

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

MENTAL RETARDASYONLU BİREYLERDE
ARX GEN MUTASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI

Yunus ARIKAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof.Dr. İbrahim KESER

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2008.02.0122.009)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir...../...../2010

Tez Danışmanı: Prof.Dr. İbrahim KESER

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr. Hüseyin BAĞCI

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr. şenay HASPOLAT

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ercan MIHÇI

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../.... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof Dr.İsmail Üstünel
Enstitü Müdürü

ÖZET

Mental retardasyon (MR, zekâ geriliği) bir bireyin aynı yaş grubundaki bireylerle kıyaslandığında, zekâ ve davranış gibi özellikler yönünden adaptasyon gösterememe durumudur. Frajil X sendromu (FXS), kalıtsal MR'nin en yaygın formu olup, X kromozomunun q27.3 bölgesinde bulunan FMR1 geninin (CGG)n üçlü nükleotid tekrarlarındaki artıştan kaynaklanmaktadır. Zekâ geriliğinden sorumlu genler arasında FMR1'den sonra gelen diğer bir gen, Aristaless Related Homeobox (ARX) genidir. Hem sendromik hem de sendromik olmayan MR olgularında ARX geni mutasyonları görülmektedir. En sık görülen mutasyonlar alanin amino asidi sayısının artmasına neden olan c.334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup şeklindeki mutasyonlardır. Mental retardasyonun yanı sıra bazı merkezi sinir sistemi ve ürogenital sistem hastalıklarında da ARX geni mutasyonları bildirilmiştir.

Bu çalışmada FXS/MR ön tanısı ile Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Klinik Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderilen ve FMR1 geni CGG tekrarları açısından normal bulunan, yaş aralığı 1 ile 18 arasında olan 125 erkek pediatrik olguda periferal kandan DNA izolasyonunu takiben, PZR yöntemi ile en sık görülen c.334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup mutasyonlarının bulunduğu ARX geni ekzon-2 bölgesi çoğaltıldı. PZR ürünleri, yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezinde uygun markıra karşılık yürütüldü. 10 hasta örneğine DNA dizileme analizi yapılarak, hem hedef bölgenin doğruluğu kontrol edildi hem de nokta mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPs) olası varlığı analiz edildi.

Araştırmanın sonucunda, klinik olarak FXS/MR ön tanısı almış, yaşları 1 ile 18 arasında olan 125 erkek çocukta MR'ye sebep olan ve en sık görülen ARX geni ekzon-2 mutasyonlarından c.334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup mutasyonları tanımlanmamıştır. ARX geni ekzon-2 nokta mutasyonları ve tek nükleotid polimorfizmleri de DNA sekansı sonucunda saptanamadı. Sonuç olarak, en sık görülen ARX geni mutasyonlarının, Antalya ve çevresindeki mental retardasyonlu erkek bireylerde, MR etiyopatogenezinde sorumlu olmadığı ileri sürülebilir. Bununla beraber daha sağlıklı bir populasyon için gerçekçi bir genetik danışmanlık vermek üzere mental retardasyondan sorumlu ARX geni hot spot bölge mutasyonları dışlandıktan sonra tüm ARX genine DNA sekansı yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Mental Retardasyon, Frajil X Sendromu, ARX Geni, PZR.

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is a failure to develop cognitive abilities and achieve a level of intelligence as well as “adaptive behaviors” when compared with the same age group. Fragile X Syndrome (FXS), the most common form of hereditary MR, results from the increasing number of (CGG)_n three nucleotides repeat of Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene which is located on X q27.3 region. The Aristaless Related Homeobox (ARX) gene is responsible for MR after FMR1 gene. Both syndromic and nonsyndromic conditions of MR are involved in the ARX gene mutations. The most common mutations in the ARX gene are c.334ins(GCG)₇ and c.428_451dup which cause the increasing number of alanine amino acid. Mental retardation as well as some central nervous system and urogenital system diseases have been associated with the ARX gene mutations.

In this study, we tested the ARX gene for the most common mutations, namely c.334ins(GCG)₇ and c.428_451dup, with Polymerase Chain Reaction (PCR) following the DNA isolation from peripheral blood samples of 125 pediatric mentally retarded males referred as FXS/MR (age range:1-18 years old) consulted to Department of Medical Biology and Genetics, Medical Faculty, Akdeniz University, and diagnosed as the number of CGG repeats of FMR1 gene are normal. PCR products were run on high resolution agarose gel electrophoresis with suitable marker. Not only correction of the target region was achieved by sequencing the products of 10 patients but also probable existence of point mutations and polymorphisms were analyzed.

As a result, the most common ARX gene mutations, c.334ins(GCG)₇ and c.428_451dup, were not detected in a series of 125 male children prediagnosed as FXS/MR. Also, the point mutation and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were not detected on the exon-2 of ARX gene by using DNA sequencing. In conclusion, it can be suggested that the c.334ins(GCG)₇ and c.428_451dup mutations of the ARX gene are not responsible for etiopathogenesis of mentally retarded males in Antalya region. However, we think that whole ARX gene should be screened to detect the other mutations responsible for mental retardation after exclusion of the hot spot mutations of ARX gene to give a realistic genetic counseling for more healthy population.

Keywords: Mental Retardation, Fragile X Syndrome, ARX Gene, PCR.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım sırasında her zaman gösterdiği ilgisi, yol göstericiliği ve bilimsel bakış açısı kazanabilmem için verdiği emek nedeniyle danışman hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim KESER'e,

Hastaların klinik değerlendirmesini yapan, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Şenay HASPOLAT ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür DUMAN'a ve Pediatrik Klinik Genetik Bilim Dalından Sayın Yrd. Doç. Dr. Ercan MIHÇI'ya, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, araştırma görevlisi ve teknik ekipteki tüm arkadaşlarıma, Anabilim Dalı sekreterlerimize,

Tez projesi kapsamında yer alarak ve çalışmaya katılarak gösterdikleri işbirliği ve özveriden dolayı tüm hastalara ve ailelerine,

Bugüne gelebilmemde verdikleri destek, her zaman yanımda hissettiğim sevgi ve güvenleri, gösterdikleri anlayış için sevgili aileme ve arkadaşlarıma tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Mental Retardasyon	3
2.2. Mental Retardasyonun Sınıflandırılması	3
2.3. Mental Retardasyonun Genetik Sebepleri	4
2.3.1. Mental Retardasyon ve X kromozomu Arasındaki İlişki	4
2.3.2. Mental Retardasyon ve Frajil X Sendromu	6
2.3.3. Frajil X Sendromunun Genetik Tanısı	7
2.4. ARX Geni	8
2.4.1 ARX Geninin Yapısı	9
2.4.1.1. Genin Yapısında Bulunan Birimlerin Görevleri ve Mutasyonları	10
MATERYAL ve METOD	18
3.1. Periferal Kandan DNA Eldesi	19
3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	19
3.1.2. İşlemler	20
3.1.3. FMR1 Geni 5' UTR'deki CGG Tekrarlarının PZR ile Çoğaltılması	20
3.1.3.1. PZR Koşulları	21
3.1.3.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	21
3.1.4. Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar	22
3.1.5. FMR1 Geni 5' UTR'deki CGG Tekrar Sayısının Hesaplanması	23
3.1.6. ARX Geni Ekzon 2 Hot Spot Bölgesinin PZR ile Çoğaltması	23
3.1.6.1. PZR Koşulları	24
3.1.6.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	24

BULGULAR	27
4.1. MR Olgularının Klinik Değerlendirmesi	27
4.2. MR Olgularının Genetik Değerlendirmesi	27
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	32
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	39
EKLER	40
Ek-1 Aydınlatılmış Onam Formu	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACC	: Korpus Kallosum Agenezisi
ARX	: Aristaless İlişkili HomeoboX geni
AmAc	: Amonyum asetat
bç	: baz çifti
CaMK II	: Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Kinaz II
Cx	: Korteks
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Di-metil sülfoksit
dup.	: Duplikasyon
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidyom Bromür
FMR1	: Frajil X Mental Retardasyon 1
FXS	: Frajil X Sendromu
g	: Gram
HD	: Homeodomeyn
GABA	: Gama Amino Bütirik Asit
HYS-AG	: Hidranensefali ile beraber Şüpheli Genital
ISSX	: X'e bağlı İnfantil Spazm Sendromu
IQ	: Zeka Katsayısı
ins.	: İnsersiyon
KHCO₃	: Potasyum Bikarbonat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MGE	: Marjinal Gangliyonik Tümsek
MR	: Mental Retardasyon
NaCl	: Sodyum Klorür
µM	: Mikromolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nt	: Nükleotid
NH₄Cl	: Amonyum Klorür
NLS	: Çekirdekte Konumlanma Sinyali
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PM	: Polialanin Motif
PRTS	: Partington Sendromu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

TBE	: Tris Borat EDTA
UTR	: Proteine çevrilmeyen bölge
WS	: West Sendromu
XLAG	: X'e Bağlı Lizensefali ile Şüpheli Genital
XLMR	: X'e Bağlı Mental Retardasyon
XMESID	: X'e Bağlı Myoklonik Epilepsi Spastisite Entelektüel Yetersizlik
WBL	: Beyaz kan hücresi lizis tamponu
WS	: West Sendromu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Klonlanan XLMR Genlerinin İdiogramı	6
2.2.	Frajil X Kromozomunun Gösterilmesi	7
2.3.	ARX Geninin Şematik Yapısı	10
2.4.	ARX Mutasyonları ve İlişkili Olduğu Fenotipler	14
2.5.	E13.5 Günlük Farede ARX Expresyonu	15
4.1.	Retrospektif 4 Olgunun Otoradyografi Sonrası CGG Tekrar Sayılarını Gösteren Southern Blot Görüntüsü	27
4.2.	Prospektif 25 Olgunun PZR Ürünlerine Ait Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	28
4.3.	Çalışılan 22 Numaralı Olgunun Fragment Analizi Görüntüsü	29
4.4.	Çalışılan Olguların ARX Geni Ekzon 2'deki Hedef Bölgenin Pürifiye PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü	30
4.5.	22 Numaralı Olgunun DNA Dizileme Analizi Görüntüsü(1)	30
4.6.	22 Numaralı Olgunun DNA Dizileme Analizi Görüntüsü(2)	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.1.	Mental Retardasyonun IQ Seviyelerine Göre Sınıflandırılması	3
2.2.	Mental Retardasyonun Genetik Sebepleri	4
2.3.	XLMR Olgularının Sınıflandırılması	5
2.4.	ARX Mutasyonlarıyla İlişkilendirilmiş Fenotipler	9
2.5.	ARX genindeki PM'lerin durumu	11
2.6.	ARX Geni PM1 Bölgesinde Tanımlanmış Mutasyonlar	12
2.7.	PM2 Bölgesi Mutasyonları	12
2.8.	HDM ve İlişkili Olduğu Fenotipler	13
2.9.	ARX Genindeki Diğer Genomik Değişimler	15
3.1.	FMR 1 Geni CGG tekrarlarının çoğaltılması için kullanılan Multipleks PZR Malzemeleri ve Miktarları	21
3.2.	ARX Geni Ekzon 2'nin Hot Spot Bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR İçeriği	23
3.3.	DNA Dizileme Reaksiyonu (labeling) için kullanılan Malzemeler ve Miktarları	25

GİRİŞ ve AMAÇ

Mental Retardasyon (MR) zekâ seviyesinin (IQ= Intelligence Quotient=Zeka Katsayısı) 18 yaşından önce IQ=70'in altında olması ve bireylerin aynı yaş grubundaki diğer bireylere davranış özellikleri bakımından uyum gösterememe durumu ile karakterizedir (1). Genel toplumdaki prevalansı %2-3 olup, genetik ve genetik olmayan sebeplerle ortaya çıkmaktadır (2).

Temel olarak MR, klinik ve genetik bulgular çerçevesinde sendromik ve non-sendromik olarak iki gruba ayrılmaktadır. Down sendromu (DS), Frajil X sendromu (FXS), Prader Willi-Angelman (PWA) sendromu gibi birçok hastalığın klinik tablosu içerisinde yer alan MR'nin, sendromik olmayan formu da bulunmaktadır. Bunun yanı sıra MR'nin % 10'unu X' e bağlı MR (XLMR) olguları oluşturmaktadır. XLMR olgularının 2/3'ünü sendromik olmayan MR'ler oluşturmaktadır (3, 4).

MR, Down sendromundan sonra en sık Frajil X sendromunda görülmektedir (5). Erkeklerde görülme sıklığı 1/2500-4000 iken, dişilerde bu oran 1/2000-8000 arasında değişmektedir. Sitogenetik olarak Xq27.3'deki frajilite ile karakterize olan Frajil X sendromunda uzun yüz, iri ve ileri çıkık kulaklar, makroorşidizm, ağır ve orta derecede zekâ geriliği görülmektedir. Frajil X sendromu için birinci dereceden sorumlu gen FMR1 geni olup, X kromozomunun q27.3 bölgesinde yerleşmiştir (6-12).

MR'de FMR1'den sonra ikinci dereceden sorumlu gen 2002 yılında tanımlanmış, X kromozomunun p22 bölgesinde yerleşmiş olan ARX (Aristaless Related Homeobox) genidir. Küçük bir gen olan ARX geni 5 ekzon ve 4 introndan meydana gelir ve 562 amino asitlik protein kodlamaktadır. ARX proteini, DNA bağlama ve C-peptid domainleri ile karakterizedir. Bunlara ek olarak korunmuş bir oktapeptid, dört polialanin ve 3 nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) bölgesi vardır. Xp22'de lokalize olan genin kalpte, iskelet kasında farklı izoformları bulunmakla birlikte, temel görevi merkezi sinir sistemindeki GABAerjik ara nöronların migrasyonunu sağlamak ve pankreasta adacık kompozisyonunu oluşturmaktır (14-17). İnsan vücudunda sistemik bir rol oynayan ARX'in genindeki mutasyonlar da büyük önem taşımaktadır.

ARX geninde en sık görülen mutasyonlar genin ikinci ekzonunda bulunan, polialanin alanının uzamasına neden olan c.428-451 arasında yer alan 24 baz çiftinin duplikasyonu ile ortaya çıkan dup(24bp) mutasyonu ve c.333 bölgesine GCG trinükleotidinin yedi tekrarından oluşan dizinin insersiyonu ile karakterize ins(GCG)₇ mutasyonlarıdır. Bu iki mutasyonun görülme sıklığı, toplam ARX mutasyonlarının yaklaşık %50' sini oluşturmaktadır. ARX geninde tespit edilmiş yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar da literatürde bulunmaktadır(18-22).

Projemizin amacı, ağır MR ile Frajil X sendromu ön tanısı almış, FMR1 geni 5'-UTR (CGG)n tekrarı normal aralıklarda bulunmuş olan toplam 125 mental retarde erkek bireyde, ARX geninin en sık görülen mutasyonlarından, c.428-451 dup(24bp) ve c.333 ins(GCG)₇ mutasyonlarının toplumumuzdaki sıklığını araştırmak, alel ve genotip frekanslarını hesaplamak, hastalarımızdaki MR ile ilişkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1 Mental Retardasyon

Mental retardasyon (MR), bilişsel yetenek geliştirmedeki başarısızlık ile, aynı yaş grubundaki bireylere zekâ ve davranış gibi özellikler yönünden adaptasyon gösterememe durumudur. Bunun yanı sıra MR'den bahsedebilmek için bireyin 18 yaşından önce IQ (Intelligence Quotient= Zeka Katsayısı) seviyesinin, 70 veya 70'in altında olması gerekir. MR'nin prevalansı toplumlar arası çeşitlilik göstermektedir. Genel olarak toplam popülasyonun %2-3'ü mental retardasyonludur. Toplumlarda MR, dişi bireylere göre erkekler arasında daha sık görülmektedir. Bu durum cinsiyete bağlı genlere dikkat çekmiş ve araştırmalar bu yönde ilerlemiştir. Bundan sonra MR'nin etiyopatogenezisinde genetik olmayan (hamile annelerin veya yeni doğan bebeklerin kötü beslenmesi, perinatal dönemdeki kazalar, uterusun teratojenik ajanlara maruz kalması) ve genetik olan faktörler rol oynamaktadır (2, 3).

2.2 Mental Retardasyonun Sınıflandırılması

MR'nin uluslar arası iletişimde klinik standardizasyonunu sağlamak için IQ testinin sonuçlarına göre derin (ağır), şiddetli, orta, ılımlı şeklinde sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.1) (3).

Çizelge 2.1. Mental Retardasyonun IQ Seviyelerine Göre Sınıflandırılması (2,3).

MR'nin Derecesi	Sıklığı (%)
İlımlı (50<IQ<75)	85
Orta (35 <IQ<50)	10
Şiddetli (20<IQ<35)	3
Derin (IQ<20)	1

2.3 Mental Retardasyonun Genetik Sebepleri

MR kromozomların sayısal ve yapısal abnormaliteleri ile kromozomal düzeyde, tek gen ve çoklu genlerin (poligenik) işe karıştığı gen düzeyinde ve genetik-çevre etkileşiminin işe karıştığı multifaktöriyel etkenlerle ortaya çıkan klinik bir fenotiptir. MR Down sendromu, Frajil X sendromu, X'e bağlı alfa-talasemi mental retardasyon sendromu (ATR-X) gibi kompleks hastalıkların bir parçası olduğu gibi, fenil ketonuri (FKU) gibi metabolik bir hastalığın ya da Duchenne muskular distofisi (DMD) gibi nöromuskular bir hastalıkla beraber de seyredebilir (2). MR'nin genetik sebepleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir (1).

Çizelge 2.2. Mental Retardasyonun Genetik Sebepleri (2)

Sayısal kromozom anomalileri:

Trizomi 21 (Down Sendromu)

X kromozomunun sayısal anomalileri (Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu, Trizomi X, tetra/pentazomi X vb.)

Parsiyel (kısmi) kromozom anomalileri:

Parsiyel trizomiler (4p, 5p vb.)

Delesyonlar (5p-/ cri du chat, 4-/Wolf-Hirschorn)

Translokasyonlar

Subkromozomal anomaliler

Birleşik gen sendromları

Kriptik (subtelomerik) translokasyonlar

Tek gen hastalıkları (monogenik)

Otozomal resesif (ailesel)

Otozomal dominant (genellikle sporadik)

X'e bağlı

Mitokondriyal hastalıklar

Birden fazla genin işe karıştığı hastalıklar (poligenik)

2.3.1 Mental Retardasyon ve X Kromozomu Arasındaki İlişki

Araştırmacılar, Down sendromu, PraderWilli-Angelman gibi sendromlarda olduğu gibi, otozomal kromozom aberasyonlarının yanı sıra, evrimsel süreçte, zekâ ile ilgili genlerin çoğunun X kromozomu aberasyonlarından kaynaklanmasını ve ilgili genlerin X kromozomunda toplanmasını, doğal seleksiyonun bir sonucu olarak görmekteyiz. Bununla beraber, bazı bilimsel otoriteler de, araştırmaların çoğunun X kromozomu üzerinde yoğunlaşılması sebebiyle bu sonuca varıldığını savunmaktadırlar (4). Toplumda MR'nin erkek bireyler arasında sık görülmesinin nedeninin erkeklerdeki bir X kromozomunun bulunması, dolayısıyla resesif veya dominant olsun MR ilişkili genlerin daha çok X üzerinde bulunabileceği ve etkili olacağı görüşü ile açıklanmaktadır.

Mental retardasyon klinik bakımdan genel olarak sendromik/spesifik, ve non-sendromik/non-spesifik olarak sınıflandırılmaktadır. X kromozomu üzerinde MR'den

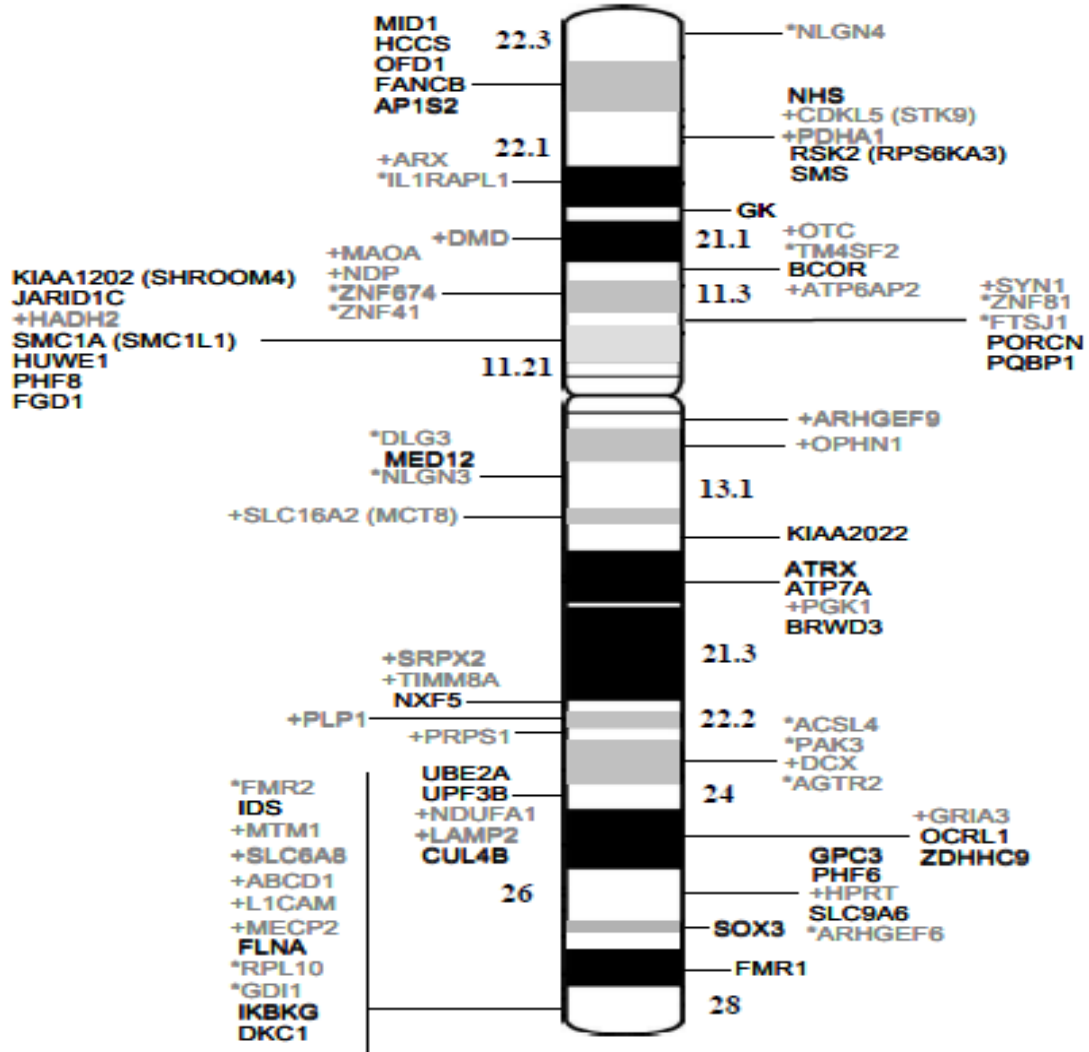
sorumlu genler için X'e bağılı MR (XLMR) kavramı kullanılmaktadır. Sendromik MR (MRXS); dismorfik özellikler, nörolojik komplikasyonlar, metabolik anormallikler ile karakterize olduğu halde, non-sendromik MR (MRX) için herhangi bir dismorfolojiden bahsetmek söz konusu değildir (4). Günümüzde MRX'den bahsedebilmek için IQ seviyesinin 70 ve altında olması yeterlidir (Çanakale MR Çalıştayı, 2009).

Bugüne kadar yapılan araştırmaların sonucunda MRXS'den sorumlu gen sayısının 100'den, MRX'den sorumlu gen sayısının ise 60'tan fazla olduğu bildirilmektedir (5). Yapılan tüm çalışmalarda 215 XLMR olgusu listelenmiştir. Bu olguların 149 tanesi spesifik klinik özelliklere sahip iken, 66 tanesinin non-spesifik klinik özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Spesifik klinik özelliklere sahip 149 olgunun 98 tanesi sendromlarla ilişkili olup, 51 tanesi nöromuskular bozukluk grubunda incelenmektedir. Bu olgulara ait bilgiler Çizelge 2.3'de özetlenmiştir (5). XLMR ve MRX'den sorumlu genlerin isimleri, X kromozomu üzerindeki yerleşimleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir (6).

Çizelge 2.3 XLMR Olgularının Sınıflandırılması.

	TOPLAM	HARİTALANAN	KLONLANAN
SENDROMİK	98	31	38
NÖROMUSKULAR	51	16	28
NONSENDROMİK/MRX	66	50	16
TOPLAM SAYI	215	97	82

XLMR'nin toplumdaki sıklığını göstermek amacıyla yapılan çalışmalardan biri British Columbia'da yapılmış ve XLMR'nin prevalansı 1,8/1000 olarak bildirilmiştir (7).



Şekil 2.1. Klonlanan XLMR Genlerinin İdiogramı. Koyu renkli genler MRXS'e neden olan genleri, açık renkte olup önünde + işareti bulunanlar nöromuskular hastalıklara neden olan genleri, açık renkte olup önünde yıldız işareti olanlar ise MRX'den sorumlu genleri ifade etmektedir.

2.3.2 Mental Retardasyon ve Frajil X Sendromu

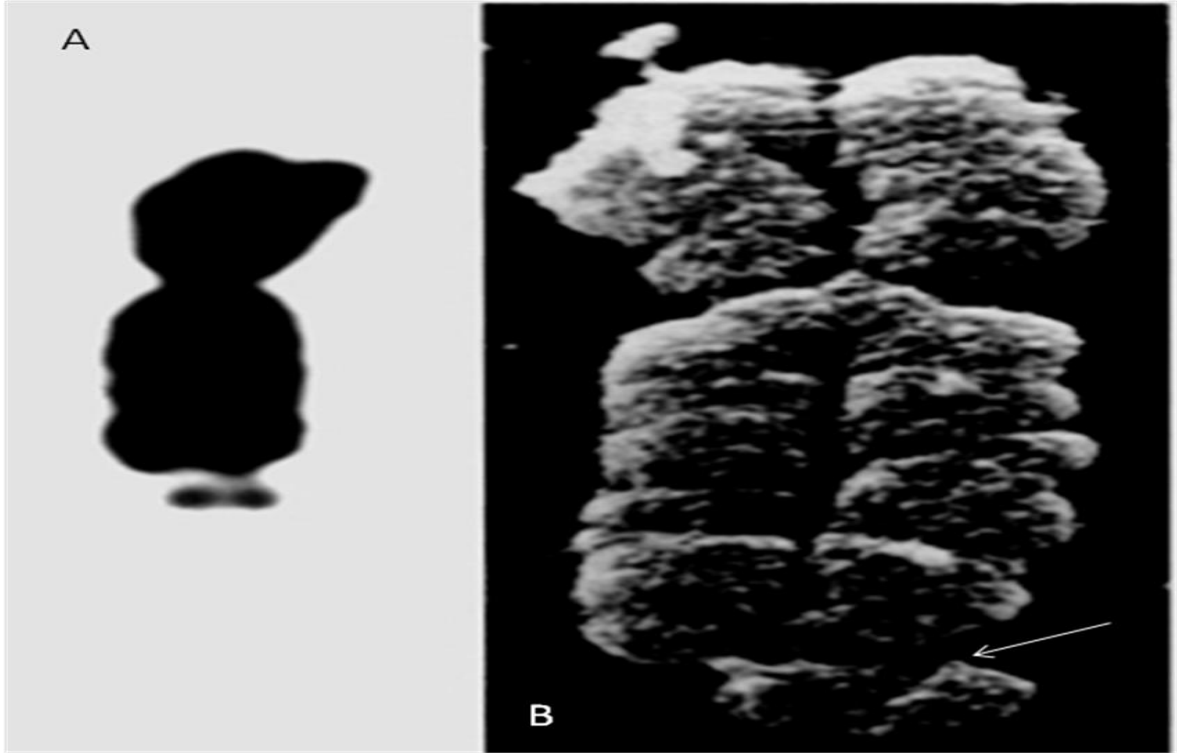
Genetik temel ve mental retardasyon arasındaki ilişki, birçok genetik değişiklikle ortaya konmuştur. En iyi karakterize edilen, Down sendromundan sonra, mental retardasyonun en ağır ve kalıtsal formunu oluşturan sendrom Frajil X sendromu (FXS)dur.

Frajil X sendromu (FXS), XLMR olgularının en yaygın monogenik sebebi olup, XLMR'li bireyler arasındaki sıklığı %15-20 arasında değişmektedir. Kalıtsal MR'nun sebebi olan FXS'nun erkeklerde görülme sıklığı 1/2500-4000 iken, bu oran dişilerde 1/2000-8000'dir (8). Erkeklerde, dişilerden daha sık görülmesinin nedeni erkeklerde bir tane X kromozomunun bulunması, başka bir ifade ile X kromozomunun hemizigot olması ile açıklanmaktadır. FXS'da MR, hiperaktivite, el çırpma-ısıırma, makroorşidizm, göz

kontaklı kuramama, eklemlerde hiperekstentibilite, büyük ya da belirgin kulaklar, zorlanarak tekrarlamalı konuşmalar başlıca klinik bulgular arasında yer almaktadır. FXS'nun klinik ön tanısı, sendromda görülen klinik bulgulara göre standardize edilen ve uluslar arası kullanılan Hagerman Frajil X Checklist'ine göre yapılmaktadır (1, 11). FXS ön tanısı almış bireylerde bu klinik bulguların birisi veya birkaçı bulunabilir.

2.3.3 Frajil X Sendromunun Genetik Tanısı

Klinik olarak tanımlanan FXS'nun genetik temelini aydınlatmak kolay olmamıştır. Sendroma adını veren X kromozomunun uzun kolunun q27.3 bölgesinde ortaya çıkan frajilite, pürin ve pirimidin sentezinde öncü molekül olan folik asitin doku kültürlerinde bulunmayışı ile veya bu yolların bloke edildiği özel yöntemlerle sitogenetik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. A: Karyotipik olarak Frajil X kromozomunun gösterilmesi. B: Elektron mikroskobu ile Frajil X kromozomunun gösterilmesi (13)

FXS çalışmalarında, X'e bağlı kalıtım modeline uymayan pedigrilerin ortaya çıkması (Sherman Paradoksu gibi), sendromun klinik ve sitogenetik bulgularının değişkenlik göstermesi, FXS için moleküler genetik çalışmaları zorunlu kılmıştır.

Günümüzde FXS'nin moleküler tanısı, 1991 yılında klonlanan, Xq27.3'de yerleşen FMR1 (Frajil X Mental Retardasyon 1) geninin 5' UTR (Un-Translated Region, proteine dönüşürilmeyen bölge)'sindeki CGG (Cytosine-Guanine-Guanine) üçlü bazların tekrar

sayısına bakılarak yapılmaktadır. CGG üçlü tekrar sayısı toplumdaki bireyler arasında değişkenlik göstermektedir. En genel üçlü tekrar sayısı 29-30 CGG tekrar sayısıdır. Buna göre bireyler, 5-54 tekrar sayısına kadar normal, 54-200 tekrar sayısına kadar premutasyon ve 200'den sonrası full mutasyon tanısı almaktadırlar. Bazı bireyler ise bu tekrarlar için mozaik durum gösterebilirler. Full mutasyonda artmış CGG tekrarlarındaki sitozinlerin hipermetilasyonu FMR1 geninin transkripsiyonunu engellemekte ve FXS fenotipi ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise premutasyon taşıyıcılığı, 50 yaş üstü erkeklerde Frajil X Tremor-Ataksi sendromu (FXTAS) ve dişilerde primer over yetmezliği (POF) ile ilişkilendirilmiştir (10).

Yapılan araştırmalarda FXS'li olguların %95'inde, FMR1 geninin 5'-UTR bölgesinde yer alan CGG tekrar dizilerindeki artışın sorumlu olduğu bildirilmiştir. Geriye kalan %5'lik kısımda ise FMR1 genindeki delesyon ve nokta mutasyonların etkili olduğu bildirilmiştir (12). FMR1 geni CGG tekrar sayılarının belirlenmesi için başlangıçta Southern blot ve PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) yöntemleri kullanılmıştır. Günümüzde FMR1 CGG tekrar sayısını daha net ortaya koyan kapiller elektroforez temelli fragment analizleri kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalarda XLMR'dan birinci dereceden sorumlu olan FMR1 geninden başka genlerin de bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmalar FMR1'den sonra MR'den ikinci derece sorumlu genin ARX (Aristaless Related Homeobox) geni olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 2.3'de gösterilen ve klonlanmış olan 82 genden bir tanesi de ARX genidir. ARX geni son zamanlarda MR ile ilişkisi bakımından toplumlarda aydınlatılması gereken hedef gen haline gelmiştir.

2.4 ARX Geni (OMIM #300382)

ARX geni, X kromozomunun kısa kolunda p22 bölgesinde yerleşmiş ve yaklaşık 12,5 kb (kilobaz) uzunluğunda bir bölgeyi içermektedir. ARX geni 2002 yılında klonlanmış olup, *Drosophila melanogaster*'de bulunan *al (arista-less)* geninin ortologudur. Paired benzeri (*Prd-like*) sınıfı gen ailesinin bir üyesi olan ARX geni, aynı zamanda bir homeobox genidir. Gen kısa bir gen olup, 5 ekzon ve 4 intron içermektedir. Genin 5 ekzonu, beyinde ve iskelet kasında, yaklaşık 2,8 kb uzunluğunda bir mRNA'yı kodlar (14). Yapılan Northern blot analizlerinde genin, kalpte 4,4 ve 5,9 kb uzunluğunda ve yine iskelet kasında 2,5 ve 2,1 kb uzunluğunda farklı transkriptlerinin bulunduğu gösterilmiştir (15). ARX geninin ön beyin, pankreas ve testis gelişiminde de önemli bir transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı ifade edilmektedir (15).

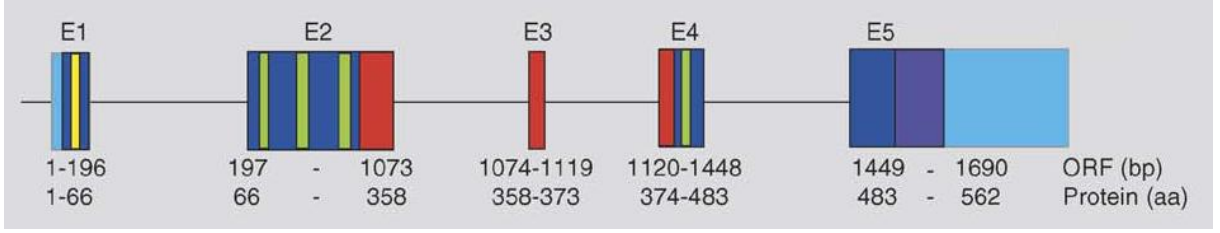
ARX geni ile yapılan çalışmalarda, ARX geni mutasyonlarının hem sendromik hem de non-sendromik MR'lerle ilişkili olduğu görülmektedir. ARX mutasyonlarının işe karıştığı durumlar genel olarak, non-malformasyon ve malformasyon grubu halinde 2 grupta incelenmektedir. ARX geni mutasyonları sonucu ortaya çıkan malformasyonu olan ve olmayan fenotipler Çizelge 2.4'de verilmektedir (15).

Çizelge 2.4: ARX Mutasyonlarıyla İlişkilendirilmiş Fenotipler (14).

Malformasyon Grubu
<p><u>HYD-AG</u>: Hidranensfali ile beraber Abnormal Genital (OMIM #300215) (Hydranencephaly with Abnormal Genitalia)</p> <p><u>XLAG</u>: X' bağı Abnormal Genital (X-linked Lissencephaly and Abnormal Genitalia) (OMIM #300215)</p> <p><u>ACC-AG/PROUD Sendromu</u>: Korpus Kallosum Yokluğu ile beraber Abnormal Genital (Agenesis of Corpus Callosum with Abnormal Genitalia) (OMIM #30004)</p> <p><u>WS/ISSX</u>: West Sendromu: X'e bağı Infantil Spazm Sendromu (West Syndrome/Infantile Spasms X-linked Sndrome) (OMIM #308350)</p>
Non-Malformasyon Grubu
<p><u>XMESID</u>: X'e bağı Myoklonik Epilepsi ile beraber Spastisite ve Entelektüel Yetersizlik (X-linked Myoelonic Epilepsy with Spasticity and Intellectual Disability) (OMIM #300432)</p> <p><u>PRTS</u>: Partington Sendromu (OMIM #309510)</p> <p><u>MRX</u>: X'e bağı Non-sendromik MR (OMIM #300419)</p>

2.4.1 ARX Geninin Yapısı

ARX geninin açık okuma çerçevesi (ORF; Open Reading Frame), 1686 baz çifti (bp) uzunluğundadır. Genin ORF'sinin Guanin ve Sitozin (GC) içeriği %72,5 olup bu durum genin moleküler genetik analizlerinde önemli bir basamak olan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'larında ciddi amplifikasyon sorununa neden olmaktadır. ARX geni 562 amino asit büyüklüğündeki fonksiyonel ARX proteinini kodlar. Bu proteini kodlayan ARX geninin bilinen 4 tane fonksiyonel dizi birimi (domain) bulunmaktadır. Bunlar; oktapeptid birimi, polialanin motifleri, homeodomainler ve gene ismini veren Aristaless birimleridir. Bu birimlerin yanı sıra genin üç adet de nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) motifi bulunmaktadır (Şekil 2.3) (15).



Şekil 2.3 ARX Geninin Şematik Yapısı. Genin ekzonları E harfi ile gösterilmiştir. E1’de oktapeptid domeyni açık sarı renk, E2 ve E4’de bulunan polialanin motiflerini (PM) koyu sarı renk, E2-E3-E4’de bulunan homeodomeynleri kırmızı renk, ve E5’de bulunan Aristaless birimi ise mor renk ile ifade edilmektedir.

2.4.1.1 Genin Yapısında Bulunan Birimlerin Görevleri ve Mutasyonları

ARX geni ile ilgili çalışmalara bakıldığında 2008 yılına kadar toplamda 92 adet MRX ailesinin bildirildiği görülmektedir. ARX geni mutasyonu bulunan XLMR ailesi sayısının ise 9 olduğu ve XLMR çalışmalarına referans oluşturması bakımından da sırasıyla MRX 29,32,33,36,38,43,54,76,87 şeklinde kodlandığı bildirilmektedir (<http://xlmr.interfree.it/home.htm>). XLMR ailelerinde yapılan çalışmalar, ARX geni mutasyonları bu ailelerde bulunan mutasyonların yaklaşık %9,5’ini oluşturduğunu ortaya koymaktadır (15). Bugüne kadar çalışılan 59 olguda 32 farklı mutasyon tipi gözlenmiştir. En sık görülen (hot spot) mutasyonlar PM1 ve PM2’nin de içinde bulunduğu E2’de olup bu oran %76’dır (45/59). Öyle ki bu bölgedeki mutasyonlarının XLMR ailelerindeki sıklığı tek başına % 6.1 olarak bildirilmektedir (15-17). ARX geni üzerinde tanımlanan bu mutasyonlar, gen veya protein üzerinde yer aldıkları bölgelere göre irdeleneceklerdir.

Oktapeptid Domeyni

Oktapeptid domaini (O.D) sırasıyla YCIDSILG (Tirozin-Sistein-İzolösin-Aspartikasit-Serin-İzolösin-Lösin-Glisin) amino asitlerinden oluşmuştur (aa27-34). Bu bölgenin bugüne kadar çalışılan model organizmalar arasında yüksek korunmuşluk derecesine sahip olduğu görülmektedir. Oktapeptid domaini, ARX proteininin amino ucuna (N-terminaline) yakın yerleşim göstermektedir (18).

ARX geninde bulunan oktapeptid domaininin, transkripsiyonu baskılayıcı özelliği olduğu bilinen eh-1 (engrailed homolog-1) represör domeynine benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu benzerlikten dolayı transkripsiyon aktivatör-represör deneyleri yapılmıştır. Oktapeptid domainin, Groucho/Transducin-Like Enhancer (TLE) kofaktör proteinleri ile de etkileşime girdiği bildirilmiştir. Buna göre, TLE1-OD etkileşimi olduğunda, ARX geninin transkripsiyon baskılayıcı özelliği açığa çıkarılmıştır. TLE1 ile OD’nin bu sinerjik etkisi, transkripsiyonun birlikte baskılaması (korepresyon) olarak adlandırılmaktadır. Daha önceki verilere göre (MRX54 ailesinde), ARX geninin oktapeptid domaini içerisinde meydana gelen mutasyonla, c.98C>T dönüşümü, ARX proteininde L33P değişimine neden olmuştur. Bu değişim sonucunda, TLE1-OD etkileşimindeki azalmadan dolayı, çalışılan genin, transkripsiyonu baskılayıcı özelliğinin azaldığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada TLE1 miktarı artırıldığı halde, transkripsiyonu baskılama özelliğinde değişme olmadığı gözlenmiştir (19). Bu ailede mutasyonu taşıyan bireylerin

IQ'su 30 ile 65 arasında değişmekte olup hasta 2 bireyde aynı zamanda epilepsi durumu bildirilmiştir (20).

Oktapeptid domaini içerisinde yer almayan, fakat OD gibi E1'de yer alan başka bir mutasyon daha tanımlanmıştır. Bu mutasyonda c.112C>T dönüşümünü takiben P38S değişimi ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonu taşıyan bireyin sınır düzeyde MR'ye sahip olduğu bildirilmiştir (IQ=70) (5, 15, 18, 20).

Polialanin Motifleri (PM)

ARX genin fonksiyonel domainlerinden biri de polialanin motifleri(PM)'dir. ARX geninde farklı uzunlukta ve yerleşimde 4 adet PM bulunmaktadır. PM'lerin ARX proteinindeki yerleşim konumları ve amino asit sayıları Çizelge 2.5'de verilmektedir.

Çizelge 2.5. ARX genindeki PM'lerin durumu.

PM Numarası	Amino Asit Pozisyonu	Amino Asit Sayısı
PM1*	100-115	16
PM2*	144-155	12
PM3	275-281	7
PM4	432-440	9

* En sık mutasyon görülen bölgeler

ARX genindeki PM'lerin rolü tam olarak anlaşılamamakla beraber, yapılan çalışmalar PM'lerin transkripsiyon düzenleyicisi görevlerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Günümüze kadar yapılan araştırmalarda, ARX geninin PM3 ve PM4 bölgelerinde herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir. PM1 ve PM2 bölgesindeki tanımlanmış mutasyonlar ise toplam ARX geni mutasyonlarının %47'sini oluşturmaktadır. Farklı klinik tablolarla seyreden MRX, ISSX, PRTS hastalarında PM1 ve PM2 bölgesinin mutasyonları tanımlanmıştır (15, 21).

Polialanin Motif 1 (PM1) Mutasyonları

ARX geninin PM1 bölgesi, normal durumda 16 adet GCG üçlü nükleotid dizisine sahiptir. Bu üçlü tekrar dizilerinin instabilitesi nedeniyle yapıya farklı sayılarda GCG tekrarları katılmakta ve PM1 bölgesinin, dolayısıyla ARX geninin yapı ve fonksiyonunu bozmaktadır. Yapıya katılan tekrarlı dizilerin komplementer DNA (cDNA, complementary DNA)'daki pozisyonuna göre mutasyonlar isimlendirilmektedir. Tekrarlı diziler sıklıkla 333. nükleotidinden sonra farklı sayıda GCG üçlü nükleotidleri şeklindeki insersiyon mutasyon ile yapıya girmektedir. Bu giriş ile de protein yapıya fazladan alanin amino asitlerinin girmesi söz konusudur. Bu bölgede en sık görülen mutasyon, yapıya 7 GCG üçlü nükleotidinin insersiyon ile girmesi sonucu oluşan c.333ins(GCG)₇ mutasyonudur. Yaşları 2 ile 14 arasında değişen kriptojenik infantil spasm sendrom tanısı konmuş 115 erkek olguda 6 bireyde (%5.2) c.333_334ins(GCG)₇ mutasyonu bulunmuştur (22). Bugüne kadar farklı çalışmalarda, farklı GCG tekrar sayısında insersiyonlara bağlı

olarak c.333ins(GCG)₃, c.333ins(GCG)₂ ve c.333ins(GCG)₁ mutasyonları literatürde yer almış ve bu varyantlar MRX ile uyumlu bulunmuştur (Çizelge 2.6) (23) .

Çizelge 2.6. ARX Geni PM1 Bölgesinde Tanımlanmış Mutasyonlar (12,14,21)

Mutasyon Tipi	Görüldüğü Durum	Görülme Sayısı
c.333ins(GCG) ₇	ISSX/West Sendromu	3
c.333ins(GCG) ₃	MRX	1
c.333ins(GCG) ₂	MRX	1
c.333ins(GCG) ₁	MRX	2

Bu insersiyon mutasyonlarından başka bildirilen bir olguda, PM1 bölgesinde c.298_330dupGCGGCA(GCG)₉ şeklinde bir mutasyon daha bulunmuştur. Bu mutasyona göre normalde 16 olan alanin amino asit sayısı 27'ye çıkmıştır. Bu olguda mutasyonu taşıyan bireyin Ohtahara sendromlu olduğu bildirilmektedir. Ohtahara sendromu, epilepsinin en erken formudur ve belirli EEG (Elektro Ensefalo Grafi) paternlerine sahiptir. Burada alanin sayısının artışına bağlı olarak, fenotipin de o kadar şiddetli etkilendiği ifade edilmektedir (24).

Yapılan bir çalışmada, c.333ins(GCG)₇ mutasyonunu taşıyan bir erkek çocuğun, infantil spazm hariç, tüm klinik özelliklerinin ISSX ile uyumlu olduğu bulunmuştur (25). Bir başka çalışmada da c.335ins(GCG)₇ şeklinde bir mutasyon tanımlanmış, bu olgunun da ISSX ile %100 uyumlu olduğu ifade edilmiştir. Olgunun aile taramasında anne ve babanın taşıyıcı olmadıkları, mutasyonun de novo olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (26).

Polialanin Motif 2 (PM2) Mutasyonları

ARX geninin PM2 bölgesinde meydana gelen ve tanımlanan mutasyonlar arasında en çok görülen mutasyon, c.428_451 bölgeleri arasındaki duplikasyon mutasyonu, c.428_451dup' dur. Bu mutasyon sonucu PM2'deki alanin amino asit sayısı 12'den 20'ye çıkmaktadır. Bugüne kadar bildirilen ARX mutasyonlarının %41'i (24/59), bu c.428_451dup mutasyonundaki, 24 bp duplikasyonu şeklindedir. Prevalansı 1/12.000 olarak hesaplanan bu mutasyonun, MR ile ilgili görüldüğü klinik durumlar Çizelge 2.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. PM2 Bölgesi Mutasyonları (14)

Mutasyon Tipi	Görüldüğü Durum	Görülme Sayısı
c.428_451dup	MRX	20
c.428_451dup	ISSX/West Sendromu	2
c.428_451dup	PRTS	2

c.428_451dup. mutasyonunun görüldüğü MRX aileleri MRX 29, 32, 33, 36, 38, 43, 54, 76, 87 olup <http://xlmr.interfree.it/home.htm>. adresinde listelenmektedirler.

ARX geni mutasyonlarının araştırıldığı MRX 29,32,33 ailelerinde her bir ailede birer erkek ve MR38 ailesinde ise bir taşıyıcı dişi bireyin dup(24) mutasyonunu taşıdığı bildirilmiştir (27). Diğer bir çalışmada da MRX36 ailesinde, 4 erkek ve bir dişi bireyin dup(24) mutasyonunu taşıdıkları tespit edilmiştir. Tanımlanan 4 erkek bireyden 3 tanesinin kardeş, bir tanesinin ise kuzen olması mutasyonun famiyal olduğunu göstermektedir. İlgili mutasyonu taşıyan bireyler ayrıca klinik olarak PRTS'nin ılımlı nörolojik özelliklerini taşıdıkları görülmüştür (19). MRX43 ailesinde de 2'si epilepsili 4 bireyin, MRX54 ailesinde ise 2'si epilepsili 7 bireyin MR'den etkilendiği bildirilmiştir (28). MRX87 ailesinde 5 erkek ve 4 dişi bireyin, dup.24 mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir (12, 16).

MR ve distonik el hareketleri ile karakterize olan Partington Sendromlu (PRTS), biri Norveç diğeri Avusturya kökenli 2 ailede, dup.24 mutasyonu gösterilmiştir. West Sendromlu Norveç kökenli bir ailede de aynı mutasyon gösterilmiştir (17, 29). Bir çalışmada aynı kuşaktan 2 erkek kardeşte ve 1 erkek kuzende aynı mutasyon PRTS ile ilişkilendirilmiştir (30). Bunlardan farklı olarak PM2'deki 24 bp'lik bir de novo delesyon mutasyonu, c.441_464del, MRX ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada mutasyon bulunan erkek çocuğun tek klinik bulgusu şiddetli MR'dir (31). Yine c.429_452del, c.431_454del, c.448_456del şeklindeki mutasyonlar MRX ile ilişkili bulunurken, c.393_452del ve c.420_451del şeklindeki mutasyonlar XLAG ile ilişkilendirilmiştir (32-35).

Homeodomeyn (HD) Mutasyonları

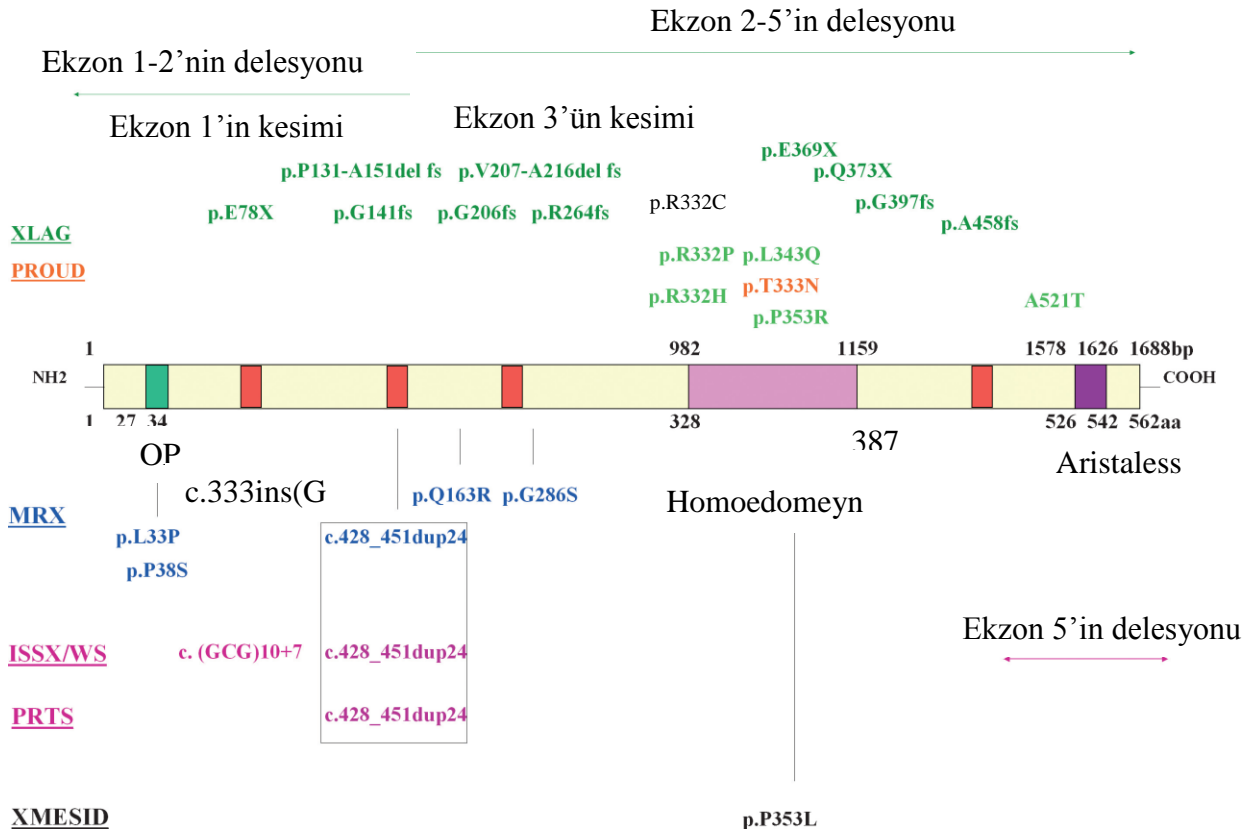
Bu güne kadar yapılan hedef gen çalışmalarında ARX'in, PAX4 (Paired box4) geninin promotoruna bağlandığı gösterilmiştir (36, 37). PAX4 geni ile ARX geninin birbirleri üzerine zıt etkilerinin olduğu bildirilmiştir (15, 19, 34). HD bölgesi ARX proteini üzerinde 328-387 amino asitler arasındaki bölgeye karşılık gelmektedir. Bu bölge içinde aynı zamanda NLS2 (325-332 amino asitleri) ve NLS3 (379-386 amino asitleri arasında) bölgeleri yer almaktadır. HD mutasyonlarının daha çok, malformasyon grubunda kendini gösterdiği bildirilmektedir (Çizelge 2.8) (15, 32, 33, 38, 39)

Çizelge 2.8.HDM ve İlişkili Olduğu Fenotipler (14,23,32)

Mutasyon Tipi	Değişim	Malformasyon Grubu
P353L	(Prolin-Lösin)	XMESID
P353R	(Prolin-Arjinin)	XLAG
R332P	(Arjinin-Prolin)	XLAG
R332H	(Arjinin-Histidin)	XLAG
R332C	(Arjinin-Sistein)	XLAG
R379L	(Arjinin-Lösin)	XLAG
R379S	(Arjinin-Serin)	ISSX
L343Q	(Lösin-Glutamin)	XLAG
E369X	(Glutamik asit-Dur)	XLAG
Q373X	(Glutamin-Dur)	XLAG
T333N	(Treonin-Asparajin)	ACC-AG /PROUD Sendromu

Aristaless Domeyni (AD) Mutasyonları

ARX geni ile ilgili yapılan çalışmalarda genin Aristaless domeyninde nokta mutasyon taşıyan herhangi bir olguya rastlanılmamıştır. Aristaless domeyni ARX geninin 5. ekzonunda yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada, bir olgunun 4. ekzonunda bulunan 1419. nükleotidden sonra yapıya AC dinükleotidinin girmesiyle, çerçeve kayması (frame shift) şeklinde bir mutasyon olduğu, bu mutasyon sonucunda oluşan dur kodunu nedeniyle Aristaless domeyninin bulunmadığı güdük bir protein meydana geldiği bildirilmiştir. ARX geninde AD'de meydana gelen bu ve diğer mutasyonlarla ilişkili olduğu fenotipler Şekil 2.4'de şematize edilmiştir (19, 20, 40).



Şekil 2.4. ARX mutasyonları ve ilişkili olduğu fenotipler: Koyu yeşil renkle gösterilmiş olan mutasyonlar (örneğin p.R264fs) güdük protein oluşumuna neden olan mutasyonları simgelemektedir. (fs:frame shift=çerçeve kayması, p:protein c:cDNA) (14, 33, 34).

ARX Geninde Bulunan Diğer Genomik Değişimler ve Polimorfizmler

ARX geninde sık olarak gözlenen ve genellikle tekrarlı dizilerin duplikasyonu ve insersiyonu şeklinde olan mutasyonlardan başka, tespit edilen delesiyonlar ve polimorfizmler de bulunmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bildirilmiş olan delesiyon ve polimorfizmler Çizelge 2.9'da gösterilmiştir (19, 20).

Çizelge 2.9. ARX Genindeki Diğer Genomik Değişimler (17,18) .

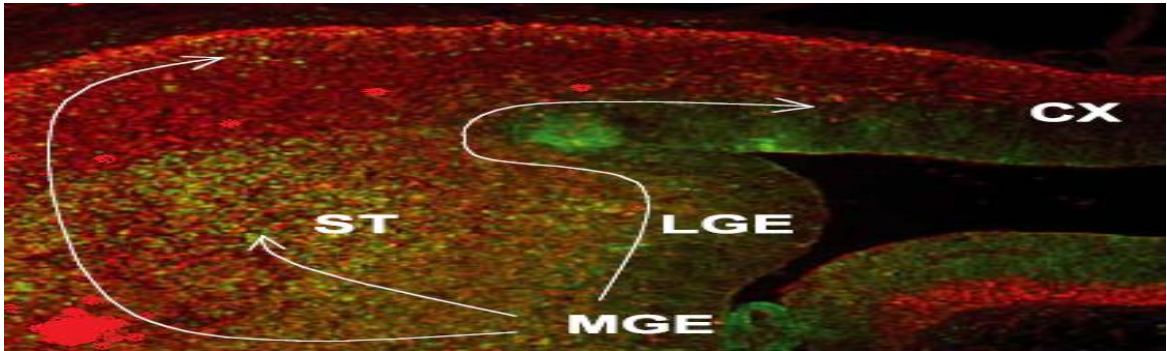
Aile	Fenotip	Mutasyon
T6	MRX	c.448del9
L45	MRX	c.429del24
D36	Sınıflandırılmamış	c.522G>T → p.S174S

Brezilya’da 143 MR’li bireyde yapılan bir çalışmada, MRX ile ilişkili iki sporadik olguda, ARX geninde c.1347C>T (p.G449G) değişimi gözlenmiş, değişimin amino asit değişikliğine neden olmadığı görülmüştür. 78 kişilik kontrol grubunda aynı değişime 2 kişide daha rastlanması bu değişimin bir polimorfizm olduğunu göstermektedir. Aynı değişim, bir başka çalışmada bir XLAG hastasında gösterilse de kontrol grubunda %4 oranında görülmüştür (17). Brezilya’da yapılan çalışmada ayrıca de novo bir başka değişim daha (c.1074-3T>C) bulunmuş, bulgu yine polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

2009 yılında, (c.81C>G/p.Y27X) ve c.423_455dup(33 bp) şeklinde de novo olarak 2 mutasyon daha bulunmuştur (15). Bunlardan birincisinde, mutasyon bulunan 2 erkek kuzende daha önce sözü edilen Ohtahara sendromu söz konusuysen, ikincisinde PRTS ve kesik kesik hızlı solunum (hiperventilasyon) yeni bir fenotip olarak kendisini göstermiştir (41, 42).

2.5. Mutasyonların Moleküler Patolojisi

ARX daha önce bahsedildiği gibi ön beyin, pankreas ve testis gelişiminde rol almaktadır (43). Yapılan çalışmalarda merkezi sinir sistemine bakıldığında yetişkinlerde, ARX’in daha çok GABA(Gama Amino Bütirik Asit) üreten (GABAerjik) nöronların ve glial hücrelerin bulunduğu amigdala, koku soğanı, gibi özelleşmiş yapılarda eksprese edildiği ve CaMKII (Kalsiyum-Kalmodulin Bağımlı Kinaz II) üreten aktive edici (eksitatorik) nöronal ve glial hücrelerde ise üretilmediği görülmektedir (43).



Şekil 2.5. Embriyonal dönemin 13.5’inci günündeki farede ARX’in Ekspresyonu (MGE: Marjinal Gangliyonik Eminens, L:Lateral, CX: Korteks, ST: Stratum).Kırmızı renk post.mitotik nöron belirteci olan β -tubulini, yeşil renk ise ARX pozitif nöronların belirteçleridir. (32)

Normal durumda ventral telensefalonun bir parçası olan MGE'den başlayan ve GABA üreten ara nöronların farklılaşması, teğetsel (tangential) ve ışınsal (radial) migrasyonu *Dlx1* ve *Dlx2* (*Distal-less*) genleri tarafından yönetilir. Bu genler daha sonra *Dlx5*, *Dlx6* ve *Arx* genlerini aktive ederler (44, 45). *Arx* (-) farelerde GABAerjik ara nöronların MGE'den LGE aracılığı ile SVZ (Sub Ventriküler Zone=Ventrikül Altı Bölge)'ye göçünün normal devam ederken, MGE'den IZ(Inter Zone=Ara Bölge)'ye göçünün engellendiği gözlenmiştir (46-48).

ARX geni ve ortaya çıkardığı protein ürününe bakıldığında, alanin amino asit sayısı artışına neden olan insersiyon ve duplikasyon tipindeki mutasyonların, çekirdek içinde ARX proteininin kümeleşmesine ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu kanıtların ISSX'i ve mental retardasyonu açıklar nitelikte olduğu kabul edilmiştir (46). ARX proteini hücre içinde, stoplazmadan çekirdeğe importin 13 (IPO13) proteini ile taşınmaktadır. ARX proteininde artan alanin sayısına bağlı olarak ARX proteininin konumunun yer değiştirdiği, normal konumu çekirdek olan ARX proteininin Ala7 mutasyonu durumunda, stoplazmada konumlandığı bildirilmiştir (49). Yanlış konumlanmanın dışında, proteinde yanlış katlanmaya bağlı olarak çekirdekte de kümeleşmeler görülmektedir. Çekirdekte fonksiyonel bir protein olan ARX'in, stoplazmik konumlanması fonksiyon kaybı (loss of function) ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca stoplazmik kümeleşme sonucu proteinin proteazlarca degradasyonu, hücre için toksik bir etki yapmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (49). Aynı mekanizmanın Ala8 mutasyonu durumunda geçerli olmadığı rapor edilmiştir. Buna göre stoplazmik kümeleşme ve proteazlarca degradasyon Ala8 mutasyonları için patolojiyi açıklamaya yönelik değildir (49). Burada dikkat çekici bir durum da her iki mutasyon durumunda ARX'in IPO13 ile etkileşime girme yeteneğinin kaybolmamasıdır. IPO13-ARX etkileşimi tahmin edileceği gibi ARX'in NLS dizileri aracılığıyla gerçekleşmektedir (32-34). Yapılan çalışmalarda NLS2'deki nokta mutasyonlarının (R332P, R332H, R332C ve T333N) XLAG ve Proud sendromlarıyla ilişkileri bildirilmiştir (49). IPO13'ün başka bir substratı olan PAX6 ile olan etkileşimine bakıldığında hedef NLS'nin NLS3 olduğu bildirilmektedir (50). PAX6-IPO13 etkileşimini sağlayan NLS, homeodomeynin C terminaline yakın konumlanmaktadır (49). 2010 yılına kadar ARX'de NLS3 mutasyonu tanımlanmamasına rağmen NLS2'deki mutasyonların in vivo'da NLS3-IPO13 etkileşiminde ARX'in çekirdekte tam ve doğru konumlanmasını engellediği düşünülmektedir (51). Görülen P353L mutasyonu, XMESID olgularında bildirilmiştir. DNA bağlanmasını direkt olarak etkilemese de doğru hidrofobik çevre oluşumunu engellediği tahmin edilmektedir (52).

2010 yılında NLS3'de 2 adet de novo mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların da NLS3-IPO13 etkileşimini engellemediği fakat IPO13'ün ARX proteini nukleusa bırakmadığını göstermiştir. Buna neden olan olay IPO13'ün çekirdek porunun, çekirdek kısmına yakın konumlanan RAs-related Nuclear Protein (RAN-GTP)'ye bağlanamaması olarak gösterilmiştir. RAN-GTP'ye bağlanamayan IPO13'ün, yükünü (ARX proteinini) çekirdeğe bırakmadığı öne sürülmektedir (39). Aynı çalışmada ARX proteininin, hücre iskelet proteinlerinden olan, Tubulin Alfa 1A (TUBA1A) ile etkileşimi ilk defa olarak koimmünpresipitasyon deneyleriyle gösterilmiştir. TUBA1A mutasyonlarının çeşitli

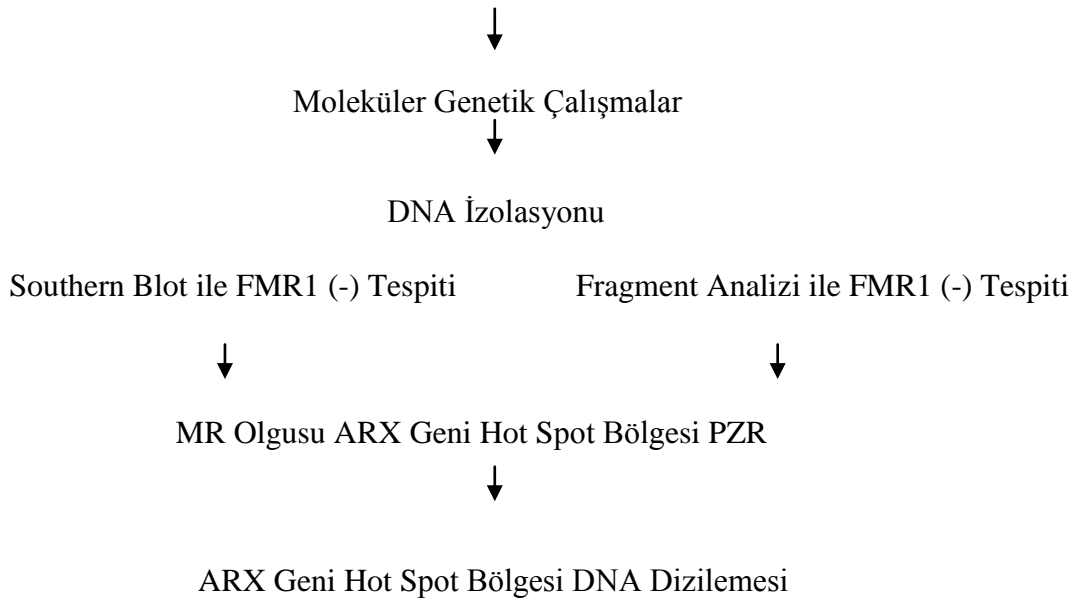
lizensefali fenotipleriyle ilişkileri literatürde yer almaktadır (53-55). R332P, T333N, R379S ve R379S mutant proteinlerinin de TUBA1A ile etkileşimlerinin devam ettiği gözlenmiştir. Fakat ilginç bir şekilde mutant ARX proteini üreten mitotik hücrelerde DNA kondensasyonun uzun sürdüğü ve hücrelerin kümeleşme gösterdiği gözlenmiştir. Hücre bölünmesinin gecikmesini takiben nöronal migrasyonun bozulması ARX ilişkili lizensefali fenotiplerini açıklar niteliktedir (39).

MATERYAL ve METOD

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Klinik Genetik ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dallarına polikliniklerine başvuran, Hagerman'ın Frajil X Sendromu Checklist'i kullanılarak Frajil X/MR olarak gönderilen, yaşları 1 ile 18 arasında değişen 100 retrospektif ve 25 prospektif olmak üzere toplam 125 erkek hasta araştırma projesine dahil edildi. Projeye katılan hasta çocukların ebeveynlerinden aydınlatılmış onam formu alındı ve proje Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onay aldı (EK-1). Probandların pedigrileri çıkarılarak aile bireylerinin durumları değerlendirildi. Pediatri klinikleri tarafından Frajil X/MR ön tanısı ile daha önce Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na gönderilmiş, Southern Blot yöntemiyle (52) FMR1 genindeki CGG tekrar sayısı açısından negatif bulunmuş 100 retrospektif, ek olarak FMR1 genindeki CGG tekrar sayısı Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazı fragment analizi yöntemiyle normal sınırlarda tespit edilen 25 prospektif hasta, projenin amacı ve kapsamı çerçevesinde ARX geninin 2. ekzonundaki en sık görülen c.334ins(GCG)7 ve c.428_451dup(24) mutasyonları direkt PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)-elektroforez yöntemi ile tarandı.

Elektroforetik olarak benzer yürüme paterni gösteren 125 olgudan rasgele seçilen 10 olguya kendi olanaklarımız ile DNA dizi analizi yapıldı. Araştırma projemizde izlenen iş akış algoritması aşağıda özetlenmiştir.

Hastaların Klinik Değerlendirilmesi: Öntanı (Frajil X/MR)



3.1.Perifal Kandan DNA İzolasyonu

Frajil X sendromu/MR ön tanısı ile gönderilen 125 hastadan periferal kan örnekleri K3EDTA'lı tüplere alınarak, salting-out (tuzla çöktürme) yöntemiyle DNA izolasyonları gerçekleştirildi (52).

3.1.1 Kullanılan Solüsyonlar

Eritrosit Lizis Tamponu

155 mM NH₄Cl (Sigma)
10 mM KHCO₃ (Sigma)
0.5 M EDTA (Sigma)

500 ml lizis tamponu hazırlamak için, 4.14 g NH₄Cl (Sigma), 0.5 g KHCO₃ (Sigma) ve 2 ml EDTA (Sigma) 500 ml bidistile suda çözüldü. Solüsyonlar otoklavda steril edildi.+4 oC'de saklandı.

EDTA (0.5 M, pH=7.4)

18.61 g EDTA (Sigma) 100 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'mı ayarlamak için NaOH çözeltisi kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Lökosit Lizis (WBL) Tamponu

0.1 M NaCl (Merck)
0.5 M EDTA (Sigma)

0.1 M NaCl solüsyonu hazırlamak için, 23.4 g NaCl 100 ml bidistile suda çözüldü ve otoklav edildi.100 ml WBL tamponu hazırlamak için, 0.1 M NaCl'den 2.5 ml, 0.5 M EDTA'dan 5 ml alınarak steril bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonu (%10'luk)

10 g SDS (Boehringer Mannheim) tartılarak, 100 ml bidistile suda çözüldükten sonra 0.22 µm'lik filtreden (Costar) geçirilerek steril edildi.

Proteinaz K Solüsyonu

100 mg proteinaz K (Boehringer Mannheim) 10 ml Tris-HCl (1 mM, pH 7.5)'de çözüldü

Amonyum Asetat (AmAc) Solüsyonu (9.5M)

36.613 g AmAc (Sigma) tartılarak, 15 ml steril bidistile suda çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra, son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.2 İşlemler

1. K3EDTA içeren (Venoject) tüplere 10 ml periferik kan örneği alındı.
2. Tüp alt-üst edilip içerisindeki kan homejenize edildikten sonra 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne (Cellstore) aktarıldı.
3. Üzerine 30 ml (1:3 oranında) lizis tamponu eklenerek vorteks (Nüve) yardımıyla homejenizasyon sağlandı.
4. 20 dakika süreyle -20 °C'de inkübasyon yapıldı.
5. 1500 rpm'de, +4°C'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde (Sigma) santrifüj edildi.
6. Dökelti atıldı, çökelti önce elle vurularak daha sonra vorteks yardımıyla tam homejenize edildi.
7. Üzerine 20 ml seviyesine kadar tekrar lizis tamponu eklendi, vorteksle homejenize edildi.
8. 5 dakika -20 °C'de inkübe edildi.
9. 1500 rpm'de, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Dökelti atıldı, çökelti elle vurularak kaldırıldı. Vorteksle homejenize edildikten sonra üzerine 9,4 ml WBL tamponu eklendi.
11. Karışıma 500 µl %10'luk SDS ve 100 µl proteinaz K eklendi.
12. Kapağı kapatılan ve karışımı içeren 50 ml'lik tüp, 37 °C'de gece boyu inkübe edildi.
13. İnkübasyon sonrası her 1 ml için 370 µl 9,5 M AmAc eklendi ve vorteks yardımıyla iyice homejenize edildi.
14. Karışım, 5000 rpm'de 25°C'de 30 dakika santrifüj edildi.
15. Üst faz yeni bir steril 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak, üzerine 1:2 oranında %96'lık soğuk etanol eklendi. Tüp alt üst edilerek DNA'nın çöktürülerek, görünür hale gelmesi sağlandı.
16. Çöken DNA, pipet ucu ile alındı, içinde 500 µl, %70'lik etanol bulunan ependorf tüpüne bırakılarak yıkandı.
17. 13.000 rpm'de, 25 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
18. Dökelti boşaltılıp, ependorf tüpünün kapağı açık bırakılarak, 37 °C'de etüve konularak alkol uçuruldu.
19. DNA 150 µl steril bidistile suda çözülerek, çalışılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.3 FMR 1 Geni 5'-UTR'deki (CGG) Tekrarlarının PZR ile Çoğaltılması

Araştırmaya dahil edilen 125 hastadan 100'ü, hedef bölge spesifik primerlerle Expand Long PCR kullanılarak (30), geriye kalan 25 hastanın DNA'ları ise hedef bölge, cinsiyet spesifik ve referans kontrol bölgelerini çoğaltan multipleks PZR ile çoğaltıldı. Kapiller elektroforez temelli fragment analizi için yapılan multipleks PZR reaksiyon içeriği ve miktarları Çizelge 3.1 de verilmiştir. Ticari olarak verilen koşullar, laboratuvarımıza uyarlanarak optimize edilmiştir.

Çizelge 3.1. FMR 1 Geni CGG tekrarlarının çoğaltılması için kullanılan Multipleks PZR Malzemeleri ve Miktarları

Malzeme Adı	Miktarı (µl)
Yüksek GC PZR Tamponu	13
Cinsiyet Primerleri	0,6
TR PZR Enzim Karışımı	1,2
Frajil X Primerleri	0,8
dH2O	1,4
gDNA (10 ng / µl)	3
Toplam	20

FMR 1 geninin çoğaltılması için kullanılan multipleks PZR koşulları aşağıda verilmiştir. Multipleks PZR reaksiyonu ürününün kapiller elektroforezle uyumlu olması bakımından ABI 9700 Thermal Cycler cihazında (Applied Biosystems, USA) gerçekleştirildi.

3.1.3.1.PZR Koşulları:

Denatürasyon: 98,5 °C - 10 sn.	}	15 Döngü
Primer bağlanması: 58 °C - 60 sn.		
Uzama: 75 °C - 6 dk.		
Denatürasyon: 98,5 °C - 10 sn.	}	15 Döngü
Primer bağlanması: 56 °C - 60 sn.		
Uzama: 75 °C - 6dk.		
Saklama: +4 °C		

3.1.3.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Her olgunun PZR ürünü 30 dakika boyunca 110 voltta, %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yürütme işlemi 10 X 15 cm'lik elektroforez setinde (BioRad) gerçekleştirildi.

3.1.4. Elektroferezde Kullanılan Solüsyonlar

10 X Tris-Borat-EDTA(TBE) Tamponu:

0.089 M Trizma (Sigma)
0.089 M Borik Asit (Sigma)
0.002 M EDTA (Sigma)

10 X TBE tamponu hazırlamak için, 54 g Tris-baz, 27.5 g borik asit ve 20 ml 0.5 M EDTA (pH 7.4), son hacim 500 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

1 X TBE Tamponu:

10 X TBE ve bidistile sudan 1:9 oranında olacak şekilde dilüsyon gerçekleştirilerek hazırlandı.

Etidyum-Bromid (EtBr) Solüsyonu (10mg / ml)

10 mg EtBr (Sigma) 1 ml bidistile suda çözülerek, karanlıkta ve 4 °C’de saklandı.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolü

PZR ürünlerinden 5’er µl alınıp, 1’er µl 6 X yükleme tamponu (Fermantas) ile karıştırılarak, ürünler sırasıyla jelin kuyucuklarına yüklendi. PZR ürünlerinin niceliğini belirlemek için 50 bp’lik Marker (Fermentas) kullanıldı. Örnekler yukarıda belirtilen elektroferez koşullarında yürütüldü.

Görüntüleme

Elektroferez sonrası PZR ürünlerinin ortaya çıkardığı fragment paternlerinin görüntüleme işlemi bilgisayar destekli yazılım programı (Syngene Transilluminator) aracılığı ile gerçekleştirildi.

Agaroz jel elektroferezi sonrasında istenmeyen PZR ürünlerinin varlığı tespit edildiğinde, ürünler fragment analizi için kapiller elektrofereze yüklenmeden aşağıdaki işlemlerden geçirilerek temizlendi.

PZR Ürünlerinin Temizlenmesi (Clean-up)

Her bir PZR ürününün temizlenmesi için 0.2 ml’lik ependorf tüp kullanıldı. PZR ürününden 2 µl alındı ve üzerine kit içeriğindeki PZR ürünü temizleme enzim karışımından (Clean-up Enzyme Mix.) 3 µl eklendi. Karışım 75 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 7 µl formamid (Merck) ve 3 µl ROX™ 1000 Size Standart (Abbott) eklenip, 93 °C’de 3 dakika bekletildi. Bu basamaktan sonra, tüm karışımın kapiller elektroferezle yürütülmesi için DNA dizileme ve genotipleme cihazına (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer/Genotyper) yüklendi. Yürütme sonucunda her bir

örneğin ham verisi ve gerçek verilerinin renkli dökümleri alınıp, agaroz jel görüntüleriyle karşılaştırılarak hastaların genotipleri belirlendi.

3.1.5. FMR1 Geni 5' UTR Bölgesi CGG Tekrar Sayısını Hesaplanması

Her bir hastanın taşıdığı CGG tekrarı ve buna bağlı olarak genotipinin belirlenmesi için, fragment analizi sonrasında elde edilen tekrar sayısından, normal referans fragment büyüklüğü olan 194 bp'den çıkarıldı. Elde edilen sayı nükleotid sayısını vermektedir. Bu sayı her bir trinükleotid birimden dolayı 3'e bölünerek, o hasta için CGG trinükleotid tekrar sayısı hesaplandı. Kısaca formüle edildiğinde:

$$(CGG)n \text{ tekrar sayısı} = ((PZR \text{ ürün Büyüklüğü (bp)} - 194))/3$$

3.1.6. ARX Geni Ekzon 2 Hot Spot Bölgenin PZR ile Çoğaltılması

Projenin amacı doğrultusunda ARX geninde sık görülen mutasyonların yer aldığı geninin 2. ekzonundaki 584 bp'lik bölgenin PZR ile çoğaltılması gerçekleştirildi. Bu hedef bölgenin çoğaltılması için gerekli olan ileri (forward, F) ve geri (Reverse, R) primer çifti kullanıldı (26). Bu primer çiftinin nükleotid içeriği aşağıda verilmektedir:

İleri Primer (F): 5' - ACGCCTGGGCCTAGGCACTG - 3'

Geri Primer (R): 5' - CTCGGTGCCGGTGCCACCAC - 3'

Ekzon 2'de hedef bölgenin çoğaltılması için hazırlanan PZR için kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmektedir.

Çizelge 3.2. ARX Geni Ekzon 2'nin Hot Spot Bölgesinin Çoğaltılması için PZR İçeriği

Malzeme Adı	Miktarı (µl)
10X Buffer with MgCl ₂	2,5
DMSO (DiMetilSülfoksit)	2,0
İleri Primer (10 pM)	0,5
Geri Primer (10 pM)	0,5
gDNA (100 ng / µl)	0,1-5
dNTP (DeoksiNükleotidTrifosfat, 10 mM)	0,5
Taq. Polimeraz (HotStar , 5u / µl)	0,3
dH ₂ O (Distile Su)	15,7
Toplam	22,6-27,6

Her bir hasta örneği için reaksiyon 0,2 ml'lik ependorflarda kuruldu. Reaksiyon kurulduktan sonra tüplere ABI 9700 Thermal Cycler cihazında (Applied Biosystems, USA) aşağıda belirtilen PZR koşulları uygulandı.

3.1.6.1.PZR Koşulları:

Ön Denatürasyon: 98 °C - 6 dk.

Denatürasyon: 95 °C - 30 sn.

Primer Bağlanması: 64 °C - 45 sn.

Uzama: 72 °C - 45 sn.

} 14 Döngü (0,5 °C ↓/Döngü)

Denatürasyon: 95 °C – 30 sn.

Primer Bağlanması: 57 °C – 45 n.

Uzama: 72 °C - 45 sn.

} 28 Döngü

Son uzama: 72 °C - 10 dk.

Saklama: 4 °C - ∞

3.1.6.2.PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez

PZR sonrasında, her olgunun PZR ürünleri, poliakrilamid kadar ayırım gücüne sahip, klasik agarozlardan farklı olan %2'lik agaroz jel (MetaPhor® Agarose) kullanılarak, 110 voltta, 55 dakika yürütüldü. Yürütülme işlemi 10 X 15 cm'lik elektrofrez setinde (BioRad) gerçekleştirildi.

%2'lik MetaPhor® Agarose Jel Çözeltisinin Hazırlanması

Kontrole karşı, hedef DNA fragmentlerindeki birkaç nükleotidlik artış (duplikasyon veya insersiyon) ve azalış (delesyon)ları gösterebilmek için yüksek ayırım gücüne sahip %2'lik MetaPhor® Agarose jel çözeltisini hazırlamak için; 2 g MetaPhor Agaroz 100 ml 1 X TBE tamponunda çözelti homojen oluncaya kadar kaynatıldı. Kaynamadan kaynaklanacak konsantrasyon ve çözünürlük değişimini engellemek için, buharlaşan sıvı miktarı kadar bidistile su ilave edildi. 50 °C'ye kadar soğutulan çözeltiye, stok EtBr (10 mg/ml) çözeltisinden 6 µl eklenerek karıştırıldı. Elektrofrez kuvetine uygun taraklar yerleştirilerek, jel çözeltisi küvete boşaltıldı. Oda ısısında 90 dakika inkübe edilerek jelin ön polimerleşmesi sağlandı. PZR ürünleri jele yüklenmeden önce uygun polimerizasyonun sağlanması için, jel +4 °C'de 20 dakika daha inkübe edildi.

PZR Ürünlerinin MetaPhor Agaroz Jele Yüklenmesi

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olan PZR ürünlerinden 5'er µl alınıp, 1'er µl 6 X yükleme tamponu (Fermentas) ile karıştırılarak, jelin ilgili kuyucuklarına yüklendi. PZR ürünlerinin fragment büyüklüklerini belirlemek için 50 bp'lik Marker (Fermentas)

kullanıldı. Elektroforez sonrası jel görüntüleme ve değerlendirme işlemleri bilgisayar destekli UV-Transilluminator (Syngene) aracılığı ile gerçekleştirildi. Her bir olgu için hedef bölge DNA fragmentleri değerlendirildi. Normal kontrole göre elektroforetik yürümede farklılık gözlenen olguların ürünleri saflaştırılarak DNA dizi analizine alındı ve olası değişiklikler teyit edildi.

PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezi sonrasında, yürümesinde farklılık görülen PZR ürünleri (584 bp), reaksiyon sırasında kullanılmamış olan dNTP'ler, primerler ve kısa fragmentler gibi artifaktlardan temizlemek için, kit (PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen) kullanılarak saflaştırma (pürifikasyon) işlemi gerçekleştirildi.

İşlemler

1. 20 µl PZR ürünü, distile su ile 50 µl'ye tamamlanıp, üzerine 200 µl bağlama tamponu HC(High Cut off) ilave edildi.
2. Karışım pipetaj yapıldıktan sonra kolona aktarıldı.
3. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Sonra kolona 650 µl yıkama tamponu eklendi.
5. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. 10.000 g'de 2 dakika son santrifüj yapıldı.
7. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 50 µl elüsyon tamponu konuldu.
8. Maksimum 15.000 g kuvvetinde 2 dakika santrifüj edildi.
9. Elde edilen pürifiye örnekten 5 µl alınarak 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı.
10. Karışım %2'lik MetaPhor Agaroz jeline yüklendi ve UV-Transilluminator aracılığı ile görüntülemesi yapıldı.

Saflaştırma sonrası görüntülemeye, 584 bp uzunluğundan daha fazla görülen şüpheli örnekler, DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak teyit edildi.

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizine alınan saflaştırılmış örnekler için kurulan reaksiyonların içeriği Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. DNA Dizileme Reaksiyonu (labeling) İçin Kullanılan Malzemeler ve Miktarları

Malzeme Adı	Miktarı
İleri veya Geri Primer (1pmol / µl)	3 µl
Big Dye™ v3.1	3 µl
Pürifiye PZR ürünü	6-10 µl
dH ₂ O	2 µl
Toplam	14-18 µl

DNA dizileme reaksiyonu için PZR reaksiyonu koşulları aşağıda verilmektedir.

DNA Dizileme Reaksiyonu için PZR Koşulları

Ön denatürasyon: 95 °C – 5 dk.

Denatürasyon: 95 °C - 30 sn.

Primer Bağlanması: 55 °C - 10 sn.

Uzama: 60 °C – 4 dk.

} 40 Döngü

Son uzama: 72 °C - 7 dk.

Saklama: 4 °C - ∞

Dizi analizi için kurulan PZR ürünleri de artifaktlardan temizlenmeleri için yine saflaştırma işleminden geçirildi. Bu saflaştırma için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

İşlemler

Hazır filtreli-kolonlu tüplere (NucleoSEQ) 600 µl distile su ilave edilip vortekslendi ve 30 dakika 4 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası filtreli-kolonlu tüpler 5000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Alt sıvı kısım atılıp, 20 µl örnek pipet yardımıyla kolonun ortasına aktarıldı. Kolon 5000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılmış fragmenti içeren alt sıvı kısım, dizi analizinin gerçekleşeceği cihazın (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer) plate kuyucuklarına yüklendi. Yürütölme sonrası ham ve gerçek verilerin renkli baskıları alındı. Elde edilen DNA dizileri ARX geninin referans dizileri ile karşılaştırılarak, sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR

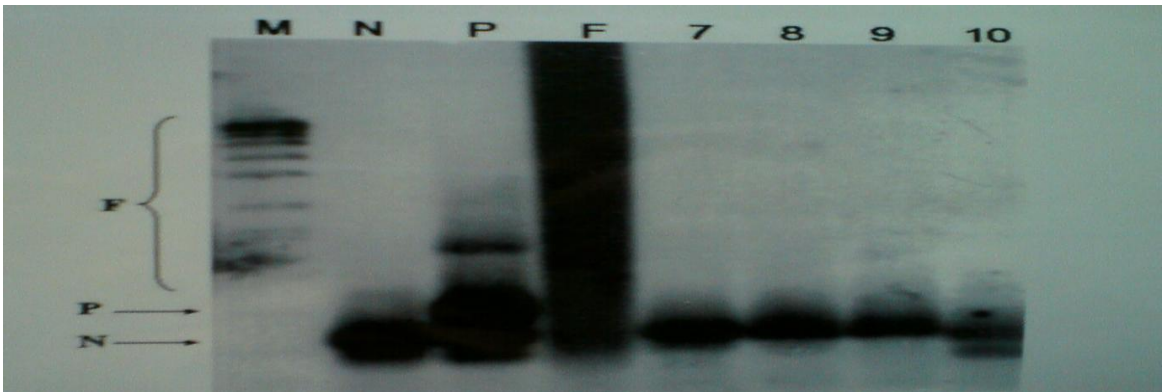
4.1.MR Olgularının Klinik Değerlendirmesi

Çalışmaya alınan 125 olgunun tamamı Frajil X/MR öntanısı almış erkek hasta çocuklardı. Olguların yaşları 1-18 arasında değişmektedir. Hem PCR-S.Blot (Şekil 4.1) hem de PCR-kapiller elektroforez temelli fragment analizi (Şekil 4.2) ile FMR1 geni 5'-UTR bölgesindeki CGG tekrarları normal bulunmuş olguların, yapılan pedigrü analizlerinin sonucunda, 1 olguda otistik davranış, 10 olguda epilepsi, 5 olgunun ailesinde paternal ve veya maternal MR olduğu görüldü. Olguların yaş ortalaması 7,4 ve akraba evliliği yüzdesi % 8,8 olarak hesaplandı.

4.2.MR Olgularının Genetik Değerlendirmesi

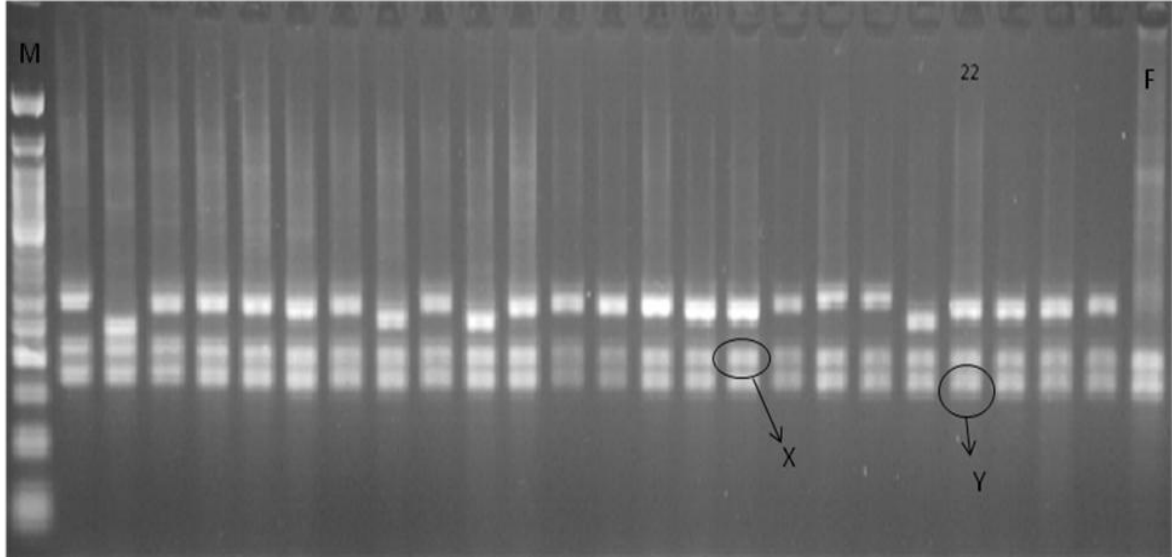
FMR1'den sonra MR'den sorumlu tutulan ARX geninde sık görülen mutasyonları barındıran hot spot bölgesi ekzon 2 için yapılan çalışma sonucunda, elektroforetik olarak, 125 olgunun hiç birinde, kontrole karşılık çok belirgin olan artış yönünde farklı bir yürüme paterni gözlenmedi. (Şekil 4.4). 125 olgu arasından rasgele seçilen toplam 10 olgu DNA dizi analize alınarak, hedef bölge incelendi. Herhangi bir artış ve azalış gözlenmedi (Şekil 4.4). Ayrıca normal fragment büyüklüğüne sahip 10 olguda yapılan DNA dizi analizinde de bölgeye özgü herhangi bir nokta mutasyonu veya polimorfizm de saptanmadı (Şekil 4.5 ve 4.6).

Retrospektif 100 olgunun Southern Blot yöntemi (21) sonrasında FMR1 geni CGG tekrar sayıları normal bulunmuştur (Şekil 4.1).



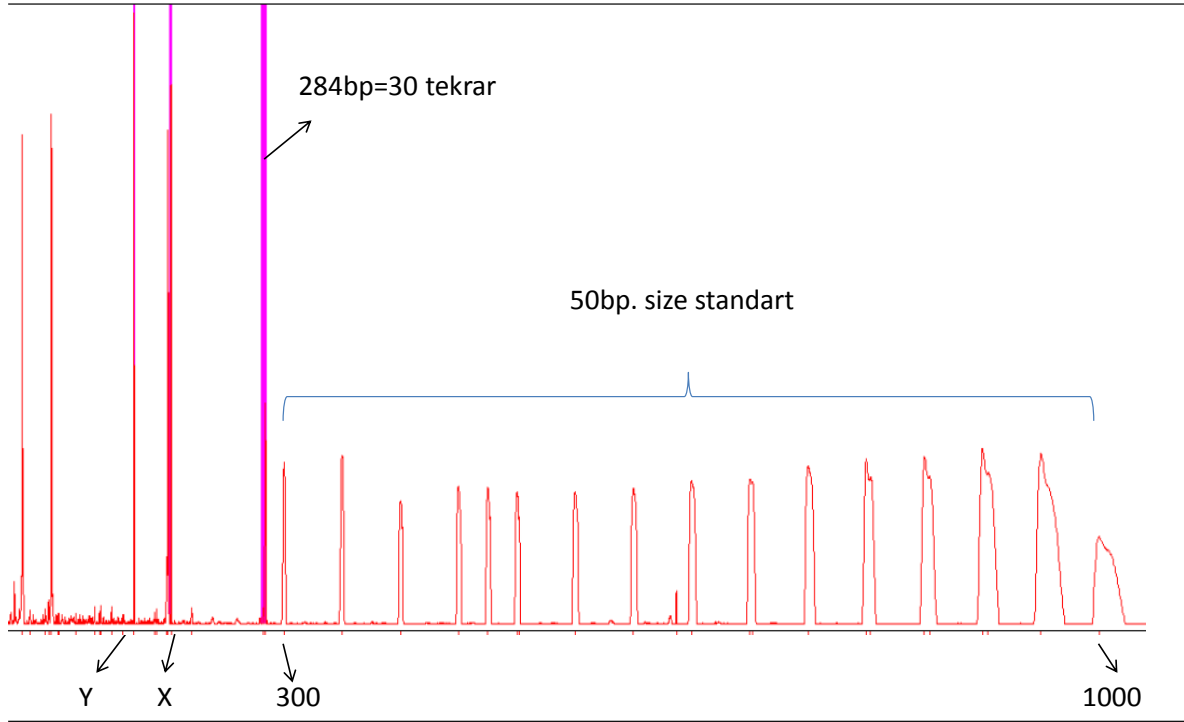
Şekil 4.1. Retrospektif 4 olgunun otoradyografi sonrası CGG tekrar sayılarını gösteren Southern Blot görüntüsü. M; Marker, N; Normal kontrol, P; Premutasyon Kontrol, F; Full mutasyon kontrol, 7-10; Normal CGG tekrarlı olgular.

Prospektif olarak çalışılan 25 olgunun FMR1 geni PZR görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



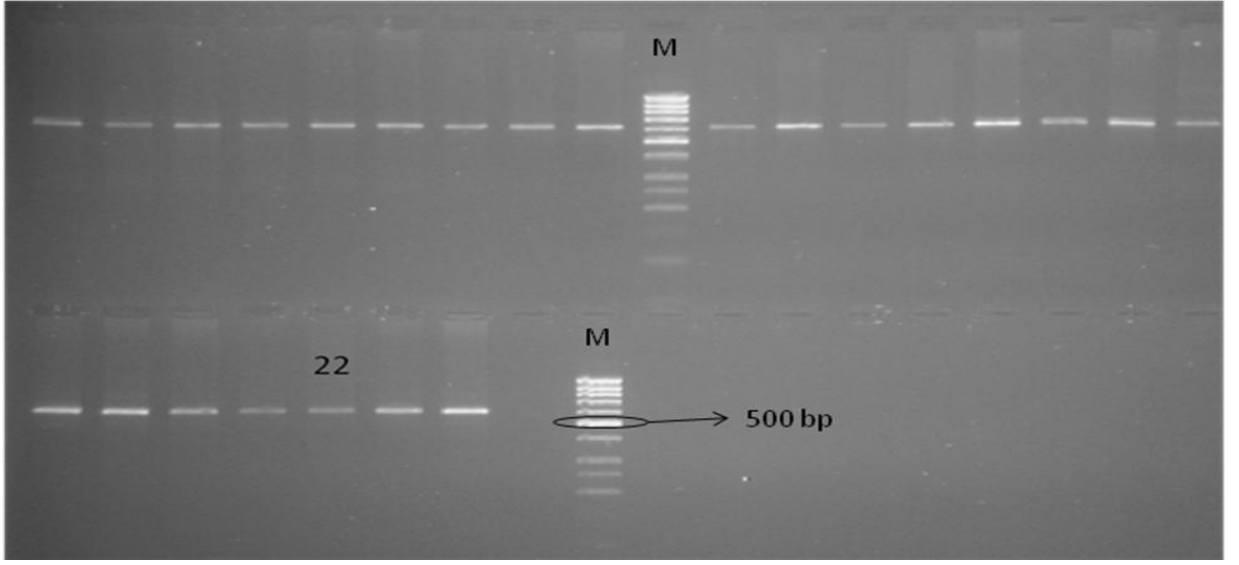
Şekil 4.2. Prospektif 25 olgunun PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. M:Marker X ve Y cinsiyet belirteçleri, F:Full mutasyon kontrol.

Çalışılan 25 olgu, pozitif kontrol olarak konulan bir olgunun (Şekil 4.2, 26 numaralı kuyu) jel görüntüleri ve fragment analiz grafiklerine bakılarak olgularımızın FMR 1 geni açısından normal olduğu saptandı. Bu durumu teyit için, 25 olguya gerçekleştirdiğimiz fragment analizi görüntüsüne örnek olarak seçtiğimiz 22 nolu olguya ait bilgiler Şekil 4.3’de verilmektedir.



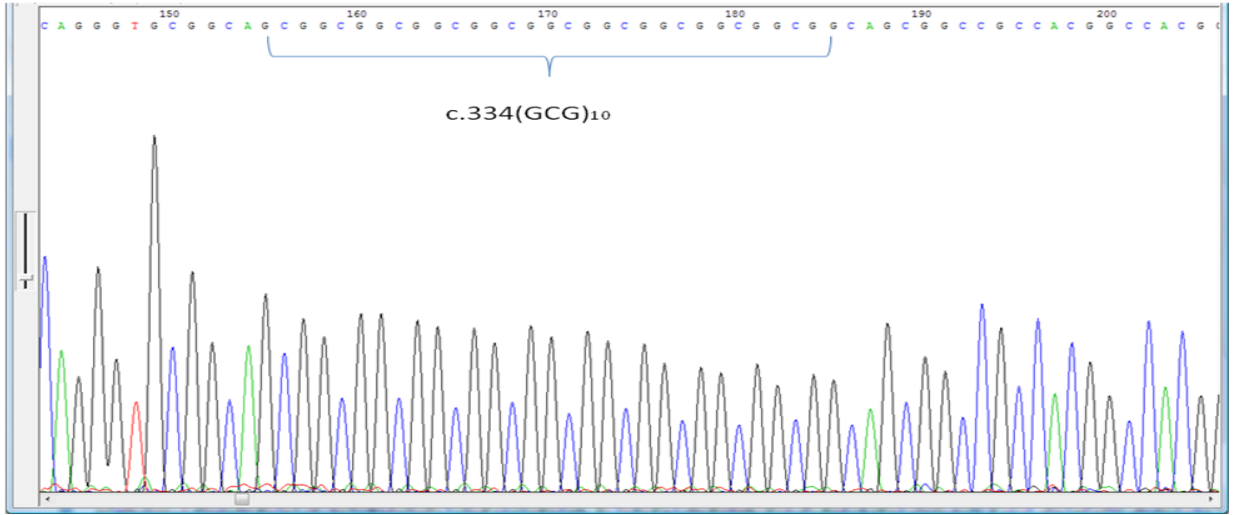
Şekil 4.3. Çalışılan 22 Numaralı Olgunun Fragment Analizi Görüntüsü. Cinsiyet (gender) primerleri (170 bp'lik Y ve 200 bp'lik X kromozomu için), size standartları (300-1000 bp) ve tekrar sayısı gösterilmiştir.

Toplamda 125 olgunun 2 farklı yöntem ile (Southern Blot ve fragment analizi) FMR 1 geni CGG tekrarı açısından normal sınırlar içerisinde olduğu gösterildikten sonra, ARX geni ekzon 2'de hot spot bölgesi çoğaltılıp, ürünlerin yüksek çözünürlüklü MetaPhor Agaroz jel görüntüleri elde edildi (Şekil 4.4).

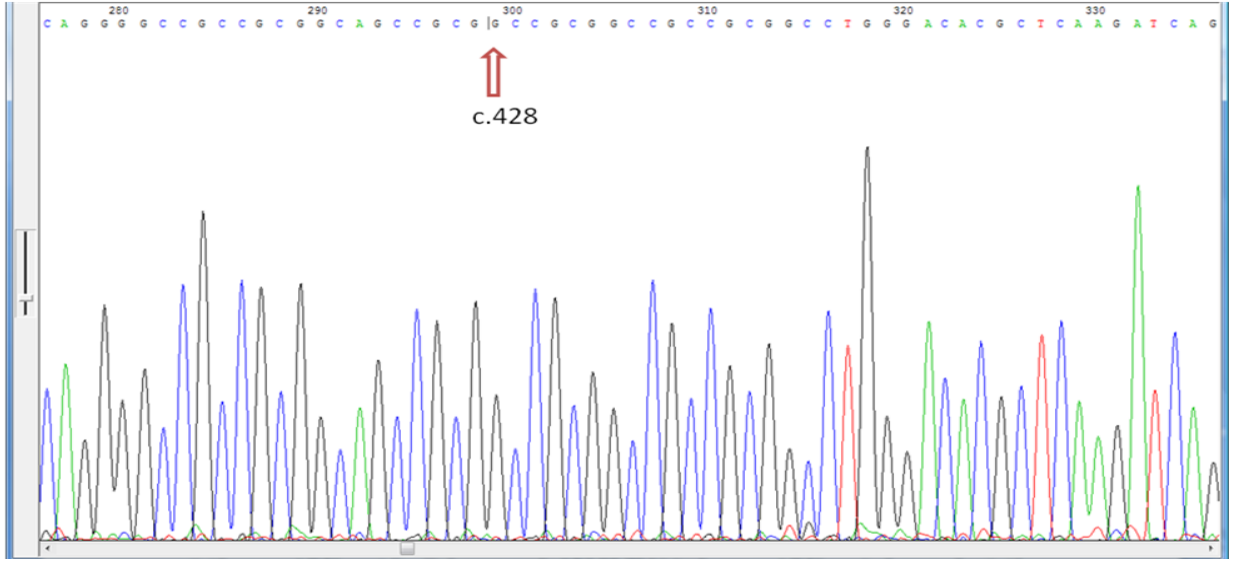


Şekil 4.4. Çalışılan Olguların ARX Geni Ekzon 2'deki Hedef Bölgenin Pürifiye PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü. Amplikonumuzun baz çifti uzunluğu 584'tür.

Çalışılan hedef bölgenin gerçekten ilgilenilen bölge olduğunu kontrol etmek amacıyla 22 numaralı olguya yapılan DNA dizi analizi sonuçları Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. 22 Numaralı Olgunun DNA Dizileme Analizi Görüntüsü: PM1'deki normal tekrar sayısı 10 GCG tekrardan oluşmaktadır. Agaroz jel elektroforezi normal (584 bp) görünen hastanın, DNA dizi analizi de normal görünmektedir. Her iki GCG üçlü nükleotidinin arasındaki GCG üçlü nükleotid sayısı 10'dur.



Şekil 4.6 22 Numaralı Olgunun DNA Dizileme Analizi Görüntüsü: Agaroz jel elektroforezini doğrular şekilde, PM2'deki c.428 pozisyonundan c.451'e kadar olan 24bç'lik duplikasyon mutasyonu bulunmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Mental retardasyon çocuklarda ağır zihinsel engelliliğin en sık görülen sebebidir. Dişilere kıyasla erkeklerde daha çok görülmektedir. Bu da erkeklerin genomik olarak bir tek X kromozomuna sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bunun sonucu olarak X kromozomu üzerinde yer alan FMR1 geninden sonra, X kromozomuna bağılı MR'den sorumlu olan ve en fazla mutasyon görülen diğere bir gen ise ARX genidir. Çalışmamızda birbirini doğrulayan iki farklı yöntemle (PCR-S.Blot ve PCR-Fragment Analizi) Frajil X/MR öntanlı, FMR1 geni 5'-UTR bölgesi CGG tekrarları normal sınırlar içinde olan 125 erkek olgu, ARX geninde ekzon 2'de en sık görülen iki mutasyon, (c.333-334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup24) açısından yüksek ayırma gücüne sahip Metaphor™ Agarose jel elektroforezi ile taranmıştır. Çoğaltılan 584 bp'lik bölgenin aradığımız bölge olduğunu göstermek için, rastgele seçilen 22 numaralı olguya DNA dizileme analizi yapıldı. İstenilen bölge olduğu doğrulanmış ve bu bölgede bu olgu için duplikasyon veya insersiyon şeklinde bir mutasyonun olmadığı gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda 125 olgunun da normal genotipte olduğu bulunmuştur. Elektroforezden sonra yapılan görüntülemeye farklı yürüme paterni gösteren olguya rastlanmadığı için 125 olgu arasından rasgele seçilen 10 olgu DNA dizi analizine alındı. Analiz sonuçları normal bulundu.

Gronskov ve arkadaşları 2004 yılında Danimarka'da yaptıkları bir çalışmada, 682 mental retarde erkek bireyde, MRX'e uyan 11 ailede, 3 MR ailesinde ve 11 otistik olguda c.334ins(GCG)₇ ve c.431_454dup24 mutasyonlarına rastlamamışlardır (21). Fakat çalışmada 4 erkek olgudan birinde 8, birinde 3 ve ikisinde 1 GCG (alanin) artışı tespit etmişler ve diğere iki erkek olguda buldukları c.1347 C>T değişimi ile birlikte 8 alanin artışı hariç tüm bulguları polimorfizm olarak değerlendirmişlerdir(20). Gronskov ve arkadaşları çalışmalarında FMR1 5'UTR'deki CGG tekrar sayılarını da dışlamışlardır. Bizim olgu sayımız az olmasına ve tüm olgularımızda FMR1 5'UTR'deki CGG tekrar sayıları dışlanmasına karşın, hepsinin ARX geni c.334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup24 mutasyonları bakımından normal bulunması, her iki popülasyonda görülen MR'de ARX geninin bu iki mutasyonunun etkili olmadığı sonucu çıkarılabilir. Bizim çalışmamızda 10 olgu DNA dizi analizine alınmış, herhangi bir GCG artışı veya azalışı ve polimorfik bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4,5 ve 4.6). Ayrıca 125 olgumuzun 1 tanesinde otistik davranış, 10 tanesinde epilepsi tanısı olmasına karşın, bu iki mutasyonun bulunmaması olguların klinik olarak daha iyi karakterize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bununla beraber 5 olguda ailesel MR, 11 olguda akraba evliliği bulunması diğere resesif genlerin de zeka geriliğinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Hem Gronskov ve arkadaşlarını hem de bizim çalışmamızın sonuçları ARX'in yaygın görülen mutasyonlarının (c.334ins(GCG)₇ ve c.428_451dup24) toplumların genetik yapısına göre değişebileceğini ortaya koymaktadır.

Merkezi sinir sisteminin gelişiminde ve nöronların fonksiyonunda önemli bir rol oynayan ARX geni, farklı klinik bulgularla ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Bu çerçevede Rujirabanjerd ve arkadaşları 2007 yılında çoğunluğunu Güney Taylandlıların oluşturduğu yaşları 3 ay ve 22 yaş arasında değişen, rutin karyotipleme ile kromozomları normal bulunan 251 mental retarde bireyde, multipleks PZR ile FRXA ve FRXE mutasyonlarını dışlamışlardır. Çalışmada ARX mutasyonlarını çalışmak için klinik olarak dışlama kriterleri oluşturularak, 251 bireyin içinde 48 bireyde ARX'in tüm ekzonlarının taranmasını SSCP (single strand conformational polymorphism) yöntemi ile gerçekleştirmişler. Tüm örneklerde c.428_451dup24 mutasyonunu taramışlar ve sadece iki örnekte c.428_451dup24 mutasyonu tespit etmişlerdir (56). Araştırmacılar buldukları mutasyonları DNA dizi analizi ile teyit etmişler. 203 bireyden 29 erkek hastanın ailesinde 2 ve daha fazla hasta erkek olduğundan, ARX geninin 5 ekzonunu DNA dizi analizi ile taramışlar ve nokta mutasyonlar açısından normal bulunmuşlar. Bizim çalışmamıza dâhil edilen tüm olgular, karyotipik anormallikleri ve FRXA'ları FMR1 geni CGG artışları bakımından dışlanırken, proje bütçesinin ve araştırma zamanının kısıtlı olması nedeniyle FRXE bakımından incelenmemişlerdir. Yeni bir çalışma ile dışlanması gerekmektedir. Ayrıca SSCP yöntemi mutasyon taramasında, DNA dizi analizine göre hassasiyeti çok düşük olan bir yöntemdir. Çalışmamızda 10 vakada yaptığımız ekzon-2 dizi analizi sonucunda herhangi bir mutasyona ve polimorfizme rastlanmamıştır.

Poirier ve arkadaşları 2006 yılında X'e bağlı mental retardasyonlu ailelerde ve iki hasta erkek kardeşlerde ARX gen mutasyonlarını taramışlar. XLMR ailelerin %9.5'inde ve hasta erkek kardeşlerin %2.2'inde ARX mutasyonu saptamışlardır. Mutasyonların çoğu hot spot bölge olan ekzon 2'de bulunmuştur. En genel mutasyonun ise c.428-451dup24 mutasyonu olduğu bildirilmiştir (57). Bizim çalışmamızda yapılan aile ağacı analizlerinde, klinik olarak probandlara benzediği düşünülen 15 bireyin olduğu tespit edilmiş, ancak probandlardaki yaygın mutasyonların görülmediği düşüncesiyle kardeşlerin taraması yapılmamıştır. Bu tip aileler klinik olarak iyi karakterize edildiğinde, nokta mutasyonlar açısından ARX geninin tüm ekzonlarının DNA dizi analizi gerçekleştirilebilir.

Partington ve arkadaşları 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada duplikasyon mutasyonu olan c.428-451dup24'ün erkeklerdeki görülme oranının 1:12.000 olduğunu hesaplamışlar. Bu oranın FRAXA'nın oranına göre 1:3 oranında olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu oran FRXA ve ARX arasında klinik bulguların örtüşebileceğini, ancak birebir eşit olmadıklarını göstermektedir. Biz de çalışmamıza bu noktadan hareketle FRXA/MR öntanı ve FMR1 geni 5'-UTR bölgesi CGG tekrarları normal sınırlar içinde olan 125 erkek hasta ARX'in en sık görülen duplikasyon mutasyonlarını çalıştık. Partington ve arkadaşlarının hesapladıkları orana bakıldığında, çalışmamızdaki olgu sayısının az olması nedeniyle bu mutasyonları görememiş olabiliriz. Olgu sayısının artırılması ve ARX geninin tüm ekzonlarının çalışılması, olası mutasyonların tümünü tespit etmek bakımından önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, sporadik mental retardasyonlu olgularda ARX mutasyon oranının düşük olması, ayrıca olgularımızın sayısının az ve büyük çoğunluğunun sporadik olması, mutasyon bulamamamızın temel nedeni olabilir. Çalışmamızın en önemli sonucunun ise çok önemli bir sağlık sorunu olan mental retardasyonun çözümünde, çok iyi standardize

edilen ve Moleküler Genetik Laboratuvarımızda çalışılan FMR1 geni CGG tekrar mutasyonlarının ve ARX geni hot spot bölge mutasyonlarının çalışılması ile olgulara genetik temel bakımından çözümsel yaklaşımın ortaya konulmasıdır. Bizim toplumumuzda daha gerçekçi sonuçlar alınabilmesi bakımından farklı bölgelerde ve daha fazla sayıda olgunun araştırılması ve genetik olarak bir mental retardasyon paneli oluşturularak, klinik öntanı doğrultusunda olguların ilgili mutasyonlar açısından taranması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca sağlıklı bir topluma katkıda bulunmak ve sorunlu ailelere genetik temelli verilerle doğru genetik danışmanlık vermek için, bu iki mutasyon dışında, daha az sıklıkta görülen, genin tüm bölgesindeki insersiyon, duplikasyon, delesyon ve nokta mutasyonların araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Chiurazzi, P., E. Tabolacci, and G. Neri, *X-linked mental retardation (XLMR): from clinical conditions to cloned genes*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2004. **41**(2): p. 117-58.
2. Chiurazzi, P. and B.A. Oostra, *Genetics of mental retardation*. Curr Opin Pediatr, 2000. **12**(6): p. 529-35.
3. Gecz, J. and J. Mulley, *Genes for cognitive function: developments on the X*. Genome Res, 2000. **10**(2): p. 157-63.
4. Hirose, S. and A. Mitsudome, *X-linked mental retardation and epilepsy: pathogenetic significance of ARX mutations*. Brain Dev, 2003. **25**(3): p. 161-5.
5. Chiurazzi, P., et al., *XLMR genes: update 2007*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(4): p. 422-34.
6. Herbst, D.S. and J.R. Miller, *Nonspecific X-linked mental retardation II: the frequency in British Columbia*. Am J Med Genet, 1980. **7**(4): p. 461-9.
7. Turner, G., et al., *Prevalence of fragile X syndrome*. Am J Med Genet, 1996. **64**(1): p. 196-7.
8. Hagerman, R.J., K. Amiri, and A. Cronister, *Fragile X checklist*. Am J Med Genet, 1991. **38**(2-3): p. 283-7.
9. Weisman-Shomer, P., E. Cohen, and M. Fry, *Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)(n) by interspersed d(AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d(CGG)(n) tetrahelical structures*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(7): p. 1535-41.
10. Castellvi-Bel, S., et al., *Single-strand conformation polymorphism analysis in the FMRI gene*. Am J Med Genet, 1999. **84**(3): p. 262-5.
11. Hayes, E.W. and R. Matalon, *Fragile X syndrome*. Pediatrics, 2009. **124**(2): p. 790-2.
12. Stromme, P., et al., *Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 441-5.
13. <http://medicineworld.org/images/blogs/6-2007/fragile-x-12701.gif>.
14. Ohira, R., et al., *Human ARX gene: genomic characterization and expression*. Mol Genet Metab, 2002. **77**(1-2): p. 179-88.
15. Gecz, J., D. Cloosterman, and M. Partington, *ARX: a gene for all seasons*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(3): p. 308-16.
16. Partington, M.W., et al., *X-linked mental retardation with dystonic movements of the hands*. Am J Med Genet, 1988. **30**(1-2): p. 251-62.

17. de Souza Gestinari-Duarte, R., C.B. Santos-Reboucas, and M.M. Pimentel, *Mutational screening of ARX gene in Brazilian males with mental retardation of unknown etiology*. J Hum Genet, 2006. **51**(8): p. 737-40.
18. McKenzie, O., et al., *Aristaless-related homeobox gene, the gene responsible for West syndrome and related disorders, is a Groucho/transducin-like enhancer of split dependent transcriptional repressor*. Neuroscience, 2007. **146**(1): p. 236-47.
19. Biennvenu, T., et al., *ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(8): p. 981-91.
20. Poirier, K., et al., *Screening of ARX in mental retardation families: Consequences for the strategy of molecular diagnosis*. Neurogenetics, 2006. **7**(1): p. 39-46.
21. Gronskov, K., et al., *Screening of the ARX gene in 682 retarded males*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**(9): p. 701-5.
22. Guerrini, R., et al., *Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus*. Neurology, 2007. **69**(5): p. 427-33.
23. Kato, M., et al., *A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome)*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(2): p. 361-6.
24. Shinozaki, Y., et al., *Expansion of the first polyalanine tract of the ARX gene in a boy presenting with generalized dystonia in the absence of infantile spasms*. Brain Dev, 2009. **31**(6): p. 469-72.
25. Wallerstein, R., et al., *Expansion of the ARX spectrum*. Clin Neurol Neurosurg, 2008. **110**(6): p. 631-4.
26. Stepp, M.L., et al., *XLMR in MRX families 29, 32, 33 and 38 results from the dup24 mutation in the ARX (Aristaless related homeobox) gene*. BMC Med Genet, 2005. **6**: p. 16.
27. Frints, S.G., et al., *Re-evaluation of MRX36 family after discovery of an ARX gene mutation reveals mild neurological features of Partington syndrome*. Am J Med Genet, 2002. **112**(4): p. 427-8.
28. Laperuta, C., et al., *MRX87 family with Aristaless X dup24bp mutation and implication for polyAlanine expansions*. BMC Med Genet, 2007. **8**: p. 25.
29. Gestinari-Duarte Rde, S., et al., *ARX mutation c.428-451dup (24bp) in a Brazilian family with X-linked mental retardation*. Eur J Med Genet, 2006. **49**(3): p. 269-75.
30. Troester, M.M., T. Trachtenberg, and V. Narayanan, *A novel mutation of the ARX gene in a male with nonsyndromic mental retardation*. J Child Neurol, 2007. **22**(6): p. 744-8.
31. Collombat, P., et al., *The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas*. Development, 2005. **132**(13): p. 2969-80.
32. Kitamura, K., et al., *Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 359-69.
33. Kato, M., et al., *Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation*. Hum Mutat, 2004. **23**(2): p. 147-59.

34. Uyanik, G., et al., *ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia*. *Neurology*, 2003. **61**(2): p. 232-5.
35. Bhat, S.S., et al., *A novel in-frame deletion in ARX is associated with lissencephaly with absent corpus callosum and hypoplastic genitalia*. *Am J Med Genet A*, 2005. **138**(1): p. 70-2.
36. Collombat, P., et al., *Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(20): p. 2591-603.
37. Collombat, P., et al., *The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells*. *Cell*, 2009. **138**(3): p. 449-62.
38. Friocourt, G., et al., *The role of ARX in cortical development*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(4): p. 869-76.
39. Shoubridge, C., et al., *Mutations in the nuclear localization sequence of the Aristaless related homeobox; sequestration of mutant ARX with IPO13 disrupts normal subcellular distribution of the transcription factor and retards cell division*. *Pathogenetics*, 2010. **3**: p. 1.
40. Hartmann, H., et al., *Agenesis of the corpus callosum, abnormal genitalia and intractable epilepsy due to a novel familial mutation in the Aristaless-related homeobox gene*. *Neuropediatrics*, 2004. **35**(3): p. 157-60.
41. Demos, M.K., et al., *Clinical study of two brothers with a novel 33 bp duplication in the ARX gene*. *Am J Med Genet A*, 2009. **149A**(7): p. 1482-6.
42. Fullston, T., et al., *Ohtahara syndrome in a family with an ARX protein truncation mutation (c.81C>G/p.Y27X)*. *Eur J Hum Genet*, 2009.
43. Poirier, K., et al., *Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. **122**(1): p. 35-46.
44. Colasante, G., et al., *Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons*. *J Neurosci*, 2008. **28**(42): p. 10674-86.
45. Cobos, I., U. Borello, and J.L. Rubenstein, *Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth*. *Neuron*, 2007. **54**(6): p. 873-88.
46. Nasrallah, I.M., J.C. Minarcik, and J.A. Golden, *A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(3): p. 411-6.
47. Sherr, E.H., *The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes*. *Curr Opin Pediatr*, 2003. **15**(6): p. 567-71.
48. Friocourt, G. and J.G. Parnavelas, *Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons*. *Front Cell Neurosci*, 2010. **4**: p. 4.
49. Shoubridge, C., et al., *Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the Aristaless-related homeobox gene*. *Genomics*, 2007. **90**(1): p. 59-71.
50. Ploski, J.E., M.K. Shamsheer, and A. Radu, *Paired-type homeodomain transcription factors are imported into the nucleus by karyopherin 13*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(11): p. 4824-34.

51. Scheffer, I.E., et al., *X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: mutation in the homeobox gene ARX*. *Neurology*, 2002. **59**(3): p. 348-56.
52. Bilgen, T., et al., *Molecular analysis of fragile X syndrome in Antalya Province*. *Indian J Med Sci*, 2005. **59**(4): p. 150-5.
53. Poirier, K., et al., *Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A)*. *Hum Mutat*, 2007. **28**(11): p. 1055-64.
54. Bahi-Buisson, N., et al., *Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with TUBA1A mutations*. *J Med Genet*, 2008. **45**(10): p. 647-53.
55. Keays, D.A., et al., *Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans*. *Cell*, 2007. **128**(1): p. 45-57.
56. Rujirabanjerd, S., et al., *Mutation screening of the Aristaless-related homeobox (ARX) gene in Thai pediatric patients with delayed development: first report from Thailand*. *Eur J Med Genet*, 2007. **50**(5): p. 346-54.
57. Partington, M.W., et al., *Three new families with X-linked mental retardation caused by the 428-451dup(24bp) mutation in ARX*. *Clin Genet*, 2004. **66**(1): p. 39-45.

ÖZGEÇMİŞ

1984'de Bartın'da dünyaya gelen Yunus ARIKAN, ilkokulu Naciye Havva Manavuşak İlkokulu'nda, ortaokulu Avni Çöllü ve Atatürk Orta Okulları'nda tamamlamıştır. Lise eğitimine Antalya lisesinde devam eden Yunus ARIKAN, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Lisans Programı'nı 2007 yılında tamamlayıp aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na Tıbbi Genetik yüksek lisans öğrencisi olarak kabul edilmiştir. 2008 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atanan Yunus ARIKAN halen aynı anabilim dalında eğitim ve öğrenim hayatına devam etmektedir.

EKLER

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Hasta / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın Adı:

Mental Retardasyonlu Bireylerde ARX Gen Mutasyonlarının Araştırılması

b. Araştırmanın İçeriği:

Hem sendromik hem de sendromik olmayan X'e bağlı MR'lerde işe karışan ve FMR1'den sonra daha sık görülen genlerden biri de yeni tanımlanmış ARX (Aristaless related homeobox) genidir . ARX geni homeobox gen ailesine aittir ve Xp22.13 bölgesinde yer almaktadır. Yaklaşık 12.5 Kb uzunluğunda 5 ekzonlu bir gen olup 562 amino asitten oluşan bir proteini kodlar. ARX proteini, DNA bağlama ve C-peptid domainleri ile karakterizedir. Bunlara ek olarak korunmuş bir oktapeptid ve dört polialanin ve 3 nuklear lokalizasyon sinyali bölgesi vardır. ARX ön beyinde ve gelişen merkezi sinir sisteminin katmanlarında eksprese edilir. ARX geninde en sık görülen mutasyonlar ikinci ekzonda bulunan polialanin alanının uzamasına neden olan c.428-451 dup(24bp), 24 baz çiftinin duplikasyonu ve c.333 ins(GCG)7 , baz dizisinin insersiyonu ile karakterize olan iki mutasyondur. FMR1 mutasyonu negatif MR'li bireylerde ARX gen mutasyonlarının araştırılması projenin içeriğini oluşturmaktadır.

c. Araştırmanın Amacı:

ARX geninde en sık görülen bu iki mutasyonun (c.428-451 dup(24bp), 24 baz çiftinin duplikasyonu ve c.333 ins(GCG)7) görülme sıklığı toplam ARX mutasyonlarının yaklaşık %50' sini oluşturmaktadır. FMR1 geni negatif olan bireylerde, MR'den sorumlu olan ikinci gendeki mutasyonların taranarak, MR'li ailelere genetik danışma verilmesini sağlamak ve kalıtsal MR'nin yeni tedavi protokollerine katkıda bulunmaktır.

d. Araştırmanın Niteliği (Klinik, Laboratuvar, Epidemiyolojik - Tez çalışması ise belirtiniz):

Yüksek Lisans Tezi

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi:

1 Yıl

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Gönüllü Sayısı: 125 olgu

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler ve Tedavi:

Frajil X ve MR öntanısı almış, yaşları 1 -19 arasında olan, sitogenetik olarak karyotipi normal ve moleküler genetik olarak FMR1 geni CGG triplet tekrar artışı açısından negatif bulunan 100 erkek hasta retrospektif, çalışma boyunca katılacak 25 erkek hasta prospektif olmak üzere toplam 125 hastadan periferik kandan DNA izolasyonu, ilgili genin iki mutasyonuna özgü bölgelerin PCR amplifikasyonları ve elektroforetik işlemleri gerçekleştirilecektir. Herbir olgunun genotipi belirlenecek ve istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

2. Gönüllünün Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlem ve tedavilerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Hasta için bir riski bulunmamaktadır.

3. Gönüllüler İçin Araştırmadan Beklenen Tıbbi Yarar:

MR'nin gelişimi ve şiddetinde işe karışan ARX genindeki sık görülen değişimlerin ortaya konulması, hastalığın kesin tanısının konulması, aileye prenatal tanı olanağının sunulması, yeni tedavi protokollerinden yararlanmasına temel oluşturması.

Bu araştırmada uygulanan tedavi ile hastalığım kontrol altına alınabilir ya da araştırma sonucunda elde edilen bilgilerle hastalığımın tanısının konulması sağlanabilir. Ayrıca araştırmanın sonuçları başka insanların yararına kullanılabilir.

4. Araştırmaya Seçenek Olan Girişimler ya da Tedaviler Konusunda Bilgilendirilme:

Araştırma laboratuvar koşullarında in vitro deney düzeneğinde yapılacaktır.

Yukarıdaki araştırmada uygulanacak tetkik ve tedaviye yönelik girişimler dışında hastalığımla ilgili başka uygun yöntemlerin var olduğunu, ancak bu araştırmada uygulanmayacağını öğrendim. Eğer yukarıdaki çalışmaya katılmayı kabul etmezsem sözü edilen öteki tedavileri alma hakkına sahip olduğumun bilincindeyim.

5. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda uygulanacak tıbbi tedavi ve işlemler:
Araştırma laboratuvar koşullarında in vitro deney düzeneğinde yapılacağından hastaya herhangi bir zararı bulunmamaktadır.

.....
.....
Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile bir hasta olarak haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Doç Dr. İbrahim KESER Telefon: 2496973

6. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı / hekim tarafından yerine getirileceği, çalışma ilacı ya da uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımıntarafından karşılanacağı bana bildirildi.

7. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı olduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

8. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da almakta olduğum tıbbi bakımın kalitesini yükseltmek amacıyla, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde,.....firması ve yöneticilerine ulaştırılacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, uygulanan yöntemin ya da ilacın kullanımının onaylanması için verilere gereksinimi olan öteki ülkelerin hükümetlerine ve ilgili birimlerine iletilebilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacı- Hekimin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih: