

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEN HARİTALAMA ÇALIŞMALARINA GİRİŞ:
OTOZOMAL DOMİNANT HEREDİTER
SFEROSİTOZ'DA BAĞLANTI ANALİZİ**

PELİN TAŞDEMİR

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. S. SENNUR DEMİREL

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEN HARİTALAMA ÇALIŞMALARINA GİRİŞ:
OTOZOMAL DOMİNANT HEREDİTER
SFEROSİTOZ'DA BAĞLANTI ANALİZİ**

**PELİN TAŞDEMİR
DOKTORA TEZİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. S. SENNUR DEMİREL

YARDIMCI TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. NURTEN AKARSU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06102006 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2009

ÖNSÖZ

Tüm doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan bölümümüz öğretim üyeleri Prof. Dr. Aynur ACAR, Yard. Doç. Dr. Gül DURAKBAŞI DURSUN, Yard. Doç. Dr. Ayşe Gül ZAMANİ ve danışmanım Prof. Dr. Sennur DEMİREL'e ve her zaman destek veren Prof. Dr Ferhan PAYDAK'a,

Tez aşamasında bana kucak açan, yardım ve ilgisini esirgemeyen ve sürekli olarak beni motive eden sayın hocam Prof. Dr. Nurten AKARSU'ya

Aile ile ilişkileri sağlama konusunda yardımcı olan Pediatrik Hematoloji ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Canan ALBAYRAK'a,

Araştırma sırasında bizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Eğitim ve tez aşamasında bana desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen annem, babam, sevgili eşim Çağatay, kızım Deniz ve oğlum Ata TAŞDEMİR'e,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

1.GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe.....	3
1.2. Eritrosit membranı.....	4
1.2.1. Spektrin proteini.....	6
1.2.2. Ankrin proteini.....	7
1.2.3. Band 3 proteini.....	7
1.2.4. Protein 4.2.....	8
1.3. Herediter Sferositoz.....	9
1.4. Kalıtım Kalıbının Belirlenmesi.....	12
1.4.1. Kromozom kalıtımı ...	13
1.4.2. Tek gen kalıtımı	13
1.4.3. Kompleks kalıtım	14
1.5. Mutasyon ve Polimorfizm Kavramları.....	15
1.5.1. Kısa DNA baz tekrarları.....	16
1.5.2. Uzun DNA baz tekrarları	16
1.5.3. DNA'nın tek bir bazındaki değişiklikler	17
1.5.4. DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri.....	17
1.6. Genom Haritalaması	17
1.6.1. Fiziksel haritalar	18
1.6.2. Genetik haritalar	18
1.7. Gen Haritalama Yöntemleri.....	23
1.7.1. Parametrik metodlar.....	23

1.7.2. Non-parametrik metodlar.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. GEREÇ.....	26
2.1.1. Klinik değerlendirme	26
2.1.2. Pedigrinin oluşturulması	27
2.1.3. Çözeltiler.....	29
2.1.3.1. DNA izolasyon tamponları	29
2.1.3.2. Agaroz jel elektroforez tamponları	29
2.1.3.3. Poliakrilamid jel elektroforez tamponları.....	30
2.1.3.4. Gümüş boyama çözeltileri.....	32
2.2. YÖNTEM.....	33
2.2.1. Periferik kan örneklerinin Alımı.....	33
2.2.2. Periferik kandan DNA izolasyonu	33
2.2.3. PZR amplifikasyonu	34
2.2.3.1. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde kontrol edilmesi	41
2.2.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)	42
2.2.5. Gümüş nitratla boyama ve jellerin fotoğraflanması.....	44
2.2.6. Genotipleme.....	45
2.2.7. Haplotipleme	47
2.2.8. İstatistiksel analizler.....	48
3. BULGULAR.....	50
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
6. ÖZET	69
7. SUMMARY	70

8. KAYNAKLAR	71
9. ÖZGEÇMİŞ	74
10. EKLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA : Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

EDTA: Ethilendiamintetraasetik asit

EtBr: Etidyum bromid

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

HE : Herediter eliptositoz

HPP : Herediter piropoilositoz

HS : Herediter sferositoz

LOD : Logaritm of Odds Ratio

µgr: mikrogram

µl: mikrolitre

µM: mikromolar

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA : Ribonükleik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

SDT : Sibship test for disequilibrium (kardeşler arası dengesiz kalıtım)

STRP : Short tandem repeat polymorphism (kısa seri tekrarları polimorfizmi)

TBE: Tris/borat/EDTA tamponu

TDT : Transmission disequilibrium test (kalıtımda dengesiz aktarım)

Tris: Tris (hidroksimetil) aminometan

TABLULAR

Tablo 1.1. Eritrosit membranında yer alan majör proteinler, genlerinin bulunduğu kromozom bölgeleri ve kalıtım özellikleri

Tablo 1.2. Herediter Sferositozun bazı klinik ve genetik özellikleri

Tablo 1.3. Membran protein defektlerinin görülme yüzdeleri

Tablo 1.4. Eritrosit membran proteinlerini oluşturan genlerin özellikleri

Tablo 1.5. Genetik haritalama yöntemleri

Tablo 2.1. *ANK1*, *SPTB*, *SPTAI*, *SLC4A1* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan polimorfik belirleyiciler ve sekansları

Tablo 2.2. DNA göstergelerinin kromozom üzerindeki varsayılan pozisyonları

Tablo 2.3. LINKAGE programında kullanılan veriler

Tablo 3.1. Herediter Sferositoz ile aday bölgelerden seçilen genetik belirleyiciler için *LOD* skor tablosu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Eritrosit membranında yer alan proteinler.

Şekil 1.2. Rekombinasyon olgusu.

Şekil 2.1. Ailenin pedigrisi.

Şekil 2.2. *SPTA1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 1 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Şekil 2.3. *ANK1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 8 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Şekil 2.4. *SPTB* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 14 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Şekil 2.5. *SLC4A1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 17 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Şekil 2.6. 14 numaralı kromozoma ait denatüren poliakrilamid jel fotoğrafı

Şekil 3.1. 1 numaralı kromozoma ait haplotip analizi.

Şekil 3.2. 8 numaralı kromozoma ait haplotip analizi.

Şekil 3.3. 14 numaralı kromozoma ait haplotip analizi.

Şekil 3.4. 17 numaralı kromozoma ait haplotip analizi.

Şekil 3.5. 1 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

Şekil 3.6. 14 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

Şekil 3.7. 17 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

1. GİRİŞ

Hereditör sferositoz (HS), membran proteinlerinin defektleri sonucu eritrositlerin morfolojik olarak bikonkav ve santral solukluğu olan disk şeklinden, santral solukluğu olmayan küre şekline dönüşmeleri ile hemolize eğilimin artması sonucu gelişmektedir. Klinik olarak değişik derecede anemi, sarılık ve splenomegali ile seyreden genetik olarak hem dominant hem de resesif kalıtımla ilişkili heterojen bir hastalıktır.

HS, Kuzey Avrupa ülkelerinde beyaz ırkta görülen en yaygın hemolitik anemidir. İnsidansı Kuzey Avrupa ülkelerinde 1/2000, Amerika Birleşik Devletlerinde 1/5000 olarak saptanmıştır. Olguların % 75'i otozomal dominant kalıtım kalıbıyla seyrederken, %10-25 vakada ise aile öyküsüne rastlanmamaktadır. Bu vakaların yaklaşık yarısı otozomal resesif kalıtılırken, diğer yarısı spontan mutasyon veya azalmış penetrasyon ile açıklanmaktadır (Timur 2001).

HS'de saptanan primer biyokimyasal defekt, eritrosit membranındaki proteinlerdedir. Eritrosit iskeletini oluşturan bu proteinler, eritrositlerin şeklini ve elastik yapısını korumaktadır. Ayrıca eritrositlerin anormal morfolojisi ve kısa yaşam süresi, eritrosit iskeletini oluşturan komponentlerden birinin defektine veya disfonksiyonuna bağlı olabilir. Yapılan çalışmalarda eritrosit membran proteinlerini oluşturan genlerde mutasyonlar tespit edilmiştir. Bunlardan major etkili olanlar α ve β spektrin, ankyrin, band 3 ve protein 4.1 dir (Iolascon ve ark 1998)..

Gen haritalama, kromozom lokalizasyonu bilinmeyen genlerin lokalizasyonlarının saptanması işlemidir. Bu işlem, olasılık modellerini kullanarak bir genin bulunduğu kromozom bölgesini saptamaya dayanır. Gen haritalama yöntemlerinden biri olan bağlantı analizi HS'de aday gen aranması çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır(Akarsu 2002).

İnsan Genom Projesi (HGP) seçilmiş model organizmaların ve insan genomunun tanımlanması için başlatılan bir bilim projesidir. 1986 yılında Amerika'da başlatılan insan genom projesi daha sonra İngiltere, Japonya, Almanya, Fransa ve Çin'in katılımıyla uluslararası bir çalışmaya dönüşmüştür.

Proje başladığı zaman insan genomunun dizi analizinin yapılmasına ve 15 yılda tamamlanmasına karar verilmiş; ancak öngörülen süreden çok önce tamamlanarak bilim dünyasına sunulmuştur. İnsan genomunda yaklaşık 32000 genin bulunduğu ve iki insan genomunun % 99.9 oranda birbirinin aynı olduğu gibi çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Bireyler arasındaki genomların karşılaştırılması, belirli genlerin farklı hastalıklara duyarlılığını ve hastaların genetik yapısına göre önlem ve tedavi için yeni stratejiler geliştirilmesini sağlayacaktır. Önümüzdeki yıllarda kromozomlardaki yeri ve nükleotid dizilimi saptanan genlerin ürünleri, gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmaların görevleri ve birbirlerini nasıl etkiledikleri gibi proteomiks çalışmalarına ağırlık verilecektir.

İnsan Genom Projesinin en önemli avantajlarından biri, gen haritalama çalışmalarında kullanılacak çeşitli polimorfik DNA belirleyicilerinin genom üzerindeki lokalizasyonlarının tespit edilmesi olmuştur. Kromozom lokalizasyonları bilinen genetik belirleyicilerin birkaç kuşaklı geniş ailelerde hastalıkla birlikte, segregasyon kalıbının incelenmesi gen haritalama disiplininin temelini oluşturmaktadır. İnsan Genom Projesinden elde edilen bilgiler, bu yöntemle birleştirilmesiyle gerek hastalıktan sorumlu yeni genlerin bulunması gerekse aday genlerin hastalıkla ilişkisinin test edilmesi mümkün olabilmektedir. İlgili tez çalışmasında da aday gen yaklaşımı kullanılarak bağlantı analizi yapılması planlanmıştır.

Bu çalışmada, Konya bölgesinden saptanmış olduğumuz dört kuşak boyunca 19 bireyde otozomal dominant HS saptanan toplam 86 kişilik bir ailede bağlantı analizi kullanılarak hastalık geninin lokalizasyonunun test edilmesi amaçlanmıştır. Planlanan çalışmada ailenin büyük olması, hem kalıtım modelinin tam olarak tespit edilebilmesine hem de bağlantı analizinin tam olarak uygulanabilmesine olanak sağlamıştır. Çalışma grubunu oluşturan bu ailede saptanan genler büyük olduğundan sekans analizi yapılmadan önce aday genin lokalizasyonunun tespit edilmesi daha sonra sekans analizi yapılması planlanmıştır.

1.1 Tarihçe

Hereditör sferositoz ile ilgili ilk bildiri 1871 yılında Vanlair ve Masius tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar, mikrositeminin oluşumunu ışık mikroskobu altında incelemişler, hastalığın hereditör yapısını tanımlamışlar ve ileri görüşlü bir tavırla anormal eritrositlerin büyümüş dalak tarafından oluşturulduğunu söylemeye cesaret etmişlerdir. Yüzyılın başında Chauffard'ın en büyük buluşu anormal eritrositlerde osmotik direncin artmış olduğunu keşfetmek olmuştur. Bu buluş HS'nin tanısında bir temel oluşturmuştur (Iolascon ve ark 1998).

HS başlangıçta erken genetik ve epidemiyolojik çalışmaların da konusu olmuştur. Young ve ark (1951) HS'nin Mendeliyen dominant olarak kalıtıldığını ve sferosit adı verilen anormal, kalın eritrositlerin varlığıyla karakterize olduğunu göstermiş, bu eritrositlerin olgunlaşma aşamalarının defektli olduğunu ve dolaşıma salınırken anormal olduklarını belirtmişlerdir. Morton ve ark (1962) HS'nin yaklaşık 5000'de 1 kişiyi etkilediğini, büyük bir olasılıkla tüm etnik gruplarda görüldüğünü ve vakaların %75'inde HS'nin dominant olduğunu iddia etmişlerdir. Agre ve ark (1985) ise HS'nin spektrin eksikliğinden kaynaklandığını göstermişlerdir. Lux ve ark'nın (1990) yaptığı sitogenetik çalışmalar ve bağlantı analizleriyle HS'de altta yatan nedenin ankrin eksikliği olduğu bulunmuştur. Daha sonraki yıllarda resesif vakaların özellikle *ANK1* ve *SPTB* genindeki de novo mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Jarolim ve ark 1995). Aslında HS'nin modern zamanları, sodyum dodesilsülfat kullanılarak çalışılan polyakrilamid jel elektroforezinin (SDS-PAGE) geliştirilmesiyle başlamıştır (Laemmli 1970, Fairbanks ve ark 1971). Bu yöntemle pek çok HS vakasının spektrin defekti nedeniyle oluştuğunu gösteren Agre ve ark (1985), muhteşem bir buluş gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra spektrin eksikliğinin *SPTA1* geni ve daha sıklıkla *SPTB* genindeki mutasyonlar sonucu olabileceği ve en sık görülen durumun *ANK1* genindeki mutasyonlar neticesinde oluştuğu ve bunun da her iki spektrin zincirindeki ikincil azalmaya yol açtığı ortaya çıkmıştır.

HS'nin tanınmasındaki asıl büyük gelişme, 80'li yılların ortalarında membran proteinlerini kodlayan cDNA klonlarının izolasyonu ile olmuştur.

Birkaç yıl sonra da HS'nin oluşumundan sorumlu ilk mutasyon açıklanmıştır. Kronolojik olarak; *SLC4A1* geni, *SPTB* geni, *ANK1* geni ve *SPTA1* geni bulunmuştur (Iolascon ve ark 1998).

Hereditör Sferositoz hastalığının etiyojisini anlayabilmek için öncelikle eritrosit membran iskeletinin yapısını tariflemek gerekir.

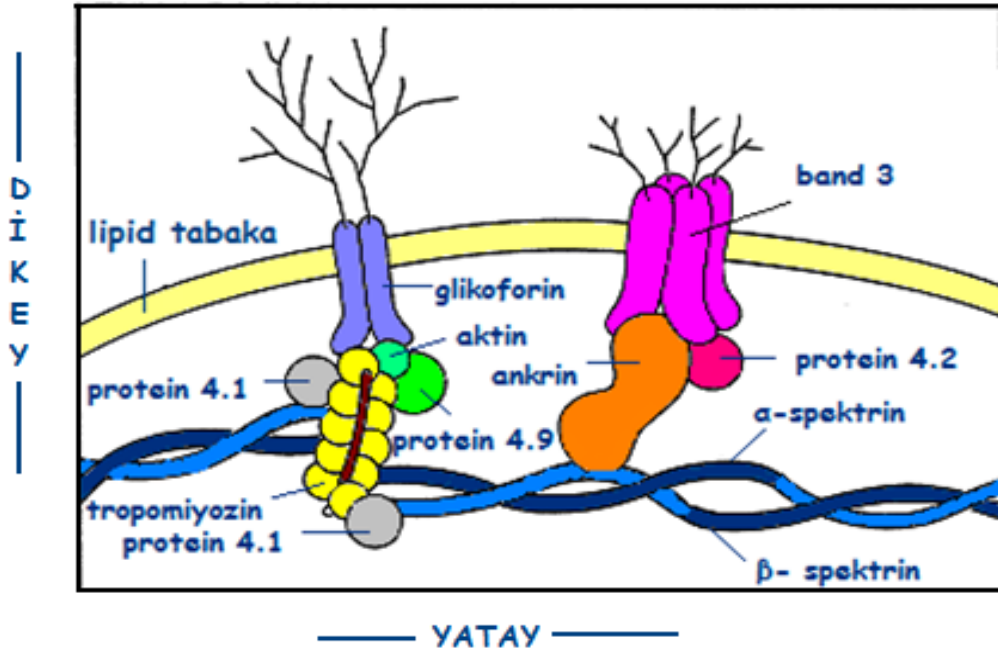
1.2. Eritrosit Membranı

Yakın geçmişte modern teknolojinin gelişmesiyle; elektron mikroskobu ve protein analizlerinin yardımıyla eritrosit membranının ve membran iskeletinin yapısının anlaşılması kolaylaşmıştır. HS'deki fonksiyonel anomalinin sebebi; membran iskeletindeki bir veya daha fazla yapısal proteinde oluşan kalitatif ve kantitatif defektlerdir. Bu anomalileri tarifleyebilmek için öncelikle membran iskeletinin yapısı hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir (Smedley ve ark. 1991).

Eritrositler, diğer canlı hücreler gibi lipid, protein ve az miktarda da karbonhidrattan oluşan bir hücre membranı ile çevrilidirler. Eritrosit membranının iç yüzeyinde ise membran iskeletini oluşturan protein ağı vardır. Eritrosit membran proteinlerinin kantitatif ve kalitatif olarak normal olmaları ve lipid tabaka ile bağlantılarının sağlam olması, membran stabilizasyonunun sağlanmasında önemli rol oynar (Blackman ve ark 2001 Hassoun ve ark 1997, Tse ve ark 1999, Timur 2001). Bu proteinlerdeki bir takım defektler, eritrosit yüzeyindeki lipid tabakayla ilişkinin bozulmasına ve eritrosit yüzey hacim oranının azalmasına, eritrosit normal şeklinin, ısı ve mekanik stabilitesinin, osmotik frajilitesinin bozulmasına ve bu eritrositlerin dalak tarafından tutulmasıyla eritrosit ömrünün kısılmasına, dolayısıyla hemolitik anemiye yol açarlar. (Tsoumanis 1996, Timur 2001).

Eritrosit membran proteinleri; membran iskeleti ağını oluşturan çevresel proteinler ve lipid tabakayı delerek membranın dış yüzüne çıkan integral (transmembran) proteinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 1.1). Çevresel proteinlerin % 50'sini spektrin oluşturur. Spektrin tetramerleri kuyruk kısımlarından protein 4.1 ile aktin isimli bir proteine, bir taraftan da bir transmembran proteini olan ankrine bağlanarak lipid tabakasının yüzeyine çıkan

band 3 ile birleşirler. Band 3 aynı zamanda membranın su ve anyon transportunu da düzenleyen bir proteindir (Smedley ve ark. 1991, Timur 2001). Eritrosit membranı; α ve β spektrin, aktin, band 3, ankrin ve protein 4.1 ve 4.2, adduzin, tropomyozin ve kalmomodulinden oluşan bir multi protein kompleksidir; (Smedley ve ark. 1991, Fowler 1996, Tse ve ark 1999, Paździor 2003) ancak yine de eritrosit membran ağırlığının yaklaşık %50'sini çift katlı lipid tabakası oluşturur. Bu çift katlı tabakada lipidler asimetrik olarak yayılmıştır: kolün fosfolipidleri bu tabakanın dış kısmında, amino fosfolipidler ve fosfatidilinozitol ise iç kısmında gruplaşmışlardır. Hidrofobik lipid tabaka, integral membran protein ailesi tarafından yan yana katedilmiştir. Bu aile, membran reseptörleri ve antijenlerini taşıyan glikoforin A, B, C ve D gibi proteinleri ayrıca protein 3 gibi transport proteinlerini içerir. İntegral proteinlerin genellikle hücre dışı, membran içi ve stoplazmik olmak üzere 3 özel bölümü vardır. Hücre dışına bakan bölüm genellikle reseptör bölümüdür ve kan grubu antijenlerini içerir. Membran içi bölüm çok hidrofobiktir ve fosfolipidleri bağlar. Stoplazmik bölüm ise çevresel proteinlerin bağlanma bölgesidir (Tsoumanis 1996, Iolascon ve ark 1998).



Şekil 1.1. Eritrosit membranında yer alan proteinler

1.2.1. Spektrin Proteini

İnsan sferositlerinde ilk bildirilen eritrosit membran iskeleti komponenti eksikliği, spektrinin parsiyel eksikliğidir (Agre ve ark 1985). Membran iskeletinin majör komponenti olan spektrin, büyük heterodimerik bir moleküldür (>400 kDa) (Birkenmeier ve ark 1988).

Spektrin, α ve β alt ünitelerini içeren filamentöz bir yapıdır. Bu filamentöz proteini oluşturan bu iki alt üniteyi *SPTA1* ve *SPTB* adı verilen iki ayrı gen kodlar. α spektrini kodlayan *SPTA1* geni 1q22-q23 kromozom bölgesine; β spektrini kodlayan *SPTB* geni ise 14q23-q24.2 kromozom bölgesine haritalanmıştır (Dhermy ve ark 1998). Bu iki alt ünite bir heterodimer oluşturmak üzere beraberce dönme hareketi yaparak antiparalel olarak uzanırlar. α ve β heterodimerleri baş kısımlarından biraraya gelerek tetramerleri oluştururlar (Smedley ve ark. 1991, Tse 1999, Birkenmeier ve ark 2004). Spektrin tetramerleri distal uçlarından aktin oligomerleriyle bağlanırlar. Bu hegzagonal ağ yapısı membranın altında destek yapıyı oluşturur ve ankrin yardımıyla lipid tabakaya bağlanır. Ankrin bir ucundan spektrine diğer ucundan da membranlar arası anyon taşıyıcısı olan band 3'e bağlanır. Bu bağlantı, protein 4.2-band 3, protein 4.1-glikoforin C ve spektrin-protein 4.1 gibi etkileşimlerle sağlamlaştırılır. Horizontal proteinlerin lipid tabakaya bağlantısını sağlayan bu dikey protein köprüsünün zayıflaması HS'nin patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Smedley ve ark. 1991, Hassoun ve ark 1996). Genellikle band 3-ankrin-spektrin ve protein 4.2'nin oluşturduğu dikey etkileşimdeki herhangi bir defekt HS ile ilişkili olup spektrin ve protein 4.1 ve band 3 proteinlerinin oluşturduğu yatay etkileşimdeki bir defekt genellikle Herediter Eliptositoz (HE) ve Herediter Piropoilositoz (HPP) ile ilişkilidir. HE ve HPP daha çok spektrinin heterodimer oluşturma aşamasındaki bir defekt sonucu ortaya çıkar (Birkenmeier ve ark 2004). HS ve bu iki hastalığın klinik bulguları birbirine benzer ancak ayırt edici olarak periferik yayma yapılacak olursa; HS'de sferositler, HE'de eliptositozlar, HPP'de ise akantositler ve şistositler görülür.

1.2.2. Ankrin Proteini

Eritrositte membran iskeleti ile plazma membranının primer bağlayıcı proteini ankrindir (Gallagher ve ark 1997 b, Özcan ve ark 2003). Ankrin proteini, β spektrini plazma membranındaki band 3 proteinine bağlar (Lambert ve ark 1990). Ankrin geni, eritrosit membranında spektrin bağlanma bölgesi araştırılırken keşfedilmiştir. Ankrin sadece eritrositte değil nöral doku ve iskelet kası dokusunda da kendini ifade eder. Eritrosit ankrin geni (*ANK1*), 8p11.2 bölgesine haritalanmıştır. Beyin hücrelerinde bulunan ankrin, biyokimyasal olarak eritrosit ankrinine benzer ve *ANK2* geni tarafından kodlanır. *ANK2* geni 4q25-q27 bölgesinde bulunur (Tsoumanis 1996, Birkenmeier ve ark 2004).

Ankrin proteini büyük, multifonksiyonel bir protein olup; N-terminal bölge (membrana bağlanan kısım), merkezde spektrin bağlayıcı bölge ve C-terminal bölge (diğer iki bölgenin bağlanma özelliklerini düzenleyen kısım) olmak üzere üç bölgeden oluşur (Gallagher ve ark 1997 a).

Bazı yayınlarda, *ANK1* gen mutasyonunun insanda görülen HS'nin majör nedeni olduğu belirtilmiş (Delaunay 1995, Eber ve ark 1996, Tse ve ark 1999), diğer bazı yayınlarda da HS'li hastaların 2/3' ünden fazlasında kombine spektrin ve ankrin defekti olduğu bildirilmiştir. Biyokimyasal ve moleküler gözlemlerle birlikte sitogenetik ve bağlantı analizi çalışmaları göstermiştir ki; HS'li hastaların büyük bir kısmında ankrin defekti primer defekt olabilir ve spektrin defekti ankrinle bağlanma bölgelerinin kaybı dolayısıyla ankrin defektine ikincil olarak ortaya çıkmış olabilir (Hanspal ve ark 1991, Tsoumanis 1996).

1.2.3. Band 3 Proteini

Band 3 (anyon taşıyıcı) majör integral proteindir (Alloisio ve ark 1996, Birkenmeier ve ark 2004). Band 3 proteinini kodlayan gen (*AE1*, *SLC4A1*, *EPB3*), 17q12-q21 bölgesinde bulunmaktadır. Band 3, sadece eritrositler ve distal renal tübüllerde eksprese olur (Bruce 2006). Eritrosit membranında en fazla bulunan protein band 3'tür; her hücrede 1.2 milyon kopyası bulunur ve 911 aminoasidden oluşur (Iolascon ve ark 1998, Tanner 2002). Band 3 proteini iki temel bölgeden oluşur; bunlar bikarbonat ve klorun membranda değiş tokuşuna

yardımcı olan C terminal (transmembran) bölge ve ankrin proteini ile membran iskeletinin etkileşimini sağlayarak köprü görevi gören N terminal (sitoplazmik) bölgelerdir (Tanner 2002, Lima ve ark 2005). Band 3 oligomerlerinin sitoplazmik bölgesiyle membran iskeletinin etkileşimi normal eritrosit şeklinin korunması ve mekanik özelliklerinin sürdürülebilmesi için kritik öneme sahiptir (Alloisio ve ark 1997, Gallagher ve ark 1997 a, Bruce ve ark 1999).

Band 3 defektine Amerikalı ve Avrupalı HS'li hastaların %20'sinde rastlanır; ancak Japonlarda daha sıktır (Eber ve ark 1996, Jarolim ve ark 1996). Band 3 proteinini kodlayan *SLC4A1* geninde değişik hastalıklarla ilişkili pek çok mutasyon tespit edilmiştir. *SLC4A1* genindeki mutasyonunun tipine ve lokalizasyonuna bağlı olarak görülen hastalıklar arasında; Hereditör sferositoz, Güneydoğu Asya ovalisitozu, korea-akantositoz ve ailesel distal renal tübüler asidoz bulunmaktadır (Birkenmeier ve ark 2004).

1.2.4. Protein 4.2

Protein 4.2, eritrosit membranının önemli unsurlarından biridir ve tüm membran proteinlerinin %5'ini teşkil eder. Bu proteini *EPB42* geni kodlar ve 15q15-q21 bölgesinde bulunur. Protein 4.2, band 3'ün stoplazmik bölgesine bağlanarak ankrin-band 3 bağlantısında önemli rol oynar (Iolascon ve ark 1998). Bu nedenle protein 4.2 defekti, band 3 ve ankrin kısmi defektlerine bağlı ikincil bulgu olarak ortaya çıkabilir (Lanciotti ve ark 1997, Peters ve ark 1999). Bununla birlikte bazı hastalarda izole protein 4.2 eksikliği de görülebilir (Tse ve ark 1999).

Eritrosit membranında yer alan majör proteinler, buldukları kromozom bölgeleri ve bu proteinlerin eksikliği veya defekti sonucu oluşan HS hastalığının kalıtım şekli Tablo 1.1' de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Eritrosit membranında yer alan majör proteinler, genlerinin bulunduğu kromozom bölgeleri ve kalıtım özellikleri.

Protein	Geni	Kromozom Bölgesi	Kalıtım Şekli
A- Spektrin	<i>SPTA1</i>	1q22-q23	Resesif
B- Spektrin	<i>SPTB</i>	14q23-q24.2	Dominant
Ankrin	<i>ANK1</i>	8p11.2	Dominant
Band 3	<i>SLC4A1</i>	17q12-q21	Dominant
Protein 4.2	<i>EPB42</i>	15q15-q21	Resesif

1.3. Herediter Sferositoz

Herediter Sferositoz, Kuzey Avrupa ülkelerinde 1/2000 insidansla beyaz ırkta görülen en yaygın hemolitik anemidir. Amerika Birleşik Devletlerinde insidans 1/5000'dir (Smedley ve ark 1991, Reinhardt ve ark 2001). Olguların % 75'i otozomal dominant kalıtım kalıbıyla seyrederken, % 25 vakada aile hikayesine rastlanmamaktadır (Agre ve ark 1985). Bu vakaların yarısı aslında otozomal resesif kalıtılırken, diğer yarısı yeni mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (Tse ve ark 1999).

Klinik olarak HS; asemptomatik formdan, hayatı tehdit eden ve düzenli kan transfüzyonu gerektiren, ciddi anemiye ve hatta seyrek olarak hidrops fetalis ve fetal ölüme kadar giden tehlikeli durumlara kadar değişen tablolarla seyreden bir hastalıktır. Bu değişkenlik, HS'nin gelişiminde gerçekleşen değişik moleküler defektlere bağlıdır (Iolascon ve ark 1998, Timur 2001, Boguslawska ve ark 2004).

Yenidoğan döneminde HS genellikle semptomatiktir. İtalyan pediatrik cerrahların 468 vakada yaptıkları araştırmaya göre, vakaların % 65'inde bulgular yenidoğan dönemde belirgindir. Hemen hemen tüm vakalarda uzun süren sarılık görülmüştür ve hiperbilirubinemiye kontrol altında tutmak için fototerapi veya kan değişimi gerekli olmuştur. Anemi, çalışılan grubun %44'ünde saptanmıştır ve hastaların 2/3'üne kan nakli gerekli olmuştur (Pinto ve ark 1985).

Yetişkinde HS'nin klinik belirtileri; anemi, sarılık ve splenomegalidir. Periferik yaymada retikülosit ve sferositlerin varlığı ve artmış eritrosit osmotik fragilitesi tanı koydurucudur. Sferositler; küresel görünümlü, ortada solukluğu olmayan mikrositik hücrelerdir. (Tse ve ark 1999, Bracher ve ark 2001). Aslında β spektrin anomalili hastalarda akantositler (dikenimsi eritrositler), band 3 defekti olan hastalarda ise mantar şekilli eritrositler görülür (Iolascon ve ark 1998). Membran yapısı bozulmuş ve deforme olmuş bu eritrositleri dalak dolaşımından yakalar ve yok eder. Bunun sonucu olarak dalakta büyüme meydana gelir. Dalağın alınmasıyla hemolizin derecesi azaltılmış olur; ancak eritrositlerdeki yapısal anomali devam eder (Tse ve ark 1999). Hastalığın seyrinde kronik hemolize bağlı safra kesesi taşı saptanmakla birlikte bazen enfeksiyonlarla ilişkili olarak eritroblastopenik ve hemolitik krizler de görülebilmektedir. Artmış hücre döngüsü nedeniyle sekonder folat eksikliği, megaloblastik anemi ve nadiren hemakromatozis gelişebilmektedir (Gülen ve ark 2003).

HS'da hastalığın ciddiyeti hafif, orta, hafif-ciddi ve ciddi olarak dört farklı şekilde ifade edilir. Bu değerlendirme bazı ortak laboratuvar değişkenlerine göre yapılır. Bunlar; hemoglobin ve bilirubin konsantrasyonları ve retikülosit sayıları gibi değerlerdir (Perrotta ve ark 2008). Tüm bu klinikve bazı genetik özellikler tablo 1.2'de özetlenmiştir.

Tablo 1.2. Herediter Sferositozun bazı klinik ve genetik özellikleri (OD; Otozomal dominant, OR; otozomal resesif, Sp; spektrin, Ank; ankrin, pro 4.2; protein 4.2, SDS-PAGE; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi).

	Hafif	Orta	Orta-ciddi	Ciddi
Hemoglobin(g/L)	Normal	>80	60-80	<60
Retikulosit	< 6%	>6%	>10%	>10%
Bilirubin(μ mol/L)	17- 34	>34	34-51	>51
Periferik yayma	Sferositler	Sferositler	Sferositler	Mikrositler, poikilositoz
Splenektomi	Seyrek olarak	Bazı vakalarda	Gerekli >5 yaş	Gerekli >2-3 yaş
SDS-PAGE (protein eksikliği)	Normal	Sp,Ank+Sp, band3, pro 4.2	Sp,Ank+Sp, band3	Sp,Ank+Sp, band3
Kalıtım kalıbı	OD	OD, de novo mut.	OD, de novo mut.	OR

HS'li hastalarda membran iskelet proteinlerinin yapılan ilk biyokimyasal analizlerinde spektrin eksikliği olduğu görülmüştür. Hastalığın ciddiyeti ve splenektomiye cevabı spektrin eksikliğinin miktarıyla ilişkilendirilmiş (Agre ve ark 1985) devam eden sitogenetik çalışmalar ve bağlantı analizleriyle altta yatan asıl nedenin ankrin eksikliği olduğu görülmüştür (Lux ve ark 1990). Daha sonra Savvides ve ark (1993), HS'li pek çok hastada spektrin ve ankrin eksikliğinin birlikte bulunduğunu açıklamışlardır. Şimdiki bilgilerimize göre HS, eritrosit membran iskeleti ve lipid tabaka arasında yer alan vertikal etkileşimi oluşturan proteinlerdeki defekt sonucu oluşmaktadır. Sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi kullanılarak yapılmış pek çok araştırma göstermiştir ki; HS'li hastaların % 30-45'inde kombine spektrin-ankrin defekti, yaklaşık % 30'unda izole spektrin defekti ve yaklaşık % 20'sinde band 3 defekti bulunmaktadır (Jarolim ve ark 1996, Dherny ve ark 1997, Lanciotti 1997). İzole protein 4.2 defektine az sayıda Amerikalı ve Avrupalı hastada rastlanırken Japonlarda sık olduğu gözlenmiştir (Tse ve ark 1999).

SDS-PAGE yöntemi eritrosit hücre iskeletini oluşturan membran protein defektlerini belirleyip tanıya yardımcı olan bir tekniktir. Membran proteinlerinin ölçülüp karşılaştırılmasına dayanan bu yöntem çoğu HS'li vakanın tanısında gerekli değildir; çünkü eritrosit belirteçleri, klinik ve aile hikayesine dayanarak doğru tanı koyulabilir.

Eritrosit membran proteinlerinin, SDS-PAGE yöntemiyle analizi, HS'li hastalarda karşılaşılabilecek 4 belirgin alt grubu açıklayabilir aynı zamanda pek çok alternatif protein eksikliklerinin tanımlanmasına yardımcı olabilir. SDS-PAGE yöntemiyle yapılan analizlere göre HS'ye neden olan protein defektleri ve sıklıkları Tablo 1.2' de verilmiştir (Jarolim ve ark 1996, Gallagher ve ark 2001)

Tablo 1.3. Membran protein defektlerinin görülme yüzdeleri

Protein Defekti	Görülme Sıklığı
Spektrin-Ankrin	%35-45
İzole spektrin	%30
Band 3	% 20
Protein 4.2	% 5

HS'de, eritrosit membran proteinlerinin oluşumunda etkili olan genlerde tespit edilmiş mutasyonlardan major etkili olanlar α ve β spektrin, ankyrin, band 3 ve protein 4.1 genlerindedir. Bu genlerin tüm özellikleri Tablo 1.3' de özetlenmiştir.

Tablo 1.4. Eritrosit membran proteinlerini oluşturan genlerin özellikleri

(Gallagher ve ark 1997).

PROTEİN	GENİ	LOKALİZASYONU	GEN BÜYÜKLÜĞÜ	EKZON SAYISI	AMİNOASİD SAYISI
α -spektrin	<i>SPTA1</i>	1q22-q23	80 kb	52	2429
β -spektrin	<i>SPTB</i>	14q23-24.2	> 100 kb	32	2137
Ankrin	<i>ANK1</i>	8p11.2	~ 160 kb	42	1880
Band 3	<i>SLC4A1</i>	17q12-q21	17 kb	20	911
Protein 4.2	<i>EPB42</i>	15q15-q21	20 kb	13	691

Genetik haritalama işlemi farklı yöntemleri kullanmakla birlikte temelde istatistiksel bir analizdir ve bunun için hipotezin sağlam parametrelerle desteklenmesi gerekmektedir. Genetik haritalama işlemi için öncelikle kalıtım kalıbının belirlenebilmesi (tek gen kalıtımı, kompleks kalıtım, mitokondrial kalıtım vs.) gereklidir.

1.4. Kalıtım kalıbının belirlenmesi

Kalıtım kalıbının belirlenmesi temel olarak pedigrinin incelemesi esasına dayanır. Pedigrinin oluşturulduktan sonra genetik geçişin kuşaklar arası segregasyonunu görmek mümkün olabilir. Kalıtım kalıpları başlıca 3 ana başlık altında toplanabilir;

1. Kromozomal kalıtım
2. Tek gen kalıtımı
3. Kompleks kalıtım

1.4.1. Kromozomal kalıtım

Kromozomlar, DNA ve proteinlerden oluşan kromatinin ileri derecede yoğunlaşmış halidir. Hücre bölünmesi ile her biri bir doğrusal DNA molekülü kapsayan kromozomlar, yavru hücrelere düzenli bir şekilde dağılırlar; ancak bazen kromozomlardaki sayısal ve yapısal birtakım değişiklikler taşıdıkları genlerin yerini ya da pozisyonunu etkilemekte ve hastalık nedeni olmaktadır. Kromozomlar çok sayıda geni üzerinde barındıran oluşumlardır. Bu nedenle kromozomlardaki birtakım kırılmalar, parça değişimleri, parça eklenmeleri ve kayıpları doğal olarak pek çok geni etkilemekte ve bunun sonucu olarak birden fazla organ sistemini etkileyen sendromlar ortaya çıkmaktadır. Kromozomlardaki kırılma, parça değişimleri, parça eklenmeleri ve kayıpları sitogenetik inceleme yöntemleriyle gösterilebilir.

1.4.2. Tek gen kalıtımı (Mendeliyen Kalıtım)

Tek gen kalıtımında tek bir gendeki bozukluk hastalık etkeni olmaya yeterlidir. Tek bir mutant gene bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar, Mendel kurallarına uyar şekilde davranırlar ve belirli kalıtım kalıpları gösterirler.

Bir birey, herhangi bir gen için homolog kromozomların aynı lokusunda yer alan identik alellere sahip ise *homozigot*, farklı alellere sahip ise *heterozigot* olarak nitelendirilir. Bireylerin fenotipik yapıları üzerinde etkili olan genlerden hem heterozigot hem de homozigot durumda aynı fenotipi veren genler *dominant*, sadece homozigot olarak bulunduğu durumlarda fenotipte kendisini ifade edebilen genler ise *resesif* olarak adlandırılmaktadır (Thompson ve ark 1991).

a. Otozomal dominant kalıtım: Kişinin anne ya da babasından tek kopyada hastalık genini alması hastalığın ortaya çıkması için yeterlidir. Hastalık her kuşakta görülür ve bu durum dikey kalıtım olarak ifade edilir. Hasta bireylerin çocuklarında hastalık %50 oranında cinsiyet farkı gözetmeksizin ortaya çıkar. Bazı bireyler geni taşıdıkları halde hastalığı ortaya çıkarmazlar fakat hastalık sonraki kuşaklarda ortaya çıkar. Bu duruma *azalmış penetrans* denir. Ayrıca otozomal dominant kalıtımda hasta bireylerde klinik açıdan farklılıklar görülebilir (Connor ve Ferguson-Smith 1997).

b. Otozomal resesif kalıtım: Hastalığın ortaya çıkması için bireyin hem anne hem de babasından mutant geni alması gerekir. Tek kopya hastalık geni taşıyan heterozigot bireylerde hastalık ortaya çıkmaz, ancak bu bireyler taşıyıcı olurlar. Taşıyıcı bir anne ve taşıyıcı bir babanın çocuklarında hastalık görülme olasılığı %25'dir. Bu, akraba evliliklerinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Hastalık kızlar ve erkeklerde eşit olarak görülür.

c. X'e bağlı dominant kalıtım: Bu kalıtım kalıbında tek bir X kromozomunda hastalık geninin taşınması, hastalığın ortaya çıkması için yeterli olduğundan kızlarda ve erkeklerde görülür. Otozomal dominant kalıttan tek farkı hastalığın cinsiyete bağlı geçiş göstermesidir. Babalar oğullarına Y kromozomunu verdikleri için kendileri hasta olsalar bile oğullarına bu hastalığı geçiremezler. Babadan oğula geçiş yoktur. Ancak babalar kızlarına X kromozomunu geçirdiklerinden hasta babanın tüm kızları hasta olur (Gelehrter ve ark 1998).

d. X'e bağlı resesif kalıtım: Hastalığın ortaya çıkması açısından kız ve erkekler açısından farklılıklar vardır. Kızlar iki adet X kromozomu taşıdıkları için tek bir X kromozomunda hastalık genini taşımaları hasta olmaları için yetmez, ancak taşıyıcı olurlar. Bu nedenle genellikle erkekler hasta, kızlarsa taşıyıcıdır. X'e bağlı resesif kalıtım pedigrisinde tipik 'dayı-yeğen kalıtımı' görülür. Taşıyıcı bir annenin erkek çocuklarının %50'si hasta, kız çocukların %50'si taşıyıcıdır. Annenin erkek kardeşlerinde hastalık görülebilir. Hasta bir erkeğin hastalığı oğullarına geçirme olasılığı yoktur; kızların ise hepsi taşıyıcıdır. Bu kızların erkek çocuklarında yine %50 oranında hastalık ortaya çıkacaktır (Gelehrter ve ark 1998).

1.4.3. Kompleks kalıtım

Pedigri modelinde Mendeliyen kalıtıma uymayan modeller kompleks kalıtım olarak adlandırılır. Tek gen hastalığı olduğu halde pedigride karmaşık yapıya yol açan bir örnek *basımlama (genomic imprinting)* modelidir. Burada mutant genin anne ya da babadan geçişine bağlı olarak ya hiç eksprese olamaması ya da farklı ekspresyonu söz konusudur. Basımlanma olayı metilasyon mekanizmasıyla açıklanır. Genlerin bazı bölgelerine metil (NH₃)

gruplarının bağlanması sonucu gen ekspresyonunun önlenmesi ya da azalması şeklinde izah edilebilir.

Bir niteliğin ortaya çıkmasında genler ile çevresel etkenler bir arada rol oynuyorsa buna *çok faktörlü (multifaktoriyel) kalıtım* denir. Genetik yatkınlık ve çevresel etkenlerin etkileşimi söz konusudur. Boy, kilo gibi normal dağılım gösteren özellikler yanında hipertansiyon, diyabet, şizofreni, bipolar bozukluklar gibi toplumda yaygın olarak görülen hastalıklar multifaktoriyel kalıtıma örnektir.

Bir diğer kompleks kalıtım tipi de *mitokondriyal kalıtım*dır. İnsanda genetik materyal başlıca iki organelde bulunur; çekirdek ve mitokondri. Mitokondri DNA'sı genomik DNA'dan farklıdır. Evrim içinde bu DNA'nın bakterilerden köken aldığı ve insan organizmasına yerleştiği düşünülmektedir. Kalıtım modeli açısından önemi ise mitokondri DNA'sının sadece anne yolu ile bir sonraki kuşağa aktarılmasıdır. Hasta annelerin genelde tüm çocukları hasta olur. Bu hasta çocukların bir sonraki kuşağına bakıldığında, hasta kadınların çocuklarında yine hastalık ortaya çıkarken, hasta erkeklerin tüm çocukları sağlam olur (Akarsu 2004).

1.5. Mutasyon ve Polimorfizm Kavramları

İnsanda genetik materyal DNA (Deoksiribonükleik asit) dir. DNA'da meydana gelen değişiklikler bireylerin DNA'larının birbirinden farklı olmasını sağlar. İnsanda DNA dizilimi protein kodlayan ve kodlamayan kısımlardan oluşur. Kodlamayan DNA'nın büyük bir kısmı genler arasındaki aralayıcı dizilerdir. Genler de ekzon ve intron adı verilen iki kısımdan oluşur. Ekzonlar protein yapımında rol alırken, intronlar transkripsiyon sırasında kesilerek uzaklaştırılırlar ve dolayısı ile genetik çeşitliliğe yol açtığını varsaydığımız değişikliklerin DNA'nın hangi kısmında olduğu önem kazanır. Protein yapısına girecek olan DNA bölgelerindeki değişiklikler *mutasyon* olarak adlandırılır ve hastalığa yol açarlar. Genel olarak proteinlerde farklılık yaratmayan ya da oluşan farklılıkların fenotipte değişikliğe yol açmadığı DNA dizi değişiklikleri ise *polimorfizm* kavramı altında ele alınır. Mutasyonlar toplumda nadir görülen değişiklikler olmasına karşın polimorfizmler toplumda yaygın olarak bulunur

(% 1'in üzerinde). Oluş mekanizmalarına ve buldukları yerlere göre farklı tiplerde polimorfizmler mevcuttur. Tüm bu polimorfik özellikler genetik gösterge olarak gen haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır.

1.5.1. Kısa DNA baz tekrarları (Short Tandem Repeat Polymorphism; STRP veya microsatellite): İnsan genom projesi çalışmaları sırasında genomda şifreye dönüşmeyen bölgelerde iki ya da dört bazlık tekrar bölgeleri olduğu görülmüştür. Bu tekrar bölgelerinin herhangi bir işlevsel önemi yoktur; ancak bireylerin DNA'larının birbirlerinden farklı olmalarına neden olurlar ve içerdikleri tekrar sayılarına göre DNA'da bölgeye özgü büyüklük farklılıkları yaratırlar. Böyle bir bireyin DNA'sının ilgili bölgesini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodu ile çoğaltıp jelde yüksek elektrik akımı altında yürütecek olursak, daha kısa olan DNA parçası daha hızlı ilerleyecek, diğeri ise geride kalacak; böylelikle jel üzerinde farklı bant görünümleri oluşacaktır. Aynı bireyin anne ve babasına ait DNA'lar da çoğaltılıp jelde yan yana yürütülecek olursa anne-baba-çocuk jel görüntüleri karşılaştırılarak bireyin hangi alelini hangi ebeveyninden aldığı saptanabilecektir.

İnsan genom projesi kapsamında genomda böyle özelliğe sahip bölgeler saptanarak bu bölgelerin PZR metodu ile çoğaltılmasına olanak verecek bölgeye özgü nükleotid dizileri (primer) ve bunların kromozom bölgelerine göre yerleri yayımlanmıştır. Bu primerleri seçmekte bize yardımcı olan bu internet adresleri şunlardır: The Center for Medical Genetics, Marshfield ([http:// research.marshfieldclinic.org/genetics](http://research.marshfieldclinic.org/genetics)), Cooperative Human Linkage Center (CHLC) (<http://lpg.nci.nih.gov/CHLC>), The Genome Database ([http:// www.gdb.org](http://www.gdb.org)) ve Utah Genome Center (<http://www.genome.utah.edu>). Gen haritalama çalışmalarında son yıllarda kullanılan genetik göstergeler STRP bölgelerini çoğaltmaya yarayan bu genetik gösterge dizileridir.

1.5.2. Uzun DNA baz tekrarları (Variable Number Tandem Repeats; VNTR ya da minisatellitler): DNA'nın bazı bölgelerinde blok halinde büyük DNA parçalarının (9-70 baz çifti ve daha uzun bölgeler) birkaç kopya halinde tekrarlandığı görülür. Bu tekrar bölgelerini içeren DNA parçaları bölgeyi içine alacak şekilde bölgenin dışından enzimler (Restriksiyon enzimleri) aracılığı ile

kesilir. Daha sonra ilgili bölge nitroselüloz bir membrana aktarılır ve VNTR bölgelerine özgü işaretli DNA parçaları (Prob) ile birleştirilir (Southern Blott yöntemi). Böylelikle bireyler arasında farklı uzunlukta olan DNA parçaları görünür hale getirilmiş olur. VNTR'lerin saptanması özellikle adli tıpta genetik parmak izi olarak adlandırılan işlemde geniş kullanım alanı bulmuştur.

1.5.3. DNA'nın tek bir bazındaki değişiklikler (Single Nucleotid Polymorphisms; SNP): Burada tek bir DNA bazının başka bir bazla yer değişimi söz konusudur. Bunun DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerden farkı, büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PZR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkı açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur. Alellerden birinde oluşan bu baz değişikliğini tanıyacak ve çoğaltma sonrasında iki alel arasında büyüklük farkı yaratacak farklı primer kullanılmasına dayalı "alele özel amplifikasyon" yöntemi kullanılır. Bu değişimi floresan işaretlerle tanıyan otomatik analizlerin kullanılması da pahalı fakat etkin yöntemlerdir. Son yıllarda tüm genomdaki SNP değişikliklerinin hepsini birden saptamayı hedefleyen DNA çip analizi yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntemle tek bir çiple 250000-500000 SNP değişikliği saptanabilmektedir ve bu da gen haritalama çalışmalarında devrim niteliğinde bir katkı yapmıştır.

1.5.4. DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) : DNA'yı belli baz dizilerinden tanıyıp kesen enzimler, "DNA kesim enzimleri (Restriction Endonucleases)" olarak isimlendirilirler. Bazı kesim enzimlerinin özgül tanıma bölgeleri genellikle 4-6 DNA bazından oluşur. Normalde enzimin tanıma bölgesi olan bu bazlarda bir değişiklik olduğunu varsaydığımızda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir (Akarsu 2004).

1.6. Genom haritalaması

Genom, bir canlının sahip olduğu haploid DNA moleküllerinin tamamına verilen isimdir. Genom haritalaması, kromozomlar üzerinde gen lokuslarının konumlarının belirlenmesidir. Dizi analizi ise nükleotid baz çiftlerinin diziliminin belirlenmesidir. Dizi analiziyle; bir genin yapısı, işlevi ve hastalık

nedeni olan mutasyonu açıklanabilir. Pek çok genin ve diğer genetik belirleyicilerin birbirlerine göre bir kromozom boyunca diziliş sırasının belirlenmesiyle bir kromozomun haritasını veya tüm genom haritasını çıkarmak mümkündür (Passarge 1995).

İnsan genomunun anatomisi, DNA organizasyonunu gösteren haritalarla şematize edilir. DNA'nın organizasyonunu gösteren temelde 2 tip gen haritası vardır:

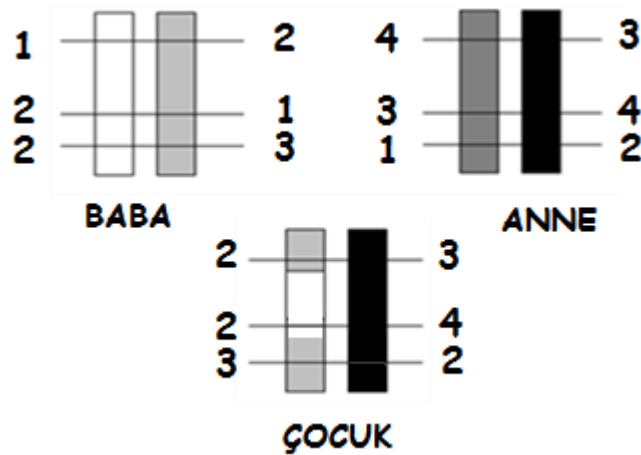
1.6.1. Fiziksel haritalar:

Fiziksel harita, bir gen lokusunun konumunu ve aynı kromozom üzerindeki diğer genlerle olan uzaklığını, kromozom üzerindeki belirli konumlara göre baz çifti olarak gerçek değerlerle verir. Düşük rezolüsyonlu fiziksel haritalar, genleri kromozomlar üzerine ya da metafaz kromozomları üzerindeki sitogenetik bantlara bağlı olarak bir kromozomun bölgeleri üzerine yerleştirilebilir; yüksek çözünürlükte fiziksel haritalama ise genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimlerini ve genler arasındaki uzaklıkları, DNA uzunluğu gibi gerçek fiziksel ölçümlerle belirler (Thompson ve ark 1991).

DNA dizilerinin fiziksel haritalanmasında çok basit bir yöntem olan kromozom in situ hibridizasyonu kullanılmıştır. Böylece uygun koşullarda yapılan hibridizasyondan sonra elde edilen sinyal, bir DNA dizisinin harita lokasyonunun tanımlanmasını sağlayabilir. Günümüzde in situ hibridizasyon teknikleri floresan in situ hibridizasyon (FISH) olarak geliştirilmiştir. Yöntem belirli bir DNA bölgesi kullanarak tüm kromozomlar içinde eşdeğer bölgeyi bulmak şeklinde uygulanır. DNA bölgesi, radyoizotopla veya floresanla işaretlendikten sonra ısıtma ve soğutma işlemlerini takiben tek iplik haline getirilir. Boyanmamış ve lam üzerine yayılmış metafazlara uygulanır. Hazırlanan prob, metafazda yer alan kromozomlardan kendi ile eşdeğer bölgesi olan ile birleşir. Floresan kullanılarak geliştirilen yeni yöntemler, DNA dizilerinin haritalanmasında kullanılmaktadır (Akarsu 2002).

1.6.2. Genetik haritalar:

Kısaca genomun matematiksel analizi olarak bilinir ve genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının bulunmasında moleküler biyolojik yöntemler ve bir dizi karmaşık istatistiksel analizleri kullanır. Genetik haritalama daha çok hastalık genlerinin haritalanması için bağlantı analizinde kullanılır (Kong ve ark 2002). Bağlantı (linkage), aynı kromozom üzerindeki birbirine yakın alellerin, tek bir birim olarak mayoz yoluyla birlikte aktarılma eğilimi olarak tanımlanabilir (Thompson ve ark 1991). Özellikle genetik etyolojili hastalıkların gen lokalizasyonlarının saptanmasında son derece verimli bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Metod en genel anlamı ile lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonu bilinen polimorfik bir genetik belirleyicinin (marker) kuşaklar arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi esasına dayanır. Bilindiği gibi kromozomlar mayozda karşılıklı parça değişimine uğrarlar (crossing over). Bu parça değişimleri sırasında birbirine yakın genler sıklıkla bir arada gametlere giderler. Birbirine uzak yerleşimli genler ise Mendel'in bağımsız tertiplenme kuralına göre rastgele olarak bir arada ya da ayrılarak giderler. Böylelikle yavru kuşaklarda ebeveynlerde olmayan yeni yapılanmalar ortaya çıkar. Bu olaya “*rekombinasyon*” olayı, ortaya çıkan ürünlere de “*rekombinant*” ürünler denir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Rekombinasyon olgusu

Rekombinasyon olayında temel hipotez şudur; eğer aradığımız gen lokalizasyonunu bildiğimiz genetik belirleyiciye çok yakınsa mayozda birbirlerinden ayıramayacak ve kuşaklar arasında daima genetik belirleyici ile alel birlikte kalıtılacaktır. Başka bir deyişle yavru kuşaklarda rekombinant bireylerin fazla sayıda bulunması aradığımız genden uzaklaştığımız anlamına gelecektir. Bu yolla genetik belirleyici alelin yeri bilindiğine göre ilgilendiğimiz genin ya da hastalığın yerini de bulmamız kolaylaşacaktır.

Rekombinasyon birimi centiMorgan (cM) ile ifade edilir. 1 cM her 100 kişide 1 rekombinant birey olduğunun göstergesidir ($1/100=0.01$) ve θ (theta) işareti ile gösterilir. Genetik uzaklıklar fiziksel anlamda ölçülebilir uzaklıklar değildir. Teorik olarak iki lokus arasında 1cM'lık bir uzaklıktan söz edildiği zaman, yaklaşık 1 milyon baz çiftinden söz ediliyor demektir (Akarsu 2002).

Gen haritalaması yapabilmek için kuşaklar arası kalıtımı izleyebileceğimiz geniş ailelere ihtiyaç vardır. Hipotezimizi oluşturabilmek için kalıtım kalıbının belirlenebilmesi (tek gen, kompleks, mitokondrial vs.) ve genetik belirleyicilerin saptanması gerekmektedir. Genetik haritalama işlemi, farklı moleküler biyolojik yöntemleri teknik olarak kullanmakla birlikte temel olarak istatistiksel bir analizdir ve tüm istatistik yöntemlerde olduğu gibi etkin bir genetik haritalama yapabilmek için hipoteze yönelik parametrelerin çok sağlam olarak belirlenmesi gerekir. Bu metod kullanılarak herhangi bir nitelik (gen, genetik belirleyici, hastalık gibi) haritalanmaktaysa da en geniş kullanım alanını genetik hastalıkların haritalanmasını oluşturmaktadır. Genetik etkenlere bağlı olduğunu düşündüğümüz bir hastalığın gen haritalamasını yapmak istediğimizde bu işlem için gerekli aşamalar şunlardır:

a. Haritalanacak fenotipin özellikleri belirli standartlara göre tanımlanmalıdır.

Fenotip; Bir bireyin genler ve çevre etkileşimleri sonucu çeşitli metodlar ile ortaya konulabilen özelliklerinin tümü olarak tanımlanabilir. Gen haritalamasının ilk aşaması haritalanacak genin, hastalığın ya da karakterin özelliklerinin standartlar oluşturularak saptanmasıdır. Gen haritalama çalışmalarında genellikle çok sayıda aileden toplanmış örneklere ihtiyaç vardır.

b. Hastalığın kalıtım kalıbı belirlenmeli ve kullanılacak metoda karar verilmelidir.

Öncelikle kalıtım kalıbı saptanmalı ve gen haritalama için seçilecek metod belirlenmelidir. Gen haritalama metodları başlıca iki ana gruba ayrılır.

1. Parametrik Metodlar

2. Non- parametrik Metodlar

Bu yöntemler bölüm 1.6’da ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

c. Haritalamada kullanılacak genetik belirleyiciler doğru olarak seçilmelidir.

Bir ailede bir kromozom bölgesinin kuşaklar arasında kalıtımını gösterebilmek ve bunu hastalıkla ilişkilendirebilmek için genetik göstergelere ihtiyaç vardır. Bu göstergeler bölüm 1.4’ de anlatılan polimorfik değişimlerdir. Bu özellik; her bir bireyde hatta kişiye ait biri anneden diğeri babadan kalıtılan kromozomlarda da farklıdır.

Eğer bir kişiye ait DNA örneği genomda bu özelliği gösteren bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR yolu ile çoğaltılır ve elektroforezde yürütülecek olursa o kişiye ait polimorfik genetik belirleyicilerden oluşan bir DNA profili ortaya çıkar. Bu tıpkı parmak izi gibidir, bireyler arasında farklılık gösterir. Birkaç kuşaklı aile bireylerinde böyle bir amplifikasyon yapılırsa kromozomların kuşaklar arasında dağılımı, bu polimorfik genetik belirleyiciler aracılığıyla belirlenir. Böylelikle mayozda oluşan parça değişimleri ve sonundaki olası rekombinant ürünler, aile bireylerini birkaç kuşak izleme olanağı sağlanabilir.

Rekombinasyon oranı; θ sıfır ile 0,5 arasında ($0 \leq \theta \leq 0,5$) bir sayıdır. $\theta = 0,5$ olduğunda, bunlar farklı kromozomlarda bulunan lokuslar gibi Mendel’in ikinci yasasına göre bağımsız davranmaktadır yani hastalık ile genetik gösterge arasında ilişki yoktur. Rekombinasyon oranı $\theta < 0,5$ olduğunda iki lokus arasında bir bağlantı (linkage) vardır ve rekombinasyon oranı θ küçüldükçe bağlantı olma olasılığı artmaktadır.

Bir kromozom üzerinde bulunan iki lokus arasındaki fiziksel uzaklık, bunlar arasındaki nükleotid sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bir santiMorgan (0.01 Morgan) yaklaşık olarak 10^6 baz çiftidir.

d. İstatistik değerlendirmeler metoda göre seçilmelidir

Bağlantı analizi için; *LOD* Skor (Logarithm of Odds Ratio) analizi yapılır. *LOD* Skor: Bağlantı saptanması olasılığının bağlantı gözlenmemesi olasılığına oranının logaritmik değerde ifade biçimidir. Başka bir deyişle aranan genin, test edilen kromozom lokusunda olması olasılığının ilgili lokusta bulunmaması olasılığına oranıdır. Ortaya çıkan değer arttıkça lokalizasyonun saptanması olasılığı da artacaktır. Örneğin bu değer 5 çıkarsa aranan genin test edilen kromozom lokusundan seçilen genetik belirleyiciye bağlantı göstermesi olasılığı, bağlantı olmaması olasılığından 10^5 kez (100.000 kez) daha fazla olacaktır. Negatif değerler de lokustan uzaklaşıldığının göstergesidir. *LOD* Skor = 3 ve üstü olan değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilirken -2 ve altı kesin olarak bağlantı yokluğunu gösterir. Aradaki değerler yoruma açıktır. *LOD* skoru ile iki genin (hastalık geni ile belirleyici alelin) ne kadar birbirine yakın olduğu matematiksel yollarla ölçülür ve sonuç olarak aranan genin test edilen kromozom lokusunda olup olmadığı anlaşılır. Hastalık aleli ile gösterge aleli arasında tam birlikteliği varsayan durum, ($\theta = 0.00$ cM) olarak gösterilen bölgedir ve burada yer alan sayılar *LOD* skor ifadeleridir. $-\infty$ ifadesi ise hastalık aleli ile gösterge aleli arasında en az bir bireyin rekombinasyon gösterdiğini belirtir. Tam bağlantı durumunda genotiplenen bireylerde hastalık ile gösterge aleli arasında rekombinasyonun hiç olmayacağı varsayılır (Akarsu 2004).

Geni haritalanacak olan hastalığın genomdaki lokalizasyonu bilinmemektedir. Genetik gösterge olarak kullanılacak olan polimorfik değişikliklerin ise hangi kromozom lokasyonunda bulunduğu insan genom projesi kapsamında belirlenmiştir. Kısaca bu polimorfik göstergelere ait haritalar elimizde mevcuttur. Belirli bir kromozom bölgesinden seçilen polimorfik DNA göstergeleri ile hastalık aleli arasında bağlantı analizi yapılırken, polimorfik göstergeler kromozomun üzerinde yukarıdan aşağıya doğru sıralanırlar ve

birbirlerine göre yerleri bellidir. Gen haritalama sırasında bu sıralamaya dikkat etmeden göstergeleri kullanacak olursak; gösterge-gösterge, hastalık- gösterge arasında oluşacak rekombinant yapılanmaları belirleyebilmemize imkan yoktur. Oysa ki gen haritalamanın esası bu rekombinasyonları belirlemeye dayanır.

1.7. Gen Haritalama Yöntemleri

1.7.1. Parametrik Metodlar:

Parametrik metodlar denilince temel olarak *Bağlantı Analizi (Linkaj Analizi)* akla gelir. Parametrik analizlerin kullanılabilmesi için aşağıdaki parametrelerin belirlenmesine ihtiyaç vardır:

- a. Hastalığın kalıtım kalıbı kesin olarak tespit edilmelidir.
- b. Üç kuşaklı ya da daha geniş aileler tercih edilmelidir.
- c. Örnek toplama yaklaşımı kalıtım kalıbına göre yapılmalıdır.

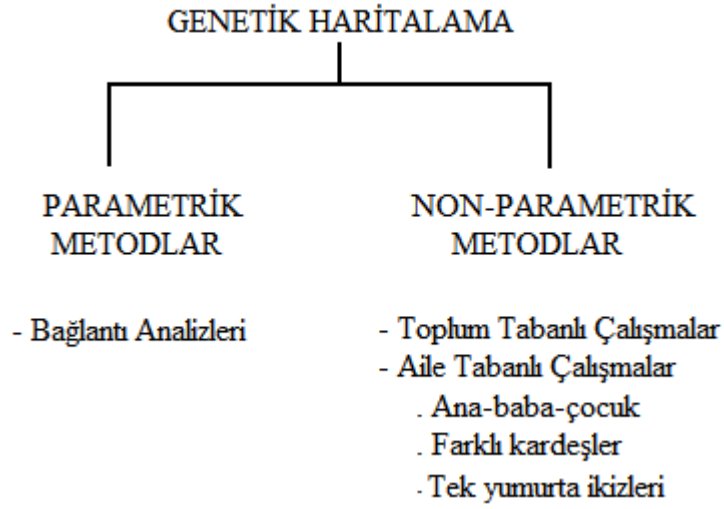
Hastalığın kalıtım kalıbı analizlerde kullanılacak hipotezin belirlenmesine yardımcı olur. Örneğin otozomal dominant bir gen ile kalıtılan bir hastalık haritalanmak isteniyorsa örnek toplama işlemi hasta bireylerin, eşleri ve tüm çocukları yanı sıra kan bağı olan bireylerin sadece kendileri şeklinde olmalıdır. Otozomal resesif bir hastalık söz konusu olduğu zaman ise sıklıkla taşıyıcı olan anne-baba ve tüm çocuklarının çalışmaya alınması yeterlidir.

1.7.2. Non- parametrik Metodlar:

Niteliklerin kalıtım kalıplarını belirlemek her zaman kolay değildir. Pek çok genetik nitelik multifaktoriyel kalıtım kalıbı gösterir ve bunlar için hipotez oluşturmakta zorluklar yaşanır. Yine her zaman birkaç kuşağı bir arada bulmak ve örneklemek olanaksızdır. Özellikle geç yaşta başlayan hastalıklarda genellikle önceki kuşaklar ölmüştür, genç kuşaklarda ise henüz hastalık ortaya çıkmamıştır. Bu durumda, eksiklikler göz önüne alınarak parametrelerden bağımsız olan non-parametrik metodlar diğer bir deyişle *assosiasyon (ilişkilendirme) çalışmaları* önerilmektedir (Akarsu 2002, Onkamo 2002).

Non-parametrik yaklaşımda, geniş pedigriler oluşturulmasına ihtiyaç yoktur; çünkü burada hastalıkla genetik belirleyicinin birlikte kalıtılması şartı aranmaz. Bunun yerine belirlenen bölgelerdeki aday genlerde aranan özelliğin var olup olmadığı araştırılır (Kong ve ark 2002).

Tablo 1.5. Genetik haritalama yöntemleri



İlişkilendirme çalışmalarında, toplumda evliliklerin rastgele olması ve test yapılan tarihten en az iki kuşak öncesi dönemden itibaren toplumda genetik karışım olmaması koşulu aranır. Ayrıca bu testler her aileden sadece bir etkilenmiş birey çalışılmasını gerektirir ve birden çok hastanın bulunduğu ailelerde geçerliliği düşüktür. Bu ilişkiyi değerlendirmek ve eş zamanlı olarak hastalık ve gösterge alelinin kuşaklar arası birlikteliğini değerlendirmek ve bağlantı hakkında da bilgi edinebilmek için kalıtımda dengesiz aktarım (TDT) testi kullanıma girmiştir. Bu test toplumdaki genetik yapılaşmadan etkilenmez. İlgilenilen alel açısından heterozigot bireyler ve hasta çocuklar incelenir. Aynı özellikleri barındıran bir diğer test de kardeşler arası dengesiz kalıtım (SDT)'dir. Burada ebeveyn ile ilgili veriye ihtiyaç duyulmamakla birlikte en az bir hasta ve bir sağlam kardeşin incelenmesi gereklidir (Akarsu 2002).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Klinik değerlendirme

Bu çalışmada, Konya bölgesinden saptamış olduğumuz dört kuşak boyunca 19 bireyde hastalık gözlenen toplam 86 kişilik bir ailede otozomal dominant Herediter Sferositoz'a neden olan genlerin haritalanması planlandı. Gerek kalıtım modelinin tam olarak tespit edilebilmesi gerekse ailenin büyüklüğünün bağlantı analizlerini uygulamayı olanaklı kılması nedeni ile ailenin bilinen gen lokalizasyonları ile test edilmesi düşünüldü.

Proband, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji polikliniğine başvuran ve tedavisi planlanıp, splenektomi yapılan 14 yaşında bayan hastaydı. Aile öyküsünden ailede pekçok kişide aynı kliniğin saptandığı ve opere edildikleri anlaşıldı. Ailelerle yapılan görüşmeler sonucunda, dört kuşaklı geniş bir aile pedigrisi elde edildi. Pedigri incelendiğinde HS'nin kalıtım kalıbının otozomal dominant formula uyumlu olduğu görüldü. Hemen hemen tüm aile bireyleriyle görüşüldü, arşivde bulunabilen dosyaları incelendi ve değerlendirildi. Gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul eden aile bireyleri "bilgilendirilmiş onam formunu" (EK-1) imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

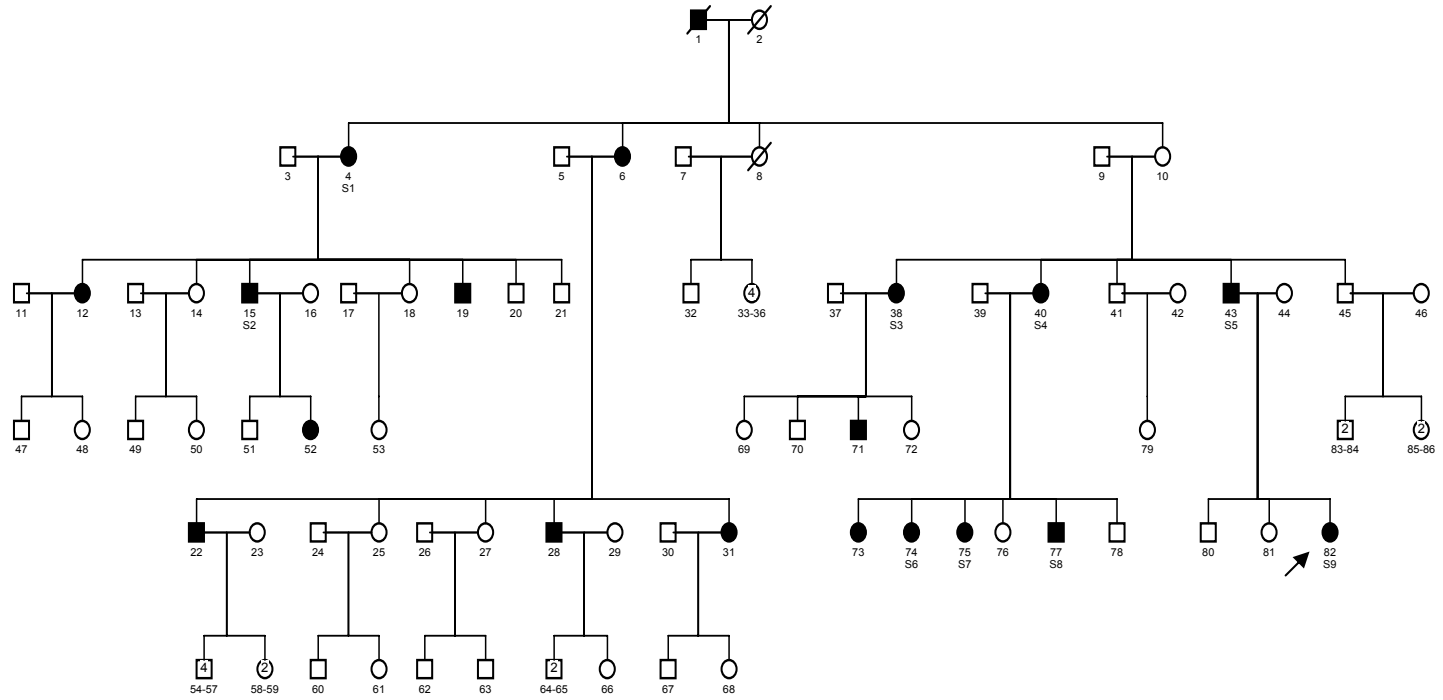
HS'nin klinik belirtilerine tüm hasta bireylerde rastlanmıştır. Bu belirtiler kısaca; anemi, sarılık ve splenomegalidir. Periferik yaymada retikülosit ve sferositlerin varlığı ve artmış eritrosit osmotik frajilitesi tanı koydurucudur. Hastalara sık aralıklarla kan transfüzyonu yapılmış ancak bu tedavinin de geçici bir çözüm olması nedeniyle hastalar yine eski durumlarına döndüklerinden radikal tedavi olarak splenektomi planlanmış, hastaların hemen hepsinde HS'nin kliniğiyle uyumlu olarak splenektomi sonrası klinikte dramatik bir düzelme gözlenmiştir.

Otozomal dominant kalıtım kalıbıyla çalışmaya uygun olarak; hasta bireyler, eş ve çocuklarının periferik kanlarının alınması planlandı. Çalışmaya başlayınca hastaların evlerine gidilerek, otozomal dominant kalıtım kalıbına

uygun olarak toplam 24 bireyden steril enjektörlerle 10cc'lik periferik kan alındı. EDTA içeren tüplere boşaltıldı ve aşağı-yukarı sallanarak kanın EDTA ile tam olarak karışması sağlandı ve pıhtılaşmanın önüne geçildi. Tüplerin üzerine kişinin adı, soyadı ve pedigrine göre verilen numarası ve tarih yazılarak herhangi bir karışıklık olması engellendi. Kanlar daha sonra +4 °C 'de en fazla 1 gün bekletilerek moleküler çalışmanın tamamlanacağı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Araştırma Merkezi bünyesinde faaliyet gösteren Gen Haritalama Laboratuvarı'na götürüldü.

2.1.2. Pedigrinin Oluşturulması

Pedigri CYRILLIC 2.1 programıyla hazırlandı. CYRILLIC 2.1, bir pedigrin çizim programı olmasının yanında; çizimden sonra polimorfik belirleyici genotiplerinin veri olarak girilmesi ile kromozomal haplotiplerin pedigrin üzerinde görüntülenmesine de olanak sağlamaktadır.



Şekil 2.1. Ailenin pedigrisi

2.1.3. Çözeltiler

2.1.3.1. DNA İzolasyon Tamponları

1. Nuclei Lysis Tamponu

10 mM Tris HCl	1.211 gr
400 mM NaCl	23.400 gr
2 mM Na ₂ EDTA	0.744 gr

Toplam 1 lt. olacak şekilde hazırlandı.

2. Proteinase K (10 mg/ml)

10 mg	Proteinase K
1 ml 0.01 M	Tris HCl
9 ml	Distile su

Solüsyon Eppendorf tüplerine alınarak -20 °C' de saklandı.

3. SDS Solüsyonu(%10 luk)

10 gr	SDS
100 ml	Distile su

Çözelti hazırlandıktan sonra filtre edilerek 37 °C 'de saklandı.

4. Amonyum Asetat Solüsyonu (9.5 M)

36.613 gr	Amonyum asetat
15 ml.	Distile su

50 ml. 9,5 M amonyum asetat hazırlamak için 36.613 gr amonyum asetat 15 ml. distile su içinde çözüldü. Filtreden geçirildikten sonra +4°C' de saklandı.

2.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

1. 10X TBE (Tris- Borik Asid-EDTA)Solüsyonu

108 gr (89 mM)	Tris Base
55 gr (89 mM)	Borik asit
40 ml. 0,5 M	EDTA (pH= 8)

Karıştırıcıda çözümlenerek hazırlandı. 100 cc TBE + 900 cc distile su olacak şekilde % 10 luk TBE solüsyonu hazırlandı.

2. 1X TBE Solüsyonu

1X TBE solüsyonu elde etmek için 10X TBE tampon çözeltisi 1:9 oranında distile su ile sulandırıldı.

3. Etidyum Bromid Çözeltisi (EtBr)

10 mg EtBr
1 ml Distile su

Çözelti hazırlanarak koyu renkli cam şişede saklandı.

4. Yükleme Tamponu

% 95	Formamid	940 µl
0.5 M	EDTA	40 µl
%0.05	Bromfenol blue	0.5 µl
%0.05	Ksilen Siyanol	0.5 µl

Toplam hacim 1 ml. olacak şekilde hazırlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

5. %2 lik Agaroz Jel Çözeltisi

Agaroz 1 gr
1X TBE 50 ml. (450 ml distile su + 50 ml 10X TBE)
EtBr 2 µl

2.1.3.3. Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları

1. %40'lık Poliakrilamid Çözeltisi

Akrilamid 38 gr.
BIS 2 gr. (N,N methylene bis acrylamide)
Distile su 60 ml

Toplam 100 ml. olacak şekilde hazırlandı. Saklandığı cam şişe ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarıldı ve +4°C'de saklandı.

2. %10'luk APS (Amonyum Persülfat) Çözeltisi

APS 1 gr.
Distile su 10 ml.

Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

3. Jelin İçeriği

Üre	25 gr.
Poliakrilamid (%40)	10.5 ml.
10X TBE	6 ml.
Distile su	25 ml.
APS (%10)	500 µl
TEMED	30 µl

4. Yapışkan solüsyon

% 95 ethanol	990 µl
Yapışkan solüsyon	5 µl (δ-methacryloxypropyltri-methoxylane)
Glasiyel asetik asid	5 µl

5. dNTP karışımı

1 ml'de 2,5 mmol olacak şekilde hazırlandı. Herbir dNTP'den 25 µl olacak şekilde alındı ve 900 µl distile suyla karıştırılarak 1000 µl'lik bir karışım hazırlandı.

6. Formamidli yükleme boyası (Stop dye)

% 95	Formamid	940 µl
0,5 M	EDTA	40 µl
% 0,05	Bromfenol blue	10 µl
% 0,05	Xylene siyanol	10 µl

Toplam volüm 1ml olacak şekilde hazırlandı.

2.1.3.4. Gümüş Boyama Çözeltileri

1. %10 luk Asetik asid çözeltisi

100 ml glasiyel asetik asit.

900 ml deiyonize su

Toplam volüm 1000 ml olacak şekilde hazırlandı.

2. Gümüş nitrat çözeltisi

1,8 gr gümüş nitrat (AgNO_3)

1500 ml deiyonize su

Karışım hazırlanarak kullanılmadan hemen önce içine 2 ml formaldehit eklendi.

Bu işlemler manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı.

3. Sodyum karbonat çözeltisi

30 gr Sodyum karbonat (NaCO_3)

2 ml Formaldehit

1 parça Sodyum tiyosülfat

1 lt. Distile su

1000 ml distile su içine 30 gr sodyum karbonat ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözünmesi sağlandı. Çözelti soğuması için buzdolabına kaldırıldı. Kullanılmasına birkaç dakika kala içerisine 2 ml formaldehit ve 1 parça sodyum tiyosülfat eklendi. Soğuk olan çözelti bantların daha uzun zamanda görünür hale gelmesini sağlayarak işlemlerin daha kontrollü ilerlemesine yardımcı oldu.

2.2. Yöntem

2.2.1. Periferik Kan Örneklerinin Alımı

Hereditör Sferositozlu aileye çalışmanın amacı ve işleyişi anlatıldı ve onam formları okutulup imzalatıldı. Çalışmanın planlandığı bireylerden EDTA'lı tüplere 10cc periferik kan alındı. DNA izolasyonu yapılabilmek için +4°C de saklandı.

2.2.2. Periferik Kandan DNA izolasyonu

Yüksek tuz konsantrasyonu ile DNA eldesi yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

1. EDTA'lı tüp içerisindeki 10 ml. Kan 50 ml. lik santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 40 ml. soğuk steril distile su dolduruldu.
2. Kapakları sıkıca kapatılan tüpler 2-3 dakika elde hızla (aşağı-yukarı) çalkalandı.
3. 10 dakika 2000 rpm hızda 21°C de santrifüj edildi.
4. Süpernatant atılıp pellet üzerine 25 ml. soğuk steril distile su eklendi ve pellet resüspanse oluncaya kadar hızla çalkalandı.
5. 10 dakika 2000 rpm hızda 21°C de santrifüj edildi.
6. Süpernatant atılıp pellet üzerine 3 ml. nuclei lysis buffer, 150 µl proteinaz K (10 mg/ml) ve 200 µl SDS (%10) eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
7. Tüpler 37°C deki su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı.
8. Tüpler 37°C den alınıp üzerlerine 2 ml. amonyum asetat konularak 20-25 kez (aşağı- yukarı) çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye bırakıldı.
9. 15 dakika 3500 rpm hızda 21°C de santrifüj edildi.
10. Süpernatant transfer pipet yardımıyla başka bir tüpe yavaşça aktarıldı. Üzerine tüpteki miktarın 2 misli kadar absolüt etanol eklendi ve yavaşça alt-üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı. DNA'nın kırılmamasına özen gösterildi.
11. 0.5 ml.lik eppendorf tüplerinin üzerine hastanın adı, soyadı ve numarası yazıldı ve içine 500 µl distile su konularak iyice görünür hale gelen DNA pipet

ucu yardımı ile transfer edildi ve oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. (Eğer DNA miktarı az ise distile su miktarı azaltılmalıdır).

12. İzole edilen DNA'ların miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlendi. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. Bu çalışmada izole edilen DNA çift iplikli olduğundan miktar tayininde aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{sulandırma oranı} \times 50$$

Ölçülen DNA konsantrasyonları kaydedildi ve konsantrasyonlara göre 50 ng/ml. olacak şekilde seyreltildi.

2.2.3. PZR amplifikasyonu

Çalışmanın amacı; Herediter Sferositoz'lu bireylerin ailelerinde, en sık hastalık etkeni olarak belirlenen *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* genlerine bağlantının var olup olmadığını belirlemektir. Bu bölgelere özel polimorfik genetik belirleyiciler kullanılarak daha önce izole edilen DNA'larla PZR'de amplifikasyon yapıldı (Tablo 3.1).

Tablo 2.1. *ANK1*, *SPTB*, *SPTAI*, *SLC4AI* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan polimorfik belirleyiciler ve sekansları

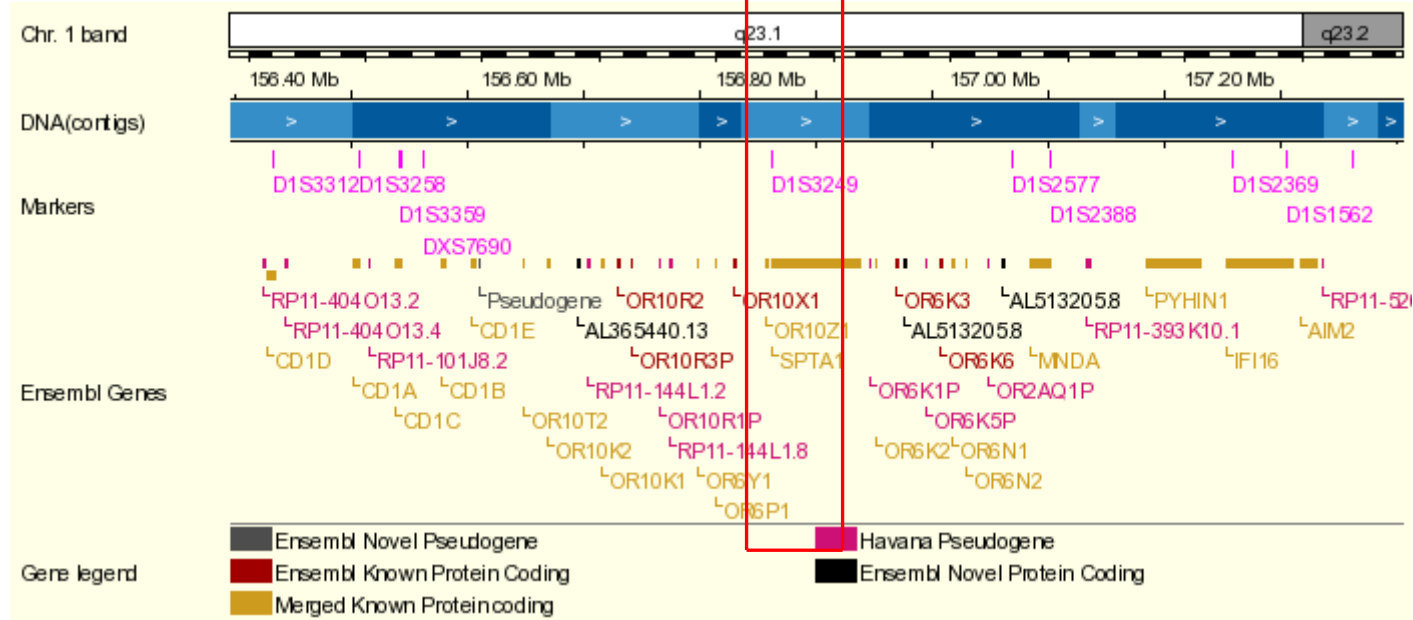
Gen	Kromozom	Genetik gösterge	Genetik gösterge sekansı		
<i>ANK1</i>	8p11.2	D8S1051	F: CTGCATTACAGCCTGGATG R: AAGAGTAGATGGGAGGCAA		
		D8S268	F: ACCTACAAGCAACAACACCA R: GTTGACTTCCATGGCTCTTT		
<i>SPTB</i>	14q23-q24.1	D14S1012	F:GGCATCAGGGCAATGT R:CACCAGTTGGGAATGAGA		
		D14S1046	F:CATTTGGAGTTGAGTGGTTGA R:CCTCTGTGGATTCTGGGA		
		D14S1069	F:TGTTCTAGTTGATGTGAGACTT R:TATTTGAGGACCTGCTGTAA		
		D17S932	F: GCTAAAAATACACGGATGG R: TGCAAGACTGCGTCTC		
<i>SLC4AI</i>	17q21-q22	D17S1861	F: AGGGGCAGCAGTCCTGTA R:ACATCATCCTGAAATCTAATGG		
		D17S1325	F:AAAGGTGGCAATTCACAGTTG R:GTGATAAAACTCAGTGGTACC		
		D17S1299	F:TAGCACTTGAGCACACATGG R: GTGCATTATGGGGACCATTA		
		D17S951	F: GGCCTCCCAAAGTCTT R: TCTACCCCGATGAGCCA		
		<i>SPTAI</i>	1q22-q23	D1S1653	F:GGAAAGCCTGTAGGAAGAGG R: CCTGGATGACAGAGTGCTCT
				D1S2635	F: TAGCAGATCCCCCGTC R:TGAATCCTACCCCTAAGTAAT

Bu genetik göstergeler, genom üzerinde sadece belli bir bölgeye bağlanan ve primer olarak adlandırılan 20-25 baz çiftinden oluşan özgün nükleotid dizileridir. Bu diziler genomda eşleniklerini bularak sadece o bölgeye bağlanır, ısıya dayanıklı polimeraz enzimi (Taq Polimeraz) aracılığı ile belli ısı derecelerinde istenilen bölgeyi kopyalamaya başlar. Böylelikle çalışmak istediğimiz genom bölgesi binlerce kopya halinde deney tüpünde elde edilmiş olur. Bu işlem Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) olarak adlandırılır. Polimorfik göstergelerin seçimi, <http://research.marshfieldclinic.org> ve <http://www.ensembl.org> internet sitelerinden elde edilen bilgilere göre belirlendi. Aşağıda şekil 2.2, şekil 2.3, şekil 2.4 ve şekil 2.5' te <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen genin ve polimorfik göstergelerin kromozom üzerindeki yerleşimleri görülmektedir.

Chromosome 1



Overview

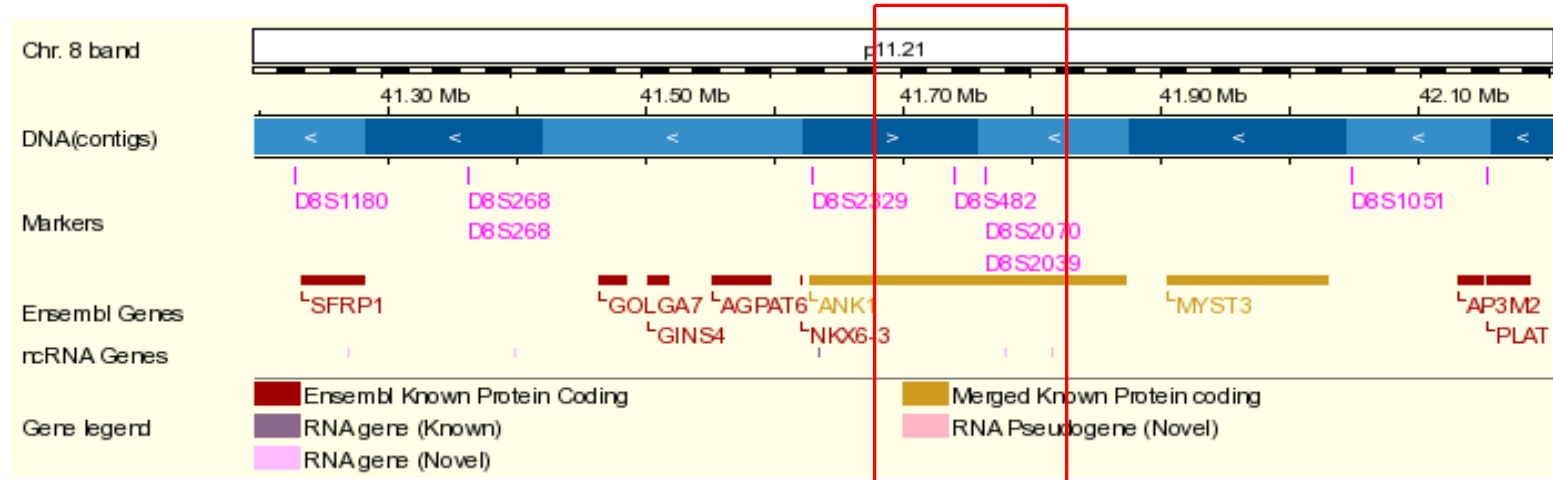


Şekil 2.2. *SPTA1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 1 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Chromosome 8



Overview

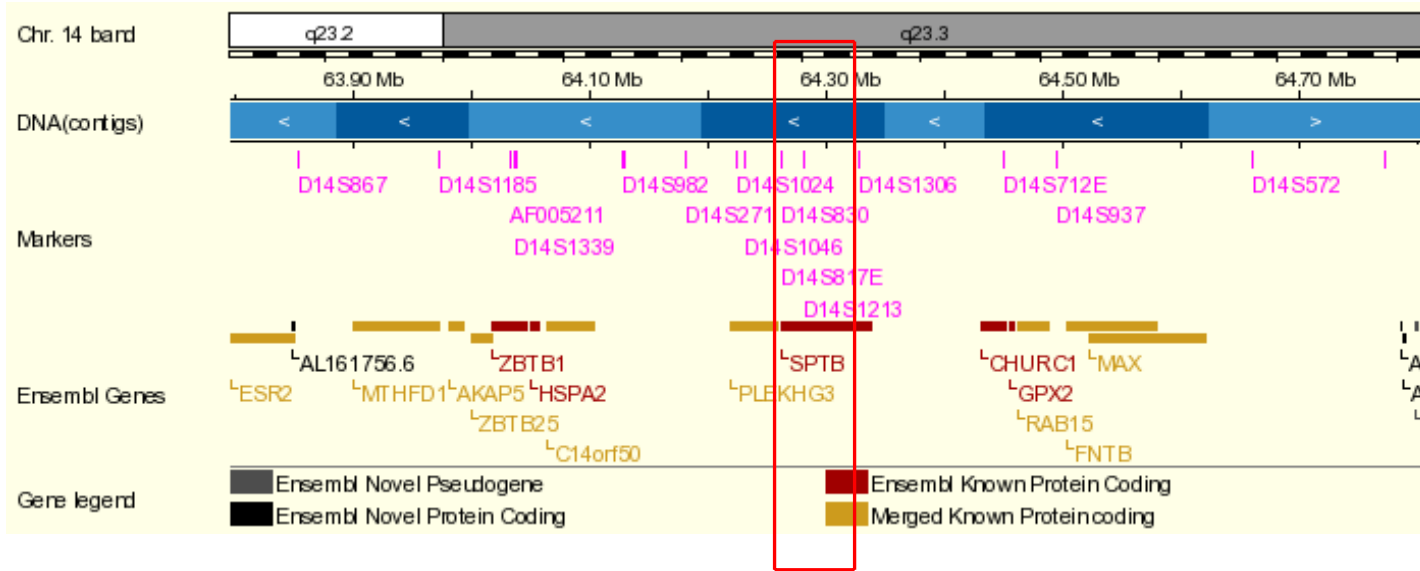


Şekil 2.3. *ANK1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 8 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Chromosome 14

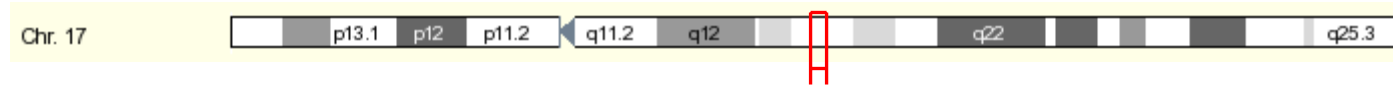


Overview

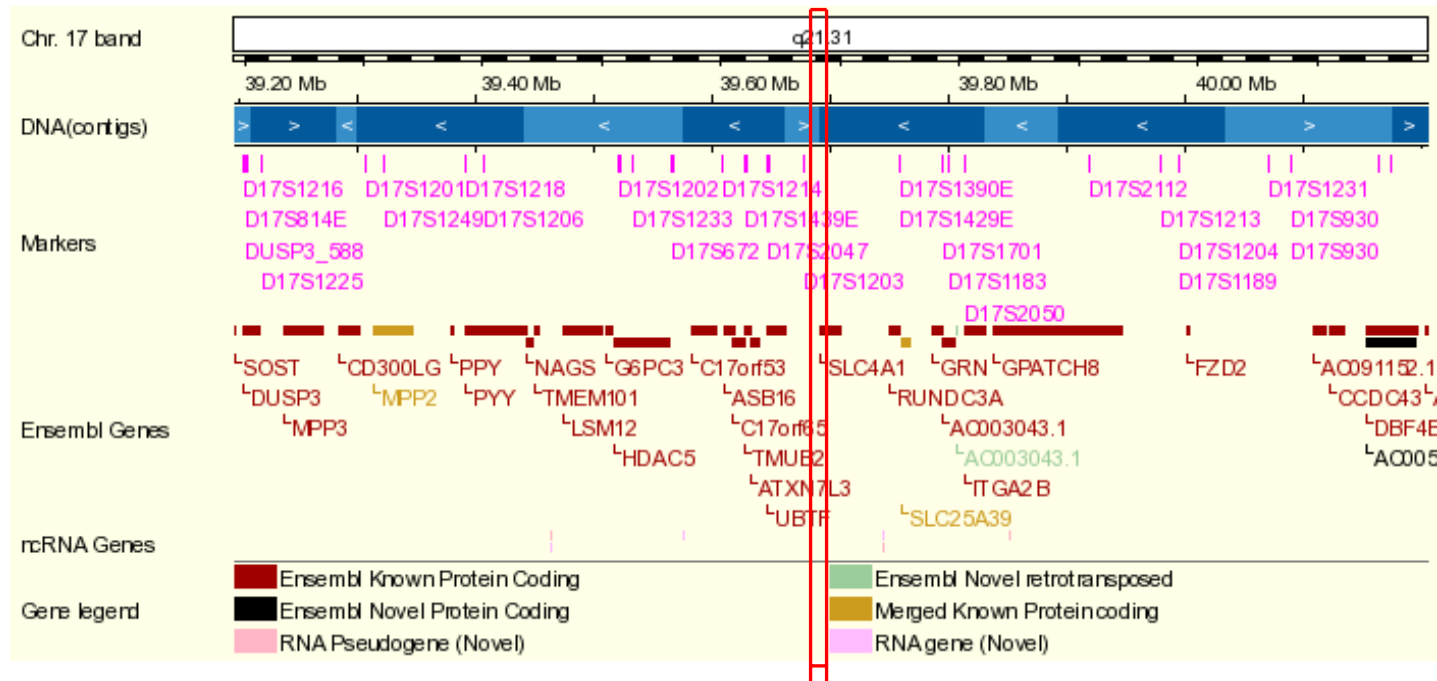


Şekil 2.4. *SPTB* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 14 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Chromosome 17



Overview



Şekil 2.5. *SLC4A1* geni ve bu gene yakın yerleşimli polimorfik göstergelerin <http://www.ensembl.org> sitesinden elde edilen verilere göre 17 numaralı kromozom üzerindeki yerleşimleri.

Daha önceden izole edilen ve -80 °C’de saklanan DNA’lar kullanılarak, PZR karışımı buz üzerinde hazırlandı ve incelendi.

PZR karışımı (master mix):

d H ₂ O	14.4 ml
Buffer	2.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl
dNTP	2.5 µl
Primer	↗	F 1 µl
	↘	R 1 µl
Taq Pol.	0.1 µl
DNA	2 µl

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

PZR Protokolü

95 °C’de	5 dk	1 döngü
95 °C’de	┌ 30 sn │ └ 30 sn └ 40 sn	30 döngü
54 °C’de		
72 °C’de		
72 °C’de	5 dk	1 döngü olarak uygulandı.
4 °C’de	∞	

2.2.3.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrol Edilmesi

PZR sonrası amplifikasyon ürünlerinin %2’lik agaroz jelde kontrolü yapıldı. 15 x 10 cm. boyutunda mini yatay jel elektroforez cihazı kullanılarak amplifikasyon ürünleri yürütüldü.

1. %2’lik agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 1 gr. Agaroz 50 ml. 1X TBE tamponunda çözelti berrak oluncaya kadar kaynatılarak çözüldü. Çözelti

berraklaştıktan sonra ısısı 50°C' ye kadar soğutuldu. Üzerine stok EtBr (Etidyum bromid) solüsyonundan 1 µl eklenerek karıştırıldı. Elektroforez küvetine tarak yerleştirilerek jel çözeltisi boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerleşme için bırakıldı.

2. Elektroforez tankına 1 X TBE tamponu konuldu. Jel tarağı çıkarıldıktan sonra polimerleşmiş jel tank içine alındı.

3. 4 µl PZR örneği, 1 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak jelde tarağın oluşturduğu kuyucuklara yüklendi. Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin doğruluğunu saptamak için 50 baz çiftlik DNA genetik belirleyicisi bir kuyucuğa 1 µl olacak şekilde yüklendi.

4. 5 dakika 85 voltta yürütüldü. Örneklerin yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV transilüminatörde görüntülenerek PZR ürünleri kontrol edildi. Amplifiye olan DNA örnekleri daha sonra denatüran poliakrilamid jel hazırlanarak bu jellerde yürütüldü.

2.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Belirlenmiş olan genetik belirleyiciler ile birlikte PZR'de çoğaltılan parçadaki alel polimorfizmlerini gösterebilmek için DNA parçacıklarının yüksek elektrik akımı altında poliakrilamid jellerde yürütülmesine ihtiyaç vardır. Bilindiği gibi her birey, biri anneden diğeri babadan kalıtılmış olan 22 adet eş somatik kromozom taşır. PZR reaksiyonu sonucunda bu eş kromozomların her ikisi birden çoğalmış olur. Ancak eş olduğu varsayılan bu iki kromozom arasında küçük farklar var ise (tek nükleotid değişikliği, delesyon gibi) bu değişiklikler de çoğalan parça içinde bulunacaktır. Yapılan işlemler;

1. Poliakrilamid jel elektroforezinin ilk aşaması camların hazırlanmasıdır. Bunun için önce kısa ve uzun iki cam alınarak alkolle üç kez temizlendi. Her iki cam için kullanılan bezlerin birbirine karıştırılmamasına dikkat edildi. Daha sonra uzun cama kaygan (Sigmacote, SIGMA) çözelti sürüldü. Kısa cama ise yapışkan çözelti (δ -methacryloxypropyltri-methoxylane, SIGMA) sürüldü ve iyice cama yayıldıktan sonra kurumaya bırakıldı. Her iki cam tekrar alkolle temizlenerek kaygan ve yapışkan çözeltilere ait fazlalıklar silindi. Camlar üst üste konmadan önce iki camın arasında aralık kalmasını

sağlamak amacıyla uzun camın her iki yanına ince yan kenarlıklar konuldu. Sonra kısa cam uzun camın üzerine kapatıldı. Camların alt kısmına da alt kenarlık konuldu ve bu kenarlık yan kenarlıklara doğru boşluk kalmaması için iyice yanaştırıldı ve sıkılaştırıldı. Bu şekilde hazırlanan camlar içine jel doldurulmak üzere kenara ayrıldı.

2. %7 oranında hazırlanan jelin hazırlanışı sırasında üre, poliakrilamid, TBE ve distile su çözününceye kadar karıştırıcıda karıştırıldı. Jel çözüldükten sonra jelin polimerleşmesini sağlamak amacıyla içine %10 luk APS'den 500 µl konuldu. Üstüne katalizör olarak TEMED'den 30 µl eklendi. Daha sonra hızlı bir şekilde jel 50 ml'lik enjektörün arkası çıkarılarak içine dolduruldu ve iki camın arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde ağır ağır döküldü. Jel döküldükten sonra jelin üst kısmına dişli kısım üste gelecek ve deliklerin 2/3'ü yukarıda kalacak şekilde testere dişli tarak yerleştirildi. Tarağın yerleştirilmesinden sonra jel üst taraftan da sıkıştırıldı ve etrafına kıskaçlar takılarak sabitlendi ve donmak üzere bırakıldı.

3. Donan jelin kıskaçları çıkarıldı. Daha sonra camların arasından alt ve üst kenarlıklar çıkarıldı. Cam yıkanarak jel artıklarından temizlendi ve elektroforeze yerleştirildi. Cihazın alt ve üst kısmına %10'luk TBE ilave edildi; böylece akımın kesintisiz olarak üst taraktan başlayıp alt yüzeye kadar ulaşması sağlandı. Jel örnekler yüklenmeden önce 20-30 dakika süreyle 1800 volt akıma maruz bırakıldı. Testere dişli tarağın yerleştirileceği kısım üreden ve jel parçacıklarından temizlendikten sonra tarak yerleştirilerek kuyucuklar oluşturuldu.

4. Örnekler 95 °C'de 5 dakika bekletildi ve sonra buz üzerine alındı. 8 µl formamidli yükleme boyası amplifikasyon örneklerinin içine koyularak karıştırıldı ve her bir boşluğa bir bireye ait örnek gelecek şekilde yüklendi. Örneklerin başına ve sonuna da 4µl Pbr ile 3 µl yükleme boyası karıştırılarak yüklendi ve 2-3 saat kadar 1800 V ve 60W elektrik akımı altında yürütüldü.

2.2.5. Gümüş Nitrat İle Boyama ve Jellerin Fotoğraflanması

Elektrik akımı altında jelde yürütülen DNA parçacıkları eğer radyoaktif olarak işaretlenmemişse görünür durumda değildir. Bu jellerin boyanması için farklı teknikler vardır ve bunlardan biri de gümüş nitrat aracılığı ile jellerdeki DNA parçacıklarını görünür kılmaktır. Bunun için gerekli işlemler;

1. Jel yürütüldükten sonra güç kaynağı kapatılarak iki cam arasındaki jel, elektroforez düzeneğinden alındı ve soğumaya bırakıldı. (Sıcakken açılması durumunda istenmeyen yapışmalar olabilir).

2. Jelin soğumasından sonra iki cam birbirinden ayrıldı. Jelin üzerine yapıştığı kısa cam %10'luk asetik asit solüsyonu içerisinde, orbital çalkalayıcı üzerinde 15 dakika çalkalanarak jelin fikse olması sağlandı.

3. Fiksasyon işleminden sonra kısa camın üzerinde bulunan jel, su ile birkaç kez yıkandı. Daha sonra 2 ml formaldehit ilave edilen gümüş nitrat solüsyonu jelin üzerine döküldü. Jel, gümüş nitrat solüsyonu içerisinde ve orbital çalkalayıcı üzerinde 20 dakika çalkalandı. Gümüş nitrat döküldükten sonra yaklaşık 5 saniye süreyle jel distile suyla hızla çalkalandı.

4. Daha sonra jelin üzerine 1 parça sodyum tiosülfat ve 2 ml formaldehit içeren soğuk sodyum karbonat çözeltisi dökülerek bantların görünür hale gelmesi sağlandı. Bu işlem sırasında camın bulunduğu kap sürekli olarak aşağı-yukarı sallandı.

5. Bantlar koyulaşınca cam % 10'luk asetik asit solüsyonu içine alındı ve 5 dakika burada tutularak boyama işlemi durduruldu.

6. Jel son olarak musluk suyunda yıkanarak asetik asit uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı.

Fotoğraflama için;

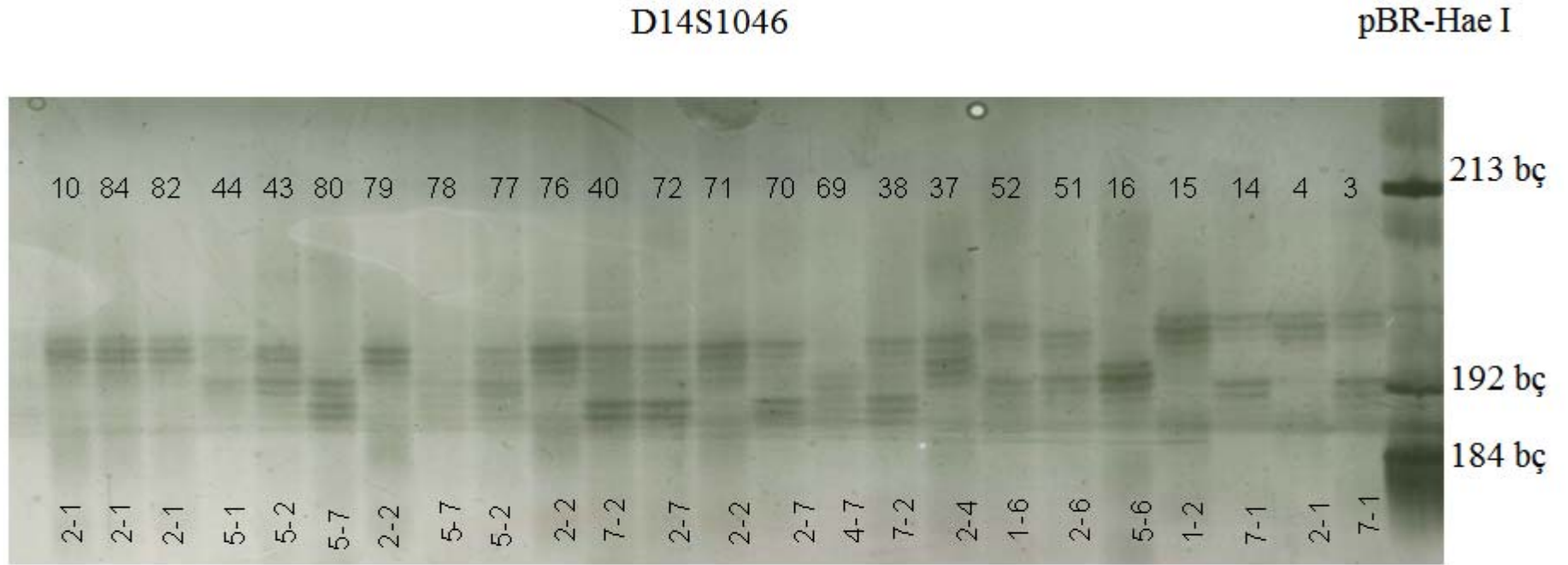
1. Üç küçük boyama kabı alındı. Birinci kaba developer, ikinci kaba su, üçüncü kaba da fixer kondu. (Developer ve fixer için Kodak Universal Developer ve Fixer'den %10'luk solüsyon hazırlandı).

2. Beyaz ışık kaynağı üzerine cama yapışık olan jel kondu. Jel üzerine de gümüş emdirilmiş fotoğraf kağıdı (ADC film- Promega) koyularak film çekildi.

3. Film çekildikten sonra developer ve fixer çözeltileri kullanılarak fotğraflandı.

2.2.6. Genotipleme

Film üzerinde görünen bantlara büyüklük farklılıklarına göre numara verildi. Numaralandırma yapılırken pBR-Hae III DNA büyüklük göstergesi referans olarak kullanıldı. 14 numaralı kromozoma ait denatüren poliakrilamid jel fotoğrafı şekil 2.6'da verildi.



Şekil 2.6. 14 numaralı kromozoma ait denatüren poliakrilamid jel fotoğrafı

2.2.7. Haplotipleme

Pedigri üzerinde polimorfik DNA göstergelerinin kromozom üzerindeki yerleşimlerine uygun olarak sıralanması işlemine *haplotipleme* denir (Tek bir göstergeye ait verilere *genotip*, tüm göstergelere ait kromozom verilerine *haplotip* denir). Buna göre haplotipleme için önce genotipleme yapıldı; genotiplemenin ardından aynı bölgeden seçilen birden fazla genetik belirleyici kromozomda yer aldıkları sıraya uygun olarak pedigrinin üzerine nakledildi ve ana ve babadan gelen kromozomlar tahmin edilmeye çalışıldı. Tablo 3.2. de, belirlenen DNA göstergelerinin kromozom üzerindeki lokalizasyonları verilmektedir.

Tablo 2.2. DNA göstergelerinin kromozom üzerindeki varsayılan pozisyonları

Kromozom	Polimorfik Gösterge ve Genin Kromozom Üzerindeki Sırası ve Yeri	
1	D1S1653	156,099 Mb
	<i>SPTA1</i>	56,847 Mb
	D1S2635	157,337 Mb
8	D8S268	41,266 Mb
	<i>ANK1</i>	41,629 Mb
	D8S1051	41,947 Mb
14	D14S1012	62,792 Mb
	D14S1046	64,152 Mb
	<i>SPTB</i>	64,302 Mb
	D14S1069	67,357 Mb
17	D17S1299	36,147 Mb
	D17S932	38,358 Mb
	D17S1325	38,791 Mb
	<i>SLC4A1</i>	39,690 Mb
	D17S951	39,075 Mb
	D17S861	40,062 Mb
	D17S2180	43,928 Mb

2.2.8. İstatistiksel Yaklaşım

Bağlantı analizlerinin en kritik aşaması hastalığın kalıtım kalıbının tam olarak tespit edilmesidir. Bunun için aile bireyleri hem klinik açıdan hem de pedigrileri incelenerek detaylı tiplendirilmelidirler.

Çalıştığımız ailenin ulaşılabilen tüm bireylerinin fenotipi belirlenmiş ve pedigri de incelendikten sonra kalıtım kalıbının otozomal dominant olduğuna karar verilmiştir. Otozomal dominant kalıtım kalıbında, hastalığın ortaya çıkması için kişinin anne ya da babasından tek kopya hastalık genini alması yeterlidir. Hastalık her kuşakta %50 ihtimalle ve cinsiyet farkı gözetmeksizin ortaya çıkar. Bazı bireyler geni taşıdıkları halde hastalığı ortaya çıkarmazlar fakat hastalık sonraki kuşaklarda ortaya çıkar. Bu duruma *azalmış penetrans* denir (Pedigride 10 numaralı bireyde olduğu gibi).

Bağlantı analizinin sonuçlarını değerlendirebilmek için LINKAGE ve FASTLINK Version 3.0 programının kullanılmasına karar verildi. LINKAGE programının analizleri sağlıklı olarak yapabilmesi için pedigrilere ait bazı parametreleri içeren verilere ihtiyaç vardır. Bunun için pedigride görülen birey numarası, cinsiyet, hastalık durumu, akrabalık ilişkileri ve genotip bilgilerinin sayısal veya simgesel olarak kaydedilmesi gerekir. Hasta bireyler (A), normal bireyler (N) harfi ile, erkekler (M), kadınlar (F) harfi ile gösterildi. Otozomal dominant kalıtım kalıbı için hastalık alel frekansı 0.0001 ve normal alel frekansı 0.9999 olarak kabul edilmektedir. Ailede bir bireyde azalmış penetrans gözlenmesinden dolayı frekans yaklaşık %85 olarak hesaplandı. LINKAGE programında kullanılan pedigri dosyası tablo 2.3’de belirtildi.

Tablo 2.3. LINKAGE programında kullanılan veriler

Aile No	Birey No	DNA No	Baba	Anne	Cinsiyet	Durum
8	1	---	0	0	M	A
8	2	---	0	0	F	N
8	3	S10	0	0	M	N
8	4	S1	1	2	F	A
8	5	---	0	0	M	N
8	6	S24	1	2	F	N
8	7	S11	3	4	F	N
8	8	S2	3	4	M	A
8	9	S12	0	0	F	N
8	10	S15	0	0	M	N
8	11	S3	5	6	F	A
8	12	---	0	0	M	N
8	13	S4	5	6	F	A
8	14	S5	5	6	M	A
8	15	S22	0	0	F	N
8	16	S13	8	9	F	A
8	17	S14	8	9	M	N
8	18	S16	10	11	F	N
8	19	S17	10	11	M	N
8	20	S18	10	11	M	A
8	21	S19	10	11	F	N
8	22	S6	12	13	F	A
8	23	S7	12	13	F	A
8	24	S20	12	13	F	N
8	25	S8	12	13	M	A
8	26	S21	12	13	M	N
8	27	S9	14	15	F	A

3. BULGULAR

Otozomal Dominant Herediter Sferositozun yaygın olarak görüldüğü dört kuşaklı geniş bir ailede *SPTAI*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* genleri bağlantı analizi ile araştırıldı. Çalışmada, öncelikle aile ile ayrıntılı görüşme yapıldı ve pedigrisi oluşturuldu. Ulaşılabilen tüm aile fertleriyle görüşüldü ve klinik olarak değerlendirildi. Ailede 19 bireyde HS gözlemlendi. Bağlantı analizinde özellikle geniş aileler ile çalışılması, sonuca kesin olarak ulaşabilmede en büyük faktördür. Çalışmanın yapıldığı aile ne kadar geniş ve çok kuşaklı ise sonuca ulaşmak o kadar kolay olabilmektedir. İncelediğimiz bu aile 86 bireyden oluşan dört kuşaklı bir ailedir.

Hastalardan onaylı izin formu alınarak kalıtım kalıbına uygun bireylerden 10 cc'lik EDTA'lı tüplere periferik kanları alındı. Kanların DNA'ları izole edildi. Aday gene bağlantı gösterip göstermediğini araştırdığımız polimorfik belirleyicilerin primer dizileri order edilip PZR karışımı hazırlandı. PZR ile çoğaltılan karışım daha sonra poliakrilamid jelde yürütülerek gümüş nitratla boyandı ve elde edilen görüntü fotoğraflandı. Daha sonraki aşamada haplotipler yapıldı. Bağlantı analizi çalışmaları sonucunda elde edilen kromozom haplotipleri sırası ile *SPTAI*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* genleri için belirlendi. Haplotip analizi sonrası elde edilen veriler LINKAGE programına girilerek *LOD* skor sonuçları elde edildi.

Haplotip analizi yapılırken kromozom lokalizasyonu ve genetik belirleyici şekil 3.1; 3.2; 3.3; 3.4'de sağ üst köşede belirtilmiştir. Haplotipler en az rekombinasyonu verecek şekilde seçilmiştir. Pedigride yer alan bu haplotipler bir sonraki kuşakta her alel ayrı ayrı görülecek şekilde sütunlarla gösterilmiştir. İçi dolu sütunlar hastalık alelini taşıyan bireyleri, içi boş sütunlar ise normal alelleri taşıyan bireyleri göstermektedir. İnce sütunla gösterilen bireyler genetik belirleyiciden bilgi alınmadığı (non-informatif olan bireyler) durumları göstermektedir. Genetik belirleyicilerin ve aday genin konumu tablonun üst kısmında verilmiştir.

1 Numaralı Kromozoma Ait Haplotip Analizi

Genin ve genetik belirleyicilerin sırası ve kromozom lokalizasyonları Şekil 3.1’de üst kısımda belirtilmiştir.

Pedigride 38 numaralı bireyde görüldüğü gibi hastalık 21 haplotipi ile diğer kuşaklarda kendini göstermiştir. D1S1653 numaralı genetik belirleyici 69, 70, 71 numaralı bireylerde non-informatif olarak görünmektedir. 4 numaralı bireyde rekombinasyon olduğu saptanmıştır.

Haplotip oluşturulduğunda en az bir rekombinasyon saptanması, seçtiğimiz genetik belirleyicilerin birbirine çok yakın yerleşimli olması ve *LOD* skor negatifliği bize aradığımız genin bu bölgede olmadığını göstermektedir.

8 Numaralı Kromozoma Ait Haplotip Analizi

Genin ve genetik belirleyicilerin sırası ve kromozom lokalizasyonları Şekil 3.2’de üst kısımda belirtilmiştir. 8 numaralı kromozomda tek genetik belirleyici ile çalışılmasının nedeni gene çok yakın yerleşimli olmasıydı (~500 kb) ve bu genetik belirleyici ile alınacak sonuç bizim için anlamlı olacaktı.

Bu haplotipte de en az bir rekombinasyona rastlanması ve *LOD* skor negatifliği aradığımız genin hastalık geni olmadığını gösterdi.

14 Numaralı Kromozoma Ait Haplotip Analizi

Genin ve genetik belirleyicilerin sırası ve kromozom lokalizasyonları Şekil 3.3’te üst kısımda belirtilmiştir.

Pedigride 4 numaralı bireyde görüldüğü gibi hastalık 225 haplotipi ile kendini göstermektedir. Hasta bireylerin tamamının 225 haplotipini almış olması ve hiç rekombinasyonun görülmemesi; ayrıca *LOD* skor değerinin pozitif çıkması hastalık geninin bu bölgede olduğunu gösterdi. Hasta bireylerde bölgeden genotiplenen genetik göstergeler arasında rekombinasyon gözlenmedi. 69 ve 78 numaralı normal bireylerde ise D14S1046 ve D14S1069 genetik göstergeleri arasında gözlenen rekombinasyon, hastalık alelini D14S1069 genetik göstergesinin üst tarafına (sentromerik kısmına) yerleştirdi.

17 Numaralı Kromozoma Ait Haplotip Analizi

Genin ve genetik belirleyicilerin sırası ve kromozom lokalizasyonları Şekil 3.4'te üst kısımda belirtilmiştir.

Pedigride 4 numaralı bireyde görüldüğü gibi hastalık 414513 haplotipi ile kendini göstermektedir. Seçtiğimiz genetik belirleyiciler gene çok yakın yerleşimli olarak seçilmiştir. 40, 78 ve 80 numaralı bireylerde rekombinasyon gözlenmektedir. Ancak bu bireyin çocuklarında rekombinasyonun devam edip etmediği anlaşılamamaktadır. 71, 76 ve 77 numaralı bireylerde D17S1861 ve D17S2180 genetik belirleyicileri informatif değildir. Seçilen genetik belirleyiciler gene çok yakın yerleşimli olmasına rağmen iki genetik belirleyicinin non-informatif olması bizi daha fazla genetik belirleyici ile çalışmaya sevk etmiştir. Birden fazla bireyde rekombinasyon olması ve *LOD* skor negatifliği aradığımız genin hastalık geni olmadığını göstermektedir.

Tüm kromozomlarda oluşturulan haplotipler incelendiğinde, 80 numaralı bireyin anneden gelen alelleri aldığını ancak babadan gelen alelleri almadığını ortaya koymuştur. Bireyden yeniden periferik kan alınarak DNA'sı izole edilmiş ve bir kez daha çalışılmış; ancak aynı sonuçla yeniden karşılaşılnca bu bireyin babasının 43 numaralı birey olmadığı sonucuna varılarak çalışmaya dahil edilmemesine karar verilmiştir.

Polimorfik DNA göstergesi pozisyonu

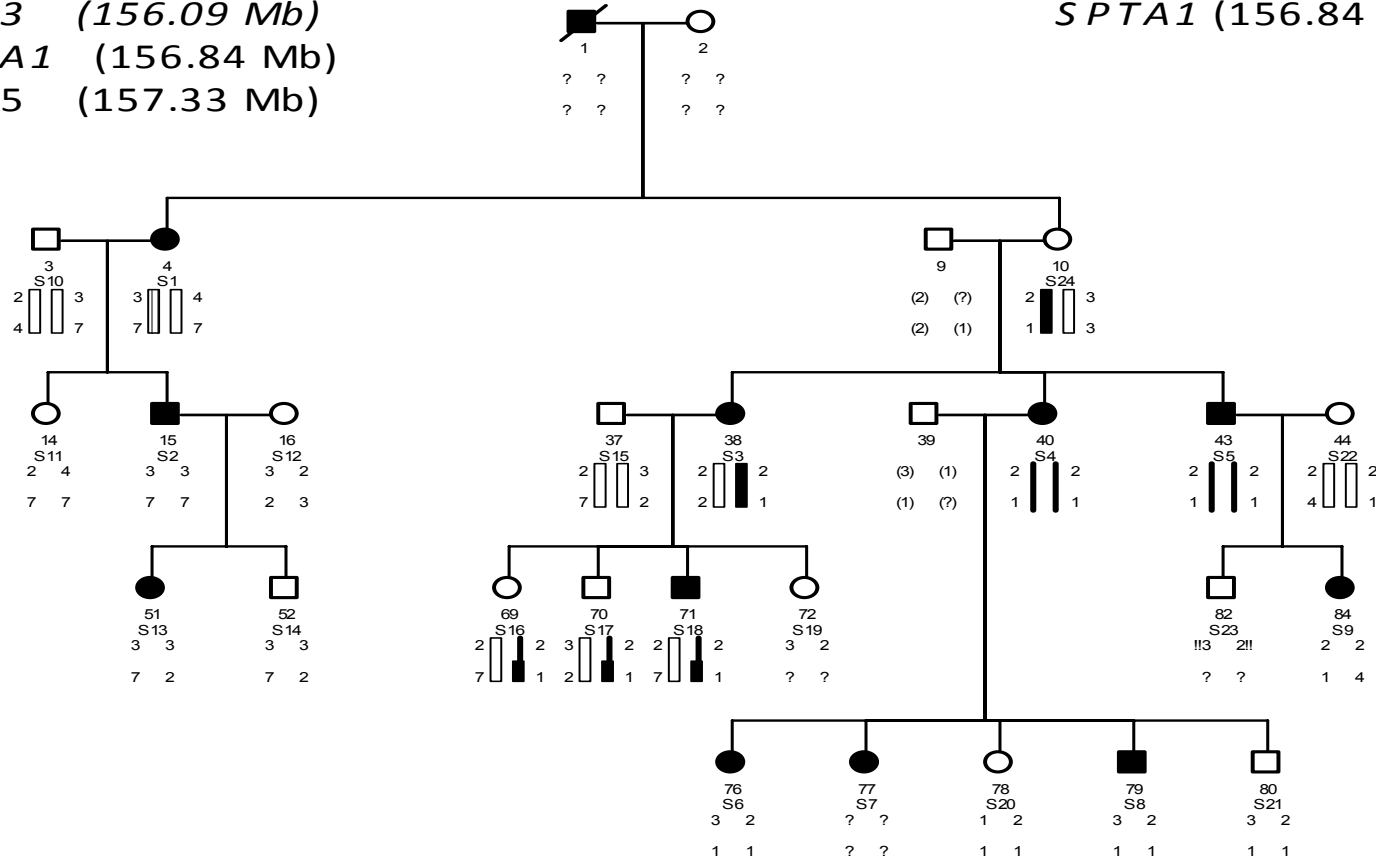
D1S1653 (156.09 Mb)

-----SPTA1 (156.84 Mb)

D1S2635 (157.33 Mb)

KROMOZOM 1q22-q23

SPTA1 (156.84 Mb)



Şekil 3.1. 1 numaralı kromozoma ait haplotip analizi

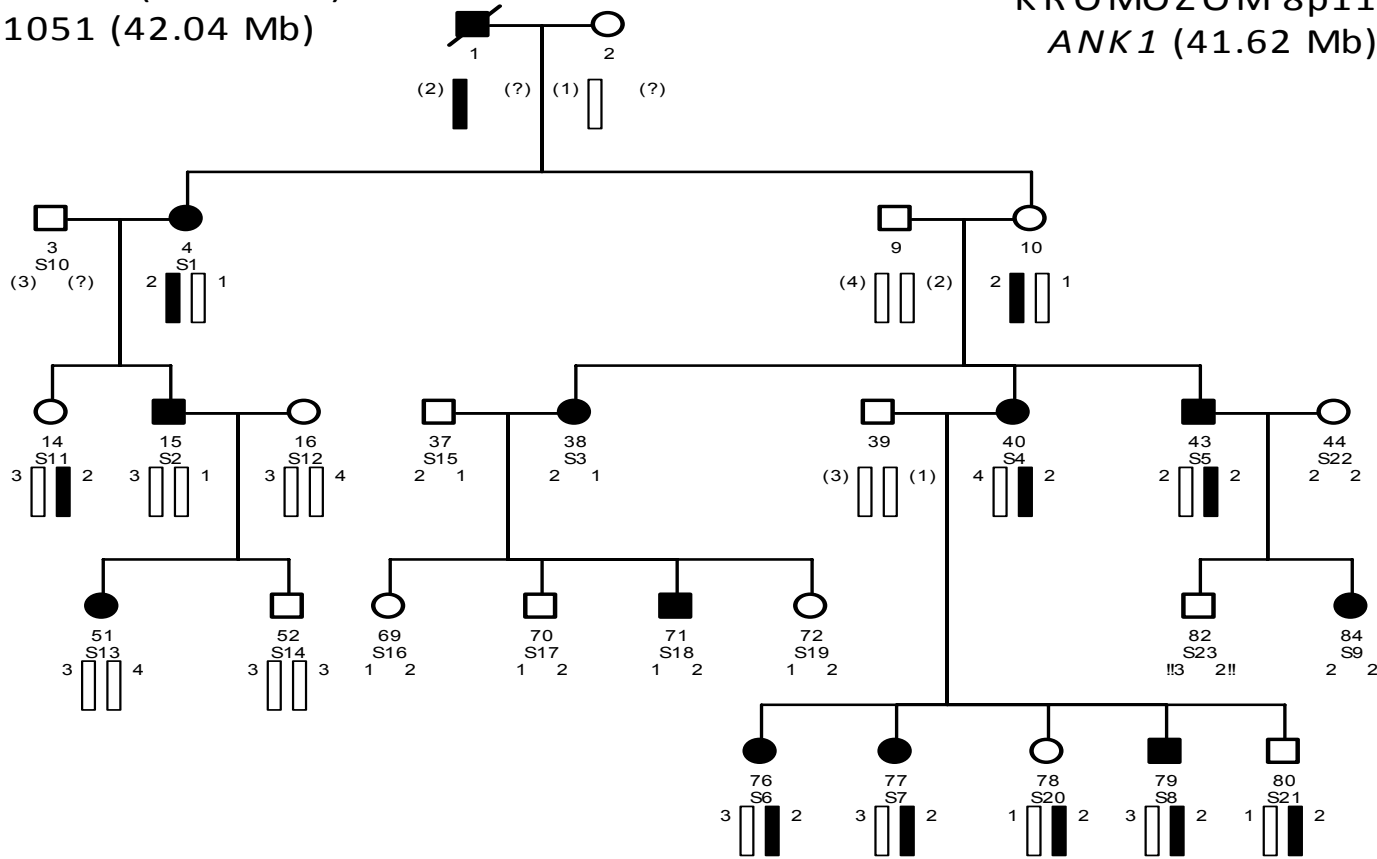
Polimorfik DNA göstergesi pozisyonu

-----ANK1 (41.62 Mb)

D8S1051 (42.04 Mb)

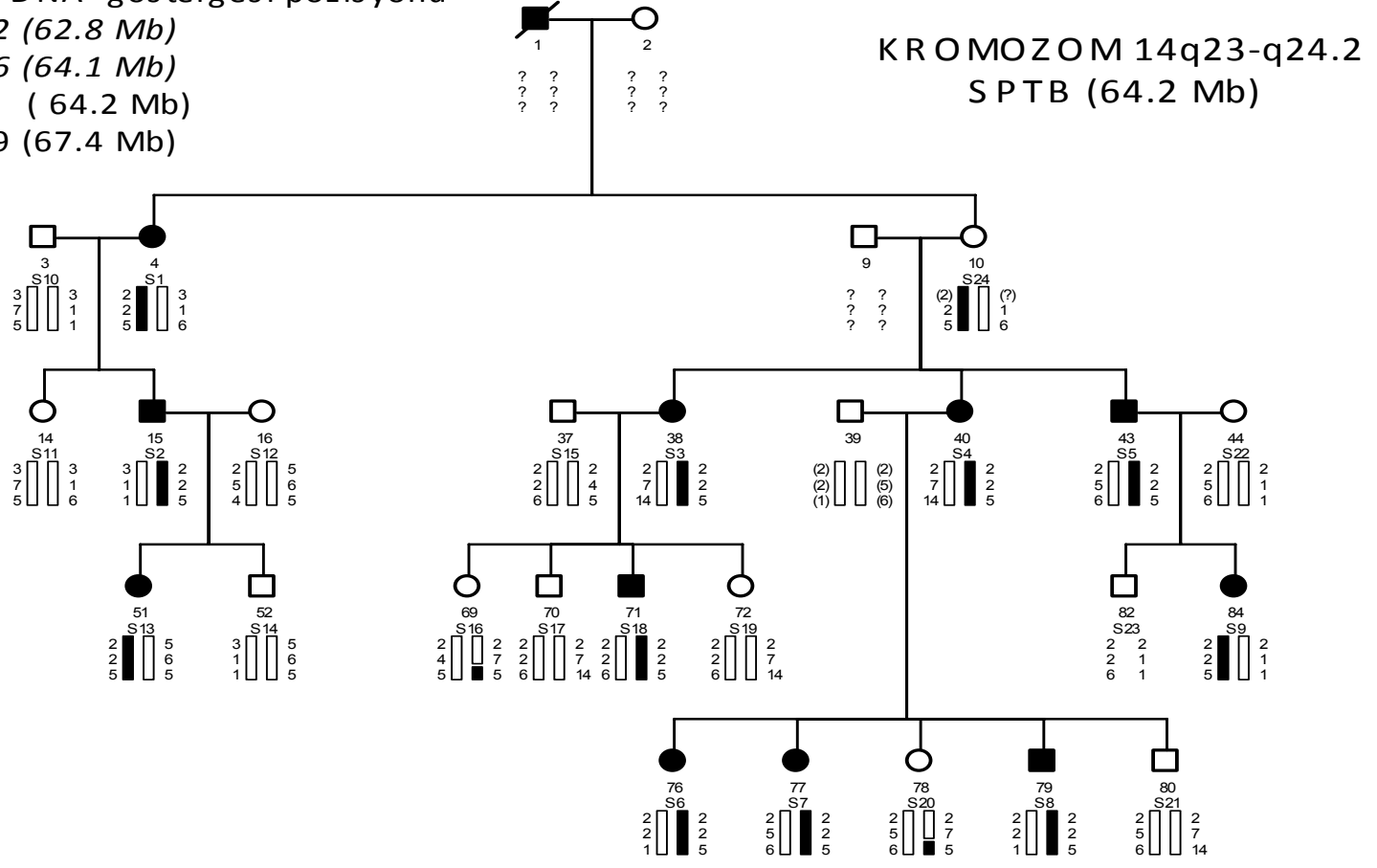
KROMOZOM 8p11.2

ANK1 (41.62 Mb)



Şekil 3.2. 8 numaralı kromozoma ait haplotip analizi

Polimorfik DNA göstergesi pozisyonu
D14S 1012 (62.8 Mb)
D14S 1046 (64.1 Mb)
 -----*SPTB* (64.2 Mb)
D14S 1069 (67.4 Mb)



Şekil 3.3. 14 numaralı kromozoma ait haplotip analizi

Polimorfik DNA göstergesi pozisyonu

D17S1299 (36.14 Mb)

D17S932 (38.35 Mb)

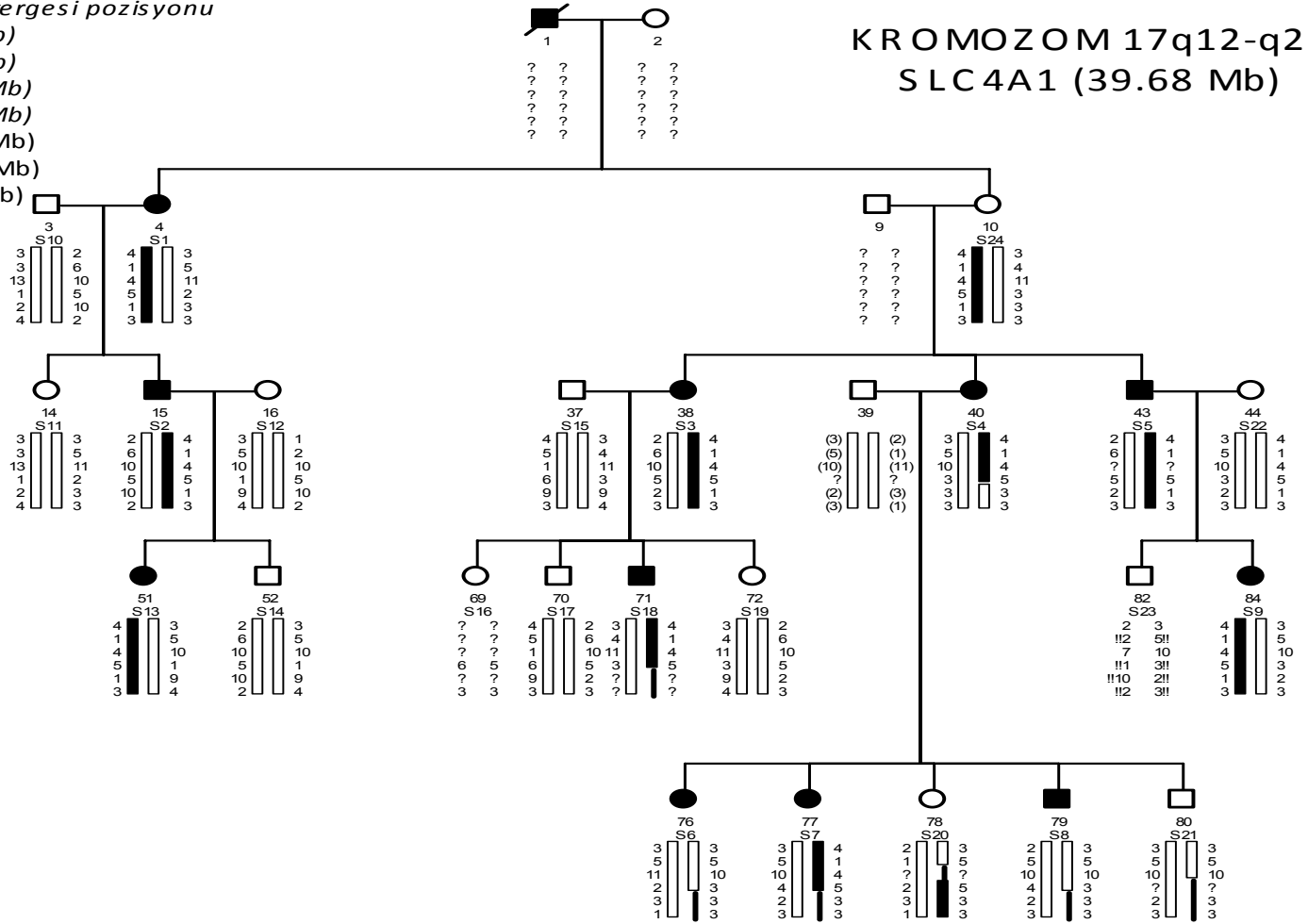
D17S1325 (38.891 Mb)

D17S951 (39.175 Mb)

-----SLC4A1 (39.68 Mb)

D17S1861 (40.062 Mb)

D17S2180 (44.02 Mb)



Şekil 3.4. 17 numaralı kromozoma ait haplotip analizi.

Tüm bu elde edilen haplotip analizi verileri yardımıyla alınan *LOD* skor sonuçlarına göre oluşturulan tablo 3.1’de verilmiştir. Bu tablodan da görüldüğü gibi sadece 14 numaralı kromozoma ait *LOD* skor verileri pozitif değerlerdir. *LOD* Skor ≥ 3 olan değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilirken 2 ve altı kesin olarak bağlantı yokluğunu gösterir. Aradaki değerler yoruma açıktır. *LOD* skor ile iki genin (hastalık geni ile belirleyici alelin) birbirine yakın olduğu matematiksel yollarla ölçülür ve sonuç olarak aranılan genin test edilen kromozom lokusunda olup olmadığına karar verilir.

Tablo 3.1’de belirtilen *LOD* skor sonuçları 1, 8 ve 17 numaralı kromozom bölgelerinden seçilen belirleyici aleller ile tiplendirdiğimiz ailedeki HS fenotipi arasında bağlantı olmadığını gösterdi. Belirleyici alel ile hastalık geni arasında hiç rekombinasyon olmadığını varsaydığımız (tam bağlantı durumu) 0.00 rekombinasyon fraksiyonu değerinde tiplendirdiğimiz genetik belirleyicilerin çoğunda gözlenen $-\infty$ (negatif sonsuz) durumu, hastalık aleli ile belirleyici alel arasında en az bir bireyde rekombinasyon olduğu anlamına gelmektedir. 14 numaralı kromozom bölgesinden seçilen belirleyici alellerde ise *LOD* skor analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlı pozitif sonuç saptanması ($Z_{\max}= 4,628; \theta= 0,00$) hastalıktan sorumlu genin 14 numaralı kromozom bölgesinde bulunan SPTB geni olduğunu göstermiştir.

Tablo 3.1. Herediter Sferositoz ile aday bölgelerden seçilen genetik belirleyiciler için *LOD* skor tablosu

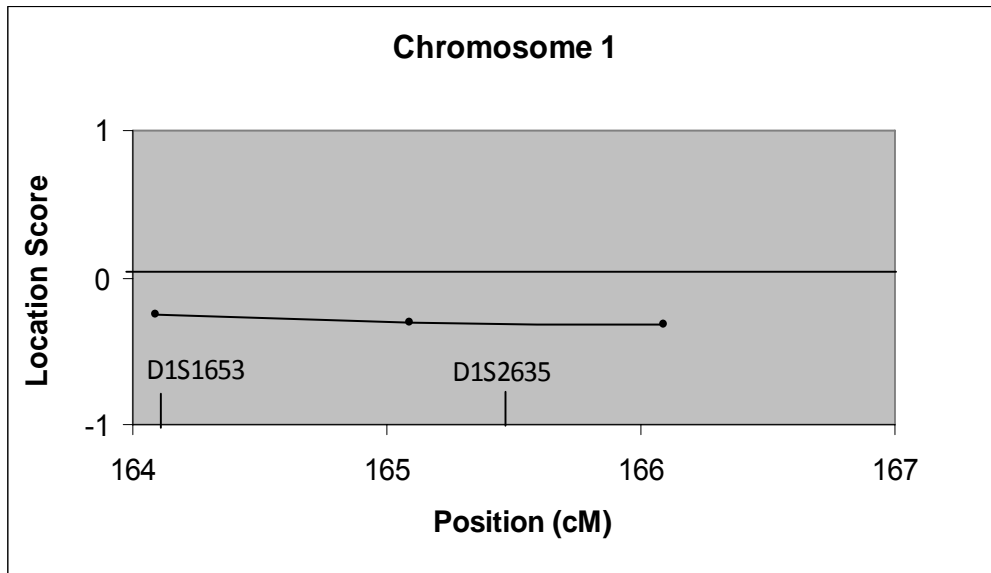
Kromozom	Genetik Belirleyici	Rekombinasyon Fraksiyonu ($\Theta=cM$)			
		0.00	0.05	0.10	0.20
1	D1S1653	-3.334	-0.439	-0.232	-0.084
	D1S2635	-3.963	-0.857	-0.500	-0.181
8	D8S1051	-∞	-2.146	-1.241	-0.429
17	D17S1299	-∞	1.129	1.405	1.323
	D17S932	-∞	0.741	1.095	1.133
	D17S1325	-∞	0.932	1.226	1.179
	D17S951	-∞	-0.360	0.055	0.272
	D17S1861	-∞	0.917	1.009	0.875
	D17S2180	0.745	0.672	0.598	0.448
14	D14S1012	1.659	1.483	1.302	0.93
	D14S1046	4.628	4.236	3.828	2.954
	D14S1069	2.694	2.556	2.363	1.861

LINKAGE programında elde edilen *LOD* skor verileri genetik gösterge-hastalık arasındaki iki nokta (two point) *LOD* skor sonucunu vermektedir. Daha sonra tüm bölgenin incelenmesine yönelik olarak bölgede genotipleme yapılan bütün göstergelerin birarada analizine olanak veren çok noktalı (multipoint) analizi de MERLIN programı kullanılarak tamamlandı. MERLIN programı için veri girişi yaparken genetik belirleyicilerin lokalizasyonları cM cinsinden girildi. Aday gene yakın yerleşimli genetik belirleyicilerle ilgili bu bilgiler <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/data/maps> internet adresinden tespit edilip kullanıldı.

MERLIN programından elde edilen veriler ve grafikler aşağıda yer almaktadır:

a. Kromozom 1'e ait veriler ve grafik:

X	Fam 1	POSITION	LOD	ALPHA	HLOD
164.09	-0,254				
165.09	-0,308	164.09	- 0.254	0.059	0.001
166.09	-0,324	165.09	-0.308	0.000	0.000
		166.09	-0.324	0.000	0.000

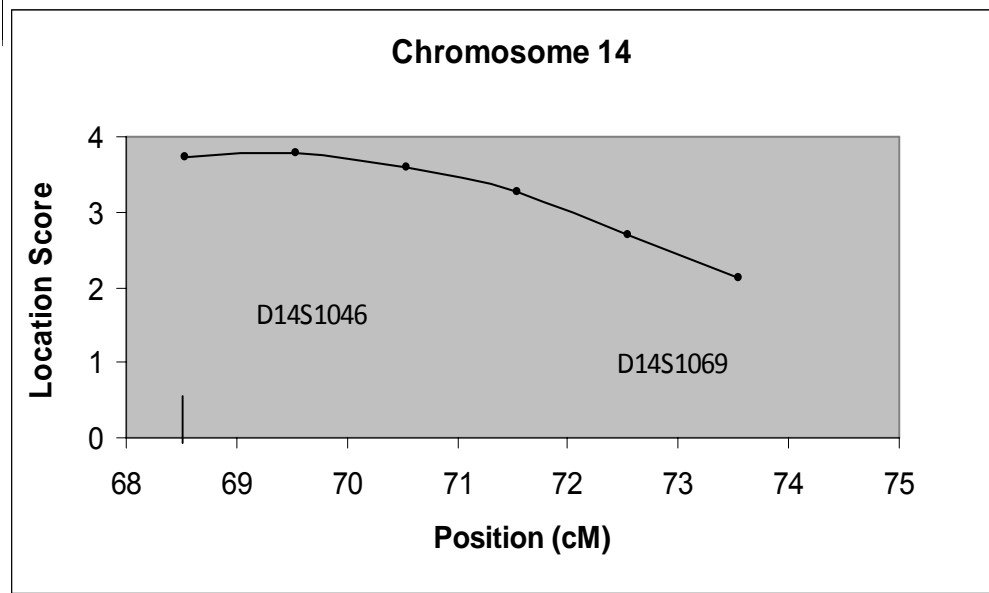


Şekil 3.5. 1 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

1 numaralı kromozoma ait *LOD* skor verileri negatif sonuç vermiştir, bu nedenle gen bölgesine yakın yerleşimli olarak seçilen genetik belirleyiciler ile hastalık geni arasında bağlantı saptanamamıştır.

b. Kromozom 14'e ait veriler ve grafik:

X	Fam 1	POSITION	LOD	ALPHA	HLOD
68,54	3,725				
69,54	3,775				
70,54	3,604				
71,54	3,259				
72,54	2,681				
73,54	2,134				

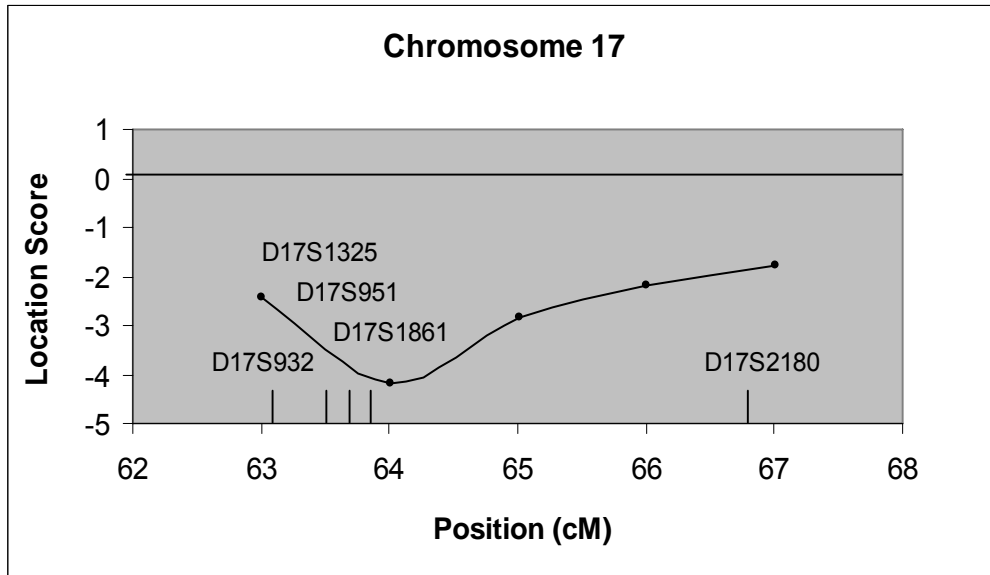


Şekil 3.6. 14 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

14 numaralı kromozoma ait *LOD* skor verileri pozitif sonuç verdi. *LOD* Skor ≥ 3 olan değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edildiğinden seçilmiş olan genetik belirleyiciler ile hastalık geni arasında bağlantı olduğu kabul edildi.

c. Kromozom 17'ye ait veriler ve grafik:

		Fam1				
			POSITION	LOD	ALPHA	HLOD
63,01	-2,441					
64,01	-4,167					
65,01	-2,841		62.010	-2.905	0.401	0.258
66,01	-2,187		63.010	-2.441	0.401	0.258
67,01	-1,768		64.010	-4.167	0.400	0.256
			65.010	-2.841	0.398	0.250
			66.010	-2.187	0.397	0.245
			67.010	-1.768	0.395	0.239



Şekil 3.7. 17 numaralı kromozomdan seçilen iki genetik belirleyicinin çok noktalı analiz grafiği

Grafikten de görüldüğü gibi 17 numaralı kromozomda *LOD* skor negatif değerdedir. Bu durum da aradığımız genin bu bölgede olmadığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Hereditör sferositoz, periferik kanda sferik şekilli eritrositlerin (sferosit) varlığıyla karakterize, anemi ile seyreden kalıtsal bir hastalıktır. Olguların %75'i otozomal dominant kalıtım kalıbıyla seyrederken, %25 vakada aile hikayesine rastlanmamaktadır (Agre ve ark 1985). Dominant nitelik göstermeyen bu vakaların yarısı aslında otozomal resesif kalıtılırken, diğer yarısı yeni mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (Tse ve ark 1999). Hastalık; klinik olarak asemptomatik formdan, hayatı tehdit eden ve düzenli kan transfüzyonu gerektiren ciddi durumlara kadar değişen tablolarla seyretmektedir (Perrotta ve ark 2008).

Bu çalışmada dört kuşakta toplam 86 birey bulunduran bir hereditör sferositoz ailesi ile çalışılmıştır. Pedigri özellikleri penetrans eksikliği gösteren otozomal dominant kalıtım kalıbı ile uyumludur. Penetrans oranı % 85 olarak saptanmıştır. Bu hastalıkta eksik penetrans daha önceki yayınlarda bildirilmemiştir. İlgili tezde bu aileden 19'u hasta olmak üzere 24 birey örneklenmiş ve ailede kuşaklar boyu süregelen bu hastalığın moleküler temellerini bulmak için çalışma başlatılmıştır.

Yakın geçmişte elektron mikroskopi ve protein analizi tekniklerinin gelişmesiyle eritrosit membranının yapısı daha iyi anlaşılmış ve HS'deki fonksiyonel bozukluğun eritrosit membran iskeletindeki bazı yapısal proteinlerdeki kalitatif ve kantitatif defektler sonucu oluştuğu açığa çıkmıştır (Smedley ve ark 1991). Eritrosit membran proteinleri olan α spektrin, β spektrin, ankrin, band 3 ve protein 4.2 proteinleri bahsedildikleri sıra ile *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* ve *EPB42* genleri tarafından sentezlenmektedir. Bu genlerde oluşan mutasyonların HS kliniğini oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Smedley ve ark 1991, Jarolim ve ark 1996, Iolascon ve ark 1998, Gallagher ve ark 2001). Literatürde bu alanda yapılan çalışmaların çoğu SDS-PAGE analizi ile proteine yönelik olarak yapılan çalışmalar ve doğrudan DNA dizi analizi çalışmalarıdır. İlgili tezde birkaç kuşaklı büyük bir aile saptadığımız göz önüne alınarak yukarıda tanımlanan yöntemlere göre daha hızlı ve etkin bir sonuç verebilecek olan bağlantı analizi yapılması planlanmıştır. Bu analizde hedefimiz yukarıda özetlenen aday genleri barındıran kromozom lokalizasyonlarından hangisinin hastalık geni ile bağlantılı olarak

kuşaklar boyu kalıtıldığını bulmaktır. Hastalıktan sorumlu olduğu gösterilen eritrosit membran proteinlerini kodlayan genlerin fiziksel yapılarının büyüklüğü göz önüne alındığında zamandan ve emekten tasarruf etmek için ilgili yöntemin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Literatür değerlendirmesi yapıldığında bu yöntem seçiminin geniş aile bulunan vakalarda tercih edildiği de görülmekle birlikte az sayıda çalışma olduğu da izlenmiştir. Örneğin, benzeri bir çalışmada Garbarz ve arkadaşları (1998), üç kuşaklı ve 13 bireyinde otozomal dominant HS görülen bir ailede *SPTB* ve *ANK1* genlerine bağlantı olup olmadığını araştırmış, çalışmanın sonucunda *SPTB* gen lokalizasyonuna bağlantı gösterilmiştir. Bölgeden seçilen iki genetik belirleyici (D14S63 ve D14S271) için maksimum lod skor 3.6 olarak hesaplanmıştır.

Bizim çalıştığımız ailede HS kliniğinde majör etkili olan *SPTAI*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4AI* genleri üzerinde çalışılması planlanmıştır. *SPTB* ve *SLC4AI* genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşan HS hastalığı bizim ailemizde olduğu gibi otozomal dominant kalıtım kalıbıyla seyrederken; *ANK1* genindeki mutasyonlar hem otozomal dominant hem de resesif HS'ye neden olmaktadır. *SPTAI* ve protein 4.2 defektine neden olan *EPB42* gen mutasyonları sonucu oluşan hastalık ise otozomal resesif kalıtlıdır (Delaunay 2007). Bizim ailemizde hakim olan dominant kalıtım profilini göz önüne alarak *SPTB* ve *SLC4AI* başta olmak üzere yine otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren *ANK1* geninin öncelikli olarak çalışılması planlanmıştır. Otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren *SPTAI* geni ise bazı toplumlarda relatif olarak yaygın görüldüğü için çalışma kapsamına alınmış, Protein 4.2 defekti ise oldukça düşük oranda görülmesi, HS'nin otozomal resesif formuna yol açması ve daha çok Japonlarda hastalık etkeni olması nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır.

Bağlantı analizi sonucunda aday genlerden 1 numaralı kromozomda yerleşik olan *SPTAI*, 8 numaralı kromozomda yerleşik *ANK1* ve 17 numaralı kromozomda yerleşik olan *SLC4AI* genlerine ait bölgeler gerek iki noktalı (Şekil 3.1) lod skor analizlerinde negatif lod skorlar saptanması gerekse haplotip analizlerinde hastalık ile bölgeden seçilen genetik belirleyiciler arasında kuşaklar boyu anlamlı bir aktarımın gözlenmemesi (Şekil 3.1; 3.2 ve 3.4) nedeni ile dışlanmıştır. Bölgeden seçilen tüm genetik belirleyicileri birarada analiz etmeye yarayan çok noktalı analiz

sonucunda da ilgili bölgelerin tamamen dışlandığı açıkça görünmektedir (Şekil 3.5 ve 3.7).

14q12-q21 numaralı kromozom bölgesinde bulunan *SPTB* genine ait lokalizasyona bağlantının test edildiği genetik belirleyicilerin her üçü (D14S1012, D14S1046, D14S1069) için de pozitif lod skorlar saptanmış maksimum lod skor 4.62 olarak belirlenmiştir. Haplotip analizinde de bu bölgeye özgü genetik belirleyiciler ile hastalık aleli arasında tam segregasyon gözlenmektedir (Şekil 3.3) Bu bulgular ile ailede hastalıktan sorumlu olan genin *SPTB* geni olduğu şüpheye yer bırakmayacak şekilde ispatlanmış olmaktadır. Bağlantı analizinin başlangıçta var saydığımız gibi özellikle genetik heterojenite gösteren hastalıklarda aday gen lokalizasyonlarının hızlı, etkin ve ucuz olarak taranmasında tercih edilebilecek bir yöntem olduğu da ortaya konmuştur. SDS-PAGE analizi çalışmaları HS'li hastaların % 30-45'inde kombine spektrin-ankrin defekti, yaklaşık % 30'unda izole spektrin defekti ve yaklaşık % 20'sinde ise band 3 defekti bulunduğunu göstermiştir (Jarolim ve ark 1996, Dhermy ve ark 1997, Lanciotti 1997). Bizim çalışmamızda da vakaların yarıya yakınında izlenen spektrin-ankrin defekti gözlenmeyip izole spektrin defeki bulunduğu izlenmiştir. Spektrin geni 32 ekzondan oluşan büyük bir gendir. Şu ana kadar yapılan mutasyon çalışmalarında belirli bir exonda mutasyon yığılımı olmaksızın bütün exonlarda gözlenmiştir. İzole spektrin defekti gösteren hastalar her ırkta görülmektedir ancak daha önce bahsedildiği gibi Kuzey Avrupa ülkeleri ve Amerikada daha sık görülmektedir. Bu durum bahsedilen ülkelerde yapılan çalışmaların fazlalığından kaynaklanıyor olabilir. Daha önceki yayınlarda Türk toplumundaki HS sıklığından, yapılmış olan aile çalışmalarından ve mutasyon analizlerinden bahsedilmemektedir.

Spektrin defekti saptanmış HS'li hastalarda, spektrin geninde pek çok frameshift, nonsense ve missense mutasyon tespit edilmiştir. Hassoun ve arkadaşları (1997), bu mutasyonların pek çoğunun otozomal dominant kalımlı HS'nin hafif ya da orta dereceli hastalık fenotipiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. β -spektrin geninde oluşan mutasyonlar sonucu kan transfüzyonuna çok fazla gerek duyulmayan hafif ya da orta dereceli HS görülürken; α -spektrin geninde oluşan mutasyonlar sonucu ciddi hastalık tablosu oluşabilir. Kombine ankrin-spektrin eksiklikleri sonucu

ise hafiften ciddi hastalık tablolarına kadar değişen fenotipler ortaya çıkabilir (Perrotta ve ark 2008). HS'nin klinik özellikleri tablo1.3 de özetlenmiştir.

Bizim ailemizde ise 19 hasta bireyden 13'üne kan tablosunda oluşan dūřmelere bağlı olarak zaman zaman kan transfüzyonları yapılmış ve daha sonra splenektomi operasyonu ile hastaların kan transfüzyonu ihtiyacı giderilmiştir. 6 hastada ise yaşlarının küçüklüğü nedeniyle ileri yaşlarda splenektomi yapılması planlanmıştır. β -spektrin genine bağlantı bulgularımızla birlikte ailenin klinik durumu değerlendirildiğinde Hassoun ve arkadaşlarının (1997) bulguları ile benzerlik gösteren şekilde klinik olarak orta dereceli bir HS ile karşı karşıya olduğumuz anlaşılmaktadır. Ancak kombine ankrin-spektrin defektine bağlı HS'de hafiften ciddiye kadar değişen tablolarla karşılaşıldığına göre klinik olarak hastalığın hangi gen mutasyonu ile oluştuğunu tahmin etmeye olanak yoktur.

Bu bulgulara bakılarak yoğun bir genetik heterojenite gösteren bu hastalıkta fenotip olarak hangi genin sorumlu olduğunu anlama yolu yoktur. Aile saptandığı zaman, bağlantı analizi bu hastalığa moleküler tanı koymaya yönelik diğer yöntemlere göre etkin bir ön tarama sağlar. Bu ön taramayı takip edecek tek gene odaklanmış DNA dizi analizleri de tam tanı koydurucu olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gen haritalama, kromozom lokalizasyonu bilinmeyen genlerin lokalizasyonlarının olasılık modelleri kullanılarak saptanması işlemidir. Gen haritalama yöntemlerinden biri olan bağlantı analizi HS'de aday gen aranması çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır. Kromozom lokalizasyonları bilinen genetik belirleyicilerin birkaç kuşaklı geniş ailelerde hastalıkla birlikte segregasyon kalıbının incelenmesi gen haritalamanın temelini oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmada, otozomal dominant HS saptanan dört kuşaklı geniş bir ailede bağlantı analizi ve *LOD* skor analizi çalışmaları sonucunda elde edilen istatistiki bilgilere dayanarak ailede 14 numaralı kromozomda yer alan *SPTB* genine bağlantı saptanmıştır. Diğer aday genler bağlantı analizi çalışması sonucunda açıkça dışlanmış böylelikle ailede görülen HS fenotipinden spektrin-ankrin kombine defektinin değil izole spektrin defektinin sorumlu olduğu bulunmuştur.

Bağlantı analizi genetik heterojenite gözlenen hastalıklarda etkin bir ön tarama yöntemidir. Bu çalışmayı tamamlayıcı bir sonraki adım olarak *SPTB* geninde mutasyon taraması çalışmaları yapılması planlanmıştır.

6. ÖZET

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN HARİTALAMA ÇALIŞMALARINA GİRİŞ: OTOZOMAL DOMİNANT HEREDİTER SFEROSİTOZ'DA BAĞLANTI ANALİZİ

PELİN TAŞDEMİR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

Hereditör sferositoz, membran proteinlerinin defektleri nedeniyle eritrositlerin sferositlere dönüşmeleri ile hemolize eğilimin artması sonucu değişik derecede anemi, sarılık ve splenomegali ile seyreden hereditör bir hastalıktır. Hereditör sferositoz klinik ve genetik olarak hem dominant hem de resesif kalıtımla ilişkili heterojen bir hastalıktır. Hereditör sferositoz, Kuzey Avrupa ülkelerinde görülen en yaygın hemolitik anemidir. Olguların % 75'i otozomal dominanttır. Yaklaşık %10-25 olguda ise bir aile hikayesi yoktur.

Bu çalışmanın amacı dört kuşaklı geniş bir ailede rastlanan otozomal dominant geçişli Hereditör sferositoz'da hangi gendeki mutasyonun patolojiden sorumlu olduğunu bulmaktır. Hereditör sferositoz'da majör etkili olan *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* genlerine bağlantının varlığı; bağlantı (Linkage) analizi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak; LINKAGE ve MERLIN analizlerinin kullanımı ve *Lod-score* istatistiksel hesaplamaları ile araştırdığımız ailede görülen Hereditör Sferositoz'un otozomal dominant olarak kalıtıldığı ve 14 numaralı kromozomda yerleşik olan *SPTB* geninin hastalıktan sorumlu olacağı bulunmuştur. Bu hastalıkta yaygın olarak görülen spektrin-ankrin kombine defektinin bu ailede de sorumlu olacağı hipotezi ankrin gen lokalizasyonuna bağlantı saptanamadığı için dışlanmıştır. Genetik heterojenite gözlenen hastalıklarda bağlantı analizi, etkin bir ön tarama yoludur ve bağlantı gözlenen *SPTB* geninde mutasyon taraması yapılabilmesi için yeni bir çalışma planlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Bağlantı analizi; gen haritalaması; hereditör sferositoz; spektrin

7. SUMMARY

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AN ENTRY TO GENE MAPPING: LINKAGE ANALYSIS IN AUTOSOMAL DOMINANT HEREDITARY SPHEROCYTOSIS

PELİN TAŞDEMİR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

Hereditary Spherocytosis is an inherited hemolytic anemia caused by the defects on membrane proteins and characterized by icterus, anemia and splenomegaly. Hereditary Spherocytosis clinically and genetically comprises a heterogeneous group of hemolytic anemias. It is the most common cause of haemolytic anaemia in Northern Europe people. In about 75% of the cases, the inheritance follows an autosomal dominant pattern. 25% of cases occur sporadically.

The aim of this study is; finding which mutation of the gene is responsible for otosomal dominant Hereditary Spherocytosis in a wide family with four generations. The linkage to the major genes in hereditary spherocytosis which is *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1* ve *SLC4A1* was searched by using the linkage analysis.

As a result; by using LINKAGE and MERLIN analysis and *LOD-score* statistical calculations we confirm that; in our family the Hereditary Spherocytosis is an otosomal dominant form of the disease and the mutation is on the *SPTB* gene which map to chromosome 14. Although combined spectrin-ankyrin defect is the most common abnormality in this disease, this hypothesis is excluded for this family because no linkage was found in ankyrin gene localization. Linkage analysis is an effective pre-screening method in genetically heterogeneous diseases and a new mutation analysis study is in the planning stage to detect the mutation in the *SPTB* gene.

Keywords: Linkage analysis; gene mapping; Hereditary Spherocytosis; spectrin

8. KAYNAKLAR

- Agre P, Casella JF, Zinkham WH, McMillan C, Bennett V (1985)** *Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis*, Nature, 314, 380-383.
- Akarsu AN, Lüleci G (2002)** *Gen haritalaması: Ne demek; Haritalar nasıl oluşturuluyor; neler içeriyor; nasıl yorumlanıyor?* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp fakültesi Dergisi Özel sayı, 29-39.
- Akarsu AN (2004)** *Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılacak genetik yöntemler: II. Hastalıkların genetik modellenmesi*, 3P Dergisi, 12(1), 8-19
- Alloisio N, Texier P, Vallier A, Ribeiro ML, Morle L, Bozon M (1997)** *Modulation of clinical expression and band 3 deficiency in hereditary spherocytosis*, Blood, 90, 1(1), 414-420.
- Alloisio N, Maillet P, Carre G, Texier P, Vallier P, Baklouti F, Philippe N, Delaunay J (1996)** *Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. association with a nonsense mutation of the band 3 gene (allele lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in trans (allele genas)*, Blood, 88, 3 (1), 1062-1069.
- Bracher NA, Lyons CA, Wessels G, Mansvelt E, Coetzer TL (2001)** *Band 3 Cape Town (E90K) causes severe hereditary spherocytosis in combination with Band 3 Praque III*, Br J Haematol, 113, 689-693.
- Birkenmeier CS, McFarland-Starr EC, Barker JE (1988)** *Chromosomal location of three spectrin genes: relationship to the inherited hemolytic anemias of mouse and man*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8121-8125.
- Birkenmeier CS, Barker JE (2004)** *Hereditary haemolytic anaemias: unexpected sequelae of mutations in the genes for erythroid membrane skeletal proteins*, J Pathol, 204, 450-459.
- Blackman SM, Hustedt EJ, Cobb CE, Beth AH (2001)** *Flexibility of the cytoplasmic domain of the anion exchange protein, band 3, in human erythrocytes*, Biophys J, 81, 3363-3376.
- Boguslawska DM, Heger E, Chorzalska A, Nierzwicka M, Hołojda J, S' widerska A ve ark (2004)**, *Hereditary spherocytosis: identification of several HS families with ankyrin and band 3 deficiency in a population of southwestern Poland*, Ann Hematol, 83, 28-33.
- Bruce L (2006)** *Mutations in band 3 and cation leaky red cells*, Blood Cells Mol Dis, 36, 331-336.
- Bruce LJ, Taner MJA (1999)** *Erythroid band 3 variants and disease*, Baillière's Clinical Haematology, 12, 4, 637-654.
- Connor JM, Ferguson MA (1993)** *Essential Medical Genetics Fourth Edition* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 75-81.
- Delaunay J (1995)** *Genetic disorders of the red cell membranes*, FEBS Lett, 369, 34-37.
- Delaunay J (2007)** *The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders*, Blood Reviews, 21, 1-20.
- Dhermy D, Galand C, Bournier O, Cynober T, Méchinaud F, Tchemia G ve ark (1998)** *Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency related to null mutations of the β -spectrin gene*, Blood Cells Mol Dis, 24, 12, 251-261.
- Eber SW, Gonzales JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell W ve ark (1996)** *Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis*, Nature Genetics, 13, 214-218.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH (1971)** *Electrophoresis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*, Biochemistry, 10, 2606-2617.
- Fowler VM (1996)** *Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle*, Curr. Opin. Cell Biol. 8, 86-96.
- Gallagher PG, Tse WT, Scarpa AL, Lux SE, Forget BG (1997 a)** *Structure and organization of the human ankyrin-1 gene*, J. Biol. Chem., 272, 31.

- Gallagher PG, Forget BG (1997 b)** *Hematologically important mutations: band 3 and protein 4.2 variants in hereditary spherocytosis*, Blood Cells Mol Dis, 23(22), 30, 417-421.
- Gallagher PG, Sabatino DE, Basseres DS, Nilson DM, Wong C, Cline AP ve ark (2001)** *Erythrocyte ankyrin promoter mutations associated with recessive hereditary spherocytosis cause significant abnormalities in ankyrin expression*, J Biol Chem, 276, 45, 9, 41683-41689.
- Garbarz M, Galand C, Bibas D, Bournier O, Devaux I, Harousseau JL ve ark (1998)** *A 5' splice region G→C mutation in exon 3 of the human β spectrin gene leads to decreased levels of β spectrin mRNA and is responsible for dominant hereditary spherocytosis (Spectrin Guemere- Penfao)*, Br J Haematol, 100, 90-98.
- Gelehrter TD, Collin FS, Ginsburg D (1998)** Principles of Medical Genetics, Second Edition Williams & Wilkins Awaverly Company, Baltimore, 1-8.
- Gülen H, Çevik A, Çevik BŞ, Erbay A, Karaca İ, Vergin C (2003)** *Hereditær sferositoz: klinik özellikler, tanı ve tedavi yöntemleri*, Ege Pediatri Bülteni, 10(3), 131-134.
- Hanspal M, Yoon SH, Yu H, Hanspal JS, Lambert S, Palek J ve ark (1991)** *Molecular basis of spectrin and ankyrin deficiencies in severe hereditary spherocytosis: evidence implicating a primary defect of ankyrin*, Blood, 77, 1,165-173.
- Hassoun H, Palek J(1996)** *Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease*, Blood Rev, 10(3), 129-47
- Hassoun H, Vassiliadis JN, Murray J, Njolstad PR, Rogus JJ, Ballas SK ve ark (1997)** *Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency*, Blood, 90, 1(1), 398-406.
- Iolascon A, Del Giudice M, Perrotta S, Alloisio N, Morlé L, Delaunay J (1998)** *Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects*, Haematologica 83, 240-257.
- Jarolim P, Rubin HL, Brabec V, Chrobak L, Zolotarev AS, Alper SL (1995)** *Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis*, Blood, 85, 3(1), 634-640.
- Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, Taylor WM, Prchal JT, Ballas SK ve ark (1996)** *Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency*, Blood, 88, 11 (1), 4366-4374.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B (2002)** *A high-resolution recombination map of the human genome*, Nature Genetics, 31, 241-247
- Laemmli UK (1970)** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, 227, 680-685.
- Lambert S, Yu H, Prchal JT, Lawlert J, Ruff P, Speicher D ve ark (1990)** *cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin*, Proc. Nati. Acad. Sci., 87, 1730-1734.
- Lanciotti M, Perutelli P, Valetto A, Di Martino D, Mori PG (1997)** *Ankyrin deficiency is the most common defect in dominant and non dominant hereditary spherocytosis*, Haematologica, 82, 460-462.
- Lima PRM, Baratti MO, Chiattonne ML, Costa FF, Saad STO (2005)** *Band 3Tambau': a de novo mutation in the AE1 gene associated with hereditary spherocytosis. Implications for anion exchange and insertion into the red blood cell membrane*, Eur J Haematol, 74, 396-401.
- Lux SE, Tse WT, Menninger JC (1990)** *Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8*, Nature, 345, 736-739.
- Morton NE, MacKinney AA, Kosower N, Schilling RF, Gray MP (1962)** *Genetics of spherocytosis*. Am J Hum Genet, 14, 170-184.

- Özcan R, Jarolim P, Lux SE, Ungewickell E, Eber SW (2003)** *Simultaneous (ac)n microsatellite polymorphism analysis and single-stranded conformation polymorphism screening is an efficient strategy for detecting ankyrin-1 mutations in dominant hereditary spherocytosis*, Br J Haematol, 122, 669–677.
- Passarge E (1995)** Color Atlas of Genetics Thieme Medical Publishers, Inc. New York, 356-358.
- Paździor G, Langner M, Chmura A, Boguslawska D, Heger E, Chorzalska A, Sikorski AF (2003)** *The kinetics of haemolysis of spherocytic erythrocytes*, Cell Mol Biol Lett, 8, 639-648.
- Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N (2008)** *Hereditary spherocytosis*, Lancet, 372, 1411–26.
- Peters LL, Jindel HK, Gwynn B, Korsgren C, John KM, Lux SE (1999)** *Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4.2-null mice*, J. Clin. Invest., 103,1527–1537.
- Pinto L, Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Matarese SMR, Nobili B, Perrotta S (1995)** *The Italian survey on hereditary spherocytosis*, Int J Pediatr Hematol Oncol, 2, 43-7.
- Reinhardt D, Witt O, Miosge N, Herken R, Pekrun A (2001)** *Increase in band 3 density and aggregation in hereditary spherocytosis*, Blood Cells Mol Dis, 27(2), 399–406.
- Savvides P, Shalev O, John KM, Lux SE (1993)** *Combined spectrin and ankyrin deficiency is common in autosomal dominant hereditary spherocytosis*, Blood, 82,10, 151, 2953-2960.
- Seidman LA, Moore CJ (2000)** *Basic laboratory methods for biotechnology (student edition)*, Prentice Hall, New Jersey, 358
- Smedley JC, Bellingham AJ (1991)** *Current problems in haematology 2: Hereditary spherocytosis*, J Clin Pathol, 44, 441-444.
- Tanner MJA (2002)** *Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders*, Curr Opin Hematol, 9, 133–139.
- Thompson MW, Mcinnes RR, Willard HF (1991)** Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Fifth Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, 53-72.
- Timur Ç (2001)** *Herediter sferositoz*, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Anemiler Sempozyumu, 137-142
- Tse WT, Lux SE (1999)** *Red blood cell membrane disorders*, Br J Haematol, 104, 2-13
- Tsoumanis F (1996)** *Analysis of severe atypical hereditary spherocytosis (HS) associated with combined spectrin and ankyrin deficiency and mental retardation*, Doktora tezi, Tıbbi genetik bölümü, Alabama Üniversitesi.
- Young LE, Izzo MJ, Platzer RF (1951)** *Hereditary Spherocytosis: I. clinical, hematologic and genetic features in 28 Cases, with particular reference to the osmotic and mechanical fragility of incubated erythrocytes*, Blood, 6, 1073 - 1098.

9. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra 1992-1998 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde lisans eğitimini tamamladı.

1999 yılından itibaren 4 yıl boyunca Konya Merkez 18 no'lu sağlık ocağında pratisyen hekimlik görevi yaptı. 2002 yılında Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD'da doktora öğrenimine başladı. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Kampüs Medikososyal Sağlık Merkez'nde çalışmaya başladı ve halen bu görevi sürdürmektedir. Yabancı dili İngilizce ve Almanca'dır. Evli ve iki çocuk annesidir.