLPGF	ELMGASGSHF	TDFEDKQQVF	EWKDLVSSLK
170	180	190	200
RRYIGRYGLA	HBSKWNFETW	NEPDHHDFFDN	VSMTMQGFLN
210	220	230	240
YYDACSGLR	AASPALRLGG	PGDSFHIPPR	SPLSWGLLRH
250	260	270	280
CHDGINFFTG	EAGVRLDYIS	LHRKGARSSI	SILEQEKVVA
290	300	310	320
QQIRQLFPKF	ADTPIYNDEA	DPLVGWSLPQ	PWRADVITYAA
330	340	350	360
MVVKVIAQHQ	NLLANTTSA	FPYALLSNDN	AFLSYHPPHF
370	380	390	400
AQRTLTAHFQ	VNNTRPPHVQ	LLRKPVLTAH	GLLALLDEEQ
410	420	430	440
LVAEVSQAGT	VLDSNHTVGV	LASAHRPQGP	ADAWRAAVLI
450	460	470	480
YASDDTRAHP	NRSVAVTLRL	RGVPPGPGLV	YVTRYLDNGL
490	500	510	520
CSPDGEWRRL	GRPVFPTAEQ	FRRMRAAEDP	VAAAPRPLPA
530	540	550	560
GGRLTLRPAL	RLPSLLLVHV	CARPEKPPGQ	VTRLRALPLT
570	580	590	600
QGQLVLVWSD	EHVGSKCLWT	YEIQFSQDGK	AYTPVSRKPS
610	620	630	640
TFNLFVFSPD	TGAVSGSYRV	RALDYWARPG	PFSDPVPYLE
650			
VPVPRGPPSP	GNP		

Şekil 2.7. İnsan α -L-iduronidaz enzimi amino asit dizisi (sarı renkle gösterilen kısım sinyal dizi) (URL-2.).

2.3.2. MPS Tip II

MPS Tip II, Hunter sendromu olarak da bilinir (OMIM# 309900). Hunter sendromu, X'e bağlı resesif kalıtılır. Iduronat-sülfataz (IDS, EC 3.1.6.13) eksikliğiyle karakterizedir (Neufeld ve Muenzer, 1995). IDS geni kromozom Xq28 de yerleşim gösterir (Wilson vd., 1991). Iduronat-sülfataz heparan ve dermatan sülfat yıkımında görev alır ve eksikliğinde bu maddelerin birikimine neden olur.

Hastaların büyük bir bölümünü erkekler oluşturur ve kadınlarda nadiren görülür (Tuschl vd., 2005). Semptomları; işitme kaybı sıktır, fiziksel deformite, kaba yüz, eklem

katılığı, zeka geriliği, hepatosplenomegali, iskelet deformiteleri ve retinal dejenerasyon şeklindedir. Genelde 15 yaş öncesi ölüm gerçekleşir. MPS Tip I'den farklı olarak, felç bu hastalıkta oldukça sık görülür ve ilerleyici nörodejenerasyon ile öğrenme güçlükleri ortaya çıkar.

2.3.3. MPS Tip III

MPS Tip III ya da Sanfilippo sendromu, MPS Tip III A (OMIM# 252900), MPS Tip III B (OMIM# 252920), MPS Tip III C (OMIM# 252930) ve MPS Tip III D (OMIM# 252940) olmak üzere dört alt tipe ayrılır.

Sanfilippo sendromu otozomal resesif kalıtılır ve heparan sülfat yıkımında sorun vardır.

MPS Tip III A, Heparan N-sülfataz (SGSH, EC 3.10.1.1) enzimi eksikliğinde heparan sülfat birikimiyle karakterize olur. SGSH geni kromozom 17q25.3' te yerleşim gösterir. En ağır formu olup, semptomlarının ilk görünüşü ilk 7. ay içinde olur ve hastalık çok hızlı gelişir. Hayatta kalma süresi ortalama 15 yıl ve maksimum 23 yıldır (Scott vd., 1995a). Konuşma, davranışsal becerilerde gerilik ve zeka geriliği görülür. Kuzey Avrupa da görülen en yaygın alt tiptir (Nelson, 1997; Baehner vd., 2005).

MPS Tip III B, α -N-asetil-glukozaminidaz (NAGLU, EC 3.2.1.50) enzimi eksikliği sonucu heparan sülfat birikimiyle olur. NAGLU geni kromozom 17q21.3' te yerleşim gösterir (Zhao vd., 1996). Çocukluk döneminde ağır zeka geriliği görülür ve 20 yaşa kadar ölüm gerçekleşir. Yunanistan da görülen en yaygın alt tiptir (Beesley vd., 2004).

MPS Tip III C: Asetil CoA: α -glukozaminid asetiltransferaz (HGSNAT, EC 2.3.1.78) enzimi eksikliği sonucunda heparan sülfat birikimiyle olur. HGSNAT geni kromozom 8p11.1 yerleşim gösterir (Fan vd., 2006; Hrebicek vd., 2006).

MPS Tip III D: N-Asetilglukozamin-6-sülfataz (GNS, EC 3.1.6.14) enzimindeki eksiklikten kaynaklanır. MPS Tip III'ün en nadir görülen alttipidir. GNS geni kromozom 12q14 bölgesinde bulunur (Robertson vd., 1988).

2.3.4. MPS Tip IV

MPS Tip IV ya da Morquio sendromu, MPSTip IVA (OMIM# 612222), MPS Tip IVB (OMIM# 253010) olmak üzere iki alt tipe ayrılır.

MPS Tip IVA, N-asetilgalaktozamin-6-sülfataz enzimindeki (GALNS, E.C.3.1.6.4) aktivite sorunlarından dolayı ortaya çıkar. GALNS geni kromozom 16q24.3 bölgesi üzerindedir (Morris vd., 1994). Şiddetli kemik deformiteleri, korneal bulanıklık, aort yetmezliği, diş mine tabakası ince olması ve servikal miyopati izlenir. Hastalar yaşamlarını 30' lu yaşlara kadar kaybederler (Montano vd., 2008).

MPS Tip IVB, β -galaktozidaz enzimi (GLB1) eksikliğinden ortaya çıkar. GLB1 geni kromozom 3p21.33 bölgesinde bulunur. Orta derecede kemik deformiteleri, bulanık kornea, servikal miyopati izlenir. Zeka geriliği ve organ büyümesi yoktur. MPS IVB'nin günümüzde GM1-gangliosidozisin bir çeşidi olduğu düşünülmektedir.

2.3.5. MPS Tip VI

MPS Tip VI, Maroteaux-Lamy sendromu (OMIM# 253200) olarak da bilinir. MPS Tip VI, N-asetilglukozamin 4-sülfataz (arilsülfataz B) (ARSB, E.C.3.1.6.12) eksikliği sonucunda, dermatan sülfat birikimiyle oluşur. ARSB geni 5q13-5q14 kromozom bölgesinde yer alır (Litjens vd., 1989).

Klinik bulguları, şekil bozuklukları, büyüme bozukluğu, kaba yüz görünümü, korneal değişiklikler, lökosit inklüzyonları, organ büyümesi ve kalp kapak hastalıklarıdır. Normal zekâlıdırlar, 20'li yaşlara kadar yaşarlar (Neufeld vd., 1989).

2.3.6. MPS Tip VII

MPS Tip VII ya da Sly sendromu (OMIM# 253220) olarak bilinir. MPS Tip VII, β -glikoronidaz (GUSB, EC 3.2.1.31) eksikliği sonucu dermatan sülfat, heparan sülfat, kondroitin 4-,6-sülfat birikimiyle karakterizedir (Sly vd., 1973).

MPS Tip VII nadir görülen bir tiptir. Mental retardasyon, hepatosplenomegali, iskelet displazisi, korneal bulanıklık görülür (Neufeld vd., 1995).

2.3.7. MPS Tip IX

MPS Tip IX (OMIM#, 601492), bu hastalık grubunun en geç keşfedilen alt tipidir. MPS Tip IX, hyaluronidase (HYAL, EC 3.2.1.35) enzimi eksikliğine bağlı hyaluronik asit birikimiyle oluşur. HYAL geni 3p21.3- p21.2 kromozomunda yerleşim gösterir (Frost vd., 1997; Lepperdinger vd., 1998). Günümüze kadar yapılan sınırlı sayıdaki

çalışmalarda HYAL1 geninde iki farklı mutasyon bulunmuştur. Bunlar Glu268Lys ve dur kodonu oluşturan 1361del37ins14 mutasyonlarıdır (Triggs-Raine vd., 1999).

2.4. IDUA Mutasyon Çalışmaları

IDUA geninde günümüze kadar yapılmış olan değişik çalışmalarda çok fazla mutasyon çeşitliliğinin (genetik heterojenite) olduğu saptanmıştır. Bu durum ise, hastalığın klinik fenotipinin tahminini ve genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasını güçleştirmektedir. Moleküler genetik analizler MPS Tip I'in erken tanısı ve tedavisi için oldukça önemlidir. Böylece hastada görülebilecek klinik fenotipin tahmin edilebilmesinde ve hastalığın tedavisinde uygulanacak yöntemlerin seçilmesinde avantaj kazanılmış olur.

Şu ana kadar hastalığa yol açtığı bilinen 199 farklı IDUA gen mutasyonu rapor edilmiştir (URL-3; Stenson vd., 2009). Bu mutasyonların 112'si yanlış anlamlı/anlamsız, 33'ü splay, 1'i regülatör, 34'ü delesyon, 15'i insersiyon, 1'i indel ve 3'ü ise kompleks mutasyonlardır.

Genel olarak dört mutasyon (p.W402X, p.Q70X, p.P533R, p.G51D) yaygın olarak görülür. En yaygın görülen IDUA gen mutasyonu, stop mutasyonu olan p.W402X'dir ve yaklaşık %50 sıklıkta Kuzey Avrupa, Amerika Birleşik devletleri, Kuzey Amerika da (Clarke vd., 1994; Scott vd., 1995b; Beesley vd., 2001) ve İspanyada (Gort vd., 1998) görülürken, daha az sıklıkla Rusya, İtalya, Brezilya da sırasıyla %4 (Voskoboeva vd., 1998), %11 (Gatti vd., 1997; Venturi vd., 2002) ve %20 (Matte vd., 2000) görüldüğü belirtilmiştir. p.Q70X mutasyonu İskandinavya ve Rusya da %50 civarında görülürken diğer ülkelerde daha az sıklıkta görülür (Bunge vd., 1994; Voskoboeva vd., 1998). p.P533R muhtemelen Kuzey Afrika orijinli bir mutasyondur ve Akdeniz ülkelerinde yayılım gösterir, %13 ve %10 sıklıkta İtalya ve İspanya da görülür (Voskoboeva vd., 1998; Alif vd., 2000; Venturi vd., 2002). p.G51D mutasyonu da spesifik olarak İtalyanlar da %13 sıklıkta görülür (Venturi vd., 2002). p.R89Q mutasyonu Japonya'da en sık olmak üzere (Yamagishi vd., 1996), Çin, Avrupa, Amerika ve Asya ülkelerinde (Sun vd., 2011), c.252insC mutasyonu da Tayland'da % 40 sıklıkla görülür (Prommajan vd., 2011).

Yukarıda belirtilen yaygın mutasyonların haricinde, farklı toplumlarda değişik mutasyonlarda görülmektedir. Rusya'da p.P533L, p.Q63X, p.Y343X, p.A75P, 974ins12bp, 134del12bp, p.A327P (Voskoboeva vd., 1998), Çin'de c.1190-1G > A,

c.792+1G >T, p.R363H (Sun vd., 2011), Brezilya da p.R383H, 134del12, Japonlarda 704ins5 (Yamagishi vd., 1996) mutasyonları rapor edilmiştir.

2.5. Tanı ve Tedavi

MPS Tip I'in tanısı idrarda, lökositlerde ve deri fibroblast kültürlerinde α -L-iduronidaz aktivitesindeki düşüklüğünün gösterilmesi ile kesinleşir. Hastalığın gebelikte tanımı ancak koriyonik villus ve amniyon hücre kültürü örneklerinden yapılabilir.

Mukopolisakkaridozlar birçok organ ve dokuyu farklı derecelerde etkileyen kronik, ilerleyici ve multisistemik bir hastalık grubu olduğu için, ümit verici gelişmeler yaşansa da hastalığın tüm semptomlarını ortadan kaldıracak bir yöntem ya da ilaç henüz geliştirilememiştir. Mevcut tedavi yaklaşımlarının çoğu hastanın sistemik şartlarını iyileştirici ve günlük yaşamını kolaylaştırıcı yaklaşımlar olarak göze çarpmaktadır. Destek tedavisi, genel sağlık kontrolü, fizik tedavi ve komplikasyonların tedavisidir. Uyku esnasında oluşabilecek solunum yetmezliği için serbest oksijen ve/veya pozitif hava yolu basıncı, tonsillektomi, adenoidektomi, trakeostomi, tekrarlayan orta kulak yolu enfeksiyonu için bilateral ventilasyon tüpü uygulaması, kalp yetmezliği için medikal tedavi, endikasyonu var ise kalp kapak replasmanı, spinal kord kompresyonu ve karpal tünel kompresyonu için cerrahi dekompresyon, korneal bulanıklık için kornea nakli, hidrosefali için ventriküloperitoneal şant gereklidir.

Mukopolisakkaridozları da içine alan LDH için tedavi seçenekleri arasında kemik iliği transplantasyonu (HSCT), substrat azaltıcı tedavi, kimyasal şaperon kullanımı ve ERT (enzim replasman tedavisi) yer alır. Tedavi amaçlı kullanılan bu yöntemlerin bazı kısıtlamaları da mevcuttur. Son yıllarda prematüre dur kodonu oluşturan mutasyonların olumsuz etkisini ortadan kaldırmaya yönelik olan 'read-through yöntemi' de diğer bir seçenek olarak sunulmaktadır.

HSCT tedavisi hastalığın ilk çıkış dönemlerinde (özellikle 2 yaşın altında) yapıldığı takdirde hastalığın progressif ilerlemesini önleyici yararlar sağladığı bildirilmiştir (Vellodi vd., 1997; Guffon vd., 1998). Fakat bu tedavi seçeneği ile ilgili çok net bir ilerleme sağlanamamıştır.

Özellikle farklı LDH ortaya çıkmasında enzimatik defektlerin keşfedilmesi ile enzim destek ya da enzim yerine koyma tedavisi (ERT) olarak bilinen bir yöntemle MPS hastalarında görülen sistemik bozuklukların iyileştirilmesine çalışılmaktadır. 1960'ların

ortalarından itibaren ERT'lerini de içine alacak şekilde değişik ve bir o kadar da zahmetli olan protein hedefleme stratejileri üzerinde çalışılmaktadır. Bazı MPS tiplerinde (özellikle Tip I, II ve VI), hastalığın kontrol altına alınmasında, hastaların yaşam kalitelerinin artırılmasında ERT gelecek için uygun bir seçenek gibi görünmektedir (Ezgü, 2011).

Mukopolisakkaridoz hastaları için ilk ERT tedavisi; 2003 yılında Laronidaz (Aldurazyme® Genzyme Corp.) adı altında ticari olarak üretilen α -L-iduronidaz enziminin ABD İlaç ve Gıda Bakanlığından izin alınarak MPS I hastalarında kullanılmasıyla başlamıştır. Bu tedaviyi 2005 ve 2006 yıllarında ticari adı Galsülfaz olan arilsülfataz (Naglazyme®_Biomarin Pharmaceutical, Inc.) enziminin MPS VI ve ticari adı Elepraz olan idursülfataz (Elaprase®_Shire HGT) enziminin MPS II için kullanılmaları izlemiştir.

Mukopolisakkaridozlarda yapılan klinik çalışmalarda ERT ile fiziksel dayanıklılığın arttığı ve idrar GAG atılımında azalma olduğu görölmüştür. Allerjik reaksiyonlar az sayıda ve daha çok hafif şiddette gözlenmiştir. Bu nedenle etkili ve güvenli bulunmuştur. ERT'nin oldukça pahalı olması, ömür boyu haftalık intravenöz infüzyon tedavisi gerektirmesi dezavantajlarındandır. Ayrıca kan-beyin bariyeri nedeniyle santral sinir sistemine, vaskülarizasyonun az olması nedeniyle de kornea ve eklem kıkırdağına geçişi yoktur. Bu nedenle ERT ile santral sinir sistemi, kornea ve iskelet bulgularında önemli bir değişikliklik olmamaktadır. Bununla birlikte ERT'sine alınan olguların yaklaşık %50'sinde rekombinant enzimlere karşı antikor gelişmekte, anafilaktik ve alerjik reaksiyonlar oluşmaktadır. Ancak, IgG yapısındaki bu antikorların tedavi etkinliğini azaltması gibi bir veri de mevcut değildir. MPS'lerde ERT MPS I, II ve VI' da kullanılmaktadır (Beck, 2010).

Enzim replasman tedavisinin etkinliğinin artırılması, maliyetinin azaltılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Tedavinin sürekliliğı ve verimini artırmak için konusunda uzmanlaşmış hekimlere ve iyi organize olmuş sağlık birimlerine çok ciddi gereksinim duyulmaktadır.

ERT tek başına Hurler sendromunun tedavisinde yeterli gelmemektedir (Wraith vd., 2007). Son yapılan çalışmalarda Hurler sendromu hastalığın ilk çıkış dönemlerinde ERT tedavisi kullanılıp ardından özellikle kan parametrelerinin düzeltilmesi ve organ

büyümesinin azaltılması için HSCT bir tedavi seçeneği olarak denenmektedir (Cox-Brinkman vd., 2006; Soni vd., 2007).

Çizelge 2.3. Mukopolisakkaridozlarda kullanılan tedavi seçenekleri

Hastalık İsmi	Enzim Yerine Koyma (ERT) Tedavisi	Kemik İliği Nakli Tedavisi (KİT)	Kimyasal Şaperon Terapisi	Substrat Azaltma Terapisi	Gen Terapisi	Stop-kodon (read through) Terapisi
MPS I	Klinik uygulama aşamasında	Klinik uygulama aşamasında	Yok	Yok	Pre-klinik	Pre-klinik
MPS II	Klinik uygulama aşamasında	Etkinlik net değil	Yok	Yok	Pre-klinik	Yok
MPS III	Pre-klinik	Etkinlik net değil	Yok	Pre-klinik	Pre-klinik	Yok
MPS IV	Klinik deneme aşamasında	Etkinlik net değil	Yok	Yok	Pre-klinik	Yok
MPS VI	Klinik uygulama aşamasında	Klinik deneme aşamasında	Yok	Yok	Pre-klinik	Yok
MPS VII	Pre-klinik	Klinik uygulama aşamasında	Yok	Yok	Pre-klinik	Yok

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bu çalışmanın etik kurul onayı, Hacettepe Üniversitesi-Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu TBK 11/26-21 no'lu belgesi ile uygun bulunmuştur.

Genomik DNA örneklerinin izolasyonu için “High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE)” kullanılmıştır. İzolasyon işlemleri aşağıda ayrıntıları verilen basamaklar kullanılarak, ticari kitin kullanım kılavuzuna uygun gerçekleştirilmiştir.

1. 200 µl hasta kanı steril ependorf tüpüne aktarılır. Üzerine 200 µl “Binding Buffer” eklenir.
2. 40 µl proteinaz K eklenir ve karıştırılarak 70 °C’de, 20 dakika süreyle inkübe edilir.
3. Karışımın üzerine 100 µl isopropanol alkol eklenir ve karıştırılır.
4. Karışım daha sonra kolon tüplerine aktarılır. 8000xg’de, 1 dakika süreyle santrifüj edilir. Toplama tüplerinde biriken sıvı kısım atılır ve kolon tüplerine bağlanmış olan materyal üzerinden DNA izolasyonuna devam edilir.
5. Kolon üzerine 500 µl “Removal Buffer” eklenir.
6. 8000xg’de, 1 dakika süreyle santrifüj edilir. Sıvı kısım atılır.
7. Tüp üzerine 500 µl “Yıkama Tamponu” eklenir ve 8000xg’de, 1 dakika süreyle santrifüj edilir. Sıvı kısım atılır.
8. 7. Basamak olan yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır.
9. 1.5 ml’lik steril ependorf tüplerine yerleştirilen filtreli kolon tüplerine 100-150 µl “Elusyon Tamponu” veya “steril su” eklenerek, 1 dakika süreyle 8000xg’de santrifüj edilir. DNA’nın kolondan ayrılması sağlanır.
10. Santrifüj sonucu toplanan DNA örnekleri kullanım süresine uygun olacak şekilde +4 °C, -20 °C veya – 80 °C’de saklanır.

3.2. DNA Konsantrasyonu

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, DNA bankasından alınan ve MPS Tip I tanısı alan hasta genomik DNA’larının konsantrasyonları, Nanodropta (ND 1000) ölçülmüştür. DNA örnekleri, son konsantrasyonları 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış ve PCR işleminde kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Hasta genomik DNA konsantrasyonları

Hasta No	Stok DNA miktarı (ng/μl)	Son konsantrasyonu (ng/μl)
M-12-1949	119,7	50
M-12-1950	116,5	50
M-12-1951	106,3	50
M-12-1952	170,5	50
M-12-1953	75,6	50
M-12-1954	78,2	50
M-12-1955	46,1	50
M-12-1956	105,8	50
M-12-1957	155,2	50
M-12-1958	259,5	50
M-13-1997	85	50
M-13-2024	72	50
M-13-2070	304	50
M-13-2080	104,4	50
M-13-2371	73,5	50

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), genomik DNA’da istenilen bölgenin o dizilere özgü tasarlanan primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. PCR ile IDUA geninin proteine dönüştürülen 14 ekzonu çoğaltılmıştır. IDUA geni ekzonları GC’ce zengin olduğu için çoğaltılma aşamasında farklı markalarda enzimler (Applied Biosystems, Hot Start, Sigma ve Bioron), GC açıcılar (DMSO, Q solution, GC enhancer) ve farklı tipte PCR yöntemleri (Standart ve Touchdown) kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

3.3.1. Standart PCR Aşamaları

- Başlangıç Denatürasyonu: Genomik DNA’nın denatürasyonu
- Denatürasyon: Kalıp DNA’nın denatürasyonu
- Annealing: Özgül primerlerin bağlanması
- Extension: Sentez reaksiyonu
- Final Extension

} Ana döngü aşamaları

3.3.2. Touchdown PCR Aşamaları

Özgül olmayan amplifikasyonları engelleme ve GC’ce zengin gen bölgelerinde özgül primerin yapışmasını kolaylaştırmak amaçlı kullanılan bir PCR yöntemidir.

- Başlangıç Denatürasyonu: Genomik DNA’nın denatürasyonu

- 1. Denatürasyon: Kalıp DNA'nın denatürasyonu
- 1. Annealing: Özgül primerlerin bağlanması ve bağlanmayı kolaylaştırmak için her döngü de Tm azaltılır
- 1. Extension: Sentez reaksiyonu
- 2. Denatürasyon: Kalıp DNA'nın denatürasyonu
- 2. Annealing: Özgül primerlerin bağlanması ve Tm her döngüde sabit kalır
- 2. Extension: Sentez reaksiyonu
- Final Extension

3.3.3. PCR Döngü Şartları

İlgili IDUA ekzonlarını çoğaltmak için yapılan yoğun deneysel çalışmalar sonucunda PCR şartları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekliyle optimize edilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR döngü şartları

Ekzon NO	Tm (°C)	PCR Tipi	PCR döngü koşulları	Reaksiyon Bileşenleri	DNA Polimeraz
1	58	Standart	94°C 5dk 1 döngü 94°C 45sn } 35 döngü 58 °C 45sn } 35 döngü 72°C 45sn } 35 döngü 72°C 10dk 1 döngü	dH ₂ O 14,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl GC-Enhancer3 µl	Applied Biosystems
2	58	Standart	94°C 3dk 1 döngü 94°C 30sn } 35 döngü 58°C 45sn } 35 döngü 68°C 45sn } 35 döngü 68°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 10,9 µl 2XMaster Mix 12,5 µl Primer 0,3-0,3 µl DNA 1 µl	Hot Start
3	58	Standart	94°C 3dk 1 döngü 94°C 30sn } 35 döngü 58°C 45sn } 35 döngü 72°C 45sn } 35 döngü 72°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 15,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl DMSO 2 µl	Sigma
4	62-58	Touchdown	95°C 3dk 1 döngü 95°C 50sn } 20 döngü 62°C-58,2 °C 15sn } 20 döngü 72°C 20sn } 20 döngü 95°C 30sn } 15 döngü 58°C 15sn } 15 döngü 72°C 15sn } 15 döngü 72°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 16,1 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,3 µl DMSO 1 µl	Sigma

Çizelge 3.2. Devam*

5	58	Standart	94°C 3dk 1 döngü 94°C 30sn } 35 döngü 58°C 45sn } 35 döngü 72°C 45sn } 35 döngü 72°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 15,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl DMSO 2 µl	Sigma
6	62-58	Touchdown	95°C 3dk 1 döngü 95°C 50sn } 20 döngü 62°C-58,2 °C 15sn } 20 döngü 72°C 20sn } 20 döngü 95°C 30sn } 15 döngü 58°C 15sn } 15 döngü 72°C 15sn } 15 döngü 72°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 15,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl DMSO 2 µl	Sigma
7	58	Standart	94°C 3dk 1 döngü 94°C 30sn } 35 döngü 58°C 45sn } 35 döngü 72°C 45sn } 35 döngü 72°C 3dk 1 döngü	dH ₂ O 14,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl DMSO 3 µl	Bioron
8	58	Touchdown	95°C 3dk 1 döngü 95°C 50sn } 20 döngü 62°C-58,2 °C 15sn } 20 döngü 68°C 20sn } 20 döngü 95°C 30sn } 15 döngü 58°C 15sn } 15 döngü 68°C 15sn } 15 döngü 68°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 10,9 µl 2XMaster Mix 12,5 µl Primer 0,3-0,3 µl DNA 1 µl	Hot Start
9	62-58	Touchdown	95°C 3dk 1 döngü 95°C 50sn } 20 döngü 62°C-58,2 °C 15sn } 20 döngü 68°C 20sn } 20 döngü 95°C 30sn } 15 döngü 58°C 15sn } 15 döngü 68°C 15sn } 15 döngü 68°C 5dk 1 döngü	dH ₂ O 6,9 µl 2XMaster Mix 12,5 µl Primer 0,3-0,3 µl DNA 1 µl Q Solution 4 µl	Hot Start
10		Standart	95°C 5dk 1 döngü 95°C 45sn } 35 döngü 58 °C 60sn } 35 döngü 72°C 60sn } 35 döngü 72°C 10dk 1 döngü.	dH ₂ O 14,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl GC-E nhancer 3 µl	Applied Biosystems

Çizelge 3.2. Devam*

11-12	58	Standart	94°C 3dk 94°C 30sn 58°C 45sn 72°C 45sn 72°C 5dk	1 döngü 35 döngü 35 döngü 35 döngü 1 döngü	dH ₂ O 14,3 µl 10xBuffer 2,5 µl MgCl ₂ 1,5 µl Primer 0,3-0,3 µl dNTP 2 µl DNA 1 µl Taq Polimeraz 0,1 µl DMSO 3 µl	11-12
13-14	62-58	Touchdown	95°C 3dk 95°C 50sn 62°C-58,2 °C 15sn 68°C 20sn 95°C 30sn 58°C 15sn 68°C 15sn 68°C 5dk	1 döngü 20 döngü 20 döngü 20 döngü 15 döngü 15 döngü 15 döngü 1 döngü	dH ₂ O 10,9 µl 2X Master Mix 12,5 µl Primer 0,3-0,3 µl DNA 1 µl	Hot Start

3.4. Amplifikasyon Primerleri

IDUA geni (GenBank No:NM_000203.3) ekzonlarının PCR ile çoğaltılıp, sekanslarının yapılması amacıyla literatür bilgisi taranmıştır. İlgili makalelerden ve Primer3 Input (version 0.4.0) programı (URL-4) kullanılarak uygun forward ve revers primerler seçilmiştir. Metabion International AG firması (Almanya) tarafından primerler sentez edilmiş ve son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırılmışlardır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. IDUA ekzonlarını amplifiye etmek için kullanılan primerlerin dizileri

Ekzon	IDUA Geni (MPS I) Primer Dizileri	PCR Ürün Boyutu (bp)
EKZON 1F	5'-GTCATCGGTCCTCAGAGCAG -3'	490
EKZON 1R	5'-GCTCCGGTCTCTGAAGCT-3'	
EKZON 2F	5'-GAACGTGTGTGTCAGCCG-3'	304
EKZON 2R	5'-ACAAGGGGTCTTCCGAGC-3'	
EKZON 3F	5'-TCCCACATGCTCCGTTGT-3'	371
EKZON 3R	5'-CAGCTCAAACCCTGGAACAC-3'	
EKZON 4F	5'-ACCCTCTCCCTCACCCAG-3'	312
EKZON 4R	5'-GCGTGATAGGGGTGCAAC-3'	
EKZON 5F	5'-CATCACCTTGACCCCTCC-3'	273
EKZON 5R	5'-CGTCTACACCTGCCCTGG-3'	
EKZON 6F	5'-GAGGAAGGCAGGAGCAGAG-3'	359
EKZON 6R	5'-CTCAGCACCACCAGGGTC-3'	
EKZON 7F	5'-TGCGGCTGGACTACATCTC-3'	448
EKZON 7R	5'-AGTAGCAGGTTCTGATGCTGC-3'	
EKZON 8F	5'-CCACCTTCCTCCCGAGAC-3'	386
EKZON 8R	5'-CTGGAGGAAGTGCGCTCC-3'	

Çizelge 3.3. Devam*

EKZON 9F	5'-TCCTTCACCAAGGGGAGG-3'	400
EKZON 9R	5'-CTGACACTCAGGCCTCGG-3'	
EKZON 10F	5'-GTCCTGGACAGCAACCACAC-3'	557
EKZON 10R	5'-GGTCCTCAGGGTTCTCCAG-3'	
EKZON 11+12F	5'-GTGTGGGTGGGAGGTGGA-3'	466
EKZON 11+12R	5'-GTGACCGCATGGGTGAAG-3'	
EKZON 13+14F	5'-GGGGCTTGAGGGAATGAG-3'	573
*	5'-CCTGACCCCAGGCTTCTC-3'	
**	5'-CAGGGCAGTACTGGGTGG-3'	
EKZON 13+14R	5'-GGTGATGGGAGGGCAGCA -3'	

NOT: 13 ve 14 no'lu IDUA ekzonları beraber çoğaltılmış ve 2 farklı ara primer kullanılarak DNA dizileme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. * 13 nolu ekzon dizileme için kullanılan revers primer, ** 14 nolu ekzon dizileme için kullanılan forward primer

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrası, Biorad GelDocXR jel görüntüleme sistemi kullanılarak kontrol edilmiştir.

3.5.1. Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan malzemeler

- 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu (1 litre) : 108 gr Tris (Merck), 55 gr Borik Asit (Merck), 7,4 gr EDTA (Merck)
- Agaroz (Prona)
- Yükleme Tamponu: 5.5 ml gliserol (Merck), 4.5 ml dH₂O, 0.01 gr orange G
- Etidyum Bromid: 10 mg Etidyum Bromid (AppliChem), 1 ml dH₂O
- PCR ürün boyutunu tahmin etmek için kullanılan Fermentas marka DNA ladder: 50 bp DNA ladder (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp).

3.6. PCR Ürün Pürifikasyonu

PCR ürünleri, ortamdaki kullanılmamış dNTP'lerin ve primerlerin temizlenmesi için aşağıda ayrıntıları verilen pürifikasyon işleminden geçirilmiştir.

1. PCR ürünlerinin üzerine 30 µl steril su ilave edilir.

2. PCR ürünleri dikkatli bir şekilde 96 kuyucuktan oluşan playtin (MinElute 96 UF Plate-Oiagen) kuyucuklarına aktarılır. Playt vakum cihazına (KnFlab) yerleştirilir ve 800 mbar'da vakumlama yapılır. 10 dakikalık süre sonunda örnekler kolona yapışmış ve sıvı kısım aşağı süzölmüştür.
3. Süre bitimin takiben örneklerin üzerine 30 µl steril su ilave edilir. Yaklaşık 5 dakika boyunca, 800 mbar'da vakum altında yıkama yapılır.
4. Kuyucukların üzerine 25 µl steril su ilave edilir. Playt hafif sallanarak kolona tutunmuş PCR ürünlerinin su fazına geçmesi sağlanır. İşleme 10 dakika boyunca devam edilir. Süre sonunda sıvı kısım mikropipet yardımıyla geri toplanır.

3.7. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi mutasyonun yeri ve tipinin tespit edilmesinde kullanılan en geçerli yöntemdir. DNA dizi analizi zincir sonlanma metodunu temel alarak, istenilen DNA fragmentinin dizisinin okunmasını sağlar. Zincir sonlanma metodunda PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, yeniden sentez gerçekleştirilir. Sentez reaksiyonunda kullanılan normal dNTP'lerin yanısıra floresan işaretli 3'-OH grupları eksik olan dideoksiribonükleik asitler de kullanılmaktadır. Sentez sırasında, enzim dideoksiribonükleik asitleri zincire takınca sentez sonlanmaktadır ve her bir sonlanma sonucunda farklı boyutlarda uçları floresan işaretli DNA fragmentleri oluşmaktadır. Bu DNA fragmentleri ABI 3130 sekans cihazında yürütölerek, istenilen bölgenin DNA dizileri elde edilmektedir.

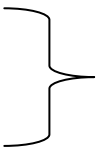
3.7.1. IDUA geni dizileme reaksiyonu

-Steril su	12-4 µl
-5Xbuffer	4 µl
-BigDye	1 µl
-Primer	1 µl
-PCR ürünü	2-10 µl

Sekans işleminde kullanılan primer, PCR için kullanılan forward ya da revers primerdir. Bu primerler sekanslama için kullanılacaksa, stok primerden 2.5 µl alınır (250 pmol) ve son hacim 50 µl olacak şekilde 47.5 µl su ilave edilir. Bu şekilde primerin son konsantrasyonu 5 pmol/ µl olur.

Sekans işleminde kullanılan PCR ürününün agaroz jel elektroforezindeki bant görünümüne göre 2-10 µl ürün alınır. Reaksiyon bileşenlerinin herbiri konulduktan sonra son reaksiyon hacmini 20 µl'ye tamamlamak için 12-4 µl arasında steril su ilave edilir.

3.7.2. Dizileme reaksiyon koşulları

96 °C	1 dakika		1 döngü
96°C	10 saniye		25 döngü
50 °C	5 saniye		
60 °C	4 dakika		

3.8. Sekans Ürün Pürifikasyonu

1. Sekans için amplifiye edilen PCR ürünlerinin üzerine (örnek başına) 2 µl sodyum asetat (3M) ve 50 µl soğuk %100 etil alkol eklenir. PCR ürünleri hafif bir karıştırma sonrasında -20 °C'de 30-40 dakika bekletilir.
2. Örnekler 12.500 rpm'de ve + 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilir.
3. Sekans ürünlerinin çökme yönünün tersinde mikropipet yardımıyla süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde çekilerek atılır.
4. Her bir örneğin üzerine 220-250 µl soğuk %70 etil alkol eklenir.
5. 12.500 rpm'de ve + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Süpernatant kısmı dikkatlice çekilir ve atılır. 95 °C'ye ayarlı heat block da yaklaşık 5-6 dakika boyunca alkol uçurulur.
7. Her bir örneğin üzerine 20 µl steril su eklenir ve 1 dakika boyunca vortekslenerek örneklerin çözülmesi sağlanır. Sonrasında 15-20 dakika oda ısısında bekletilir.
8. Örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edilir. Denatürasyonu takiben -20 °C'de 10 dakika bekletilir ve dizi analiz cihazına yerleştirilerek yürütme yapılır.

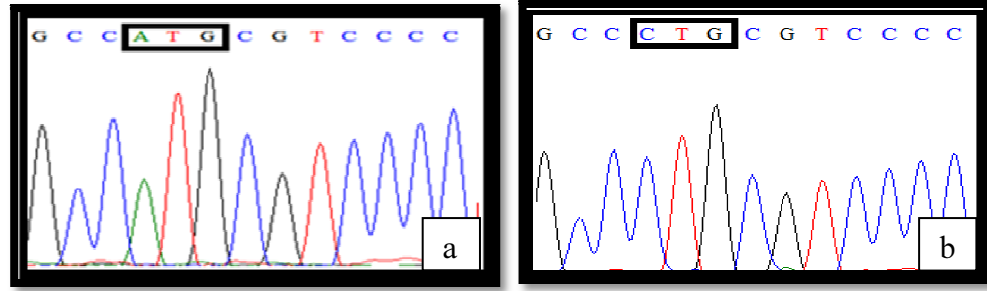
4. BULGULAR

4.1. Mutasyonlar ve polimorfizmler

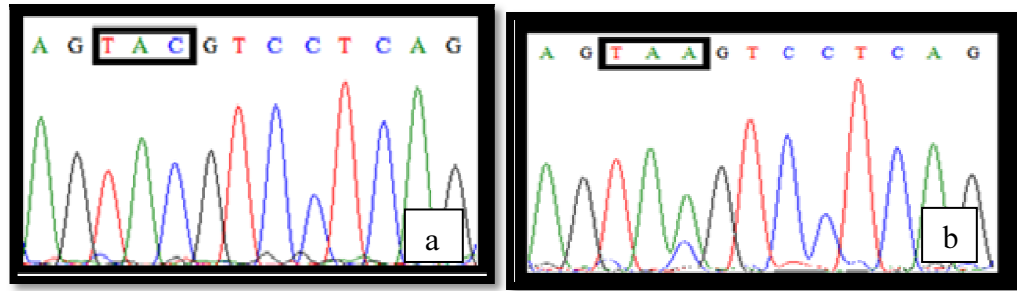
Çalışılan 15 hasta bireyin 10'unda hastalığa sebep olan mutasyonlar tespit edilmiştir. Çalışmamızda daha önce literatürde belirtilmemiş olan 2 adet yeni mutasyon ve bilinen 7 değişik mutasyon tespit edilmiştir. Ayrıca bu tez kapsamında hasta bireylerde 9 farklı polimorfizm bulunmuştur (Çizelge 4.1-4.3; Şekil 4.1-4.11).

Çizelge 4.1. MPS Tip I hastalarında tespit edilen mutasyonlar

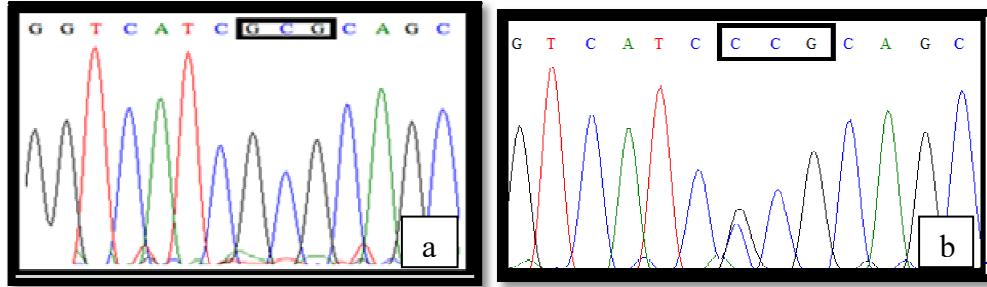
Hasta DNA Arşiv No	Nükleotit değişimi	Ekzon/İntron	Mutasyonun Protein Üzerindeki Etkisi	Mutasyon Tipi	Kaynaklar
M-12-1953	c.1A>C	I	p.M1L / p.M1L	Translasyon başlama bölgesi (Translational initiation site)	Lee-Chen ve Wang 1997
M-12-1955	c.192C>A / c.1067G>C	II-VIII	p.Y64X / p.A327P	Anlamsız (Nonsense) / Yanlış Anlamalı (Missense)	Bach vd., 1993/ Bunge vd., 1994
M-12-1954	c.494-1G>A	Intr.IV	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Kırılma (Splicing)	Bertola vd, 2011
M-12-1956	c.494-1G>A	Intr.IV	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Kırılma (Splicing)	Bertola vd, 2011
M-13-2070	c.494-1G>A	Intr.IV	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Kırılma (Splicing)	Bertola vd, 2011
M-13-2371	c.793 -5C>A c.793 -6C>G	Intr.VI	Splays defekti	Kırılma (Splicing)	Bu çalışmada
M-12-1950	c.1205G>A	IX	p.W402X / p.W402X	Anlamsız (Nonsense)	Scott vd., 1992
M-13-2080	c.1205G>A	IX	p.W402X / p.W402X	Anlamsız (Nonsense)	Scott vd., 1992
M-12-1949	c.1598C>T	XI	p.P533L / p.P533L	Yanlış Anlamalı (Missense)	Voskoboeva vd., 1998
M-12-1957	c.1882C>T	XIV	p.R628X / p.R628X	Anlamsız (Nonsense)	Beesley vd., 2001



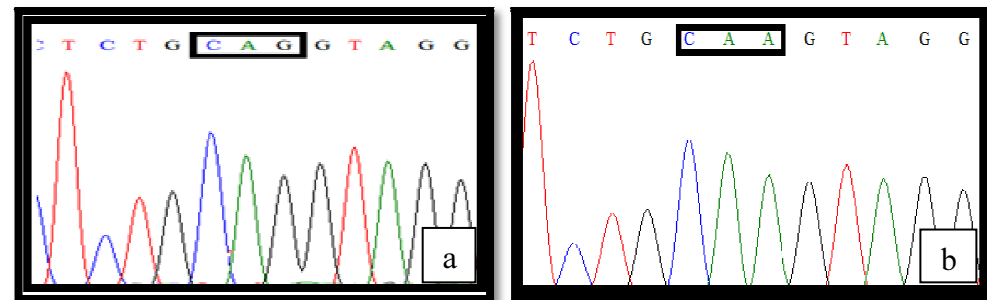
Şekil 4.1. 1953 no'lu hastada p.M1L (ATG>CTG) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



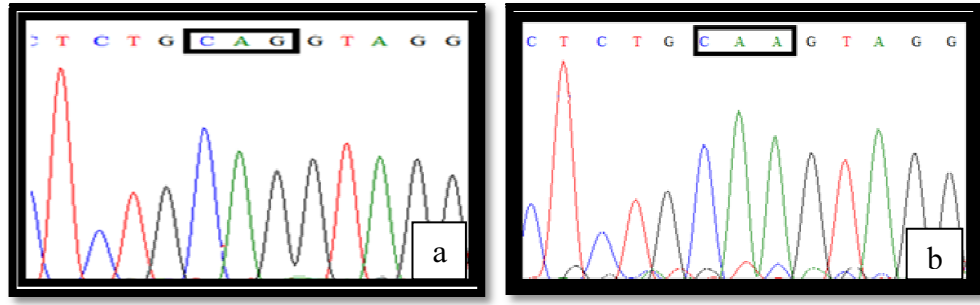
Şekil 4.2. 1955 no'lu hastada p.Y64X (TAC>TAA) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



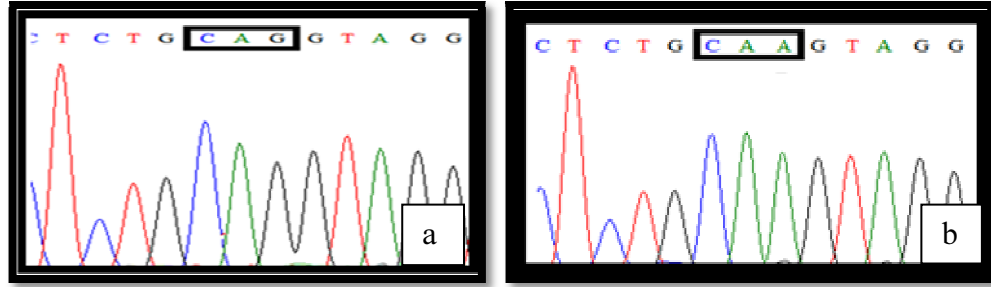
Şekil 4.3. 1955 no'lu hastada p.A327P (GCG>CCG) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



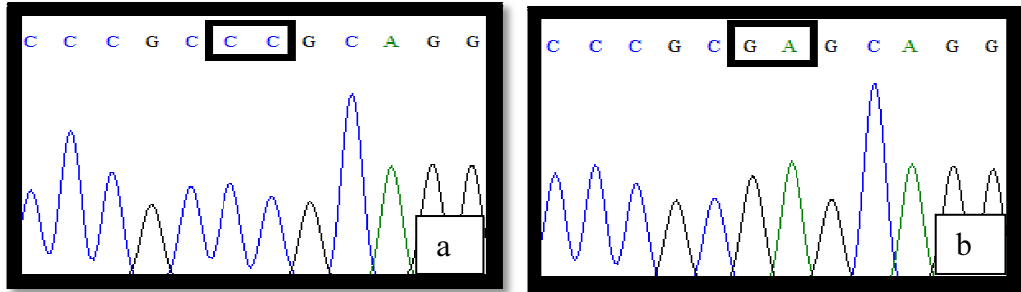
Şekil 4.4. 1954 no'lu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



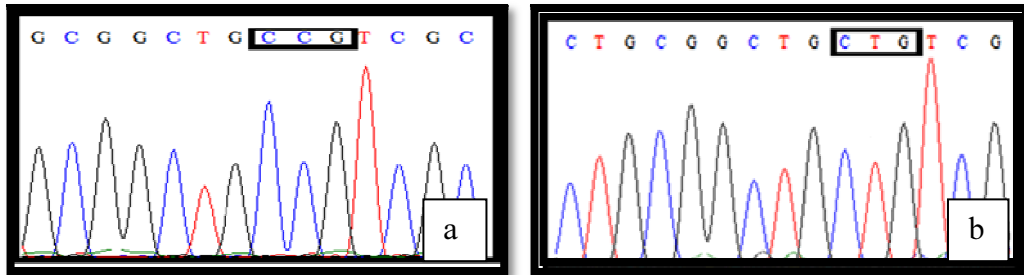
Şekil 4.5. 1956 no'lu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



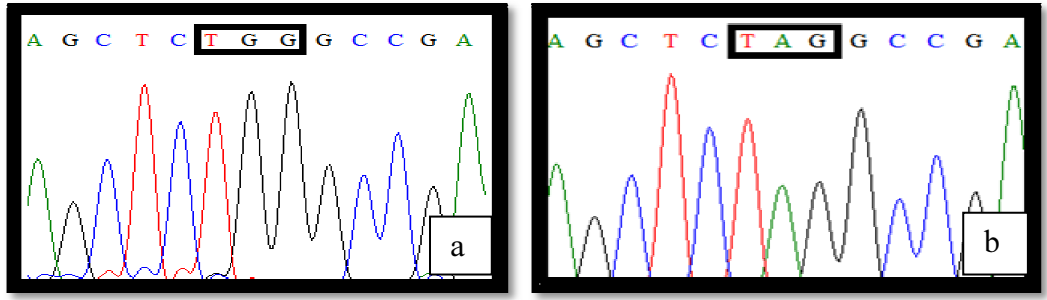
Şekil 4.6. 2070 no'lu hastada c.494-1G>A nükleotid değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



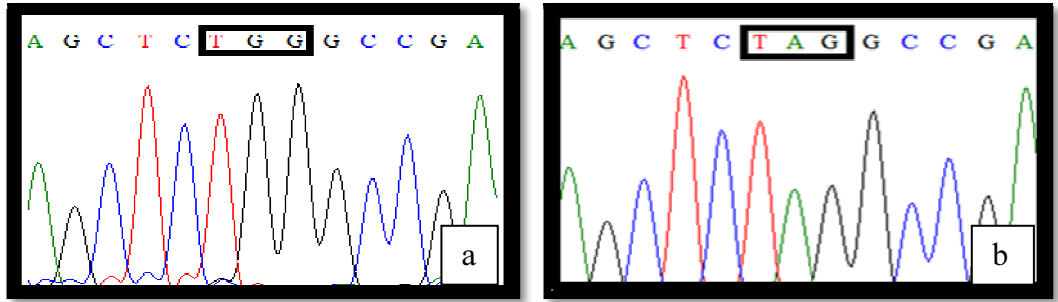
Şekil 4.7. 2371 no'lu hastada c.793 -5C>A ve c.793 -6C>G nükleotid değişimleri; a) Normal dizi, ve b) Mutant dizi



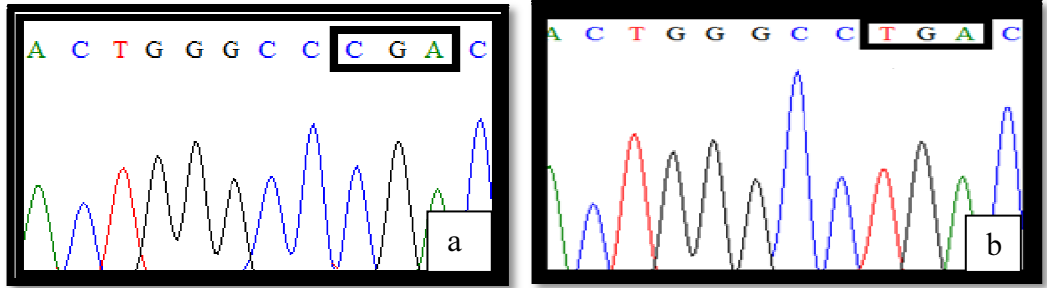
Şekil 4.8. 1949 no'lu hastada p.P533L (CCG>CTG) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



Şekil 4.9. 1950 no'lu hastada p.W402X (TGG>TAG) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



Şekil 4.10. 2080 no'lu hastada p.W402X (TGG>TAG) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi



Şekil 4.11. 1957 no'lu hastada p.R628X (CGA>TGA) değişimi; a) Normal dizi ve b) Mutant dizi

Çizelge 4.2. MPS Tip I hastalarında tespit edilen mutasyonların fenotipik etkisi

Hasta DNA Arşiv No	Nükleotit değişimi	Mutasyonun Protein Üzerindeki Etkisi	Fenotipik Yansıma
M-12-1953	c.1A>C	p.M1L / p.M1L	Hurler Sendromu
M-12-1955	c.192C>A / c.1067G>C	p.Y64X / p.A327P	Hurler Sendromu
M-12-1954	c.494-1G>A	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Hurler Sendromu
M-12-1956	c.494-1G>A	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Hurler Sendromu
M-13-2371	c.793-5C>A	Splays defekti	Hurler-Sheie Sendromu
M-13-2371	c.793-6C>G	Splays defekti	Hurler-Sheie Sendromu
M-13-2070	c.494-1G>A	p.R166GfsX27/ p.R166GfsX27	Hurler Sendromu
M-12-1950	c.1205G>A	p.W402X / p.W402X	Hurler Sendromu
M-13-2080	c.1205G>A	p.W402X / p.W402X	Hurler Sendromu
M-12-1949	c.1598C>T	p.P533L / p.P533L	Hurler-Sheie Sendromu
M-12-1957	c.1882C>T	p.R628X / p.R628X	Hurler Sendromu

Çizelge 4.3. MPS Tip I hastalarında tespit edilen polimorfizmler

Hasta DNA Arşiv No	Ekzon/İntron No	Polimorfizm
M-12-1949	I	p.H33Q T>G (hom)
M-12-1955	I	p.H33Q T>G Hom
		p.A8A C>A Het
		p.A20A G>A Het
M-12-1953	III	p.R105Q G>A Hom
	Intr.V	IVS5-8C>T Hom
	VII	p.A314A G>C Hom
	IX	p.T410T C>G Hom

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında klinik muayenesi sonucunda MPS Tip I ön tanısı alan 15 hastada mutasyon analizi yapılmıştır. Tip I tanısı konmuş olan bu 15 hastanın 10'unda 2'si yeni olmak üzere 9 farklı hastalığa neden olan nükleotit değişimi saptanmıştır. Böylece hastalık tanısı, moleküler genetik analizler yapılarak da doğrulanmıştır. Klinik olarak MPS Tip I tanısı konmuş olan 5 hastada ise herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Mutasyon tespit edemediğimiz hastaların moleküler analizlerinin yapılabilmesi, genetik olarak ilgili MPS tipine sokulabilmesi amacıyla hasta hekimlerine gerekli öneriler ve bilgiler bildirilmiştir.

Bulunan mutasyonlar 9 hastada homozigot ve bir hastada birleşik heterozigot durumda saptanmıştır (Çizelge 4.1). Saptanan mutasyonların 3'ü yanlış anlamlı (p.M1L, p.A327P, p.P533L), 3'ü anlamsız (p.Y64X, p.W402X, p.R628X) ve geriye kalan 3 tanesi ise kırılma (c.494-1G>A, c.793-5 C>A, c.793-6 C>G) mutasyonlarıdır.

p.M1L mutasyonu şu ana kadar yapılan çalışmalarda bir Çinli hastada (Lee-Chen ve Wang 1997) birleşik heterozigot ve bir İspanyol hastada homozigot olarak saptanmıştır. Bu mutasyonun homozigot durumda Hurler fenotipine neden olduğu bildirilmiştir (Bertola vd, 2011). Bu çalışma kapsamında ise bir hastada homozigot olarak bulunmuştur. Bu mutasyon genin protein kodlayıcı ilk bazında gerçekleştiği için metiyonin (ATG) amino asiti yerine lösin (CTG) amino asidi geçmektedir. Translasyon başlama kodunu değiştiği için translasyon düzgün kodondan başlayamamakta ve bir sonraki metiyonin kodonu olan 133'üncü amino asite kadar bir atlama olmaktadır. 133'üncü amino asit olan metiyonin 4. ekzonun içerisinde yer almaktadır ve dolayısıyla 1, 2, 3 ve 4. ekzonun bir kısmının da yer aldığı 132 amino asitlik bir bölge α -L-iduronidaz enziminin protein yapısına dahil olamamaktadır. Sinyal peptit kısmını da içerecek şekilde bir kayıp sözkonusu olduğu için; IDUA proteininin endoplazmik retikuluma transport ve lizozom içine taşınma süreci bozulmaktadır. Sonuç olarak 521 amino asitlik, eksik ve aktivite gösteremeyen bir enzim sentezlenmektedir (Lee-Chen ve Wang 1997).

p.Y64X mutasyonu ilk kez iki Arap kökenli İsrailli'de (bir Dürzi ve bir Müslüman Arap) homozigot durumda saptanmıştır. Bu mutasyonun Hurler fenotipine neden olduğu açıklanmıştır (Bach vd., 1993). p.Y64X, nadir görülen bir mutasyon özelliği taşımaktadır. Bu genetik değişimde, tirozin kodlayan 64. kodon stop kodonuna

dönüşmektedir. Mutasyon sonucunda 589 amino asit eksikliği olan, inaktif bir enzim sentezlenmektedir. p.Y64X mutasyonu bizim çalışmamızda bir hastada p.A327P mutasyonu ile birleşik heterozigot durumda bulunmuştur. Hastanın klinik semptomlarla hastaneye başvurmasından dolayı bu iki mutasyonun birbirlerine *trans* konfigürasyonda bulunduğunu düşünmekteyiz. Maalesef bu hastaların ebeveynlerinin DNA örnekleri alınamadığı için anne-baba örneklerinde segregasyon için gerekli analizler yapılamamıştır. p.A327P mutasyonunda 327. pozisyonadaki alanin, prolin amino asidine dönüşmektedir. Bu mutasyonun homozigot durumdayken Hurler gösterdiği açıklanmıştır (Bunge vd., 1994). Bu mutasyonun görülme sıklığı merkezi Avrupa için (Alman ve Hollandalılar) %11 (Scott vd., 1995), İngiltere için %3.5-6 (Scott vd., 1995; Bessley vd., 2001), İtalya için %5.6 (Gatti vd., 1997), Avusturya için %2.2 (Kroefple vd., 2001), Brezilya için %3.3-8.3 (Matte vd., 2000; Matte vd., 2003) olarak bildirilmiştir. Çalışmalar çoğunlukla Avrupa kökenli beyaz ırkta yapılmıştır. 2005 yılında 85 Türk MPS I hastasıyla yapılan bir çalışmada bu mutasyonun frekansı %3.5 olarak bulunmuştur (Barkar vd., 2005). Genel olarak literatür çalışmalarına bakıldığında bu mutasyonun tek başına homozigot bulunmaktan ziyade, diğer anlamlı ve anlamsız mutasyonlarla beraber, birleşik heterozigot durumda olduğu görülmektedir. Prolinin yan zinciri amino grubuyla bağ yaptığı için prolin bir imino asit olarak bilinir. Prolin protein düz zincirine katıldığında ana protein omurgasını 60°'lik açı değişimine zorlamaktadır. Bu açısal bağlanma, normal olarak prolinin bulunduğu bölgelerde ya da mutasyon sonucu yapıya girdiği protein bölgelerinde esneklik kaybına neden olmaktadır. Bu sebeple α -heliks ve β -plaka gibi düzenli sekonder yapıların orta kısmında yer aldığı zaman konformasyonel açıdan düzenli olan sekonder yapıyı bozar. A327 rezidusu α -L-iduronidaz proteininin 6. α -heliksi içinde, proteinin iç kısmına gömülüdür. Doğal protein yapısında bulunması gereken alanin yerine prolinin geçmesi; proteinin aktivitesini olumsuz yönde etkileyecek, stabiliteyi düşürecek ya da yıkımını hızlandıracak şekilde konformasyonel değişime neden olmuş olabilir.

p.W402X, IDUA geninin 9 no'lu ekzonunda meydana gelen ve dur kodonu oluşturan yaygın bir mutasyondur (Scott vd., 1992). Bu yaygın genetik değişim bizim çalışmamızda iki hastada homozigot durumda tespit edilmiş olmasına rağmen, Türkiye için allel frekansı %45.3 olarak verilmiştir (Barkar vd., 2005). Bu mutasyon; 402 no'lu amino asitten sonrası ifade edilemediği için inaktif ve eksik IDUA proteini üretilmesine neden olmaktadır. p.W402X mutasyonu homozigot olduğu durumlarda çok ağır klinik

tablo sergiler ve bu yüzden α -L-iduronidaz enzimi yokluğunda Hurler sendromu gelişir (Voskoboeva vd., 1998; Beesley vd., 2001).

c.494-1G>A kırılma (splays) bölge mutasyonu 2011 yılında 21 Türk MPS Tip I hastası ile yapılan bir çalışmada, 5 hastada ilk kez bulunmuş ve %41'lik allel frekansı yüksekliğinden dolayı Türk mutasyonu olarak rapor edilmiştir (Bertola vd., 2011). Bu tez çalışması kapsamında ise 3 hastada homozigot olarak bulunmuştur. Çalışılan hasta sayısının azlığı nedeniyle; mutant allel frekansı hesaplamının bu çalışma için şimdilik uygun olmadığını düşünüyoruz. Bu mutasyon splays mekanizmasını bozan bir mutasyondur. Dördüncü intronun son nükleotidindeki değişiklik nedeniyle, 4. intronun akseptör bölgesi 5. ekzonun içine 4 nükleotit kaymakta ve bu bölgede çerçeve kaymasına neden olmaktadır. Böylece 166. amino asit ve sonrasındaki amino asit dizisi değişerek 27 aminoasit sonrasında dur kodonu oluşturmaktadır (p.R166GfsX27). IDUA enziminde 193 amino asitten sonrası ifade edilememekte ve anlamsız bir protein oluşmaktadır. İşlevsel α -L-iduronidaz enzimi hiç oluşmadığı için ağır form olan Hurler sendromu ortaya çıkmaktadır (Bertola vd., 2011).

c.793-5C>A ve c.793-6C>G mutasyonları ilk kez bu çalışma kapsamında tespit edilen iki yeni nükleotit değişikliğidir. Bu iki yeni mutasyon tek bir hastada homozigot durumda saptanmıştır. Bu hastanın anne, baba ve kardeşinde yapılan segregasyon analizinde bu değişiklikler heterozigot olarak bulunmuştur ve bu bireylerde herhangi bir hastalık semptomuna rastlanmamıştır. Sonuç olarak her iki mutasyonunda ASSEDA (Automated Splice Site and Exon Definition Analyses) ve NetGene2 programlarıyla yapılan analizlerinde; intron 6 ve ekzon 7 arasındaki splays mekanizmasını etkilediği (etkinliğini düşürdüğü) ve patojenik bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Splays mekanizmasındaki bir hata ise anormal mRNA üretimine ve dolayısıyla aktif olmayan ya da yeterli enzimatik aktiviteye sahip olmayan IDUA proteinin sentezi ile sonuçlanmaktadır.

p.P533L değişimi, ilk kez 2 Rus hastada Q70X ve 974ins12 mutasyonlarıyla birleşik heterozigot durumda saptanan, nadir bir mutasyondur (Voskoboeva vd., 1998). Günümüze kadar bu mutasyonu taşıyan başka bir hasta rapor edilmemiştir. Bu bölge için tanımlanmış ikinci yanlış anlamlı (missense) mutasyon ise P533R değişimidir. P533 bölgesinin CpG zengini bir bölgede bulunması nedeniyle mutasyonlar için sıcak bölge -“hot-spot” - olarak bildirilmiştir (Voskoboeva vd., 1998). P533 rezidusunun da içinde yer aldığı C terminal bölgesininin 130 amino asitlik kısmının (523-653) özellikle

protein fonksiyonunda önemli olduğu ve bu bölgede meydana gelen bazı mutasyonların (p.P533R, p.Q561X, p.Q584X, p.R619G, p.R628P, p.R628X, p.X654G) ağır fenotipler oluşturduğu bulunmuştur (Tieu vd., 1995; Lee-Chen vd., 1999; Beesley vd., 2001; Lee-Chen vd., 2002; Matte vd., 2003). C terminal bölgesindeki amino asit diziliminin protein-protein etkileşimlerinde görev alan fibronektin III proteini ile benzerlik gösterdiği de bulunmuştur (Rempela vd., 2005; Vazna vd., 2009).

p.R628X mutasyonu 1 hastada homozigot durumda tespit edilen ve zincir sentezini sonlandıran yanlış anlamlı bir mutasyondur. R628 rezidusunda IDUA proteinin C terminal bölgesini oluşturan 14. ekzon içinde yer almakta ve proteinin C terminal bölgesine oldukça yakın bir yerde bulunmaktadır. Arjininin dur kodonuna dönüşmesi proteinin C terminal bölgesinde ciddi bir amino asit eksikliğine yol açar ve dolayısıyla bu mutasyon homozigot durumda ağır hastalık fenotipinin (Hurler) oluşmasına neden olur (Beesley vd., 2001; Matte vd., 2003; Chkioua vd., 2011; Vazna vd., 2009).

Şu ana kadar IDUA geninde 32 farklı non-patojenik olduğu rapor edilen dizi varyasyonu yani polimorfizm tanımlanmıştır. Bu çalışma kapsamında da 9 MPS Tip I hastasının 3' ünde daha önce tanımlanmış olan 7 değişik polimorfizm bulunmuştur. Bu genetik polimorfizmler p.A8A, p.A20A, p.H33Q, p.R105Q, IVS5-8C>T, p.A314A, p.T410T nükleotit ya da amino asit değişimlerinden oluşmaktadır. Bu polimorfizmlerin IDUA mRNA'sının işleme sürecine, stabilitesine ya da α -L-iduronidazın taşınmasına, ve aktivitesine nasıl bir etki yaptığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu polimorfizmleri sağlıklı bireylerde görünen α -L-iduronidaz aktivitesinin değişkenliğine katkı sağlayabilirler ve MPS I hastalarında görülen değişik mutasyonlarla kombinasyonlar yaparak hastalığın fenotipik şiddetinde değişikliğe neden olabilmektedirler (Scott vd., 1993).

Sonuç olarak bu tez kapsamında klinik olarak MPS I tanısı almış 15 hastada IDUA geni üzerinde yapılan moleküler genetik analizlerde 10 hastanın 9 değişik mutasyon taşıdığı tespit edilmiş ve klinik tanıları DNA düzeyinde de kesinleştirilmiştir.

Mutasyon çalışmalarının hastalara sağlayacağı en büyük avantajların başında klinik olarak tiplendirilmesi zor olan hastalıklarda, hastalık tanısının konması ve bu tanıya uygun tedavi seçeneklerinin uygulanması gelmektedir. MPS'lar birçok organ ve dokuyu farklı derecelerde etkileyen kronik, ilerleyici ve multisistemik bir hastalık grubu olduğu için, ümit verici gelişmeler yaşansa da hastalığın tüm semptomlarını ortadan kaldıracak

bir yöntem ya da ilaç henüz geliştirilememiştir. MPS Tip I, ERT tedavisine iyi yanıt veren tiplerden biridir. Bu hastalara özellikle ERT tedavisi uygulanarak hastanın sistemik şartlarının iyileştirilmesine, günlük sosyal yaşamını daha rahat geçirebilmesine ve semptomların ağırlaşmasının geciktirilmesine çalışılmaktadır.

Klinik fenotipine bakarak ya da Biyokimyasal testlerle MPS Tip I tanısı konmuş kişilerde, mutasyon taraması yapılarak DNA düzeyinde de tanı kesinleştirilmiştir. Ayrıca, IDUA geniyle ilgili toplumumuza ait mutasyon profillerinin belirlenmesine katkıda bulunulmuştur. Mutasyon profilleri kullanılarak genotip-fenotip ilişkilerinin kurulması mümkün olacaktır. İlgili mutasyonların ilaç tedavisine yanıt verip-vermediği tespit edilebilecektir. Mutasyon taramasından elde edilen verilerden yola çıkılarak toplum taramasına yönelik DNA tanı kitleri geliştirilmesi de bu tip çalışmaların sağlayacağı katkılardan birisidir. Ayrıca ilgili ailelere, prenatal tanı ve genetik danışmanlık hizmetleri sağlanarak bu ailelere ileriki yıllarda sağlıklı çocuklara sahip olması şansı da sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aerts J.M., Van Weely S., Boot R., Hollak C.E. ve Tager J.M., 1993. Pathogenesis of lysosomal storage disorders as illustrated by Gaucher disease, *J Inherit Metab Dis*, 16, 288-291.
- Alif N., Hess K., Straczek J., Sebbar S., Belahsen Y., Mouane N., Abkari A., Nabet P. ve Gelot M.A., 2000. Mucopolysaccharidosis type I in Morocco: clinical features and genetic profile, *Arch Pediatr*, 7, 597-604.
- Bach G., Moskowitz S.M., Tieu P.T., Matynia A. ve Neufeld E.F., 1993. Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area, *Am J Hum Genet*, 53, 330-338.
- Baehner F., Schmiedeskamp C., Krummenauer F., Miebach E., Bajbouj M., Whybra C., Kohlschütter A., Kampmann C. ve Beck M., 2005. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany, *J Inherit Metab Dis*, 28, 1011-1017.
- Barkar V., Yılmaz A., Ergün M.A., Ezgü F.S., Menevşe A. ve Hasanoğlu A., 2005. Türk Toplumunda Tip I Mukopolisakkaridoz'un Moleküler Analizi, *Türkiye Klinikleri, J Pediatr Sci*, 1, 10, 127-128.
- Barton N.W., Brady R.O., Dambrosia J.M., Di Bisceglie A.M., Doppelt S.H., Hill S.C., Mankin H.J., Murray G.J., Parker R.I., Argoff C.E., Raji P., Grewal M.D. ve Kian-Ti Yu M.D., 1991. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency–macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 324, 1464-1470.
- Beck M, 2010. Therapy for lysosomal storage disorders, *IUBMB Life*, 62, 1, 33-40.
- Beesley C.E., Meaney C.A., Greenland G.A., Adams V., Vellodi A., Young E.P. ve Winchester B.G., 2001. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations, *Hum Genet*, 109, 503-511.
- Beesley C., Moraitou M., Winchester B., Schulpis K., Dimitriou E. ve Michelakakis H., 2004. Sanfilippo B syndrome: molecular defects in Greek patients. *Clin Genet*, 65, 143-149.
- Belichenko P.V., Dickson P.I., Passage M., Jungles S., Mobley W.C. ve Kakkis E.D., 2005. Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human alpha-L-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain, *Mol Genet Metab*, 86, 1-2, 141-149.
- Bertola F., Filocamo M., Casati G., Mort M., Rosano C., Tyłki-Szymanska A., Tüysüz B., Gabrielli O., Grossi S., Scarpa M., Parenti G., Antuzzi D., Dalmau J., Di Rocco M., Vici C.D., Okur İ., Rosell J., Rovelli A., Furlan F., Rigoldi M., Biondi A., Cooper D.N. ve Parini R., 2011. IDUA Mutational Profiling of a Cohort of 102 European Patients with Mucopolysaccharidosis Type I: Identification and Characterization of 35 Novel α -L-iduronidase (IDUA) Alleles Wiley-Liss, INC. DOI, 10, 1002, humu, 21479.
- Bijsterbosch M.K., Donker W., van de Bilt H., van Weely S., van Berkel T.J. ve Aerts J.M., 1996. Quantitative analysis of the targeting of mannose-terminal

- glucocerebrosidase, predominant uptake by liver endothelial cells, *Eur J Biochem*, 237, 344-349.
- Boelens J.J., Prasad V.K., Tolar J., Wynn R.F. ve Peters C., 2010. Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders, *Pediatr Clin North Am*, 57, 123-145.
- Brooks D.A., Fabrega S., Hein L.K., Parkinson E.J., Durand P., Yogalingam G. Matte U., Giugliani R., Dasvarma A., Eslahpazire J., Henrissat B., Mornon J.P., Hopwood J.J. ve Lehn P., 2011. Glycosidase active site mutations in human α -L-iduronidase, *Glycobiology*, 11, 741-750.
- Bunge S., Kleijer W.J., Steglich C., Beck M., Zuther C., Morris C.P., Schwinger E., Hopwood J.J., Scott H.S. ve Gal A., 1994. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients, *Hum Mol Genet*, 3, 861-866.
- Chkioua L., Khedhiri S., Turkia H.B., Tchong R., Froissart R., Chahed H., Ferchichi S., Dridi M.F.B., Vianey-Saban C., Laradi S. ve Miled A., 2011. Mucopolysaccharidosis type I: molecular characteristics of two novel alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian patients *Diagnostic Pathology*, 6, 47.
- Clarke L.A., Nelson P.V., Warrington C.L., Morris C.P., Hopwood J.J. ve Scott H.S., 1994. Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: identification of two additional frequent mutations, *Hum Mutat*, 3, 275-282.
- Clarke L.A., 1997. Clinical diagnosis of lysosomal storage diseases. In: Applegarth DA, Dimmick JE, Hall JG, eds. *Organelle diseases*, Chapman and Hall, London, 37-71.
- Cleary M.A. ve Wraith J.E., 1995. The presenting features of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler syndrome), *Acta Paediatr*, 84, 337-339.
- Clements P.R., Brooks D.A., Saccone G.T.P. ve Hopwood J.J., 1985. Human α -L-iduronidase, Purification, monoclonal antibody production, native and subunit molecular weight, *Eur J Biochem*, 152, 21-28.
- Cox-Brinkman J., Boelens J.J., Wraith J.E., O'Meara A., Veys P., Wijburg F.A., Wulffraat N., ve Wynn R.F., 2006. Haematopoietic cell transplantation (HCT) in combination with enzyme replacement therapy (ERT) in patients with Hurler syndrome, *Bone Marrow Transplant*, 38, 17-21.
- Durand P., Lehn P., Callebut I., Fabrega S., Henrissat B. ve Mornon J.P., 1997. Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis, *Glycobiol*, 7, 277-284.
- Ezgü F., 2011. Lizozomal depo hastalıkları ve enzim yerine koyma tedavisi, *Türkiye Klinikleri J Pediatri*, 7, 2, 99-106.
- Fan X., Zhang H., Zhang S., Bagshaw R.D., Tropak M.B., Callahan J.W. ve Mahuran D.J., 2006. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C), *Am J Hum Genet*, 79, 738-44.

- Frost G.I., Csoka T.B., Wong T. ve Stern R., 1997. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase, *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 10-15.
- Gatti R., Di Natale P., Villani G.R., Filocamo M., Muller V., Guo X.H., Nelson P.V., Scott H.S. ve Hopwood J.J., 1997. Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients, *J Inherit Metab Dis* 20, 803-806.
- Gort L., Chabas A. ve Coll M.J., 1998. Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type 1 patients: high prevalence of the W402X mutation, *Hum Mutat*, 11, 332-333.
- Guffon N., Souillet G., Maire I., Straczek J. ve Guibaud P., 1998. Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation, *J Pediatr.*, 133, 119-25.
- Heinegard D. ve Oldberg A., 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules, *FASEB J*, 3, 2042-2051.
- Hollak C.E., Aerts J.M., Goudsmit R., Phoa S.S., Ek M., van Weely S., von dem Borne A.E., van Oers M.H., 1995. Individualised low-dose alglucerase therapy for type 1 Gaucher's disease, *Lancet*, 345, 1474-1478.
- Hopwood J.J. ve Morris C.P., 1990. The mucopolysaccharidoses: diagnosis, molecular genetics and treatment, *Mol Biol Med*, 7, 381-404.
- Hrebicek M., Mrazova L., Seyrantepe V., Durand S., Roslin N.M., Nosková L., Hartmannová H., Ivánek R., Cízková A., Poupetová H., Sikora J., Urinová J., Stranecký V., Zeman J., Lepage P., Roquis D., Verner A., Ausseil J., Beesley C.E., Maire I., Poorthuis B.J., van de Kamp J., van Diggelen O.P., Wevers R.A., Hudson T.J., Fujiwara T.M., Majewski J., Morgan K., Kmoch S. ve Pshezhetsky A.V., 2006. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome), *Am J Hum Genet*, 79, 807-19.
- Kakkis E.D., Muenzer J., Tiller G.E., Waber L., Belmont J., Passage M., Izykowski B., Phillips J., Doroshov R., Walot I., Hoft R. ve Neufeld E.F., 2001. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I, 344, 182-8.
- Kjellen L. ve Lindahl U., 1991. Proteoglycans: structure and interactions, *Annu Rev Biochem*, 60, 433-475.
- Koç I., 2008. Prevalence and sociodemographic correlates of consanguineous marriages in Turkey, *J Biosoc Sci*, 40, 1, 137-148.
- Kroepfl T., Milos I., Paul K., Plecko B. ve Paschke E., 2001. The frequency of common mutations among patients with mucopolysaccharidosis types I, II and IIIA diagnosed in Austria over the last 17 years, *Clin Genet*, 60, 393-394.
- Lee-Chen GJ ve Wang TR., 1997. Mucopolysaccharidosis type I: identification of novel mutations that cause Hurler/Scheie syndrome in Chinese families, *J Med Genet*, 34, 11, 939-41.
- Lee-Chen G.J., Lin S.P., Tang Y.F. ve Chin Y.W., 1999. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting alpha-L-iduronidase activity, *Clin Genet*, 56, 66-70.

- Lee-Chen G.J., Lin S.P., Chen I.S., Chang J.H., Yang C.W. ve Chin Y.W., 2002. Mucopolysaccharidosis type I: identification and characterization of mutations affecting alpha-Liduronidase activity, *J Formos Med Assoc*, 101, 425-428.
- Lepperdinger G., Strobl B. ve Kreil G., 1998. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity, *J Biol Chem*, 273, 22466-22470.
- Litjens T., Baker E.G., Beckmann K.R., Morris C.P., Hopwood J.J. ve Callen D.F., 1989. Chromosomal localization of ARSB, the gene for human Nacetylglactosamine- 4-sulphatase, *Hum Genet*, 82, 67-68.
- Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E. ve Carey W.F., 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders, *JAMA*, 281, 249-254.
- Mandelli J., Wajner A., Pires R.F., Giugliani R. ve Coelho J.C., 2002. Detection of mucopolysaccharidosis type I heterozygotes based on the biochemical characteristics of leukocyte alpha-L-iduronidase, *Arch Med Res*, 33, 1, 20-24.
- Matte U., Leistner S., Lima L., Schwartz I. ve Giugliani R., 2000. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients, *Am J Med Genet*, 90, 108-109.
- Matte U., Yogalingam G., Brooks D., Leistner S., Schwartz I., Lima L., Norato D.Y., Brum J.M., Beesley C., Winchester B., Giugliani R. ve Hopwood J.J., 2003. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol Genet Metab*, 78, 37-43.
- Montano A.M., Tomatsu S., Brusius A., Smith M. ve Orii T., 2008. Growth charts for patients affected with Morquio A disease, *Am J Med Genet*, 146, 1286-1295.
- Morris C.P., Guo X.H., Apostolou S., Hopwood J.J. ve Scott H.S., 1994. Morquio A syndrome: cloning, sequence, and structure of the human N-acetylgalactosamine 6-sulfatase (GALNS) gene, *Genomics*, 22, 652-654.
- Muenzer J., 2004. The mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations, *J Pediatr*, 144, 27-34.
- Murphy A., Flanagan O., Dunne K. ve Lynch S., 2007. High incidence of Cohen syndrome among Irish travelers, *Clin Dysmorphol*, 16, 257-259.
- Natowicz M.R., Short M.P., Wang Y., Dickersin G.R., Gebhardt M.C., Rosenthal D.I., Sims K.B. ve Rosenberg AE., 1996. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency, *N Engl J Med*, 335, 1029-1033.
- Nelson J., 1997. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland, *Hum Genet*, 101, 355-358.
- Neufeld E.F. ve Muenzer J., 1989. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed, McGraw-Hill, New York, 1565-1588.
- Neufeld E.F. ve Muenzer J., 1995. The mucopolysaccharidoses, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*, 7th ed. McGraw-Hill, New York, 2465-2494.

- Neufeld E.F. ve Muenzer J., 2001. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beudet AL, Sly WS and Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 3421-3452.
- Poorthuis B.J., Wevers R.A., Kleijer W.J., Groener J.E., de Jong J.G., van Weely S., Niezen-Koning K.E. ve van Diggelen O.P., 1999. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands, *Hum Genet*, 105, 151-156.
- Piraud M., Boyer S., Mathieu M. ve Maire I., 1993. Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples, *Clin Chim Acta*, 221, 171-181.
- Prince W.S., McCormick L.M., Wendt D.J., Fitzpatrick P.A., Schwartz K.L., Aguilera A.I., Koppaka V., Christianson T.M., Vellard M.C., Pavloff N., Lemontt J.F., Qin M., Starr C.M., Bu G. ve Zankel T.C., 2004. Lipoprotein receptor binding, cellular uptake, and lysosomal delivery of fusions between the receptor-associated protein (RAP) and alpha-L-iduronidase or acid alpha-glucosidase, *J Biol Chem*, 279, 33, 35037-35046.
- Prommajan K., Ausavarat S., Srichomthong C., Puangsricharern V., Suphapeetiporn K. ve Shotelersuk V., 2011. A novel p.E276K IDUA mutation decreasing α -L-iduronidase activity causes mucopolysaccharidosis type I, *Molecular Vision*, 17, 456-460.
- Rempela B.P., Clarke L.A. ve Withers S.G., 2005. A homology model for human α -L-iduronidase: Insights into human disease *Molecular Genetics and Metabolism* 85, 28-37.
- Robertson D.A., Callen D.F., Baker E.G., Morris C.P. ve Hopwood J.J., 1988. Chromosomal localization of the gene for human glucosamine-6-sulphatase to 12q14, *Hum Genet*, 79, 175-178.
- Scott H.S., Anson D.S. ve Orsborn A.M., 1991. Human α -L-Iduronidase: cDNA isolation and expression, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 9695-9699.
- Scott H.S., Guo X.H., Hopwood J.J. ve Morris C.P., 1992. Structure and sequence of the human α -L-Iduronidase gene, *Genomics* 13, 1311-1313.
- Scott H.S., Litjens T. Nelson P.V., Thompson P.R., Brooks D.A., Hopwood J.J. ve Morris C.P., 1993. Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes, *Am J Hum Genet*, 53, 973-986.
- Scott H.S., Blanch L., Guo X.H., Freeman C., Orsborn A., Baker E., Sutherland G.R., Morris C.P. ve Hopwood J.J., 1995a. Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome, *Nat Genet*, 11, 465-467.
- Stenson P.D., Ball E.D., Howells K., Phillips A.D., Mort M. ve Cooper D.N., 2009. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalised genomics, *Hum Genomics*, 4, 2, 69-72
- Scott H.S., Bunge S., Gal A., Clarke L.A., Morris C.P. ve Hopwood J.J., 1995b. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications, *Hum Mutat*, 6, 288-302.

- Sly W.S., Quinton B.A., McAlister W.H. ve Rimoin D.L., 1973. Beta glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis, *J Pediatr*, 82, 249-257.
- Solyom E., 1996. Incidence data for Mucopolysaccharidoses in Hungary, 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases Program, Wollongong, Australia, 75.
- Soni S., Hente M., Breslin N., Hersh J., Whitley C., Cheerva A. ve Bertolone S., 2007. Pre-stem cell transplantation enzyme replacement therapy in Hurler syndrome does not lead to significant antibody formation or delayed recovery of the endogenous enzyme post-transplant: a case report, *Pediatr Transplant*, 11, 563-567.
- Sun L., Li C., Song X., Zheng N., Zhang H. ve Dong G., 2011. Three novel alpha-L-iduronidase mutations in 10 unrelated Chinese mucopolysaccharidosis type I families *Genetics and Molecular Biology*, 34, 2, 195-200.
- Suzuki Y., Nakamura N., Fukuoka K., Shimada Y., Uono M., 1977. β -Galactosidase deficiency in juvenile and adult patients. Report of six Japanese cases and review of literature, *Hum Genet*, 36, 219-229.
- Taylor J.A., Gibson G.J., Brooks D.A., Hopwood J.J., 1991. α -L-Iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts, *Biochem J*, 274, 263-268.
- Terlato N.J. ve Cox G.F., 2003. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature, *Genet Med*, 5, 286-294.
- Tieu P.T., Bach G., Matynia A., Hwang M. ve Neufeld E.F., 1995. Four novel mutations underlying mild or intermediate forms of alpha-L-iduronidase deficiency (MPS IS and MPS IH/S), *Hum Mutat* 6, 1, 55-59.
- Triggs-Raine B., Salo T.J., Zhang H., Wicklow B.A. ve Natowicz M.R., 1999. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX, *Proc Natl Acad Sci USA*, 25, 96, 11, 6296-300.
- Tuschl K., Gal A., Paschke E., Kircher S. ve Bodamer O.A., 2005. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature, *Pediatr Neurol*, 32, 270-272.
- Vazna A., Beesley C., Berna L., Stolnaja L., Myskova H., Bouckova M., Vlaskova H., Poupetova H., Zeman J., Magner M., Hlavata A., Winchester B., Hrebicek M. ve Dvorakova L., 2009. Mucopolysaccharidosis Type I in 21 Czech and Slovak Patients: Mutation Analysis Suggests a Functional Importance of C-Terminus of the IDUA Protein, *Am J Med Genet*, 149, 5, 965-974.
- Vellodi A., Young E.P., Cooper A., Wraith J.E., Winchester B., Meaney C., Ramaswami U. ve Will A., 1997. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres, *Arch Dis Child*, 76, 92-99.

- Venturi N., Rovelli A., Parini R., Menni F., Branbillasca F., Bertagnolio F., Uziel G., Gatti R., Filocamo M., Donati M.A., Biondi A. ve Goldwurm S., 2002. Molecular analysis of 30 mucopolysaccharidosis type I patients: evaluation of the mutational spectrum in Italian population and identification of 13 novel mutations, *Hum Mutat*, 20, 231.
- Voskoboeva E.Y., Krasnopolskaya X., Mirenburg T., Weber B. ve Hopwood J., 1998. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union, *Mol Genet Metab*, 65, 174-180.
- Wenger D.A., Sattler M., Mueller O.T., Myers G.G., Schneiman R.S. ve Nixon G.W., 1980. Adult GM1 gangliosidosis: clinical and biochemical studies on two patients and comparison to other patients called variant or adult GM1 gangliosidosis, *Clin Genet*, 17, 323-334.
- Wilcox W.R., 2004. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care, *J Pediatr*, 144, 3-14.
- Wilson P.J., Suthers G.K., Callen D.F., Baker E., Nelson P.V., Cooper A., Wraith J.E., Sutherland G.R., Morris C.P. ve Hopwood J.J., 1991. Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome, *Hum Genet*, 86, 505-508.
- Wraith J.E., Scarpa M., Beck M., Bodamer O.A., De Meirleir L., Guffon N., Meldgaard Lund A., Malm G., Van der Ploeg A.T. ve Zeman J., 2008. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy, *Eur J Pediatr*, 167, 267-277.
- Wraith J.E., Beck M., Lane R., Van der Ploeg A.T., Shapiro E., Xue Y., Kakkis E.D. ve Guffon N., 2007. Enzyme replacement therapy in patients who have mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase), *Pediatrics*, 120, 37-46.
- Wang R.Y., Bodamer O.A., Watson M.S. ve Wilcox W.R., 2011. Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals, *Genetics in Medicine*, 13, 5, 458-478.
- Yamagishi A., Tomatsu S., Fukuda S., Uchiyama N., Shimozawa N., Suzuki Y., Kondo N., Sukegawa T. ve Orii T., 1996. Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations, *Hum. Mutat*, 7, 23-29.
- Yogalingam G., Guo X.H., Muller V.J., Brooks D.A., Clements P.R., Kakkis E.D. ve Hopwood J.J., 2004. Identification and molecular characterization of alpha-L-iduronidase mutations present in mucopolysaccharidosis type I patients undergoing enzyme replacement therapy, *Hum Mutat*, 24, 3, 199-207.
- Zhao H.G., Li H.H., Bach G., Schmidtchen A. ve Neufeld E.F., 1996. The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 6101-6105.
- URL-1, www.genzyme.ca, Lysosomal storage disorders MPS I Mucopolysaccharidosis I, 20 Aralık 2012.

URL-2, <http://www.uniprot.org/uniprot/P35475>,İnsan α -L-iduronidaz enzimi aminoasit dizisi, 25 Aralık 2012.

URL-3, <http://www.hgmd.org>,Human gene mutation database, 1 Temmuz 2013.

URL-4, <http://frodo.wi.mit.edu>, Primer3 input (version 0.4.0) prog.

EK 1

cDNA dizisi (Transkript No: ENST00000247933)

```
1  GTCACATGGGGTGCGCGCCCAGACTCCGACCCGGAGGCGGAACCGGCAGTGCAGCCCGAA
.....
.....
                                     R      Y S      M
61  GCCCCGCAGTCCCCGAGCACGCGTGGCCAATGCGTCCCCTGCGCCCCCGCGCCGCGTGTCT
.....ATGCGTCCCCTGCGCCCCCGCGCCGCGTGTCT
.....-M--R--P--L--R--P--R--A--A--L--L

                                     *      R      *
121  GGCGCTCCTGGCCTCGCTCCTGGCCGCGCCCCGGTGGCCCGGCCGAGGCCCGCACCT
33  GGCGCTCCTGGCCCTCGCTCCTGGCCGCGCCCCCGGTGGCCCCGGCCGAGGCCCGCACCT
12  --A--L--L--A--S--L--L--A--A--P--P--V--A--P--A--E--A--P--H--L

                                     K                                     *      *
181  GGTGCAITGTGGACGCGGCCCGCGCGCTGTGGCCCCTGCGGCGCTTCTGGAGCAGCACAGC
93  GGTGCATGTGGACGCGGCCCGCGCGCTGTGGCCCCTGCGGCGCTTCTGGAGGAGCACAGG
32  --V--H--V--D--A--A--R--A--L--W--P--L--R--R--F--W--R--S--T--G

                                     *      **      *      *      M      R      Y
241  CTTCTGCCCCGCTGCCACACAGCAGGCTGACAGTAGTCTCTCAGCTGGGACAGCA
153  CTTCTGCCCCCGCTGCCACACAGCAGGCTGACCAGTACGTCTCAGCTGGGACAGCA
52  --F--C--P--P--L--P--H--S--Q--A--D--Q--Y--V--L--S--W--D--Q--Q

                                     *      YR*      S      *S R      *R
301  GCTCAACCTCCCTATGTGGGCGCGCTCCTCGCGCGGCATCAAGCAGGTCCGACCCA
213  GCTCAACCTCGCCTATGTGGGCGCGCGTCCCTCACCAGCGGCATCAAGCAGGTCCGACCCA
72  --L--N--L--A--Y--V--G--A--V--P--H--R--G--I--K--Q--V--R--T--H

                                     Y R      **      S      R
361  CTGGCTGCTGGAGCTTGTACACCAACAGGGGGTCCACTGGAGCGGGCCTGAGCTACAACCT
273  CTGGCTGCTGGAGCTTGTACACCAACAGGGGGTCCACTGGAGCGGGCCTGAGCTACAACCT
92  --W--L--L--E--L--V--T--T--R--G--S--T--G--R--G--L--S--Y--N--F

                                     M      R      Y      R      *
421  CACCCACCTGGACGGGTACCTGGACCTTCTCAGGAGAACAGCTCCTCCAGGGTTTGA
333  CACCCACCTGGACGGGTACCTGGACCTTCTCAGGAGAACAGCTCCTCCAGGGTTTGA
112  --T--H--L--D--G--Y--L--D--L--L--R--E--N--Q--L--L--P--G--F--E

                                     **      YR H      R      W      Y
481  GCTGATGGGCAGCGCCTCGGGCCACTTCACTGACTTTGAGGACAAGCAGCAGGTGTTTGA
393  GCTGATGGGCAGCGCCTCGGGCCACTTCACTGACTTTGAGGACAAGCAGCAGGTGTTTGA
132  --L--M--G--S--A--S--G--H--F--T--D--F--E--D--K--Q--Q--V--F--E

                                     R*      *      R      R      Y
541  GTGGAAGGACTTGGTCTCCAGCCTGGCAGGATATACATCGCTAGGTAGGACTGGCGCA
453  GTGGAAGGACTTGGTCTCCAGCCTGGCCAGGAGATACATCGGTAGGTACGACTGGCGCA
152  --W--K--D--L--V--S--S--L--A--R--R--Y--I--G--R--Y--G--L--A--H

                                     N      R      *      Y*      *      S      S
601  TGTTCCTCAAGTGAACCTTCGAGACGTGGAATGAGCCAGACCACGACTTTGACAACGT
513  TGTTCCTCAAGTGAACCTTCGAGACGTGGAATGAGCCAGACCACGACTTTGACAACGT
172  --V--S--K--W--N--F--E--T--W--N--E--P--D--H--H--D--F--D--N--V

                                     *      **      K M      **      SW*      **R      *      RY
661  CTCCATGACCATGCAAGGCTTCTGAACACTACTACGATGCCTCTGGGAGGCTCTGCGCGC
573  CTCCATGACCATGCAAGGCTTCTGAACACTACTACGATGCCTCTGGGAGGCTCTGCGCGC
192  --S--M--T--M--Q--G--F--L--N--Y--Y--D--A--C--S--E--G--L--R--A
```

721 CGCCAGCCCCGCCCTGCGG**GGGAG*CCCGGGGACTCCTTCCACACCCCAACGCGATC
 633 CGCCAGCCCCGCCCTGCGGCTGGGAGGCCCGGCGACTCCTTCCACACCCCAACGCGATC
 212 --A--S--P--A--L--R--L--G--G--P--G--D--S--F--H--T--P--P--R--S

781 CCGCTGAGCTGGGGCCTCTGCGCCCTGCCACGACGGTACCAACTTCTTCACTGGGGA
 693 CCGCTGAGCTGGGGCCTCTGCGCCACTGCCACGACGGTACCAACTTCTTCACTGGGGA
 232 --P--L--S--W--G--L--L--R--H--C--H--D--G--T--N--F--F--T--G--E

841 GGCGGGCTGCGGCTGGACTACATCTCCTCGACAGGAAGGTGCGCGCAGTCCATCTC
 753 GGCGGGCTGCGGCTGGACTACATCTCCTCCACAGGAAGGGTGC GCGCAGCTCCATCTC
 252 --A--G--V--R--L--D--Y--I--S--L--H--R--K--G--A--R--S--S--I--S

901 CATCCTGGAGCAGGAGAAGGTCGTCGCGCAGCAGATCCGGCAGCTCTTCCCCAAGTTCGC
 813 CATCCTGGAGCAGGAGAAGGTCGTCGCGCAGCAGATCCGGCAGCTCTTCCCCAAGTTCGC
 272 --I--L--E--Q--E--K--V--V--A--Q--Q--I--R--Q--L--F--P--K--F--A

961 GGACACCCCATTTACAGGACGAGCGGACCCGCTGTTGGGCTGGTCCCTGCCACAGCC
 873 GGACACCCCATTTACAACGACGAGGCGGACCCGCTGTTGGGCTGGTCCCTGCCACAGCC
 292 --D--T--P--I--Y--N--D--E--A--D--P--L--V--G--W--S--L--P--Q--P

1021 GTGGAGGGCGGACGTGACCTACCGGGCCATGGTGGTGAAGGTCATCGGCAGCATCAGAA
 933 GTGGAGGGCGGACGTGACCTACCGGGCCATGGTGGTGAAGGTCATCGCGCAGCATCAGAA
 312 --W--R--A--D--V--T--Y--A--A--M--V--V--K--V--I--A--Q--H--Q--N

1081 CCTGCTACTGGCCAACACGACCTCCGCTTCCTCCCTAGCGCTCTGAGCAAGACATGCG
 993 CCTGCTACTGGCCAACACCACTCCGCTTCCCTACGCGCTCTGAGCAACGACAATGC
 332 --L--L--L--A--N--T--T--S--A--F--P--Y--A--L--L--S--N--D--N--A

1141 CTTCTGAGCTACACCCGCACCCCTTCGCGCAGGCAAGCTCCCGCGCGCTTCCAGGT
 1053 CTTCTGAGCTACACCCGCACCCCTTCGCGCAGCGCACGCTCACC GCGCGCTTCCAGGT
 352 --F--L--S--Y--H--P--H--P--F--A--Q--R--T--L--T--A--R--F--Q--V

1201 AACAACACCCCGCCCGCACGTGCGCTGTTGCAAGCCGCTGCTCAAGGCCATGGG
 1113 CAACAACACCCGCCCCGCCGACGTGCAAGCTGTTGCGCAAGCCGCTGCTCACGCCATGGG
 372 --N--N--T--R--P--P--H--V--Q--L--L--R--K--P--V--L--T--A--M--G

1261 GTGCTGGGCTGCTGGATGAGGAGGAGCTCTGGCCGAAGTGTGCGAGGCCGGACCGT
 1173 GCTGCTGGCGCTGCTGGATGAGGAGCAGCTCTGGGCCGAAGTGTGCGAGGCCGGACCGT
 392 --L--L--A--L--L--D--E--E--Q--L--W--A--E--V--S--Q--A--G--T--V

1321 CCTGGACAGCAACCACACGGTGGGCGTCTGCGCAGCGCCACCGCCCCAGGGCCCGGC
 1233 CCTGGACAGCAACCACACGGTGGGCGTCTGCGCAGCGCCACCGCCCCAGGGCCCGGC
 412 --L--D--S--N--H--T--V--G--V--L--A--S--A--H--R--P--Q--G--P--A

1381 CGACGCCTGGCGCGCCGCGGTGCTGATCTACGCGAGCGACACACCGCGCCACCCCAA
 1293 CGACGCCTGGCGCGCCGCGGTGCTGATCTACGCGAGCGACGACACCGCGCCACCCCAA
 432 --D--A--W--R--A--A--V--L--I--Y--A--S--D--D--T--R--A--H--P--N

1441 CCGCAGC^RGTCTCGCGGTGACCTGCGGCTGCGCGGGGTGCCCCCGGCCCGGG^YCTGGTCTA
 1353 CCGCAGCGTCTCGCGGTGACCTGCGGCTGCGCGGGGTGCCCCCGGCCCGGGCCTGGTCTA
 452 --R--S--V--A--V--T--L--R--L--R--G--V--P--P--G--P--G--L--V--Y

 1501 CGTCACGCGCTA^YCTGGACAACGGGCTCTGCGAGCCCGAG^MGGCGAGTGG^{YR Y*Y Y}CGGCCTGGG
 1413 CGTCACGCGCTACCTGGACAACGGGCTCTGCGAGCCCCGACGGCGAGTGGCGGCGCCTGGG
 472 --V--T--R--Y--L--D--N--G--L--C--S--P--D--G--E--W--R--R--L--G

 1561 CCGGC^{S SM}GTCTTC^{*}CAC^KGCAGAGCAGTTC^{*}CGGCGCA^{*}GCGCGCGGCTGAGGACCCGGT
 1473 CCGGCCCCGTCTTCCCCACGGCAGAGCAGTTCGGGCGCATGCGCGCGGCTGAGGACCCGGT
 492 --R--P--V--F--P--T--A--E--Q--F--R--R--M--R--A--A--E--D--P--V

 1621 GGCCGCGGGCGCCC^SCGCCCCCTTACCCGCCGGCGGGCGCCTGACCC^SCTGCGCCCGCGCTGCG
 1533 GGCCGCGGGCGCCCCGCCCTTACCCGCCGGCGGGCGGCTGACCC^SCTGCGCCCCGCGCTGCG
 512 --A--A--A--P--R--P--L--P--A--G--G--R--L--T--L--R--P--A--L--R

 1681 GCTGC^SGTCTCTTTGCTGGT^{*}CACGTGTGTGCGCGCCCCGAGAAGCCG^{**}CGGGCAGGT
 1593 GCTGCCGTCTGCTTTTGTGGTGCACGTGTGTGCGCGCCCCGAGAAGCCGCCCGGGCAGGT
 532 --L--P--S--L--L--L--V--H--V--C--A--R--P--E--K--P--P--G--Q--V

 1741 CACG^{S Y}GGCTCCGCGCCCTG^YCCCCCTGACC^{Y*}AAGGGCAGCTGG^{Y*}CTCTGGTCTGGTCTGGATGA
 1653 CACGCGGCTCCGCGCCCTGCCCCCTGACCCAAGGGCAGCTGGTTCTGGTCTGGTCTGGATGA
 552 --T--R--L--R--A--L--P--L--T--Q--G--Q--L--V--L--V--W--S--D--E

 1801 ACAC^RGTGGGCTCCAAGTGCCTGTGGACATACGA^RATCC^{*R}AGTTCT^YCTCAGGAC^RGGTAAGGC^Y
 1713 ACACGTGGGCTCCAAGTGCCTGTGGACATACGAGATCCAGTTCTCTCAGGACGGTAAGGC
 572 --H--V--G--S--K--C--L--W--T--Y--E--I--Q--F--S--Q--D--G--K--A

 1861 GTAC^{R Y S}ACCC^YGGTCAGCAGGAAGCCATCGA^{Y **}CTTCAACCT^{S *}TTGTGTTCAGCCAGACAC
 1773 GTACACCCCGGTCTCAGCAGGAAGCCATCGACCTTCAACCTCTTTGTGTTCAGCCAGACAC
 592 --Y--T--P--V--S--R--K--P--S--T--F--N--L--F--V--F--S--P--D--T

 1921 AAGTGCTGTCTCTGGCTCC^{SR *}TACCGA^{B VRY}TTGAGCCCTGGACTAC^{*R}GGCC^{*D}GACCAGGCC
 1833 AAGTGCTGTCTCTGGCTCCTACCGAGTTTCGAGCCCTGGACTACTGGGCCCGACAGGCC
 612 --G--A--V--S--G--S--Y--R--V--R--A--L--D--Y--W--A--R--P--G--P

 1981 CTTCT^{*}GGACCTG^{*}GC^YGTAC^YTG^{*}AGGTCCCTGT^RCCAAGAGGGCCCATCCCC^KGG
 1893 CTTCTCGGACCCTGTGCCGTACCTGGAGGTCCCTGTGCCAAGAGGGCCCCCATCCCCGGG
 632 --F--S--D--P--V--P--Y--L--E--V--P--V--P--R--G--P--P--S--P--G

 2041 CAATC^{R Y **R}CA^RGACCTGTGCTGAGCCCCAGT^YGGTTGCACCTCCAC^YGGCAGTCAGCGAGCT
 1953 CAATCCATGA.....
 652 --N--P--*--.....

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nazente Atçeken

Doğum Yılı :12.07.1984

Eğitim Bilgileri (Kurum ve Yıl)

Lisans :Erciyes Üniversitesi 2004-2008

Yüksek Lisans :Aksaray Üniversitesi 2010-2013

İletişim Bilgileri

Adres :Taşpazar mah. 846 sok. Şahin sitesi Şirin apt. No 1 Merkez
Aksaray

Telefon :0 382 216 06

E-posta :biyolog_nazente@hotmail.com