



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SNP MİKROARRAY YÖNTEMİ ile KALITSAL
METABOLİK HASTALIKLARDAN SORUMLU
GENLERİN TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve EKŞİ

TIBBİ GENETİK PROGRAMI

Ankara, 2019

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SNP MİKROARRAY YÖNTEMİ ile KALITSAL
METABOLİK HASTALIKLARDAN SORUMLU
GENLERİN TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve EKŞİ

TIBBİ GENETİK PROGRAMI

**Bu araştırma; TÜBİTAK 111S217 nolu ve Hacettepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırmalar Birimi 08 01 601 003 nolu projeler ile dolaylı
olarak desteklenmiştir.**

Ankara, 2019

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SNP Mikroarray Yöntemi ile Kalıtsal Metabolik Hastalıklardan Sorumlu Genlerin
Tanımlanması

Merve EKŞİ

Yüksek Lisans Tezi

13.06.2019

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Didem YÜCEL YILMAZ

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ

Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

Dr. Öğr. Üyesi Didem YÜCEL YILMAZ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gerekten tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

13.06.2019

Merve EKŞİ

Hayatıma anlam katan canım eşime....

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında beni destekleyen, yardım ve anlayışını esirgemeyen, sabrı, sevecenliği ile beni hiç yalnız bırakmayan, tecrübesiyle bana ışık olan Sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem YÜCEL YILMAZ'a ,

Çalışmalarım sırasında tecrübelerinden yararlandığım, desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL'e .

Fikir ve görüşlerinden yararlandığım Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ ve Doç. Dr. Gülay GÜLEÇ CEYLAN'a.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm, karşılaştığım zorluklar sırasında beni yalnız bırakmayıp destek olan Hacettepe Üniversitesi Metabolizma Araştırma laboratuvarındaki arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar	3
2.1.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Patofizyolojisi	4
2.1.2. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Epidemiyolojisi.....	4
2.1.3. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Sınıflandırılması	5
2.1.4. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Kliniği.....	6
2.1.4.1. Amino Asit Metabolizması Bozuklukları	6
2.1.4.2. Organik Asidemiler.....	7
2.1.4.3. Karbonhidrat Metabolizması Bozuklukları.....	7
2.1.4.4. Üre Döngüsü Bozuklukları	8
2.1.4.5. Yağ Asidi Oksidasyon Bozuklukları.....	9
2.1.4.6. Mitokondriyal Hastalıklar	9
2.1.4.7. Lizozomal Depo Hastalıkları	10
2.1.4.8. Peroksizomal Hastalıklar	10
2.1.4.9. Pürin ve Pirimidin Metabolizması Bozuklukları.....	11
2.1.4.10. Porfiria.....	11
2.1.4.11. Konjenital Glikolizasyon Bozuklukları.....	12
2.1.5. Kalıtsal Metabolik Hastalıklara Klinik Yaklaşım	12
2.1.5.1. Erken Başlangıçlı Belirti ve Bulgular	12
2.1.5.2. Geç Başlangıçlı Belirti ve Bulgular	13
2.1.6. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Teşhis Yöntemleri.....	13
2.1.7. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Tedavi	13
2.2. Nadir ve Bilinmeyen Metabolik Hastalıklar	14
2.2.1. Nadir Hastalıklarda Klinik Yaklaşım	15

2.3. Gen Haritalama Stratejileri	16
2.3.1. Gen Haritalamada Kullanılan Genetik Belirteçler	17
2.3.1.1. Kısa DNA Baz Tekrarları (Short Tandem Repeats, STR, Mikrosatellitler)	17
2.3.1.2. Uzun DNA Baz Tekrarları (Variable Number Tandem Repeats, VNTR, Minisatellitler)	17
2.3.1.3. Tek Nükleotit Değişiklikleri (Single Nucleotide Polymorphism-SNP)	18
2.4. Mikroarray Teknolojisi	19
2.4.1. Mikroarray Uygulamalarında Prob Dizaynı.....	20
2.4.2. İmmobilizasyon.....	21
2.4.3. Mikroarray Teknolojisi Uygulama Alanları.....	22
2.4.3.1. Gen-Ekspresyon Arrayleri	22
2.4.3.2. SNP Arrayler	22
2.4.3.3. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Array	27
2.4.3.4. Array Tabanlı Kromatin İmmünopresipitasyon Arrayler (ChIP on Chip Array)	27
2.4.3.5. Yeniden Dizileme (Re-Sequencing) Array	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kandan DNA İzolasyonu	29
3.2. Parafin Bloktan DNA İzolasyonu	29
3.3. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonlarının Kantitatif Ölçümü	30
3.4. Affymetrix 250K SNP Array Genotipleme Metodu	30
3.4.1. Restriksiyon Enzim Kesimi	31
3.4.2. Ligasyon.....	32
3.4.3. PCR Reaksiyonu	33
3.4.4. PCR Pürifikasyonu.....	34
3.4.5. PCR Ürünlerinin Spektrofotometrik Ölçümü	35
3.4.6. Fragmentasyon	35
3.4.7. İşaretleme	36
3.4.8. Hibridizasyon	36
3.4.9. Yıkama/Boyama.....	38
3.4.10. Tarama	40

3.4.11. Affymetrix 250K SNP Array Sonuçlarının	
Değerlendirilmesi.....	41
3.4.12. Mutasyon Taraması.....	41
3.5. Aday Genlerin Amplifikasyonu	42
3.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	42
3.7. Otomatik DNA Dizi Analizi	43
3.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Ürünlerinin Çöktürölmesi	44
4. BULGULAR	46
4.1. Affymetrix 250K SNP Array Bulguları	46
4.2. Genomboyu Homozigotluk Haritalaması Sonuçları	48
4.3. Aday Genlerin DNA Dizi Analizi Sonuçları	60
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER.....	88
EK-1. ETİK KURUL ONAYI	88
EK-2. ÖZGEÇMİŞ.....	89

ÖZET

SNP Mikroarray Yöntemi ile Kalıtsal Metabolik Hastalıklardan Sorumlu Genlerin Tanımlanması

Kalıtsal metabolik hastalıklar protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentez ya da yıkım yollarındaki bozukluklar sonucu ortaya çıkan kalıtsal tek gen bozukluklarıdır. Bu çalışmada, kompleks fenotip sergileyen ayrıntılı klinik ve laboratuvar çalışması yapılmış ve otozomal çekinik kalıtım modeli gösteren metabolik/nörometabolik hastalık sahibi altı ailede genom boyu genotiplendirme ve homozigotluk haritalaması analizleri ile hastalıktan sorumlu gen lokusunun bulunması ve bu lokuslarda yer alan aday genlerdeki hastalık nedeni olan mutasyonun saptanması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında genom boyu genotiplendirme için etkin bir metot olan Affymetrix 250K SNP Mikroarray yöntemi kullanılmış olup, otozomal çekinik kalıtım modeli esas alınarak yapılan haplotip analizleri sonucunda metabolik/nörometabolik hastalığı olan ailelerde *C19orf70*, *CLN8*, *COA7*, *HIKESHI*, *MAG* ve *SNX14* genleri hastalıktan sorumlu aday genler olarak belirlenmiştir. Belirlenen aday genlerin tüm ekzonları otomatik DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyonlar açısından taranmıştır. Mutasyon analizleri sonucunda, *SNX14* geninde c.1108+1181_2108-2342del, *C19orf70* geninde IVS3-2A>G, *HIKESHI* geninde ise c.160G>C;p.Val54Leu mutasyonları olmak üzere daha önce tanımlanmış üç mutasyon, *CLN8* geninde ise yeni bir mutasyon c.221G>A;p.Gly74Asp mutasyonu saptanmıştır.

Çalışma kapsamına alınan aileler, konvansiyonel metotlar ile (metabolit tarama, enzim analizleri, radyolojik incelemeler ya da tek gen mutasyon taramaları) bilinen metabolik/nörometabolik hastalıkların disiplinler arası ayrıntılı çalışmaları ile dışlandığı, tanı konulamamış hastalardır. Bu çalışma ile yüksek ölçekli SNP çipleri kullanılarak ailelerde hastalıklardan sorumlu lokus ve genler başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Homozigotluk haritalama yöntemi, özellikle etkilenmiş bir ya da iki hasta çocuğun olduğu çekirdek ailelerde hastalıktan sorumlu genlerin bulunması bakımından oldukça etkin bir şekilde kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Genetik haritalama, kalıtsal metabolik hastalıklar, mikroarray, SNP

ABSTRACT

Identification of Disease-Causing Genes in Inherited Metabolic Diseases by SNP Microarray Method

Inherited metabolic diseases are single gene disorders resulting from defects in the synthesis or degradation pathways of proteins, carbohydrates and fatty acids. In this study, it was aimed to find the genetic loci responsible for these diseases and identifying the disease causing mutations in candidate genes in this loci through genome-wide genotyping and homozygosity mapping analysis in six families with undiagnosed metabolic /neurometabolic disease by detailed clinical and laboratory studies showing genetic disease with autosomal recessive mode of inheritance.

Affymetrix 250K SNP microarray, which is an effective method for genome-wide genotyping was used in the study; as a result of haplotype analyzes in the families based on autosomal recessive inheritance model, *C19orf70*, *CLN8*, *COA7*, *HIKESHI*, *MAG* and *SNX14* genes were identified as candidate genes responsible for metabolic/neurometabolic diseases. All exons of identified candidate genes were screened for mutations by automated DNA sequencing method. The mutation analysis revealed three previously identified mutations: c.1108+1181_2108-2342del in the *SNX14* gene, IVS3-2A>G in the *C19orf70* gene, c.160G>C;p.Val54Leu in the *HIKESHI* gene and novel c.221G>A;p.Gly74Asp mutation in *CLN8* gene.

The families included in the study were undiagnosed patients, who were examined with detailed interdisciplinary study for known metabolic/neurometabolic diseases by conventional methods (metabolite screening, enzyme analysis, radiological examinations or single gene mutation screening). In this study, genetic locus and disease causing genes in these families were successfully identified using high-throughout SNP chips. The homozygosity mapping approach was used very efficiently to find genes responsible for diseases, especially in nuclear families with one or two affected children.

Keywords: Homozygosity mapping, inherited metabolic disease, microarray, SNP

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	:Adenin
ATP	:Adenozin trifosfat
Bç	:Baz çifti
BOS	:Beyin omurilik sıvısı
BSA	:Sığır serum albümini
C	:Sitozin
cDNA	:Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
aCGH	:Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
CNV	:Kopya sayısı değişiklikleri
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	:Etilen diamin tetra asetik asit
F	:Forward primer
G	:Guanin
GCOS	:GeneChip® operating software
GYTPE	:GeneChip® genotyping analysis software
HsDNA	:Herring sperm DNA
HSP70	:Isı şoku proteini
IEM	:Yenidoğan metabolik bozukluklar
IGV	:Bütünleştirici genomik görüntüleyici
M	:Molar
Mb	:Megabaz
Mbar	:Milibar
MES	:2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MICOS	:Mitokondriyal bağlantı bölgesi ve krista organizasyon sistemi
Mg	:Miligram
ml	:Mililitre
mM	:Milimolar

µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar
mtDNA	:Mitokondriyal DNA
NCL	:Nöronal seroid lipofusinozis
Ng	:Nanogram
Nm	:Nanometre
NPC	:Nüklear por kompleksi
OCR	:Oligo kontrol reaktifi
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
PKU	:Fenilketonüri
Pmol	:Pikomol
R	:Reverse primer
RFLP	:Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	:Ribonükleik asit
Rpm	:Rotation per minute (dakikadaki devir)
SAPE	:Streptavidin phycoerythin
SNP	:Tek nükleotit polimorfizmi
SSPE	:Saline-sodium phosphate-EDTA
STR	:Kısa DNA baz tekrarları
T	:Timin
TdT	:Terminal deoksinükleotidil transferaz
T _m	:Erime sıcaklığı
TMACL	:Tetramethyl ammonium chloride
U	:Birim (Unit)
VIGENOS	:Visual genome studio, hemsoft, Ankara
VNTR	:Uzun DNA baz tekrarları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Metabolik blok modeli	3
Şekil 2.2.	Mikrosatellit dizileri.....	17
Şekil 2.3.	VNTR.....	18
Şekil 2.4.	Tek nükleotit polimorfizmi (SNP'ler).....	19
Şekil 2.5.	DNA mikroyarray kullanımı ve yapımındaki işlem basamakları	20
Şekil 2.6.	“Allel-spesifik hibridizasyon” ve “allel-spesifik primer extension” teknolojisi.....	24
Şekil 2.7.	Prob array döşenmesi ve hibridizasyon modeli	26
Şekil 2.8.	Affymetrix genomboyu 250K SNP.....	27
Şekil 3.1.	Affymetrix SNP çip ve çipin arka yüzünde örneklerin yüklendiği kısım.....	38
Şekil 3.2.	Affymetrix Gene Chip sistemi	40
Şekil 4.1.	PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	46
Şekil 4.2.	Fragmentasyon ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	46
Şekil 4.3.	Tarama sonrası Affymetrix SNP çipteki örnek görüntüsü.....	47
Şekil 4.4.	GTTYPE (GeneChip® Genotyping Analysis Software) ile analiz edilen çipe ait örnek kalite kontrol raporu	47
Şekil 4.5.	Dinamik model algoritması ile SNP ve genotip bilgilerinin gösterilmesi	48
Şekil 4.6.	Bir no'lu aileye ait soy ağacı.....	49
Şekil 4.7.	Bir no'lu ailede 19. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	49
Şekil 4.8.	Bir no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	50
Şekil 4.9.	İki no'lu aileye ait soy ağacı	51
Şekil 4.10.	İki no'lu ailede 11. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	51
Şekil 4.11.	İki no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	52
Şekil 4.12.	Üç no'lu aileye ait soy ağacı	53

Şekil 4.13.	Üç no'lu ailede 8. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	53
Şekil 4.14.	Üç no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	54
Şekil 4.15.	Dört no'lu aileye ait soy ağacı	55
Şekil 4.16.	Dört no'lu ailede 6. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	55
Şekil 4.17.	Dört no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	56
Şekil 4.18.	Beş no'lu aileye ait soy ağacı.....	57
Şekil 4.19.	Beş no'lu ailede 1. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	57
Şekil 4.20.	Beş no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	58
Şekil 4.21.	Altı no'lu aileye ait soy ağacı	59
Şekil 4.22.	Altı no'lu ailede 19. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita.....	59
Şekil 4.23.	Altı no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu.....	60
Şekil 4.24.	İki no'lu ailede <i>HIKESHI</i> geninde saptanan homozigot c.160 G>C (p.Val54Leu) mutasyonu	61
Şekil 4.25.	İki no'lu ailede <i>HIKESHI</i> geninde saptanan heterozigot c.160 G>C (p.Val54Leu) mutasyonu	61
Şekil 4.26.	İki no'lu ailede ki sağlıklı bireylerin DNA dizi analizi sonucu	62
Şekil 4.27.	Üç no'lu ailede <i>CLN8</i> geninde saptanan homozigot c.221 G>A (p.Gly74Asp) mutasyonu	62
Şekil 4.28.	Üç no'lu ailede <i>CLN8</i> geninde saptanan heterozigot c.221 G>A (p.Gly74Asp) mutasyonu	63
Şekil 4.29.	Dört no'lu ailede <i>SNX14</i> geninde saptanan homozigot c.1108+1181_2108-2342del mutasyonu.....	64
Şekil 4.30.	Altı no'lu ailede <i>C19orf70</i> geninde saptanan homozigot IVS3-2A>G mutasyonu	65
Şekil 4.31.	Altı no'lu ailede <i>C19orf70</i> geninde saptanan heterozigot IVS3-2A>G mutasyonu	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Kalıtsal metabolik hastalıkların sınıflandırılması	5
Tablo 2.2.	SSIEM sınıflandırmasındaki başlıca metabolik hastalık grupları	6
Tablo 3.1.	<i>MAG</i> genine ait primer dizileri	44
Tablo 3.2.	<i>HIKESHI</i> genine ait primer dizileri.....	45
Tablo 3.3.	<i>CLN8</i> genine ait primer dizileri.....	45
Tablo 3.4.	<i>SNX14</i> genine ait primer dizileri	45
Tablo 3.5.	<i>COA7</i> genine ait primer dizileri	45
Tablo 3.6.	<i>C19orf70</i> genine ait primer dizileri.....	45
Tablo 4.1.	İki no’lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.....	52
Tablo 4.2.	Üç no’lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.....	54
Tablo 4.3.	Dört no’lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.....	56
Tablo 4.4.	Beş no’lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler	58
Tablo 4.5.	Altı no’lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler	60
Tablo 4.6.	Çalışmada bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalığa neden neden olan genlerde saptanan mutasyonlar.....	66

1. GİRİŞ

Günlük diyetle alınan besin maddeleri (temel olarak protein, karbonhidratlar ve yağlar) ve zaman zaman endojen yıkımla ortaya çıkan bileşikler katalist olarak çok sayıda enzimin ve taşıyıcı proteinin rol oynadığı reaksiyonlar zincirinden geçerek, organizmanın kullanabileceği veya organizmaya zarar vermeden vücuttan uzaklaştırılabilecek maddelere dönüştürülmektedir. Metabolizma, vücut dokularında yapım ve yıkım ile ilgili bu kimyasal reaksiyonların tümüne verilen addır. Metabolik hastalıklarda protein, yağ ve karbonhidratların sentezi veya katabolizmasında bir enzim veya taşıyıcı bir proteinin eksikliği söz konusudur (1).

Nörometabolik hastalıklar ise, santral sinir sistemi tutulumu ile giden metabolik hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda, bu grup hastalıkların tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış olmakla birlikte, halen tanımlanmamış çok sayıda nörometabolik hastalık olduğu öngörülmektedir. Bu nedenle nörometabolik hastalıklar, özellikle çocuk sağlığı ve hastalıkları alanında çalışan metabolizma, nöroloji ve genetik uzmanlarının tanı koyma, izleme ve ailelere genetik danışmanlık vermekte büyük zorluklar yaşadığı hastalıklar olmaya devam etmektedir.

Metabolik/nörometabolik hastalıkların genel olarak dünya toplumlarında görülme sıklığı 1/4 000- 1/5 000 olarak rapor edilmektedir (2, 3, 4, 5). Bu hastalıkların %90'dan fazlası otozomal çekinik kalıtılması nedeniyle, akraba evlilikleri bu hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli risk faktörüdür. Ortalama akraba evliliği oranının %24 olduğu ülkemiz, tanımlanmış ya da henüz tanımlanmamış metabolik/nörometabolik hastalıkların en sık görüldüğü toplumların başında gelmekte ve toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir (6, 7). Erken tanı ve tedavisi yapılamayan metabolik hastalıkların çoğunda hastalarda kalıcı ve ciddi sistemik hasarlar gelişmektedir. Bu nedenle metabolik/nörometabolik hastalıkların erken tanısı oldukça önemlidir.

Kalıtsal metabolik hastalıklar ile ilgili farkındalığın artması ve rutin tanı yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile diğer toplumlar için nadir olarak değerlendirilen metabolik/nörometabolik hastalıkların ülkemizde beklenenden çok daha sık görüldüğü tespit edilmektedir.

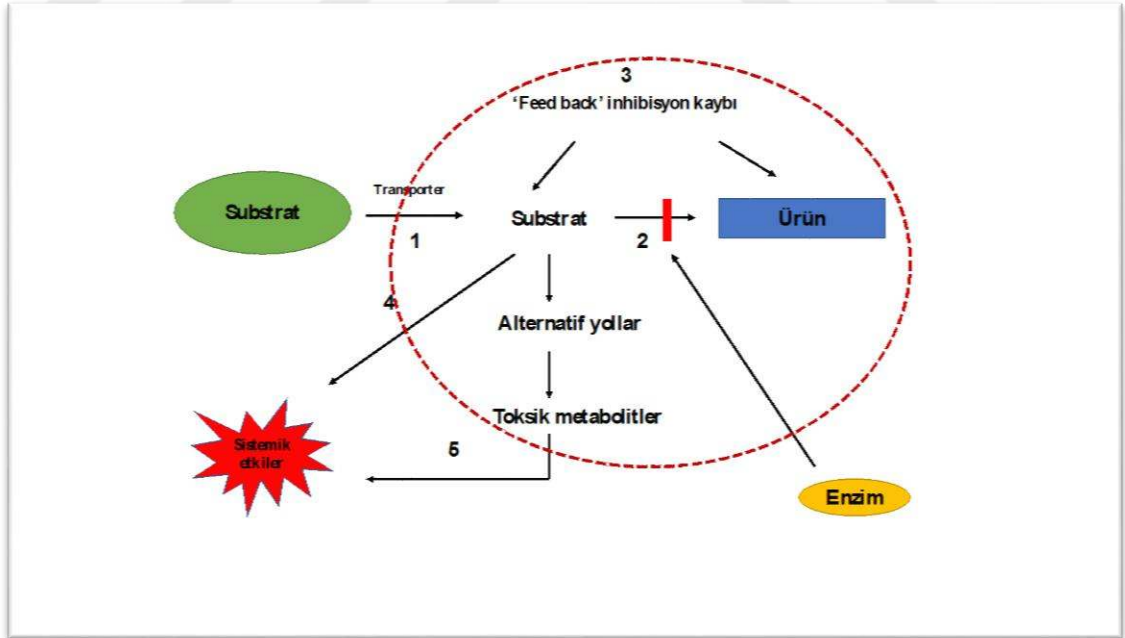
Biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle yüksek ölçekli genetik metodların uygulanması ve bunun tıp pratiğine uygulanabilir hale gelmesi daha önce tanısı konulamayan genetik hastalıkların patogenezinin aydınlatılması fırsatını sağlamıştır. Son yıllarda ileri düzey genetik analizlerin uygulanması ile bu hastalıkların tanısı konulmaya başlanmış bununla birlikte yeni hastalıklar tanımlanmıştır (8, 9, 10). Özellikle ileri düzey genetik metodların en yoğun olarak kullanılacağı alanların başında şimdiye kadar adlandırılmamış ve sorumlu geni bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalıklar gelmektedir.

Bu tez çalışmasında ayrıntılı klinik ve laboratuvar çalışması ile literatürde tanımlı veya tanımlanmadığı öngörülen ve kompleks fenotip sergileyen otozomal çekinik kalıtım modeli gösteren bireylerde SNP mikroarray yöntemi ile yüksek ölçekli genom analizi yapılarak hastalıktan sorumlu genetik bozuklukların saptanması hedeflenmiştir. Çalışmada genom analiz yöntemlerinden “genom boyu genotiplendirme”, “homozigotluk haritalaması”, “aday gen belirlenmesi”, “mutasyon tarama yöntemlerinin sıralı bir şekilde kullanılması ile hastalıklara neden olan moleküler bozuklukların aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

Metabolizma, vücut dokularında yapım ve yıkım reaksiyonlarının tümüne verilen addır. Metabolik hastalıklar ise, protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezi ya da katabolizması yolağında, bir enzim ya da kofaktörünün eksikliği ya da substrat taşıyıcı protein eksikliği sonucunda ortaya çıkan kalıtsal tek gen bozukluklarıdır (Şekil 2.1). Kalıtsal metabolik hastalıklar ilk kez 1908’de Sir Archibald Gaarod tarafından tanımlanmıştır (11). Kalıtsal metabolik hastalıklar tek tek nadir olmakla birlikte, çok çeşitli oldukları düşünüldüğünde çocukluk çağındaki genetik bozuklukların önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Son on yılda kalıtsal metabolik hastalıkların tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tedavi edilmeyen vakalarda erken tanı, mortalite ve morbitideyi önlemek için oldukça önemlidir (12). Çoğu kalıtsal metabolik hastalık otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır ve akraba evliliğinin sık olduğu ülkemizde kalıtsal metabolik hastalıklara oldukça sık rastlanmaktadır.



Şekil 2.1. Metabolik blok modeli (1, 2).

2.1.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Patofizyolojisi

Kalıtsal metabolik hastalıklar genellikle otozomal resesif geçiş göstermektedir. Ancak dominant ve X'e bağlı kalıtım tipleride bulunmaktadır. Genetik bozukluklar, mutant enzimlerin veya taşıyıcı proteinlerin fonksiyon kaybına ya da kazanımına neden olan nokta mutasyonları delesyonları, insersiyonları veya kromozomal yeniden düzenlenmeleri içerir. Mitokondrideki biyokimyasal yolları kapsayan bir grup kalıtsal metabolik hastalık ise mitokondriyal DNA'daki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Genetik bozukluklardan kaynaklanan ilgili biyokimyasal yolağın bloke edilmesi doğrudan toksik etkiler gösterebilirken, dolaylı olarakta metabolik akışın diğer yollara sapmasıyla substrat birikmesine ve ürünün eksikliğine neden olmaktadır (13) (Şekil 2.1).

2.1.2. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Epidemiyolojisi

Kalıtsal metabolik hastalıkların dünya toplumlarında görülme sıklığı genel olarak 1/5 000 olarak rapor edilmektedir. Kalıtsal metabolik hastalıkların %90'dan fazlasının otozomal çekinik kalıtılması nedeniyle akraba evliliğinin sık olduğu ülkelerde bu hastalıkların insidansı ve prevalansı artmaktadır. Ortalama akraba evliliği oranının %24 olduğu ülkemiz, tanımlanmış ya da henüz tanımlanmamış metabolik hastalıkların en sık görüldüğü toplumların başında gelmektedir (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Kalıtsal metabolik hastalıkların insidansı ve prevalansı farklı ülkelerde değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yenidoğan tarama programlarına göre biyotinidaz eksikliği insidansı 1:67 766, klasik galaktozemi için 1:53 554, akçağaç şurubu hastalığı için 1:197 714, fenilketonüri (PKU) için ise 1:23 080 olarak rapor edilmiştir (14). Türkiye'de PKU insidansının 1:5 049 olduğu bildirilmiştir (15).

2.1.3. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Sınıflandırılması

Kalıtsal metabolik hastalıklar, substrat birikimine, etkilenmiş enzim grubuna ve organel fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak, çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Kalıtsal metabolik hastalıkların patofizyolojik açıdan klinik sınıflandırması Tablo 2.1’de gösterilmiştir (16). Kalıtsal metabolik hastalıkları Araştırma Derneği (SSIEM) tarafından önerilen ve yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma ise etkilenmiş ana substrat göz önüne alınarak yapılmıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.1. Kalıtsal metabolik hastalıkların sınıflandırılması (17).

Tip	Tanım	Örnekler
İntoksikasyon tipi	Ana patoloji, toksik substratların aşırı birikiminden kaynaklanır.	• Aminoasidopatiler (fenilketonüri, akça ağaç şurubu hastalığı, tirozinemi, homosistinüri, üre döngüsü bozuklukları, vb.) • Organik asidüriler (metilmalonik, propiyonik, izovalerik, glutarik tip I, 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) liyaz eksikliği, vb.) • Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (galaktozemi, kalıtsal fruktoz intoleransı)
Enerji bozuklukları tipi	Ana patoloji, ürünün eksikliğinden kaynaklanır.	• Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (glikojen depo hastalığı tip Ia) • Mitokondriyal hastalıklar (solunum zinciri bozuklukları, Krebs döngüsü bozuklukları) • Yağ asidi oksidasyon bozuklukları
Depolama tipi	Ana patoloji, hücre organellerinde kompleks moleküllerin hatalı katabolizmasına bağlı olarak metabolitlerin sürekli olarak birikiminden kaynaklanır.	• Lizozomal depo hastalıkları (Gaucher hastalığı, Niemann-Pick hastalık tipleri A ve B, vb.) • Peroksizomal hastalıklar (Zellweger sendromu, adrenolökodistrofi)

Tablo 2.2. SSIEM sınıflandırmasındaki başlıca metabolik hastalık grupları (17).

Amino asit ve peptit metabolizması bozuklukları
Karbonhidrat metabolizması bozuklukları
Yağ asidi ve keton metabolizması bozuklukları
Enerji metabolizması bozuklukları
Pürin, pirimidin ve nükleotit metabolizması bozuklukları
Sterol metabolizması bozuklukları
Porfirin ve hem metabolizması bozuklukları
Lipid ve lipoprotein metabolizması bozuklukları
Konjenital glikolizasyon bozuklukları ve diğer protein modifikasyon bozuklukları
Lizozomal hastalıklar
Nörotransmitter metabolizması bozuklukları
Vitaminler ve kofaktörlerin metabolizmasındaki bozukluklar
Eser elementlerin ve metallerin metabolizmasındaki bozukluklar
Ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki bozukluklar ve varyantlar

2.1.4. Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Kliniği

Kalıtsal metabolik hastalıkların kliniği ayrıntılı olarak aşağıdaki sırayla açıklanmaktadır. Bunlar amino asit metabolizması bozuklukları, organik asidemiler, karbonhidrat metabolizması bozuklukları, üre döngüsü bozuklukları, yağ asidi oksidasyon bozuklukları, mitokondriyal hastalıklar, lizozomal depo hastalıkları, peroksizomal hastalıklar, pürin ve pirimidin metabolizması bozuklukları, porfirialar ve konjenital glikolizasyon bozukluklarıdır.

2.1.4.1. Amino Asit Metabolizması Bozuklukları

Aminoasidopatiler, amino asitlerin metabolik yollarındaki kalıtsal bozukluklar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aminoasidopatiler arasında fenilketonuri, tirozinemi, akçaağaç şurubu hastalığı, homosistinüri, alkaptonüri, sistinüri gibi hastalıklar yer almaktadır. Aminoasidopatilerin klinik semptomları, genellikle toksik ara maddelerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (18).

İlk belirtiler veya semptomlar genellikle yenidoğan döneminde görülmektedir (15, 19). Aminoasidopatiler, plazma (veya idrar) amino asit konsantrasyonlarının ve bazen de idrar organik asitlerinin analizi ile teşhis edilmektedir. Aminoasidopatilerin çoğunluğu, proteinin ve kusurlu yolda yer alan aminoasidin diyet kısıtlaması ile ve büyük miktarlarda protein parçalanmasına yol açan katabolik durumlardan kaçınılması yoluyla tedavi edilebilmektedir (18). Örneğin, akçağaç şurubu hastalığında tanı konulmaz ve tedavi edilmezse, klinik seyir ensefalopati, koma ve hatta ölüme kadar gidebilir. Fenilketonüri hastalarının tedavi edilmediği durumda ise klinik seyir motor-mental retardasyon ile sonuçlanmaktadır (15, 19).

2.1.4.2. Organik Asidemiler

Organik asidemiler (piruvik, izovalerik, metilmalonik asidemiler, biyotinidaz eksikliği) dallı zincirli amino asitlerin yıkımındaki kalıtsal enzim bozukluklarından kaynaklanan anormal ve toksik organik asitlerin birikmesiyle karakterizedir (12). Biyokimyasal olarak, organik asidemilerdeki bozulan bazı reaksiyonlar, mitokondriyal beta-oksidasyon döngüsünün dehidrojenaz, hidrataz veya ketotiyolaz reaksiyonları ile paraleldir. Klinik özellikler sadece toksik ara maddelerin birikmesinden değil, aynı zamanda mitokondriyal enerji metabolizması ve karnitin homeostazındaki bozukluktan kaynaklanmaktadır. Organik asidemiler, idrarda organik asitlerin veya kandaki açılarnitinlerin analizi ile teşhis edilmektedir. Tedavi, aminoasidopatilere benzerdir ve ilgili aminoasitlerin beslenmede kısıtlanması ve protein katabolizmasının önlenmesini içermektedir. Karnitin ve glisin gibi takviye destekler, tedaviye oldukça yardımcı maddelerdir (18).

2.1.4.3. Karbonhidrat Metabolizması Bozuklukları

Karbonhidrat metabolizmasının en sık görülen hastalıkları arasında glikojen depo bozuklukları, kalıtsal fruktoz intoleransı ve galaktozemi yer almaktadır (13). Bu gruptaki bozukluklar genel olarak galaktoz ve fruktoz metabolizması bozuklukları, glikoneogenez ve glikojen depo bozuklukları ve karbonhidrat taşıma bozuklukları olarak sınıflandırılabilir.

Galaktoz ve fruktoz metabolizması bozuklukları, glikoliz sırasında galaktoz ve fruktozun sitosolik metabolizmasındaki defektler sonucu patojenik metabolitlerin

birikmesi sonucu oluşmaktadır. Galaktozemi ve fruktozemisi olan çocuklarda, sırasıyla, laktoz (süt, süt ürünleri) veya fruktoz (meyve, sakaroz) alımından sonra karaciğer ve/veya böbrekte ciddi hasarlar oluşmaktadır. Tedavi galaktoz ve fruktoz alımının ortadan kaldırılmasını gerektirmektedir.

Glikoneogenez ve glikojen depo bozukluklarının tipik metabolik özellikleri arasında kısa açlık süreleri ve laktik asidemiden sonra oluşan hipoglisemi gelmektedir. Glikojen depo bozuklukları, bebeklik döneminde karaciğer büyümesine yol açmaktadır. Glikojenoz tip III gibi bazı bozukluklarda ise transaminaz ve kreatin fosfat kinaz yüksektir ve sonucunda miyopati görülebilmektedir. Tedavide, hipoglisemiye önlemek amacıyla sık yemek yemek ve mısır nişastası takviyesi önerilmektedir.

Karbonhidrat taşıma bozukluklarında çok sayıda farklı glukoz ve karbonhidrat taşıyıcısı bulunmakta ve klinik semptomlar, bozukluğun olduğu dokuya göre büyük farklılıklar göstermektedir. Semptomlar sıklıkla sindirim sistemi veya böbreklerle ilgili olup, aynı zamanda merkezi sinir sistemini de içermektedir (kan / beyin bariyerinde yetersiz glukoz taşınımı) (18).

2.1.4.4. Üre Döngüsü Bozuklukları

Üre döngüsündeki enzimlerden herhangi birinin eksikliği, üre atılımında bozukluğa neden olmaktadır (19). Üre döngüsü bozuklukları arasında arjininemi, arjininosüksinik asidüri, N-asetil glutamat sentetaz eksikliği gibi hastalıklar sayılabilmektedir.

Üre döngüsü bozuklukları, yenidoğanlarda birkaç gün beslendikten sonra ağır hiperamonyemik ensefalopati ile kendini gösterir. Rezidüel enzim aktivitesi olan hastalarda daha geç başlangıçlı bir klinik tablo görülmektedir (19). Metabolik taramalar, plazma ve idrarda amino asit analizini ve idrarda orotik asit analizini içermektedir. Tedavi, esansiyel amino asitlerin takviyesi, katabolik durumların önlenmesi ve protein alımının azaltılmasını gerektirmektedir (18).

2.1.4.5. Yağ Asidi Oksidasyon Bozuklukları

Yağ asidi oksidasyon bozuklukları, karnitinin hücre içine taşınmasında rol alan taşıyıcı proteinden başlayarak, karnitin taşıma sistemi, beta-oksidasyonda rol alan enzim eksiklikleri veya elektron taşınmasındaki bozukluklar neticesinde gelişmektedir (20).

Yağ asidi oksidasyon bozukluklarında hastalarda keton cisimcikleri yapılamamakta ve glikoneogenez olmaksızın glikoliz kullanımının artması nedeniyle kan şekeri düşmektedir. Beyin için enerji kaynağı olmadığından koma veya konvülsiyonlara neden olur, toksik metabolitlerin birikmesi ile de kardiyomiyopati ve miyopati gelişmektedir. Tanı, serbest yağ asitleri ve keton cisimleri 3-hidroksibutirat ve asetoasetatın yanı sıra asilkarnitin profili ve idrar organik asitlerin analizi ile yapılmaktadır (18). Tedavi için sık aralıklarla beslenme, nazogastrik tüp ile beslenme ve çiğ mısır nişastası takviyesi önerilmektedir.

2.1.4.6. Mitokondriyal Hastalıklar

Enerji metabolizması bozuklukları, piruvat dehidrojenaz kompleksi, krebs döngüsü, elektron taşıma zinciri ve ATP üretimindeki genetik kusurlardan kaynaklanmaktadır. Mitokondriyal ensefalopati, Alpers-Huttenlocher sendromu, hepatoensefalopatik mtDNA sendromları ve Leigh sendromu mitokondriyal hastalıklar arasında sayılmaktadır. Mitokondriyal hastalıklar klinik olarak enerji eksikliği ve çoklu organ yetmezliği bulgu ve belirtileri ile kendini göstermektedir. Birçok vakada, laktik asidemi ve ilerleyici nörodejeneratif hastalık vardır. Mitokondriyal hastalıkların tanısı, hastalarda kan laktat seviyelerinin, BOS laktatların, plazma amino asitlerinin ve alanin seviyelerinin sık ölçülmesini ve mitokondriyal DNA'daki mutasyonların araştırılmasını kapsamaktadır. Organ fonksiyonlarının dikkatli incelenmesi ve görüntülenmesi tanı için önem arz etmektedir. Tedavi seçenekleri sınırlıdır, ancak genellikle riboflavin, koenzim Q veya tiamin gibi çeşitli vitaminler ve kofaktörleri içermektedir (18).

2.1.4.7. Lizozomal Depo Hastalıkları

Lizozomal depo hastalıkları, substratların lizozomal degradasyonunun bozulmasına bağlı olarak doku ve organlarda glikozaminoglikanların, glikoproteinlerin veya glikolipitlerin birikmesinden kaynaklanan metabolik hastalıklardır (12, 16). Lizozomal depo hastalıkları arasında mukopolisakkaridozlar en sık görülen gruptur. Fabry ve Pompe ise diğer lizozomal depo hastalıkları arasında sayılmaktadır. Lizozomlar, büyük lipid ve mukopolisakkarit moleküllerinin hücre içi parçalanması için gerekli bir dizi hidrolaz enzimini içermektedir. Bu enzimlerden birinin eksikliği, o enzimin substratının birikmesine yol açarak, organların fonksiyonel olarak bozulmasına ve organ büyümesine neden olmaktadır. Hastalığın klinik özellikleri arasında karaciğer büyümesi, dalak büyümesi, nörolojik gerileme, kaba yüz görünümü ve kısıtlı eklem hareketleri sayılabilmektedir. Metabolik dekompanasyon yoktur, ancak bazı durumlarda akut semptomlar (örn., şiddetli ağrı) başlıca klinik özelliktir. Hastaların idrarında anormal glikozaminoglikanlar ve oligosakkaritler araştırılarak tanı konulabileceği gibi, kesin tanı için spesifik enzim çalışmaları gerekmektedir. Çoğu hastalık için henüz spesifik bir tedavi yoktur, ancak enzim replasman tedavisinin veya kemik iliği transplantasyonunun çeşitli bozukluklarda faydalı olduğu görülmektedir (21).

2.1.4.8. Peroksizomal Hastalıklar

Peroksizomal hastalıklar peroksizomal biyogenez bozuklukları ve peroksizomal tek enzim eksikleri olarak iki grup içinde değerlendirilmektedir. Peroksizomal biyogenez defektlerinde tüm peroksizom fonksiyonları bozulmuştur. Bu gruptaki bozukluklar birbiri içine geçen üç klinik spektrumdan oluşur. Bu üç tip (Zellweger sendromu, neonatal adrenolökodistrofi ve infantil refsum hastalığı) Zellweger spektrum bozuklukları olarak adlandırılır. Peroksizomal tek enzim eksikleri, hastalarda peroksizom fonksiyonlarında (eterfosfolipit sentezi, alfa ve beta oksidasyon) rol alan enzimlerin birinin eksikliğinden oluşur (12, 16, 22).

Genel olarak yenidoğan ve erken çocukluk döneminde görülmelerine karşın erişkin yaşta görünen peroksizomal hastalıklarda vardır. Dismorfik bulgular, katarakt, hepatomegali ve nörolojik bulgulara ek olarak karaciğer tutulumu hastalığın klinik bulguları arasında gösterilmektedir. Peroksizomal hastalıklar genellikle

şiddetli, ilerleyici multisistem bozukluklarına neden olmaktadır. Peroksizomal hastalıkların tanısında, kanda uzun zincirli yağ asitlerinin ve safra asitlerinin analizi, plazma plazminojen seviyelerin ölçümü gibi peroksizomal tarama testleri ile hasta fibroblastlarında enzim aktivite ölçümü testleri kullanılmaktadır (21, 22).

2.1.4.9. Pürin ve Pirimidin Metabolizması Bozuklukları

Pürin ve pirimidinler nükleik asitlerin önemli kısımlarını oluşturmaktadır. Pürin ve pirimidin metabolizması bozuklukları nükleik asitlerin sentez, yıkım veya her ikisinde birden gözlenen bir anomaliden kaynaklanmaktadır. Bu eksiklikler nöromusküler anormalliklere, böbrek taşına, gut hastalığına, anemiye ve immün disfonksiyona neden olmaktadır. Pürin metabolizması bozukluklarına Gut hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu ve hiperürisemi örnek verilirken, pirimidin metabolizması bozukluklarına ise orotik asidüri örnek gösterilebilir.

Bu grup hastalıklar kreatinin ile ilişkili olarak idrarda ürenin artması ya da azalması veya spesifik olarak idrar pürinleri ve pirimidinlerinin analizi yoluyla tanımlanabilmektedir. Bazı pirimidin parçalanma metabolitleri sadece idrar organik asit analizi ile tanınmaktadır. Pürin ve pirimidin metabolizmasındaki eksikliklerin neden olduğu böbrek taşı hastalığı sadece allopurinol adı verilen ilaçla tedavi edilmektedir. Bazı pirimidin metabolizması bozuklukları, özellikle orotik asidüri ve 5 ‘nükleotidazın (nükleotid deplasyon sendromu) aşırı aktivasyonu, üridin veya triasetiluridin ile tedavi edilebilmektedir. Pürin metabolizması bozukluklarının başlıca nörolojik bulgularının çoğu için etkili bir tedavi yoktur (21).

2.1.4.10. Porfiria

Porfiriler, hem biyosentezi sırasında kalıtsal veya edinsel enzim eksikliklerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, vücut porfirinleri veya porfirin öncülleri dokularda birikmektedir. Porfiria hastalığı halk arasında vampir hastalığı olarak bilinmektedir. Sinir sistemi ve / veya cilt en çok etkilenen sistemler arasında gösterilmektedir (13, 16).

2.1.4.11. Konjenital Glikolizasyon Bozuklukları

Konjenital glikozilasyon bozuklukları, proteinlerin translasyon sonrası glikozilasyonu için gerekli enzimlerin eksikliğinden kaynaklanan metabolik hastalık grubudur. Glikolizasyonda rol oynayan 40'tan fazla farklı enzim vardır. Bu enzimlerden birinin eksikliği, çok çeşitli yapısal anormalliklere ve fizyolojik fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Belirtiler arasında merkezi sinir sistemi tutulumu, gelişimsel gecikme, büyüme geriliği, hipoglisemi, derialtı anormal yağ birikimi, karaciğer fonksiyon bozukluğu, protein kaybettiren enteropati ve boy kısalığı sayılabilmektedir (12, 13, 19). Bu gruptaki çoğu hasta için etkili bir tedavi henüz yoktur.

2.1.5. Kalıtsal Metabolik Hastalıklara Klinik Yaklaşım

Kalıtsal metabolik hastalıklar herhangi bir yaşta ancak en çok çocukluk döneminde oldukça geniş klinik belirti ve bulgularla ortaya çıkabilmektedir. Kalıtsal metabolik hastalıklardan kaynaklanan belirti ve bulgular erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı formlara ayrılabilir.

2.1.5.1. Erken Başlangıçlı Belirti ve Bulgular

Kalıtsal metabolik hastalıklar yenidoğan döneminde çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Ancak hızlı tanı ve erken tedavi ile çoğu kalıtsal metabolik hastalık başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir.

Galaktozemi, ketotik olmayan hiperglisemi, glutarik asidüri tip II ve mitokondriyal hastalıkların bazıları prenatal dönemde ortaya çıkan kalıtsal metabolik hastalıklar arasında sayılabilmektedir (23). Kalıtsal metabolik hastalıkların tanımlanmasında aile öyküsü birinci adımdır ve bu tür bozuklukların çoğu otozomal resesiftir. Otozomal resesif oldukları düşünüldüğünde ebeveynler arasında akraba evliliği olup olmadığına bakılmaktadır.

Klinik semptomlar arasında koma, hipotoni, hipertoni, nöbetler ve organomegali sayılabilmektedir. Belirtiler ve bulgular doğumdan sonraki sağlıklı bir periyottan sonra başlamaktadır (24).

2.1.5.2. Geç Başlangıçlı Belirti ve Bulgular

Kalıtsal metabolik bozukluklar çocuklukta, ergenlikte ve yetişkinlik döneminde görülebilmekte ve çeşitli nörolojik bulgular ile kendilerini göstermektedirler.

Kas tonusu değişiklikleri ve istemsiz hareketler teşhis için oldukça önemli olan ipuçları arasında sayılabilmektedir (25, 26). Atakların başlamasını ateş, beslenme yolu ile aşırı substrat alımı ve aşırı açlık tetiklemektedir.

Klinik belirtiler ve bulgular arasında makrosefali, mikrosefali, dikkat eksikliği, mental ve motor retardasyon, hipotoni, hipertoni, spastisite, nöbetler, hareket bozuklukları, inme, ataksi, koma gibi nörolojik bulgular sayılabilmektedir. Diğer belirti ve bulgular ise kas bulguları, organomegali, hematolojik anormallikler, kaba yüz özellikleri, iskelet anormallikleri, karaciğer yetmezliği, kalp yetmezliği, gelişme geriliği, duyuşsal problemler ve cilt problemlerinden oluşmaktadır (25, 27).

2.1.6. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Teşhis Yöntemleri

Kalıtsal metabolik hastalıkların teşhisini koymak önemlidir ve erken teşhis her hastalıkta olduğu gibi burada da tedavi şansını büyük ölçüde arttırmaktadır. Kalıtsal metabolik hastalık potansiyeli taşıyan her hastanın kesin tanısı için enzimatik ve / veya moleküler tanıya ihtiyaç duyulmaktadır. Klinik bulgulara ek olarak basit metabolik laboratuvar testleri ile bazı ipuçları elde edilerek erken müdahaleyi kolaylaştırmak mümkün olmaktadır (28).

2.1.7. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Tedavi

Kalıtsal metabolik hastalıkların tedavisinde son on yıl içinde oldukça önemli gelişmeler olmuş ve gelecekte daha iyi tedavi imkanları bulabilmek adına önemli gelişmeler bugünde devam etmektedir. Diğer tüm hastalıklarda olduğu gibi kalıtsal

metabolik hastalıklarda da erken teşhis önem arz etmektedir. Metabolik hastalıkların bir kısmı tedavi edilebilmektedir. Diğer bir kısmı ise hastalıktan etkilenmeden ya da az etkilenerek yaşamlarını sürdürmektedir.

Kalıtsal metabolik hastalıklarda tedavi yaklaşımları iki ana başlık altında incelenmektedir: akut ve kronik tedavi. Akut tedavi şüpheli/kesin kalıtsal metabolik hastalıktan kaynaklanan akut ataklı bir hastayı tedavi etmek için alınacak tüm önlemleri içermektedir (29). Kalıtsal metabolik hastalıklar için kronik tedavi edici yaklaşımlar aşağıdaki sıralanmaktadır:

1. Substratı azaltarak yapılan tedaviler
 - a. Besinsel kısıtlama
 - b. Substrat inhibisyonu
2. Eksik ürünün değiştirilmesi
3. Rezidüel enzim indüksiyonu
 - a. Kofaktör değişimi
 - b. Şaperon tedavisi
4. Eksik enzimin yenilenmesi
 - a. Enzim replasman tedavisi
 - b. Hücre / organ nakli
5. Toksik substratın çıkarılması
 - a. Diyaliz / hemofiltrasyon
 - b. Tıbbi tedavi
6. Araştırma tedavileri

2.2. Nadir ve Bilinmeyen Metabolik Hastalıklar

Yüksek derecede heterojen olan nadir hastalıklar, yaşamı tehdit eden veya kronik olarak sakat bırakan düşük prevalanslı ve oldukça kompleks hastalıklardır (30).

Nadir hastalıkların çoğu genetik ve patojenik bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Bir kısmı ise genetik yatkınlıkla kombinasyon halinde, hamilelik sırasında veya ilerleyen yaşam sürecinde çevresel etkilenme sonucu ortaya çıkmaktadır. Diğerleri nadir görülen kanserler, oto-immün hastalıklar, konjenital

malformasyonlar, toksik ve bulaşıcı hastalıklardır. İlk belirtilerin ortaya çıktığı yaş bakımından büyük çeşitlilik olmasına rağmen nadir hastalıkların çoğu doğumda veya çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır.

Son 25 yılda yapılan çalışmalar ile tahmini 7 000 nadir monogenik hastalığın %50'sinden sorumlu olan genler tanımlanmış ve geriye kalan ve hastalığa neden olan genlerin çoğunun yakın bir gelecekte tanımlanacağı tahmin edilmektedir. Gen keşfindeki bu ivme, yüksek ölçekli yeni nesil dizileme teknolojilerinin uygulanmasının bir sonucudur. Nadir hastalık tanısı ile başvuran ailelerin çoğunun yeterli klinik takip ve uygun genetik danışmaya izin veren moleküler tanı alma şansını hızlı bir şekilde artmaktadır. Ayrıca, nadir görülen hastalıkların altında yatan genetik ve moleküler nedenlerin belirlenmesi, bu patojenik yollarda etkili bir şekilde müdahale edilebilecek yeni tedavilerin tasarlanmasını kolaylaştıracaktır (30).

2.2.1. Nadir Hastalıklarda Klinik Yaklaşım

Tanı konulamayan terimi kapsamlı bir klinik muayene ve detaylı laboratuvar çalışmalarından sonra kesin tanı alamamış hastaları ifade etmektedir. Bu kısmen her bireyin kendine özgü genetik ve çevresel bir geçmişe sahip olması ve hastalıkların çok sayıda yolakla kendisini göstermesinden kaynaklanmaktadır. Araştırma, konsültasyon, klinik testler ve daha önce bilinen hastalıkların atipik görünümünün değerlendirilmesi yoluyla yapılan ayrıntılı bir klinik araştırma ve klinisyenin ayırıcı tanısının genişlemesine olanak sağlamaktadır. Ayrıntılı fenotipleme, görüntüleme ve diğer testler klinik tablonun daha iyi bir şekilde belgelendirilmesini sağlayarak, vakanın gelecekte yeni keşfedilen hastalıklar, genetik varyantlar ve hasta grupları ile ilişkilendirilmesine yardımcı olmaktadır.

Eksiksiz bir hasta kayıt verisi, prenatal ve postnatal bulguları, gelişimsel dönüm noktalarını, büyüme paternini, semptomların ve belirtilerin başlangıç ve ilerlemesini, tetikleyici etkileri, ilaçlara verilen cevabı ve hangi aile bireylerinin etkilendiğinin belirlenmesi için aile soy ağacından oluşmaktadır. İlgili fiziksel bulgular arasında dismorfizm, organomegali, nörolojik bozukluk, kemik tutulumu ve dermatolojik bulgular yer almaktadır. Birçok nadir ve yeni hastalık multisistemik olduğundan, klinisyenler tanının değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (31).

2.3. Gen Haritalama Stratejileri

William Bateson ve Reginald Punnett tarafından yürütülen genetik bağlantı çalışmaları, genetik haritalamanın temelini oluşturmaktadır. Bağlantılı genler arasında parça değişimi oranının farklı olduğunu ve krosingover sıklığının kromozom üzerindeki genler arasındaki uzaklığı belirttiği fikri, ilk kez 1911’de Thomas Hunt Morgan’ın *Drosophila* ile yaptığı bağlantı çalışmalarında keşfedilmiştir. Morgan’ın öğrencisi Alfred Sturtevant tarafından geliştirilen ilk genetik haritalamada iki bağlantılı gen arasındaki mesafe ne kadar çoksa, bu genler arasındaki bölgede krosingover olma olasılığının da o derece yüksek olacağı ileri sürülmüştür. Genler arasındaki uzaklığı ölçmenin rekombinasyon olaylarını hesaplayarak yapılabileceği gösterilmiştir (32, 33, 34).

Kromozom haritaları, 1980’de RFLP’lerin (Restriction Fragment Length Polymorphism) keşfi ile oluşturulmaya başlanmış ve 1990’ların ortalarında istatistiksel analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ile birlikte tüm-genom genetik haritaları oluşturulmuştur (34, 35).

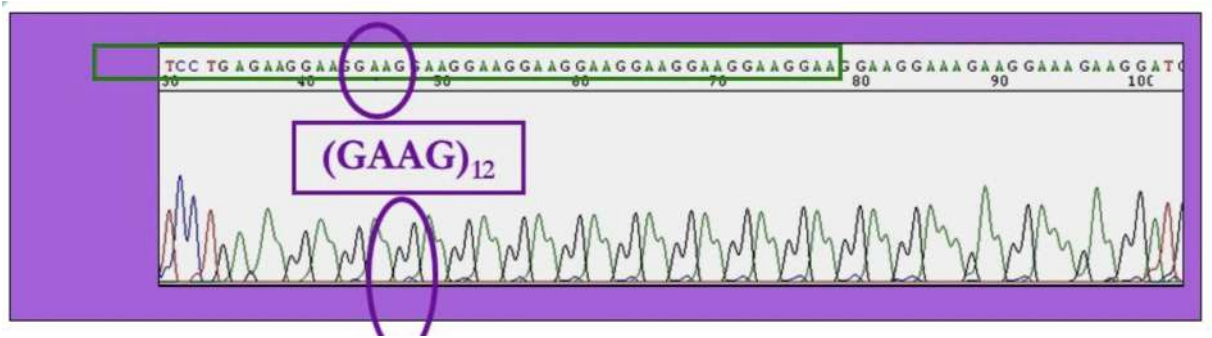
Genetik haritalama, genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin (lokus) moleküler biyolojik yöntemler ve istatistiksel analizler ile gösterilmesi işlemi olarak bilinmektedir. Genetik haritalama metodu lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonunu bildiğimiz genetik belirleyicinin (‘marker’) kuşaklar arasında birlikte kalıtılması temeline dayanmaktadır. Kromozomlar mayozda karşı karşıya gelerek parça değişimine uğramakta ve bu parça değişimi sırasında birbirine yakın olan genler sıklıkla bir arada kalıtılmaktadır. Uzak yerleşimli olan genler ise rastgele olarak bir arada gidebilmekte ya da ayrılmaktadır. Rekombinasyon kavramı genetik haritalamanın temelini oluşturmakta ve başlıca hipotez “aradığımız gen kromozom lokalizasyonunu bildiğimiz markıra çok yakınsa bu genler mayozda birbirinden ayrılmayacak ve kuşaklar arasında daima markır allel ile birlikte kalıtılacaktır” şeklindedir. Bir kromozomun haritasını veya tüm genomun haritasını belirlemek çoğu genin ve diğer genetik belirleyicilerin (markır) birbirine göre bir kromozom boyunca dizilişlerinin haritalanmasıyla mümkün olabilmektedir. İnsan vücudu fonksiyonlarının bilinmesi için bu genetik haritalama oldukça önemli olup, bu sayede insan genetik hastalıklarının heterojenite ve segregasyon analizleri yapılabilecek ve gen tedavileri mümkün olabilecektir (36).

2.3.1. Genetik Haritalamada Kullanılan Genetik Belirteçler

Kromozom lokalizasyonu hakkında bir bilgiye sahip olmadığımız genetik bir hastalığın lokalizasyonunun bulunması genetik haritalama ile mümkün olmaktadır. Bunun içinde, hangi kromozomda lokalize olduğunu kesin olarak bildiğimiz genetik markırlar kullanılmaktadır. Genetik markırlar doğrudan genlerin içinde veya genlerle hiçbir ilgisi olmayan DNA parçaları üzerinde olabilmektedirler. Gen haritalaması yapılırken polimorfik özellik taşıyan markırlar kullanılmaktadır (34).

2.3.1.1. Kısa DNA Baz Tekrarları (Short Tandem Repeats, STR, Mikrosatellitler)

Kısa DNA baz tekrarları (STR'ler) olarak da bilinen mikrosatellitler, tüm genomda yaygın olarak dağılmış tekrarlı dizilerin bir grubunu temsil etmektedir. Bunların çoğunluğu iki ila altı bazlık ardarda tekrarlanan kısa nükleotit dizilerden oluşmakta olup, bunun yanısıra tri-, penta- veya hekza-nükleotit tekrarları da bulunmaktadır (Şekil 2.2). Mikrosatellitler yüksek değişkenlik göstermeleri nedeniyle adli tıpta, popülasyon genetiğinde ve genetik soyağacı çalışmalarında kullanılmaktadır. STR varyantları ve birçok hastalık arasında önemli ilişkiler olduğu gösterilmiştir (34, 37).

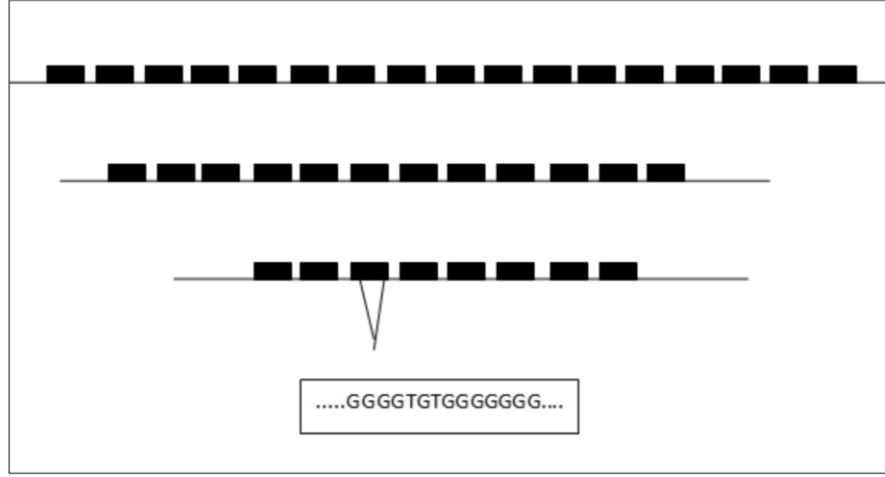


Şekil 2.2. Mikrosatellit dizileri (38).

2.3.1.2. Uzun DNA Baz Tekrarları (Variable Number Tandem Repeats, VNTR, Minisatellitler)

Uzun DNA baz tekrarları minisatellitler olarakta adlandırılmaktadır. Bu yöntemde, genom içinde dağılmış 16-64 baz çifti ve daha uzun bölgelerin birkaç kopya halinde tekrarlandığı görülmektedir (Şekil 2.3). VNTR'lere özgü restriksiyon

enzimleri kullanılarak farklı bireylerde farklı uzunluklarda fragmanlar elde edilebilmektedir (39). VNTR'ler günümüzde adli tıpta oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.



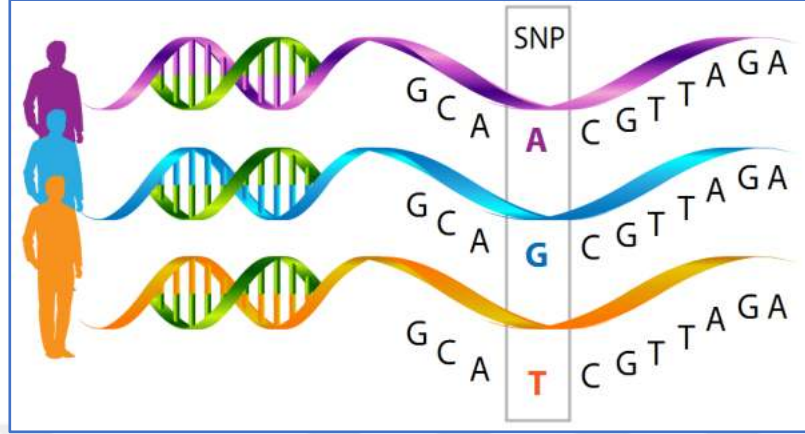
Şekil 2.3. VNTR (34).

2.3.1.3. Tek Nükleotit Değişiklikleri (Single Nucleotide Polymorphism-SNP)

Tek nükleotit polimorfizmi veya SNP'ler, DNA'nın tek bir bazındaki değişiklikler olarak bilinmektedir. SNP'ler polimorfik özellik taşımaktadır ve insan genomunda tanımlanmış yaklaşık on milyon SNP olduğu bilinmektedir. Polimorfizmler, belirli bir popülasyonda %1'den büyük sıklıkla meydana gelen baz değişiklikleri olarak tanımlanmaktadır. Yakın akraba olmayan iki birey arasında değişiklik gösteren 2.5×10^6 SNP vardır veya ortalama olarak genomdaki her 1 000 bazdan yaklaşık biri polimorfiktir. Etnik bir popülasyon içinde her 3 000-7 000 baz içinde yaklaşık bir ortak SNP olması burada herhangi bir hasta bireyin bu pozisyonda polimorfik (heterozigot) olma ihtimalinin %10'dan fazla olduğunu açıklamaktadır (31) (Şekil 2.4).

SNP'ler sadece genlerle ilişkili olmayıp, aynı zamanda DNA'nın kodlanmayan bölgelerinde de bulunmaktadır. Her ne kadar belirli bir SNP bir hastalığa neden olmasa da, SNP'ler bazı hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir. Bu ilişki, bir bireyin hastalığa yakalanmasında genetik yatkınlığın değerlendirilmesinde SNP'lerin incelenmesine olanak sağlar. Aynı zamanda, belirli SNP'lerin herhangi bir

özellik ile ilişkili olduğu biliniyorsa, bu SNP'lerin yakınındaki DNA bölgesi incelenerek bu özellikten sorumlu gen veya genleri tanımlamak amacıyla da SNP'ler kullanılabilmektedir (40).



Şekil 2.4. Tek nükleotit polimorfizmi (SNP'ler) (41).

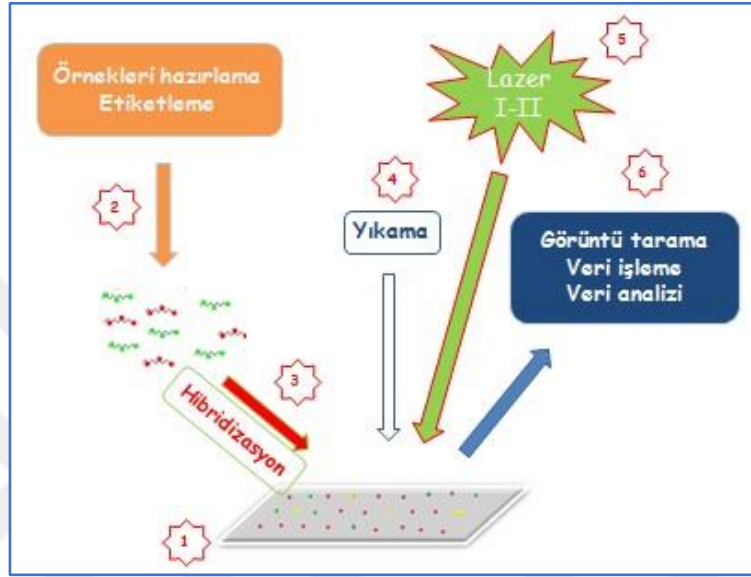
2.4. Mikroarray Teknolojisi

Mikroarrayler, binlerce nükleik asitin bir yüzeye bağlandığı ve karışımdaki nükleik asit dizilerinin hibridizasyon yoluyla göreceli konsantrasyonlarının ölçüldüğü bir teknolojidir (42).

Mikroarrayler cam, silikon veya polimerlerden yapılmış katı bir yüzeye üzerine sabitlenmiş prob temelli bir teknolojidir. Problar, hedef molekül için mümkün olduğu kadar yüksek özgüllük ve affinite gösterir özellikte olmalıdır. Genom ve transkriptom analizleri için problar PCR ürünleri, oligonükleotitler, plazmitler veya bakteriyel yapay kromozomlar olabilmektedir. Bunun yanı sıra, problar, proteom analizleri için proteinler, antikorlar, DNA/RNA aptamerleri, karbohidratlar gibi farklı tipte moleküllerden de oluşabilmektedir (42, 43, 44).

Arrayler çap, yoğunluk ve spot sayısına bağlı olarak makro ve mikroarrayler olarak isimlendirilmektedir. Dizi başına yaklaşık 1 200 spot içeren bir makroarrayin çapı 22 cm uzunluğundadır. Mikroarrayler ise üzerine oligonükleotitlerin spotlandığı veya sentezlendiği cam substratlardan yapılan yaklaşık 100 000 spot/cm² içeren mikroskobik lam boyutundaki çiplerdir (45).

Mikroarray teknolojsinin temel analiz mekanizması, bir örnekteki hedef moleküllerinin çip üzerindeki tamamlayıcı prob dizilere bağlanmasıyla başlamaktadır. Hedef molekül genellikle floresan boyalarla etiketlenmekte ve hibridizasyondan sonra yıkama işlemine tabi tutularak tarama veya görüntüleme cihazında okutulmaktadır. Daha sonra yazılım araçları ile veriler analiz edilmektedir (42, 46) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. DNA mikroarray kullanımı ve yapımındaki işlem basamakları (47).

DNA mikroarrayler, yüksek verimlilik gerektiren çok sayıda uygulama için kullanılabilir. Aynı anda yüz milyona yakın farklı molekül için bir örneğin incelenebilme özelliği, DNA mikroarray teknolojisini hızla büyüyen tekniklerden biri haline getirmiştir. Mikroarray teknolojisi yüksek ölçekli genotipleme, gen ekspresyon profili oluşturma, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve yeniden dizileme gibi uygulamalar için kullanılmaktadır (48).

2.4.1. Mikroarray Uygulamalarında Prob Dizayını

Prob seçim stratejisi, kullanılan uygulamaya ve büyük ölçüde mikroarray fabrikasyonuna bağlıdır, ancak bir prob spesifik olmalı ve hedefi verimli bir şekilde yakalayabilmelidir. Mikroarrayler için proplar Genbank vb. gibi nükleotid dizisi veritabanlarından seçilmektedir. Yirmi beş ila altmış nükleotid uzunluğundaki proplara dayanan gen ekspresyonu dizileri için prob sekansları genellikle transkriptin 3' ucunda bulunan nükleotit sekanslarından seçilmektedir. Bunun nedeni, cDNA

sentezinin çoğunlukla polyT primerleri kullanılarak transkriptin 3' ucundan başlamasıdır. Gen ekspresyon dizisi problemleri, benzer hibridizasyon sinyalleri üretmek üzere aynı sıklıkta ve benzer serbest enerjide çalışmak için aynı erime sıcaklığına (T_m) sahip olmalıdır.

Gen ekspresyon çalışmaları için kullanılan problemlerin aksine, mutasyon analizi için kullanılan problemlerin AT veya GC'ce zengin bölgelerde olup olmadığı kontrol edilerek mutasyon bölgesinin olduğu yere yerleştirilmelidir. SNP analizlerinde ise problemlerin T_m eşleşmesi, SNP'lerin belirli bir lokus için markır seçim kriterinden dolayı daha kolay olmaktadır. GC ve AT bakımından zengin bölgelerdeki SNP'lerden kaçınmak gerekmektedir (48).

2.4.2. İmmobilizasyon

DNA problemleri için immobilizasyon adımı, mikroarraylerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. İmmobilizasyon, moleküllerin bir yüzeye bağlanarak hareketliliğinin azalması veya kaybıyla tanımlanmaktadır. Genel olarak, uygun bir immobilizasyon seçimi hem yüzey hem de DNA problemlerinin fizikokimyasal özellikleri ile belirlenmektedir (49).

DNA çiplerinin başarısı, DNA problemlerinin immobilizasyonu için kullanılan kimyaya bağlıdır. Ayrıca, DNA çiplerinin başarısı, yüzeye bağlı problemlerin işlevselliğine, bağlanma yoğunluğuna ve bağlanma kimyasının yeniden üretilebilirliğine de bağlıdır. Oligonükleotit mikroarraylerin inşası için iki tip baskın immobilizasyon yöntemi vardır. Bunlar fotolitografik yöntemler ile çip yüzeyinde oligonükleotitlerin doğrudan (in situ) sentezi ve elektrostatik etkileşim ya da kovalent bağlanma yoluyla problemlerin yüzeye immobilize olması şeklindedir (49).

İmmobilizasyonda kullanılan katı destekler önemli olup, arka plan sinyalini, problemler ve katı destek arasındaki bağın stabilitesini, prob yoğunluğunu, hibridasyon verimini, DNA hibrit özelliklerini, spot morfolojisini ve yoğunluğunu etkileyebilmektedir. DNA mikroarrayler için kimyasal olarak kolayca değiştirilebilir ve floresan saptamaya izin vermesi bakımından katı cam destekler kullanılmaktadır. Ayrıca polimerik malzemeler ve silikon katı desteklerde kullanılmaktadır. Polimerik

malzemelerin esnek oluşu, tarama için sorun teşkil etse de bu malzemelerin cam gibi kırılğan olmaması bir avantajdır (48).

2.4.3. Mikroarray Teknolojisi Uygulama Alanları

2.4.3.1. Gen-Ekspresyon Arrayleri

Hücre ve dokulardaki gen ekspresyonu profillerindeki global değişikliklerin incelenmesi amacıyla kullanılan ekspresyon arrayleri güçlü bir teknolojidir. Bu teknik ile aynı anda binlerce farklı genin ekspresyon profillerinin birarada incelenmesi mümkün olmaktadır (48).

Bu yöntemde, ilgili hücrelerden RNA ekstrakte edilerek ya doğrudan etiketlenir ya da etiketli bir cDNA'ya dönüştürülür. Ekspresyon arrayleri, birçok gen ifadesinin aynı zamanda izlenebilmesi, hasta ve sağlıklı hücrelerdeki gen ifadelerinin karşılaştırılmasının sağlanması ve hastalıkları alt-gruplar halinde kategorize edebilme gibi avantajlarının yanı sıra toksik bileşenlerin veya ilaç etkilerinin açıklanmasında da kullanılmaktadır (43, 50).

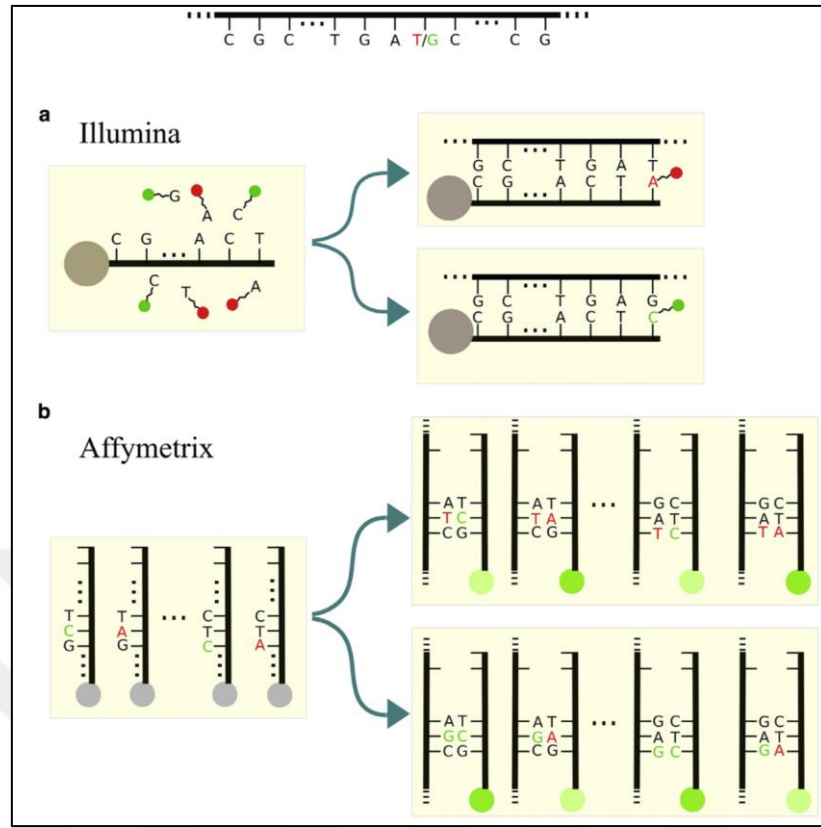
2.4.3.2. SNP Arrayler

SNP'ler, bir türün üyelerini birbirinden ayıran DNA dizisindeki tek baz değişiklikleri olarak bilinmektedir. İnsanlardaki SNP'ler büyük bir popülasyonun önemli bir bölümünde (%1'den fazla) görülmektedir (51, 52). SNP'ler genomda hem kodlayıcı hem de kodlayıcı olmayan bölgelerde bulunmaktadır. Genomda yaygın ve çok sayıda bulunan SNP'ler yaklaşık 1/1 000 baz çifti bir sıklıkla bütün insan genomu boyunca geniş ölçüde dağılmaktadırlar (51, 53, 54). Tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) tüm bu özellikleri onları yüksek ölçekli array tabanlı yaklaşımlar için uygun genetik markırlar yapmaktadır. Ayrıca SNP'lerin hastalık tanısını ve yatkınlığını etkileyebilmesinden dolayı SNP'lerin klinik uygulamalarını da desteklemektedir. Daha da önemlisi, genetik varyasyonların varlığı, verilen herhangi bir ilacın etkinliğine ve/veya ilaca bağlı yan etkilerine katkıda bulunarak ilaç tedavisini ve ilaç yanıtını güçlü bir şekilde etkilemektedir (51, 55, 56).

Tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) öneminden dolayı, yüksek ölçekli SNP genotiplendirmesi için ucuz ve doğru teknolojilerin geliştirilmesini kolaylaştıran genom çapında yaygın SNP veritabanı oluşturmak amacıyla 2002 yılında Uluslararası HapMap Projesi başlatılmıştır (57, 58). İnsan genomunda tanımlanan yaklaşık on milyon SNP ve en az bir kb DNA uzunluğunda 1 400 CNV (Copy number variants) bölgeleri içeren çeşitli genetik varyasyonlara sahip yaklaşık üç milyar DNA baz çifti bulunmaktadır (57, 59, 60). İnsandan insana kopya sayısı değişkenliği gösteren CNV’ler insan genetik varyasyonu için önemli katkı sağlamaktadır. Bazı araştırmalar, CNV’lerin çeşitli yaygın hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (61, 62, 63).

SNP arraylerde, SNP’ler iki allel için A ve B olmak üzere rastgele işaretlenmektedir. Bu nedenle, her birey genellikle her bir ebeveynden her SNP pozisyonunun bir kopyasını taşıyacağından bir kişinin bir SNP bölgesindeki genotipi AA, AB veya AB şeklinde olmaktadır (64).

SNP arrayler için hem Affymetrix hem de Illumina gibi ticari şirketlerin farklı kimyasal özellikteki çipleri kullanılmaktadır. Bugün SNP arrayler ile 1 000 000 dan fazla farklı SNP tespit edebilmektedir. Prob tabanlı üretilen SNP arraylerde %99 üzerinde doğrulukta SNP genotiplendirilmektedir (65). Affymetrix firmasının array teknolojisi, “allel-spesifik hibridizasyon” a dayanırken, Illumina firması “allel-spesifik primer extension” teknolojisini kullanmaktadır (66) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. “Allel-spesifik hibridizasyon” ve “allel-spesifik primer extension” teknolojisi (67).

Belirli bir allel için spesifik olarak işaretlenen probun mutasyon bölgesinin üzerine gelecek şekilde ortalanmasına allel spesifik hibridizasyon denilmektedir. Probun orta kısmına gelerek değişiklik gösteren baz, yanlış eşleşmiş hibridleri yüksek oranda destabilize ederek probun hedefteki mutasyon için duyarlılığını arttırmaktadır. “Allel-spesifik primer extension” teknolojisi ise, probdaki son nükleotidin SNP bölgesi üzerine yerleşmesine dayanmaktadır. SNP bölgesi probun ucu ile eşleşirse polimeraz zincir reaksiyonu başlamakta, eğer probun ucu SNP bölgesi ile eşleşmezse yanlış eşleşmiş hibridizasyonda 3’ ucu açık kalacağından polimerizasyonun başlaması engellenmektedir (48).

Genetik hastalıkların standart moleküler araştırmalarında yüksek ölçekli SNP mikroarrayler kullanılarak yapılan kapsamlı genom çaplı tarama; numune hazırlama, işleme ve veri analizlerinde önemli maliyet ve zaman avantajları sunmaktadır. Mikroarray teknolojisinin artan kullanımı, kişiselleştirilmiş genomik tıbbın ve hastalığa özgü mikroarraylerin yapımına olanak sağlamaktadır. Mikroarray

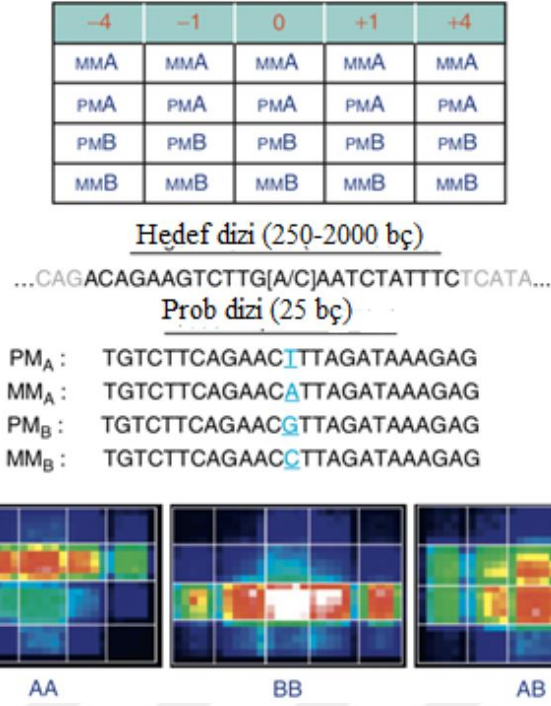
teknolojisi ve analitik yazılımlardaki ileri gelişmelerle birlikte, yüksek ölçekli SNP genotipleme, yakın gelecekte daha fazla hastalığın patofizyolojisinin keşfedilmesine ve yeni hedeflenen ilaçların gelişmesine yardımcı olmaya devam edecektir (57).

Affymetrix Platform

Genom araştırmalarında önemli bir araç haline gelmiş Affymetrix arrayler, SNP array üreten ilk ticari firmadır (68). Affymetrix GeneChip HuSNP haritalama testi, numune başına % 99'dan fazla tekrarlanabilirlikte ve % 98'den fazla doğrulukta yaklaşık 1 300 SNP genotipe sahip ilk mikroarray platformudur (69). Sonraki versiyonlar kademeli olarak 10 000, 100 000, 500 000, 1 000 000 SNP içeren arrayler olarak devam etmiştir. Yeni Affymetrix Genome-Wide Human SNP arrayler 906 600 SNP probu ve 946 000 CNV probu içeren 1.8 milyon genetik markıra sahiptir (57, 61).

Affymetrix array, hedeflenen her bir SNP için 24-40 farklı 25 oligo baz çiftinden oluşan bir prob setinden oluşur. Arrayde her bir allel için tam eşleşen (PM) ve yanlış eşleşen (MM) dörtdü prob setinden, her bir SNP için altı veya on prob seti içermektedir. Tam eşleşen (PM) probu, genellikle hedef allellerden biri ile tam olarak eşleşirken, MM prob ise 13.baz (ortadaki baz) değiştirildiğinden hiçbir allel ile tam olarak eşleşmemektedir. Yanlış eşleşen (MM) probu ise, spesifik olmayan hibridizasyonun neden olduğu kirliliği, spesifik hibridizasyon sinyalinden ayırt etmek için tasarlanmış prob olarak bilinmektedir (57, 68) (Şekil 2.7).

Affymetrix arraylar gen ifade profillerinin çıkarılmasında, polimorfizm analizlerinde, mutasyon analizlerinde, DNA dizi analizlerinde, evrimsel çalışmalarda ve potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. Prob array döşenmesi ve hibridizasyon modeli (68).

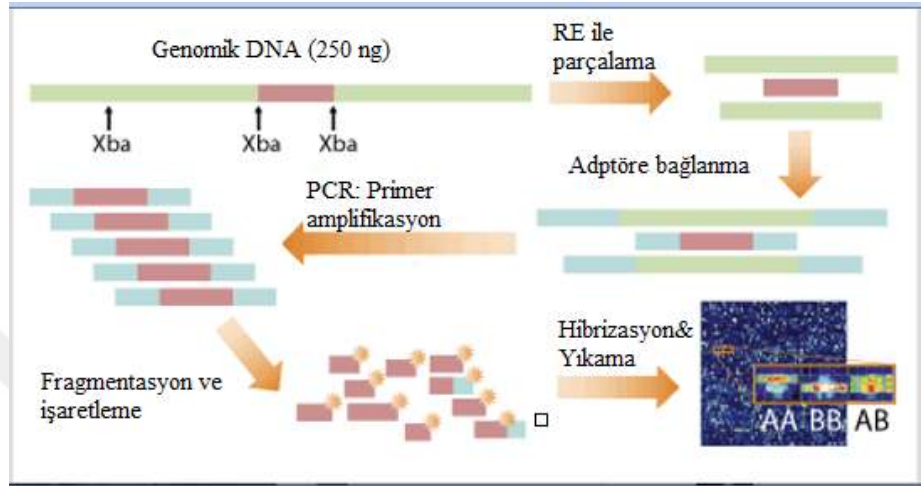
Affymetrix Genome-Wide Human 250K SNP Array

Affymetrix 500K Array seti her biri ortalama 250 000 SNP genotipleme yapabilen iki farklı array içermektedir. Bir array *Nsp I* restriksiyon enzimini (~ 262 000 SNP), diğer array ise *Sty I* (~ 238 000 SNP) enzimini kullanmaktadır. Affymetrix array sisteminde genomik DNA (250 ng) örnekleri *Nsp I* endonükleaz enzimiyle kesilmektedir. Ardından ligasyon reaksiyonu 4 bç'lik yapışkan uçları tanıyan adaptörler ile yapılmaktadır. Restriksiyon enzim kesimi sonucunda elde edilen tüm fragmentler, büyüklüğüne bakılmaksızın adaptör ligasyon için substrat olarak kullanılmaktadır. Adaptör diziyi tanıyan primer, adaptör ile bağlanmış DNA fragmentlerini amplifiye etmek için kullanılmaktadır. Amplifiye edilen fragment büyüklerinin 200-1 100 bç büyüklüğünde olması beklenmektedir.

Amplifikasyon ürünleri pürifiye edildikten sonra *DNAz I* enzimi ile kesilmektedir. Fragmente olan DNA örneği, terminal deoksinükleotit transferaz (TdT) adı verilen bir enzim kullanılarak biotin molekülleri ile işaretlenmekte ve GeneChip Human Mapping 250K çipe hibridize edilmektedir. Hibridizasyonda kullanılan hibridizasyon karışımı, hibridizasyonu iyileştiren ve arka plan kirliliğini azaltan reaktifler içermektedir. Aynı zamanda, hibridizasyon kontrollü olarak çalışan

ve ip üzerindeki spesifik problara bağlanan bir oligonükleotit kontrol reaktifi içermektedir (70).

Hibridizasyon ağamasından sonra yıkama ve boyama iğlemleri gerekleğmektedir. Tarayıcı aracılığı ile okuma yapılmakta ve veriler bilgisayar ortamında özel yazılım aracılığıyla analiz edilmektedir (68) (ėekil 2.8).



ėekil 2.8. Affymetrix genomboyu 250K SNP array (68).

2.4.3.3. Karėılaėtırılmalı Genomik Hibridizasyon Array

Karėılaėtırılmalı genomik hibridizasyon (aCGH), DNA miktarındaki kayıp ve kazanımları yüksek çözünürlükte saptayan oldukça güvenli bir yöntem olarak bilinmektedir. Karėılaėtırılmalı genomik hibridizasyon yöntemi ile tüm genomdaki delesyonlar, insersiyonlar ve kopya sayısı değiğiklikleri saptanabilmekte ve hücrenin bütün kromozomları incelenebilmektedir.

Karėılaėtırılmalı genomik hibridizasyon, bütün kromozomun cam slaytlar üzerine immobilize edilmesine ve farklı floresan iğaretleyiciler ile kontrol ve rnek DNA'nın kromozomal preparata hibridize olma esasına dayanmaktadır (48).

2.4.3.4. Array Tabanlı Kromatin İmmünopresipitasyon Arrayler (ChIP on Chip Array)

Kromatin immünopresipitasyon (ChIP), proteinlerin genomla nasıl etkileğime girdiğini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Spesifik proteinlerin, promotor

bölgelerdeki transkripsiyon faktörleri veya diğer DNA bağlama bölgeleri gibi spesifik genomik bölgelerle ilişkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlar.

Çip üzerinde ChIP, kromatin immünopresipitasyonu, DNA mikroarray ile birleştiren bir teknolojidir. Normal ChIP gibi, çip üzerinde ChIP ile de genom-boyu proteinler ve DNA arasındaki in vivo etkileşimleri araştırmak mümkün olmaktadır (71).

2.4.3.5. Yeniden Dizileme (Re-Sequencing) Array

Özel tasarlanabilen ve yüksek kalitede yeniden sekanslama arrayleri ile 60 000 baza kadar olan nükleotit dizilerinin tek bir deneyde analizi mümkün olabilmektedir. Bu teknoloji mitokondriyal, bakteri veya küçük ökaryotik genomların ve belirli hastalıklar için seçilen spesifik genlerin dizilenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (68).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Metabolizma ve Beslenme Ünitesi'ne başvurmuş ayrıntılı klinik ve laboratuvar çalışması ile literatürde tanımlanmadığı öngörülen ve kompleks fenotip sergileyen otozomal resesif kalıtım modeli gösteren ve en az iki etkilenmiş metabolik/nörometabolik hastalık sahibi altı aile çalışılmıştır. Çalışmaya alınan toplam birey sayısı 29'dur. Çalışma Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Metabolizma Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Çalışma 31 Ocak 2018 tarihinde GO 18/123 proje numarası ile "Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından onaylanmıştır. Etik kurul izin yazısı Ek-1'de sunulmuştur.

3.1. Kandan DNA İzolasyonu

Kandan genomik DNA elde edilmesi için İnvitrogen iPrep™ pürifikasyon cihazında (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) "İnvitrogen iPrep™ PureLink™ gDNA Blood" kiti kullanılarak otomatik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.2. Parafin Bloktan DNA İzolasyonu

- Parafin bloktan DNA izolasyonu yapılacak olan bireyin dokusu 1.5 ml'lik ependorf tüpün içine alındı.
- 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 500 µl Lizis tampon eklendi.
- Lizis tampon eklenen tüpün içine 20 µl Proteinaz K (10µg/µl) eklenerek örnekler 56°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası tüplere 500 µl fenol, 300 µl kloroform eklenerek, tüpler 10 dk boyunca karıştırıldı ve 15 000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrasında tüpün üstündeki süpernatant bölgesi yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılarak süpernatant miktarı kadar kloroform eklendi. Tüpler beş dakika boyunca iyice karıştırıldı ve 15 000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant yeni bir tüpe alındı ve alınan miktarın 2.5 katı kadar soğuk %100'lük etil alkol eklenerek DNA'nın toplanması sağlandı.
- Tüpler DNA'nın toplanmasını arttırmak için üç saat -80°C'de bekletildi.
- Tüpler daha önceden +4°C getirilmiş soğutmalı santrifüjde 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve %100'lük alkol uzaklaştırıldı.
- Alkolün tamamen uzaklaşması için tüpler iki dakika kurumaya bırakıldı.
- Elde edilen DNA pelleti üzerine 50 µl steril distile su eklenerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.
- İzole edilen genomik DNA, -80°C'de saklandı.

3.3. Spektrofotometrede DNA Konsantrasyonlarının Kantitatif Ölçümü

İzole edilen DNA örnekleri NanoDrop cihazında 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek her bir DNA örneğinin konsantrasyonu belirlendi. Stok DNA örneklerinin bir kısmı başka bir tüpe alınarak, Affymetrix 250K SNP mikroarray metodu için gerekli olan 50 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Konsantrasyonların doğruluğu için tekrar NanoDrop cihazında ölçüm yapıldı. DNA örneklerine ait 260/280 değerleri 1.6 – 1.8 aralığında bulundu.

3.4. Affymetrix 250K SNP Array Genotipleme Metodu

Çalışmada Affymetrix[®] Genome-Wide Human 250K SNP Array sistemi kullanılarak tüm genoma dağılmış yaklaşık 262 000 SNP genotiplendirilmiştir.

Deney protokolü aşağıdaki deney basamaklarından oluşmaktadır.

- Restriksiyon enzim kesimi
- Ligasyon
- PCR
- PCR pürifikasyonu

- PCR ürünlerinin spektrofotometrik ölçümü
- Fragmentasyon
- İşaretleme
- Hibridizasyon
- Yıkama/Boyama
- Tarama

3.4.1. Restriksiyon Enzim Kesimi

Restriksiyon enzim kesimi basamağında DNA örneklerinin toplam konsantrasyonları 250 ng olmalıdır. Bu nedenle 50 ng/μl olacak şekilde sulandırılan genomik DNA örneğinden beş μl alınarak kesim için hazırlanan karışımdan DNA üzerine 14.75 μl ilave edildi. Tüm deney buz üzerinde çalışıldı.

Nsp I Enzim Kesim Reaksiyonu

H ₂ O	→ 9.75 μl
NE Tampon 2 (10X)	→ 2 μl
BSA (10X (1 mg/mL)	→ 2 μl
<i>Nsp I</i> (10 U/μl)	→ 1 μl
Toplam Hacim	→ 14.75 μl

Genomik DNA (50 ng/μl)	→ 5 μl
Kesim Karışımı	→ 14.75 μl
Toplam Hacim	→ 19.75 μl

Hazırlanan örnekler enzim kesimi için GeneAmp PCR 9 700 cihazına yerleştirilerek aşağıdaki kesim koşullarını içeren program seçildi.

Nsp I Enzim Kesim Programı

37°C	►	120 dk
65°C	►	20 dk
4 °C	►	Bekleme

Enzim kesimi sonucunda örnekler ligasyon aşamasında kullanılmak üzere - 20°C’de saklandı.

3.4.2. Ligasyon

Nsp I resitriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA örnekleri, 4 baz çiftlik yapışkan uçları tanıyan Nsp adaptörü kullanılarak ligasyon işlemi yapıldı. Ligasyona başlamadan önce gerekli koşullar GeneAmp PCR 9 700 cihazına girildi ve sıcaklık 16°C olacak şekilde çalıştırıldı. Ardından ligasyon reaksiyonu hazırlandı.

Adaptör Nsp Dizisi

5' ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCTCATG 3'
3'AATACTCGTGCTGTCTGCGGACTAGAp 5'

Ligasyon Reaksiyonu

Adaptör Nsp I (50 µM)	—►	0.75 µl
T4 DNA Ligaz Tamponu (10X)	—►	2.5 µl
T4 DNA Ligaz (400 U/µl)	—►	2.0 µl
Toplam Hacim	—►	5.25 µl

Hazırlanmış olan ligasyon karışımından 5.25 µl alındı ve kesilen 19.75 µl DNA üzerine eklendi.

Kesilmiş DNA	—►	19.75 µl
Ligasyon Karışımı	—►	5.25 µl
Toplam hacim	—►	25 µl

Hazırlanmış olan karışım aşağıdaki ligasyon programı seçilerek GeneAmp PCR 9 700 cihazına yerleştirildi.

Ligasyon Programı

16°C	►	180 dk
70°C	►	20 dk
4°C	►	Bekleme

Ligasyon sonucunda örneklere 75 µl steril su ilave edilerek sulandırıldı. Örnekler PCR aşamasında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Ligasyon yapılmış DNA	→	25 µl
H ₂ O	→	75 µl
Toplam Hacim	→	100 µl

3.4.3. PCR Reaksiyonu

Adaptör Nsp dizisini tanıyan PCR primeri adaptör ile bağlanmış DNA fragmentlerinin amplifikasyonu için kullanıldı. Bu şekilde tüm genomun amplifikasyonu sağlandı. Hibridizasyon aşamasında etkin bir ürün elde edebilmek için her bir DNA örneği için üç adet PCR reaksiyonu yapıldı.

PCR Primer Dizisi

5' ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCT 3'

PCR Karışımı

		1 XPCR	3XPCR
H ₂ O	→	44.5 µl	133.5 µl
Clontech TITANIUM Taq PCR Tamponu (10X)	→	10 µl	30 µl
G-C Melt (5M)	→	15 µl	45 µl
dNTP Karışımı (her biri 2.5 mM)	→	14 µl	42 µl
PCR Primer 002 (100 µM)	→	4.5 µl	13.5 µl
Clontech TITANIUM Taq DNA Polimeraz (50X)	→	2 µl	6 µl
Toplam Hacim	→	90 µl	270 µl

Ligasyon aşamasından elde edilen sulandırılmış 10 µl DNA örneğine 90 µl PCR karışımından eklendi.

PCR Karışımı	→ 90 µl
Dilue ligasyon yapılmış DNA	→ 10 µl
Toplam Hacim	→ 100 µl

PCR Programı

PCR GeneAmp PCR 9700 cihazında aşağıdaki PCR koşulları seçilerek yapılmıştır.

94°C	▶ 3'	} 1 döngü
94°C	▶ 30"	
60°C	▶ 30"	} 30 döngü
68°C	▶ 15"	
68°C	▶ 7'	} 1 döngü
4°C	▶ Bekleme	

PCR'dan sonra örnekler (üç µl PCR ürünü + üç µl yükleme boyası) %2'lik agaroz jelde 120 sabit voltta bir saat yürütüldü ve Bio-Rad Gel Doc XR görüntüleme cihazı (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) ile görüntülendi. Beklenen PCR büyüklükleri 200 -1 000 bp aralığındaydı.

3.4.4. PCR Pürifikasyonu

- PCR reaksiyonu aşamasında her bir örnek için tüp başına 100 µl olan toplam 300 µl PCR ürünü, 50 µl olacak şekilde 96'lık PCR pürifikasyon kitindeki (Qiagen MinElute 96 protocol PCR purification kit) altı kuyucuğa paylaştırıldı.
- 96 kuyucuklu pleyt 10 dakika vakum pompasında (KnFLab) 800 mbar'da vakumlandı.
- Kuyucukların üzerine 45 µl steril su ilave edildi ve tekrar 10 dakika 800 mbar'da vakumlandı.

- Kuyucuklara 35 µl steril su ilave edildi ve yedi dakika yavaş bir şekilde sallanarak amplifikasyon ürünleri toplandı.
- Her örnek için tek bir 1.5 ml'lik ependorf tüp hazırlandı ve her örnek tek bir tüpe toplandı.

3.4.5. PCR Ürünlerinin Spektrofotometrik Ölçümü

Fragmentasyon aşaması için toplam 45 µl (90 µg) DNA gereklidir. Bundan dolayı pürifikasyon aşamasından sonra örnekler yaklaşık 50 µl olacak şekilde ısıtmalı santrifüjde uçurularak uygun konsantrasyon sağlandı. Her bir PCR örneğinin konsantrasyonu yaklaşık 2 000 ng/µl olacak şekilde NanoDrop cihazında ölçüldü ve fragmentasyon için 45 µl örnek hazırlandı.

3.4.6. Fragmentasyon

Amplifiye edilmiş DNA örnekleri fragmentasyon için *DNAz I* enzimi ile kesildi. Bu aşamada mutlaka buzda çalışılmalıdır ve PCR cihazına önceden uygun program girilerek 37°C'ye ayarlanmalıdır.

Fragmentasyon Karışımı

Pürifiye PCR Ürünü (90 µg)	→	45 µl
10X Fragmentasyon Tamponu	→	5 µl
Fragmentasyon Reaktifi (0.05 U/µl)	→	5 µl
Toplam Hacim	→	55 µl

Fragmentasyon Programı

37°C	▶	35'
95°C	▶	15'
4°C	▶	Bekleme

Reaksiyon sonrası örnekler (dört µl örnek + dört µl yükleme boyası) %4'lük agaroz jelde 120 voltta bir saat yürütüldü ve Bio-Rad Gel Doc XR görüntüleme cihazı (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) ile görüntülendi.

3.4.7. İşaretleme

Terminal Deoxynucleotidly Transferase (TdT) enzimi, TdT tamponu ve biotin işaretli reaktif kullanılarak fragmente olmuş PCR ürünlerinin uç işaretleme gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

İşaretleme Karışımı

5X TdT Tampon	→ 14 µl
“Gene Chip” DNA İşaretleme Reaktifi (30 mM)	→ 2 µl
TdT (30 U/µl)	→ 3.5 µl
Toplam Hacim	→ 19.5 µl

Fragmentasyon aşamasından sonra kesilmiş DNA üzerine 19.5 µl işaretleme karışımından ilave edildi ve vortekslendi.

İşaretleme Programı

37°C	▶ 4 saat
95°C	▶ 15 dakika
4°C	▶ Bekleme

İşaretleme aşamasından sonra örnekler -20°C’de saklandı.

3.4.8. Hibridizasyon

Hibridizasyon karışımı hazırlanırken hibridizasyon fırını açıldı. Sıcaklık 49°C ye getirilerek hız 60 rpm olarak ayarlandı. Hibridizasyon karışımına işaretlenmiş DNA örneği eklendi. Hibridizasyon karışımındaki OCR (Oligo Control Reagent) reaktifi beş adet biotin işaretli oligonükleotit karışımından oluşmaktadır. Bu oligonükleotit karışım Affymetrix 250K SNP çip üzerindeki kontrol bölgeleriyle hibridize olmaktadır.

Hibridizasyon Karışımı

MES (12X; 1.22M)	→ 12 µl
DMSO (%100)	→ 13 µl
Denhardt Çözeltisi (50X)	→ 13 µl
EDTA (0.5M)	→ 3 µl
HsDNA (10 mg/ml)	→ 3 µl
OCR(Oligo Control Reagent)	→ 2 µl
Human Cot -1 DNA (1 mg/ml)	→ 3 µl
Tween -20 (%3)	→ 1 µl
TMACL (5M)	→ 140 µl
Toplam Hacim	→ 190 µl

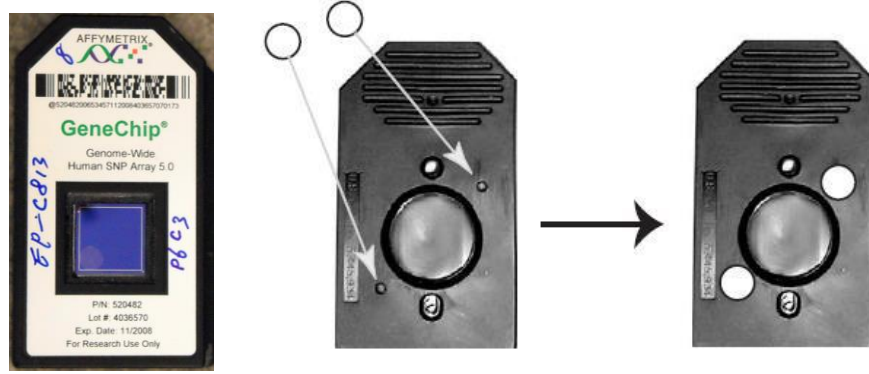
İşaretlenmiş DNA üzerine hibridizasyon karışımı dağıtıldı. 95°C’de 10 dakika denatüre edildi.

İşaretli DNA	→ 70 µl
Hibridizasyon Karışımı	→ 190 µl
Toplam Hacim	→ 260 µl

Denatürasyon Programı

95°C	► 10 dakika
49°C	► Bekleme

Denatürasyon programı çalışırken örneklerin yükleneceği çipler +4°C’den çıkarıldı ve bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Çiplerin üzerlerini çizmemeye dikkat edilerek çalışıldı. Bir pipet ucuyla çiplerin sağ üst tarafında bulunan delik kapatıldı (Şekil 3.1). Denatürasyondan sonra PCR cihazında 49°C’de bekletilen 200 µl hacimdeki örnekler hızlı bir şekilde çipin sol alt kısmında bulunan deliğe yüklendi. Yükleme yapılırken hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Çiplerin arkasındaki delikler etiketlerle kapatıldı. Çipler hibridizasyon fırınına dengeli bir şekilde yerleştirildi ve 49°C, 60 rpm rotasyonla 16-18 saat hibridizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Affymetrix SNP chip ve chipin arka yüzünde örneklerin yüklendiği kısım (68).

3.4.9. Yıkama/Boyama

Yıkama için gerekli olan iki farklı yıkama çözeltisi (Yıkama A, Yıkama B) hazırlandı. Hazırlanan yıkama A ve B çözeltileri filtreden geçirildi ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklandı.

Yıkama Çözeltisi A

20X SSPE	→	300 ml
10% Tween -20	→	1.0 ml
Distile Su	→	699 ml
Toplam Hacim	→	1000 ml

Yıkama Çözeltisi B

20X SSPE	→	30 ml
10% Tween -20	→	1.0 ml
Distile Su	→	969 ml
Toplam Hacim	→	1000 ml

Çiplerin yıkama/boyama işleminin yapıldığı “Fluidics Station 450” cihazı açılarak, çipler cihaza yerleştirilmeden önce, modüllerin (cihazda dört adet modül bulunmaktadır) altına steril 1.5 ml’lik ependorf tüpler yerleştirilerek her modül için “prime_450” programı seçildi. Böylece fluidics sisteminin yıkama A, B çözeltisi ve steril su ile yıkanarak hazır hale getirilmesi sağlandı.

Her modül için SAPE (Streptavidin, R-phycoerythrin konjugatı) boyama solüsyonu, antibadi boyama tamponu ve array bekletme tamponu içeren üç farklı tüp hazırlandı. Array bekletme tamponundan her bir tüpe 820 µl eklendi ve her bir tüp bir modül için kullanıldı. Ayrıca SAPE boyama solüsyonu ve antibadi boyama tamponunda kullanılmak üzere stain buffer (boyama tamponu) hazırlandı.

Array Bekletme Tamponu

MES Tampon (12X)	→	8.3 ml
5M NaCl	→	18.5 ml
Tween -20 (10%)	→	0.1 ml
Steril Su	→	73.1 ml
Toplam Hacim	→	100 ml

Boyama Tamponu (Stain Buffer)

H ₂ O	→	800.04 µl
SSPE (20X)	→	360 µl
Tween -20 (%3)	→	3.96 µl
Denhardt Çözeltisi (50X)	→	24 µl
Toplam Hacim	→	1 188 µl
Toplam Hacim /2	→	594 µl

SAPE Çözelti Karışımı

Boyama Tamponu	→	594 µl
1 mg/ml SAPE	→	6.0 µl
Toplam Hacim	→	600 µl

Antibadi Boyama Tamponu

Boyama Tamponu	→	594 µl
0.5 mg/ml Biotinlenmiş Antibadi (Anti- Streptavidin Antibody, biotinylated)	→	6.0 µl
Toplam Hacim	→	600 µl

16-18 saat hibridizasyon sonrası çipler hibridizasyon fırınından alındı. Sağ üst kısmındaki etiket çıkarılarak yine pipet ucuyla kapatıldı ve sol alttaki uçtan içindeki hibridizasyon karışımı boşaltıldı. Tamamen boşaltıldığına emin olunduktan sonra çiplere 270 µl array bekletme tamponu yüklendi. Pipet ucu çıkarıldı ve çiplerin arkasındaki delikler tekrar küçük etiketlerle kapatıldı.

Fluidics cihazına her modül için örnek numaraları ve örnek ile ilgili bilgiler sistem bilgisayarına girilerek, “mapping 5001v2_450” protokolü seçildi. Çipler, SAPE çözelti karışımı, antibadi boyama tamponu ve array bekletme tamponu cihaza yerleştirildi ve yıkama/boyama işlemi başlatıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Affymetrix Gene Chip sistemi (72).

Yıkama sonrasında çiplerde hava kabarcığı varsa array bekletme tamponu yüklenerek hava kabarcıkları yok edildi. Hava kabarcığının olması durumunda doğru okuma sağlanamamaktadır.

3.4.10. Tarama

Yıkama işlemi bittikten sonra çipler GeneChip® Scanner 3 000 7G ile tarama işlemine tabi tutuldu. Tarama sonuçları Affymetrix sistem programları GCOS (GeneChip® Operating Software) ve GTYPE (GeneChip® Genotyping Analysis

Software) ile analiz edilerek, örneğe ait imaj, kalite kontrol raporları ve genotip bilgilerini içeren dosyalar hazırlandı ve kaydedildi.

3.4.11. Affymetrix 250K SNP Array Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Affymetrix GYTPE programı tarafından oluşturulan genotip dosyaları (CHP files) özel bir yazılım programı olan VIGENOS (Visual Genome Studio, Hemasoft, Ankara) programına aktarılarak tüm aile bireyleri için genom boyu analiz yapıldı. VIGENOS programı ile ailelerdeki anne, baba ve çocuklara ait tüm genomdaki SNP verileri değerlendirilerek bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalıklarla bağlantılı olduğu düşünülen homozigot bölgeler tarandı.

Kullanılan VIGENOS programı oldukça kapsamlı genotiplendirme bilgisini görsel olarak anlaşılabilir genomik tiplendirme şeklinde bir yazılım aracılığıyla görüntülemektedir. Bu yazılım ile SNP markır bilgileri ve alleller renklendirilerek gösterilmektedir. Program Affymetrix çip dosyalarını direkt olarak orijinal dosyadan işleyebilmektedir. Analiz sırasında, ilk işlem çip setindeki markırları analiz tipine göre filtre etmek ve informatif bilgi vermeyen markırı uzaklaştırmaktadır. İkinci işlem haplotip bilgisini görüntülemek için markır bilgisinin renklendirilmesidir. Renklendirme programı analiz kısmındaki “color-mapping” fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Renklendirme fonksiyonu yanında her bir markır için tek boyutlu grafik kolonları şeklinde skor fonksiyonu tanımlamak da mümkündür (73).

Programda indeks vakadan (etkilenen birey) elde edilen genotip verilerine özdeş olan homozigot genotipler mavi olarak gösterilmektedir. Karşıt homozigot genotipler beyaz olarak gösterilirken, heterozigot SNP'ler turuncu renkte görünmektedir. Ebeveyn-çocuk ölçüsündeki heterozigot genotiplerin bir sonucu olarak informatif olmayanlar (bilgi vermeyenler) sarı renkte gösterilmektedir (74).

3.4.12. Mutasyon Taraması

Bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalığı olan ailelerdeki bireylere ait genomik DNA örneklerinde genom-boyu analizler sonucu bağlantı saptanan genlerde DNA dizi analizi ile mutasyon taraması yapıldı. Bağlantı saptanan genler seçildikten sonra uygun primerler tasarlanarak ilgili ekzon ve ekzon-intron bağlantılarını içeren

genomik DNA fragmentleri PCR ile çoğaltılarak öncelikle hastalık tanısı olan proband için daha sonra ebeveynler ve diğer kardeşler açısından mutasyon taraması yapılarak ailelerde segregasyon analizleri yapılmıştır.

3.5. Aday Genlerin Amplifikasyonu

Bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalığı olan ailelerdeki aday genlere ait protein kodlayan tüm ekzonlar ve ekzon-intron bağlantıları PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) analizi için çoğaltıldı.

PCR Reaksiyonu

DNA (50 ng/μl)	→	1 μl
One Taq® DNA Polimeraz	→	2.5 μl
Steril Su	→	11 μl
Primer F/R (100 pmol)	→	0.3 μl
Toplam Hacim	→	25 μl

PCR Koşulları

95°C	▶	5 dakika	1 Döngü
95°C	▶	30 saniye	} 35 Döngü
50-65°C	▶	45 saniye	
68°C	▶	45 saniye	
68°C	▶	5 dakika	1 Döngü
12°C	▶	Bekleme	

3.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PCR ürünleri 96'lık PCR pürifikasyon kiti (Qiagen MinElute 96 protocol PCR purification kit) kullanılarak ortamdaki fazla dNTP ve primerden temizlenmesi için pürifiye edildi.

- PCR ürününe 30 μl su ilave edilerek 96 kuyucuklu pleyte yüklendi ve 15 dakika vakum pompasında (KnfLab) 800 mbar'da vakumlandı.

- Her bir kuyucuğa 30 µl su ilave edilerek tekrar 15 dakika 800 mbar’da vakumlandı.
- Tekrar her bir kuyucuğa 30 µl su ilave edilerek pleyt 15 dakika 800 mbar’da vakumlandı.
- En son, kuyucukların üzerine 30 µl su ilave edilerek pleyt 15 dakika çalkalandıktan sonra pürifiye olan ürünler tüpte toplandı.

Pürifikasyon sonrası örnekler (iki µl örnek + altı µl yükleme boyası) %2’lik agaroz jelde 225 voltta 20 dakika yürütüldü ve Bio-Rad Gel Doc XR görüntüleme cihazı (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) ile görüntülendi.

3.7. Otomatik DNA Dizi Analizi

Aday genlerdeki mutasyonların kesin yeri ve tipinin saptanması için DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi için “BigDye Terminator v3.1” reaksiyon kiti kullanıldı.

DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

BigDye® Terminator v3.1	→	1 µl
5X Sekans Tamponu	→	4 µl
PCR Ürünü	}	14 µl
Steril Su		
Primer F/R (5 pmol/µl)	→	1 µl
Toplam Hacim	→	20 µl

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Koşulları

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

3.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Ürünlerinin Çöktürülmesi

DNA dizi analizi reaksiyonunun ardından reaksiyona girmeyerek ortamda kalan enzim, floresan işaretli ddNTP (dideoksinükleozit trifosfat) karışımı ve primerlerin uzaklaştırılması için ürünler bir kez daha pürifiye edilerek ABI 3 130 cihazında kapiller elektroforeze tabi tutuldu.

- DNA dizi analizi reaksiyonundan elde ettiğimiz ürünlerin üzerine iki μl 3M sodyum asetat ve 50 μl %100'lük etanol eklendi.
- -20°C 'de 20 dakika bekletildi ve 12 500 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Pellete zarar vermeden supernatan atılarak 200 μl %70'lik etanol eklendi ve 12 500 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Supernatan atılarak Thermo Block TDB 120 cihazında 95°C 'de 10 dakika etanol uçuruldu.
- 40 μl steril suda çözülen ürünler Gene Amp PCR System'de 94°C 'de dört dakika denatüre edildi.
- Ardından beş dakika -20°C 'de bekletildi ve ABI 3 130 kapiller elektroforezine yerleştirilerek otomatik elektroforez işlemine tabi tutuldu.

Tablo 3.1. MAG genine ait primer dizileri.

Gen Adı	Ekzon	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
MAG	1	CGGGCAATGAAACAAGACCC	CTCCCATCCCCAACCACATG
MAG	2	CTGAGCAGGTTGGAGGTGG	TCCCAGATCTGCCATCCAGG
MAG	3	GAGGCGATACCGTTGAGGAG	AATCCCTGCCTGGCCCTG
MAG	4	GCGGAACCAGGCAGTCCT	CTCGACTGTTTATGGCCGGT
MAG	5	GCTAGGTTTGGGGTGGGATC	AATTCAGCTTCCCTGCCCTC
MAG	6	GGGAAATTGGAGGGCCCTAC	CTCTCCAACCGGAAAGGGAG
MAG	7	CTCCGTGCCAATCAGTCAGT	GCAGGGGCTGGAATTAACAG
MAG	8	GTTCTGAAAGGGCTGCTTGC	TGTCCTTCCTCTCCTCCTGT
MAG	9	GGAGGTTCTCGCAGGGATTT	CACTGTCACCTGCCTCACTC

Tablo 3.2. *HIKESHI* genine ait primer dizileri.

Gen Adı	Ekzon	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
<i>HIKESHI</i>	1	TTACCTTCCCGGAAACTGGC	CCACGCTCCATCCTCACATA
<i>HIKESHI</i>	2	GCTGTGATCTGCCCCGAGTTA	AGGGGGAAAAGTCATATTCCATGT
<i>HIKESHI</i>	3	TGACAGCTATTTTTCTGGTGGGA	TGGGCAACAGAGCAAGACTC
<i>HIKESHI</i>	4	TTGGGATTACAGGCATGAGC	CATGCAGTGCTGATGTTTACA
<i>HIKESHI</i>	5	ATCAAAACTGCCCGGATATTAAA	CCAAAACAAAATGTCTTGCCTTTGA

Tablo 3.3. *CLN8* genine ait primer dizileri.

Gen Adı	Ekzon	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
<i>CLN8</i>	1A	GCTGGACCGCTCTAGCTTTA	GGCTGTGCTCTGAACACCAA
<i>CLN8</i>	1B	ATGGTCGCTGGCTTTGTCTT	AGCGTCCAGGACATTGTAGC
<i>CLN8</i>	2	GAGCCCTGGGGAGGAAATTC	TCAAAAGCCATCATTCGCGG

Tablo 3.4. *SNX14* genine ait primer dizileri.

Gen Adı	İntron	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
<i>SNX14</i>	12-21	TGCATGTGTGTACATCCACGT	TCCCTCCACTTGCCAGTTTC
<i>SNX14</i>	12-21	GCCAAAGCAATCACTGGTCTC	TCCAGCCTAGGCAATAGTGT

Tablo 3.5. *COA7* genine ait primer dizileri.

Gen Adı	Ekzon	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
<i>COA7</i>	1	GAGAGACAGCCCCCAGTTTC	TCCCCAGTCCCTAACCCAAA
<i>COA7</i>	2	TTGCCACACATCAGGAGGAC	TGATTGGCTCAAGGTCCCAC
<i>COA7</i>	3	ACTGACTTTGGCCTGAGACA	AAGGGCTGCATCAGTCTTCA

Tablo 3.6. *C19orf70* genine ait primer dizileri.

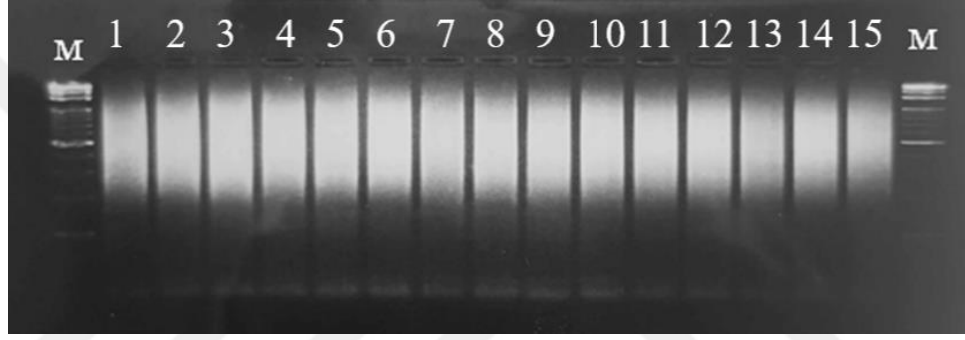
Gen Adı	Ekzon	Primer F (5'→3')	Primer R (5'→3')
<i>C19orf70</i>	4	ACCGCCCAAACAAACTCTA	CAGGCCAACCCCTGTGCTC

4. BULGULAR

4.1. Affymetrix 250K SNP Array Bulguları

PCR

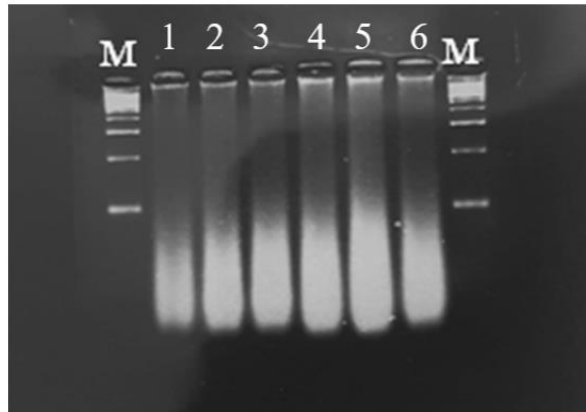
Nsp I enzimi ile kesilen ardından *Nsp* adaptörü kullanılarak ligasyon işlemi yapılan genomik DNA, adaptör *Nsp* dizisini tanıyan primer ile tüm genomun çoğaltılması amacıyla amplifiye edildi. Amplifiye edilen DNA %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Beklenen PCR ürünlerin büyüklüğü 200-100 bp arasında olmalıdır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi (M: 100 bp DNA marker, Fermantas).

Fragmentasyon

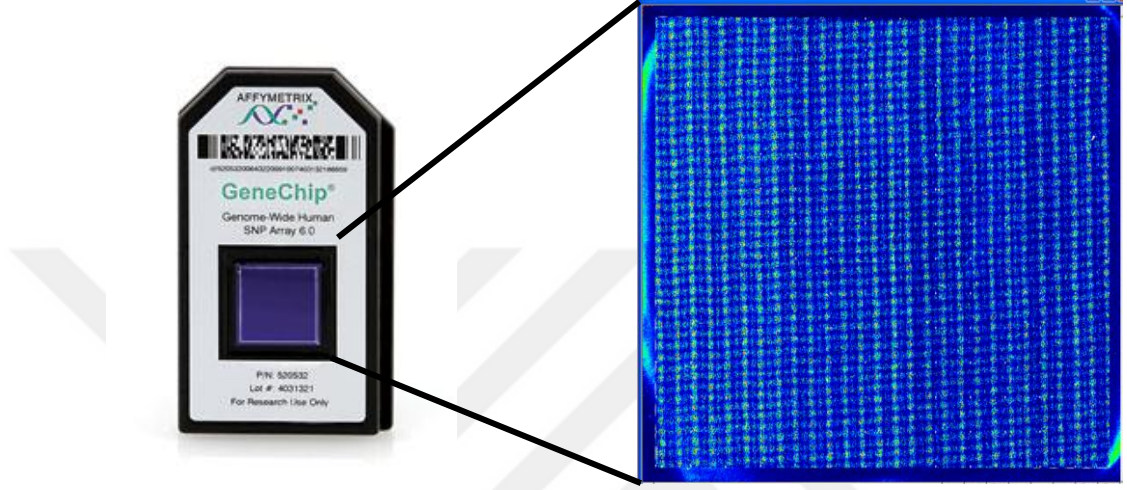
Tüm genomun çoğaltılması amacıyla amplifiye edilen DNA örnekleri fragmentasyon işlemi için *DNAz I* enzimi ile kesildi. Örneklerin tümü %4'lük agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Beklenen fragmentasyon ürünlerinin büyüklüğü <180 bp arasındadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Fragmentasyon ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50 bp, DNA marker, Fermantas).

Tarama

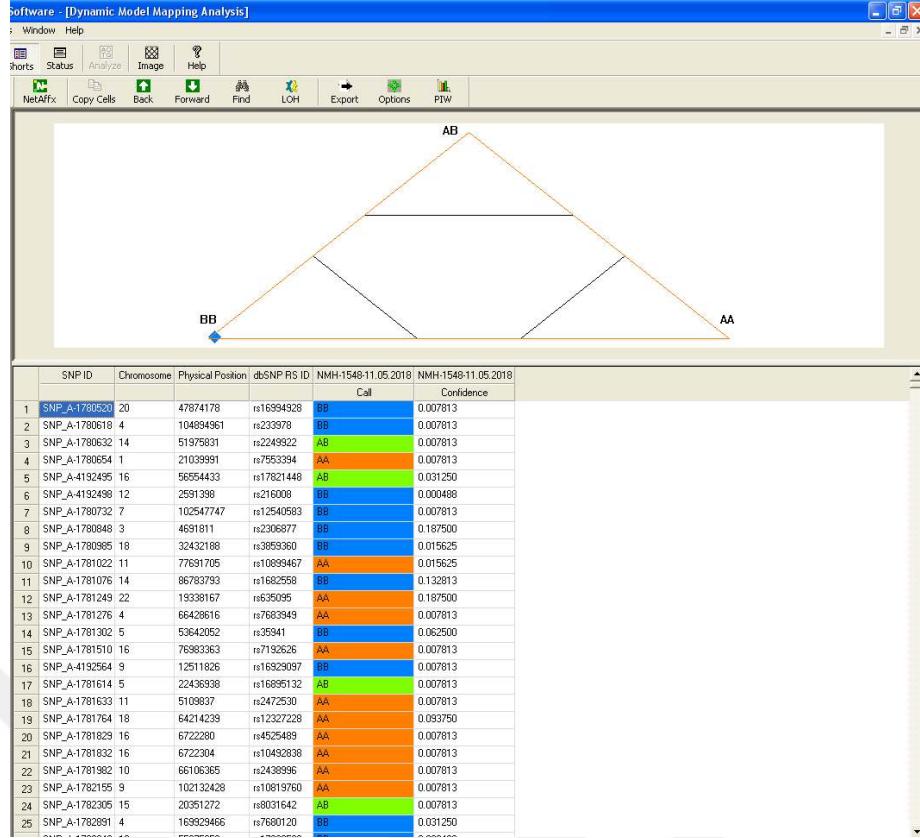
Hibridizasyon ve yıkama/boyama işlemlerinin ardından çipler GeneChip® Scanner 3 000 7G ile tarandı. Çiplere ait sonuçlar, Affymetrix sistem programları (GCOS, GTYPE ile analiz edilen örneğe ait imaj, kalite kontrol raporları ve genotip bilgilerini içeren dosyalar hazırlandı ve kaydedildi (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Tarama sonrası Affymetrix SNP çipteki örnek görüntüsü (68).

Mapping Array Report					
Report File Name - D:\Program Files\Affymetrix\GeneChip\Affy_Data\Data\NMH-1548-11.05.2018.rpt					
Date:		05/11/18 17:03:07			
Total number of SNPs:		262264			
Total number of QC Probes:		4			
Probe array type:		Mapping250K_Nsp			
SNP Performance					
CEL Data		Called Gender	SNP Call	AA Call	AB Call
NMH-1548-11.05.2018		M	97.05%	38.66%	24.10%
NMH-1549-11.05.2018		M	96.51%	37.64%	26.07%
NMH-1550-11.05.2018		F	95.40%	38.15%	25.41%
NMH-1551-11.05.2018		F	95.91%	39.54%	22.07%
NMH-1553-11.05.2018		M	96.43%	39.18%	23.04%
QC Performance					
CEL Data		AFFX-5Q-123	AFFX-5Q-456	AFFX-5Q-789	AFFX-5Q-ABC
NMH-1548-11.05.2018		717.0	474.0	1082.5	2342.5
NMH-1549-11.05.2018		627.0	388.0	989.0	2252.5
NMH-1550-11.05.2018		542.0	447.0	848.0	1941.5
NMH-1551-11.05.2018		445.0	313.0	885.0	1768.0
NMH-1553-11.05.2018		573.5	346.5	870.5	1566.0
Shared SNP Patterns					
CEL Data		SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
NMH-1548-11.05.2018		AB	BB	AB	AB
NMH-1549-11.05.2018		AA	BB	BB	AA
NMH-1550-11.05.2018		AB	BB	AB	AB
NMH-1551-11.05.2018		AB	BB	BB	AB

Şekil 4.4. GTYPE (GeneChip® Genotyping Analysis Software) ile analiz edilen çipe ait örnek kalite kontrol raporu.



Şekil 4.5. Dinamik model algoritması ile SNP ve genotip bilgilerinin gösterilmesi.

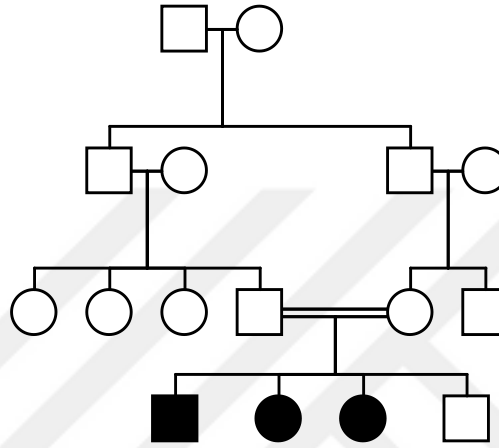
4.2. Genomboyu Homozigotluk Haritalaması Sonuçları

Affymetrix GYTPE programı tarafından oluşturulan genotip dosyaları (CHP files) özel bir yazılım programı olan VIGENOS (Visual Genome Studio, Hemasoft, Ankara) programına aktarılarak tüm aile bireyleri için genom boyu analiz yapıldı. VIGENOS programı ile ailelerdeki anne, baba ve çocuklara ait tüm genoma dağılmış yaklaşık 262 000 SNP verisi değerlendirilerek metabolik/nörometabolik hastalıklarla bağlantılı olduğu düşünülen homozigot bölgeler saptandı.

Şekil 4.6' da soy ağacı gösterilen ve aralarında akraba evliliği olan bir no'lu ailede toplamda altı birey 250K SNP array ile genotiplendirildi. Ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları arasında iktiyozis, hafif mental retardasyon, kaba yüz görünümü ve yürüme bozukluğu bulunmaktadır. SNP verileri VIGENOS programı ile analiz edilip incelendiğinde 19. kromozomda 37 502 069-51 338 681 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 14 Mb büyüklüğünde bir homozigot kromozom bölge saptandı (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Bu homozigot kromozom bölgesi incelendiğinde

C19orf61, *BLOC1S3*, *MRT11*, *XRCC1*, *ETHE1*, *PEPD*, *SCN1B*, *MAG*, *COX6B1*, *SDHAF1*, *WDR62*, *RYR1* genleri hastalıktan sorumlu olabilecek aday genler olarak belirlendi. Aday genler hastaların klinik bulguları ile birlikte ayrıntılı olarak incelenip, literatür taraması ile birlikte değerlendirildiğinde, kromozomal pozisyonu 40 474 829-40 496 549 olan *MAG* geni hastalıktan sorumlu olabilecek en kuvvetli aday gen olarak seçildi.

AİLE 1



Şekil 4.6. Bir no'lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.7. Bir no'lu ailede 19. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita (1-baba, 2-anne, 3,4,5-hasta, 6-sağlam).

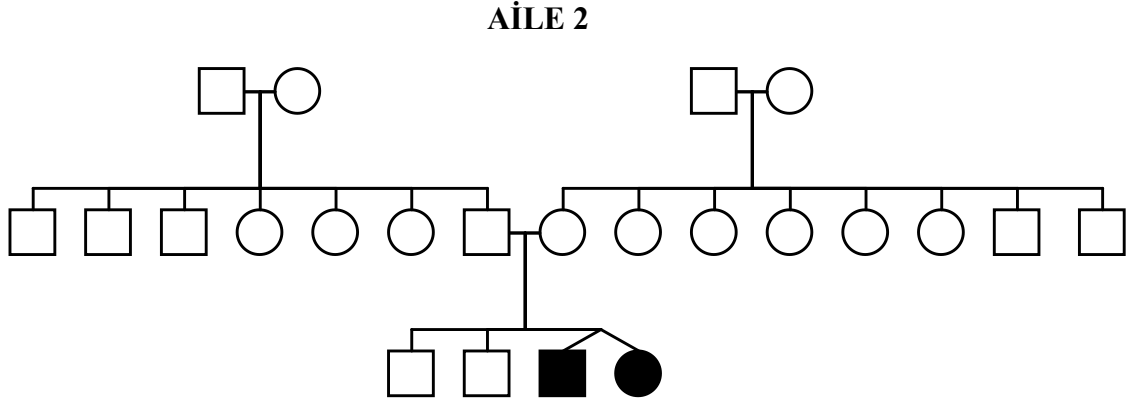
Cr	Location	Position	SNP_A	1	2	3	4	5	6
19	58,7314	39760922	SNP_A-2238099	NC	AB	BB	BB	BB	BB
19	58,9450	39872941	SNP_A-1807354	AB	AA	AA	AA	AA	AB
19	58,9456	39873271	SNP_A-2229249	AB	AA	AA	AA	AA	AB
19	59,0764	39926175	SNP_A-1858498	AB	BB	BB	BB	BB	AB
19	59,1039	39934940	SNP_A-1883144	AB	BB	BB	BB	BB	AB
19	59,1998	39965539	SNP_A-1953679	AB	BB	BB	BB	BB	AB
19	59,2260	39973894	SNP_A-1887744	AB	AA	AA	AA	AA	AB
19	59,5731	40084626	SNP_A-2078354	AB	AB	BB	BB	BB	AA
19	59,6296	40102638	SNP_A-2280873	AB	AB	AA	AA	AA	BB
19	59,6611	40112681	SNP_A-1784186	AB	AB	AA	AA	AA	BB
19	59,6733	40116599	SNP_A-1795663	AB	AB	AA	AA	AA	BB
19	59,7125	40129107	SNP_A-2228746	AB	AB	BB	BB	BB	AA
19	59,7215	40131973	SNP_A-1820041	AB	AB	AA	AA	AA	BB
19	61,0037	40344549	SNP_A-1877665	AA	AB	AA	AA	AA	AB
19	61,0669	40377296	SNP_A-2159539	BB	AB	BB	BB	BB	AB
19	61,0675	40377579	SNP_A-2302808	AA	BB	AB	AB	AB	AB
19	61,0840	40386159	SNP_A-4218202	AA	NC	AA	AA	AA	AB
19	61,3366	40517045	SNP_A-2065475	BB	AB	BB	BB	BB	AB
19	61,4832	40592981	SNP_A-2172468	BB	AB	AB	AB	AB	BB
19	61,6268	40667407	SNP_A-2022173	AA	BB	AB	AB	AB	AB
19	61,6275	40667761	SNP_A-1808736	BB	AA	AB	AB	NC	NC
19	61,7346	40723238	SNP_A-2192392	AB	AB	AA	AA	AA	BB
19	61,8084	40761472	SNP_A-2044562	AB	BB	AB	AB	AB	BB
19	62,6579	41254897	SNP_A-2144390	AB	AB	BB	BB	BB	AA
19	62,6583	41255260	SNP_A-2276687	AB	AB	BB	BB	BB	AA
19	62,6587	41255589	SNP_A-2036417	NC	AB	BB	BB	BB	AA
19	62,9988	41563135	SNP_A-1797543	AB	BB	BB	BB	BB	AB
19	63,0343	41595269	SNP_A-4197914	AB	AA	AA	AA	AA	NC
19	63,0471	41606871	SNP_A-4193870	AB	AA	AA	AA	AA	NC
19	63,0658	41623797	SNP_A-2150411	AB	AA	AA	AA	AA	AB

Chr 19:
40 474 829-40 496 549

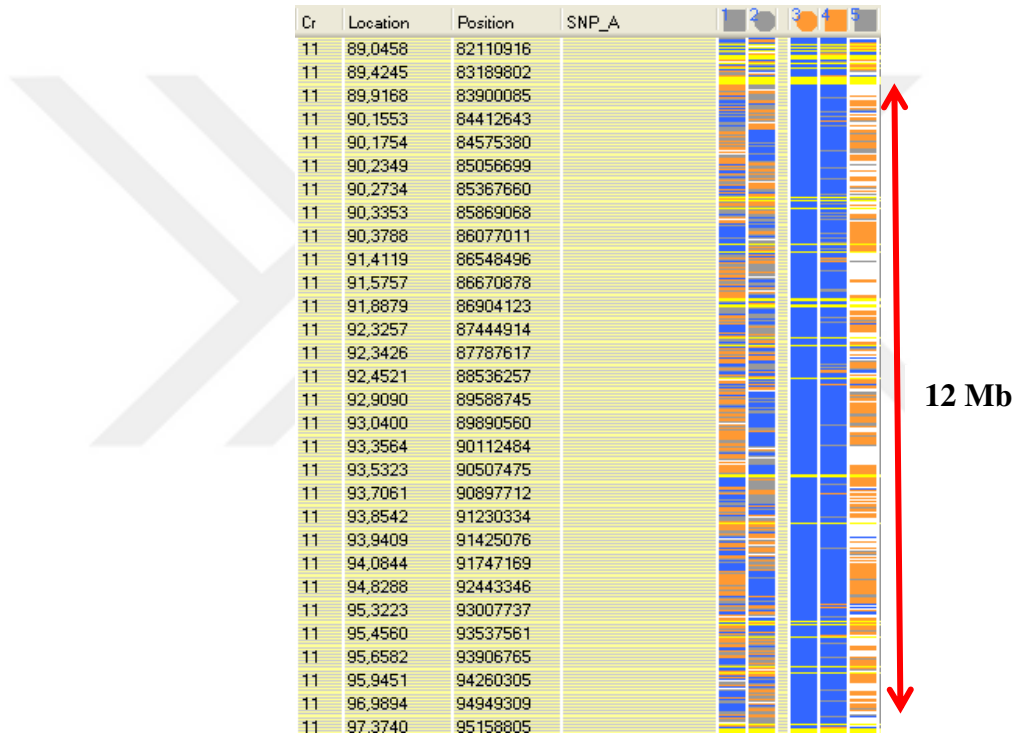
MAG
geni

Şekil 4.8. Bir no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4,5-hasta, 6-sağlam).

Şekil 4.9'da soy ağacı gösterilen ve aralarında akrabalık bulunmayan iki no'lu ailede toplam altı birey 250K SNP array ile genotiplendirildi. Ailedeki hastaların klinik bulguları arasında büyüme ve gelişme geriliği, dismorfik bulgular, spastisite, hipertelorizm ve motor mental retardasyon bulunmaktadır. SNP verileri VIGENOS programı ile analiz edilip incelendiğinde yedi farklı kromozomda on farklı homozigot kromozom bölgesi saptandı. Bu bölgelerin lokalizasyonları ve bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili olabilecek aday genler ayrıntılı olarak Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Aday genler hastaların klinik/biyokimyasal verileri ile birlikte değerlendirildiğinde 11. kromozomda 83 189 802-95 158 805 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 12 Mb büyüklüğündeki homozigot kromozom bölgesi içinde yer alan ve fiziksel yerleşimi 85 690 913-85 734 621 olan *HIKESHI* geni hastalıktan sorumlu olabilecek en kuvvetli aday gen olarak seçildi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.9. İki no'lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.10. İki no'lu ailede 11. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta, 5-sağlam).

Cr	Location	Position	SNP_A	1	2	3	4	5
11	90,2839	85452707	SNP_A-2012947	NC	AB	AA	AA	BB
11	90,2855	85465472	SNP_A-2287895	AB	AB	BB	BB	AA
11	90,2882	85488111	SNP_A-4223651	AA	AB	AA	AA	AB
11	90,2929	85525529	SNP_A-1944256	BB	AB	BB	BB	NC
11	90,2939	85533835	SNP_A-2090983	AB	NC	AA	AA	BB
11	90,2945	85539067	SNP_A-1893645	BB	NC	BB	BB	AB
11	90,2956	85547385	SNP_A-2050001	AB	AA	AA	AA	BB
11	90,2967	85556553	SNP_A-1857069	BB	AB	BB	NC	NC
11	90,3021	85600090	SNP_A-2073878	NC	AB	AA	AA	BB
11	90,3222	85762792	SNP_A-4192515	AA	AA	AB	AA	AA
11	90,3331	85851213	SNP_A-2012972	AB	NC	AA	AA	NC
11	90,3344	85861280	SNP_A-4238271	NC	AB	AB	AA	AB
11	90,3349	85865800	SNP_A-2088080	NC	NC	BB	BB	AA
11	90,3353	85869068	SNP_A-2311831	NC	AB	AA	AA	BB
11	90,3375	85886545	SNP_A-1788288	AB	AB	AA	NC	BB
11	90,3376	85887204	SNP_A-2274605	AB	AB	BB	BB	AB
11	90,3396	85903240	SNP_A-2076573	NC	NC	AA	AA	BB
11	90,3397	85904246	SNP_A-2273963	NC	NC	AB	BB	AA

Chr 11:
85 690 913-
85 734 621

HIKESHI
geni

Şekil 4.11. İki no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta, 5-sağlam).

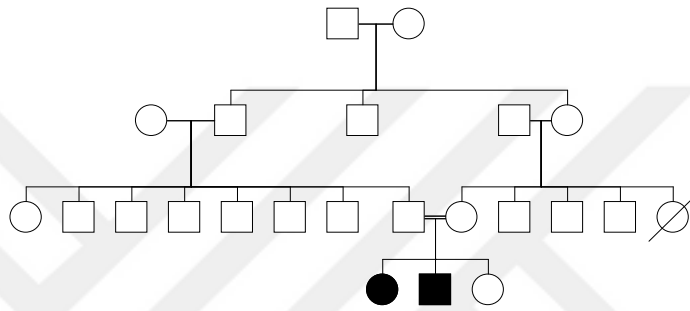
Tablo 4.1. İki no'lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.

Kromozom numarası	Nükleotit pozisyonu	Genler
3	168 563 263-177 983 377 158 646 329-159 903 063	<i>TNIK</i> <i>GFM1</i>
6	145 000 503-150 125 314	<i>GRM1</i>
10	61 302 860-62 332 320	<i>ANK3</i>
11	83 189 802-95 158 805 33 026 641-34 979 484 40 542 692-40 977 990	<i>HIKESHI, QIL, MED17, MRE1, SYTL2</i> <i>PDHX</i> <i>MRT23</i>
13	20 479 439-22 969 070	<i>SACS</i>
17	47 449 709-48 413 228	<i>MRT35</i>
21	36 277 829-40 312 865	<i>PIGP</i>

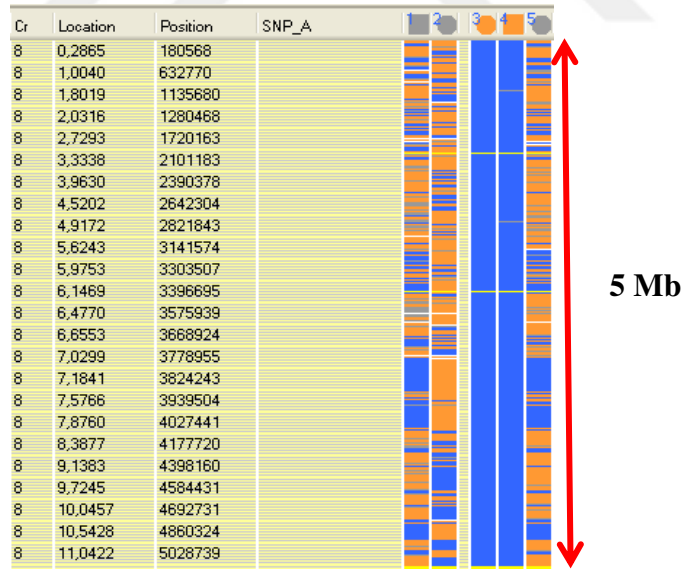
Şekil 4.12'de soy ağacı gösterilen ve aralarında birinci derecede akraba evliliği olan üç no'lu ailede anne, baba, iki hasta çocuk ve bir sağlam kardeş için toplamda beş birey 250K SNP array ile genotiplendirildi. Ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları, gelişim geriliği, yürüyememe, konuşamama, ağır mental retardasyon, ataksi, mikrosefali, serebellar atrofi ve dismorfik bulgular şeklindedir. SNP verileri VIGENOS programı ile analiz edilip incelendiğinde üç farklı

kromozomda toplamda dört farklı homozigot kromozom bölgesi saptandı. Bu bölgelerin lokalizasyonları ve bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili olabilecek aday genler ayrıntılı olarak Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Aday genler hastaların klinik/biyokimyasal bulguları göz önüne alınarak incelendiğinde, 8. kromozomda 180 568-5 028 739 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 5 Mb büyüklüğündeki homozigot kromozom bölgesi içinde yer alan ve 1 699 277-1 722 143 nükleotit pozisyonlarında yerleşim gösteren *CLN8* geni hastalıkla bağlantılı olabilecek en kuvvetli aday gen olarak seçildi (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

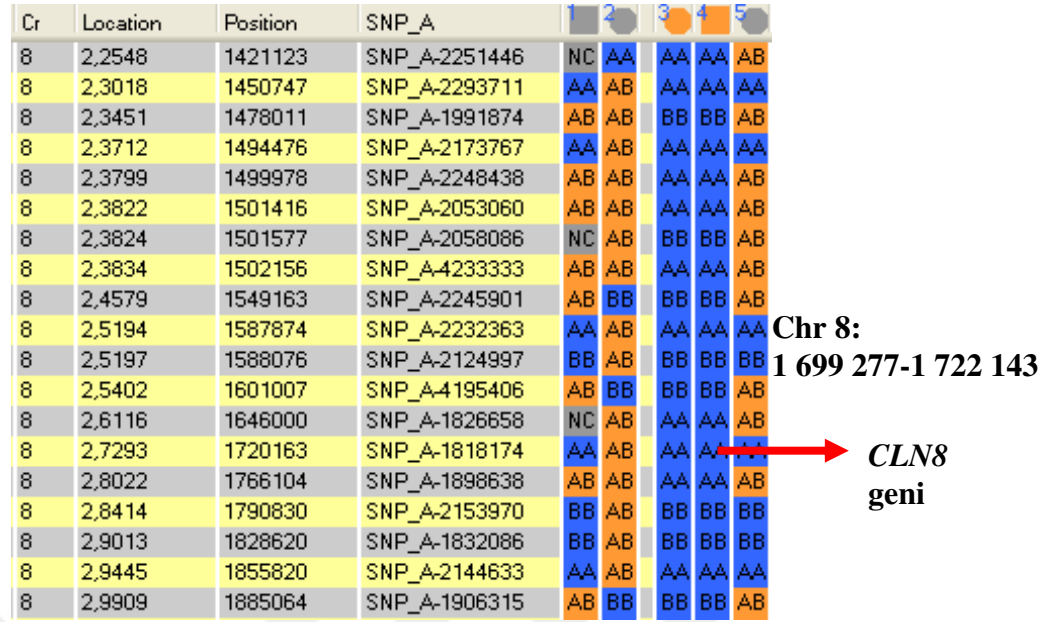
AİLE 3



Şekil 4.12. Üç no’lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.13. Üç no’lu ailede 8. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP’lere ait fiziksel harita (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta, 5-sağlam).



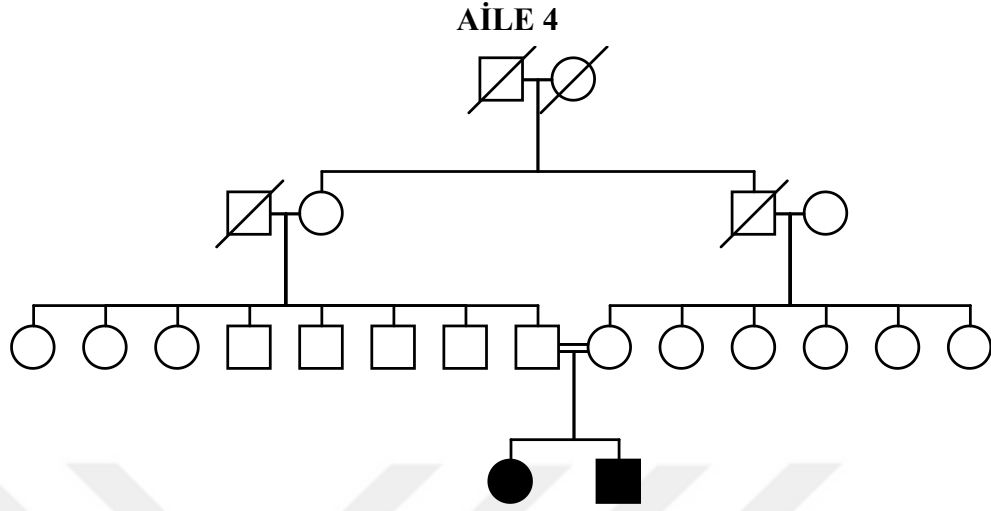
Şekil 4.14. Üç no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta, 5-sağlam).

Tablo 4.2. Üç no'lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.

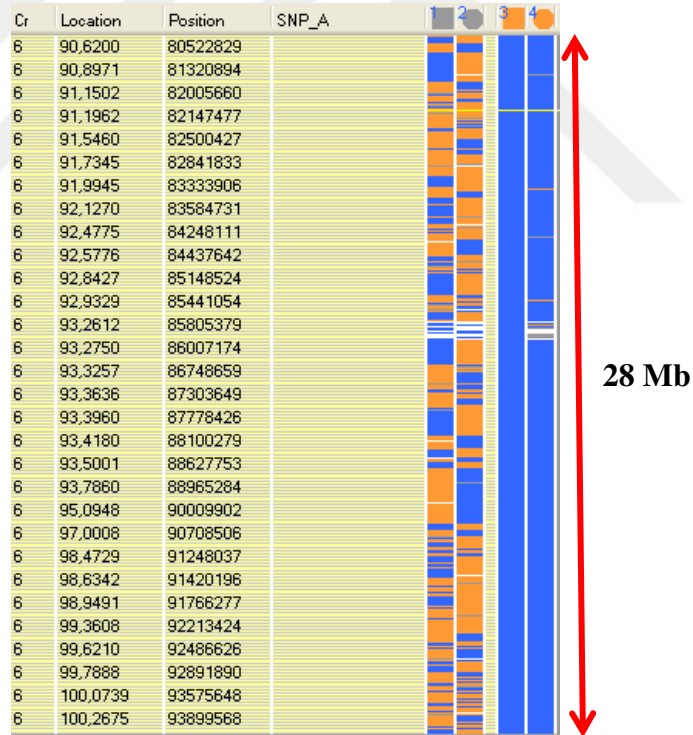
Kromozom numarası	Nükleotit pozisyonu	Genler
6	86 173 848-88 118 708	<i>SNX14</i>
8	180 568-5 028 739	<i>CLN8</i>
15	30 231 488-36 523 156 58 480 650-67 952 775	<i>SLC12A6, NOLA3</i> <i>HERC1, ACP33, MTFMT, CLN6</i>

Şekil 4.15'de gösterilen ve aralarında akraba evliliği olan dört no'lu ailede anne, baba ve iki hasta çocuk olmak üzere toplam dört birey 250K SNP array ile genotiplendirildi. Ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları arasında zeka geriliği, kaba yüz görünümü, serebellar atrofi, basık burun kökü, ayak deformitesi, retinopati, motor ve mental retardasyon bulunmaktadır. SNP verilerinin VIGENOS programı ile analizi sonucunda 3. kromozomda 40 712 313-60 290 662 nükleotit pozisyonları arasında 20 Mb büyüklüğünde, 6. kromozomda 7 917 675-19 279 720 nükleotit pozisyonları arasında 12 Mb büyüklüğünde ve 74 941 389-103 461 217 nükleotit pozisyonları arasında 28 Mb büyüklüğünde üç farklı homozigot kromozom bölgesi saptandı (Tablo 4.3). Bu homozigot kromozom bölgelerindeki aday genler hastaların klinik/biyokimyasal bulguları göz önüne alınarak incelendiğinde, 6. kromozomda 15 Mb büyüklüğündeki homozigot kromozom bölgesi içinde yer alan ve 86 271 936-86

360 332 nükleotit pozisyonları arasında yerleşim gösteren *SNX14* geni hastalıktan sorumlu en kuvvetli aday gen olarak seçildi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.15. Dört no'lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.16. Dört no'lu ailede 6. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta).

Cr	Location	Position	SNP_A	1	2	3	4
6	93,2764	86027382	SNP_A-2303708	AA	BB	AA	BB
6	93,2813	86099189	SNP_A-2114091	AA	AB	AA	AA
6	93,2907	86237451	SNP_A-2289652	BB	AB	BB	BB
6	93,2960	86314254	SNP_A-2081983	BB	AB	BB	BB
6	93,2975	86336456	SNP_A-1787144	AA	AB	AA	AA
6	93,3052	86448821	SNP_A-2227621	BB	AB	BB	BB
6	93,3053	86451122	SNP_A-1874928	AA	AB	AA	AA
6	93,3089	86503587	SNP_A-2042073	BB	AB	BB	BB
6	93,3109	86533203	SNP_A-2192979	BB	AB	BB	BB
6	93,3126	86557675	SNP_A-2078687	AA	AB	AA	AA
6	93,3139	86576474	SNP_A-2043841	AA	AB	AA	AA
6	93,3139	86576721	SNP_A-1944266	AA	AB	AA	AA
6	93,3227	86705194	SNP_A-4211811	BB	AB	BB	BB
6	93,3242	86727663	SNP_A-4205268	AA	AB	AA	AA
6	93,3250	86739755	SNP_A-4201061	AA	AB	AA	AA
6	93,3257	86748659	SNP_A-2195529	AA	AB	AA	AA
6	93,3266	86761974	SNP_A-2073615	BB	AB	BB	BB
6	93,3283	86786670	SNP_A-4227769	BB	AB	BB	BB
6	93,3385	86937185	SNP_A-2120811	AB	AA	AA	AA
6	93,3390	86943363	SNP_A-2102025	AB	NC	BB	BB
6	93,3390	86943469	SNP_A-2189024	AB	AB	AA	AA
6	93,3390	86943550	SNP_A-2149409	AB	NC	BB	BB
6	93,3397	86953795	SNP_A-1878671	AB	AB	BB	BB

Chr 6:
86 271 936-86 360 332
→ **SNX14**
geni

Şekil 4.17. Dört no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta).

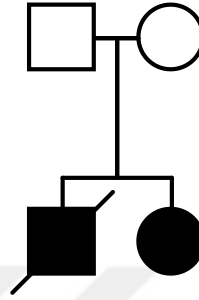
Tablo 4.3. Dört no'lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.

Kromozom numarası	Nükleotit pozisyonu	Genler
3	40 712 313-60 290 662	-
6	7 917 675-19 279 720 74 941 389-103 461 217	<i>DTNBPI, NHLRC1</i> <i>SNX14, SLC35A1, RARS2,</i> <i>NDUFAF4, FBXL4</i>

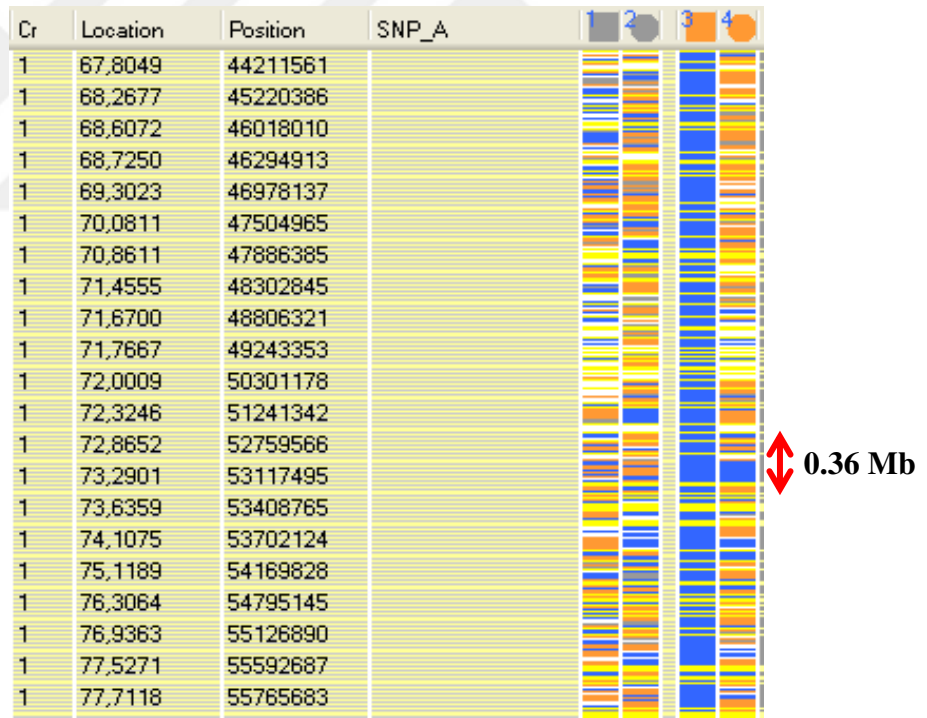
Aralarında akraba evliliği olmayan beş no'lu ailede anne, baba ve iki hasta çocuk olmak üzere toplam dört birey 250K SNP array ile genotiplendirildi (Şekil 4.18). Ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları arasında kas tutulumu, santral sinir sistemi tutulumu, mitokondri disfonksiyonu ve laktik asidoz görülmektedir. SNP verilerinin VIGENOS programı ile analizi sonucunda büyük bir homozigot kromozom bölgesi saptanamadı bir nolu kromozomlarda 52 759 566-53 117 495 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 0.36Mb büyüklüğünde, üç nolu kromozomda 58 344 364-59 132 300 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 0.8Mb büyüklüğünde küçük homozigot kromozom bölgeleri tespit edildi (Tablo 4.4). Bu

homozigot kromozom bölgelerindeki aday genler hastaların klinik/biyokimyasal bulguları göz önüne alınarak incelendiğinde 1. kromozomda 52 922 711-52 936 626 nükleotit pozisyonları arasında yerleşim gösteren *COA7* geninin hastalık ile bağlantılı olabileceği düşünüldü (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20)

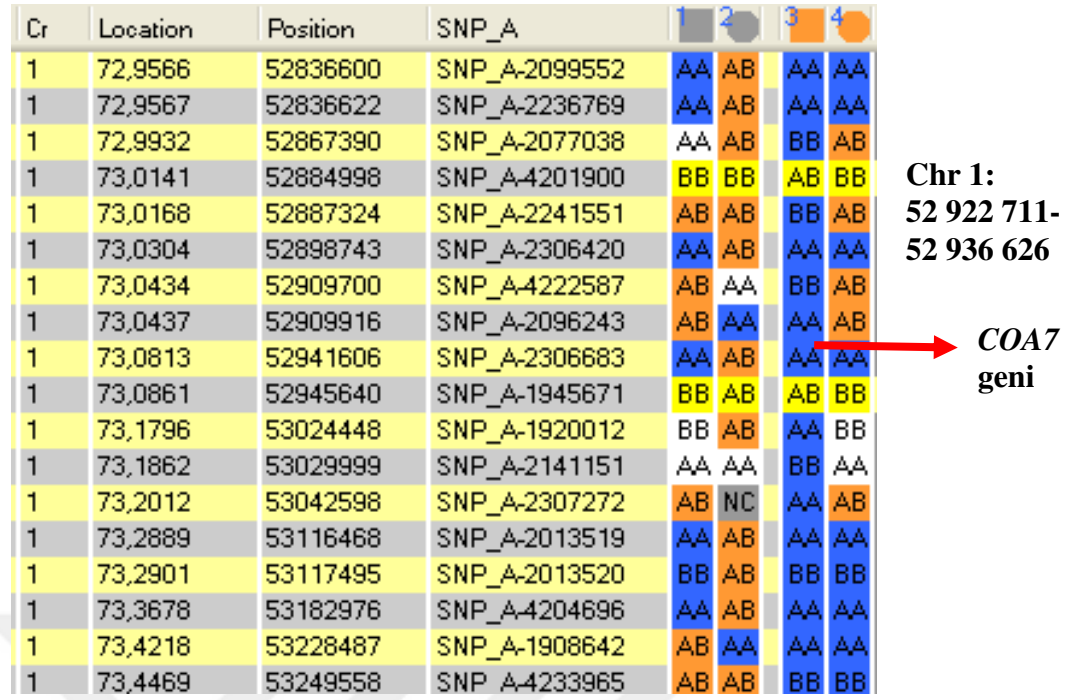
AİLE 5



Şekil 4.18. Beş no'lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.19. Beş no'lu ailede 1. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta).



Şekil 4.20. Beş no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta).

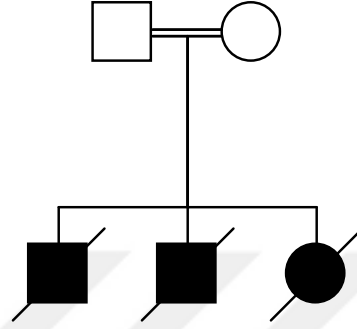
Tablo 4.4. Beş no'lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.

Kromozom numarası	Nükleotit pozisyonu	Genler
1	52 759 566-53 117 495	COA7
3	58 344 364-59 132 300	PDHB

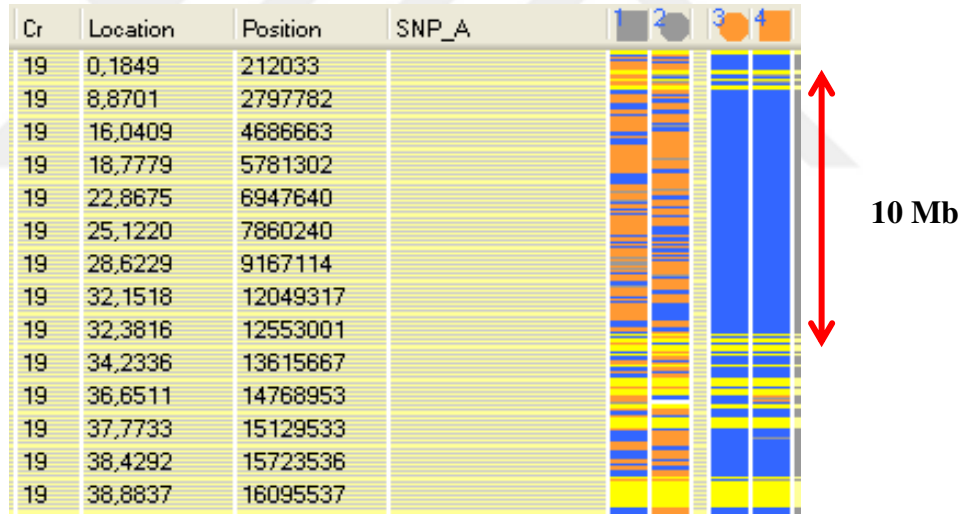
Aralarında akraba evliliği bulunan altı no'lu ailede anne, baba ve iki hasta çocuk olmak üzere toplam dört birey 250K SNP array ile genotiplendirildi (Şekil 4.21). Ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları arasında pontoroserebellar hipoplazi, 3-metil glutakonik asidüri, laktik asit ve pürivik asit yüksekliği, mikrosefali bulunmaktadır. SNP verilerinin VIGENOS programı ile analizi sonucunda 2. kromozomda 221 000 360-227 753 236 nükleotit pozisyonları arasında 6.7 Mb'lık, 4. kromozomda 137 626 126-142 286 086 ve 154 847 105-179 037 104 nükleotit pozisyonları arasında 4.6 Mb'lık ve 24 Mb'lık, 6. kromozomda 6 798 391-11 294 035 ve 149 594 280-169 926 308 nükleotit pozisyonları arasında 4.5 Mb'lık ve 20 Mb'lık ve 19. kromozomda 2 797 782-12 553 001 nükleotit pozisyonları arasında yaklaşık 10 Mb'lık toplam altı farklı homozigot kromozom bölgesi saptandı. Bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili olabilecek aday genler ayrıntılı olarak Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Bu homozigot kromozom bölgelerindeki aday genler hastaların

linik/biyokimyasal bulguları göz önüne alınarak incelendiğinde 19. kromozomda 10 Mb büyüklüğündeki homozigot kromozom bölgesi içerisinde yer alan 5 580 433-5 582 907 nükleotit pozisyonları arasında yerleşim gösteren *C19orf70* geni hastalıktan sorumlu en kuvvetli aday gen olarak seçildi (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).

AİLE 6



Şekil 4.21. Altı no'lu aileye ait soy ağacı.



Şekil 4.22. Altı no'lu ailede 19. kromozomda saptanan homozigot bölge ve genotiplendirilen SNP'lere ait fiziksel harita (1-baba 2-anne 3-4,hasta).

#	Cr	Location	Position	SNP_A	1	2	3	4
37	19	16,6030	4863557	SNP_A-2185343	AB	NC	BB	BB
38	19	16,6036	4863729	SNP_A-2183291	AB	AA	AA	AA
39	19	16,6047	4864071	SNP_A-2122382	AB	AA	AA	AA
40	19	17,2349	5120772	SNP_A-1853967	AA	AB	AA	AA
41	19	17,3686	5178008	SNP_A-2176430	AA	AB	AA	AA
42	19	17,4333	5205718	SNP_A-1941213	AB	AB	AA	AA
43	19	17,6480	5297600	SNP_A-2225258	AA	AB	AA	AA
44	19	17,8651	5390549	SNP_A-1847337	BB	AB	BB	BB
45	19	17,9274	5417206	SNP_A-1863773	BB	AB	BB	BB
46	19	17,9578	5430216	SNP_A-4239697	AB	AB	BB	BB
47	19	17,9585	5430522	SNP_A-2302958	AB	AB	BB	BB
48	19	18,1777	5524344	SNP_A-2309079	AB	AA	AA	AA
49	19	18,7779	5781302	SNP_A-2107076	AB	AB	AA	AA
50	19	18,7871	5785212	SNP_A-1859118	AB	AB	AA	AA
51	19	21,9389	6717213	SNP_A-2269511	AB	AB	AA	AA
52	19	22,0307	6739979	SNP_A-4192677	AB	AB	AA	AA
53	19	22,0441	6743315	SNP_A-2176832	AB	NC	AA	AA
54	19	22,4840	6852482	SNP_A-2055981	AB	AB	AA	AA
55	19	22,4842	6852530	SNP_A-1947550	AB	AB	BB	BB
56	19	22,4843	6852559	SNP_A-2208070	AB	AB	BB	BB
57	19	22,4923	6854537	SNP_A-2040434	AB	AB	BB	BB

Chr 19:
5 580 433-
5 582 907
C19orf70
geni

Şekil 4.23. Altı no'lu ailede saptanan homozigot bölgedeki SNP'lere ait haplotip analiz sonucu (1-baba, 2-anne, 3,4-hasta).

Tablo 4.5. Altı no'lu aileye ait homozigotluk saptanan kromozomal bölgeler.

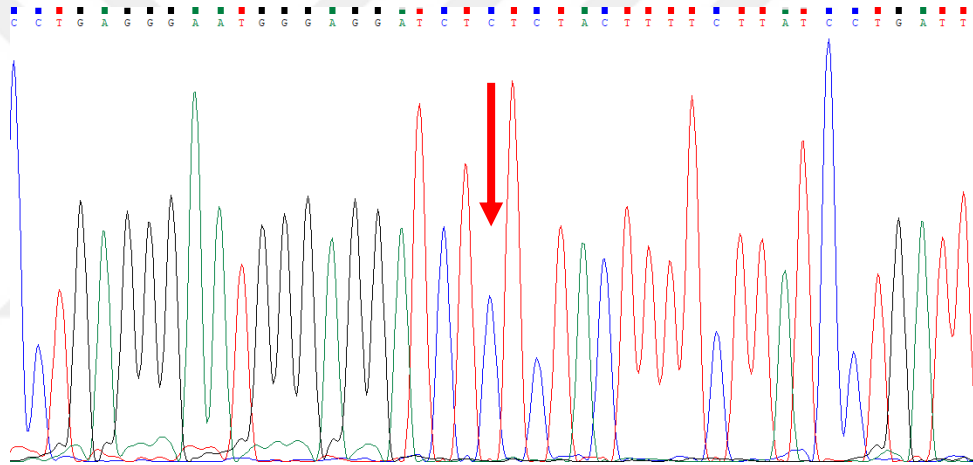
Kromozom numarası	Nükleotit pozisyonu	Genler
2	221 000 360-227 753 236	<i>MRLP44</i>
4	137 626 126-142 286 086 154 847 105-179 037 104	- <i>MSMO1, AGA, ETFDH, NEK1</i>
6	6 798 391-11 294 035 149 594 280-169 926 308	- <i>RMND1, SERAC1, MPC1</i>
19	2 797 782-12 553 001	<i>C19orf70, ATCAY, NDUFA11, MCOLN1, PET100, DOCK6</i>

4.3. Aday Genlerin DNA Dizi Analizi Sonuçları

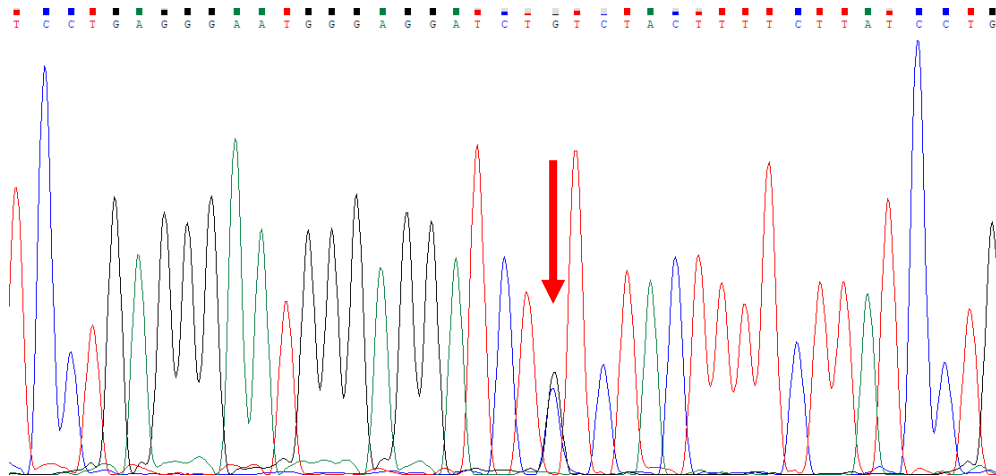
Bir no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *MAG* geninin 3. ekzonu dışında tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantıları tüm aile bireyleri için

DNA dizi analizi ile incelendi. Fakat DNA dizi analizi sonucunda hasta bireyler, anne, baba ve sağlam kardeşte herhangi bir değişiklik saptanamadı.

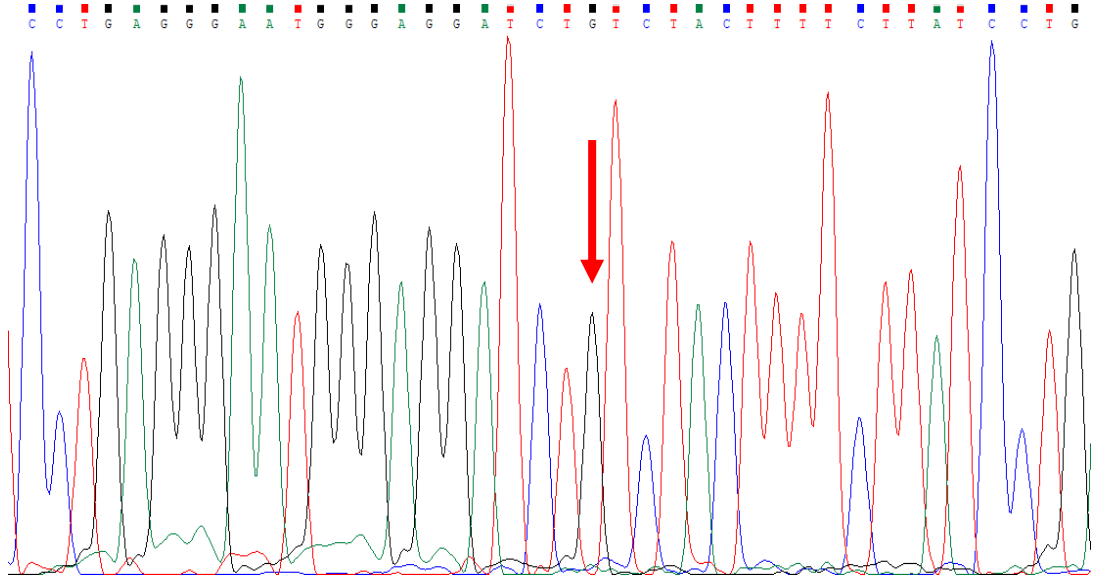
İki no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *HIKESHI* geninin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantıları tüm aile bireyleri için DNA dizi analizi ile incelendi. DNA dizi analizi sonucunda, hasta bireylerin *HIKESHI* geninin 2. ekzonunun 160. pozisyonunda yer alan guanin nükleotidinin sitozin nükleotidine (c.160 G>C) dönüştüğü saptandı (Şekil 4.24). Bu değişiklik 54. kodonda valin amino asitinin lösin amino asidine (p.V54L) dönüşümüne sebep olmaktadır. Hasta bireyler bu değişikliği homozigot olarak taşıırken, hasta bireylerin anne ve babası heterozigot, sağlam kardeşleri ise bu mutasyonu taşımamaktadır (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).



Şekil 4.24. İki no'lu ailede *HIKESHI* geninde saptanan homozigot c.160 G>C (p.Val54Leu) mutasyonu.

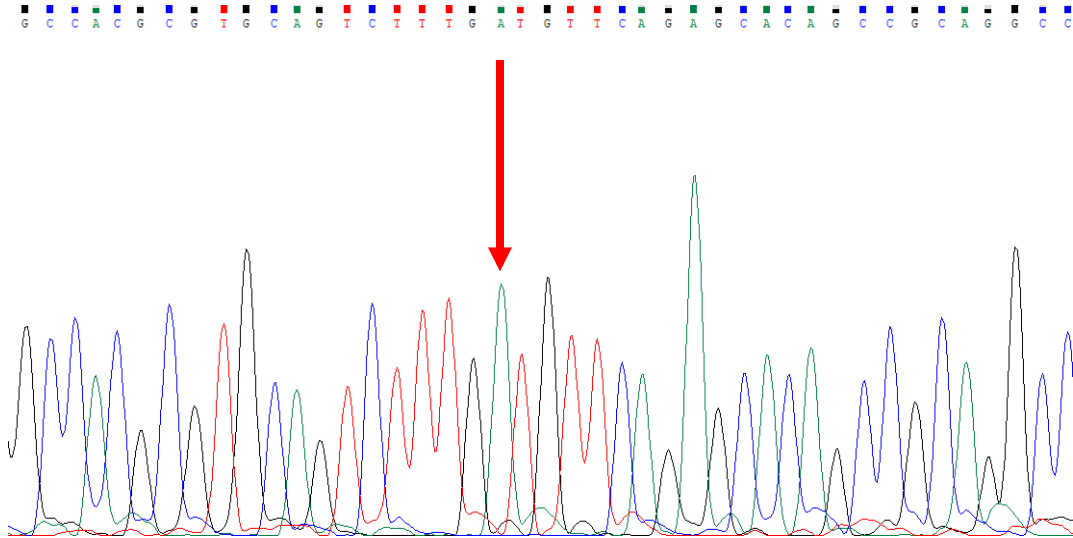


Şekil 4.25. İki no'lu ailede *HIKESHI* geninde saptanan heterozigot c.160 G>C (p.Val54Leu) mutasyonu.

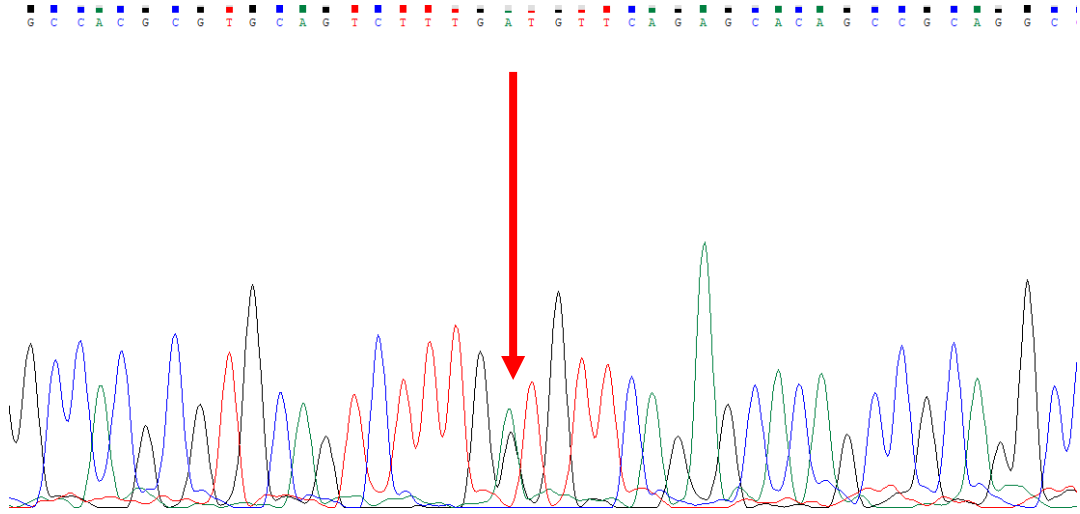


Şekil 4.26. İki no'lu ailede ki sağlıklı bireylerin DNA dizi analizi sonucu.

Üç no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *CLN8* geninin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantıları tüm aile bireyleri için DNA dizi analizi ile incelendi. DNA dizi analizi sonucunda hasta bireylerin *CLN8* geninin 1. ekzonunda 221. pozisyonda yer alan guanin nükleotidinin adenin nükleotidine (c.221 G>A) dönüştüğü saptandı (Şekil 4.27). Bu değişiklik 74. kodonda glisin amino asitinin aspartat amino asidine (p.G74D) dönüşümüne neden olmaktadır. Hasta bireyler bu değişikliği homozigot olarak taşıırken, hasta bireyin anne, baba ve sağlam kardeş bu değişikliği heterozigot olarak taşımaktadır (Şekil 4.28).

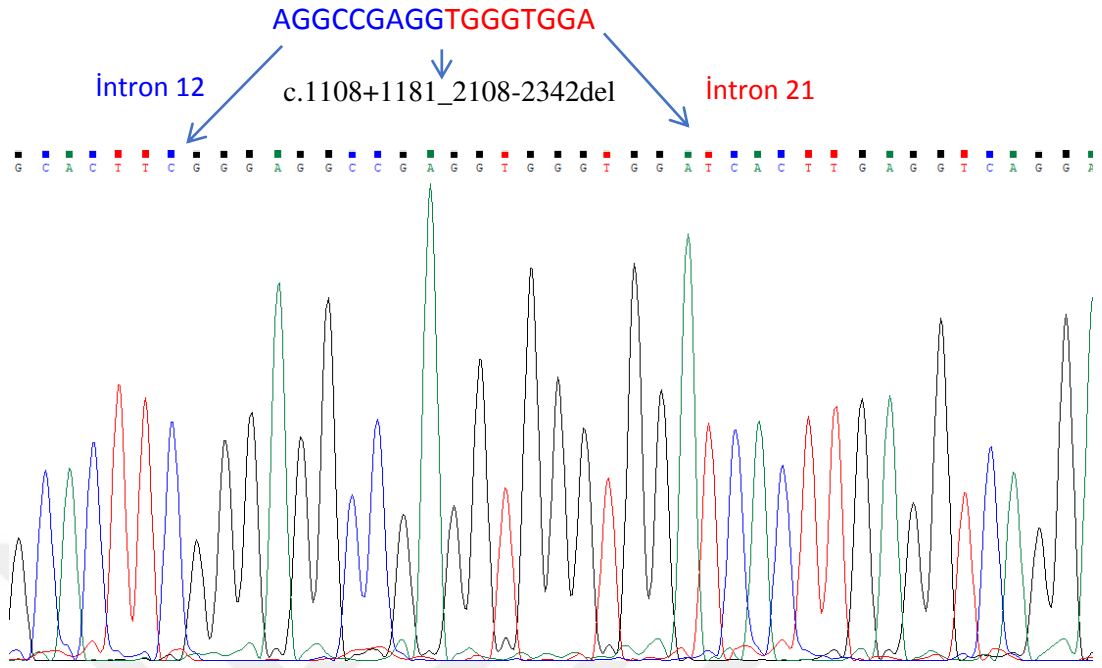


Şekil 4.27. Üç no'lu ailede *CLN8* geninde saptanan homozigot c.221 G>A (p.Gly74Asp) mutasyonu.



Şekil 4.28. Üç no'lu ailede *CLN8* geninde saptanan heterozigot c.221 G>A (p.Gly74Asp) mutasyonu.

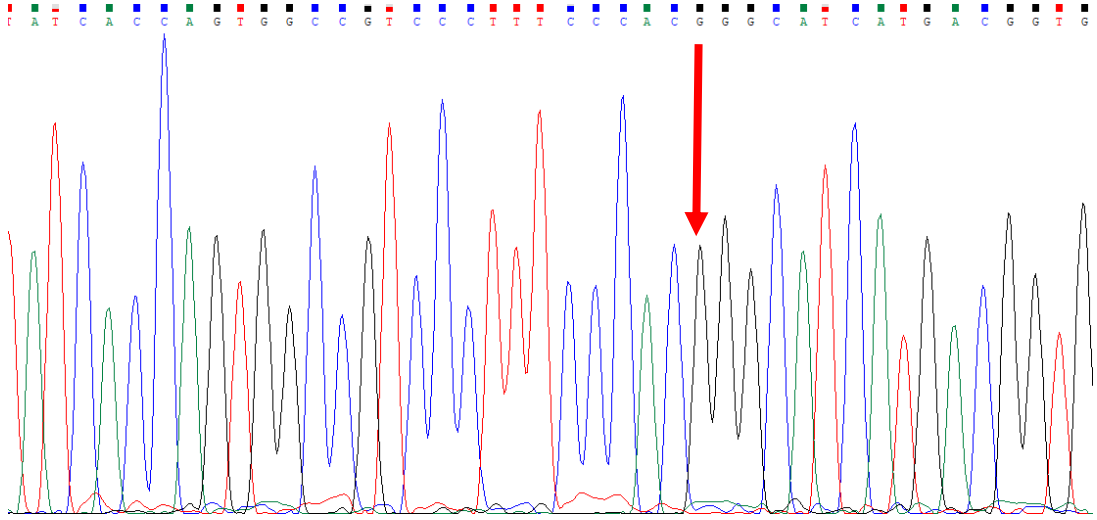
Dört no'lu ailede 250K SNP array ile genotiplendirme sonucunda hasta kardeşlerde ortak homozigotluk gösteren bölgelerdeki genlerden birisi olan *SNX14* en kuvvetli aday gen olarak seçilmiştir. Bu ailede başka bir çalışma kapsamında ekzom dizi analizi yapılmış ancak hastalıktan sorumlu olabilecek anlamlı homozigot mutasyon tespit edilememiştir. Daha önce yapılan ekzom dizi analizi verisinde IGV (Integrative Genomiks Viewer) programı kullanılarak *SNX14* genine ait okumalar incelenmiş ve her iki hasta kardeşte 13 ve 21 ekzonları içine alan ekzonik bölgelerinin okunmadığı saptanmıştır. Bu nedenle bu gende tüm ekzon-intron bölgelerine bakılmamış, bu büyük delesyona özgül primerler dizayn edilerek hasta kardeşlerde mutasyonun varlığı DNA dizi analizi ile test edilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda hastalarda c.1108+1181_2108-2342del mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır. Bu delesyon, intron 12 ve intron 21'i içine alan 25 640 baz çiftlik bir delesyondur (Şekil 4.29).



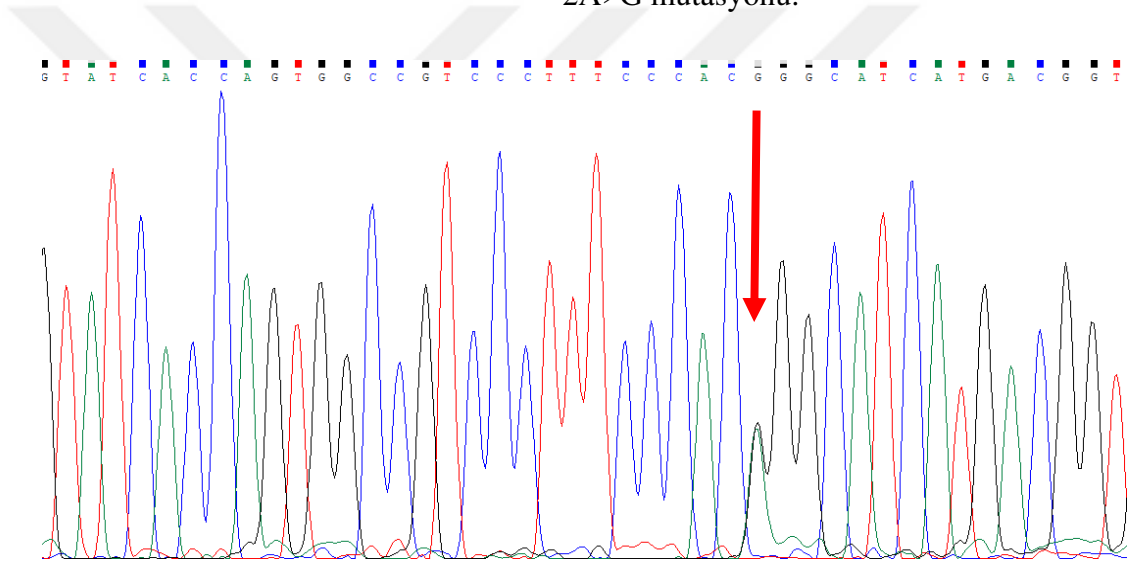
Şekil 4.29. Dört no'lu ailede SNX14 geninde saptanan homozigot c.1108+1181_2108-2342del mutasyonu.

Beş no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen 1. kromozomda yer alan *COA7* geninin tüm ekzon ve ekzon-intron bağlantıları tüm aile bireyleri için DNA dizi analizi ile incelendi. Ancak DNA dizi analizi sonucunda hasta ve diğer aile bireylerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı.

Altı no'lu ailede, başka bir çalışma kapsamında ekzom dizi analizi yapılmış ve analiz sonucunda elde edilen varyantlar hastalık ile ilişkilendirilememiştir. Altı no'lu ailede 250K SNP array ile genotiplendirme sonucunda hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *C19orf70* geninin, ekzom verisindeki varyasyonlar içerisinde de yer almasından dolayı öncelikle bu varyasyonun olup olmadığını doğrulamak amacıyla *C19orf70* genin 4.ekzonu tüm aile bireyleri için DNA dizi analizi ile incelendi. DNA dizi analizi sonucunda hasta bireylerde *C19orf70* geninde IVS3-2A>G mutasyonu homozigot olarak saptandı (Şekil 4.30). Hasta bireylerin anne ve babası bu mutasyonu heterozigot olarak taşımaktadır (Şekil 4.31).



Şekil 4.30. Altı no'lu ailede *C19orf70* geninde saptanan homozigot IVS3-2A>G mutasyonu.



Şekil 4.31. Altı no'lu ailede *C19orf70* geninde saptanan heterozigot IVS3-2A>G mutasyonu.

Tablo 4.6. Çalışmada bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalığa neden neden olan genlerde saptanan mutasyonlar.

Fenotip	Gen	Ekzon/ İntron	Nükleotit Değişikliği	Protein Değişikliği	Kaynaklar
Metabolik/ Nörometabolik	<i>HIKESHI</i>	2.ekzon	c.160G>C	p.V54L	Edvardson S., et al., 2015
Metabolik/ Nörometabolik	<i>CLN8</i>	1.ekzon	c.221G>A	p.G74D	Bu çalışma
Metabolik/ Nörometabolik	<i>SNX14</i>	intron 12 intron 21	c.1108+1181_2108-2342del	-	Thomas AC., et al., 2015
Metabolik/ Nörometabolik	<i>C19orf70</i>	4.ekzon	IVS3-2A>G	Splaysing	Gödiker J., et al., 2018

5. TARTIŞMA

Doğuştan metabolizma bozuklukları (IEM) olarakta adlandırılan kalıtsal metabolik hastalıklar, genomik veya mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar sonucu oluşan konjenital hastalıkların bir gurubunu oluşturmaktadır. Bireysel olarak ele alındığında kalıtsal metabolik hastalıklar, 1/50 000-1/150 000 arasında değişen bir insidansla nadir görülen hastalıklar olmakla birlikte, toplu olarak ele alındığında bu oran 1/1 000 olmaktadır. Monogenik hastalıklar olarakta nitelendirilen kalıtsal metabolizma hastalıklarında ki bu mutasyonlar, spesifik bir proteinin ya da enzimin fonksiyonunu etkileyerek ilgili metabolik yolakta bozukluğa neden olmaktadır (75).

Yaklaşık 700 genetik hastalığın geniş, çeşitli ve heterojen bir grubunu temsil eden kalıtsal metabolik hastalıklar özellikle çocukluk çağında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan nadir mutasyonlar sonucu görülmektedir (76).

Metabolik hastalıklar içinde bir alt grup olarak değerlendirilebilecek olan nörometabolik hastalıklar, biyokimyasal maddelerin sentezlenememesi, anormal birikimi veya toksik metabolitlerin oluşumu sonucu beyin dokusunun hasar görmesi ile sonuçlanan metabolik hastalıklardır. Metabolik/nörometabolik hastalıkların büyük çoğunluğu otozomal resesif kalıtım göstermektedir. Dolayısıyla, akraba evliliklerinin sık olduğu toplumlarda metabolik/nörometabolik hastalıklar önemli bir halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır. Örneğin, erken tanı konulup tedavi edilmediği durumlarda ağır santral sinir sistemi hasarı yaratan fenilketonüri hastalığının dünya toplumları arasında insidansı ortalama yaklaşık 100 000'de 4-10 iken, bu oran ülkemizde 1/4 500'dür.

Metabolik/nörometabolik hastalıklar, çocuk sağlığı ve hastalıkları alanındaki metabolizma, nöroloji ve genetik uzmanlarının tanı koymada, izlemede ve ailelere genetik danışmanlık vermekte büyük zorluklar yaşadığı hastalıkların başında gelmektedir. Erken tanı ve tedavisi yapılamayan metabolik hastalıkların çoğunda hastalarda ciddi ve kalıcı sistematik hasarlar gelişmektedir. Bu nedenle bu tip hastalıklarda erken tanı ve tedavi oldukça önemlidir.

Günümüzde 700'e yakın metabolik/nörometabolik hastalık tanımlanmasına rağmen halen tanımlanmamış çok sayıda nörometabolik hastalık olduğu

düşünülmektedir. Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ile mikroarray, tüm genom-ekzom dizi analizi gibi ileri düzey ve yüksek ölçekli genetik metodların yaygın bir şekilde kullanılmasıyla birlikte, şimdiye kadar adlandırılmamış ve sorumlu geni bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalıkların patogenezi aydınlatılmaya başlanmış ve hemen her yıl yeni birkaç metabolik/nörometabolik hastalık tıp literatürüne kazandırılmaya başlanmıştır. Ülkemiz bu açıdan özellik arz etmekte, yeni ve nadir metabolik/nörometabolik hastalıkların önemli bir kısmı Türkiye'deki hastalardan tanımlanmaktadır (8, 9, 10, 77, 78).

Bunun yanısıra, biyoteknoloji ve genetik alanındaki gelişmeler tek başına bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalıkların tanımlanmasında yeterli olmayıp, vakaların ve ailelerin yüksek teknoloji gen analizler için aday olup olmadığının belirlenmesi için ayrıntılı klinik ve laboratuvar (biyokimya, analitik kimya, enzim, genetik analizler, elektrofizyolojik,) çalışmaların yapılmasında ayrıca önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında kompleks fenotip sergileyen ve en az iki etkilenmiş metabolik/nörometabolik hastalık sahibi altı aile olmak üzere toplam 29 bireye ait genomik DNA örneği kullanılarak SNP mikroarray yöntemi ile genom boyu genotiplendirme, bağlantı analizi ve genom-analiz yöntemlerinden homozigotluk haritalaması yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, aralarında akraba evliliği olan ve iktiyozis, yürüme bozukluğu, kaba yüz görünümü ve nistagmusu olan bir no'lu ailede hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen genler arasından 19. kromozomda yer alan *MAG* (myelin associated glycoprotein) geni en kuvvetli aday olarak seçilmiştir. Ancak *MAG* geninin 3. ekzonu dışında tüm ekzonları DNA dizi analizi ile incelenmiş ve bu ekzonlarda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. *MAG* genindeki hastalıkla ilişkili mutasyonun 3. ekzonda olmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir. *MAG* geni mutasyonları literatürde otozomal resesif “spastik parapleji, 75” (MIM; 616680) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

MAG geni tarafından kodlanan protein, tip I membran proteindir ve immünoglobulin süperalesinin bir üyesidir. *MAG* proteini, siyalikleşmiş glikokonjugatlara bağlanan ve belirli miyelin-nöron hücre-hücre etkileşimlerine

aracılık eden bir lektindir ve bu proteininin miyelinasyon sürecine dahil olduğu düşünülmektedir.

Aralarında akraba evliliği olmayan, büyüme ve gelişme geriliği, dismorfik bulgular (basık burun kökü, baş-boyun kulaklar düşük), spastisite, hipertelorizm, motor ve mental retardasyon bulguları olan iki no'lu ailede genom boyu homozigotluk haritalaması neticesinde aday gen olarak belirlenen *HIKESHI* (heat shock protein nuclear import factor) geninin ikinci ekzonunda, daha önce literatürde rapor edilmiş p.Val54Leu (c.160 G>C) mutasyonu tespit edilmiştir.

Bu mutasyon ilk kez literatürde 2016 yılında Edvarson ve ark. tarafından (79) erken başlangıçlı spastik parapleji, edinilmiş mikrosefali ve optik atrofi ilişkili yeni bir konjenital lökodistrofi olduğu düşünülen üç farklı aileden Ashkenazi-Yahudisi altı hasta bireyde, homozigot haritalama ve ekzom dizi analizi sonucunda, kurucu (founder) mutasyon olarak bulunmuştur. Ashkenazi-Yahudisi orijinli 1 012 sağlıklı birey genotiplendirilerek mutasyonun taşıyıcılık oranı yaklaşık 1/200 olarak bildirilmiştir. Tanımlanan p.Val54Leu (c.160G>C) mutasyonu literatürde “hipomyelinizan lökodistrofi, 13” (MIM; 616881) fenotipi ile ilişkilendirilmiş ilk ve tek mutasyon olma özelliğini taşımaktadır.

Hasta fibroblastları ile yapılan fonksiyonel deneyler sonucunda bu mutasyonun patojenitesi doğrulanmış ve hastalarda görülen lökodistrofi anormal ısı-şoku stresi (heat-shock stress) yanıtı ile ilişkilendirmiştir. *HIKESHI* geni, ısı-şoku ile indüklenen Hsp70 (heat-shock protein, 70-kd) proteinlerinin çekirdeğe taşınmasına aracılık eden, evrimsel olarak korunmuş nükleer taşıma reseptörünü kodlayan bir gendir. Bu protein sadece Hsp70'in ATP bağlı formunun taşınmasına aracılık etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, Hikeshi proteinin, stres koşulları altında Hsp70 proteinlerinin çekirdeğe girmesi için gerekli olduğu rapor edilmiştir (79, 80).

Makromoleküllerin, nüklear por kompleksleri (NPC) aracılığıyla nükleositoplazmik taşınmasının düzenlenmesi, ökaryotik hücrelerde çeşitli hücresel fonksiyonlar için çok önemlidir. İmportinler, transportinler, eksportinler ve karyoferinler olarak adlandırılan importin β ailesinin üyeleri nükleositoplazmik taşıyıcı moleküllerdir ve çok sayıda seçici nükleositoplazmik protein taşınmasına aracılık etmektedirler (79, 81, 82, 83). Mayadan insana kadar korunmuş Hikeshi

proteini ise iyi-karakterize edilmiş importin beta ailesinin bir üyesi olmayıp, özgün bir nükleer taşıyıcı proteindir (79).

Isı şoku ve oksidatif stres gibi stresler importin β ailesi aracılı yolların down-regülasyonunu indükleyerek stres koşulları altında normal çalışmasını önlemektedir (79, 84, 85). Hikeshi proteininin önemi tamda bu stres koşulu altında anlaşılmaktadır. Isı şokuna cevaben Hsp70 proteinleri hızlı ve anlık olarak sitoplazmadan çekirdeğe ve nukleusa taşınmaktadır (79, 86). Çekirdeğin içinde, Hsp70, Hikeshi'den ayrılıp, natif ve natif olmayan proteinlere bağlanarak moleküler şaperon olarak işlev görmektedir ve hücreleri ısı şoku hasarından korumaktadır (79, 87). Buna uyumlu bir şekilde, Hikeshi'den yoksun hücrelerin ısı şoku stresi sırasında canlılığının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (80).

Edvarson ve ark. tarafından yapılan yapılan fonksiyonel çalışma sonuçları, *HIKESHI* genindeki homozigot p.V54L mutasyonunun, ısı şoku stresi altında, nükleer Hsp70 proteininin yokluğu ile sonuçlanan Hikeshi protein eksikliği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Lökoensefalopatinin nedeninin çekirdekdeki HSP70 eksikliğinden veya stres esnasında sitoplazmada aşırı birikiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (79).

Lökodistrofiler, değişken periferik sinir sistemi tutulumu ile miyelin oluşumunu veya korunmasını etkileyen beyaz cevher bozukluklarıdır. Yeni nesil dizileme tekniği ile artan tanı oranlarına rağmen, hastaların yaklaşık yarısında lökodistrofilerin genetik nedeni bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında iki nolu ailede hastalıktan sorumlu *HIKESHI* geninde tanımlanan p.V54L mutasyonu Türk hastalarda tanımlanan ilk mutasyon, literatürde ise bildirilen ikinci mutasyon olma özelliği taşımaktadır.

Akraba evliliği yapmış, yürüyememe, konuşamama, dismorfik bulguları (dar alın) olan ve serebellar atrofi, mikrosefali, ağır motor ve mental retardasyon, şiddetli hareket bozukluğu olan üç no'lu ailede *CLN8* (ceroid lipofuscinosis, neuronal,8) geninde yapılan mutasyon taraması sonucunda hasta bireylerde genin birinci ekzonunun 221. pozisyonundaki guanin nükleotidinin adenin nükleotidine (c.221 G>A) dönüşmesi, sonucunda 74. kodonda glisin amino asitinin yerine aspartat amino asitinin (p.G74D) olduğu saptanmıştır. Bu mutasyon, farklı veritabanlarında (ExAc,

1000 genome) bildirilmemiş, ilk kez bu çalışmada rapor edilmiş yeni bir mutasyondur. Bu mutasyonun protein üzerindeki patojenik etkisini belirlemek için PolyPhen ve Mutation Taster in-silico tahminleme programları kullanılmış ve p.G74D varyasyonun etkisi, her iki programda “muhtemel patojenik” olarak analiz edilmiştir. *CLN8* genindeki mutasyonlar literatürde otozomal resesif “seroid lipofusinoz, nöronal, 8” (MIM; 600143) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

Nöronal seroid lipofusinozlar (NCL’ler), tipik olarak otofloresan lipopigment seroid’in beyin ve diğer dokularda birikmesi ile karakterize olan klinik ve genetik olarak heterojen nörodejeneratif lizozomal bozukluklardır. Bugüne kadar, farklı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan 14 farklı NCL alt tipi (CLN1 - CLN14) tanımlanmıştır (88, 89, 90).

Nöronal seroid lipofusinozlar genellikle çocukluk ve ergenlik döneminde ve çok nadiren genç erişkinlik döneminde görülmektedir. Bu heterojen bozukluklar, görme kaybı, epilepsi, demans gibi benzer semptomları ve belirtileri paylaşmaktadır. Nöronal seroid lipofusinozların patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte hücre içi depolama süreci ve ilerleyici sinir hücre kaybını içermektedir (89). Nöronal seroid lipofusinozların çoğunluğu şu anda tedavi edilebilir değildir ve genellikle erken ölüme yol açmaktadır (89, 91, 92).

CLN8 formu ilk olarak Finlandiya’da Kuzey epilepsi (Northern epilepsy, NE) sendromu olarak da bilinen mental retardasyonlu progresif epilepsi olarak tanımlanmıştır (93). Daha sonraki çalışmalar ile, Fin kuzey epilepsisinden farklı olarak Türk, İtalyan ve Pakistanlı hastalarda geç infantil varyant NCL (vLINC) fenotipi tanımlanmıştır (89, 94, 95, 96, 97).

Son olarak geç infantil NCL fenotipi ile ilişkilendirilmiş yeni bir *CLN8* mutasyonu Japon bir hastada rapor edilmiştir (88).

CLN8 geni, endoplazmik retikulumda yerleşim gösteren 286 amino asitlik bir zar proteinini kodlamaktadır (89, 98, 99). Nöronlarında dahil olduğu polarize hücrelerde de ER dışında bir yerleşiminin olduğu tahmin edilmektedir (100).

Her ne kadar protein fonksiyonu büyük oranda bilinmese de CLN8, lipit-tanımaya domeynleri içeren TLC (TRAM-LAG1-CLN8) protein ailesinin bir üyesidir

(101). TLC proteinleri lipid regülasyonunda lipid-tanıma, sentez ve transport gibi farklı rollerde görev alan proteinlerdir. Bu nedenle, bu NCL formunun lipid biyosentezinde veya taşınmasındaki bozukluklar sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (89).

Bu çalışmada *CLN8* geninde tespit edilen ve in-siliko tahminleme programları ile muhtemel patojenik olarak öngörülen ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bölgedeki p.G74D yanlış anlamlı varyasyon proteini, TLC domeyni içerisindeki bölgede yer almaktadır. Bu nedenle bu mutasyonun protein konformasyonunu etkileyerek lipid düzenlemesinde bir bozukluğa neden olabileceği düşünülmektedir.

Aralarında akraba evliliği olan ve zeka geriliği, retinopati, motor ve mental retardasyon, serebellar atrofi, ayak deformitesi, konuşma ve yürüme bozukluğu ve dismorfik bulgulara (kaba yüz) sahip dört no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *SNX14* (sorting nexin 14) geninin DNA dizi analizi sonucunda hasta bireylerde, daha önce literatürde bildirilmiş homozigot c.1108+1181_2108-2342del mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyona genin 12. intronu ve 21. intronu arasındaki bölgeyi kapsayan 25 640 bazlık büyük bir delesyon neden olmaktadır (102). *SNX14* gen mutasyonları literatürde “spinoserebellar ataksi, otozomal resesif 20” (MIM; 616354) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (103).

Thomas ve ark. (102) tarafından yapılan çalışmada, homozigot haritalama ve ekzom dizi analizi yöntemi ile aralarında akrabalık olan Türk bir ailede bildirilen bu delesyonun, intron 12 ve 21'de bulunan iki Alu tekrar dizisi arasındaki hatalı rekombinasyon sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Alu tekrar dizileri insan genomunda en yaygın bulunan tekrar dizilerindendir ve 300 baz çiftlik tekrar dizilerinden oluşmaktadır. İnsan genomu içinde en az 500 000 Alu dizisi bulunmaktadır.

Thomas ve ark. (102) tarafından yapılan çalışmada, *SNX14* gen mutasyonları serebellar atrofi ve zihinsel yetersizlik sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Zihinsel yetersizlik ve serebellar atrofi, çok sayıda genetik koşulla bir araya gelmekte ve sıklıkla mikrosefali ve / veya epilepsi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca bu hastalıklar klinik ve genetik olarak heterojen nörolojik bozukluklardır (102). Çocukluk

çağındaki zihinsel yetersizlik sendromu ile ilişkili serebellar hastalığın sınıflandırılması ve tanısall yaklaşımı karmaşık ve oldukça zordur. Genellikle nöroradyolojik ve diğerklinik bulguların dikkatli bir şekilde tanımlanmasına ve değerkendirilmesine bağılıdır (102, 104, 105, 106, 107).

SNX14 proteini sorting nexin ailesinin bir üyesidir. Phox (PX) fosfoinositid bağlama domeynine sahip bu ailenin üyeleri hücre içi trafikte rol oynamaktadır. SNX14 proteini ayrıca bir G protein sinyal düzenleme (RGS) domeynine sahiptir. G protein sinyal düzenleme ailesinin üyeleri düzenleyici moleküllerdir ve heterotrimerik G proteinlerinin G alfa alt birimleri için GTPaz aktive edici proteinler olarak işlev görmektedir. *SNX14*, normal nöronal uyarılabilirlik ve sinaptik iletimin korunmasında rol oynamaktadır. Ayrıca *SNX14*'ün hücressel protein metabolizmasında ve vezikül-aracılı transportta yer alan genlerle birlikte ifade edildiğı tahmin edilmektedir (102).

Daha önce literatürde bildirilen *SNX14* genindeki bu homozigot c.1108+1181_2108-2342del mutasyon için Thomas ve ark. (102) tarafından yapılan çalışmada, hasta fibroblastalarının cDNA'ları DNA dizi analizi ile incelendiğinde, ekzon 12 ve ekzon 22 arasında in-frame bir splicing olduğu doğrulanmış ve RGS ve PX domeynlerini içine alan 334 amino asitlik (p.Val369_Leu702del) bir bölgenin delesyona uğradığı gösterilmiştir. Bu delesyon direk olarak hem PX hem de RGS domeynini etkilediğinden SNX14 proteinin normal hücressel fonksiyonunun kaybolduğı düşünölmektedir.

PX domeyni, çeşitli organellerin sitoplazmik uzantılar üzerindeki fosfoinositidlere (PtdIns3P) bağlanarak, endozomal sorting ve hücre trafiğı dahil olmak üzere farklı PX domeyn içeren proteinlerin farklı hücressel yerleşimlerini ve fonksiyonlarını belirlemektedir (102, 108).

RGX domeyni, G-protein aracılı reseptörlerin (GPCR) G-alfa_s (Gα_s) alt ünitesine bağlanıp, GTPaz aktivitesini artırmaktadır. PX domeyni aracılığıyla, bu aktivitenin endozomlarda meydana gelebileceğı protein sorting ve degradasyon yolu ile G-alfa_s sinyalinin zayıflamasına yol açabileceğı öngörölmüşür (102, 109, 110).

Bu çalışmalarla, SNX14'ün endozomal sorting'deki ve protein yıkımının düzenlenmesindeki rolü son zamanlarda yapılan prenatal insan beyni transkriptom

analizleri ile desteklenmiştir (102, 111).

Sinaptik disfonksiyonun, zihinsel yetersizlik ile ilişkili nörogelişimsel bozuklukları kapsadığı bilinmektedir (102, 112) ve bunun *SNX14* mutasyonlarının patogenezinin altında yatan neden olabileceği düşünülmektedir. *SNX14*'ün, nöral gelişim ve fonksiyonda, özellikle de beyincik gelişimi ve olgunlaşmasında oldukça önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (102).

Aralarında akrabalık olmayan ve kas tutulumu, santral sinir sistemi tutulumu, mitokondri disfonksiyonu ve laktik asit yüksekliği olan beş no'lu ailede hastalıkla ilişkili olarak tanımlanmış genler arasından birinci kromozomda yer alan *COA7* (cytochrome C oxidase assembly factor 7) geni en kuvvetli aday olarak seçilmiştir. *COA7* geninin tüm ekzonları DNA dizi analizi ile incelenmiş ancak bu ekzonlarda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. *COA7* geni literatürde otozomal resesif “spinoserebellar ataksi, aksonal nöropati 3” (MIM: 618387) ile ilişkilendirilmiştir. *COA7* geni, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I ve IV'ün biraraya gelmesinde rol oynamaktadır.

Hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen diğer ikinci kuvvetli aday gen ise, *PDHB* genidir. *PDHB* gen mutasyonları literatürde “piruvat dehidrojenaz E1-beta eksikliği” (MIM: 614111) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Beş no'lu ailede hastaların klinik özellikleri göz önüne alındığında üçüncü kromozomdaki küçük homozigot bölge içinde yer alan *PDHB* geninin hastalıkla bağlantılı olabileceği muhtemeldir.

Aralarında akraba evliliği olan ve pontoserebellar hipoplazi, 3-metil glutakonik asidüri, laktik asit ve pürivik asit yüksekliği, motor ve mental retardasyon, dismorfik bulgular, mikrosefali, lipid miyopatisi, hipertrofik kardiyomiyopati bulguları olan altı no'lu ailede hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen *C19orf70* (*QILI*) geninin DNA dizi analizi sonucunda hasta bireylerde genin üçüncü ekzonunun akseptör splay bölgesinde literatürde daha önce tanımlanmış homozigot IVS3-2A>G splay mutasyonu saptanmıştır. *QILI* genindeki mutasyonlar literatürde “kombine oksidatif fosforilasyon eksikliği, 37” (MIM: 618329) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Gödiker ve ark. (113) tarafından yapılan çalışmada *QIL1* proteinini kodlayan *C19orf70* genindeki IVS3-2A>G mutasyonunun psikomotor retardasyon ile uyumlu ağır mitokondriyal ensefelopati,

hepatopati ve laktik asidoza neden olduğu bildirilmiştir ve bu çalışmadaki hastalarla altı nolu ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları oldukça benzerlik göstermektedir.

C19orf70 geninin üçüncü intronundaki IVS3-2A>G (c.260-2A>G) mutasyonu, dördüncü ekzonun akseptör splaysing bölgesini etkilemekte ve anormal splaysing oluşumuna neden olmaktadır. Hasta fibroblastlarından elde edilen cDNA'larının dizi analizi sonucunda alternatif splays bölgelerinin oluşması sonucu dördüncü ekzonda iki adet anormal ve kısalmış splays ürünü oluşmaktadır. Bunlardan birinci splays transkripti, ekzon dörtte 21 baz çiftinin eksilerek yedi amino asitin kaybı sonucu oluşan bir transkriptir. Diğer splays transkripti ise 44 baz çiftinin silinerek çerçeve kayması sonucu dur kodonu (G87Gfs*18) oluşturan transkriptir (113).

Mitokondriyal bağlantı bölgesi ve krista organizasyon sistemi (MICOS), mitokondriyal zar yapısını dinamik olarak düzenleyen yaklaşık 700 kD'luk bir komplekstir. *MICOS13* olarakta bilinen *QILI* (*C19orf70*) geni, krista bağlantı noktalarında mitokondriyal iç membranda yerleşim gösteren ve krista bağlantı bütünlüğü, krista morfolojisi ve mitokondriyal fonksiyon için gerekli olan MICOS alt ünitesini kodlamaktadır.

İç membran, krista membranı ve dış membrandan oluşan mitokondri yapısı mitokondriyal fonksiyon için oldukça önemlidir. Mitokondri hücre içinde dinamik bir yapıya sahiptir ve oldukça organize bir iç membran yapısından oluşmaktadır. Anormal krista yapıları normal mitokondriyal fizyolojiyi bozmakta ve bu da birçok nörodejeneratif hastalığa neden olmaktadır (113, 114, 115, 116, 117).

Son yıllarda keşfedilen ve mayadan insana kadar tüm organizmalarda yüksek oranda korunmuş krista bağlantılarında zenginleşen "Mitokondriyal Bağlantı Bölgesi ve Krista Organizasyon Sistemi" (MICOS) adı verilen ve iç membran yapısına dahil olan bir protein kompleksinin (113, 116, 118, 119) krista bağlantılarının oluşmasına ve/veya stabilize edilmesine, mitokondri içindeki kristaların yerleşim, dağılım ve kopya sayısının belirlenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca MICOS iç membran ve dış membran ile bağlantı kurarak mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçlerine de dahil olmaktadır (113, 116, 118, 119, 120, 121).

MICOS kompleks proteinlerinden biri olan QIL1 proteini, alt komplekslerin bir araya gelmesi ve bağlantısı için vazgeçilmez bir rol oynamaktadır ve MICOS stabilitesi için çok önemlidir. QIL1 protein yapısının bozulması ile krista bağlantı yapıları kaybolarak MICOS kompleks yapısı bozulmaktadır (113).

Bu tez çalışması sonucunda genomboyu genotiplendirme ve homozigotluk haritalaması yöntemleri kullanılarak kompleks fenotip sergileyen ve nadir metabolik/nörometabolik hastalık sahibi ailelerde hastalıkla bağlantılı olduğu düşünülen genler saptanmış ve ilgili genlerde DNA dizi analizi sonucunda daha önce literatürde rapor edilmemiş *CLN8* geninde yeni bir mutasyon, *HIKESHI*, *SNX14* ve *C19orf70* genlerinde ise daha önce rapor edilmiş üç mutasyon bulunmuştur. Mutasyonların bulunduğu genlerin hepsi literatürde son birkaç yılda tanımlanmış ve nadir görülen metabolik/nörometabolik hastalıklardan sorumlu genlerdir. Ayrıca bu sonuçlar çalışmada kullanılan 250K çözünürlükteki SNP Array metodunun etkin bir yöntem olduğunu göstermekte olup daha yüksek bir genotiplendirmeye ihtiyaç duyulmadan özellikle etkilenmiş bir ya da iki hasta bireyin olduğu çekirdek ailelerde bile hastalıktan sorumlu genlerin bulunması mümkün olmuştur. Bu çalışma sonunda bazı hastalarda tespit edilen hastalıktan sorumlu genler ve patojenik mutasyonlar literatürde bilinen bir klinik fenotip ile ilişkilendirilmiş olmasına karşın bu hastalıklar nadir hastalıklar grubu içerisinde yer almaktadır.

Bu çalışma genom boyu genotiplendirme metodu olan SNP mikroarray yöntemi kullanılarak, daha önce tanısı konulamayan nadir genetik hastalıkların moleküler temelini aydınlatılması bakımından önemlidir. Çocuk sahibi olmak isteyen ailelere genetik danışmanlık verilmesi için hastalığın moleküler patolojisinin belirlenmesi önemli olup, hastalıkla ilgili genlerin saptanması erken tanı ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesini kolaylaştıracaktır. Nadir hastalık tanısı ile başvuran ailelerin moleküler tanı almaları, gelecekte yeni keşfedilen hastalıklar, genetik varyantlar ve diğer hasta grupları ile ilişkilendirilmesine yardımcı olarak hastalık fenotiplerinin daha kolay aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda SNP mikroarray metodu ile tanı alamamış nadir metabolik/nörometabolik hastalık sahibi ailelerde genom-boyu homozigotluk haritalaması ve bağlantı analizi yapılarak hastalıktan sorumlu olan genler ve hastalık nedeni olan moleküler patolojiyi belirlemeye yönelik ilk adım olan mutasyon saptanması başarılı bir şekilde tamamlanarak, hastalığa özgü genotip-fenotip ilişkisi kurulabilmiştir.

Mikroarray, tüm genom-ekzom dizi analizi gibi ileri düzey ve yüksek ölçekli genetik metodlar, tek başına bilinmeyen metabolik/nörometabolik hastalıkların moleküler patolojisinin tanımlanmasında yeterli olmayıp, vakaların ve ailelerin yüksek teknoloji içeren gen analizleri için aday olup olmadığının belirlenmesinde ayrıntılı klinik ve laboratuvar (biyokimya, analitik kimya, enzim, genetik analizler,elektrofizyolojik,...) çalışmaları önemli olup, mutlaka yapılması önerilmektedir. Bu konuda ilgili klinisyenlerin ve temel bilimlerdeki araştırmacıların multidisipliner bir çalışma içinde olması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma, ülkemiz için önemli bir sağlık sorunu olan metabolik/nörometabolik hastalıkların genetik temelini araştırılmasını hedeflemiştir. Bu hastalıklar tek tek ele alındığında az sayıda olmasına karşın toplu olarak değerlendirildiğinde gerek sayı gerekse tedavi hizmetleri alanında topluma ekonomik, sosyal ve sağlık alanında önemli ölçüde bir yük getirmektedir. Literatürde her 800 ile 5 000 yeni doğandan birisinin herhangi bir metabolik/nörometabolik hastalıklı olarak doğduğu rapor edilmektedir. Bu hastalıklar ağır mortalite ve morbidite yüküne sahiptir. Bu nedenle bu tür hastalar, genelde mevcut sağlık sistemi içerisinde tanı konulamadığı için bir süre sonra göz ardı edilmekte ve bu hastalıklara sahip olan aileler ve tanı alamayan bireyler umutsuz bir şekilde toplumdan izole edilmektedirler. Bu hastalıkların genetik patolojilerinin aydınlatılması sağlık sistemi içerisinde farkındalık yaratarak yeni hastaların daha erken dönemde tanımlanmasını ve tedavi altına alınmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Coskun T. Tanısal Yaklaşım İlkeleri. İçinde: Coşkun T, Yurdakök M (editör). *Yenidoğanda Kalıtsal Metabolik Hastalıklar*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2014: 29-30.
2. Rao AN, Kavitha J, Koch M, Suresh Kumar V. Inborn errors of metabolism: review and data from a tertiary care center, *Indian J. Clin. Biochem.*, 2009, 24: 215-222.
3. Weiner DL. Inborn errors of metabolism. <http://emedicine.medscape.com/article/804757-overview>. 29 Ekim 2013.
4. Low LCK. Inborn errors of metabolism: clinical approach and management, *Hong Kong Med. J.*, 1996, 2: 274-281.
5. Leonard JV, Morris AAM. Inborn errors of metabolism around time of birth, *Lancet*, 2000, 356: 583-587.
6. Ozalp I, Coşkun T, Tokatli A, Kalkanoğlu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Özgüç M, Köse R. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future, *Turk J. Pediatr.*, 2001, 43(2): 97-101.
7. Hacettepe Nüfus Etütleri Enstitüsü. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması. <http://www.hips.hacettepe.edu.tr/TNSA2008-AnaRapor.pdf>. 2008.
8. Banka S, Newman WG, Özgül RK, Dursun A. Mutations in the G6PC3 gene cause Dursun syndrome, *Am. J. Med. Genet. A.*, 2010, 152(10): 2609-2611.
9. Dündar H, Özgül RK, Yalnızoglu D, Erdem S, Oğuz KK, Tuncel D, Temucin CM, Dursun A. Identification of a novel Twinkle mutation in a family with infantile onset spinocerebellar ataxia by whole exome sequencing, *Pediatr. Neurol.*, 2012, 46(3): 172-177.
10. Dursun A, Yalnızoglu D, Gerdan OF, Yucel-Yilmaz D, Sagioglu MS, Yuksel B, Gucer S, Sivri S, Özgül RK. A probable new syndrome with the storage disease phenotype caused by the VPS33A gene mutation, *Clin. Dysmorphol.*, 2017, 26(1): 1-
11. Garrod A. The Croonian lectures on inborn errors of metabolism, lecture II: alkaptonuria, *Lancet*, 1908, 2: 73-79.
12. Raghuveer TS, Garg U, Graf WD. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update, *Am. Fam. Physician*, 2006, 73: 1981-1990.
13. Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview, *Sao Paulo Med. J.*, 1999, 117: 251-265.

14. Therrell Jr. BL, Lloyd-Puryear MA, Camp KM, Mann MY. Inborn errors of metabolism identified via newborn screening: ten-year incidence data and costs of nutritional interventions for research agenda planning, *Mol. Genet. Metab.*, 2014, 113: 14–26.
15. Tezel B, Dilli D, Bolat H, Sahman H, Ozba S, Acıcan D, Ertek M, Koşse MR, Dilmen U. The development and organization of newborn screening programs in Turkey, *J. Clin. Lab. Anal.*, 2014, 28:63–69.
16. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2006, 29: 261–274.
17. Ezgu F. Inborn Errors of Metabolism. In: Makowski GS (eds.). *Advances in Clinical Chemistry*, 1 st ed. USA, Academic Press, 2017: 196-251.
18. Zschoche J. Disorders of Intermediary Metabolism. In: Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL (eds). *Inherited Metabolic Disease*, 1 st ed. Berlin, Springer, 2010: 3-6.
19. Leonard JC, Morris AA, Inborn errors of metabolism around time of birth, *Lancet*, 2000, 12(356): 583–587.
20. Dursun A. Yağ Asidi Oksidasyon Bozuklukları. İçinde: Coşkun T, Yurdakök M (editör). *Yenidoğanda Kalıtsal Metabolik Hastalıklar*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2014, 9: 123-133.
21. Zschoche J. Disorders of Intermediary Metabolism. In: Hoffmann GF, Nyhan WL (eds). *Inherited Metabolic Disease*, 1 st ed. Berlin, Springer, 2010: 7-9.
22. Dursun A. Peroksizomal Bozukluklar. İçinde: Coşkun T, Yurdakök M (editör). *Yenidoğanda Kalıtsal Metabolik Hastalıklar*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2014, 8: 115-122.
23. Chakrapani A, Cleary MA, Wraith JE. Detection of inborn errors of metabolism in the newborn, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2001, 84: F205–F210.
24. Barends M, Pitt J, Morrissy S, Tzanakos N, Boneh A. Newborn Screening Laboratory Staff, Biochemical and molecular characteristics of patients with organic acidaemias and urea cycle disorders identified through newborn screening, *Mol. Genet. Metab.*, 2014, 113: 46–52.
25. Valayannopoulos V, Poll-The BT. Diagnostic work-up in acute conditions of inborn errors of metabolism and storage diseases, *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, 113: 1553–1562.
26. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2006, 29: 261–274.
27. Sirrs SM, Lehman A, Stockler S, van Karnebeek CD. Treatable inborn errors of metabolism causing neurological symptoms in adults, *Mol. Genet. Metab.*, 2013, 110: 431–438.

28. Champion MP. An approach to the diagnosis of inherited metabolic disease, *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.*, 2010, 95: 40–46.
29. Baumgartner MR, Hoërster F, Dionisi-Vici C, Haliloglu G, Karall D, Chapman KA, Huemer M, Hochuli M, Assoun M, Ballhausen D, Burlina A, Fowler B, Grünert SC, Grünewald S, Honzik T, Merinero B, Perez-Cerdá C, Scholl-Bürgi S, Skovby F, Wijburg F, MacDonald A, Martinelli D, Sass JO, Valayannopoulos V, Chakrapani A, Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia, *Orphanet J. Rare Dis.*, 2014, 2: 130.
30. Duenas AM, Juan MC, Seuma ARP, Vilas D, Ispuerto L, Morais S, Sequeiros J, Alonso I, Volpini V, Munuera CS, Morell GP, Alvarez R, Sanchez I. Rare Neurodegenerative Diseases: Clinical and Genetic Update. In: Paz MP, Taruscio D, Groft SC (eds). *Rare Diseases Epidemiology: Update and Overview*, 2 nd ed. Switzerland, Springer, 2017: 444-445.
31. Gahl WA, Adams DR, Markello TC, Boerkoel NF, Tifft CJ. Genetic Approaches to Rare and Undiagnosed Diseases. In: Kliegman RM, Stanton BMD, St. Geme J, Schor NF (eds). *Textbook of Pediatrics*, 20 th ed. Canada, Nelson, 2015: 629-630.
32. Griffiths G, Anthony JF, Miller M, Jeffrey H, Suzuki, David T, Lewontin RC, and Gelbart WM. Eukaryotic Chromosome Mapping by Recombination. In: Freeman WH (eds). *An Introduction to Genetic Analysis*, 8 th ed. New York, Freeman&Company, W.H ,2000: 115-150.
33. Kong X, Murphy K, Raj T, et al. A combined linkage-physical map of the human genome, *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, 75: 1143-1148.
34. Boyacıoğlu SÖ, Dündar M. Gen haritalama stratejileri, *Sağlık Bilimleri Dergisi (J.Health Scie.)*, 2012, 21(1): 50-60.
35. Medicine Encyclopedia. History of genetic mapping. [http:// medicine. jrank. org/ pages/2486/Mapping-History-Genetic-Mapping.html](http://medicine.jrank.org/pages/2486/Mapping-History-Genetic-Mapping.html). 14.10.2010.
36. Akarsu N, Lülecı G. Gen haritalaması: ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl yorumlanıyor?, *Dokuz Eylül Tıp Dergisi (İnsan Genom Projesi- Özel Sayı)*, 2002, 29-39.
37. Teama S. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In: Liu Y (eds). *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*, 1 st ed. China, IntechOpen, 2018: 25-40.
38. Sezer A. Ilıman iklim meyve türlerinde çeşit ve tiplerinin moleküler tekniklerle karakterizasyonu. [http:// slideplayer. biz. tr/ slide/ 2970341/](http://slideplayer.biz.tr/slide/2970341/). 2008.
39. Blanco A, Blanco G. Genetic Information. In: Blanco A, Blanco G (eds). *Medical Biochemistry*, 1 st ed. Argentina, Academic Press, 2017: 465-492.
40. Nature. SNP. [https:// www. nature. com/ scitable/ definition/ single-nucleotide-polymorphism-snp-295](https://www.nature.com/scitable/definition/single-nucleotide-polymorphism-snp-295). 2014.

41. Bioviva Science. Mapping your health through SNPs: your unique qr code. <https://bioviva-science.com/blog/mapping-your-health-through-snps-your-unique-qr-code>. 14 Kasım 2018.
42. Bumgarner R. Overview of DNAmicroarrays: types, applications, and their future, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2013, 101: 22.1.1.-22.1.11.
43. Dufva M. Introduction to Microarray Technology. In: Dufva M (eds). *DNA Microarrays For Biomedical Research: Methods and Protocols*, 1 st ed. U.S.A, Humana Press, 2009: 1-22.
44. von Nickisch-Rosenegk M, Ehrentreich-Förster E, Reiss E., Henkel J, Strehlow R. and Andresen D. DNA microarrays, *Advances in Biochem. Engineering/ Biotechno.*, 2008, 109: 433-453.
45. Bednar M. DNA microarray technology and application, *Med. Sci. Monid.*, 2000, 6(4): 796-800.
46. Sobrino B, Brión M and Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, *Forensic Scien. Internat.*, 2005, 154: 189-194.
47. Bal SH, Budak F. Mikroarray teknolojisi, *Uludağ Üni. Tıp Fakül. Der.*, 2012, 38(3): 227-233.
48. Bilitewski U. DNA Microarrays: An Introduction to the Technology. In: Bilitewski U (eds). *Microchip Methods in Diagnostics*, 1 st ed. U.S.A, Humana Press, 2009: 1-14.
49. Nimse SB, Song K, Sonawane MD, Sayyed DR, Kim T. Immobilization techniques for microarray: challenges and applications, *Sensors*, 2014, 14: 22208-22229.
50. Yoltaş A, Karaboz İ. DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları, *Elektronik Mikrobiyo. Dergisi*, 2010, 8(1): 1-19.
51. Lonetti A, Fontana MC, Martinelli G, Iacobucci Ilaria. Single Nucleotide Polymorphisms as Genomic Markers for High-Throughput Pharmacogenomic Studies. In: Li PCH, Sedighi A, Wang L (eds). *Microarray Technology*, 1 st ed. Canada, Humana Press, 2016: 143-159.
52. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes, *Nature*, 2012, 491(7422): 56-65.
53. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, 409(6822): 928–933.
54. Scott SA. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics, *Genet. Med.*, 2011, 13(12): 987–995.

55. Iacobucci I, Lonetti A, Candoni A, Sazzini M, Papayannidis C, Formica S et al. Profiling of drug-metabolizing enzymes/transporters in CD33+ acute myeloid leukemia patients treated with Gemtuzumab-Ozogamicin and Fludarabine, Cytarabine and Idarubicin, *Pharmacogenomics J.*, 2013, 13(4): 335–341.
56. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome, *Nature*, 2005, 437(7063): 1299–1319.
57. Lam CW, Lau KC, Tong SF. Microarrays for personalized genomic medicine, *Adv. Clin. Chem.*, 2010, 52: 1-18.
58. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. Global variation in copy number in the human genome, *Nature*, 2006, 444(7118): 444–454.
59. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature*, 2007, 449(7164): 851–861.
60. Sebat J, Lakshmi B , Troge J , Alexander J , Young J, Lundin P , Maner S, Massa H, Walker M, Chi M et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science*, 2004, 305: 525–528.
61. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances, *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 4181-4193.
62. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome, *Nat. Genet.*, 2004, 36: 949–951.
63. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome, *Nat. Rev. Genetics*, 2006, 7: 85–97.
64. Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones KW, Wei W, Stratton MR, Futreal PA, Weber B, Shapero MH, Wooster R. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays, *Genome Research*, 2004, 14: 287–295.
65. Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, Law J, Berntsen T, Chadha M, Hui H, Yang G, Kennedy GC, Webster TA, Cawley S, Walsh E, Jones KW, Fodor SP, Mei R. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays, *Nat. Methods*, 2004, 1: 109-111.
66. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglu T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Scien.*, 1998, 280: 1077-1082.

67. Vahidnezhad H, Youssefian L, Jazayeri A, Uitto J. Research techniques made simple: genome-wide homozygosity/autozygosity mapping is a powerful tool for identifying candidate genes in autosomal recessive genetic diseases, *J. Invest. Dermatol.*, 2018, 138(9): 1893-1900.
68. Affymetrix. GeneChip[®] Human Mapping 500K Array Set. [http:// www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com). 2005-2006.
69. Jiang N, Leach LJ, Hu X, Potokina E, Jia T, Druka A, Waugh R, Kearsey MJ, Luo ZW. Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets, *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 28.
70. Welander J. Alaysis of genetic relatedness using DNA microarrays, *Deparment of Clin. And Experi. Med.*, 2009, 1-49.
71. Lee TI, Johnstone SE, Young RA. Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location, *Nat. Protoc.*, 2006, 1(2): 729-748.
72. New Life Scientific Inc. Affymetrix GeneChip 3000 microarray scanner autoloader oven 640 fluidics 450. [https://www. newlifescientific. com/affymetrix-genechip-3000-scanner-autooader-fluidic-station-400450-oven-640](https://www.newlifescientific.com/affymetrix-genechip-3000-scanner-autooader-fluidic-station-400450-oven-640). 2019.
73. Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, Yigit G, Uyguner O, Candan S, Okur H, Kaygin S, Balci S, Mavili E, Alikasifoglu M, Haase I, Wollnik B, Akarsu NA. ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development, *Hum. Mol. Gen.*, 2009, 18(22): 4357-4366.
74. Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, von Eggeling F, Yilmaz E, Deren O, Posorski N, Ozdag H, Liehr T, Balci S, Alikasifoglu M, Wollnik B, Akarsu NA. Disruption of ALX1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal-recessive ALX-related frontonasal dysplasia, *Am. J. Hum. Genet.*, 2010, 86(5): 789-96.
75. Wertheim-Tysarowska K, Gos M, Sykut-Cegielska J, Bal J. Genetic analysis in inherited metabolic disorders—from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives, *Dev. Period Med.*, 2015, 19(4): 413-431.
76. Pampols T. Inherited metabolic rare disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, 686: 397-431.
77. Yalnızoğlu D, Özgül RK, Oğuz KK, Özer B, Yücel-Yılmaz D, Gürbüz B, Serdaroğlu E, Erol İ, Topçu M, Dursun A. Expanding the phenotype of phospholipid remodeling disease due to MBOAT7 gene defect, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2019, 42(2): 381- 388.

78. Yücel-Yılmaz D, Yücesan E, Yalnızoğlu D, Oğuz KK, Sağıroğlu MŞ, Özbek U, Serdaroğlu E, Bilgiç B, Erdem S, İşeri SAU, Hanağası H, Gürvit H, Özgül RK, Dursun A. Clinical phenotype of hereditary spastic paraplegia due to KIF1C gene mutations across life span, *Brain Dev.*, 2018, 40(6): 458- 464.
79. Edvarson S, Kose S, Jalas C, Fattal-Valevski A, Watanabe A, Ogawa Y, Mamada H, Fedick AM, Ben-Shachar S, Treff NR, Shaag A, Bale S, Gartner J, Imamoto N, Elpeleg O. Leukoencephalopathy and early death associated with an Ashkenazi-Jewish founder mutation in the Hikeshi gene, *J. Med. Genet.*, 2016, 53(2): 132-137.
80. Kose S, Furuta M, Imamoto N. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage, *Cell*, 2012, 149: 578-589.
81. Görlich D., Kutay D. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1999, 15: 607-660.
82. Weis K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle, *Cell*, 2003, 112: 441-451.
83. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle, *Nat. Rev. Moll. Cell Biol.*, 2007, 195-208.
84. Furuta M, Kose S, Koike M, Shimi T, Hiraoka Y, Yoneda Y, Haraguchi T, Imamoto N. Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin alpha, *Genes Cells*, 2004, 9: 429-441.
85. Kodiha M, Chu A, Mtusiewicz N, Stochaj U. Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress, *Cell Death Differ.*, 2004, 11: 862-874.
86. Velazquez JM, Lindquist S. Hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery, *Cell*, 1984, 36: 655-662.
87. Pelham HR. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock, *EMBO J.*, 1984, 3: 3095-3100.
88. Katata Y, Uematsu M, Sato H, Suzuki S, Nakayama T, Kubota Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Saitsu H, Kure S. Novel missense mutation in CLN8 in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: The first report of a CLN8 mutation in Japan, *Brain Dev.*, 2016, 38(3): 341- 345.
89. Cannelli N, Cassandrini D, Bertini E, Striano P, Fusco L, Gaggero R, Specchio N, Biancheri R, Vigeveno F, Bruno C, Simonati A, Zara F, Snatorelli FM. Novel mutations in CLN8 in Italian variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: another genetic hit in the Mediterranean, *Neurogenetics*, 2006, 7: 111-117.
90. Mole SE, Williams RE, Goebel HH. Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses, *Neurogenetics*, 2005, 6: 107-126.

91. Haltia M. The neuronal ceroid-lipofuscinoses, *J. Neuropathol Exp. Neuro.*, 2003, 62: 1-13.
92. Goebel HH, Wisniewski KE. Current state of clinical and morphological features in human NCL, *Brain Pathol.*, 2004, 14: 61- 69.
93. Herva R, Tyynela J, Hirvasniemi A, Syrjakallio-Ylitalo M, Haltia M. Northern epilepsy: a novel form of neuronal ceroid-lipofuscinosis, *Brain Pathol.*, 2000, 10: 215- 222.
94. Vantaggiato C, Radaelli F, Falcone S, Perrotta C, Tonelli A, Bondioni S, et al. A novel CLN8 mutation in late-infantile-onset neuronal ceroid lipofuscinosis (LINCL) reveals aspects of CLN8 neurobiological function, *Hum. Mutat.*, 2009, 30: 1104-1116.
95. Reinhardt K, Grapp M, Schlachter K, Bruck W, Gartner J, Steinfeld R. Novel CLN8 mutations confirm the clinical and ethnic diversity of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Clin. Genet.*, 2010, 77: 79-85.
96. Mahanjah M, Zelnik N. Phenotypic heterogeneity in consan-guineous patients with a common CLN8 mutation, *Pediatr. Neurol.*, 2012, 47: 303-305.
97. Ranta S, Topcu M, Tegellberg S, Tan H, Ustubutun A, Saatci I, et al. Variant late infantile ceroid lipofuscinosis in a subset of Turkish patients is allelic to northern epilepsy, *Hum. Mutat.*, 2004, 23: 300-305.
98. Weimer JM, Kriscenski-Perry E, Elshatory Y, Pearce DA. The neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in different proteins result in similar disease, *Neuromolecular*, 2002, 1: 111-124.
99. Lonka L, Kytala A, Ranta S, Jalanko A, Lehesjoki AE. The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum, *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9: 1691-1697.
100. Lonka L, Salonen T, Siintola E, Kopra O, Lehesjoki AE, Jalanko A. Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells, *J. Neurosci. Res.*, 2004, 76: 862-871.
101. Winter E, Ponting CP. TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains?, *Trends. Biochem. Sci.*, 2002, 27: 381-383.
102. Thomas AC, Williams H, Seto-Salvia N, Bacchelli C, Jenkins D, O'Sullivan M, Mengrelis K, Ishida M, Ocaña L, Chanudet E, James C, Lescai F, Anderson G, Morrogh D, Ryten M, Duncan AJ, Pai YJ, Saraiva JM, Ramos F, Farren B, Saunders D, Vernay B, Gissen P, Straatman-Iwanowska A, Baas F, Wood NW, Hersheson J, Houlden H, Hurst J, Scott R, Bitner-Glindzicz M, Moore GE, Sousa SB, Stainer P. Mutations in SNX14 cause a distinctive autosomal-recessive cerebellar ataxia and intellectual disability syndrome, *Am. J. Hum. Genet.*, 2014, 95(5): 611- 621.

103. Akizu N, Cantagrel V, Zaki MS, Al-Gazali L, Wang X, Rosti RO, Dikoglu E, Gelot AB, Rosti B, Vaux KK, Scott EM, Silhavy JL, Schroth J, Copeland B, Schaffer AE, Gordts PL, Esko JD, Buschman MD, Field SJ, Napolitano G, Abdel-Salam GM, Ozgul RK, Sagiroglu MS, Azam M, Ismail S, Aglan M, Selim L, Mhmoud IG, Abdel-Hadi S, Badawy AE, Sadek AA, Mojahedi F, Kayserili H, Masri A, Bastaki L, Temtamy S, Müller U, Desguerre I, Casanova JL, Dursun A, Gunel M, Gabriel SB, de Lonlay P, Gleeson JG. Biallelic mutations in SNX14 cause a syndromic form of cerebellar atrophy and lysosome-autophagosome dysfunction, *Nat. Genet.*, 2015, 47(5): 528-534.
104. Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, King MC, and Levy-Lahad E. Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene, *Am. J. Hum. Genet.*, 2009, 85: 281–289.
105. D'Arrigo S, Vigano` L, Grazia Bruzzone M, Marzaroli M, Nikas I, Riva D, and Pantaleoni C. Diagnostic approach to cerebellar disease in children, *J. Child Neurol.*, 2005, 20: 859–866.
106. Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N, et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management, *Neurogenetics*, 2010, 11: 1–12.
107. Poretti A, Wolf NI, and Boltshauser E. Differential diagnosis of cerebellar atrophy in childhood, *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2008, 12: 155–167.
108. Teasdale RD, Collins BM. Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease, *Biochem. J.*, 2012, 441: 39-59.
109. Zheng B, Ma YC, Ostrom RS, Lavoie C, Gill GN, Insel PA, Huang XY and Farquhar MG. RGS-PX1, a GAP for GalphaS and sorting nexin in vesicular trafficking, *Science*, 2001, 294: 1939-1942.
110. Zheng B, Lavoie C, Tang TD, Ma P, Meerloo T, Beas A and Farquhar MG. Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by Heterotrimeric Galphas protein, *Mol. Biol. Cell*, 2004, 15: 5538-5550.
111. Miller JA, Ding SL, Sunkin SM, Smith KA, Ng L, Szafer A, Ebbert A, Riley ZL, Royall JJ, Aiona K, et al. Transkriptional landscape of the prenatal human brain, *Nature*, 2014, 508: 199-206.
112. Zoghbi HY, Bear MF. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual diasabilities, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012, 4: a009886.

113. Gödiker J, Grüneberg M, DuChesne I, Reunert J, Rust S, Westermann C, Wada Y, Classen G, Langhans CD, Schlingmann KP, Rodenburg RJ, Pohlmann R, Marquardt T. QIL1-dependent assembly of MICOS complex-lethal mutation in C19ORF70 resulting in liver disease and severe neurological retardation, *J. Hum. Genet.*, 2018, 63(6): 707-716.
114. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health, *Cell*, 2012, 148: 1145-1159.
115. Manella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, 1762: 140-147.
116. Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan M, Pfanner N. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2017, 1864: 737-746.
117. Zick M, Rabl R, Reichert AS. Cristae formation-linking ultra-structure and function of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, 1793: 5-19.
118. Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, et al. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture, *EMBO J.*, 2011, 30: 4356-4370.
119. van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system, *Curr Opin Cell Biol.*, 2016, 41: 33-42.
120. Harner ME, Unger A-K, Geerts WJ, Mari M, Izawa T, Stenger M, et al. An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation, *eLife*, 2016, 5: e18853.
121. Schorr S, van der Laan M. Integrative functions of the mitochondrial contact site and cristae organizing system, *Semin Cell Dev. Biol.*, 2017, https://doi.org/10.1007/8904_2017_48.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 229

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 31 OCAK 2018 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2018/03
Proje No : GO 18/123 (Değerlendirme Tarihi : 31.01.2018)
Karar No : GO 18/123 – 25

Üniversitemiz Çocuk Sağlığı Enstitüsü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Didem Yücel YILMAZ' ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Ali DURSUN, Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL ile birlikte çalışacakları ve Merve EKŞİ' nin yüksek lisans tezi olan, GO 18/123 kayıt numaralı, *"SNP Mikroarray Yöntemi ile Kalıtsal Metabolik Hastalıklardan Sorumlu Genlerin Tanımlanması"* başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurtan AKARSU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BİLİZOĞLU (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| KATILMADI | |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNACI (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGEL (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |

Ek-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Merve EKŞİ
Doğum tarihi	: 21.01.1988
Doğum yeri	: İstanbul
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Aziziye mahallesi Cinnah caddesi 74/7 Çankaya/Ankara
Tel	: 0535-222-88-85
E-mail	: mervebaris88@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Mehmet Niyazi Altuğ Süper Lisesi
Lisans	: 2009-2014 Fatih Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi-Moleküler Biyoloji
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: Intermediate