

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**DUCHENNE TİPİ KAS DİSTROFİSİ (DMD) / BECKER TİPİ KAS
DİSTROFİSİ (BMD) HASTALARINDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ**

ADEM KOCAMAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**






İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Yüksek Lisans Programında Adem KOCAMAN tarafından hazırlanan Duchenne Tipi Kas Distrofisi (DMD) / Becker Tipi Kas Distrofisi (BMD) Hastalarında Genotip Fenotip İlişkisi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

27 / 07 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>				<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA	İÜ	DETAE	Genetik Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	İÜ	CTF	Fizyoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Ü. Bora BARUTÇU	İÜ	CTF	Biyofizik Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. Seval AYDIN	İÜ	CTF	Biyokimya Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Nerses BEBEK	İÜ	İTF	Nöroloji Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Adem Kocaman



İTHAF

Annem'e ithaf ediyorum..

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve deneyler esnasında verdiği bilgiler, akademik kariyerimde bir adım olan yüksek lisans eğitimimin her aşamasında gosterdiği destek, aŐtıđı kapılar iÇin, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel-Őnaltuna'ya,

Bu ŐalıŐmada verdikleri fikirler ve gosterdikleri destek iÇin, Burcu Dursun, HŐlyla Aydoğan, Nihal YiđitbaŐı, Abdullah Őzdemircan'a,

Gosterdikleri anlayıŐ ve destek iÇin tŐm DETAE Genetik Anabilim Dalı ŐalıŐanlarına,

TeŐekkőr eder, ŐŐkranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Müsküler Distrofiler.....	3
2.2. Distrofinopatiler	3
2.2.1. Tarihçe	4
2.2.2. Distrofinin İşlevi ve Anormal Yapısının Sonuçları	4
2.2.3. Duchenne Kas Distrofisi	7
2.2.3.1. Sıklık	7
2.2.3.2. Kalıtım.....	7
2.2.3.3. Klinik Bulgular.....	8
2.2.3.4. Tanı	9
2.2.4. Becker Kas Distrofi.....	14
2.2.5. Distrofinopatilerde Taşıyıcılar	15
2.3. Hastalığın önlenmesi ve Genetik danışma	15
2.4. Tedavi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Gereçler.....	17
3.1.1. Hasta Örnekleri	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	17
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	18

3.1.4. Kullanılan Cihazlar	18
3.1.5. Kullanılan Yazılımlar.....	18
3.1.6. Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler	18
3.2. Yöntemler	19
3.2.1. DNA İzolasyonu	19
3.2.2. MLPA Çalışması.....	20
3.2.2.1. DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyonu.....	20
3.2.2.2. Ligasyon.....	21
3.2.2.3. PZR Çalışması.....	21
3.2.2.4. Kapiler Elektroforez Cihazına Yükleme	22
3.2.2.5. Fragman Analizi.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Genel Özellikler	24
4.1.1. Kontrol Grubu Sonuçları.....	25
4.1.2. Araştırma Grubu Sonuçları	26
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	53
FORMLAR	57
ETİK KURUL KARARI	59
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: MLPA'nın PZR programının tabloda gösterimi.	22
Tablo 4-1: Çalışılan hastalarda PZR ve MLPA sonuçlarının detaylı bir şekilde gösterimi.	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Distrofin proteinin hücre içerisindeki işlevsel yapısı.	5
Şekil 2-2: Distrofin proteinin şematiksel yapısı.	6
Şekil 2-3: Gowers Belirtisi (25 No'lu kaynaktan alıntı).	8
Şekil 2-4: MLPA yönteminin şematiksel anlatımı.	12
Şekil 3-1: MLPA yönteminin Denatürasyon ve Hibridizasyon aşamalarının şematiksel anlatımı.	20
Şekil 3-2: MLPA yönteminin Ligasyon aşamalarının şematiksel anlatımı.	21
Şekil 4-1: 11414, 11424, 11435,11503,11349 ve 11596 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.	25
Şekil 4-2: 117, 1121, 11237, 11273, 11297 ve 11339 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.	25
Şekil 4-3: 11617, 11651, 11658 ve 11670 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.	26
Şekil 4-4: 11718, 11314, 10001, 10002, 11358 ve 10005 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.	26
Şekil 4-5: Olgu 1' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	27
Şekil 4-6: Olgu 1' in P035 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	27
Şekil 4-7: Olgu 2' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	28
Şekil 4-8: Olgu 2' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	28
Şekil 4-9: Olgu 3' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	29
Şekil 4-10: Olgu 3' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	29
Şekil 4-11: Olgu 4' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	30
Şekil 4-12: Olgu 4' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	30
Şekil 4-13: Olgu 5' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	31
Şekil 4-14: Olgu 5' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	31
Şekil 4-15: Olgu 6' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	32
Şekil 4-16: Olgu 6' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	32
Şekil 4-17: Olgu 7' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	33
Şekil 4-18: Olgu 7' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	33
Şekil 4-19: Olgu 8' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	34
Şekil 4-20: Olgu 8' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	34

Şekil 4-21: Olgu 9' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	35
Şekil 4-22: Olgu 9' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	35
Şekil 4-23: Olgu 10' nun P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	36
Şekil 4-24: Olgu 10' nun P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	36
Şekil 4-25: Olgu 11' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	37
Şekil 4-26: Olgu 11' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	37
Şekil 4-27: Olgu 12' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	38
Şekil 4-28: Olgu 12' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	38
Şekil 4-29: Olgu 13' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	39
Şekil 4-30: Olgu 13' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	39
Şekil 4-31: Olgu 14' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	40
Şekil 4-32: Olgu 14' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	40
Şekil 4-33: Olgu 15' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	41
Şekil 4-34: Olgu 15' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	41
Şekil 4-35: Olgu 16' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	42
Şekil 4-36: Olgu 16' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	42
Şekil 4-37: Olgu 17' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	43
Şekil 4-38: Olgu 17' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	43
Şekil 4-39: Olgu 18' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	44
Şekil 4-40: Olgu 18' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	44
Şekil 4-41: Olgu 19' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	45
Şekil 4-42: Olgu 19' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	45
Şekil 4-43: Olgu 20' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	46
Şekil 4-44: Olgu 20' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	46
Şekil 4-45: Olgu 21' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	47
Şekil 4-46: Olgu 21' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	47
Şekil 4-47: Olgu 22' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	48
Şekil 4-48: Olgu 22' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	48
Şekil 4-49: Olgu 23' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	49
Şekil 4-50: Olgu 23' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH: Microarray-based Comparative Genomic Hybridization

BMD: Becker müsküler distrofisi

CNV: Copy Number Variation; Kopya Sayısı Değişiklikleri

DMD: Duchenne müsküler distrofisi

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

FISH: Fluoresan in situ hibridizasyon

LGMD: Kav ak tipi kas distrofisi ("Limb-Girdle müsküler distrofi")

MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification

NLB: Nükleer lizis tamponu

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; tek nükleotid polimorfizmi

TBST: Tris-tuz-tween 20 zeltisi ("Tris-buffered saline Tween 20")

TE: Tris hidroklorür ve sodyum EDTA

XLMR: X'e bağlı mental retardasyon

α : Alfa

β : Beta

ÖZET

Kocaman, Adem. Duchenne Tipi Kas Distrofisi (DMD) / Becker Tipi Kas Distrofisi (BMD) hastalarında genotip fenotip ilişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2011

Duchenne Tipi Kas Distrofisi (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) 3500' de bir görülen, X'e bağlı çekinik kalıtım özelliği gösteren bir tek gen hastalığıdır. Hastalık, distrofin adı verilen ve 79 eksondan oluşan proteini kodlayan genin normal diziliminin bozulmasına neden olan mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar.

Becker Tipi Kas Distrofisi (Becker Muscular Dystrophy, BMD) ise aynı gen bölgesinde bulunmaktadır ve burada meydana gelen mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkar, ancak BMD hastalarında eksik fakat işlevsel bir protein sentezlenir. BMD'de semptomlar daha geç yaşlarda kendini belli eder ve hastalığın seyri (Prognozu) çok daha yavaştır. DMD hastalarında ise sentezlenen protein işlevsizdir ve sistem tarafından tamamen yok edilir.

DMD hastalarının %65'inde görülen delesyon ve %7-10'unda görülen duplikasyonların yaklaşık %70'i ekson 45-55 arasında, yaklaşık %23'ü ise ekson 2 ile 20 arasındadır. Nokta mutasyonları ise gen üzerinde herhangi bir noktada bulunabilirler.

Çalışmamızın amacı DMD/BMD hastalarında detaylı genetik analiz yaparak MLPA yöntemi ile konvansiyonel "multipleks" PCR tanı testlerinin tanı amaçlı kullanım alanlarını belirlemektir.

Anahtar Kelimeler : Duchenne Tipi Kas Distrofisi, Becker Tipi Kas Distrofisi, DMD, BMD, MLPA

ABSTRACT

Kocaman, Adem. Type of Duchenne muscular dystrophy (DMD) / Becker muscular dystrophy (BMD) in patients with genotype phenotype İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Programme. Master Thesis. İstanbul. 2011

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is one of the most common inherited pediatric neuromuscular disorders, affecting 1 in 3500 live male births. It is an X-linked disorder caused by mutations in the DMD gene, one of the largest known human genes covering 2.4 Mb, encoding a 14 –kb mRNA and 8 tissue specific promoters and contains 79 exons.

Mutations leading to a truncated protein cause the severe phenotype of DMD, whereas mutations retaining the mRNA reading frame cause the more mild phenotype of Becker muscular dystrophy (BMD).

Mutations in this large gene generally result in a disturbance of the open reading frame during dystrophin protein production that either leads to the synthesis of a truncated , degraded protein molecule. Approximately 65% of the dystrophin mutations in the DMD gene are the most common intragenic deletions. Point mutations, insertions and nucleotide changes together account 25-30% and duplications account for 5-10% that appears to be evenly distributed throughout the gene.

Our aim in this study is to identify best practice guidelines for genetic diagnostics of DMD/BMD patients using detailed genetic analyses comparing the MLPA and the conventional multiplex PCR methodologies.

Key Words: Duchenne muscular dystrophy , Becker muscular dystrophy, DMD, BMD, MLPA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yüzyıl içerisinde genetik bilimi alanında yaşanan gelişmeler ve insanlık tarihinin en önemli buluşları arasına giren gen haritasının çıkarılması ile bilim dünyasında inanılmaz buluşlara yol açabilecek kapılar aralanmış oldu. Özellikle, informatik alanındaki devrimsel nitelikteki ilerlemelerin genetik alanında işlevsel hale gelmesiyle, yapılan bilimsel çalışmalar hız kazanmıştır.

Günümüzde kalıtsal faktörlerin temelinde nükleik asitler olduğunu ve nükleik asitlerin kalıtsal nitelikleri kuşaktan kuşağa aktarılmasını sağladığını bilmekteyiz. Birçok hastalığın temelinde kalıtsallık olduğu için Genetik bilimi doğrudan sağlık alanına girmiştir.

Genetik bilimi; tıpta bilinmeyenlerin giderek azalmasını ve genetik kökenli hastalıkların tedavisini beraberinde getirecek olan buluşlar ile özünde insan sağlığının korunmasını amaçlamaktadır. Kalıtsal hastalıkların altında yatan mutasyonların belirlenmeye başlanması ile hastalıkların tanısına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır.

Nöroloji biliminin bir kolu olan sinir kas hastalıkları içerisinde yer alan müsküler distrofiler, iskelet kas dokusu tutuluşuna bağlı anormal kas güçsüzlüğü ile karakterize olan bir grup kalıtsal bir hastalıktır. Hastalığın etkilediği kas grubu, kalıtım şekli ve başlama yaşı müsküler distrofileri gruplandırmak için kullanılan kriterlerdir. Kalıtım şekline göre otozomal dominant, otozomal resesif ve X kromozomuna bağlı geçiş gösteren yaklaşık kırk beş müsküler distrofi çeşidi bulunmaktadır (1,2).

Müsküler distrofiler içinde en sık görülen X'e bağlı çekinik kalıtım gösteren Duchenne ve Becker Müsküler Distrofi'leridir (DMD / BMD). Bu hastalıklar distrofin adı verilen 427 kDa'luk distrofin proteinini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (1). Xp21.2 bölgesinde yerleşmiş distrofin geninde meydana gelen delesyon, duplikasyon veya nokta mutasyonları nedeni ile kas dokusunda hücre dışı matriks ve hücre iskeleti arasındaki bağlantıyı sağlayan distrofin proteinin yapısı bozulur ve işlevsel olamaz (2). Duchenne müsküler distrofisi hastalığı çocukluk çağında ortaya çıkmakta olup hastaların iskelet dokusunda distrofin proteini yoktur. Becker müsküler distrofisi hastalarında ise düşük seviyede ve yapısı değişmiş

distrofin proteini bulunur. Duchenne müsküler distrofininin daha geç başlangıçlı ve daha hafif seyreden formudur (3).

Günümüzde teknolojinin sağlık alanına hakim olmasıyla beraber ilerlemelerin hızlanmış olması, bu hasta ve ailelerine mit vermekle beraber hastalığı ortadan kaldıracabilecek kesin bir tedavi yöntemi henüz geliştirilememiştir. Bu noktada koruyucu tedavi yaklaşımlarının önemi ortaya çıkmakta ve hastalığın kalıtsal oluşu ve etkin tedavisinin olmayışı nedeniyle etkilenmiş çocukların ailelerindeki taşıyıcı kadınların belirlenebilmesi önem taşımaktadır.

Duchenne ve Becker Müsküler Distrofileri ile ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmış, gen bölgesi belirlenmiş, mutasyonlar tespit edilmiş, tanı amaçlı moleküler tanı testleri geliştirilmiştir. Mutasyonların PZR yöntemiyle tespit edilmesi bu amaçla kullanılan en yaygın yöntemdir. Fakat PZR ile yapılan analizlerde en sık gözlendiği varsayılan sadece 18-22 eksone bakılabilmekte olup, duplikasyon ve nokta mutasyonları tespit edilememektedir. Ve en nemliside doğum öncesi erken tanı amaçlı taşıyıcılığın tespiti için yetersiz kalmaktadır. Yeni bir yöntem olan MLPA (Multiple ligation Dependent Probe) ile eş zamanlı 45' e yakın hedef dizi amplifikasyonu ile gen delesyon ve duplikasyonlarının tespiti mümkündür. Distrofin geninde ise 79 eksonun incelenmesi ve delesyon tespitinin yanısıra gen duplikasyonları ve kadınlarda taşıyıcılık belirlenmesi mümkün olabilmektedir (4,5,6)

Bu araştırma kapsamında MLPA (Multiple ligation Dependent Probe) metodu ile multipleks PZR metodları birbirleri ile karşılaştırılacak ve MLPA'nın delesyon ve duplikasyon yakalama üstünlüğü belirlenmeye çalışılacaktır. Böylelikle çıkan sonuçların kesinliği ile hastalığın tanısı için daha net veriler elde edilmesi amalanacak. Ayrıca, alışmamızda, hastalarda delesyon, duplikasyon ve nokta mutasyonları ile fenotip arasında yapılacak olan karşılaştırmalar neticesinde ilerleyen zamanlarda yapılması muhtemel olan ekzon atlatma yöntemi için detaylı veriler toplanacaktır. Ve elde edilen sonuçların kıyaslanması ile hastalık ile ilgili yeni bilgilere ulaşılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Müsküler Distrofiler

Müsküler distrofiler, iskelet kas hücrelerinin yıkım ve tamir süreçlerinin sonucunda meydana gelen, ilerleyici kas güçsüzlüğü ve kaybıyla karakterize olmuş kalıtsal bir hastalık grubudur. Bazıları doğumda belirti verip hızla ilerleyerek ölümlerle sonuçlanırken bazıları da yavaş gidişat gösterip geç erişkin döneme kadar belirti vermeyebilir (6). Duchenne müsküler distrofisi (DMD) ve Becker müsküler distrofisi (BMD) bu grup içerisinde yer alır.

Müsküler distrofiler (MD) diğer nöromüsküler hastalıklardan genetik geçişli primer miyopati olması, kas liflerinde dejenerasyon ve ölümün olması ile ayrılırlar (6). Yaş, hastalığın ilerleme hızı, kalıtım şekli, etkilediği kas grubu, genetik sebep ve etkilendiği gen müsküler distrofileri sınıflandırmada kullanılmaktadır (2).

Müsküler distrofileri kalıtsal özelliklerine göre otozomal baskın (OD), otozomal çekinik (OR) ve X'e bağlı çekinik (XR) olarak 3 gruba ayrılır. Ancak bazı hastalıkların birden fazla kalıtım şekli göstermeleri nedeniyle klinik özelliklerine göre iki grupta da incelenebilir (7).

2.2. Distrofinopatiler

Distrofin genindeki mutasyona bağlı olarak gelişirler ve X resesif geçişlidirler. Distrofin geni X kromozomunun kısa kolunun 21 numaralı bandında yerleşmiştir. 79 eksonludur ve insandaki bilinen en büyük gendir. Distrofinopatilerde bu gende delesyon, duplikasyon ve nokta mutasyonu olduğu için distrofin ya hiç üretilmez yada üretimi çok azdır veya bozuktur (8).

Distrofinopatiler, X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösterdiği için erkeklerde görülen bir hastalıktır. Kadınlar hastalığın taşıyıcısı olabilmektedir. Fakat nadir de olsa kadınlarda da kas zaafı görülebilmektedir. Bunun nedenlerinden bir tanesi mutasyonlu distrofin geni taşıyan kadının normal X kromozomunun inaktivasyonudur (3,9). Diğer bir neden ise mutasyonsuz distrofin geni taşıyan X kromozomunun otozomal bir kromozomla translokasyon yapmasıdır. Ayrıca tek X kromozomu taşıyan Turner sendromlu kadınlarda da Duchenne müsküler distrofisi hastalığı görülebilmektedir (10,11).

2.2.1. Tarihçe

Müsküler distrofiler yüzyıllardır bilinmekle birlikte ilk olarak 1852 yılında Meryon tarafından tanımlanmıştır. 1891 yılında ise Erb tarafından kas dokusunda oluşan harabiyetler sonucu meydana gelen bir grup hastayı incelemesi sonucu 'müsküler distrofi' olarak adlandırmıştır. Duchenne tipi müsküler distrofinin tanımlanması ise 1868'de kas hastalarından kas biyopsisi olarak inceleyen Guillame Benjamin Duchenne tarafından yapılmıştır. 1955 yılında ise Becker ve Keiner DMD'ye benzer ancak daha hafif bulguların görüldüğü Becker-Kiener müsküler distrofiyi bildirmişlerdir (12,13).

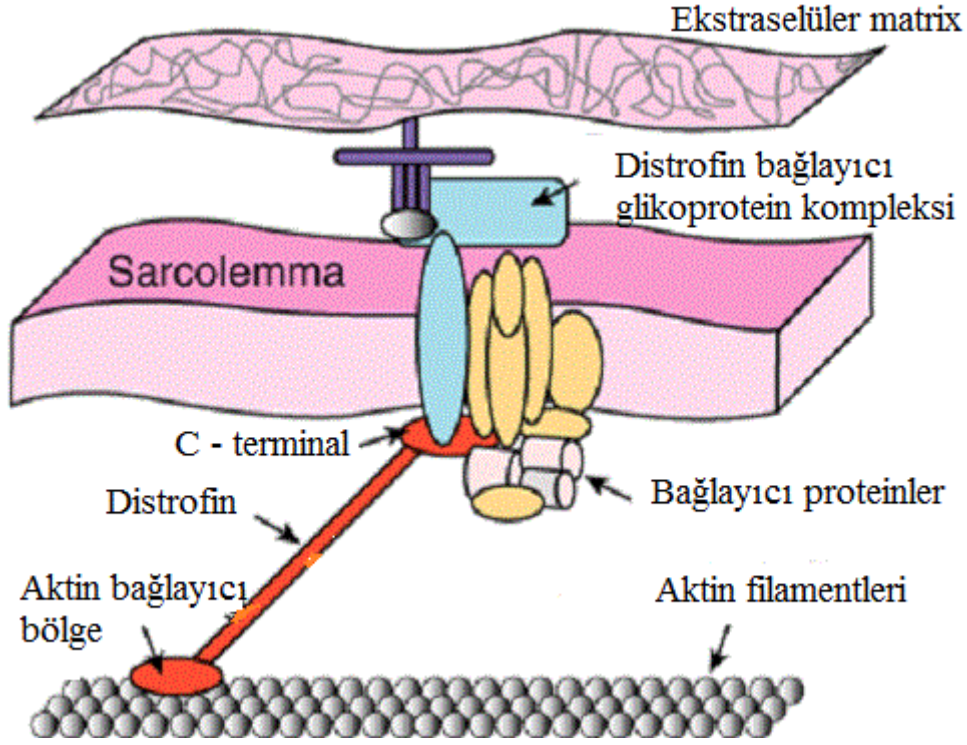
1983 yılında Kingston ve arkadaşları genetikteki gelişmeler neticesinde DMD ve BMD' ye yol açan genin X kromozomunun kısa kolunda (Xp21) yer aldığını bağlantı çalışmaları ile göstermişlerdir. 1986'da Monaco ve arkadaşları Distrofin geninin pozisyonel klonlamasını yapmışlar ve Hoffman ve arkadaşları Distrofin geninin ürünü olan distrofin proteinini 1987'de tanımlamıştır. Distrofin proteininin yapısının tanımlanması ile taşıyıcıların tespiti ve prenatal tanının mümkün olabilirdiği sağlanmıştır (14,15). DMD için kesin bir tedavi yöntemi bulunmamış olmasına rağmen distrofin geni klonlanması sonrasında gen tedavisi ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve günümüzde halen devam etmektedir.

2.2.2. Distrofinin İşlevi ve Anormal Yapısının Sonuçları

Distrofin geni, X kromozomunun p21 bölgesinde yer almaktadır. Bu gen 2.5 Mb uzunluğundadır ve 79 ekson ve 7 dokuya özel promotor içerir (16). Distrofin gen bölgesinden kodlanan 14 kb'lık mRNA, iskelet kasında ağırlıklı olmak üzere kalp kası ve beyinde sentezlenmektedir ve iskelet kas dokusunda 427 kDa'luk distrofin proteinini kodlamaktadır (17).

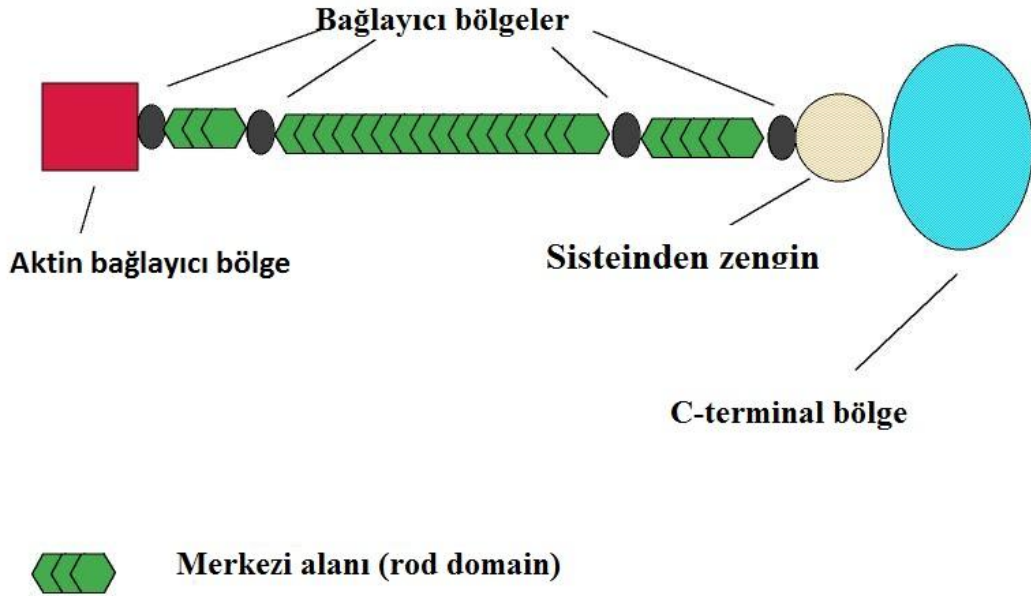
Distrofin, kas hücresi zarı olan sarkolemmannın iç yüzeyindedir ve hücre iskeleti ile hücre dışı alan arasında bağlayıcı öge olarak, sarkolemmannın yapısal bütünlüğünü korur. İskelet kası, kalp kası, vasküler düz kaslar ve beyinde bulunur. İskelet kası ve kalp kasının sarkolemmasının sitoplazmik yüzünde yerleşmiş, glikoproteinlerle birleşik halde (distrofin-glikoprotein kompleks) bulunan ve kas kasılması esnasında yapısal destek sağlayan bir proteindir. Kasta bulunan m-distrofin, beyin ve Purkinje izoformları, kısa distrofin ürünü Dp71, utropin ve distrofin ilişkili protein gibi distrofinin birçok izoformu vardır. Distrofin ayrıca hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun düzenlenmesinde de

rol oynar (18).



Şekil 2-1: Distrofin proteinin hücre içerisindeki işlevsel yapısı.

Distrofin proteini dört bölgeye ayrılmaktadır. Bunlar N-terminal aktin bağlayıcı bölge, rod bölgesi, sisteinden zengin bölge ve C-terminal bölgesidir (17). Protein, bir aktin bağlayan N-uç alanı, bir merkezi alan, bir sisteinden zengin alan ve bir de C-uç alanından oluşur. N-uç alanı alfa aktinle benzerlik gösterir ve 232-240 amino asit içerir. Merkezi alanı (rod domain) spektrine benzer yapıda 25 ikili sarmal tekrar yapar. Sisteinden zengin alan 280 ve C-uç alanı da 420 amino asit içerir (18).



Şekil 2-2: Distrofin proteininin şematiksel yapısı.

DMD ve BMD hastalarının yaklaşık olarak %65'inde distrofin geninde delesyon mutasyonu görülmektedir (17). DMD hastalarında delesyon mutasyonlarından dolayı distrofin geninin açık okuma çerçevesi bozulmaktadır. Bu tip mutasyonlar okuma çerçevesini bölerek, protein sentezini, bitmesi gerekli olan yerden çok önce bitirir. Mutasyonların %92'si bu tiptedir ve fonksiyonel distrofin proteini sentezlenmemektedir. BMD hastalarında ise mutasyon sonucunda distrofin geninin açık okuma çerçevesi korunmaktadır. Mutasyonlar çerçeve içinde kalır ve okuma dizisinde bir değişiklik yaratmazlar. Kodlanması gereken bazı amino asitler yanlış kodlanır ve hatalı bir distrofin molekülü yaparlar. Ancak proteinin amino ve karboksi uçları normaldir (18). Bu tip bir mutasyon, yarı işlevsel bir proteinin sentezine neden olur ve Becker tipi distrofiye yol açar. Fakat fonksiyonları ve yapısı bozulmuş distrofin proteini üretilmektedir.

DMD ve BMD hastalarının %5-10'unda kısmi gen duplikasyonu mutasyonu saptanmıştır. Çerçeve dışı duplikasyon mutasyonları DMD hastalarında, çerçeve içi mutasyonlar ise BMD hastalarında daha sık rastlanmaktadır. Tüm DMD ve BMD

hastalarının 1/3'lük kısmında ise nokta mutasyonu görülmektedir (18).

Tek nükleotit değişimleri, anlamsız (%34), çerçeve kayması (%33), kırılma bölgesinde değişim (%29) ve yanlış anlamlı mutasyonlara neden olarak DMD gen ifadesinde değişimlere ve hatalı protein oluşumuna neden olurlar (19,20).

2.2.3. Duchenne Kas Distrofisi

Duchenne kas distrofisi (DMD) kas distrofileri arasında en sık görülen hastalıktır. Distrofinopatilerin % 85' ini oluşturur ve en şiddetlisidir. Görülme oranı 3500 canlı doğan erkek bebekte birdir (18). Olguların % 90' dan fazlası beş yaş altında erken çocukluk döneminde bulgu verir.

DMD; distrofin genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar sonucunda distrofin geninin kodladığı 427 kDa'luk distrofin adı verilen hücre iskeleti proteininde yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşmaktadır. DMD hastalarının büyük bir çoğunluğunda mutasyonlar nedeniyle distrofin proteini bulunmamaktadır (3).

2.2.3.1. Sıklık

DMD'nin görülme sıklığı yenidoğan erkek çocuklarda 1/3500 olup, kadınlarda taşıyıcılık oranı 1/2500'dür. Görülme sıklığı toplumlara göre farklılık gösterebilmekle birlikte etkin doğum öncesi tanının sonucunda hastalığın görülme sıklığı azalmaktadır.

BMD sıklığı ise net olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık 1/18.000 ile 1/30.000 civarında olabileceği bildirilmiştir (2,16,17).

2.2.3.2. Kalıtım

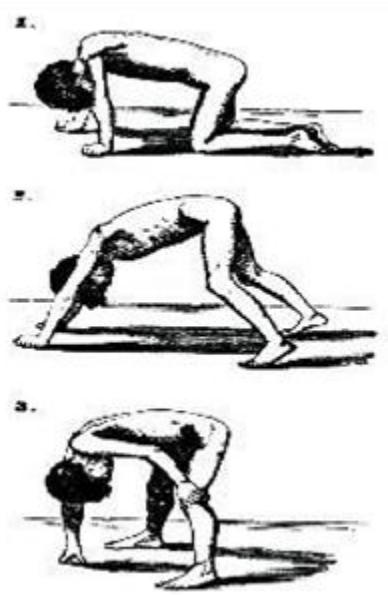
DMD'li olguların %35'u yeni mutasyonlar ile %65'i ise mutant genin taşıyıcı anneden aktarılması sonucu oluşur (3). DMD erkeklerde ölümcül olduğu için taşıdıkları mutant gen bir sonraki kuşağa aktarılamaz ve mutant genlerin 1/3'ü her kuşakta kaybolur. Fakat hasta oranlarında görülme sıklığı değişmediğinden toplumda mutant yerine konulduğu düşünülüp, DMD'li olguların 1/3'ünün yeni mutasyonlar ile oluştuğu kabul edilir. Ve bu duruma Haldane Kuralı denmektedir (19).

BMD'li erkeklerde klinik daha hafif seyrettiği için üretkenlikleri devam eder ve hastalıklı geni kızlarına aktarırlar. Bunun sonucunda, BMD'li olguların büyük çoğunluğu (%90), taşıyıcı anneden erkek çocuğa hastalıklı genin aktarımı ile meydana gelir. Olguların yaklaşık %10'u yeni mutasyon sonucu oluşur (21).

2.2.3.3. Klinik Bulgular

Doğumda ve erken süt çocukluğu döneminde etkilenen erkek çocuklar nadiren semptomatiktir. Kas güçsüzlüğünün ilk bulgusu olarak başı dik tutmada güçlük dikkati çekebilir. Yürüme gecikebileceği gibi genellikle 12 ay civarında başarılabilir. Gluteal kas güçsüzlüğünü dengelemek için çocuk ayakta iken lordotik pozisyonda durur (22).

Olguların % 25'ine iki yaşın altında, % 50' sine 2-4 yaş arasında, % 75'ine 4-7 yaş arasında, % 99 - % 100'üne 7-9 yaşları arasında tanı konulabilmektedir (21,23). 2-5 yaşlarında olan çocuklar yürürken düşmektedirler, basamak çıkmakta zorluk çekmektedirler ve ördekvari yürüyüşleri vardır. Hastaların baldır kaslarında hipertrofi vardır. Proksimal kol ve bacak kaslarında ise güçsüzlük bulunmaktadır ve Gowers belirtisi göstermektedir. Bu belirtide çocuklar yerden kalkarken kendi vücutları üzerinde tırmanarak doğrulamaktadırlar (24). 12 yaş civarına yaklaştığında alt ekstremitte kaslarındaki ve kalça kavşağındaki güçsüzlüğün artması nedeniyle hastalar tekerlekli sandalyeye bağlanmaktadır. Zamanla kollardaki reflekslerin yitilmesi, bardak tutma ve yemek yeme gibi işlevlerde yardıma ihtiyaç hissedilmesi gerçekleşir. 20'li yaşlara gelindiğinde hastaların birçoğu solunum sorunları ve kardiyak hastalıkları nedeniyle kaybedilmektedir. Olguların % 75'i solunum yetmezliğinden, % 20'si kalp yetmezliğinden, geri kalanı da pnömoni, pulmoner emboli, ani ölüm nedeniyle kaybedilir (25).



Şekil 2-3: Gowers Belirtisi (25 No'lu kaynaktan alıntı).

Hastaların tümünde entellektüel yetenekler etkilenmekle birlikte % 20-30' unda zeka düzeyi (IQ) 70' in altındadır. En çok öğrenme güçlükleri ile karşılaşılır. BMD hastalarında mental gerilik Duchenne müsküler distrofi hastaları kadar sık görülmemektedir (26).

BMD hastalarında DMD hastaları ile aynı klinik tabloyu sergiler ancak hastalığın ortaya çıkışı daha ileri zamanlarda ve daha yavaş seyreder.

2.2.3.4. Tanı

Aile öyküsünün olması önemli bir tanısal ipucudur. Soyağacının çizilmesi ve akrabaların araştırılması ile olası kalıtsal geçişleri tespit etmek mümkündür. Fiziki muayenede erkek çocuklarda proksimal kaslarda belirgin kas güçsüzlüğü, merdiven çıkmakta zorluk, yürüme anormalileri en belirgin klinik belirtilerdir. Serum CK düzeyinin normalden 10-20 kat daha yüksek olması ve EMG'de kas tutulmaları DMD/BMD'yi düşündürür. Kas biyopsisi örneği çalışmaları ve DNA analizi ile mutasyonların tespiti DMD/BMD tanısını kesinleştirir.

Tanı koymak için kullanılan yöntemler;

a) Kreatin Kinaz (CK)

DMD'de en az 10-20 kat yüksektir. Doğumdan itibaren yüksek CK değerleri hastalık açısından uyarıcı olmalıdır. Fakat kreatin kinaz yüksekliği nonspesifiktir ve normal olması tanı ile bağdaşmaz. Hastalığın ileri safhalarında yıkılan kas hücresi daha az olacağından CK değerleri daha düşük saptanabilir (2).

b) Elektromiyografi (EMG)

Kasın miyopatik yapısını ortaya koymak ve diğer nörojenik nedenleri dışlamak için yapılmalıdır. Motor ve duyuşsal iletim hızları normal iken DMD olgularında EMG'de miyopatik değişiklikler görülür (2,8).

c) Kas Biyopsisi:

Kas biyopsisinde distrofin tayini ilk kez Hoffman ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyalarla kas biyopsi örneğinde distrofin proteininin yokluğunu göstermek, DMD'nin tanısını kesinleştirmek için kullanılır. Gen

delesyonunun gösterilemediği olgularda, kas immünohistokimyası distrofin varlığı ya da yokluğunu belirleme açısından değerlidir. Delesyon belirlenmiş de olsa hastalık gidişatının belirlenmesi amacıyla da immünohistokimyasal inceleme yapılabilir (5,26)

d) DNA Analizi

1- RFLP ve STR Analizleri

Polimorfizm olarak tanımlanan DNA baz dizileri farklılıkları, restriksiyon enzimlerinin kesme bölgelerinde oldukları zaman, kolayca tanınır ve restriksiyon enzimi kesimiyle elde edilen parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Enzyme Fragment Length Polymorfizm-RFLP) diye adlandırılır. Bu değişiklikler kişinin fenotipinde herhangi bir bozukluğa yol açmaz ancak DNA'yı kesen çeşitli restriksiyon enzimlerinin kesme bölgelerini değiştirerek, kişiler arası farklı uzunlukta kesim parçaları oluşturur. RFLP analizinde iki kromozom birbirinden gen içinde ya da gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması ya da bulunmaması ile ayrılır.

DMD'de RFLP analizinin temeli, allellerdeki DNA baz dizisi farklılıklarından yararlanılarak, iki eş kromozomun birbirinden ayırt edilmesi ve hasta olgunun annesinden kalıtıldığı X kromozomunun ailedeki izinin sürülmesine dayanır (27).

Uygulama zorluğu ve bilgilendirici bilgi sağlama yönünden günümüzde yetersiz kalan bu yöntem yerini, DNA içersinde bulunan, 2-10 baz tekrarlarının (Short Tandem Repeats = STR) analizine bırakmıştır. STR belirteçlerinin analizi ile kalıtılan gen daha iyi takip edilebilmekte ve istatistiksel açıdan daha anlamlı bağlantı analizleri yapılabilmektedir. (27,28)

2- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

DMD/BMD mutasyonlarının % 60-65'i distrofini kodlayan gen bölgesinde delesyon olarak görüldüğünden, hastadaki delesyonların tanımında delesyon bölgelerini çoğaltarak bu bölgelerdeki değişimleri tanımlayabilen çoklu gen amplifikasyonu yöntemi kullanılmaktadır. Multipleks I ve Multipleks II olarak adlandırılan iki çoklu amplifikasyon sisteminden her biri Distrofin geninin farklı eksonlarını taramaktadır. Bu eksonlar delesyonların sıklıkla rastlandığı hot spot bölgelerine uyan ekson 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 ve promotor (PM) bölgeleridir. 18 ekson ve PM bölgesi çoklu PZR yöntemi ile ayrı primerler kullanarak çoğaltılabilmekte ve ürünler jel elektroforezi ile doğrudan incelenmektedir (29). Normal kişilerde tüm parçalar mevcutken, hastalarda herhangi bir parçanın saptanmaması ya da çoğaltılan

bölgenin boyunda gözlenen bir kısıklık, incelenen gen bölgesinde delesyon olduğunu göstermektedir. Mutipleks I ve II'nin birlikte kullanım amacı yalnız birinin kullanımı ile tanınamayan delesyonların tespitidir. Bu sayede gendeki delesyonların % 98'i saptanabilmektedir (5,29,30).

Bu yöntemler içerisinde PZR yöntemi delesyonların tespiti için en ideal yöntem gibi görünse de 79 ekzona sahip bir gende duplikasyonlar tespit etmeden ve sadece 18 ekzona bakarak delesyon tespiti ile sonuç vermek bir hayli risk taşıyabilir. Yeni gelişen bir yöntem olan MLPA ile bu sorunlar aşılabilmektedir.

MLPA; 45 kadar spesifik dizinin eşzamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metodur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130 - 490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir (31,32). Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunur

MLPA bir prob karışımının genomik DNA ile hibridizasyonu yapılarak, özgül DNA dizilerinin rölatif miktarının belirlenmesi amacıyla yönelik bir metoddur (33,34). Aynı deneyde 96 örneğin analizi mümkündür. Kopya sayısı değişikliklerinin incelenmesinde aCGH ve SNP mikrodizin yöntemlerinin aksine basit, hızlı, düşük maliyetli, pratik ve yorumu kolay bir teknik olarak genetik laboratuvarlarında geniş kullanım alanı bulmuştur. Çok küçük dizileri ilgilendiren kayıp veya kazanım varlığında FISH gibi alternatif yöntemlerden daha avantajlıdır.

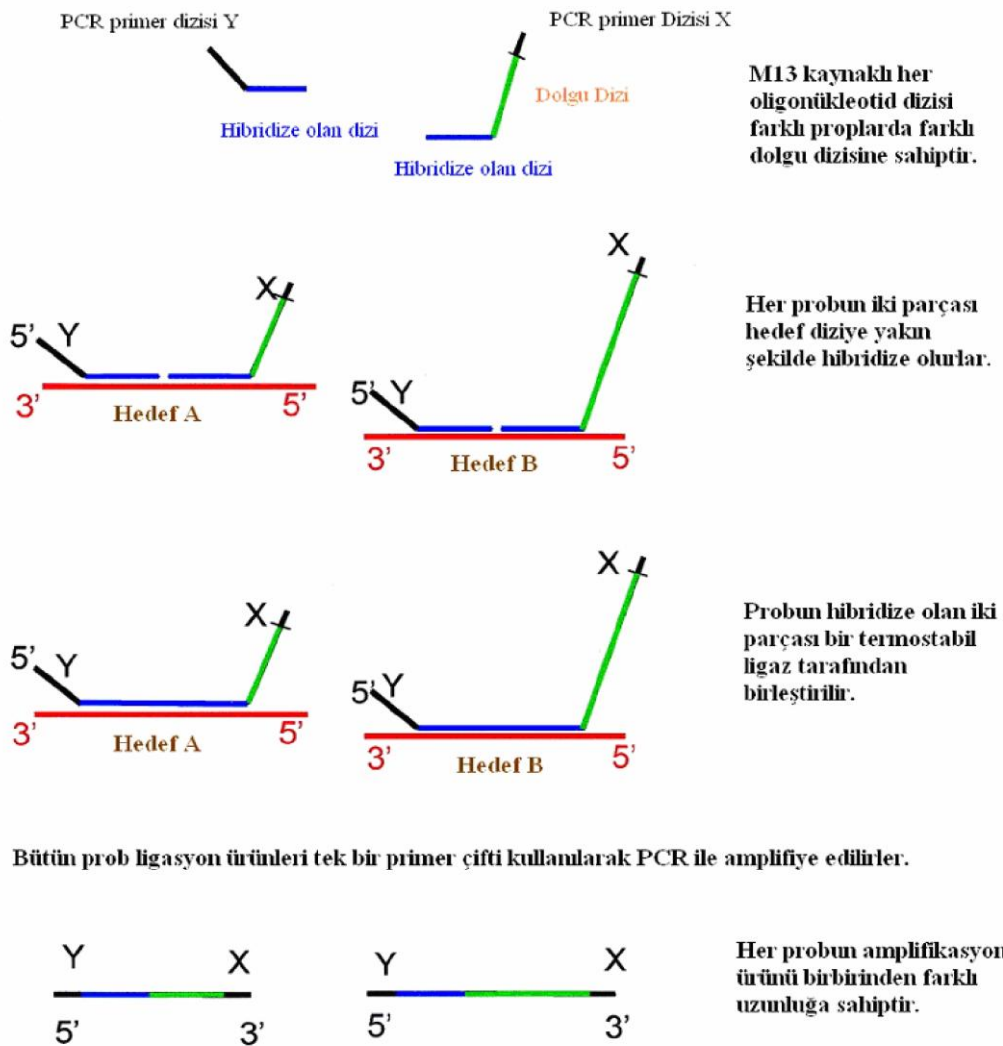
MLPA yöntemi hedef nükleotid dizisinin denatürasyonu sonrasında yan yana yerleştirilmiş iki komplementer probun hibridizasyonu ile başlar. (33,34). Daha sonra hibridize olan problemler ligasyon işlemine tabi tutularak birleştirilir. Problemlere özgü özel hazırlanmış primerler kullanılarak yapılan multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilir. Sadece hedef diziyeye hibridize olan problemler ligasyona uğrarlar ve PCR ile amplifiye olurlar. MLPA yönteminde multipleks PCR'dan farklı olarak hedef bölgelerdeki diziler değil, hedef bölgeye hibridize olan MLPA problemleri amplifiye edilir (34). Standart multipleks PCR'dan farklı olarak tek bir çift PCR primeri kullanılır. Deneyden sonra amplifiye olan ürünler 130-480 baz çifti uzunluğundadır. Ürünler daha

sonar kapiler jel elektroforezi ile ayrılır ve yazılım sistemleri kullanarak amplifikasyon ürünleri incelenir. Her amplifikasyon ürününün pik alanı, bu hedef dizinin rölatif kopya sayısını yansıtır, kayıp ya da kazanım bulunan diziler kolaylıkla belirlenebilir. Buradan elde edilen verilen sisteme ait yazılım programına yüklenerek analiz yapılır.

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

•Denatüre genomik DNA 40 ayrı prob ile hibridize edilir.

•Her bir MLPA probu, biri sentetik, diğeri M13 kaynaklıdır.



Amplifikasyon ürünleri elektroforez ile ayrıştırılır. Prop amplifikasyon ürünlerinin göreceli miktarları hedef dizinin göreceli doz miktarını belirler.

Şekil 2-4: MLPA yönteminin şematiks anlatımı.

MLPA yöntemi teknik hataların sonuç yorumunda hatalara yol açmaması için birtakım içdenetim kontrol mekanizmaları içermektedir. Bu amaçla bütün MLPA prob karışımlarına bazı kontrol fragmanları eklenmiştir. Buna göre her karışım 4 adet DNA miktarı kontrol fragmanı (*DNA Quantity control fragment / Q-fragment*) ve 3 adet DNA denatürasyon kontrol fragmanı (*DNA Denaturation control fragment /D-fragment*) içerir. *Q-fragment* olarak kullanılan 4 prob, 64, 70, 76 ve 82 baz uzunluğundadır ve amplifikasyonları ligasyondan bağımsız gerçekleşecek şekilde tasarlanmışlardır. Fragman analizi sırasında amplifikasyon ürünlerini gösteren eğriler gösterildiğinde, *Q-fragment* olarak kullanılan bu dört probun amplifikasyon ürünleri, *D-fragment* ve diğer MLPA problemlerinin amplifikasyon ürünleri ile karşılaştırılır. *Q-fragment* amplifikasyonu diğerlerine göre 1,5 kat veya daha fazla oranda gözleendiğinde bu durumun ligasyonun gerçekleşmediği ya da DNA miktarının az olduğuna işaret ettiği gözlenmiştir (33,34).

Buna karşılık *D-fragment* olarak karışıma eklenen 88, 92 ve 96 baz uzunluğundaki problemler karışımdaki bütün diğer problemler gibi ligasyona bağımlı olarak amplifiye olurlar. Bu problemlerin amplifikasyon oranları, karışımdaki diğer MLPA problemleri gibi, ligasyon başarılı olmuşsa, DNA miktarı yeterliyse ve uygun şekilde denatüre olduysa beklenen eğriler çizdirilerek değerlendirilebilir. *D-fragment* olarak kullanılan problemlerden 92 baz uzunluğundaki prob, 2q14 lokalizasyonunda yer alan bir diziyeye özgü tasarlanmıştır. 88 baz uzunluğundaki fragman 6p21.3 bölgesindeki *FANCE* geninin başındaki CpG adacığına özgü tasarlanmıştır. 96 baz uzunluğundaki fragman ise, 1p36 bölgesindeki TP73 geninin başındaki CpG adacığına özgü tasarlanmıştır. Bu iki CpG adacığının yüksek oranda C/G nükleotidleri içermeleri denatürasyonlarını son derece zorlaştırır. Bu fragmanlara özgü doruk yüksekliklerinin 92 baz uzunluğundaki *D-fragment* ve diğer problemlere göre %40 veya daha az bulunması, DNA örneğinin denatürasyonunun tam olmadığını gösterir (34).

D-fragment olarak eklenen 92 baz uzunluğundaki prob, MLPA prob karışımına diğerlerinden daha az miktarda eklenir ve hibridizasyon kontrolü için kullanılır. Eğer bu proba özgü amplifikasyon ürünü 88 ve 96 baz uzunluğundakilere göre çok daha azsa, prob-hedef hibridizasyonunun tam olmadığı görülür. Bunun sebebi ise hibridizasyon süresinin kısa olması, hibridizasyon sıcaklığının düşük olması, DNA miktarının fazla olabilir.

MLPA sonuçlarını değerlendirirken gözönüne alınması gereken başka önemli noktalar da vardır (34). Bunlardan biri özellikle X kromozomu ile ilgili problemlerin bulunduğu deneylerde hastanın cinsiyetidir. Bu problemler için normalde hemizigot olan erkeklerin sonuçları mutlaka erkek kontrollerin örnekleriyle karşılaştırılmalıdır. Bir diğer nokta kopya sayısı değişikliği bulunan problemlerin birbirleriyle komşuluk ilişkisidir. Birbiriyle fiziksel komşuluk gösteren gen bölgelerine ait problemlerin aynı türdeki kopya sayısı değişiklikleri (delesyon veya duplikasyon) daha büyük olasılıkla gerçek pozitif sonucu gösterir, buna karşın komşuluğu olmayan problemlerdeki değişiklikler yalancı sonuçlara işaret edebilir. Bir başka önemli nokta da ilgilenilen hastalığın özelliğidir. Buna göre sıklıkla kopya sayısı değişikliği nedeniyle ortaya çıkan hastalıklarda ve toplumda sık görülen hastalıklarda (örn., Duchenne kas distrofisi), bulunan kopya sayısı değişikliğinin gerçek pozitif sonuç olması olasılığı daha yüksektir. Ayrıca komşuluk ilişkisi gösteren problemler arasında uzun fiziksel mesafe varsa, bu bölge genomik tekrar dizileri içeriyorsa, veya eksonlar arasında bulunan intronun uzunluğu fazlaysa, kopya sayısı değişikliğine yol açacak yeniden düzenlenmelerin oluşması olasılığı da yüksektir (34).

Genomik DNA da olduğu gibi mRNA araştırmalarında, CpG metilasyon paterninin multiplex kantitasyonunda da mümkündür. Günümüzde 350 den fazla laboratuvar, MLPA yöntemiyle çeşitli genlerin, delesyon ve amplifikasyonları araştırılmaktadır (34).

2.2.4. Becker Kas Distrofi

Daha hafif klinik seyirli, hastaların 40-50 yaşa dek yaşayabildikleri bir kas distrofisidir (4,21). Sıklığı 30 000 canlı doğan erkek bebekte birdir. Distrofin geninde delesyon vardır (1,9).

Kas biyopsisinde % 80 olguda distrofinin moleküler ağırlığı % 20-90 oranında azalmış, % 15 olguda distrofin normal boyutta fakat miktar olarak düşük, % 5 olguda ise anormal olarak büyük boyuttadır (1,5). Ördekvari yürüyüş (waddling gait) 10-15 yaşlarda dikkati çeker, 15-20 yaş civarında giderek artan kas güçsüzlüğü ve baldır hipertrofisi gelişir. Kayıp DMD' den daha geç dönemdedir.

Tanı DMD'deki gibi aile öyküsü, CK yüksekliği, EMG, genetik inceleme ve kas biyopsisi ile konur.

BMD ölümcül olmayıp, üreme uyumu % 70'e varır. BMD'li olgular evlenebilir ve bütün kızlarına mutant geni geçirerek kızlarından olan erkek torunlarının hasta olma riskini % 50'ye çıkarırlar. Bu nedenle BMD'li olguların büyük bölümü (%85-90) kalıtsaldır, ancak olguların %10'u yeni mutasyon ile oluşur (27,28).

2.2.5. Distrofinopatilerde Taşıyıcılar

Distrofinopatiler temelde erkek cinsiyeti etkiliyor görünse de kadın taşıyıcıların da değişik derecelerde etkilendiği gösterilmiştir. Kadın taşıyıcılarda DMD' de % 24, BMD' de % 20 oranında iskelet kas tutulumu bildirilmiştir (44). Kas krampları, kas güçsüzlüğü görülebilir. Kas güçsüzlüğü genelde ağır seyretmez ve çoğunlukla asimetriktir. Bulgu vermeyen taşıyıcıların büyük bölümünde, değişik dercelerde kalp tutulumları da görülebilir (45).

Taşıyıcı kadınlarda klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olan mekanizmalar; X-inaktivasyon mekanizması, X-otozom translokasyonu, 45,X genotipi, her iki X kromozomunun da mutant geni içermesi ve uniparental disomi'dir. Teorikte mümkün olmasına rağmen pratikte mümkün olmayan olası sebeplerde değerlendirilebilir.

2.3. Hastalığın önlenmesi ve Genetik danışma

Hastalığın önlenmesi; hastalığın erken tanısı, taşıyıcıların belirlenmesi, doğru genetik danışma ve prenatal tanı ile mümkün olabilir. Özellikle, DMD olan bir çocukla doktora başvuran ailelerde, çocuğun anne tarafından kadın akrabalarında da taşıyıcılık olasılığının kesinlikle gözardı edilmemesi gerekir ve ailedeki taşıyıcıların tespit edilmesi gerekmektedir. DMD'li birey bulunan ailelerdeki kadınların taşıyıcı olup olmadıklarının, erken yaşlarda çocuk sahibi olmadan tespit edilmesi önemlidir. Ailesinde DMD veya BMD'li bir bireyin bulunduğu kadınların taşıyıcılık durumlarının belirlenmesi için soy ağacının çıkarılması DNA analizi uygulanmaktadır.

Genetik danışmada doğum öncesi tanı uygulamalarının temel amacı, söz konusu hastalık için yüksek risk nedeniyle çocuk sahibi olmaktan kaçınan ailelere sağlıklı bir çocuk için güvence verebilmektir. Ailesinde DMD'li olgu bulunan taşıyıcılık riski yüksek kadınlara moleküler analizler ile güvenilir sonuçlar verilebilmektedir.

MLPA'nın yaygın kullanılması ile taşıyıcılık tespiti daha kolay olacak ve gerekirse aileler alternatif üreme yollarına yönlendirilerek sağlık bir çocuk elde etmeleri sağlanacaktır.

2.4. Tedavi

Günümüzde DMD tedavisi ve steroid tedavisine eklenen destekleyici tedaviden ibarettir. Steroidin tedavide kullanılmaya başlaması ile hastalığın ilerleyişinde ve kliniğinde belirgin bir düzelme yanında yaşam kalitesinde iyileşme olmuştur (46,47). Bunun haricinde kesin tedavi amaçlayan gen terapisi çalışmalarına hızla devam edilmektedir. Sağlam genin vektörler ile hastaya aktarılması, exon-skipping yöntemleri ve gen susturulması çalışmaları halen devam etmekte ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta Örnekleri

Araştırılacak olgular; İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne klinik tanısı konarak gelmiştir. Çalışma başlatılmadan önce İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmıştır. Çalışmada kas dokusu örnekleri kullanılan tüm hastalara çalışmayı detayları ile anlatan bilgilendirilmiş gönüllü hasta onay formu imzalatılmıştır. Çalışmanın deneysel işlemleri İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan hastalar İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anabilim Dalı'ndan gelen hastalar arasından seçilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

MLPA Anöploidi Kiti (Salsa P095- MRC Holland)

Etanol

Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Tris baz

Tris-HCl

Hidrojen peroksit

Sodyum hidroksit (NaOH)

Bromfenol mavisi

Hidroklorik asit (HCl)

Distile Su

Agaroz

Bisakrilamid

Sodyum klorür (NaCl)

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

EDTA'lı Kan Tüpü

Pipet Uçları (Değişik Hacimler için)

1.5 ml'lik ependrof tüp

310 Sample Tubes

0.2 ml PZR Tüpü

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Mikrosantrifüj	(Biofuge Stratos, Heraeus)
-20, +4 Soğutucu	(Bosh, Almanya)
Isı Blokları	(Gen Probe, San Diego, A.B.D.)
Pipet Seti (10-100-100 μ l)	(Eppendorf, Almanya)
Vorteks	Elektromag
PZR Cihazı	Biorad
Spektrofotometre	Nanodrop-2000
Kapiller Elektroforez Cihazı	Beckman, CEQ 8000
Derin dondurucu	Bosch
Bilgisayar	Asus
Santrifüj	Eppendorf

3.1.5. Kullanılan Yazılımlar

MLPA Analizi	Cofflayser V.9.5
Ofis programı	Office 2010, Microsoft

3.1.6. Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

Sodyum Dodesil Sülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)

10 gr sodyum dodesil sülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve 0,22

mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Tris Baz Stok Çözeltisi (100 ml, 1,5 M)

18,165 gr Tris baz distile su ile 90 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

Amonyum Persülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)

10 gr amonyum persülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. DNA İzolasyonu

1 ml kan için:

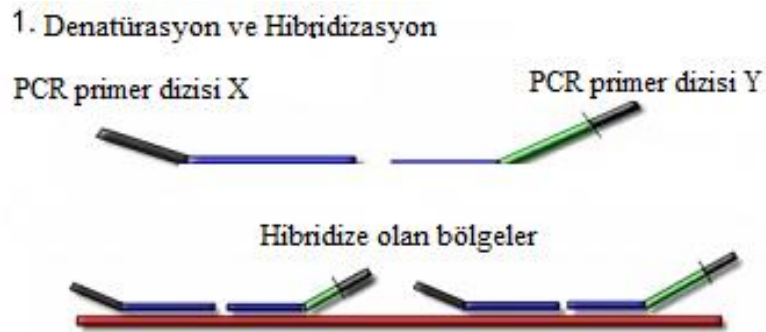
- 1ml kan temiz bir tüpe aktarılır.
- Üzerine 3 ml Lysis Buffer eklenir.
- 30 dak. bekleme süresi ardından 2400 rpm'da 5 dak. çevrilir.
- Üst faz dökülür ve vortex yapıp 1 ml Lysis Buffer eklenir.
- 1 dak. vortex yapılır ve 2400 rpm'da 5 dak. çevrilir.
- Üst faz yine dökülür ve vortex yapılır.
- 1 ml nükleaz buffer, 50 µl SDS ve 30 µl Proteinaz K eklenip 3 saat beklenir.
- 4000 Rpm 'da 8 dakika çevrilir ve üst faz boş bir tüpe aktarılıp üzerine 3 ml alkol eklenir.
- Şeffaflaşan DNA mikropipet yardımıyla 0.5'lik tüplere alınarak 10 dak. 60 derecelik ısıtıcıda kurutulur. ,
- Ardından DNA miktarına göre TE buffer eklenir.

3.2.2. MLPA Çalışması

MLPA çalışması için pipetasyon işlemi gereken basamakların çok hızlı yapılması gerekmektedir. Bunun için uygun sıcaklıkta bekletme seçeneğini içeren PZR prtokolü cihaz hafızasına alınarak işlemlerin hızlı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanmalıdır

3.2.2.1. DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyonu

- Çalışmada kullanılacak DNA'lar -20°C den çıkartılarak çözüldü
- Kısa süreli santrifüjün ardından spektrofotometrede ölçüm yapıldı.
- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan ölçümler neticesinde $5\ \mu\text{l}$ ($45\text{-}150\ \text{ng}$ DNA) alındı.
- Alınan örnekler $200\ \mu\text{l}$ lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- $98\ ^{\circ}\text{C}$ de $5\ \text{dk}$. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler $25\ ^{\circ}\text{C}$ ye soğutuldu.
- $25\ ^{\circ}\text{C}$ deki DNA örneğinin üzerine $1.5\ \mu\text{l}$ SALSA Probe Mix (P095) ve $1.5\ \mu\text{l}$ MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Daha sonra $95\ ^{\circ}\text{C}$ de $1\ \text{dk}$. inkübe edilip örnekler $60\ ^{\circ}\text{C}$ de $16\ \text{saat}$ hibridizasyona bırakıldı.

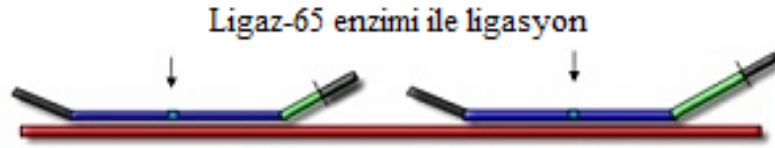


Şekil 3-1: MLPA yönteminin Denatürasyon ve Hibridizasyon aşamalarının şematiksel anlatımı.

3.2.2.2. Ligasyon

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Her bir örnek için 3µl Ligase 65Buffer-A, 3 µl Ligase-65 Buffer-B, 25 µl su ve 1 µl Ligase 65 enzim hazırlanarak pipetajla ile karıştırıldı.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.
- Ardından 15 °C de ürünler cihazdan alınarak bir sonraki aşamaya geçildi.
- Ligasyon ürünü 4 °C de 1 hafta saklanabilir.

2. Ligasyon



Şekil 3-2: MLPA yönteminin Ligasyon aşamalarının şematikselsel anlatımı.

3.2.2.3. PZR Çalışması

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Bu aşamadan sonra yapılacak çalışmalar buz üzerinde devam edildi.
- Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla; 4 µl 10XSALSA PCR Buffer, 26 µl distile su, 10 µl Polimeraz miks eklenerek PZR başlatıldı.

- PZR programı;

Denatürasyon	30 sn	95 °C	
Annealing	30 sn	60 °C	35 döngü
Ekstansiyon	60 sn	72 °C	
Final Ekstansiyon	20 dk	72 °C	

Tablo 3-1: MLPA'nın PZR programının tabloda gösterimi.

- Program bitiminde örnekler alınarak yükleme işlemine geçilir.

3.2.2.4. Kapiler Elektroforez Cihazına Yükleme

- Tampon plağının kullanılacak kadar olan kuyucuklarına 2/3 oranında seperasyon tamponu eklenir.
- Örnek yükleme plağı için örnek başına; 32 µl formamid, 0,2 µl CEQ600 size marker olacak şekilde mastermiks hazırlanır.
- Mastermiks kuyucuklara 32 µl olacak şekilde dağıtılır.
- 2.2 şer µl PZR ürünü kuyucuklarına eklenir.
- Her kuyucuğa birer damla mineral yağ damlatılır.
- Koşturma ayarları;
 - Kapiler sıcaklığı 50 °C
 - Denatürasyon sıcaklığı 90 °C
 - Bekleme süresi 120 sn
 - İnjektasyon voltajı 2.0kV ve süresi 60 sn,
 - Koşturma voltajı 4.8kV ve süresi 60 dk olacak şekilde yapılır.

3.2.2.5. Fragman Analizi

- Okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi.
- Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Coffalyser versiyon 9.4 programına aktarıldı
- Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı.
- Program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, ≤ 0.7 değerlerinde bölgede delesyon yani doz eksikliği olduğu, ≥ 1.3 değerlerinde ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmektedir.
- Elde edilen sonuçlar değerlendirilmek üzere kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Özellikler

Çalışmamıza DMD/BMD tanısı amacıyla İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na 2009-2011 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış 30 adet kan örneği dahil edilmiştir.

Ana Bilim Dalı'mız tarafından bu kan örneklerine rutin olarak uygulanan Multiplex PZR analiz sonuçları “gerçek durum, referans” olarak belirlendi ve bu sonuçlar kontrol grubu sonuçlarını oluşturdu. Aynı kan örneklerine uyguladığımız MLPA yöntemi ile elde edilen sonuçlar araştırma grubu sonuçlarını oluşturdu.

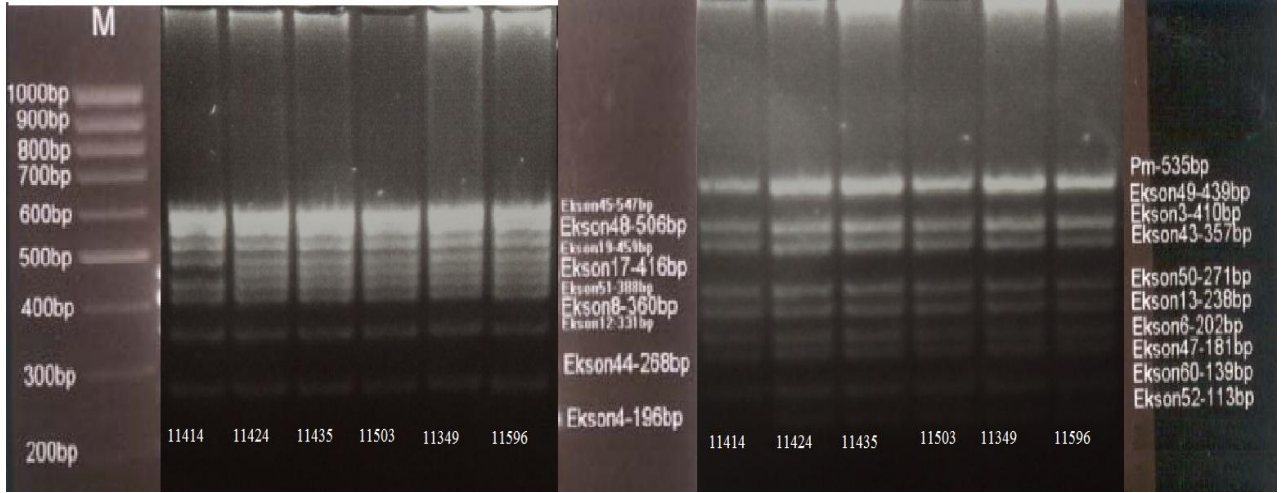
Kontrol grubu sonuçları ile araştırma grubu sonuçları karşılaştırılarak MLPA yönteminin güvenilirliği gözlenip; Multiplex PZR ile tespit edilemeyen delesyon ve duplikasyonların tespiti gerçekleşti. Yöntem farklılığı ile ele geçen zengin veriler ile genotip fenotip karşılaştırması yapıldı.

	Hasta Kodu	PCR I	PCR II	PCR Sonuç	MLPA Sonuç P034	MLPA Sonuç P035	MLPA ANALİZ
1	117	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
2	1121	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
3	11237	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
4	11273	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
5	11275	12	13	12-13	tam	12-13	12-13 Del.
6	11297	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
7	11327	45	tam	45	45	tam	45 Del.
8	11339	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
9	11349	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
10	11358	tam	43	43	31-33-35-37-39-40	23-25-27-29-30-41-43	23-43 Hom. Del.
11	11414	51	52	51-52	tam	51-52-53	51-53 Del.
12	11424	tam	tam	tam	2 dup	tam	2 Dup.
13	11435	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
14	11503	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
15	11596	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
16	11617	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
17	11651	tam	51	51	tam	52	52 del.
18	11658	tam	tam	tam	29-30	tam	28-30 Del.
19	11670	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
20	11718	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
21	11314	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
22	10421	8	tam	8	8-9	tam	8-9 Del.
23	10645	6-12	tam	6-12	6-29	11-20	6-29 Del.
24	10001	tam	12	tam	12-13-15	tam	12-15 Del.
25	10002	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
26	10003	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
27	10128			5-45	3-46	11-40	3-46 Del.
28	10005	tam	tam	tam	tam	tam	Normal
29	****	tam	tam	tam	tam	tam	Kontrol
30	****	tam	tam	tam	tam	tam	Kontrol

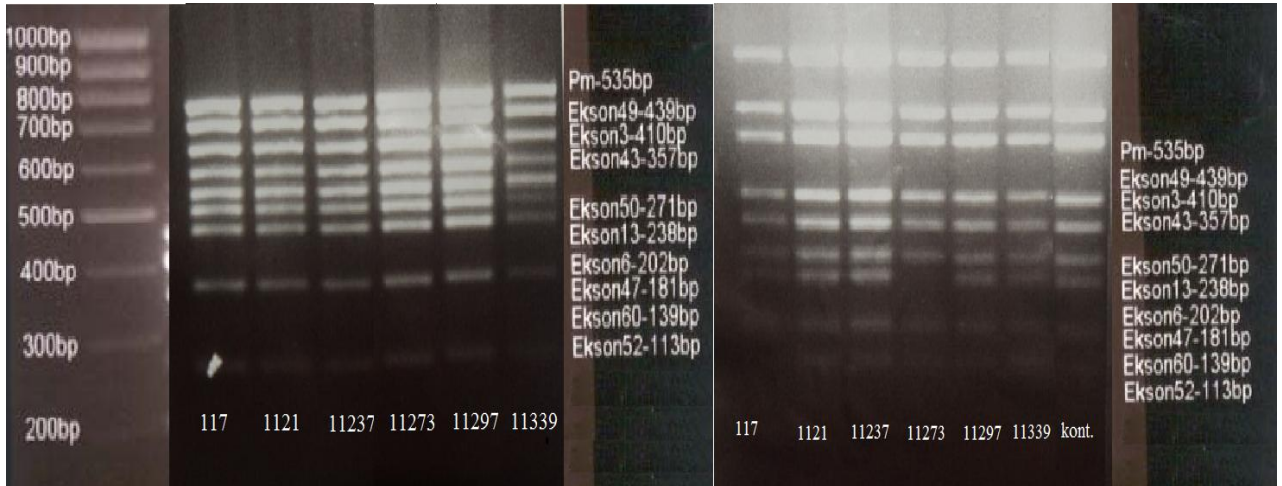
Tablo 4-1: Çalışılan hastalarda PZR ve MLPA sonuçlarının detaylı bir şekilde gösterimi tam: Delesyon saptanmamıştır.

4.1.1. Kontrol Grubu Sonuçları

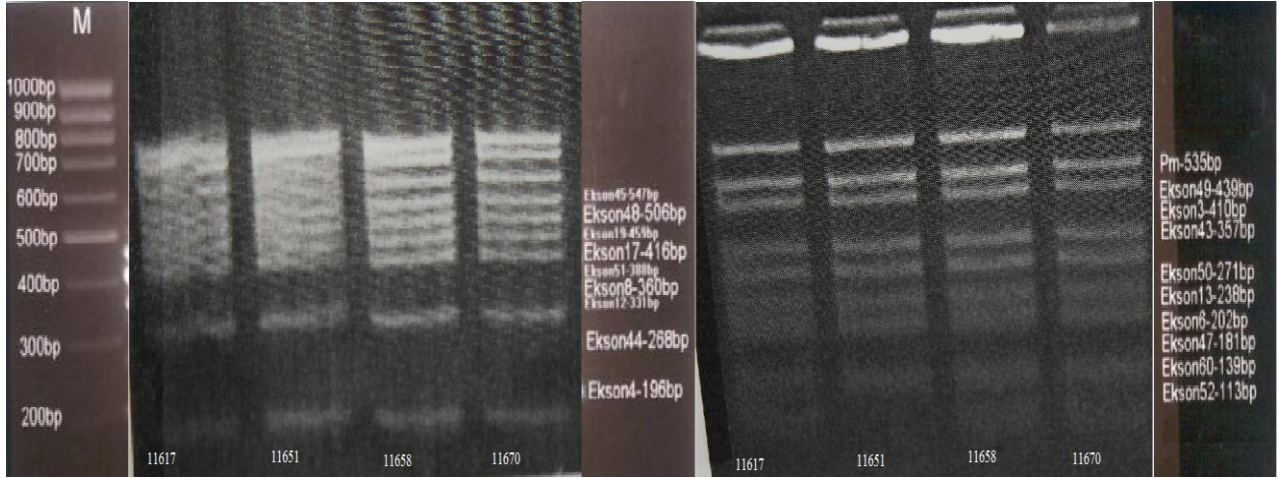
Kontrol grubu sonuçlarını oluşturan sonuçlar (referans); kan örneklerinden rutin uygulamamız olan Multiplex PZR analizi sonuçları arşiv bilgilerinden alınmıştır ve aşağıdaki gibidir;



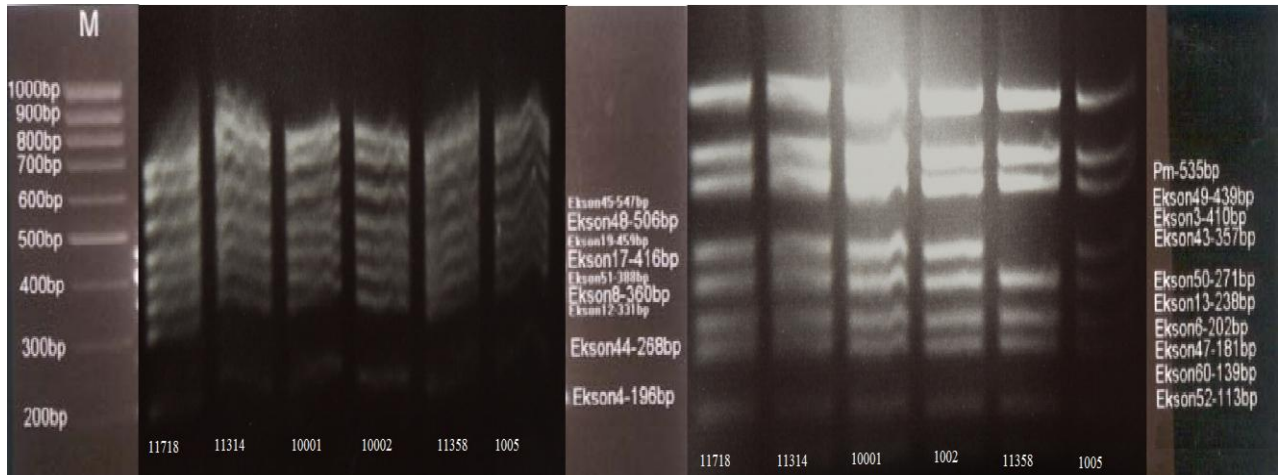
Şekil 4-1: 11414, 11424, 11435,11503,11349 ve 11596 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.



Şekil 4-2: 117, 1121, 11237, 11273, 11297 ve 11339 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.



Şekil 4-3: 11617, 11651, 11658 ve 11670 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.



Şekil 4-4: 11718, 11314, 10001, 10002, 11358 ve 10005 numaralı hastaların Multiplex PZR sonuçlarını gösteren şekil.

4.1.2. Araştırma Grubu Sonuçları

Çalışmamız DMD/BMD tanısı amacıyla İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na 2009-20011 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış 40 adet kan örneğini kapsamakta olup kan örneklerine uyguladığımız MLPA Salsa P034 ve MLPA Salsa P035 kitleri sonuçları araştırma grubu sonuçlarını doğurmuştur. Elde ettiğimiz veriler aşağıdaki gibidir;

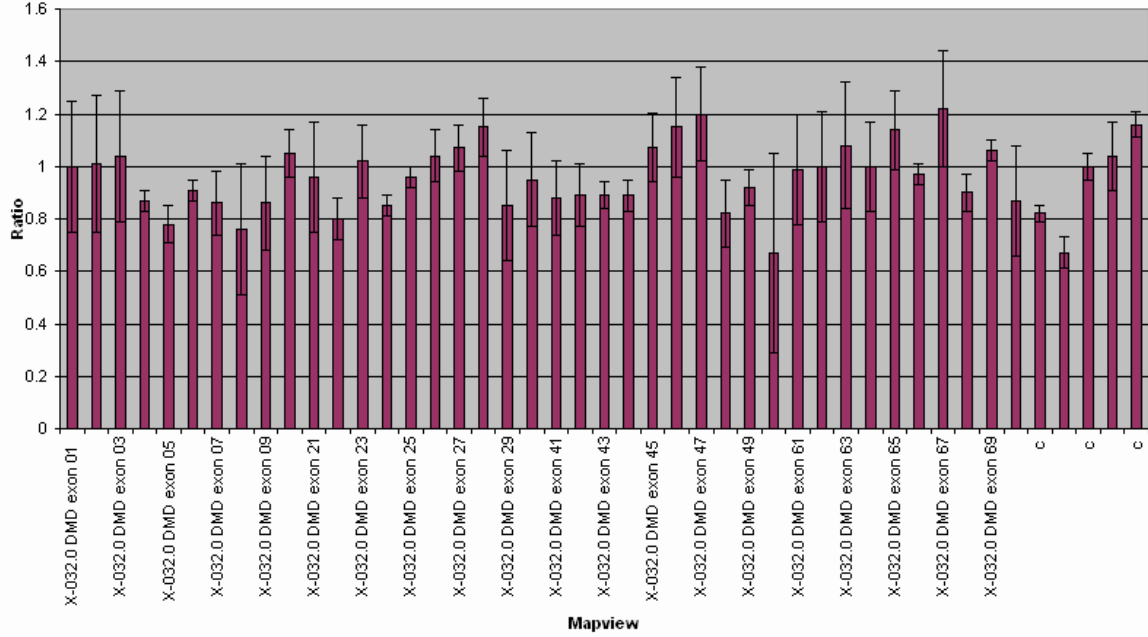
OLGU 1: 117 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 8

Kısa epikiz: Yürümede güçlük çekme.

P034_11-7.H12_11041109FK.xls

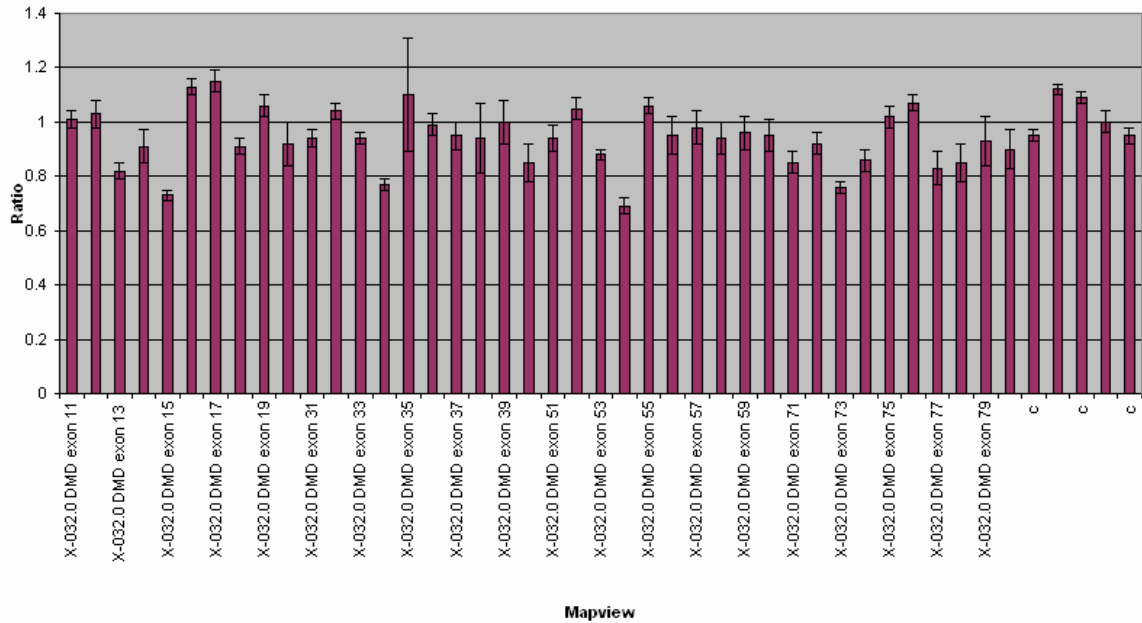
P034_11-7.H12_11041109FK^CEQsCSV.csv



Şekil 4-5: Olgu 1' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11-7.B03_11041108RC.xls

P035_11-7.B03_11041108RC^CEQsCSV.csv



Şekil 4-6: Olgu 1' in P035 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

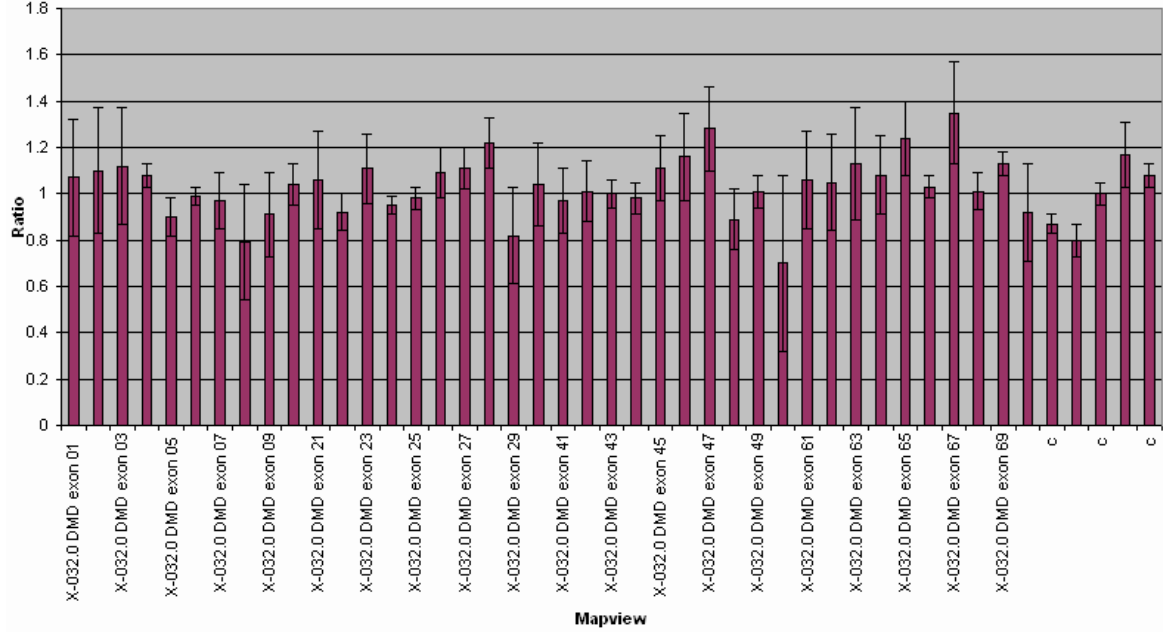
OLGU 2: 1121 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 19

Kısa epikiz: Ön tanı BMD. Ailede kas hastası yok.

P034_11-21_A02_11041109FE.xls

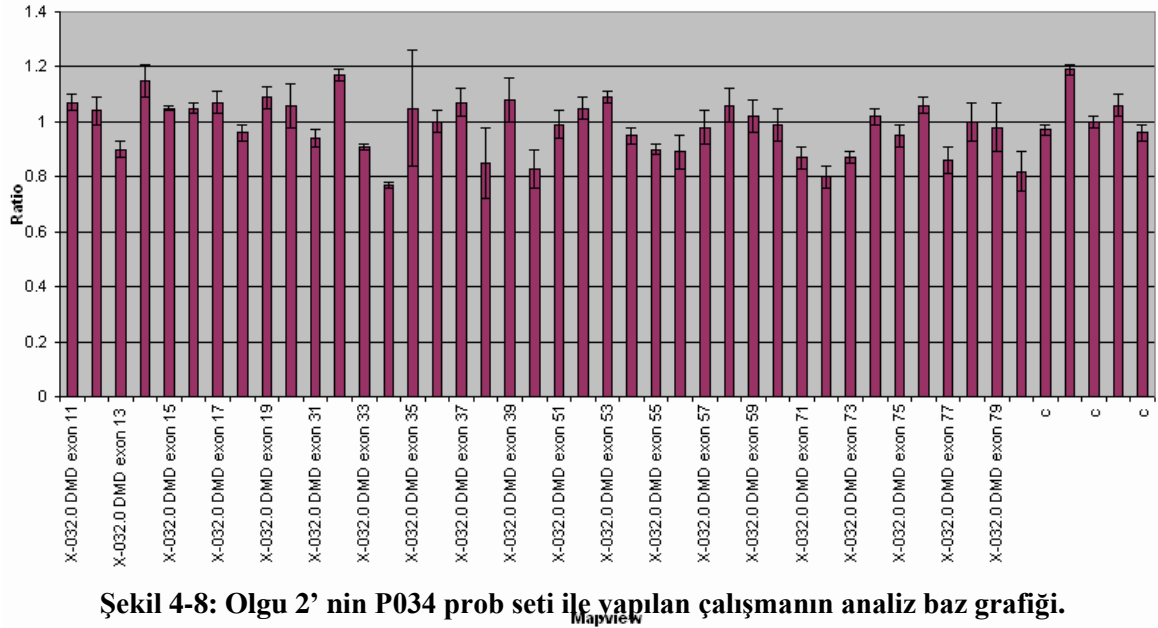
P034_11-21.A02_11041109FE^CEQsCSV.csv



Şekil 4-7: Olgu 2' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11-21_C03_11041108RB.xls

P035_11-21.C03_11041108RB^CEQsCSV.csv



Şekil 4-8: Olgu 2' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

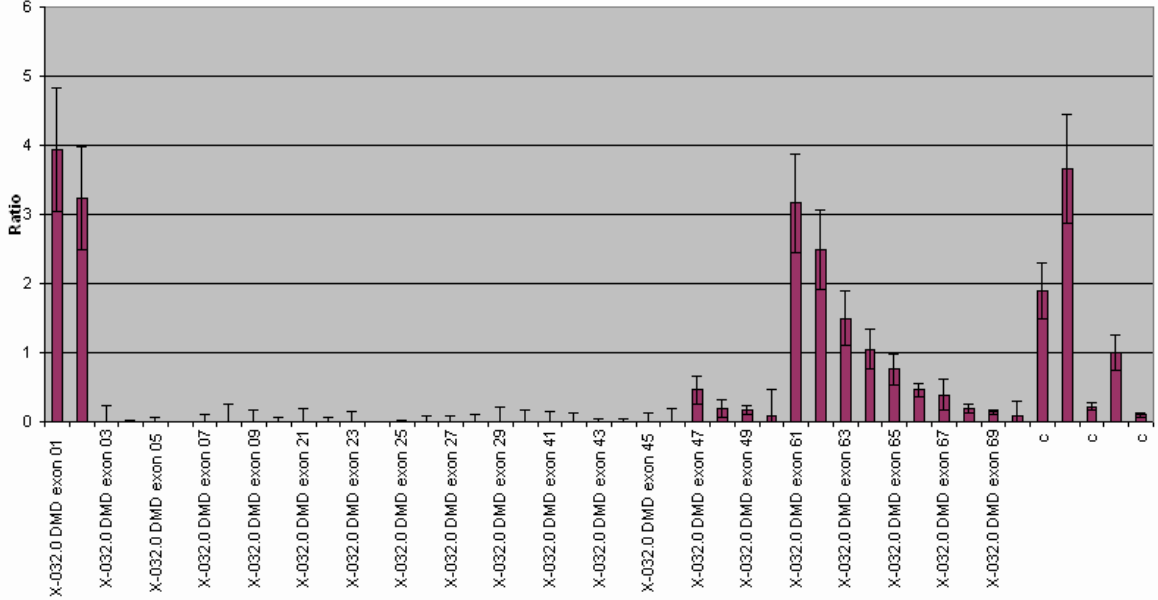
OLGU 3: 10128 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: -

Kısa epikiz: -

[P034_10128.B12_11041109FK.xls](#)

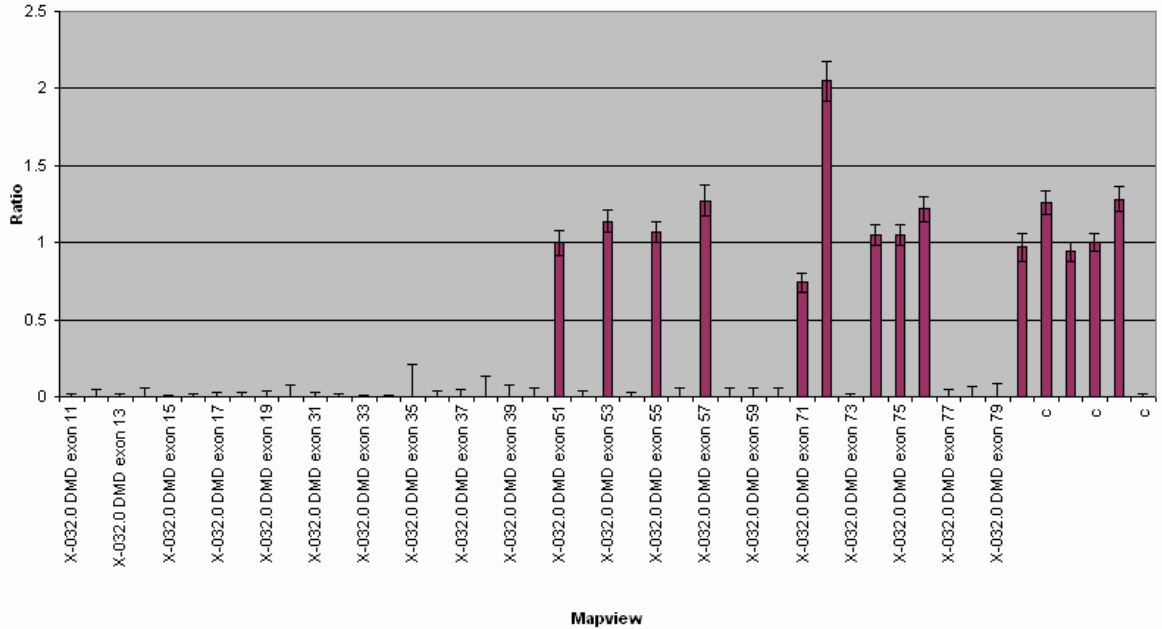
P034_10128.B12_11041109FK^CEQsCSV.csv



Şekil 4-9: Olgu 3' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

[P035_10128.D02_11041108RA.xls](#)

P035_10128.D02_11041108RA^CEQsCSV.csv



Şekil 4-10: Olgu 3' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: 3-45 ekzonlar arasında delesyon saptandı.

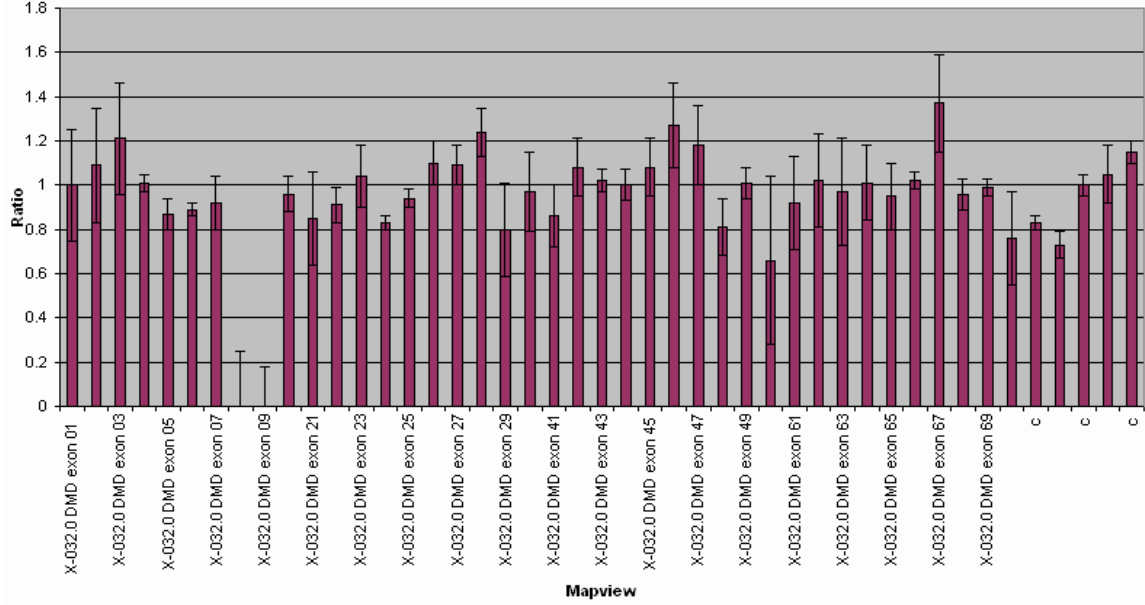
OLGU 4: 11421 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: -

Kısa epikriz: -

P034_10421.C12_11041109FI.xls

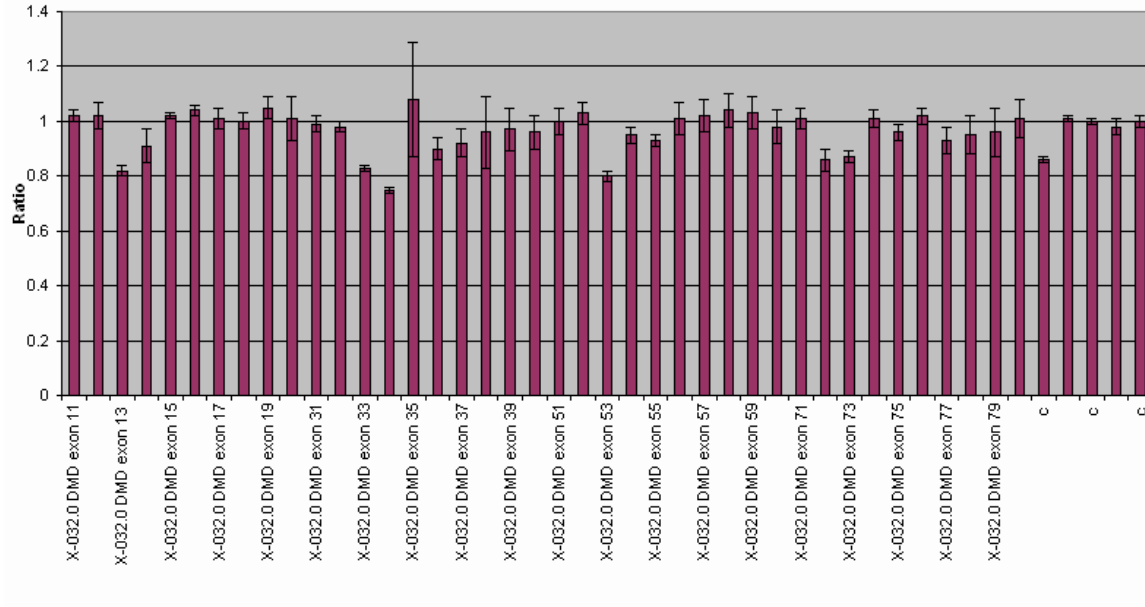
P034_10421.C12_11041109FI^CEQsCSV.csv



Şekil 4-11: Olgu 4' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_10421.E02_11041108R8.xls

P035_10421.E02_11041108R8^CEQsCSV.csv



Şekil 4-12: Olgu 4' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: MLPA sonucunda 8. ve 9. ekzonlarda delesyon saptandı.

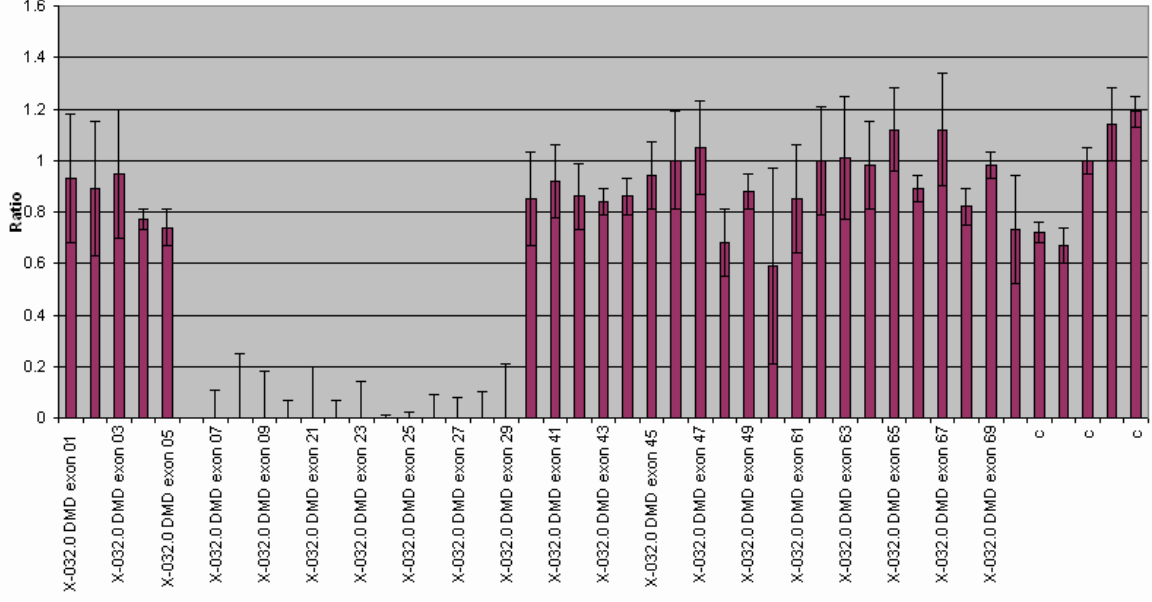
OLGU 5: 10645 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: -

Kısa epikiz: -

P034_10645.E12_11041109FI.xls

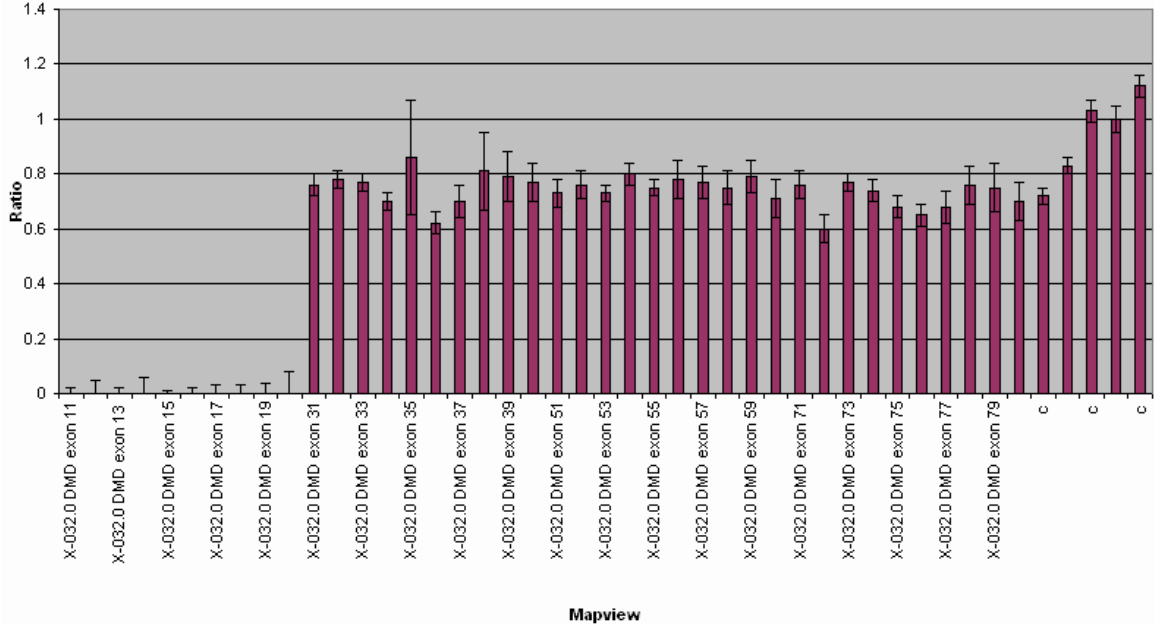
P034_10645.E12_11041109FI^CEQsCSV.csv



Şekil 4-13: Olgu 5' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_10645.G02_11041108R6.xls

P035_10645.G02_11041108R6^CEQsCSV.csv



Şekil 4-14: Olgu 5' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

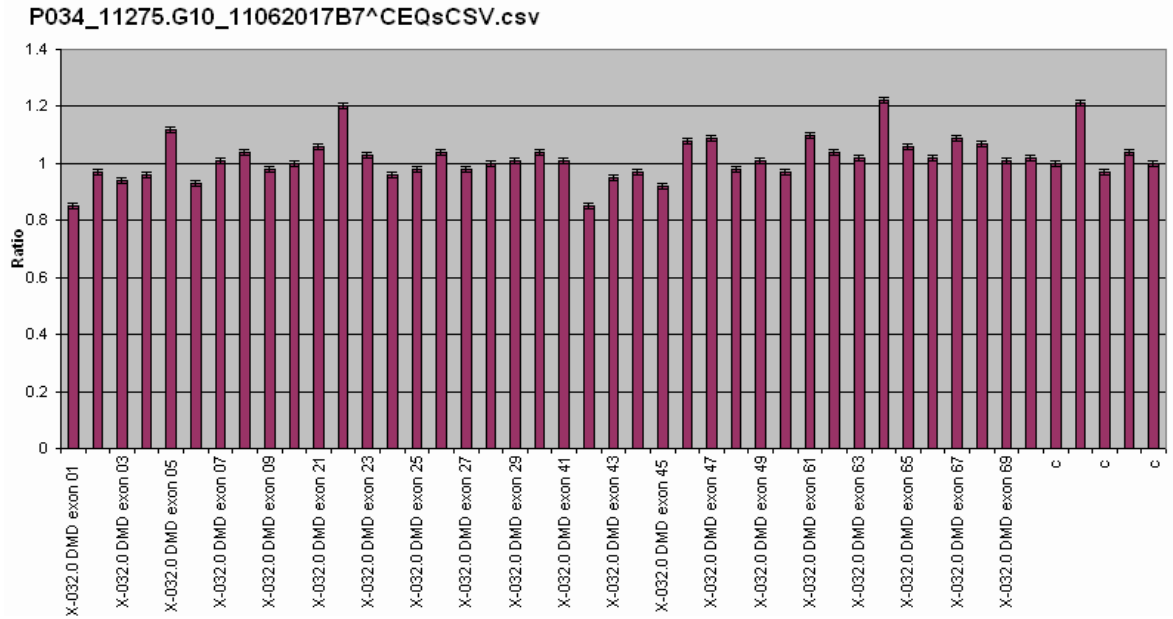
Sonuç: 7- 29 ekzonlar arasında delesyon saptandı.

OLGU 6: 11275 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 6 aylık

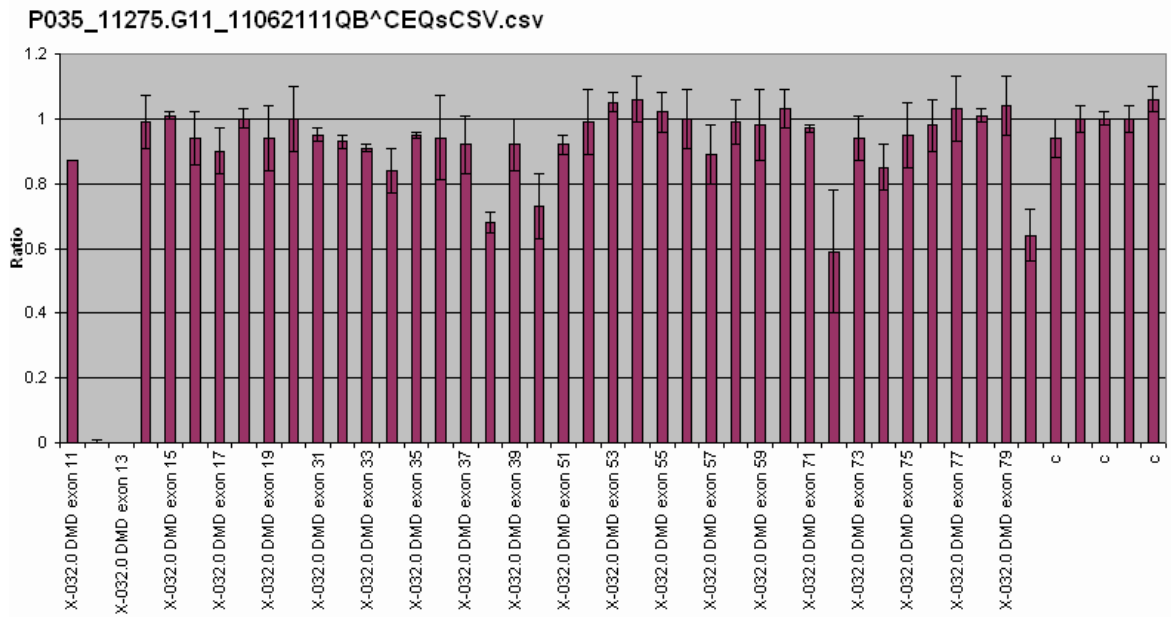
Kısa epikriz: Anne ve baba teyze çocukları. Abisi, annesinin teyzesinin oğlu ve annesinin dayısının oğlu kas hastası. Yüksek CK düzeyi.

P034_11275.G10_11062017B7.xls



Şekil 4-15: Olgu 6' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11275.G11_11062111QB.xls



Şekil 4-16: Olgu 6' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

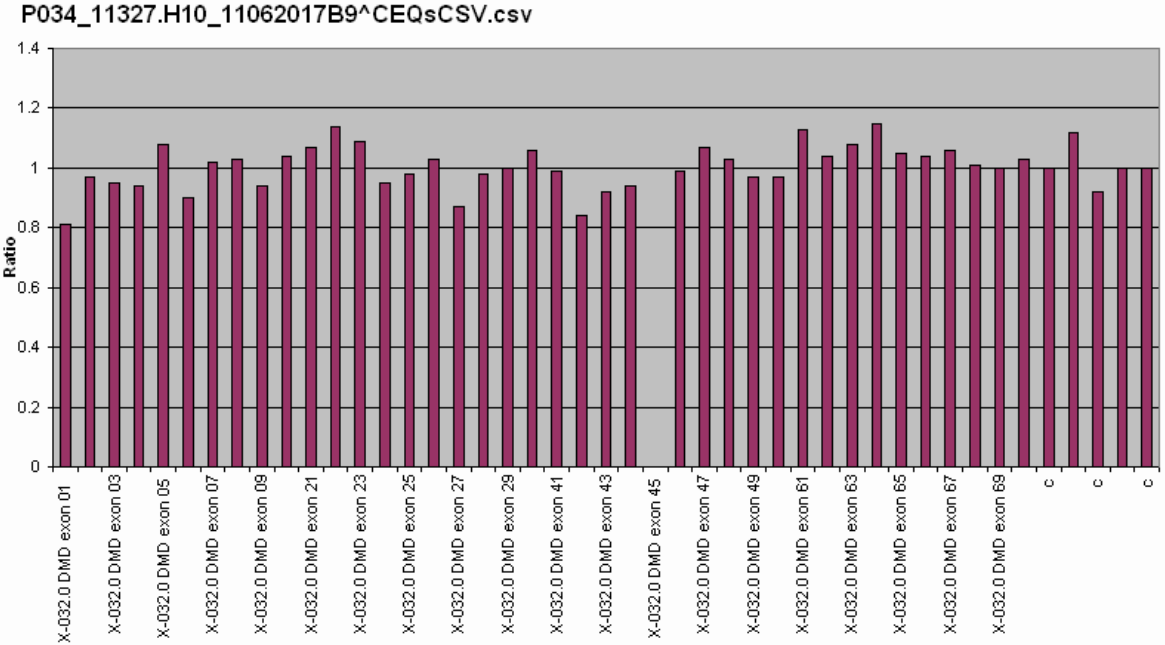
Sonuç: 12. ve 13. ekzonları kapsayan delesyon tespit edildi.

OLGU 7: 1121 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 19

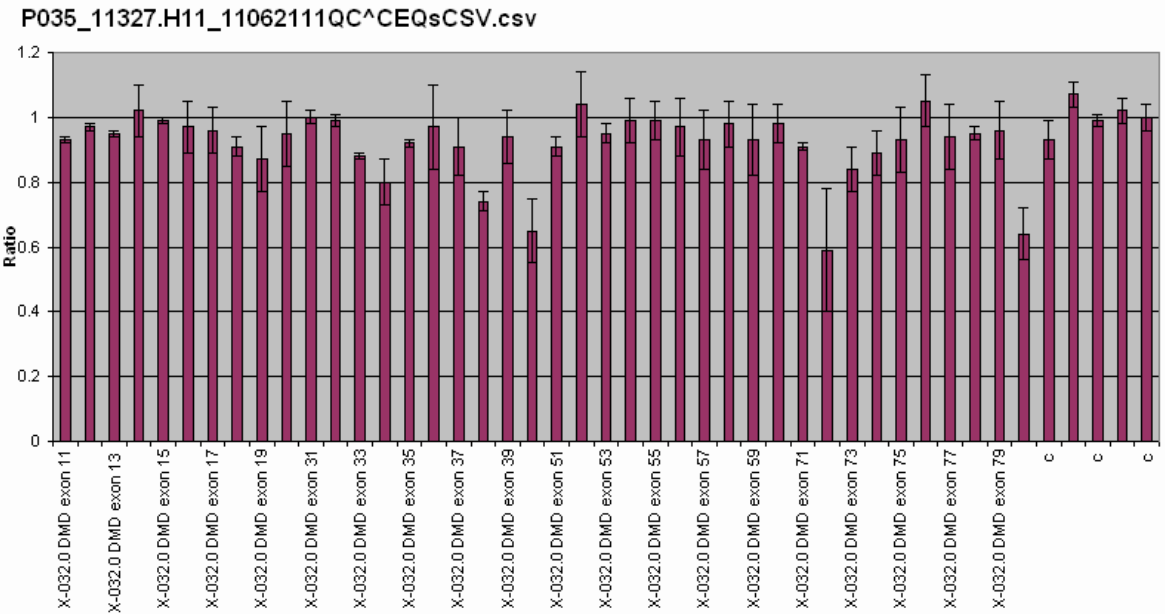
Kısa epikiz: Ailede kas hastası yok. Anne baba uzaktan akraba.

P034_11327.H10_11062017B9.xls



Şekil 4-17: Olgu 7' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11327.H11_11062111QC.xls



Şekil 4-18: Olgu 7' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

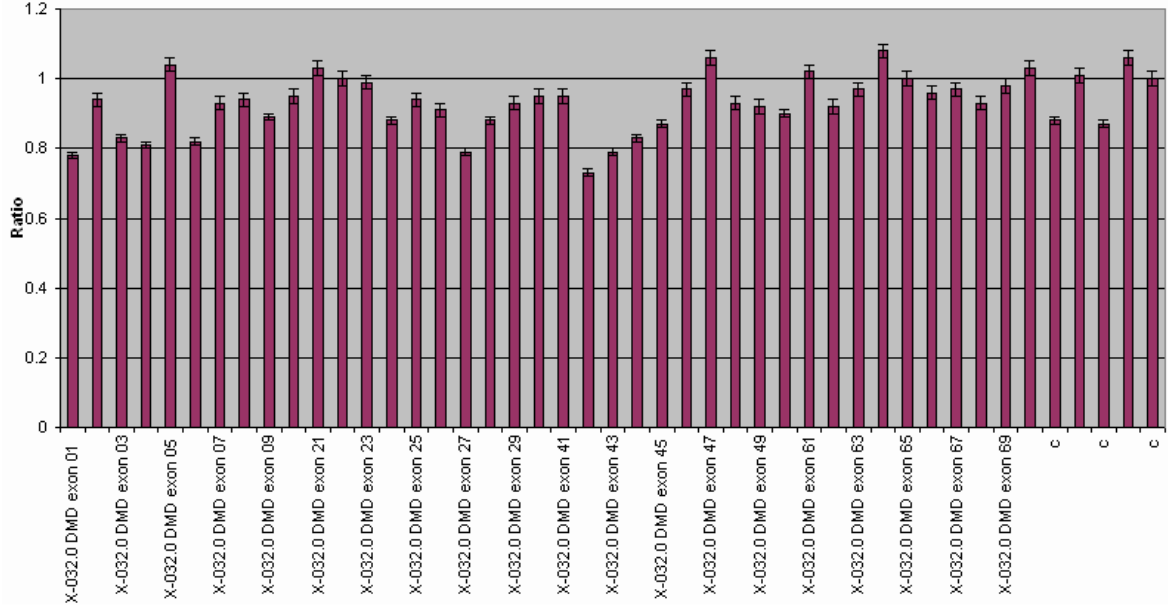
OLGU 8: 11414 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 7

Kısa epikiz: -

P034_11414.F10_11062017B6.xls

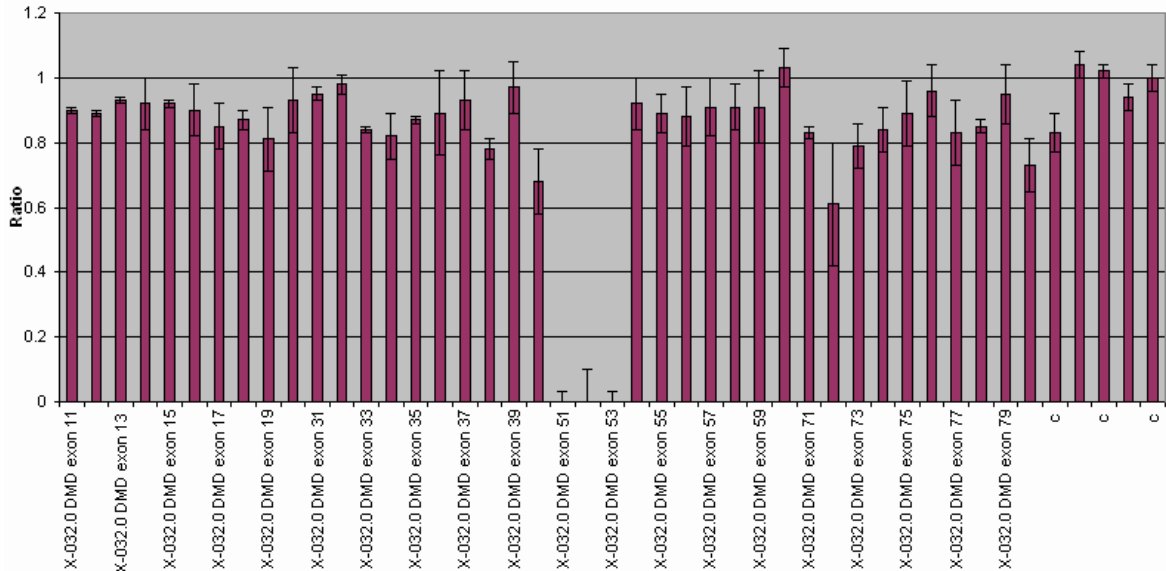
P034_11414.F10_11062017B6^CEQsCSV.csv



Şekil 4-19: Olgu 8' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11414.F11_11062111Q9.xls

P035_11414.F11_11062111Q9^CEQsCSV.csv



Şekil 4-20: Olgu 8' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

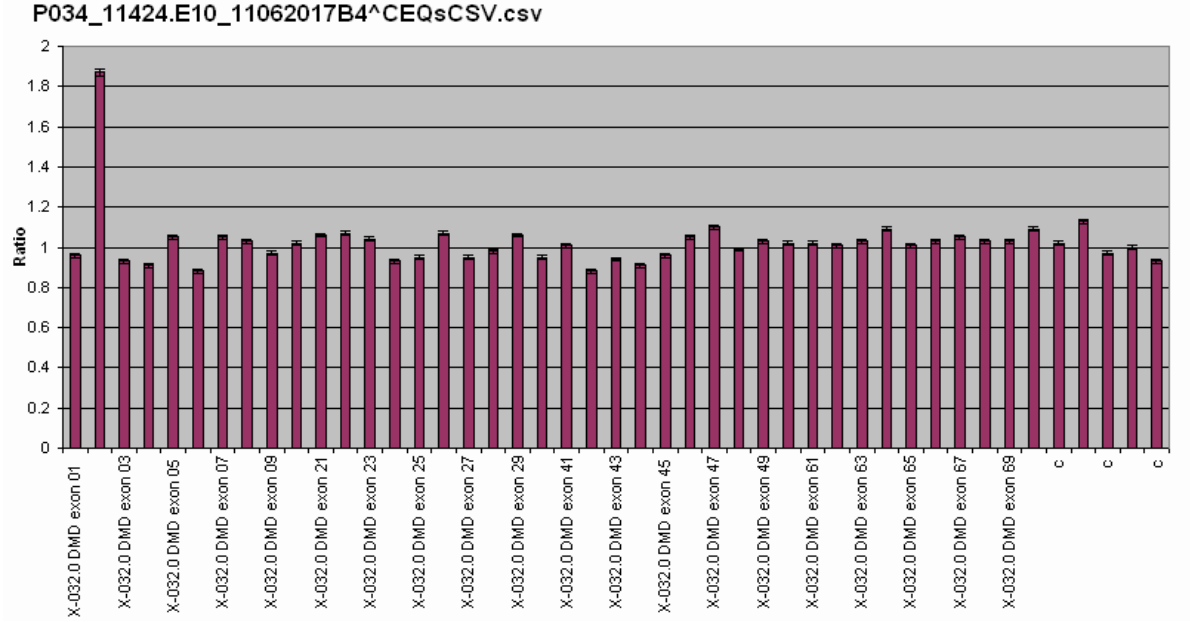
Sonuç: 51-52 ve 53. ekzonlarda delesyon saptandı.

OLGU 9: 11424 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 1

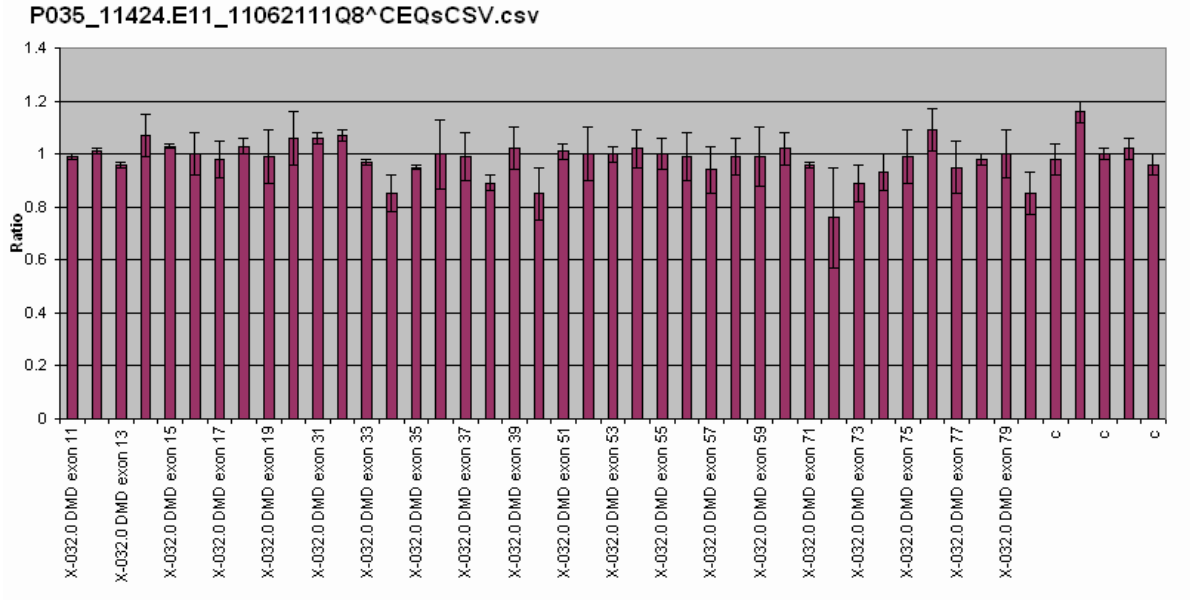
Kısa epikiz: Yüksek CK düzeyi

P034_11424.E10_11062017B4.xls



Şekil 4-21: Olgu 9' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11424.E11_11062111Q8.xls



Şekil 4-22: Olgu 9' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

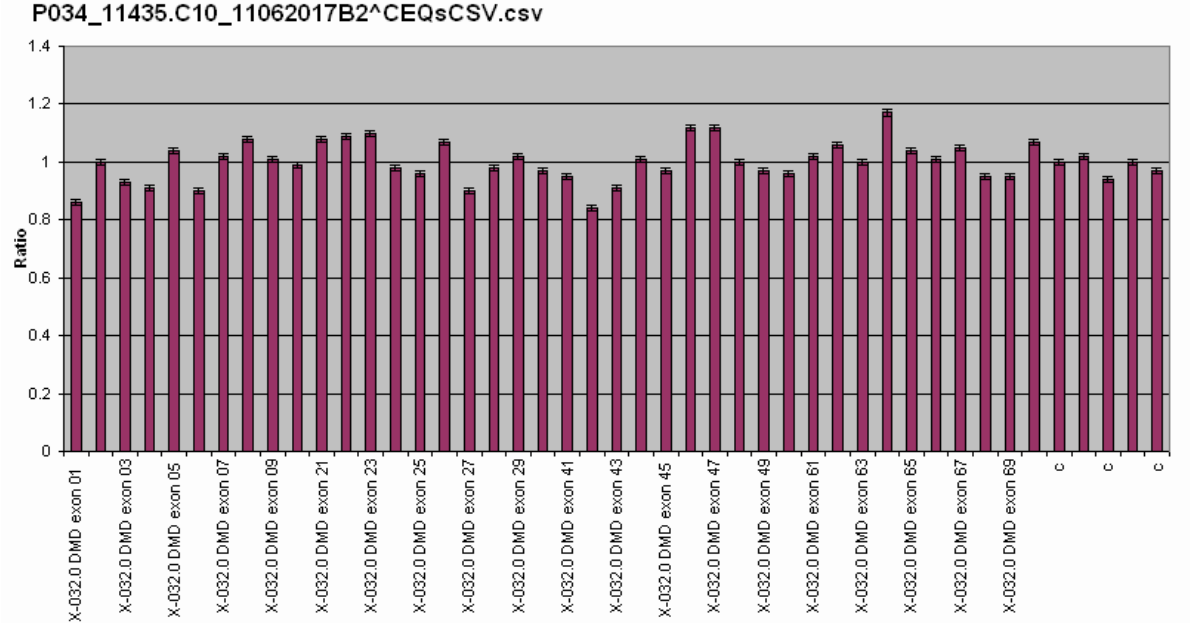
Sonuç: PZR çalışmasında normal gözlenirken MLPA sonucunda 2. Ekzonda duplikasyon saptandı.

OLGU 10: 11435 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 17

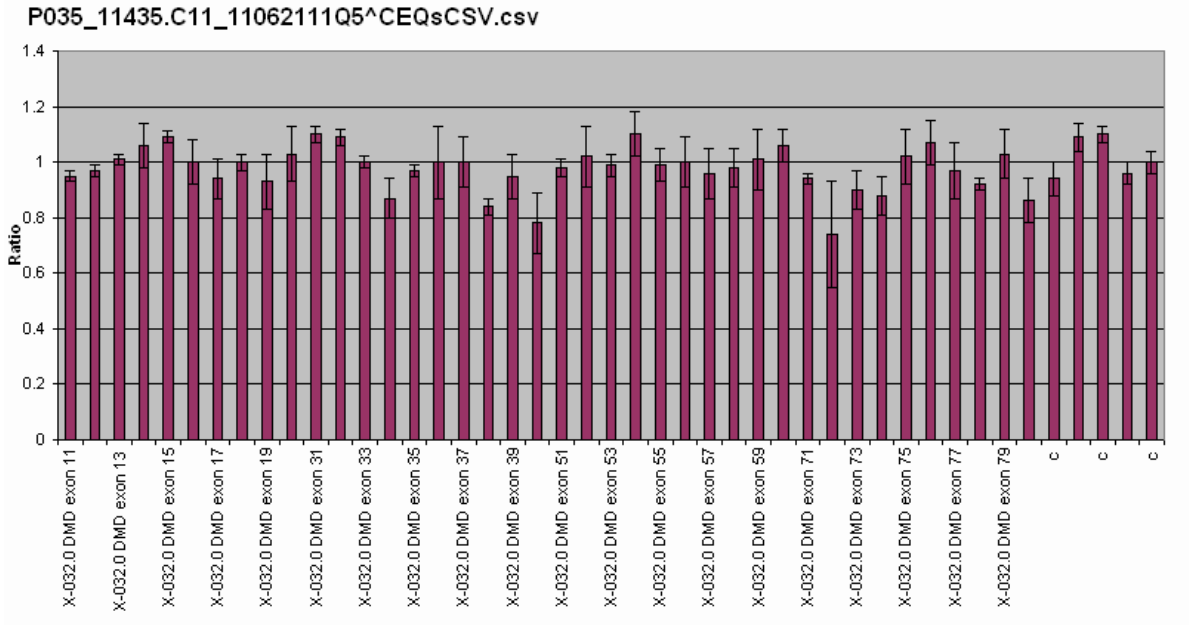
Kısa epikiz: -

P034_11435.C10_11062017B2.xls



Şekil 4-23: Olgu 10' nun P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11435.C11_11062111Q5.xls



Şekil 4-24: Olgu 10' nun P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

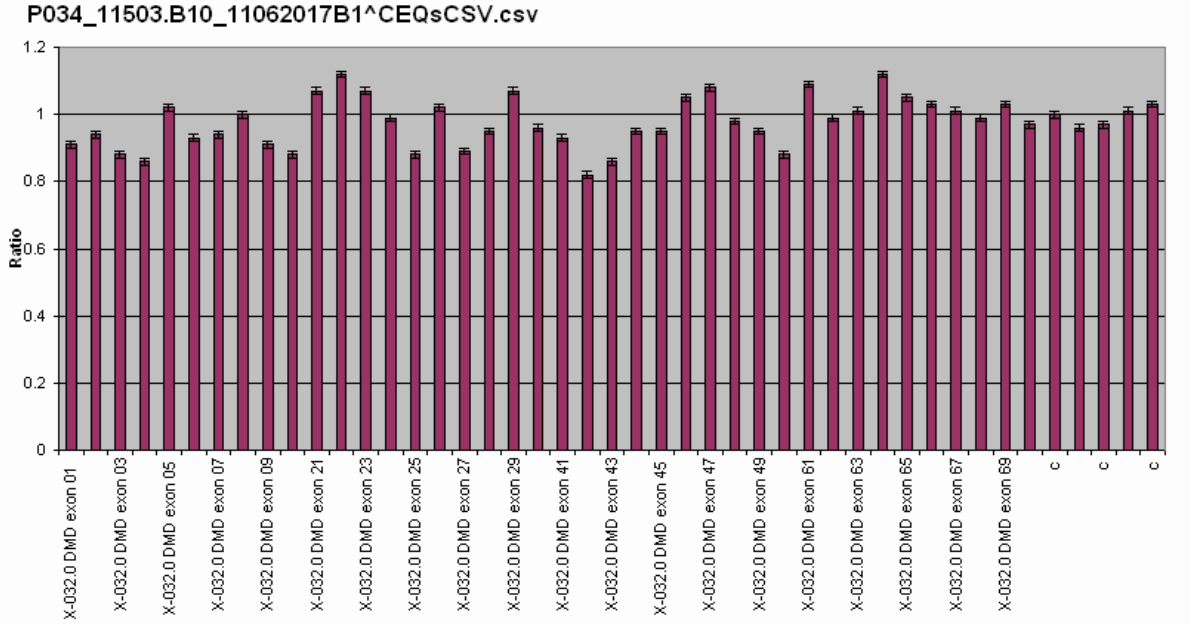
Sonuç: Delesyon saptanmadı.

OLGU 11: 11503 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 18

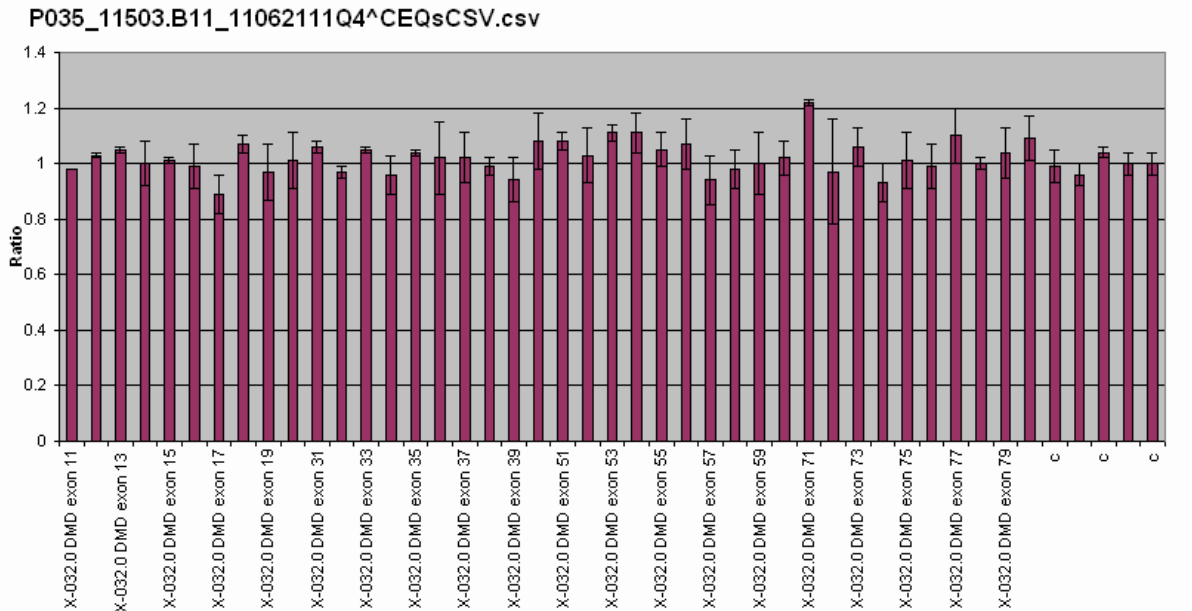
Kısa epikiz: -

P034_11503.B10_11062017B1.xls



Şekil 4-25: Olgu 11' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11503.B11_11062111Q4.xls



Şekil 4-26: Olgu 11' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

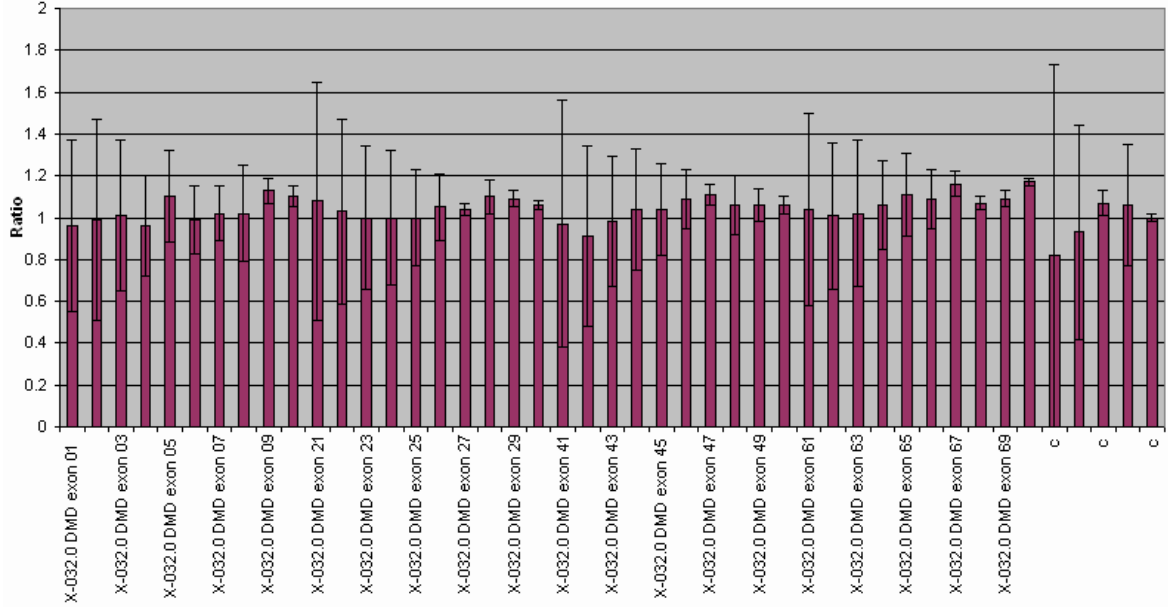
OLGU 12: 11596 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 7

Kısa epikiz: Anne ve baba amca çocukları. Dede ve 3 dayı kas hastası.

P034_596.C01_11071108XG.xls

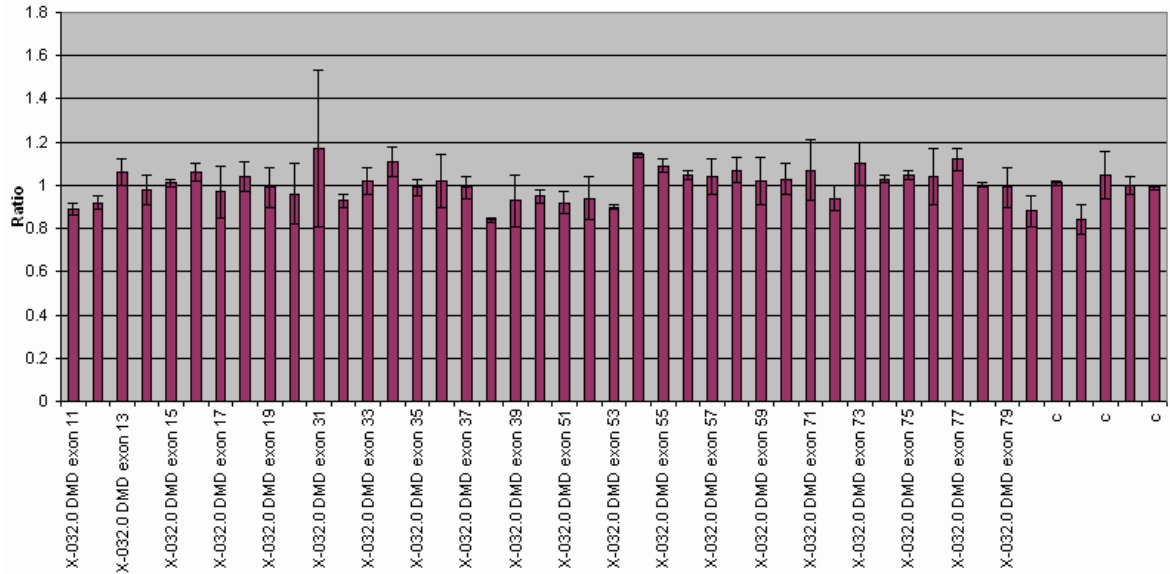
P034_596.C01_11071108XG^CEQsCSV.csv



Şekil 4-27: Olgü 12' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_596.B02_11071108YU.xls

P035_596.B02_11071108YU^CEQsCSV.csv



Şekil 4-28: Olgü 12' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

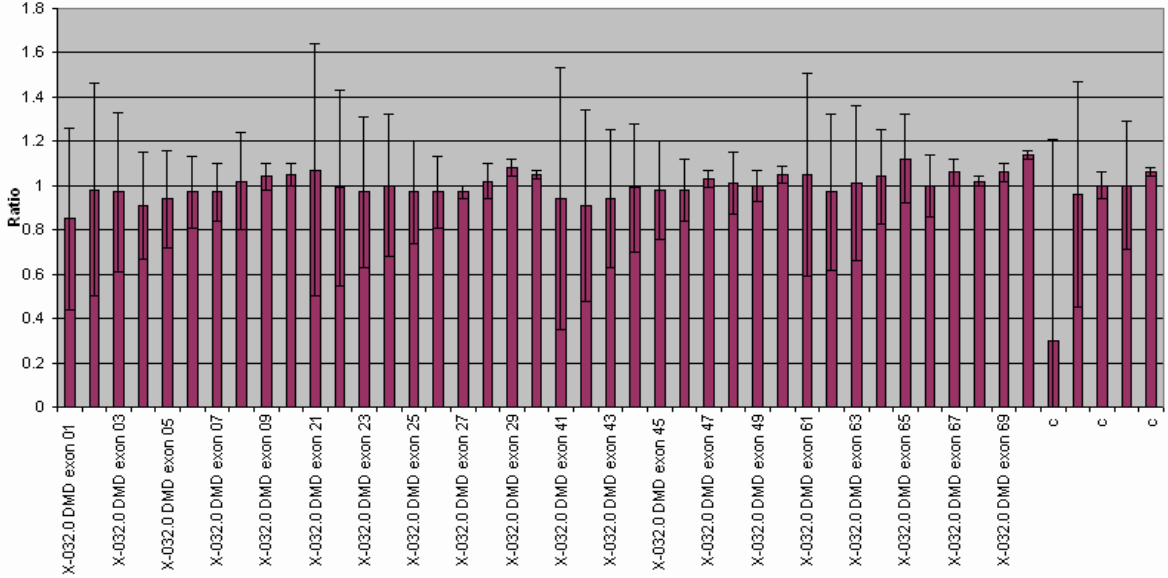
OLGU 13: 11617 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 16

Kısa epikiz: Anne – baba akraba evliliği.

P034 617.D12_11071108X8.xls

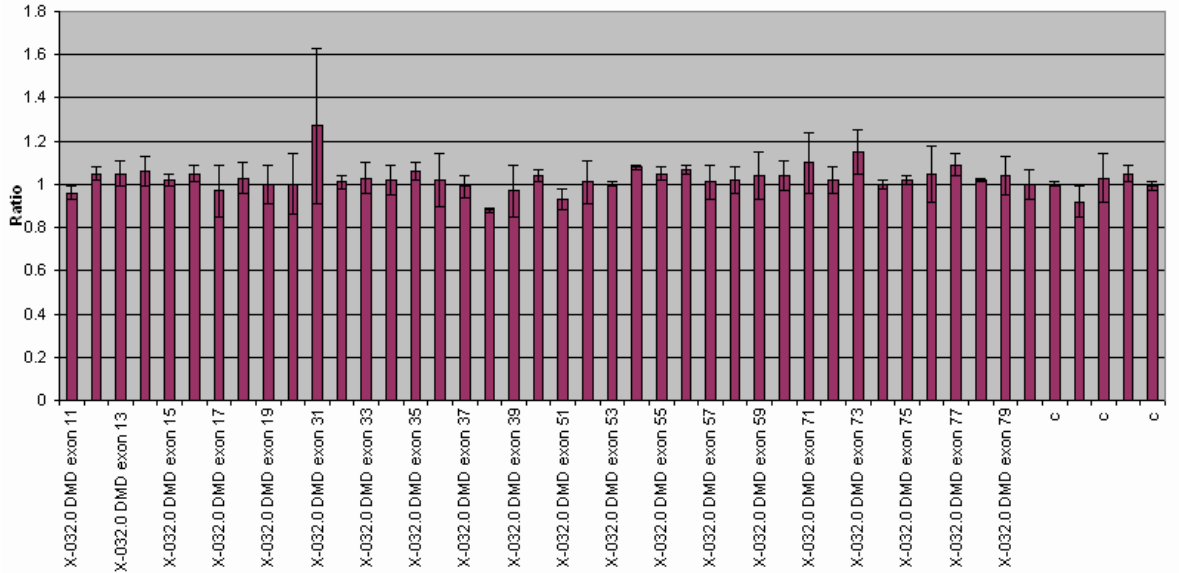
P034 617.D12_11071108X8^CEQsCSV.csv



Şekil 4-29: Olgu 13' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035 617.C02_11071108YV.xls

P035 617.C02_11071108YV^CEQsCSV.csv



Şekil 4-30: Olgu 13' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı

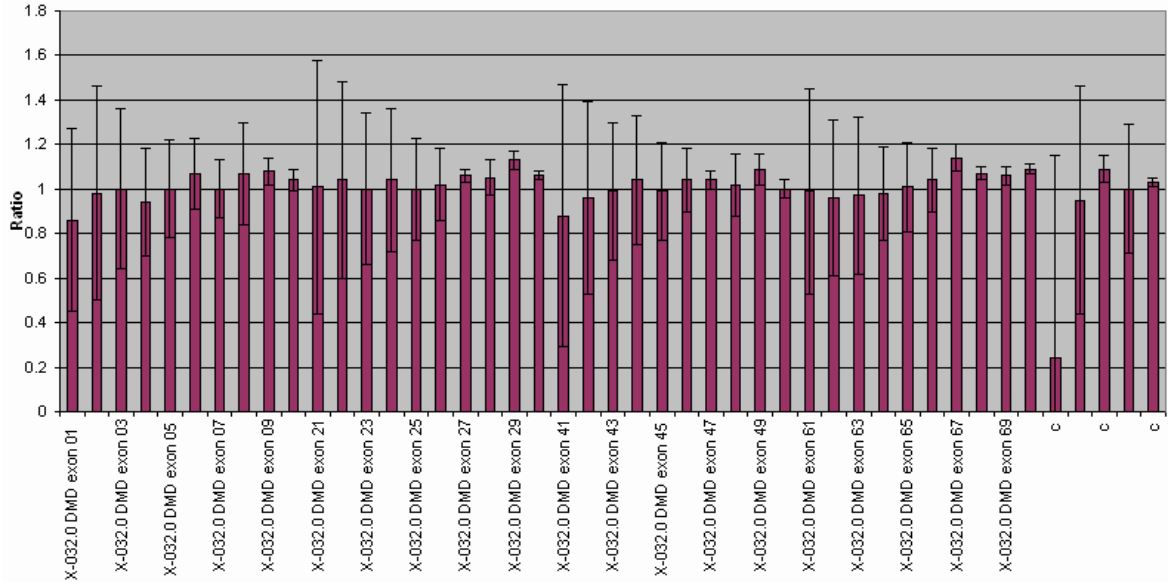
OLGU 14: 11651 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 3

Kısa epikiz: 3 yaşında yürüme bozukluğu gözlemlendi.

P034_651.E12_11071108XC.xls

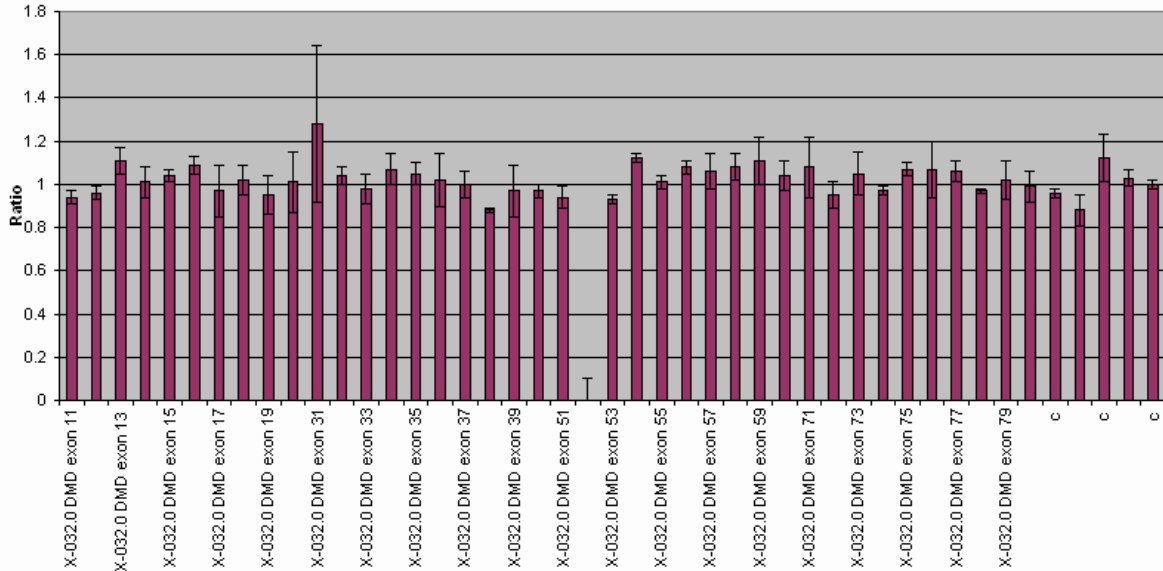
P034_651.E12_11071108XC^CEQsCSV.csv



Şekil 4-31: Olgu 14' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_651.D02_11071108YX.xls

P035_651.D02_11071108YX^CEQsCSV.csv



Şekil 4-32: Olgu 14' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

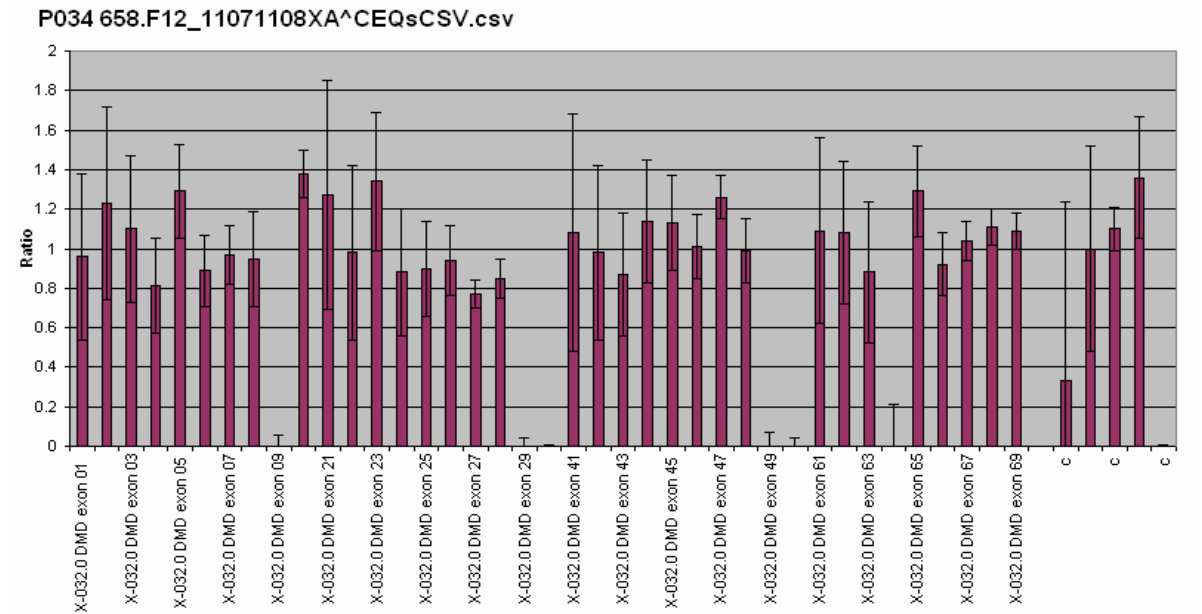
Sonuç: 52. ekzonda delesyon saptandı.

OLGU 15: 11658 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 3

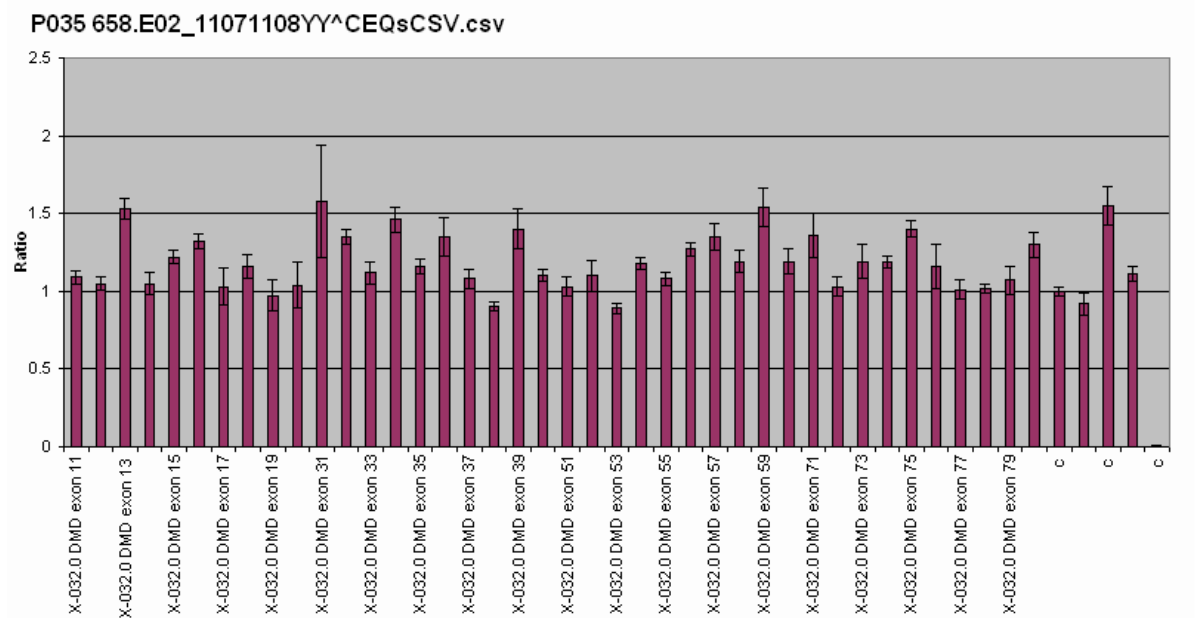
Kısa epikiz: Vefat eden dayı kas hastası.

[P034_658.F12_11071108XA.xls](#)



Şekil 4-33: Olgu 15' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

[P035_658.E02_11071108YY.xls](#)



Şekil 4-34: Olgu 15' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

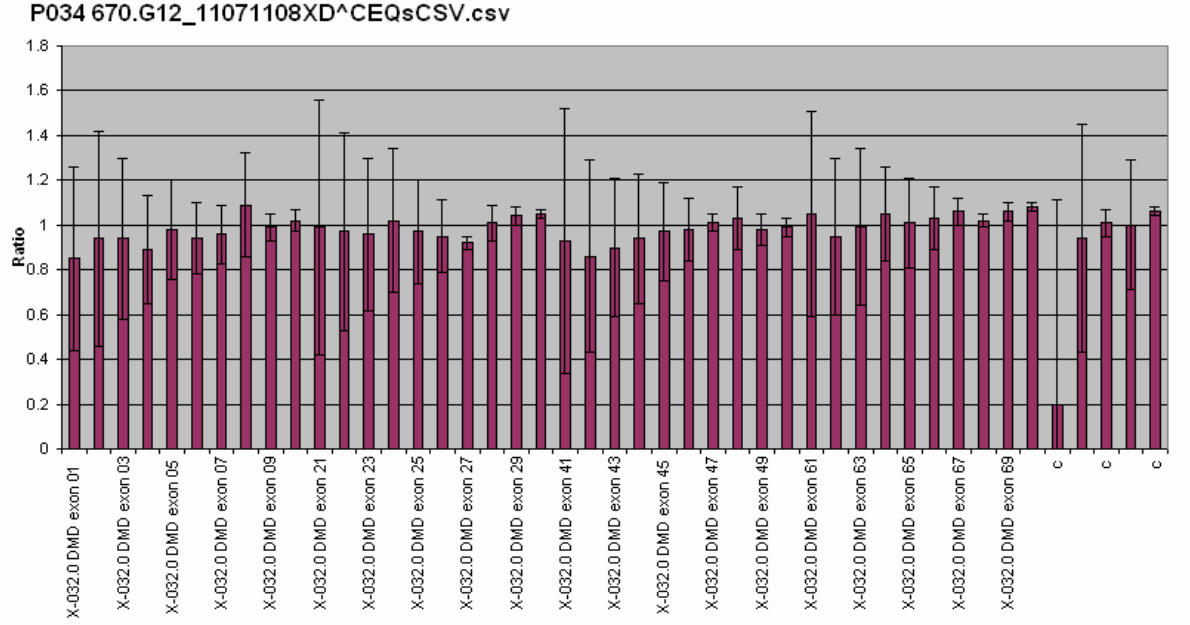
Sonuç: 9 ve 29. ekzonlarda delesyon saptandı.

OLGU 16: 11670 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 5

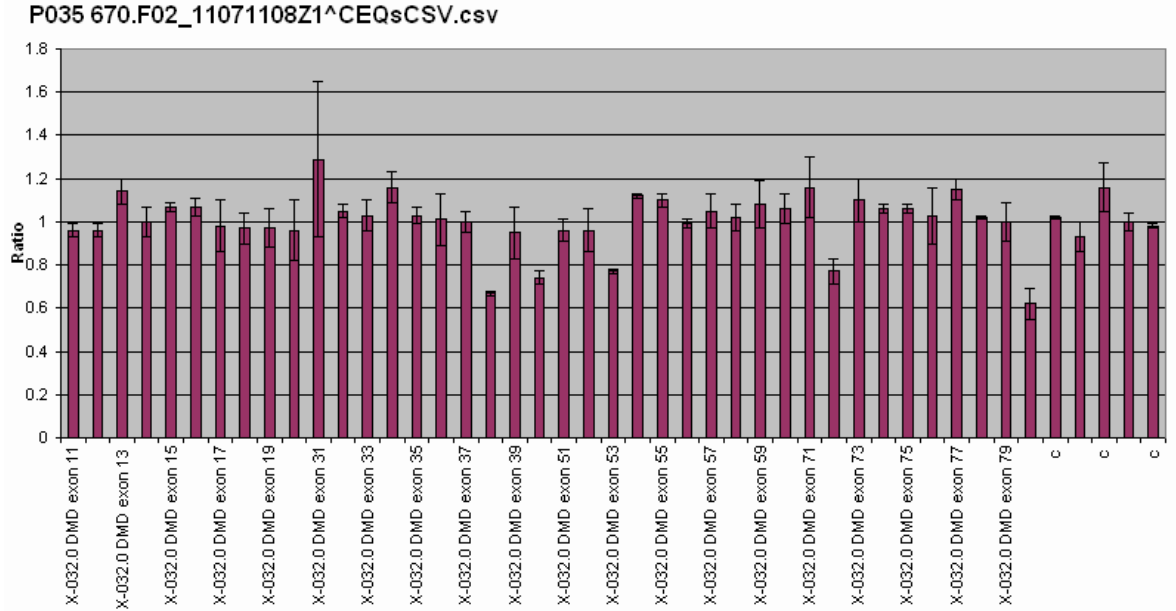
Kısa epikiz: -

P034 670.G12_11071108XD.xls



Şekil 4-35: Olgu 16' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035 670.F02_11071108Z1.xls



Şekil 4-36: Olgu 16' nın P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

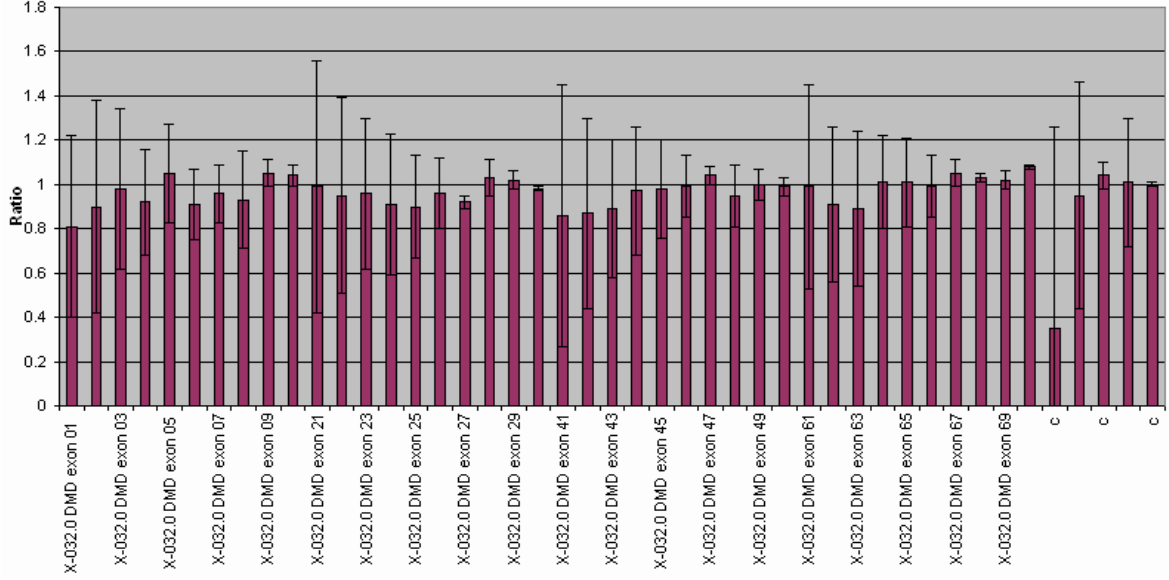
OLGU 17: 11718 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 1

Kısa epikiz: Yüksek CK düzeyi.

P034 718.E01_11071108XH.xls

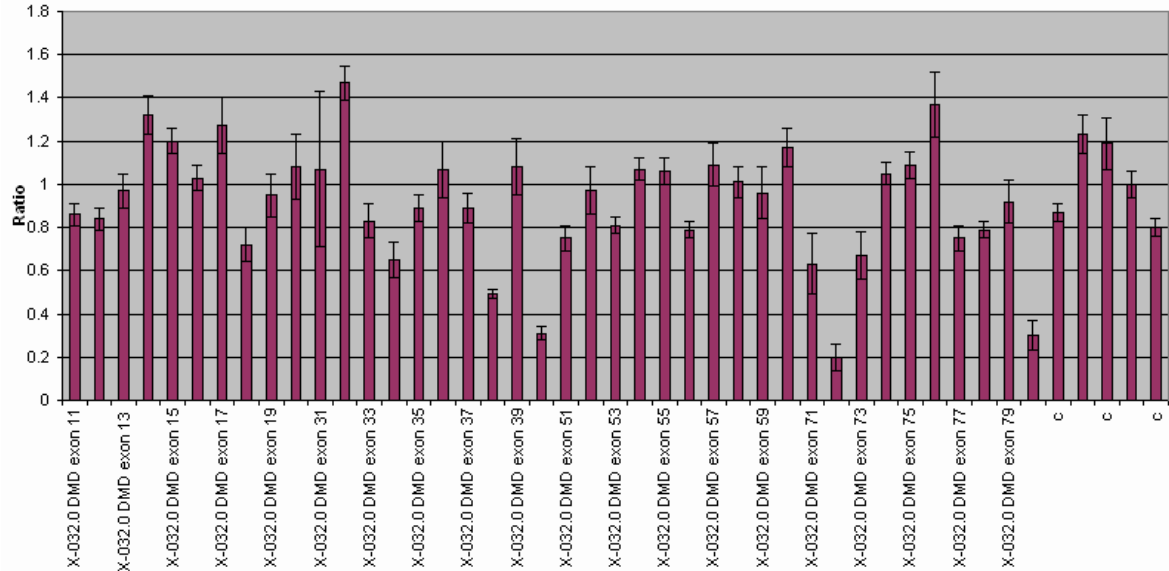
P034 718.E01_11071108XH^CEQsCSV.csv



Şekil 4-37: Olgu 17' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035 718.G02_11071108Z0.xls

P035 718.G02_11071108Z0^CEQsCSV.csv



Şekil 4-38: Olgu 17' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

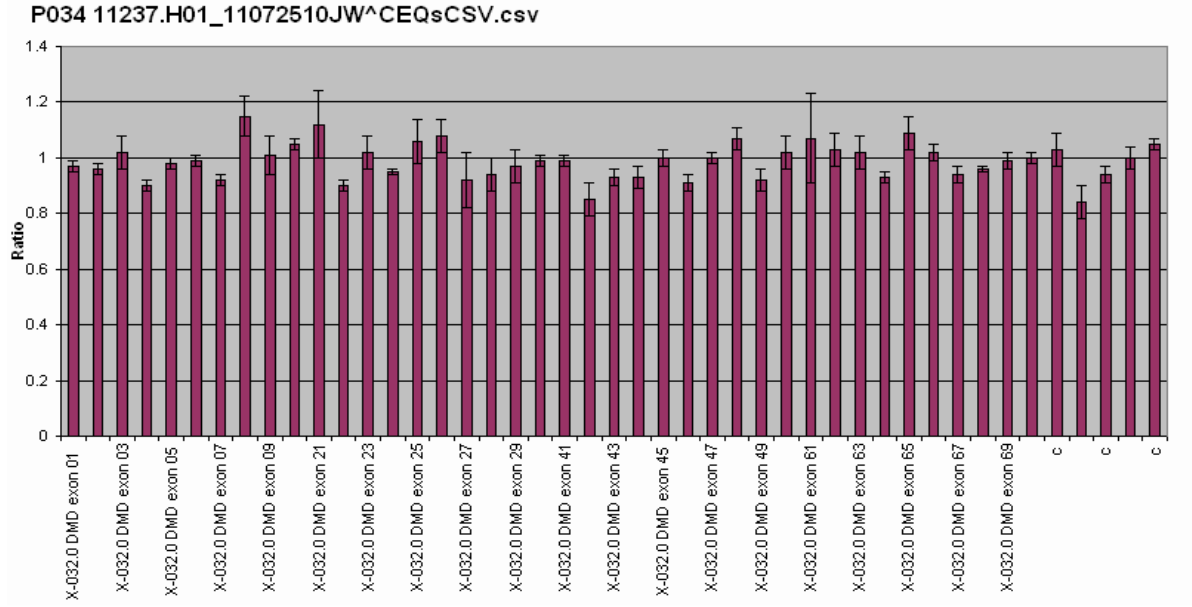
Sonuç: Delesyon saptanmadı.

OLGU 18: 11237 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 54

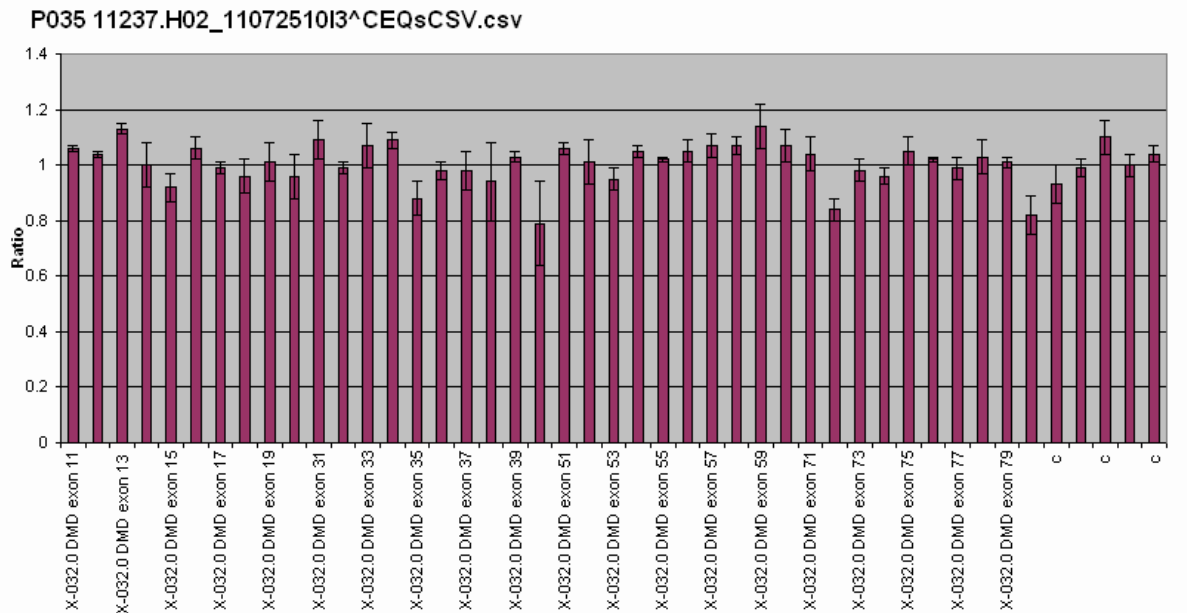
Kısa epikiz: Anne-baba akraba evliliği. Becker şüphesi.

P034.11237.H01_11072510JW.xls



Şekil 4-39: Olgu 18' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035.11237.H02_11072510I3.xls



Şekil 4-40: Olgu 18' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

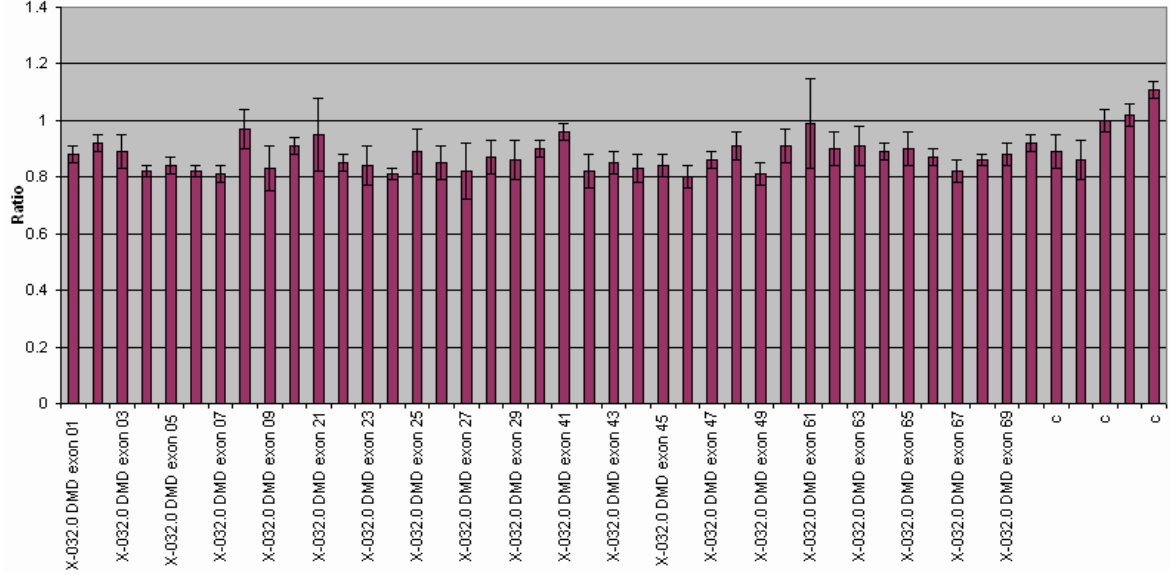
OLGU 19: 11273 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 2 aylık

Kısa epikiz: Kreatinin kinaz yükseklığı, Hipotoni.

P034 11273.G01_11072510JU.xls

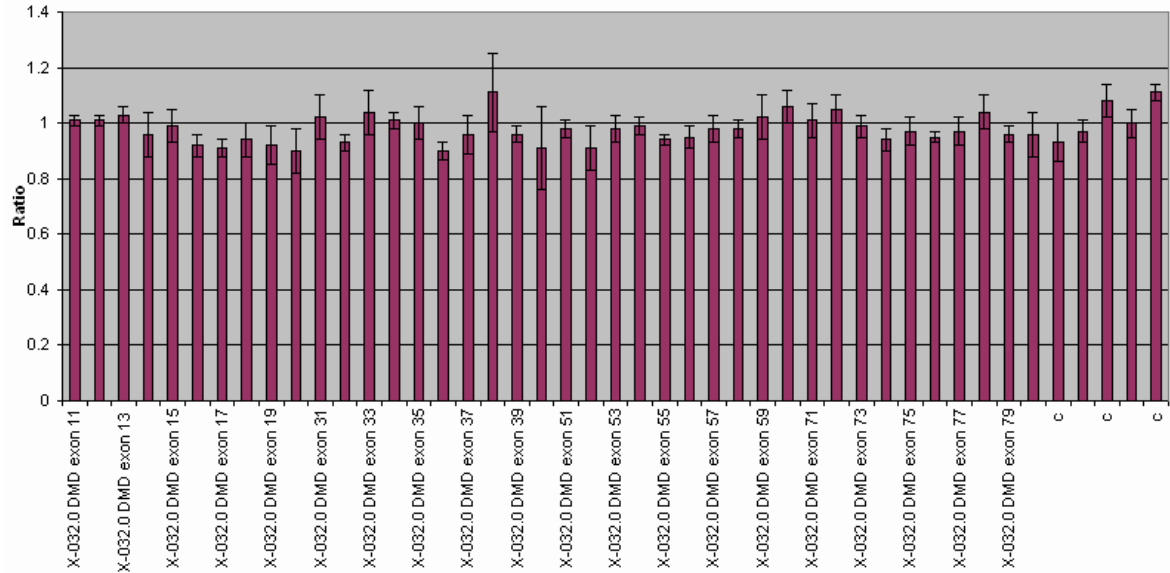
P034 11273.G01_11072510JU^CEQsCSV.csv



Şekil 4-41: Olgu 19' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035 11273.G02_11072510I2.xls

P035 11273.G02_11072510I2^CEQsCSV.csv



Şekil 4-42: Olgu 19' un P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

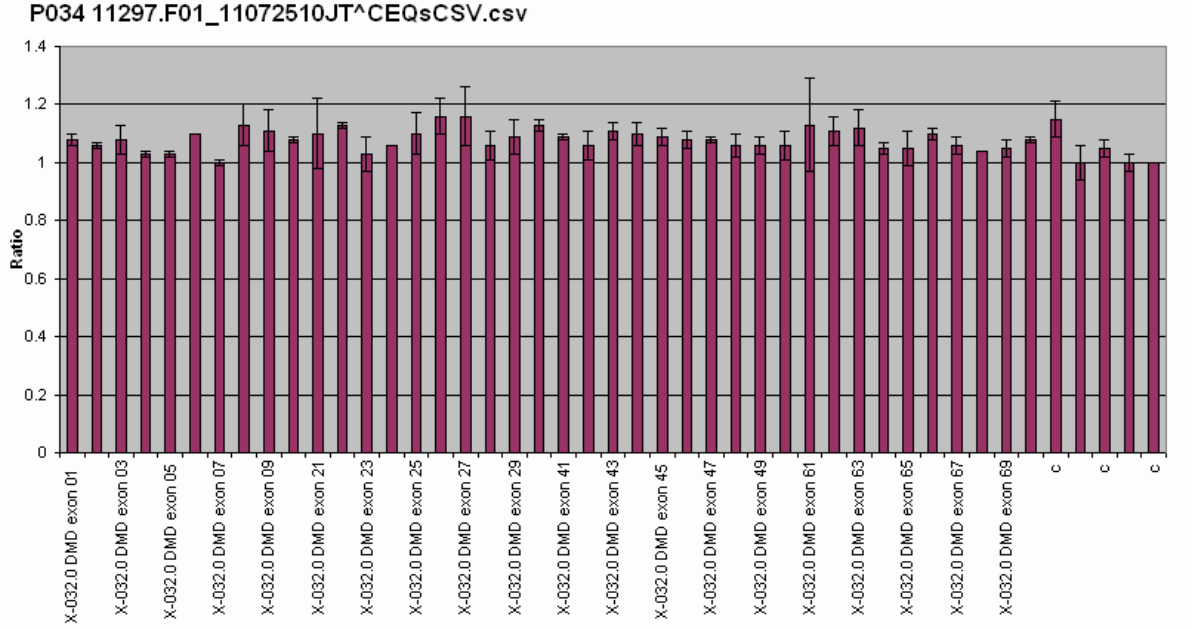
Sonuç: Delesyon saptanmadı.

OLGU 20: 11297 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 8

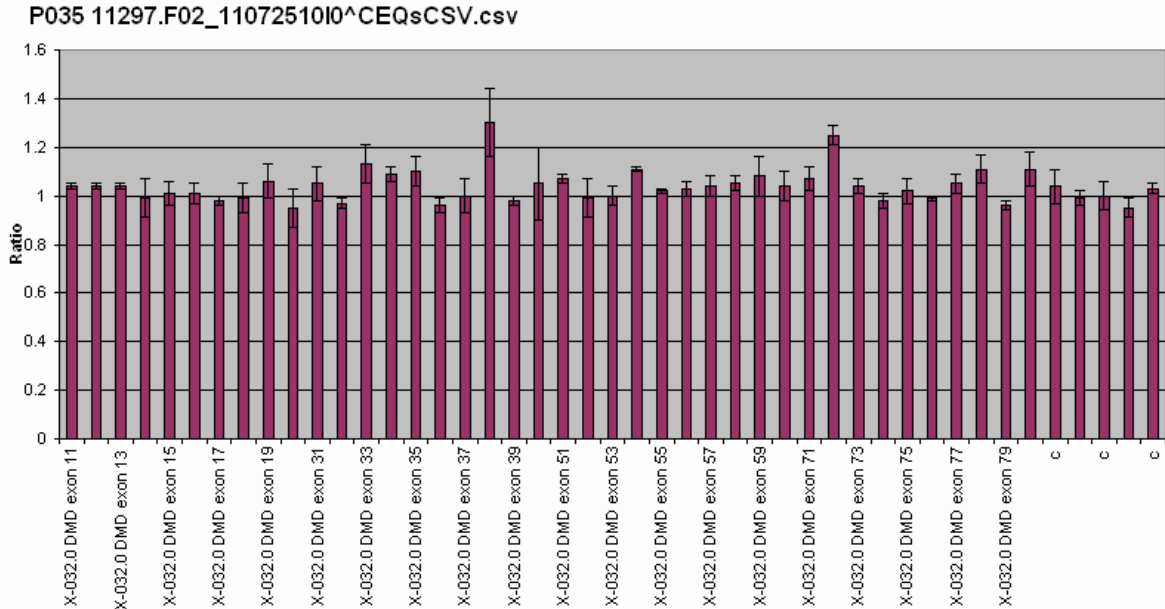
Kısa epikiz: -

P034.11297.F01_11072510JT.xls



Şekil 4-43: Olgu 20' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035.11297.F02_11072510I0.xls



Şekil 4-44: Olgu 20' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

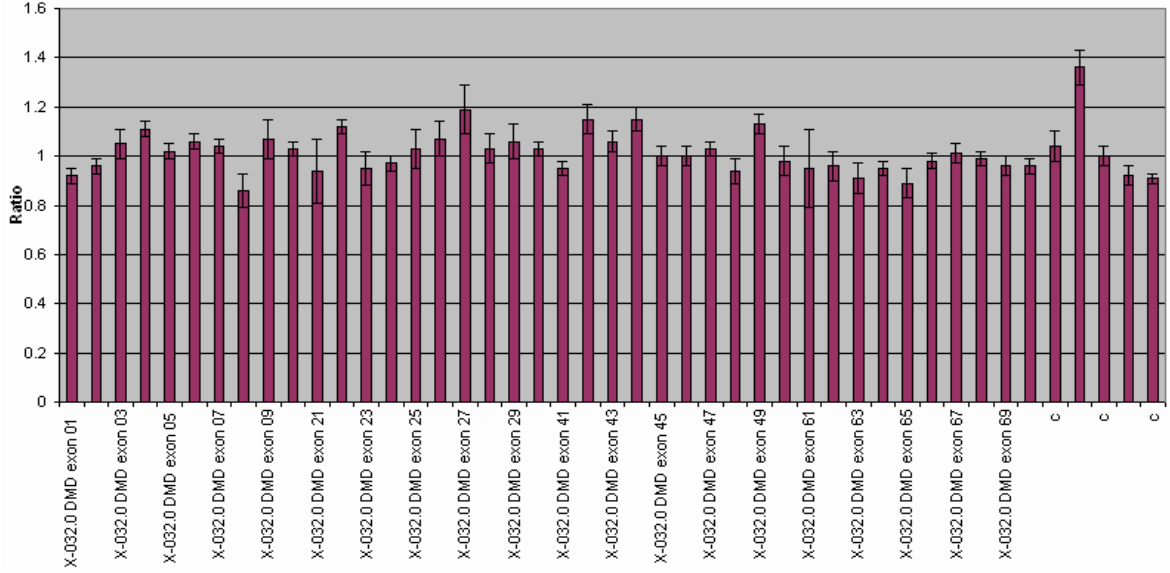
OLGU 21: 11339 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 50 yaşında takip ediliyor.

Kısa epikiz: Becker şüphanesi.

P034_11339.E01_11072510JS.xls

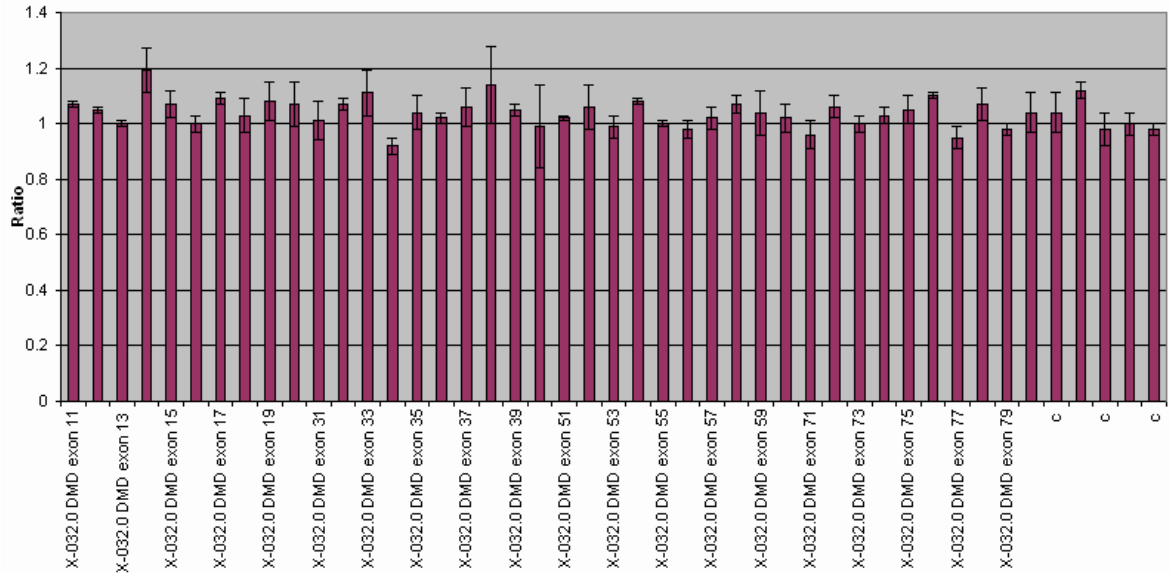
P034_11339.E01_11072510JS^CEQsCSV.csv



Şekil 4-45: Olgu 21' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11339.E02_11072510HZ.xls

P035_11339.E02_11072510HZ^CEQsCSV.csv



Şekil 4-46: Olgu 21' in P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

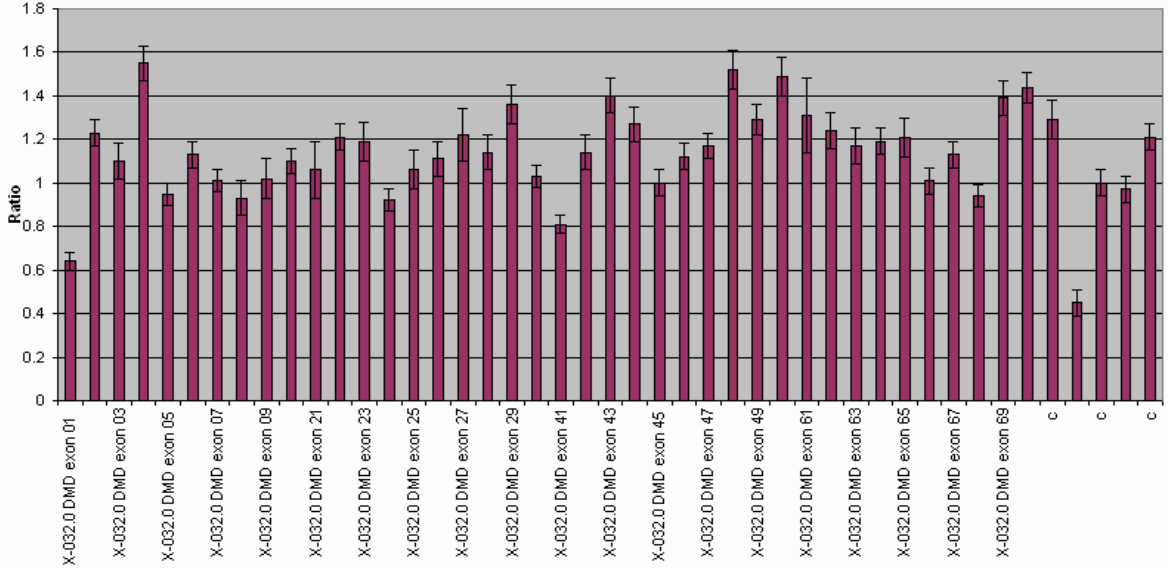
OLGU 22: 11349 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 44

Kısa epikiz: Ayaklarda güçsüzlük. Becker şüphesi.

P034_11349.D01_11072510JQ.xls

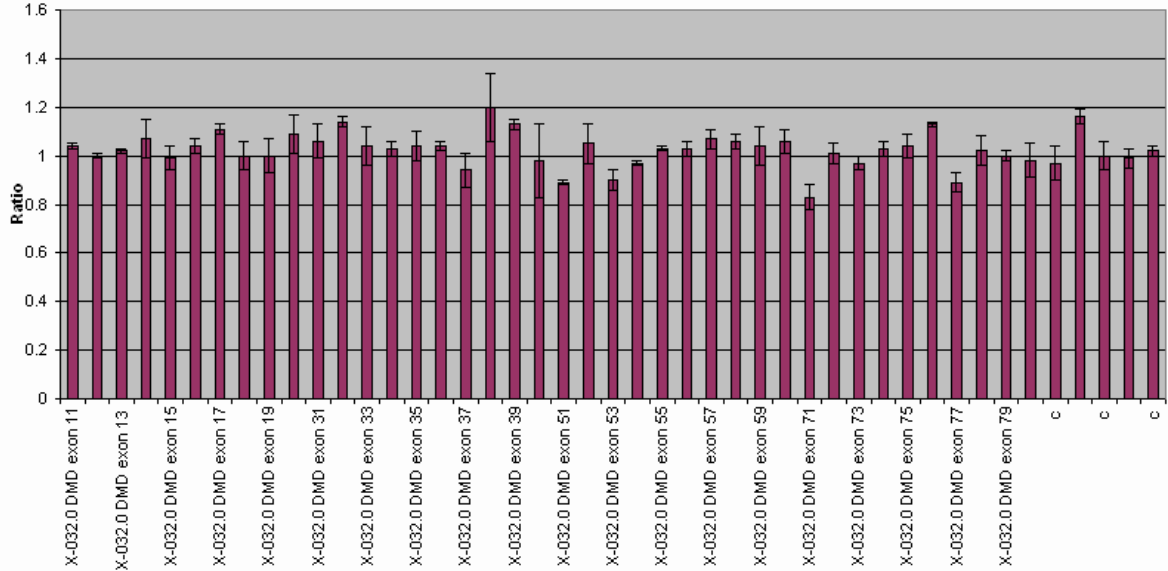
P034_11349.D01_11072510JQ^CEQsCSV.csv



Şekil 4-47: Olgu 22' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

P035_11349.D02_11072510HY.xls

P035_11349.D02_11072510HY^CEQsCSV.csv



Şekil 4-48: Olgu 22' nin P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: Delesyon saptanmadı.

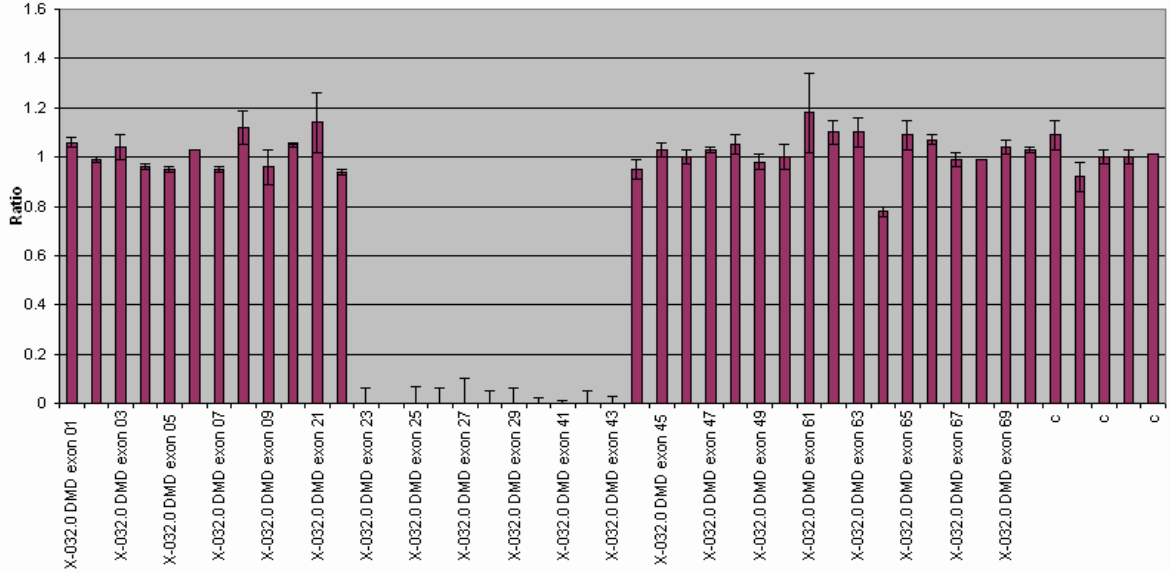
OLGU 23: 11358 numaralı hasta:

Hastalığın ortaya çıkış yaşı: 6

Kısa epikiz: Dayı kas hastası.

[P034.11358.C01_11072510JP.xls](#)

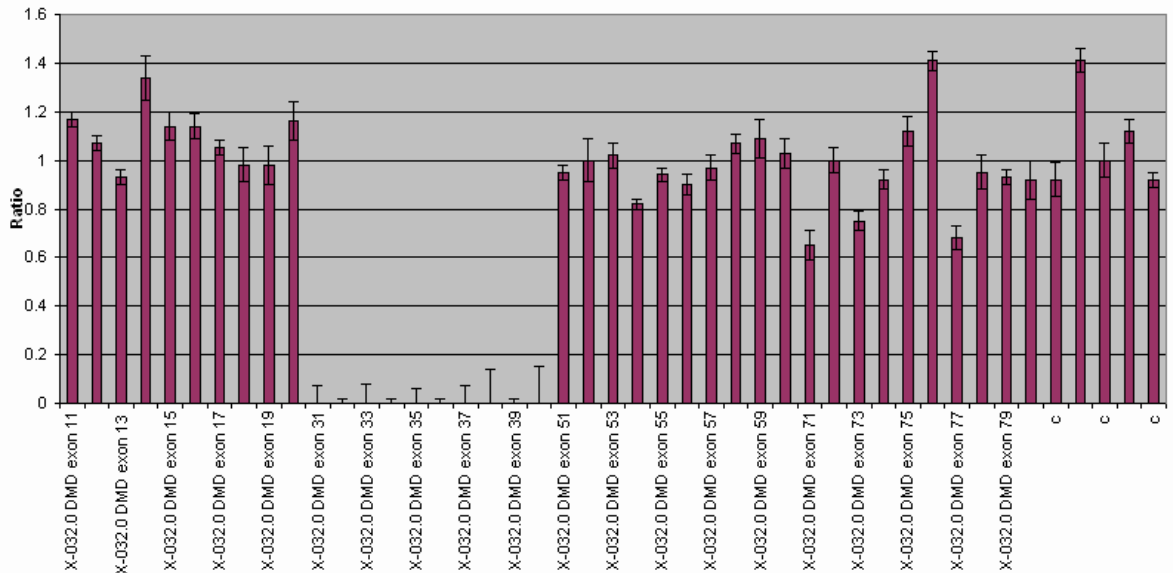
P034.11358.C01_11072510JP^CEQsCSV.csv



Şekil 4-49: Olgu 23' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

[P035.11358.C02_11072510HX.xls](#)

P035.11358.C02_11072510HX^CEQsCSV.csv



Şekil 4-50: Olgu 23' ün P034 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz baz grafiği.

Sonuç: PZR sonucu 43. ekzon delesyonu saptandı. MLPA sonucunda ise 23. ve 43. ekzonlar arasında homozigot delesyon saptandı.

5. TARTIŞMA

DMD/BMD, toplumda 3500’ de 1 görülen, etkin tedavisi olmayan, ölümcül klinik seyreden, X’e bağlı çekinik kalıtım gösteren bir kas hastalığıdır. Bu nedenlerle DMD/BMD tanısı almış çocuğu olan ailelere, doğum öncesi genetik tanı önerilir. İzole olgularda, annenin taşıyıcılık olasılığı 2/3’tür (%66). Bu yüzden gebelik için genetik danışma alınması gereklidir. Ve olası gebeliklerde genetik tanı konması doğacak olan bebek için hayati önem taşıyabilir. İzole olguların 1/3’ü yeni mutasyon sonucu oluştuğundan, anne ve diğer kadın akrabalarda da taşıyıcılık durumu olmaz. Böyle ailelerde anne dışındaki kadın akrabalarda doğum öncesi tanıya gerek yoktur. Ancak annede germinal mozaikizm dışlanmaması gerektiğinden, her hamilelikte doğum öncesi tanı önerilmelidir. Doğum öncesi tanı önerisinin doğru yapılabilmesi, olguların ailelerindeki kadınların taşıyıcılık durumlarının doğru tespit edilmesine bağlıdır.

Çalışmamıza DMD/BMD tanısı amacıyla İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı’na 2009-2011 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış 30 adet kan örneği dahil edilmiştir.

DMD/BMD hastalarında büyük oranda gen delesyon (%60-65) ve duplikasyon (%10-15) mutasyonları gözlenmektedir. Günümüzde mutasyonların en sık gözlendiği eksonların incelendiği 2 aşamalı Multiplex PZR yöntemi rutin tanı amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (16,27,29). Delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonların yaklaşık %98’i genin, “Hot spot” olarak adlandırılan, 5’ ucu ve merkez bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Hot spot bölgede yer alan eksonlar 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 ve PM bölgesidir. Ve bu bölgelere PZR ile bakılarak tanı konmaya çalışılmaktadır. Distrofin geni içerisinde bulunan 79 ekzon içerisinde sadece 18 ekzona bakılabildiği için arada kalan delesyonların saptanması mümkün olmamaktadır. Bu durum neticesinde hastalık sahibi olan fakat moleküler test ile tanı konulamayan hastalar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca DMD/BMD’ ye yol açabilen duplikasyonların gösterilebilmesi olanaksızdır. PZR yönteminin bir diğer dezavantajı da taşıyıcılık tespiti yapamamasıdır. Bu nedenle hayati önem taşıyan genetik danışma; ailelerde taşıyıcılık bakılmadığı için verilememekte ancak bir sonraki gebelikte fetus için genetik tanı konmaya çalışılabilmektedir.

MLPA yöntemi, diğer analiz yöntemleriyle karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahiptir. Nokta mutasyonlarını gösteren sekans analizi ve DHPLC gibi yöntemler kopya sayısı değişikliklerini gösteremez. Southern blot, birçok değişimi gösterebilse de, küçük delesyonları her zaman yakalayamaz ve rutin bir analiz yöntemi olarak güvenilir bir şekilde kullanılamaz. İyi tanımlanmış delesyonlar PCR ile gösterilebilirler, ancak delesyonların çoğunda kopma noktası kesin olarak bilinemez ve duplikasyonlar gözlenemez.

MLPA'nın multipleks bir teknik olması ve 50-70 baz kadar küçük dizileri analiz edebilmesi FISH tekniğine oranla daha ayrıntılı analiz imkanı sağlar . MLPA pürifiye edilmiş DNA ile yapılır ve aCGH yöntemine göre çok daha kolay ve maliyeti uygundur. MLPA yöntemi genom-boyu araştırmalar için uygun olmasa bile, bir çok rutin uygulama için mikrodizin temelli tekniklere alternatif bir yöntemdir. Multipleks olması nedeniyle bir deneyde 40-45 hedef bölgeye yönelik sonuç verebilir ve klinik sorunun türüne göre tek bir MLPA deneyi tanısal yeterliliğe sahip olabilir . MLPA deneyleri uygulaması kolay ve zahmetsizdir. Çok sayıda örneğin aynı anda çalışılmasına fırsat verir. MLPA yönteminin duyarlılığı yüksektir. Kitteki problemlerin lokalizasyonuna göre rezolüsyon yükselir ve bir genin hangi eksonlarında kopya sayısı değişikliği bulunduğu ayırt edilebilir. Kısa dizileri gösterebildiği için tek bir eksonun kopya sayısı değişikliğini yakalayabilir.

Lai ve arkadaşları da MLPA tekniğini klasik çoklu PZR ile karşılaştırmıştır. Bu amaçla 45 DMD tanılı ve 20 BMD tanılı olguda her iki yöntemin de mutasyon saptamadaki gücünü karşılaştırmışlar, MLPA'nın çoklu PZR'den daha fazla delesyon saptayabildiğini belirtmişlerdir. MLPA yönteminin 2 olguda tek ekson delesyonu için yanlış sonuç verdiğini ve tek ekson delesyonlarının mutlaka PZR ile doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Hasta grubumuzun önemli bir kısmı delesyon gözlenmeyen hastalar arasından seçildi. Klinik olarak DMD / BMD kliniğine uygun hastaların atlanma olasılığı ve konulan tanıların doğruluk oranlarını arttırmak için MLPA yönteminin seçilmesi tanısal verimi artıracak, günlük klinik uygulamalarda tetkik seçimi aşamasında mutlaka yapılması gereken fayda-maliyet analizi yönünden de daha avantajlı olacaktır.

Sonuçların karşılaştırılması neticesinde MLPA'nın multiplex PZR'a göre delesyon yakalama kapasitesinin daha yüksek olduğu ve duplikasyonların tespiti ile ayırıcı tanıyı güçlendirdiği ortaya konmuştur. Böylelikle çıkan sonuçların kesinliği ile genotip-fenotip ilişkilendirmesi için daha net veriler elde edilmeye başlanmıştır. Delesyon ve duplikasyonların neden olduğu fenotiplerin kıyaslanması ve ilerleyen zamanlarda başarılması muhtemel olan ekzon atlama yöntemlerinin uygulanabilmesi için detaylı veriler toplanmaya başlanmıştır. Annelerde taşıyıcılık tespiti ile DMD/BMD hastalığının tedavisi olmasa da önlenilmesi hedefi ile artık sadece hasta bireye tanı koymayı değil ailede taşıyıcıların tespiti de daha kolay hale gelmiştir.

Optimizasyon çalışmaları neticesinde MLPA'nın kullanıma başlanması ile laboratuvarın tanısal teste vermiş olduğu doğruluk oranı artırılarak, iş ve maliyet yükü hafifletilmiştir. Ayrıca bireyin sağlığı ön plana çıkarılarak insanlara daha yüksek sağlık standartlarında hizmet verilebilmesi sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hoffman EP ve ark. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;**51**:919-928
2. Cohn RD, Campell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000;**23**:1456-1471
3. Blake DJ, Weir A; Newey SE, Davies KE, Function and genetics of dystrophin and dystrophin related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;**82**:291-329
4. Jansen B., et al. (2005):MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene; potentials and pitfalls. *Neurogenetics*.**6**:29-35
5. Lai K.K.S., et al (2005): Detection exon deletions and duplications of DMD gene using MLPA. *Clin. Biochem.* **39**:367-372
6. Sarnat H.B. Muscular dystrophies. In Berhman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed. Saunders; **2004**:69-2060.
7. Mc Nally EM, Tovbin JA. Cardiomyopathy in Muscular Dystrophy Workshop (Workshop report).*Neuromuscular Disorders* 2004; **14**:442-48
8. Kılıç Z. Nöromusküler Hastalıklarda Kardiak Etkilenme. *T Klin J Ped Sp Iss* 2003; **1**:263-67.
9. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1990;**46**:672-681.
10. Quan F, Janas J, Fejel SET, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:160-165.
11. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: Further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet* 1981;**33**:513-518.
12. Parent A.D, (2005): Duchenne de Boulonge, Parkinsonism *Relat Disord.* **11**; 411-412
13. Bakker E, Van Ommen B.G.J. Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (DMD and BMD) In: Emery A.E.H. *Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics*, 1th Ed. England ,John Wiley& Sons Ltd, **1998**; 59-85

14. Beggs A, Kunkel L.M. (1990): Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophies. *J.Clin. Invest.* **85(3)**:613-9
15. Emery A.E.H. (ed) (1998): *Neuromuscular disorders: Clinical and Molecular genetics*. Chapter 3. Baker E., Van Ommen G.J.B. Chichester, Wiley.
16. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J Biol Chem* 1995;**270**:27305-27310.
17. Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ. Structure of WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* 2000;**7**:634-638.
18. Nudel U., Yaffe D. (2001): The duchenne Muscular Dystrophy Gene: Structure, Evolution, Expression and function of the products. http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day/book/uri_nudel.pdf
19. Chaturvedi L.S., Mkhherjee M., Srivastava S., Mittal R.D., Mittal B. (2001): Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med*. Dec 31-33.
20. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. (2003): Dystrophin and mutations: one gene several proteins, multiple phenotypes. *Review Neurology* **2**; 731-739.
21. Emery A.E.H. (ed) (1998): *Neuromuscular disorders: Clinical and Molecular genetics*. Chapter 3. Baker E., Van Ommen G.J.B. Chichester, Wiley.
22. Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005;**7**:317-326
23. Finsterer J, Stöllberger C. The Heart in Human Dysrophinopathies. *Cardiology* 2003; **99**:1-19.
24. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002;**359**:687-95.
25. Nudel U., Yaffe D. (2001): The duchenne Muscular Dystrophy Gene: Structure, Evolution, Expression and function of the products. http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day/book/uri_nudel.pdf
26. Hoshino S., Ohkoshi N., Masahiko W. (2000): Immunohistochemical staining of dystrophin on formalin-fixed paraffin-embedded sections in Duchenne/Becker muscular dystrophy and manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* **10(6)**:425-9.
27. Elles R., Mounthford R. (ed) (2004): *Molecular diagnosis of genetic diseases*

- 2nd ed. Chapter 8, Mann K., Prenatal detection of chromosome aneuploidy by QF-PCR; Chapter 16, Kneppers A.L., Ginjaar B., Bakker E., Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. Humana press USA
28. Clemens P.R., Fenwick R.G., Chamberlain J.S., Gibbs R.A., de Andrade M., Chakraborty R., Caskey C. T. (1991): Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **49**; 951-960
 29. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier JE, Nguyen PN, Caskey C.T. (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* **16**(23):11141-56.
 30. Ioannau P., Christopulos M., Panayides K., Middelton L. (1992): Detection of duchenne muscular dystrophy carriers by quantitative multiplex PCR. *Neurol.* **42**;1783-1790.
 31. Sbiti A., (2002): Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Morroccan Patients. *J. Biomed & Biotech.* 158-160.
 32. de Vries BBA, White SM, Knight SJL, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; **38**: 145–150.
 33. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
 34. <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx>
 35. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993;**16**:536-538.
 36. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 1990;**272**:557-560.
 37. Ashton E.J, Yau SC, Deans ZC, Abbs SJ. (2008): Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. *Eur J Hum Genet.* **16**(1):53-61.
 38. Gatta V., Scarciolla O., Gaspari A.R., Palka C., De Angelis M.V., Di Muzio A., Guanciali-Franchi P., Calabrese G., Uncini A., Stuppia L. (2005): Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.*

- 117(1):92-98.**
39. Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M. Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet* 2008; **53**:215-219.
 40. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard F.H. (ed) (2007) *Thompson&Thompson Genetics in Medicine, Chapter 7, 12 7th Edition.* Saunders.
 41. Sarnat H.B. Muscular dystrophies. In Berhman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Eds. *Nelson Textbook of Pediatrics, 17th ed.* Philedelphia, Saunders; 2004; 2060-69
 42. Norwood FLM, Sutherland-Smith AJ, Keep NH, Kendrick-Jones J. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 2000;**8**:481-491.
 43. Kılıç Z. Nöromusküler Hastalıklarda Kardiyak Etkilenme. *T Klin J Ped Sp Iss* 2003; **1**:263-67.
 44. Dellafave L.M, Mc Nally E.M. Cardiomyopathy in neuromuscular disorders. *Progress in Pediatric Cardiology* 2007; **24**:35-46.
 45. Öge A.E, Bahar S.Z (ed) (2004): *İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Ders Kitabı, Bölüm 33, Serdaroğlu P., Deymeer F. Kas ve Nöromusküler Kavak Hastalıkları.*
 46. Bushby K, Bourke J, Bullock R, Eagle M, Gibson M, Quinby J. The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Current Paediatrics* 2005; **15**:292-300.
 47. Kinali M, Manzur A.Y, Muntoni F. Recent developments in the Duchenne Muscular dystrophy. *Paediatrics and Child Health* 2008; **18**:22-6.
 48. Ligon A., Kashork C.D, Richards C.S, Shaffer L.G. (2000): Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Hum Genet.* **8(4)**:293-8.
 49. Yau S.C., Bobrow M., Mathew C.G., Abbs S.J. (1996): Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J.Med Genet.* **33(7)**:550-558.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU HASTA BİREYLER İÇİN

Çalışma kapsamında, DMD / BMD hastalarından ve 1. derece yakınlarından EDTA'lı tüpe 10 ml periferik kan örneği alınacaktır. Alınan kan örneğinden DNA izolasyonu yapılacak ve DNA bankası oluşturulacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak ve örnekler numaralı olarak saklanacaktır. DNA bankası başka çalışmalarda kullanılmayacaktır.

Kan örnekleri EDTA'lı tüpe alındıktan sonra 3000g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma alikotlanarak -80°C'de analiz edilinceye kadar saklanacaktır.

Bu çalışmanın bilimsel ve tıbbi açıdan önemi, hastalıkla ilişkili yeni genlerin bulunması ve bimarlıklardan yararlanarak ailesel genetik taramaların yapılabilmesidir. Böylece Türk toplumu için bir mutasyon profili oluşturulacaktır.

Gönüllülerin araştırmaya katılma süresi 6 aydır.

Elde edilen genetik test sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup, sadece size ve hekiminize bildirilecek olup üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Gönüllüden kan alımı sırasında hastanın kolunda kısa süreli lokal hematoma gelişebileceği ve bu durumun geçici olduğu anlatılmalıdır.

Muhtemel zarar görülmesi durumunda gönüllünün veya yakınının bilgi için ilişki kuracağı kişi, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik AD'dan Prof. Dr. Nihan Erginel Ünalıtuna olup, 414 20 00/ 33324 nolu telefondan ulaşılabilir.

Gönüllüye araştırmaya katılmayı reddedebileceği ve bu durumun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkisinin olmayacağı bildirilecektir.

Araştırma, 100 Alzheimer hastası ile herhangi bir nörolojik hastalık hikayesi olmayan sağlıklı 200 kişiden oluşacaktır.

Gönüllünün rızasına bakılmaksızın, araştırmacı gerektiğinde gönüllüyü araştırma dışında bırakılabilecektir.

Yapılması planlanan genetik araştırmalar için sizden maddi destek talep edilmeyecektir.

Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işleme başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Toplantı Tarihi : 20/10/2010
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Toplantı Sayısı : 06

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nihan ERGİNEL ÜNALTUNA'nın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Adem KOCAMAN'ın yürüteceği 2010/718-210 dosya numaralı Duchenne Tipi Kas Distrofisi (DMD)/Becker Tipi Kas Distrofisi (BMD) hastalarında genotip fenotip ilişkisi" başlıklı tez çalışması kurulumuzca incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

Prof.Dr. Ayşen BULUT (T.Katılmadı)
Halk Sağlığı (Emekli)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK (T.Katılmadı)
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN
Şişli Etfal Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN (T.Katılmadı)
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanı

Prof.Dr. Demir TIRYAKI
Biyofizik (Emekli)

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Adem	Soyadı	Kocaman
Doğ.Yeri	Samsun/ Çarşamba	Doğ.Tar.	04/07/1986
Uyruğu	T.C:	TC Kim No	499783356434
Email	ademkocaman@gmail.com	Tel	05424909281

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik	2008
Lise	Samsun F.Fen Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	92	91	90
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yürüyüş.