T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

NON SPESİFİK MENTAL RETARDASYON OLGULARINDA FMR1 ETKİLEŞİMLİ SİTOPLAZMİK PROTEİN 1 VE 2 (CYFIP1 VE CYFIP2) GENLERİNİN İNCELENMESİ

ZEYNEP GAMZE GÜVEN

DANIŞMAN
DOÇ.DR. Z.OYA UYGUNER

GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yülsek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

08 / 07 /2008

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum	: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı	: Genetik
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı	: Genetik
Tez Sahibi	: Zeynep Gamze GÜVEN
Tez Başlığı	: Non spesifik mental retardasyon olgularında FMR1 etkileşimli sitoplazmik protein 1 ve 2 (CYFIP1 ve CYFIP2) genlerinin incelenmesi
Sınav Yeri	: İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.
Sınav Tarihi	: 03 / 07 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Seher BAŞARAN (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)
2. Prof. Dr. Adnan YÜKSEL (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)
3. Doç. Dr. Hülya KAYSERİLİ (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)
4. Doç. Dr. Kıvanç ÇEFLE (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı)
5. Doç. Dr. Z. Oya UYGUNER (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) (Tez Danışmanı)

BEYAN

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

Zeynep Gamze GÜVEN



Canım Annem ve Babam'a

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında çalışmalarımı büyük bir titizlikle yakından izleyen, beni yönlendiren, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Zehra Oya Uyguner´ e ,

İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans yapmamı teşvik eden ve olanak sağlayan Prof. Dr. Seher Başaran'a,

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilimsel katkıda bulunan Doç. Dr. Hülya Kayserili ve Dr. Birsen Karaman'a,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Hacer Eriş ve Dr. Abdullah Üzümcü' ye,

Tez çalışmalarım sırasında beni destekleyen İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına ve Dr. Ayça Dilruba Aslanger'e

Her zaman her konuda yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-26/15122006.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Mental Retardasyon Tanımı ve Sıklığı 2
2.2. Mental Retardasyonların Sınıflandırılması 2
2.3. Mental Retardasyonun Etiyolojisi 3
2.3.1 Mental Retardasyonun Oluşumunda Gözlenen Çevresel Etmenler 3
2.3.1.1. Prenatal Evre 3
2.3.1.2. Perinatal Evre 4
2.3.1.3. Postnatal Evre 4
2.3.2. Mental Retardasyonda Genetik Etmenler 4
2.3.2.1. Kromozom Anomalileri: 4
2.3.2.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri 5
2.3.2.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri 5
2.3.2.2. Tek Gen Mutasyonlarına Bağlı Mental Retardasyonlar 6
2.3.2.2.1. Sendromik Mental Retardasyonlar ve Sık Görülen Bazı Örnekler 6
2.3.2.2.1.1. Rubinstein Taybi Sendromu 8
2.3.2.2.1.2. Fenilketonüri 8
2.3.2.2.1.3. Frajil X Sendromu 9
2.3.2.2.2. Non Sendromik Mental Retardasyonlar 12
2.3.2.2.2.1. X e Bağlı Non Sendromik Mental Retardasyonla (MRX) İlişkili Genler 15

2.3.2.2.2.1.1. PAK3……15
2.3.2.2.2.1.2. HUWE1……15
2.3.2.2.2.1.3. PQBP1…….....16
2.3.2.2.2.1.4. ARX……..16
2.3.2.2.2.2. ORNSMR İle İlişkili Genler……17
2.3.2.2.2.2.1. PRSS12…….17
2.3.2.2.2.2.2. CRBN……...18
2.3.2.2.2.2.3. CC2D1A……...19
2.3.2.2.2.2.4. GRIK2……..20
2.3.2.2.2.2.5. TUSC3……..21
2.4. Aday Genler 22
2.4.1. CYFIP1..... 22
2.4.2. CYFIP2..... 23
2.5. Hastalıklarla İlişkili Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler..... 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 27
3.1. Gereç 27
3.1.1. Çalışma Grubu 27
3.2. Yöntem……..27
3.2.1. Genlerin Yapılarının ve Dizilerinin Analizi……..27
3.2.2. Homosigozite Haritalamasında Kullanılan Polimorfik Markörlerin Seçimi….28
3.2.3. Primerlerin Tasarlanması……...28
3.2.4 DNA Eldesi 29
3.2.5 Homozigosite Haritalamasında Kullanılan Polimorfik Markörlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması 29
3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Gümüş Boyama ile Görüntüleme 29
3.2.7. Restriksiyon Enzimi Kesim Yöntemi……30
3.2.8.Dizileme Öncesi Genlerin Ekson Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması30
3.2.9. DNA Dizi Analizi 31
4. BULGULAR..... 37
4.1. CYFIP 1 Geni..... 37
4.2. CYFIP2 Geni..... 37
5. TARTIŞMA…….49

KAYNAKLAR……....55
FORMLAR……..65
ÖZGEÇMİŞ…….70

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: XLMR ile ilişkili haritalanan bölge ve klonlanan gen sayısının gruplara göre dağılımı…….....7

Tablo 2-2: ORNSMR ile ilişkili lokus ve genler…….13

Tablo 2-3: MRX ile ilişkili genler, proteinler ve fonksiyonları…..…….....14

Tablo 3-1: *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin homozigosite haritalamasında kullanılan indelSNP ler ve STR markörler……..35

Tablo 3-2: *CYFIP2* geninin amplifikasyonu için kullanılan ileri-geri primerler……36

Tablo 3-3: MspI enzim kesim analizi……..36

Tablo 4-1: M-88 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişimi ve/veya SNP ler…….46

Tablo 4-2: M-123 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen SNP ler…….47

Tablo 4-3: M-124 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen SNP ler…….48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Normal ve mutant nörotripsin proteininin domain yapısı……..18
Şekil 2-2: GLU_{K6} proteininin yapısı…….…..21
Şekil 2-3: CYFIP1 proteinin yapısı ve transkript varyantları…….23
Şekil 2-4: 15q11-q13 bölgesindeki PWS/AS kırılma noktaları (BP1, 2, 3) ile imprinted ve non imprinted genler……23
Şekil 2-4: CYFIP2 proteinin yapısı ve transkript varyantları…….24
Şekil 3-1: Çalışmaya alınan olgulara ait aile ağaçları…….32
Şekil 4-1: *CYFIP1* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler…….....38
Şekil 4-2: M-51 ailesinin RE kesimi sonrası jelde elde edilen görüntüsü……..41
Şekil 4-3: *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler……..42
Şekil 4-4: M-88 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler……...45
Şekil 4-5: M-88 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizilenmesi sonucu elde edilen heterozigot dizi değişimini gösteren kromatogram……46
Şekil 4-6: M-123 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler…….....47
Şekil 4-7: M-124 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler……...48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aa	amino asit
ADAR	adenosine deaminase acting on RNA
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-metil-4-izoxazolepropionic acid
bç	baz çifti
BGG	büyüme gelişme geriliği
BP	break point
$CD4^+$	cluster of differentiation 4
CGH	comparative genomic hybridization
CK2	kazein kinaz II
CMV	sitomegalovirus
EDTA	etilen diamin tetraasetik asit
FISH	fluoresan in situ hybridization
FMRP	frajil X mental retardasyon proteini
FragX_IP	cytoplasmic fragile X interacting domain
HAT	half a repeat TPR
HECT	homologous to E6 associated protein C terminus
HIE	hipoksik-iskemik ensefelopati
HIV	human immunodeficiency virus
HRBT	high resolution banding technique
HSV-2	herpes simpleks virus tip-2
IQ	intelligent quotient
indel	insertion-deletion
kb	kilobaz
KH	lizin-histidin
KR	kringle domain
LTD	long term depression
LTP	long term potantiation
Mb	megabaz
MCL1	myeloid cell leukemia
mGluR	metabotropik glutamat reseptörü
MLPA	multiplex ligation dependent probe amplification
MR	mental retardasyon
mRNA	messenger RNA
mRNP	ribonükleoprotein kompleksi
MRT	autosomal recessive mental retardasyon
MRX	X e bağlı non sendromik mental retardasyon
NES	nükleer eksport sinyali
NLS	nükleer lokalizasyon sinyali
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NMR	nöromotor retardasyon
NSMR	non sendromik mental retardasyon
ODNSMR	otozomal dominant non sendromik mental retardasyon

ORNSMR	otozomal resesif non sendromik mental retardasyon
PAJ	poliakrilamid jel (19:1)
PAR	pseudoautosomal region
PCR	polymerase chain reaction
PKU	phenyl ketonuria
poli-G	poliguanin
poliQ	poliglutamin
poli-U	poliurasil
PR	prolinden zengin bölge
PROT	proteaz domain
PW/AS	Prader Willi / Angelman sendromu
RE	restriksiyon enzimi
RGG	arginin-glisin-glisin
RISC	RNA induced silencing kompleks
SNP	single nucleotide polymorphism
Spore SSJP	small spore protein J
SRCR	scavenger receptor cysteine-rich
SSS	santral sinir sistemi
STR	short tandem repeat
TBE	tris-borik asit-EDTA
TOM1	target of myb1
TPR	tetratricopeptide repeats
UBA	ubiquitin associated
UIM	ubiquitin interacting motif
WAVE 1	WASP- family verprolin homologous protein 1
WW	triptofan-triptofan
WWE	triptofan-triptofan-glutamik asit
XLMR	X e bağlı mental retardasyon
ZK	zeka katsayısı

ÖZET

Güven, ZG. Non Spesifik Mental Retardasyon Olgularında FMR1 Etkileşimli Sitoplazmik Protein 1 ve 2 (CYFIP 1 ve CYFIP 2) Genlerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.

Dünya nüfusunun yaklaşık %2-3 ünün mental retardasyondan (MR) etkilendiği ve etiyolojisinde genetik ve non-genetik faktörlerin etkin olduğu bildirilmektedir. Bilişsel yetersizliğin tek majör bulgu olduğu MR, non sendromik mental retardasyon (NSMR) olarak adlandırılıp bu olguların yaklaşık %25inde otozomal resesif kalıtım gözlenmektedir (ORNSMR). ORNSMR de bugüne kadar 5 gen tanımlanmış ve 12 bölge haritalanmıştır.

Projemizde, nöron iletişiminde önemli rol oynayan frajil X mental retardasyon proteinine (FMRP) bağlanan *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin ORNSMR tanısı alan 20 olgu ve ailesinde moleküler açıdan incelenmesi amaçlandı.

İlk aşamada, *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerine informatif otozomal resesif bağlantı gösteren olguların homozigosite haritalaması ile belirlenmesi,. ikinci aşamada, belirlenen olgularda genlerin dizileme yöntemi ile incelenmesi planlandı. Haplotiplemede, *CYFIP1* geni için 3 aile non informatif, 2 aile yarı informatif, *CYFIP2* geni için 1 aile non informatif ve 4 aile yarı informatif bulundu. 3 aile, *CYFIP2* genine informatif homozigot bağlantı gösterdi. Bu ailelerin etkilenmiş olgularında *CYFIP2* geni dizilendi. Dizi analizi sonucunda tanımlanmış birçok polimorfizm saptandı. Bir ailede, 32 inci eksonda, translasyona uğramayan bölgede tanımlanmamış heterozigot bir dizi değişimi saptandı (c.*2380 T/G). Yapısal değerlendirmeye göre, bu değişim tek nükleotidlik bir polimorfizm (SNP) olarak değerlendirildi.

Sonuçlarımız, *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin ORNSMR ailelerimizde etkin olmadığını, ancak, yüksek genetik heterojenite nedeniyle, başka MR ailelerinde otozomal resesif ve/veya de novo dominant mutasyonlarla etkin olabileceğinin dışlanamayacağını düşündürdü.

Bundan sonraki aşamada, ailelerimizde FMRP ye bağlanan diğer proteinlerin araştırılmasının, MR nin moleküler etyopatogenezine katkı getireceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : otozomal resesif non sendromik mental retardasyon, homozigosite haritalaması, informatif, haplotipleme.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: Proje No: T-26/15122006.

ABSTRACT

Güven, ZG. Investigation of Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 1 and 2 (CYFIP1 and CYFIP2) Genes in Patients With Non Spesific Mental Retardartion. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Genetics. Master Thesis. İstanbul. 2008.

Mental retardation (MR), affects approximately 2-3% of the general population. Genetic and non-genetic conditions are reported to be effective in its etiology. In non syndromic mental retardation (NSMR) cognitive impairment is the only major finding. Autosomal recessive inheritance of NSMR (ARNSMR) may account for approximately 25% of all patients with NSMR.

In this study, we aimed to investigate the fragile X mental retardation (FMRP) interacting protein *CYFIP1* and *CYFIP2* genes in our 20 ARNSMR families. In the first part, our strategy was to perform homozygosity mapping in order to define the informatively linked homozygous families to these genes. In the second part, we planed to sequence the linked genes. 3 families were found non informative and 2 families were found semi-informative for *CYFIP1*, while 1 family gave non informative, 4 families gave semi informative results for *CYFIP2* gene. 3 families showed informatively homozygous linkage to *CYFIP2* gene. Complete sequencing of *CYFIP2* showed various identified polimorphysims and one unidentified heterozygous variation (c.*2380 T/G) in the untranslated region of exon 32. This is considered to be a single nucleotide polymorphysim (SNP) according to the structural evaluation

Our data showed that, *CYFIP1* and *CYFIP2* genes are not associated in our ARNSMR families. Nevertheless, the association of these genes with autosomal reccesive and/or de novo dominant mutations could not be excluded in MR pathogenesis, due to high genetic heterogeneity.

We think that investigation of other FMRP binding proteins in our families may be important for the enlightment of molecular pathogenesis of MR

Key Words: Autosomal recessive non-syndromic mental retardation, homozygosity mapping, informative

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T–26/15122006.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bilişsel yetersizliğin ön planda olduğu non sendromik mental retardasyon (NSMR) etiyolojisinde otozom ya da X kromozomu üzerindeki gen mutasyonları etkin olabilmektedir. NSMR'lerin yaklaşık %25 inde otozomal resesif kalıtım gözlenmektedir (ORNSMR). Bağlantı analizine yardımcı olacak klinik göstergelerin olmaması ve yüksek genetik heterojenite, ORNSMR ye neden olan genlerin araştırılmasını güçleştirmektedir. Bugüne kadar, ORNSMR ile ilişkili 12 gen bölgesi haritalanmış ve 5 gen tanımlanmıştır. Genetik etiyolojinin aydınlatılabilmesi için, geniş aileler genom boyu bağlantı analizine olanak sağlarken, küçük ailelerde veya izole olgularda aday gen yaklaşımı uygulanabilmektedir. Literatürde, CYFIP1 (15q11) ve CYFIP2 (5q33.3) proteinlerinin sitozolde FMRP ye bağlanarak nöron iletişiminde önemli rol oynadıkları belirtilmektedir.

Bu çalışmada *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin ORNSMR grubumuzda incelenmesi amaçlandı. Proje kapsamında, kromozomal ve subtelomerik anomalilerin dışlandığı, *FMR1* genindeki üçlü tekrar dizilerinin normal bulunduğu NSMR'li olgularda, *CYFIP1* ve *CYFIP2* genleri için informatif homozigot haplotip gösteren bireylerde genlerin dizilenmesi planlandı. İlk aşamada araştırmamızın seçim kriterlerine uyan ve projeye katılmaya onaylarını veren 20 NSMR'li olgu ve ailesinde DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Homozigosite haritalamasında, informatiflik olasılığını arttırabilmek için en az dört markör seçilmesi planlandı. *CYFIP1* geni için 4 indel SNP, *CYFIP2* geni için 4 indel SNP ve 2 STR markörü saptanarak haplotipleme çalışmaları gerçekleştirildi. *CYFIP1* geni için yapılan analizde, 3 aile non informatif bulunurken, diğer informatif ailelerde bölgeye homozigot bağlantı saptanmadı. *CYFIP2* geni için ise 1 aile non informatif bulunurken, informatif ailelerin üçünde homozigotluk saptandı ve *CYFIP2* geninde dizi analizi ile inceleme gerçekleştirildi.

Dizileme çalışmaları sonucunda, bir çok tanımlanmış polimorfizm saptandı ancak herhangi bir mutasyonla karşılaşılmadı. Bu inceleme, özgün seçilmiş ORNSMR popülasyonunda *CYFIP1* ve *CYFIP2* genleri üzerinde yapılmış ilk çalışma olup, bu genlerin bizim ailelerimizde mental retardasyon ile ilişkisi olmadığını gösterdi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mental Retardasyon Tanımı ve Sıklığı

Mental retardasyon (MR), 18 yaşından önce başlaması, zeka katsayısının (IQ) 70 ve altında olması, öz bakım, ev yaşamı, kişilerle iletişim kurma, toplumsal kaynakları kullanma, kendini yönetip yönlendirme, okulla ilgili beceriler kazanma, iş yapma, boş zamanları değerlendirme, sağlık ve güvenlik gibi uyumsal işlevlerden en az ikisinde yetersizlik olma gibi özelliklerle kendini gösteren bir durumdur (1).

Dünya nüfusunun yaklaşık %2 sinin MR den etkilendiği bildirilmektedir (2). Ancak bu oran toplumdan topluma değişebilmektedir. Bunun sebebi MR nin düşük sosyoekonomik seviye ile ilişkili olmasıdır. Erkeklerde dişilere göre daha sıktır. Etiyolojik çalışmalar, en sık karşılaşılan etmenler arasında, kromozom anomalileri ve tek gen mutasyonları gibi genetik oluşumların yanı sıra, prematüre doğum, prenatal enfeksiyon, gebelikte toksik ilaçlara maruz kalma gibi genetik olmayan durumları saymakta ve kaynağının son derece heterojen olduğunu vurgulamaktadır (3).

2.2. Mental Retardasyonların Sınıflandırılması

MR nin derecesi zekâ katsayısı (ZK=IQ=ZB) ile ölçümlenmektedir. Zeka katsayısı için gerekli değerlendirmeler, çocuğun yaşıtlarıyla karşılaştırıldığı ve içinde yaşadığı toplum için standartlaştırılmış testlerle yapılmaktadır. Zeka Katsayısı, (ölçülebilen zeka yaşı / gerçek yaşı) x 100 formülüyle ifade edilmektedir.

MR, IQ skorlamasına göre 4 farklı düzey altında sınıflandırılmaktadır (1,4, kaynak: 3 p.160).

Hafif MR (IQ=70-50) : MR nin yaklaşık %80-85 ini oluşturmaktadır. Bu düzeydeki çocuklarda duysal ve motor bozukluklar azdır. Konuşma becerilerini okul öncesi dönemde kazanırlar. Erişkin yaşta bağımsız yaşayabilme becerilerini elde edebilirler. Sosyal becerileri, iletişimleri ve fonksiyonel akademik yetileri geridir. Uygun bir eğitim ile toplumda normal bir yaşantı sürdürebilirler.

Orta MR (IQ=49-35): MR nin yaklaşık %10 unu oluşturmaktadır. Çoğu konuşma becerisini erken yaşta kazansa da gecikme söz konusudur. Bu çocuklar basit işlerde çalışabilir ve öz bakımlarını yerine getirebilirler. Tanıdıkları alanlarda tek başlarına kaybolmadan dolaşabilirler. Ergenlik dönemlerinde, toplumsal adetleri,

gelenek ve görenekleri öğrenmedeki zorlukları nedeniyle yaşıtlarıyla ilişkileri bozulabilir. Basit düzeyde iletişim becerisi kazanabilirler.

Ağır MR (IQ=34-20): MR lerin yaklaşık %3-4 ünü oluşturmaktadır. Erken çocukluk döneminde konuşma becerilerini kazanamazlar yada çok az kazanırlar. Konuşmayı okul döneminde öğrenebilirler, yürümeleri gecikebilir. Temel bakım konusunda eğitilebilirler. Erişkinlikte emir ve gözlem ile çok basit temel ihtiyaçlarını yerine getirebilirler.

Çok Ağır MR (IQ=25'nin altında): Bu grup %1-2 civarındadır. Tüm alanlarda gerilik vardır. Konjenital anomaliler ve MR ye neden olan nörolojik problemler sık gözlenir. Gözetim altında, her türlü bakımlarının ve öz ihtiyaçlarının başkaları tarafından gerçekleştirilmesi gerekir. Yoğun eğitimle motor gelişim, öz bakım ve iletişim yetileri çok az da olsa arttırılabilir.

2.3. Mental Retardasyonun Etiyolojisi

Mental retardasyonun etmenleri son derece hetorojen olup, genetik ve çevresel faktörler ayrı ayrı ya da bir arada çeşitli boyutlarda etkin olmaktadır. Bu nedenle, çoğu kez, kaynağını tanımlamak çok güçtür.

Günümüzde, ağır MR nin, %60-75 inin etiyolojisi belirlenebilirken, hafif MR de bu oran %38-55 e düşmektedir. Ağır MR nin %25-50 sinden genetik faktörlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (2).

2.3.1 Mental Retardasyonun Oluşumunda Gözlenen Çevresel Etmenler

Mental retardasyon etkilenim zamanına göre; prenatal, perinatal ve postnatal olmak üzere 3 dönemde incelenebilir. Bu dönemler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır (5, kaynak: 3 p.167)

2.3.1.1 Prenatal Evre

Bu dönemde MR ile ilişkilendirilen durumlar maternal enfeksiyonlardır. En sık karşılaşılanları: konjenital rubella, sitomegalovirus (CMV), toksoplasmosis ve insan immun yetersizliği virusü (*Human Immunodeficiency Virus*/HIV)'dür.

Maternal enfeksiyonların yanısıra gebelik süresinde maruz kalınan toksik maddeler de MR ye neden olabilmektedir. Örneğin, gebelikte alkol kullanımı, annede

fenilketonuri (*Phenyl Ketonuria*/ PKU) varlığı, civa ve diğer teratojenlere maruziyet bu grubun içinde sayılan önemli etmenlerdendir.

Ayrıca, hamilelik toksemisi ve plasental yetmezlik de intrauterin büyüme geriliğine, prematür oluşuma ve bu durumlardan kaynaklı MR ye neden olabilmektedir.

2.3.1.2. Perinatal Evre

Bu dönemde MR ye neden olabilecek en önemli etmen santral sinir sistemine (SSS) zarar veren enfeksiyonlardır. Örneğin, Herpes Simpleks Virus Tip-2 (HSV-2) ve bakteriyel enfeksiyonlar bu grup içinde değerlendirilmektedir.

Bunların yanısıra, doğum aşamasına ait sorunlar, örneğin, hipoksik-iskemik ensefelopati (HIE), intraserebral kanama, hiperbilirübinemi ve prematürelik durumları da MR ye neden olabilir.

2.3.1.3. Postnatal Evre

Bu sürede, beyinde hipoksi-asfiksi-iskemi durumu, SSS enfeksiyonları, bebeğin toksik maddelere maruz kalması (kurşun, karbonmonoksit gibi), beyin tümörleri, lösemi, beyin travmaları, psikososyal ve ekonomik problemler, anne veya çocukta psikotik hastalık ve özellikle ilk bir yıl içinde endokrin anomalileri MR ile ilişkilendirilebilen önemli etmenler arasında sayılmaktadır.

2.3.2. Mental Retardasyonda Genetik Etmenler

MR ye yol açan genetik etmenler içinde en iyi tanımlananlar kromozom anomalileridir. Tek gene bağlı olanlar içinde ise moleküler açıdan da en iyi tanımlanmış olan frajik X sendromu en sık görülenidir.

2.3.2.1. Kromozom Anomalileri

Mental retardasyonlu olgularda, kromozom anomali oranları, hasta seçim kriterlerine bağlı olarak, %4-34.1 arasında değişmektedir (6,7). Hau ve ark. (8) tarafından MR li çocuklar için özel eğitim veren okullardaki öğrencilerden oluşturulan 11,892 olguluk bir seride yapılan bir çalışmada bu oranın 15.9 olduğu saptanmıştır. Kromozom anomalileri sayısal ve yapısal olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmektedir.

2.3.2.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

Sayısal kromozom anomalileri, sitogenetik olarak kolay tanınan, klinik açıdan en iyi bilinen ve en sık görülen kromozom anomalileridir. Sayısal kromozom anomalilerinin önemli bir kısmı letal olup, daha çok spontan abortus materyallerinde görülmektedir (örneğin trizomi 16, 22 vd.). Canlı doğumda görülen otozomal trizomiler 21, 18 ve 13 dür. Trizomi 21 (Down Sendromu)'in yeni doğanlarda insidansı 1/600-700 dür. Hastaların %95 inde serbest trizomi, %3-4 ünde 13, 14, 15, 22/21 translokasyonu görülürken, %1-2 sinde mozaisizm izlenir. 6000 canlı doğumda bir görülen trizomi 18 ve 12000 de bir görülen trizomi 13 ise letal olup yaşam süreleri çok kısıtlıdır. Cinsiyet kromozom monozomisi olan 45,X (Turner sendromu)'lerin %99 u intrauterin yaşamda kaybedilmesine rağmen yeni doğanlardaki sıklığı dişilerde 1:4000 dir. Turner sendromunun klinik fenotipi, sitogenetik bulgularının çeşitliliğine (mozaisizm ve yapısal X/Y anomalileri) paralel olarak yüksek heterojenite gösterir (9). Cinsiyet kromozomlarındaki sayısal artışlar fenotipi daha hafif etkilemektedir.

2.3.2.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri

Yapısal kromozom anomalileri, total kromozom sayısı değişmeden, kromozomlar üzerinde, segmental artış (duplikasyon), azalma (delesyon) ya da yer değiştirme (translokasyon ve inversiyon) şeklinde oluşan anomalilerdir. Bu anomalilerin yarısı, genetik bilgide herhangi bir değişikliğe yol açmayan ve fenotipi etkilemeyen "dengeli kromozom anomalileri", diğerleri ise genetik bilgi değişikliğine yol açan ve fenotipi etkileyen "dengesiz kromozom anomalileri"dir. En sık görülen yapısal anomaliler translokasyonlar, inversiyonlar ve >5Mb (Megabaz) delesyonlardır. Dengeli yapısal anomaliler fenotipik olarak etkilenmemiş bireylerde daha sık görülürken klinik olarak etkilenmiş bireylerde delesyonlar daha sıklıkla gözlenmektedir. Kromozomal anomalilerin tanısında genel olarak 450-550 bant seviyesinde klasik sitogenetik incelemeler yapılmaktadır. Bu bant seviyesinde bir inceleme ile 3 Mb'dan büyük anomaliler tespit edilebilmektedir. Bu delesyon sendromları içinde en sık görülenleri 5p ve 4p delesyonlarıdır (10). 3 Mb'dan daha küçük delesyonların tanısı ise klasik yöntemlerle çoğu zaman olanaksızdır. Prometafaz kromozomlarının incelenmesine olanak sağlayan "High Resolution Banding Technique (HRBT)" ve "Fluoresan in Situ Hybridization (FISH)" teknikleri bu anomalilerin tanısında büyük kolaylık sağlamaktadır. Mikrodelesyon sendromları olarak adlandırılan bu sendromlar içinde en

sıklıkla karşılaşılanlar; Williams Sendromu, Prader-Willi/Angelman Sendromu, Di George/Velokardiofasiyal Sendromu, vd. dir. Kromozomların subtelomerik bölgeleri klasik bantlama teknikleri ile özgün olmayan bant kalıpları gösterdiğinden sitogenetik değerlendirilmeleri hemen hemen olanaksızdır. Oysa bu bölgeler işlevsel olarak aktif pek çok gen içermektedir ve anomalileri fenotipin etkilenmesine yol açmaktadır. Subtelomerik bölgelerin izlenmesine yol açan FISH, CGH (Comparative Genomic Hybridization) ve MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) teknikleri uygulamaları sonrasında yeni sendromlar (1p-, 8p-, 13q-) tanımlanmıştır.

Subtelomerik anomalilerin orta ve ağır mental retardasyonlu olguların %7.4 ünden, hafif mental retardasyonlu olguların ise %0.5 inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (10). Tekrar dizilerince zengin subtelomerik bölgelerde rekombinasyon oranının yüksek olması hatalı eşleşme olasılığını yükseltmektedir. Bu da MR olgularında subtelomerik bölge anomalilerine dikkat edilmesi gerekliliğini göstermektedir (11, 12).

Delesyonun büyüklüğüne bağlı olarak aynı sendromun klinik bulguları hastadan hastaya farklılık gösterebilmektedir.Telomerik ve sentromerik kırılma noktalarının farklı hastalarda aynı bölgede yoğunlaşmış olması delesyona yatkınlığa sebep olan dizilerin varlığını düşündürmektedir. Yapılan haritalama çalışmaları, kırılma noktalarının düşük kopyalı tekrar dizilerinde olduğunu ve delesyona, tekrarların yakınında yer alan kopyalar arasındaki anormal rekombinasyonların yol açtığını düşündürmektedir (9).

2.3.2.2. Tek Gen Mutasyonlarına Bağlı Mental Retardasyonlar

Tek bir gende oluşan mutasyonlar, sendromik (MRS) ve non sendromik mental retardasyona (NSMR) yol açarlar.

2.3.2.2.1. Sendromik Mental Retardasyonlar ve Sık Görülen Bazı Örnekler

MRS, MR ye konjenital anomalilerin de eşlik etmesi ile karakterize bir durumdur. Bugüne kadar otozomal dominant, otozomal resesif ve X e bağlı kalıtım şekillerinin görüldüğü 300 den fazla MRS tanımlanmıştır. Belli başlı MRS ler arasında; Rubinstein Taybi Sendromu (OMIM 180849), Frajil X Sendromu (OMIM 300624), Silver Russel Sendromu (OMIM 180860), Rett Sendromu (OMIM 312750), Coffin Lowry Sendromu (OMIM 303600), Fenilketonüri (OMIM 261600), Cornelia De Lange

Sendromu (OMIM 122470, 300590 ve 610759), Lesch-Nyhan Sendromu (OMIM 300322), Norrie Hastalığı (OMIM 310600), Costello Sendromu (OMIM 218040) sayılabilir (13).

X kromozomu üzerindeki genlerin, erkekte haploid yapıda bulunması (major pseudoautosomal region/PAR1 ve minor pseudoautosomal region/PAR2 dışında kalan bölgesi), daha kolay haritalanmasına ve MR ile ilgili genlerinin daha kolay saptanmasına olanak sağlamaktadır. X e bağlı mental retardasyonun (XLMR) en sık görülen etmeni, frajil X sendromu olup, MR erkeklerin 1/4,000–1/5,000 inde, dişilerin ise %2-2.5 inde görülmektedir (14). *MECP2* (DNA da metilenmiş CpG adacıklarına bağlanan 2 geni) genindeki çeşitli nokta mutasyonları da kromatin yapısını değiştirerek erkeklerde letal ancak dişilerde en sık görülen MR etmeni olan Rett Sendromuna yol açmaktadır. Chiurazzi P. ve ark. (15) XLMR olgularını klinik bulgularına göre 3 ana grupta toplamışlardır: (a) sendromik olanlar; multiple konjenital anomaliler ve beyin/beyin dışındaki organ/dokulardaki defektlerin eşlik ettiği durumlar, (b) nöromusküler bozukluklar, (c) non spesifik durumlar (15). Bugüne kadar X kromozomu üzerinde toplam 97 bölge haritalanmış ve 82 gen klonlanmıştır (Tablo 2-1). Tanımlanan genlerin %22 si transkripsiyonel regülasyonda, %19 u sinyal iletim yolaklarında, %15 i membran yapısında bulunurken, %6 sı DNA ve RNA işlenmesi, %3 ü protein sentezi, %7 si hücre siklusunun düzenlenmesinde görev almaktadırlar (15).

Tablo 2-1: XLMR ile ilişkili haritalanan bölge ve klonanan gen sayısının gruplara göre dağılımı – Chiurazzi' (15) den

	Toplam	Haritalan bölge sayısı	Klonlanan gen sayısı
Sendrom	98	31	38
Nöromusküler	51	16	28
Non spesifik	66	50	16
Toplam	**215**	**97**	**82**

2.3.2.2.1.1. Rubinstein Taybi Sendromu

Rubinstein Taybi Sendromu, mental retardasyon, geniş el ve ayak baş parmağı, palpebral fissürlerin aşağı doğru çekik olması, hipoplastik maksilla, belirgin burun ve konjenital kalp hastalığı ile karakterize olup, yeni doğan sıklığı 1/100,000 olarak bildirilmektedir (9). Otozomal dominant olarak kalıtım göstermekte ve genellikle *de novo* mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (16). Rubinstein Taybi Sendromu *CREBBP* (*CREB Binding Protein*) ve *EP300* (*E1A Binding Protein*) genlerindeki heterozigot mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Etkilenmiş bireylerin %40-60 ında, 16p.13.3 da yer alan *CREBBP* mutasyonları görülmktedir. *CREBBP* genindeki mutasyonların çoğu nokta mutasyonu, küçük delesyon-insersiyonlar olmakla birlikte translokasyonlar, inversiyonlar ve büyük delesyonlar da görülebilmektedir (17). Etkilenmiş bireylerin yaklaşık %3 ünde ise 22q13 de lokalize olan *EP300* genindeki mutasyonlar saptanmaktadır (18). Her 2 gen de birbirleriyle yüksek homoloji göstermekte ve birçok sinyal yolağında transkripsiyon ko-aktivatörü olarak görev yapan *histon asetilransferaz* (*HAT*) aktivitesine sahiptirler. (16).

2.3.2.2.1.2. Fenilketonüri

Fenilketonüri, mental retardasyon, hipertoni, hiperrefleksi, idrar ve terde küf kokusu, epileptik nöbet, ve psikotik belirtilerin görüldüğü otozomal resesif geçişli metabolik bir hastalıktır (3). Türk toplumundaki canlı doğum sıklığı 1/2600, taşıyıcılık sıklığı ise 1/26 olarak bildirilmektedir (19). 12q24.1 de lokalize olan fenilalanin hidroksilaz enzimini kodlayan *PAH* genindeki (*Phenylalanine Hydoxylase*/*PAH*) mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu hastalarda, fenilalanin parçalanamadığı için vücut sıvısında birikmektedir. Yüksek fenilalanin düzeyi erken çocukluk döneminde gelişmekte olan beyin dokusuna zarar vermektedir. Bugüne kadar, *PAH* geninde 500 den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların %62 si yanlış anlamlı, %13 ü küçük delesyon, %11 i kırpılma hatası, %6 sı sessiz, %5 i anlamsız ve %2 si insersiyon tipi değişimlere yol açmaktadır (16). Erken tanı konduğu takdirde fenilketonürinin semptomatik tedavisi olanaklıdır. Fenilalanin esansiyal aminoasit (aa) grubundan olup vücuda ancak gıdalarla alınabilmektedir. Tedavisindeki genel ilke, gıda ile alınan fenilalanin miktarını azaltmak ve kandaki fenilalanin düzeyini normal sınırlar içinde tutmaktır. Diyet tedavisi için fenilalaninden fakir özel ve ilaç niteliğindeki mamaların

kullanılması gerekmektedir. Beyin dokusunun en hızlı geliştiği ilk 8–10 yıl boyunca tedaviye devam edilmesi önemlidir.

2.3.2.2.1.3. Frajil X Sendromu

Frajil X sendromu, *FMR1*(*Fragile X Mental Retardation 1*) geninin translasyona uğramayan 5' bölgesinde bulunan -CGG- üçlü tekrar dizilerinin artması sonucunda ortaya çıkan bir dinamik mutasyon hastalığıdır. Popülasyonda normal bireylerde, -CGG- tekrarlarının sayısı oldukça değişkendir. Normal bireylerde tekrar sayısı 6–50 arasında değişir ve -CGG- tekrarlarının arasında -AGG- tekrarları bulunur. Bu durumun, DNA replikasyonunda stabiliteyi koruduğu bildirilmektedir. *FMR1* genindeki 50-200 tekrar sayılı alleller premutasyonlu alleller olarak isimlendirilmektedir. Premutasyonlu alleller mayozda instabildir ve maternal etkide antisipasyon gösterirler. Bu nedenle, maternal kalıtımda tekrar sayıları bir sonraki kuşağa genelde artarak geçiş gösterir. Frajil X sendromunun fenotipi *FMR1* geninde 200 ün üzerinde artış olması ve promoter bölgesindeki CpG adacıklarının metillenmesi sonucu, gen ifadesinin kesilmesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, genin ürünü olan Frajil X Mental Retardasyon Proteini (FMRP) üretilemez. *FMR1* deki 200 ve üzerindeki tekrar dizileri tam (*full*) mutasyon olarak adlandırılmaktadır (20,21).

Xq27.3 bölgesine lokalize olan *FMR1* geni, 1991 yılında klonlanmış ve yaklaşık 38 kb lik bir alana yayılan 17 eksondan oluştuğu ve 632 aa lik FMRP'yi kodladığı saptanmıştır. *FMR1* geninin alternatif kırpılmalar sonucu 6 farklı transkripti olduğu saptanmaktadır (22). Protein yapısında, N terminal bölgesinde nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), bunun arkasında lizin ve histidinden zengin 2 adet KH (KH1 ve KH2) domaini, nükleer eksport sinyali (NES) ve C terminal bölgesinde "arjinin-glisin" residülerinden oluşan -RGG- kutusu bulunmaktadır. Ayrıca protein-protein etkileşimlerinden sorumlu olan 2 adet *coiled coil* domaini bulunmaktadır (23).

Farede yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmaları FMRP nin beyin, testis, ovum, timus, göz ve dalak dokusunda yüksek, kolon, uterus, tiroid bezi ve karaciğerde az oranda ifade edildiğini, kalp, aort ve kas dokusunda ise ifadesinin olmadığını göstermektedir (21). Frajil X sendromunun patofizyolojik mekanizmasının anlaşılabilmesi için FMRP nin fonksiyonunun anlaşılması önemlidir.

FMRP nin hem nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) hem de nükleer eksport sinyali (NES) içermesi bu proteinin nükleus ve sitoplazma arasında gidip geldiğini göstermektedir. FMRP nin C terminal bölgesinde bulunan iki farklı RNA bağlanma motifinin varlığı ise (iki adet KH domaini ve bir adet -RGG- kutusu), bu proteinin RNA ya bağlanma özelliği de taşıdığını göstermektedir (24). Deneysel çalışmalar, FMRP nin translasyondan sonra nükleusa geri dönerek, burada, ribonükleoprotein kompleksi içerisinde, özgün mRNA hedeflerine bağlanarak onları sitoplazmaya taşıdığını göstermektedir (21, 22). Yapılan çalışmalar *in vitro* koşullarda FMRP nin seçici olarak RNA moleküllerinin poli-G ve poli-U kuyruklarına bağlandığını göstermektedir (21, 22). KH domainine sahip olan proteinlerin, tek zincirli RNA oligonükleotidlerine, mRNA lara ve ribosomal RNA lara bağlanabilme özelliklerinin RNA metabolizmasının düzenlenmesinde önemli olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca, -RGG- kutusunu içeren motiflerin de RNA ya bağlanma aktivitesi göstermekle birlikte birçok nükleer ve nükleolar RNA ya da bağlanan proteinlerin yapısında bulunduğu bilinmektedir. İlk olarak RNA ya bağlanmayı sağlayan bölgenin KH domaini olduğu düşünülürken son yapılan çalışmalar özgün mRNA etkileşimlerinden -RGG- kutusunun sorumlu olduğunu göstermektedir. Klinik tablosu frajil X e benzeyen ancak tekrar dizileri normal olan ağır MR li bir olguda, 2 inci KH domaininde yanlış anlamlı *de novo* p.I304N mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonun, FMRP nin doğru katlanmasını engelleyerek, RNA ya bağlanma fonksiyonunu ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (25). FMRP nin bir diğer özelliği de, ilk *coiled coil* domaininin FXR1 (FMRP ilişkili protein1) ve FXR2 (FMRP ilişkili protein2) gibi FMRP benzeri proteinlerin bağlanması ile ilgiliyken, 2 inci domaininin 60S ribozomal RNA ya bağlanmasına aracılık etmesidir. Yeni çalışmalar, FMRP nin ribozomlara mRNA aracılığıyla bağlandığını göstermektedir (23).

FMRP nin büyük bir ribonükleoprotein yapısı (mRNP) içinde, mRNA lar ile birlikte translasyona katılan poliribozomlar ile ilişkide olması, gen ifadesinde post-transkripsiyonel bir kontrol sağladığını düşündürmektedir. Bu nedenle, FMRP nin ifadesinin en yüksek olduğu sinir hücrelerinde, özgün mRNA ların sitozole transportunu, lokalizasyonunu ve translasyonunu kontrol altında tuttuğu görüşü savunulmaktadır (20, 21, 22, 24).

mRNP yapısında, FMRP ile ilişkide bulunan 8 farklı protein tanımlanmıştır. Bu proteinler sırasıyla; nükleolin, YB-1 (Y box- binding protein), FXR1, FXR2, NUFIP1

(FMRP etkileşimli nükleer protein 1), NUCIF1 (Nükleer sitoplazmik FMRP etkileşimli protein 1), CYFIP1 (FMRP etkileşimli sitoplazmik protein 1) ve CYFIP2 (FMRP etkileşimli sitoplazmik protein 2) dir (24).

FXR1 ve 2, FMRP ile yüksek homoloji göstermekte ve aynı fonksiyonel domainleri içermektedir. Bu proteinlerin, erişkin beynindeki ifade düzenleri FMRP ile aynı, iskelet kası ve testiste ise farklıdır. FXR2 ve bazı FXR1 izoformlarının, FMRP den farklı olarak nükleus yerine nükleolusdan sitoplazmaya RNA transportunda rol oynadıkları, aynı komplekste farklı proteinler ile etkileşime girdikleri, farklı RNA ların taşınmasında rol oynadıkları ve bu nedenle örtüşen değil özgün fonksiyonları oldukları bildirilmektedir (26, 27).

NUFIP1, 2 adet *zinc finger* motifi içeren, RNA ya bağlanan bir protein olup, beyindeki ekspresyon düzenleri FMRP ile aynıdır. Genellikle, interkromatin fibrillerle ilişkideki nöronların nükleusunda ve sitoplazmasında lokalize oldukları belirtilmektedir (28). Yüksek oranda homoloji göstermelerine karşın, NUFIP1 ile FXR1 ve FXR2 proteinleri herhangi bir etkileşim içinde değildirler. NUFIP1 in, FMRP nin mRNA ların taşınmasındaki fonksiyonunda rol oynadığı ve bunun dışında nükleus-sitoplazma arasında taşındığı düşünülmektedir (28).

mRNP kompleksinde bulunan diğer proteinlerden nükleolin ve YB-1, RNA ya bağlanma özelliği göstermektedirler, ancak FMRP ile direkt ilişki kurdukları gösterilmemiştir (29, 30).

NUCIF1 proteini için günümüzde saptanmış herhangi bir motif bulunmamakta olup, mRNP kompleksi içinde yer alması ve özgün olarak FMRP ile etkileşmesi dışında başka bir işlevi bilinmemektedir (24).

Frajil X hastaları ve Fmr1 *knock out* farelerin beyinlerinde yapılan incelemelerde dendritik omurga'ların *(spine*) normalden daha uzun, ince ve şekilsiz oldukları dikkat çekmiştir. Bu bulgular, FMRP nin sinaps bölgelerindeki plastisitesinin sağlanması için önemli olan lokal protein sentezini kontrol altında tutarak, gelişim sırasında sinaps oluşumu ve sinaptik aktivitenin sağlanmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Sinaps bölgelerindeki FMRP sentezinin glutamat tarafından uyarılan metabotropik glutamat reseptörlerine (mGluR) bir cevap olarak başladığının

bilinmesinden bu yana, FMRP ninin hipokampustaki uzun süreli baskılanma (*Long Term Depression*/LTD; sinaps iletişimdeki uzun süren baskı) daki rolü araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar, Fmr1 *knock out* farelerinde hipokampal LTD nin normalden daha uzun olduğunu göstermektedir. Bu bulgular FMRP nin LTD ye neden olan proteinlerin translasyonunu baskılayarak ve bazı glutamat reseptörlerinin internalizasyonunu yavaşlatarak LTD yi kontrol ettiğini göstermektedir (25).

Drosophila'nın Fmr1 proteini olan Dfmr1 nin, Argonaute 2 proteini ve RNA *induced silencing* kompleks (RISC)'e bağlanarak, *RNA interferans mediated gene silencing* işlevini gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu bulgular, FMRP nin, RISC aracılığı ile özgün mRNA ların translasyonun baskıladığını göstermektedir (31).

2.3.2.2.2. Non Sendromik Mental Retardasyonlar

Herhangi bir fonksiyonel ve anatomik bozukluğun olmadığı, sadece bilişsel beceri yetersizliğinin bulunduğu durumlar non sendromik/non spesifik MR (NSMR) olarak adlandırılmaktadır. Non sendromik mental retardasyonlu olguların yaklaşık %25 inde otozomal resesif kalıtım gözlenmektedir (ORNSMR). Bağlantı analizine yardımcı olacak klinik göstergelerin olmaması ve genetik heterojenite, ORNSMR ye neden olan genetik etmenlerin araştırılmasını güçleştirmektedir. Bugüne kadar, ORNSMR ile ilişkili 12 gen bölgesi haritalanmış ve 5 gen tanımlanmıştır (32, 33, 34, 91, 92). ORNSMR ile ilişkili genler ve lokuslar Tablo 2-2' de gösterilmiştir (32).

NSMR nin otozomal dominant formunun (ODNSMR) kendi kuşakları ile sınırlı kalması sonucu izole olgular olmaları, büyük dikey ailelerin oluşamamasına ve bu nedenle de sorumlu genlerin aydınlatılmasında güçlüklere yol açmaktadır (32). ODNSMR ile ilişkili olabileceği düşünülen çok sayıda gen, dengeli translokasyon, inversiyon veya duplikasyonlu mental retardasyon olguların kromozom kırık noktalarının belirlenmesiyle tanımlanmıştır. Son yapılan bir çalışmada t(13;21)(q22;q22.1) dengeli translokasyon taşıyıcısı mental retardasyonlu bir erkek olguda, kromozom kırık noktasında bulunan *CLDN14* geninde allelik ekspresyon kaybı olduğu gösterilmiştir (35). Holinski-Feder ve ark. (36) 2000 yılında yayınladıkları makalede, hafif MR, non spesifik dismorfizm ve azalmış penetrans ile belirgin otozomal dominant geçişin görüldüğü bir ailede kriptik subtelomerik translokasyonun, t(3;16)(q29;p13.3), hastalıkla birlikte ayrıldığını göstermiştir.

Tablo 2-2: ORNSMR ile ilişkili lokus ve genler-Vanagaite (32)' den değiştirilerek

Lokus	Pozisyonu	Gen	Mental Retardasyon derecesi
MRT1	4q26	PRSS12	Ağır MR
MRT2A	3p26.3	CRBN	Hafif MR
MRT3	19p13.12	CC2D1A	Ağır MR
MRT4	1p33-p34.3		Hafif MR
MRT5	5p15.2-p15.32		Orta MR-Ağır MR
MRT6	6q16.1-q21	GRIK2	Hafif MR-Ağır MR
MRT7	8p12-p21.1	TUSC3	Orta MR
MRT8	10q21.3-q22.3		Hafif MR-Orta MR
MRT9	14q12-q13.1		Hafif MR
MRT10	16p12.1-q12.1		Orta MR
MRT11	19q13.2-q13.32		Orta MR
MRT12	1p21.1-p13.3		Ağır MR

XLMR her 600 erkekten birini etkilemekte ve bunların da 2/3 nün non sendromik XLMR olduğu düşünülmektedir (MRX) (37). MRX de yeni genlerin tanımlanması için, bağlantı analizi, dengeli kromozom yeniden düzenlenmeleri (X-otozom translokasyonları, mikrodelesyon) üzerindeki genlerin araştırılması ve X kromozomu üzerinde nöron gelişimi ve fonksiyonu ile ilgili genlerde aday gen yaklaşımı ile mutasyon taraması yöntemleri kullanılmaktadır (38). MRX tanımı ilk olarak 1991 yılında Kerr ve ark. (39) tarafından yayınlanan makalede, X e bağlı kalıtımın görüldüğü ve herhangi başka bir bulgunun eşlik etmediği bir erkek olgu için kullanılmıştır. Bugüne kadar MRX ile ilişkili 24 gen tanımlanmıştır (Tablo 2-3). Bu genler fonksiyonlarına göre dört farklı grup altında değerlendirilmektedir; (1) Rho GTPaz siklusu ve dentritik regülasyon, (2) RabGTPazlar ve sinaptik vesikül transportu, (3) gen ekspresyonunun regülasyonu, (4) Orphan mekanizması (40). Bu genler arasında 11 tane genin (*ATRX*, *RPS6KA3*, *FGD1*, *OPHN1*, *MECP2*, *SLC6A8*, *ARX*, *PQBP1*, *JARIDIC*, *NLGN3*, *NLGN4*) hem sendromik hem de non sendromik MR ye yol açması, sendromik ve non sendromik XLMR nin moleküler açıdan düz bir çizgi ile ayrılamayacağını göstermektedir (2).

Tablo 2-3: MRX ile ilişkili genler,proteinler ve fonksiyonları- Renieri (40)' den

Gen	Protein	Protein Fonksiyonu
Rho GTPaz siklusu ve dentritik regülasyon		
OPHN1	OPHN1	RhoA,Rac1 ve cdc42 nin Rho GTPaz aktivatör proteini
PAK 3	PAK 3	serin treonin protein kinaz, Rac1 ve cdc42 nin bağlandığı hedef protein
ARHGEF6	α-Pix	Rac1 ve cdc42 nin guanin nükleotid değişim faktör proteini
TM4SF2	TM4SF2	integrinlerle etkileşen membran proteini
FGD1	FGD1	cdc42 ye bağlanır, GTP-GDP değişimini uyarır
NLGN4	NLGN4	postsinaptik membran proteini, sinaps oluşumunda rol oynar
NLGN3	NLGN3	postsinaptik membran proteini, sinaps oluşumunda rol oynar
Rab GTPazlar ve sinaptik vesikül transportu		
GDI1	α-GDI	Rab proteinlerinin GDP den ayrılma inhibitörü
IL1RAPL1	ILRAPL	bilinmiyor,uyarılmış nörotransmiter eksositozu ile ilişkili olabilir
Gen ekspresyonunun regülasyonu		
RPS6KA3	RSK2	serin treonin protein kinaz
ATRX	XNP	ATP ye bağımlı DNA helikaz
MECP2	MeCP2	Metil CpG bağlayan protein
ARX	ARX	transkripsiyon faktörü
ZNF41	ZNF41	KRAB domain taşıyan zinc finger protein, transkripsiyonel represör ?
FMR2	FMR2P	transkripsiyon faktörü
PQBP1	PQBP-1	poliglutamin bağlayan protein, splizozom bileşenleri ile etkileşiyor,transkripsiyonel represör
FTSJ1	FTSJ1	RNA metiltransferaz
ZNF81	ZNF81	KRAB domain taşıyan zinc finger protein
JARID1C	JARID1C	kromatin remodelling ve trankripsiyonun regülasyonunda görev alır
ZNF674	ZNF674	KRAB domain taşıyan zinc finger protein
Orphan mekanizması		
SLC6A8	SLC6A8	kreatin transporter
AGTR2	AT2	angiotensin 2 reseptörü
ACSL4	ACSL4	uzun zincirli Asetil Co A sentetaz
DLG3	SAP102	NMDA reseptörlerinin NR2 altünitesi ile etkileşen membrana bağlanan guanilat kinaz protein

2.3.2.2.2.1. X e Bağlı Non Sendromik Mental Retardasyonla (MRX) İlişkili Genler

2.3.2.2.2.1.1. PAK3

Xq21.3-q24 de lokalize olan *PAK3* genindeki nokta mutasyonlarının MRX ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (41, 42, 43, 44). *PAK3*, *PAK1* ve *PAK2* nin de içinde bulunduğu p21-*activated kinase* (PAK) ailesine ait bir gendir. Fare dokularında yapılan *Northern* blot analizleri sonucunda Pak 3 ün 3 adet izoformu olduğu saptanmıştır: 2.2-kb lik testise özgü transkript, beyin ve testis de eksprese olan 2.4-kb lik transkript, böbrek ve beyinde eksprese olan 3-kb lik transkript. *PAK3* geni tarafından kodlanan PAK3 proteini GTP ye bağlanan proteinler olan Cdc42 ve RAC'a bağlanmaktadır. Cdc42 ve RAC proteinleri hücre adhezyonu, migrasyonu, dendrit gelişimi ve omurga (*spine*) morfogenezinde rol oynamaktadır. Bu nedenle PAK3 proteininin dendrit gelişiminde ve dendritik spine'lardaki sito-iskelet re-organizasyonu için gerekli olabileceği düşünülmektedir (13).

2.3.2.2.2.1.2. HUWE1

Xp11.2 bölgesinde yer alan HECT, UBA ve WWE *domain containing 1* (*HUWE1*) geninin kodladığı 4,374 aa lik E3 *ubiquitin* ligaz proteini (HUWE1), hedef proteinlerin ubiquitinasyonu ve proteosomal yıkımında görev almaktadır. Bu yolakta, MCL1 (*Myeloid Cell Leukemia*) proteinin degredasyonu ve poli-ubiquitinasyonunu katalize ederek apoptosisi düzenlemektedir. Ayrıca p53 tümör supresörünü ve H1, H2A, H2B, H3, H4 temel histonlarını da ubiquitinize etmektedir (45). Beyin, kalp, plasenta gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır. Hipokampusta fazla miktarda eksprese olduğu saptanmıştır (46). Nükleusta lokalizasyon göstermekle birlikte, bazı kanserleşmiş kolorektal hücrelerde perinüklear ve sitoplazmik lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir (45). 3 adet izoformu (Q7Z6Z7-1, Q7Z6Z7-2, Q7Z6Z7-3) bulunmaktadır (45). HUWE1 proteini, N terminalinde TOM1 (*target of myb1*) domaini ardından sırayla UBA (*ubiquitin associated*) domain, UIM (*ubiquitin interacting* motif), WWE domain ve C terminalde HECT (Homologous to E6 associated protein C terminus) domain ile karakterizedir (13). HECT domaini, E3 ubiquitin ligaz proteinlerinde bulmakta ve ubiquitinizasyon sırasında ubiquitinin hedef proteinlere transferinde görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda, HUWE 1 proteininin kolorektal kanserlerdeki onkogenez ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kolorektal kanserlerde, *HUWE1* ekspresyonunun artması sonucu p53 ün ubiquitinizayonu artmakta ve buna bağlı olarak da degredasyonu

hızlanmaktadır. Bu durumun p53 seviyesinde azalmaya neden olmasıyla birlikte sinir sisteminde gelişimsel anomalilere yol açabileceği düşünülmektedir (47). Son yapılan bir çalışmada, *HUWE1* geninin de bulunduğu Xp11.22 bölgesindeki mikroduplikasyonun XLMR ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bölgeye bağlantı gösteren 6 farklı XLMR ailesinin etkilenmiş bireylerinde, *HUWE1* geninin duplike olduğu ve ekspresyonunun normale göre 2-5 kat arttığı belirlenmiş olup 3 ailede 3 farklı yanlış anlamlı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların *HUWE1* in hayvan ortologları arasında oldukça korunmuş olan arginin residülerini değiştirdiği belirlenmiştir (46).

2.3.2.2.2.1.3. PQBP1

Xp11.23 bölgesinde bulunan *polyglutamine binding* protein 1 (*PQBP1*) geni hem sendromik hem de non sendromik mental retardasyondan sorumlu tutulmaktadır. 6 eksondan oluşan *PQBP1* geninin kodladığı PQBP1 proteini 265 aa dan oluşan bir RNA ya bağlanma proteindir. PQBP1 beyine spesifik transkripsiyon faktörü olan Brn-2 nin poliglutamin (poliQ) dizisine bağlanmaktadır. Ayrıca, PQBP1 in artmış poliQ dizilerine yüksek afinite ile bağlandığı da ifade edilmektedir. PQBP1'in N-terminalinde triptofan, tirozin, prolin rezidülerinin bulunduğu WW domaini, orta bölgede özgün asidik ve bazik rezidülerin beş kez tekrarı ile oluşan hepta aa oluşumlu bir motifi, di-aa tekrarlarından oluşan DR/ER motifi, nükleer lokalizasyon sinyali ve son olarak C terminal bölgesinde C_2 domaini ile karakterizedir (13). Hepta ve di aa tekrarları poliglutamin dizileriyle etkileşim için gerekirken, WW domaini, transkripsiyon faktörlerinin prolinden zengin motiflerine bağlanarak transkripsiyonu düzenlemekte, C_2 domaini ise Ca^{+2} bağımlı fosfolipid sinyalizsyonunda görev almaktadır. *PQBP1* beyinde; hipokampus, serebellar korteks ve görme sinirinde fazla miktarda eksprese olmaktadır. *PQBP1* genindeki mutasyonlar; Renpenning Sendromu, Golabi-Ito-Hall Sendromu ve non sendromik mental retardasyona neden olmaktadır (48).

2.3.2.2.2.1.4. ARX

Aristaless Related Homeobox (*ARX*) geni Xp22.13 bölgesinde yerleşik olup yapısında 60 aa lık *homeobox* olarak isimlendirilen bir diziye sahiptir. *ARX* geninin 5 ekzonu bulunmaktadır. İnsanlarda fetal ve erişkin beyin hücrelerinde, iskelet kasında eksprese olmaktadır. Çizgili kas hücrelerinde daha kısa iki izoformunun eksprese olduğu saptanmıştır. Merkezi ve periferik sinir sisteminin gelişmesi için önemli olduğu,

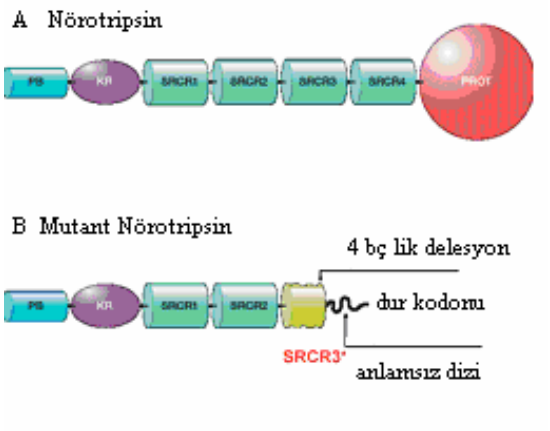
aksonal migrasyonda rol oynadığı ve GABA*ergic* nöron değişiminde rolü olduğu ifade edilmektedir. ARX proteini DNA ya bağlanan bir transkripsiyon faktörü olup C terminalinde aristaless ve N terminalinde prd-benzeri (*paired like*) *homeobox* domainlerine sahiptir. *ARX* genindeki mutasyonlar farklı fenotiplere yol açabilmektedir. Bunlar, MRX, West Sendromu, Partington Hastalığı, kuşkulu genitalyaya eşlik eden X e bağlı lisensefali/korpus kallosum agenezi (XLAG), hidranensefali ve otizm dir. *ARX* mutasyonlarının fenotipe etkisi, mutasyonun tipine ve gen içindeki pozisyonuna göre değişmektedir. *ARX* geni mutasyon sıklığı, XLMR ailelerinde yaklaşık %9,5, yalnızca etkilenmiş iki erkek kardeşin bulunduğu ailelerde ise %2,2 olarak bildirilmektedir (49). Bu veriler XLMR de, *ARX* in FMR1 geni mutasyonlarından sonra ikinci sırayı aldığını göstermektedir. *Homeobox* domaininin korunmuş rezidülerindeki yanlış anlamlı ve erken dur kodonu mutasyonları genelde XLAG ile ilişkilendirilirken, genin diğer bölgelerindeki yanlış anlamlı mutasyonlar ve ekson 2 de bulunan -GCG- tekrarlarındaki artışlar genellikle, West, Partington Sendromu ve MRX ile ilişkili bulunmaktadır. *ARX* deki -GCG- tekrarlarındaki artışın proteinin agregasyonuna neden olduğu ve lokalizasyonunun değişmesine yol açtığı belirtilmektedir. En sık gözlenen mutasyon ekson 2 deki 24 bç lik duplikasyondur (50, 51).

2.3.2.2.2.2. ORNSMR İle İlişkili Genler

2.3.2.2.2.2.1. PRSS12

ORNSMR ile ilişkili tanımlanan ilk gen olan *PRSS12*, 4q25-q26 da lokalize olup (MRT1) multidomain tripsin benzeri serin proteaz nörotripsini kodlamaktadır. Molinari ve ark. (52) 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, 1° kuzen evliliği yapan ve 4 ekilenmiş çocuğu bulunan Cezayirli bir ailede *PRSS12* mutasyonunun hastalıkla birlikte ayrıldığı gözlenmiştir. Bu ailenin etkilenmiş 4 çocuğunun da bilişsel fonksiyonlarında bozukluk ve IQ nun 50 nin altında olduğu gözlenmiştir. Nörotripsinin beyin, plasenta, özafagus, uterus, kemik, pankreas, testis, akciğer, ağız, kas, embryonik doku ve göz de eksprese olduğu belirlenmiştir (13). *PRSS12* beyin gelişiminin 44 üncü gününden 15 inci haftasına kadar eksprese olmakta, presinaptik uçlarda lokalize olup beynin hafıza ve öğrenme ile ilişkili bölgelerinde ifadesinin yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir. *PRSS12* mutasyonuna sahip etkilenmiş bireylerde, bulguların 2 yaşından sonra ortaya çıkması, nörotripsinin sinaps oluşumunda değil de beyin gelişiminin ileriki evrelerinde sinaps re-organizasyonu ve sinaptik plastisite gibi adaptif sinaptik fonksiyonların

sağlanmasında görev aldığını düşündürmektedir (52, 53). İnsan PRSS12 proteininin, N terminalinde prolinden zengin bölge (PR), kringle domaini (KR), ardından dört adet *scavenger receptor cysteine-rich* (SRCR) domain ve son olarak C-terminal serin proteaz domaini (PROT) bulunmaktadır (53) (Şekil 2-1). Kringle domainleri bağlanma işlevine ortam hazırlayan yapılar (*binding mediator*) olarak tanınmakta ve proteolitik aktivitenin sağlanmasında rol oynamaktadırlar (54). SRCR domaini daha çok hücre dışı reseptörlerin yapısında bulunmakta ve protein-protein etkileşimlerinde rol oynamaktadır (55). Serin proteaz domainleri katalitik aktivite için gereklidir. 13 eksondan oluşan *PRSS12* geninin 7 inci eksonunda oluşan 4 bç lik bir delesyon, 4. SRCR domain ve serin proteaz domainden yoksun bir protein oluşturmaktadır (53)



Şekil 2-1 : (A) Normal nörotripsin proteininin domain yapısı (B) Mutant nörotripsin-Molinari (53)' den

2.3.2.2.2.2.2. CRBN

Higgins ve ark. (56) sundukları bir yayında *CRBN* geninin NSMR ile olan ilişkisini belirtmiştir. Bu makalede, daha önce 3pter-p25 bölgesine (MRT2) bağlantı gösteren, akraba evliliği yapmış geniş bir Alman kökenli Amerikan ailesinde, NSMR ye neden olan CRBN gen mutasyonu ilk kez açıklanmıştır (56, 57). Etkilenmiş bireylerin IQ ları 50-70 arasında değişirken erkeklerin IQ skorlarının kadınlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (56, 58). Bağlantılı bölgede saptanan *CRBN* geni cereblon proteinini kodlamaktadır. Cereblon proteini, kan, kemik, kemik iliği, beyin, kulak, bağ dokusu, testis, karaciğer, akciğer de eksprese olmaktadır (13). CRBN nin 2 adet

izoformu (Q96SW2-1 ve Q96SW2-2) bulunmaktadır. Q96SW2-1, 442 aa dan oluşurken Q96SW2-2, 441 aa dan oluşmakta ve bu formda 23 üncü. rezidü yer almamaktadır (45). Cereblon proteini, 1 adet ATP ye bağımlı Lon proteaz domaini ve çok sayıda fosforilasyon bölgesi içermektedir. ATP ye bağımlı Lon proteaz lar hücrede kısa ömürlü regülatör proteinler ile hatalı proteinleri degrede etmektedirler (58). Cereblon proteinin ATP bağlayan domaini ile katalitik domaininin bulunmaması proteaz aktivitesine sahip olmadığını düşündürmektedir (45). Cereblon geninin 11 inci eksonunda oluşan anlamsız mutasyon, erken dur kodonu oluşturmaktadır. Bu mutasyon sonucu proteinin *N-myristoylation* bölgesi hasar görmekte ve C terminal bölgede yer alan *kazein kinaz II (CK2) fosforilasyon* bölgesi yok olmaktadır. CK2 nin uzun süreli potensiyasyon sırasında aktive olduğu bilindiğinden bu bölgenin yok olmasının hücresel trafiğin yanlış yönlenmesine yol açabileceği ve hipokampusta uzun süreli potensiyasyonu etkileyebileceği ileri sürülmektedir. Lon içeren proteazların mitokondride lokalize olup -GT- den zengin DNA dizilerine bağlanarak mitokondriyel replikasyon ve transkripsiyonu düzenlediği göz önüne alındığında *CRBN* genindeki mutasyonun mitokondriyel enerji metabolizmasının nükleer regülasyonunu bozduğu, hafıza ve öğrenme güçlüğüne neden olabileceğini düşündürmektedir (56, 59).

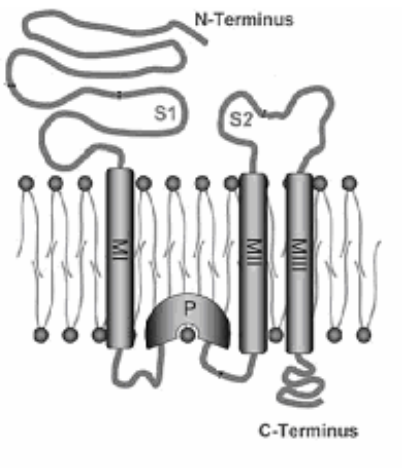
2.3.2.2.2.2.3. CC2D1A

Ağır MR ye yol açan ve 19p13.12de lokalize olan *CC2D1A* geninin (*coiled-coil and C2 containing domain 2 A*) kodladığı CC2D1A proteini 1 adet C2 domaini ve dört adet DM14 domainlerini içermektedir (13). Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlanmasında görev yapan proteinlerde bulunan C2 domaini, C terminal bölgede yer almaktadır. DM14, CC2D1A ya özgün bir domain olup henüz fonksiyonu bilinmemektedir. *CC2D1A,* beyin, plasenta, deri, prostat, larinks, kemik iliği, böbrek, embriyonik doku, kan, testis, over, pankreas, kas; ağız; göz; uterus, karaciğer gibi birçok dokuda eksprese olmaktadır (13). CC2D1A nın 3 tane izoformu (Q6P1N0-1, Q6P1N0-2, Q6P1N0-3) vardır. Q6P1N0-1 951 aa dan ve Q6P1N0-2 950 aa dan oluşmaktadır. İki no lu izoformda 819 uncu rezidü yer almamaktadır. Q6P1N0-3 ise 467 aa lık kısa bir formdur ve bu formda 1-150 ve 618-951 arasındaki rezidüler bulunmamaktadır (45). Kısa izoformunda 14, 15 ve 16 ıncı eksonlar ve DM14 domaini bulunmazken uzun izoformları her iki domaine de sahiptir. *CC2D1A* mutasyonlarının NSMR ile ilişkisi, Vanagaite ve ark (60) tarafından yayınlanan bir makalede Arap-İsrail kökeninden

geldiği belirtilen dokuz ailede tanımlanmış ve tüm etkilenmişlerin (15 olgu) 1° kuzen evlilik ürünü olduğu belirtilmiştir. Ailelerin etkilenmiş bireylerinde aynı mutasyon saptanmış ve bunun genin C2 ve DM14 domainlerini içeren (ekzon 14, 15, 16) homozigot bir delesyon olduğu bildirilmiştir (60). CC2D1A proteininin farede bulunan Freud–1 proteini ile yüksek homoloji gösterdiği saptanmıştır. Freud–1 proteini *5-HT1A* nın reseptör elementi olarak tanımlanmaktadır. *CC2D1A* geninin mutasyonu sonucu *5-HT1A* nın ekspresyonunun artması beklenmektedir. 5-HT1A reseptörlerinin hipokampusta dendrit gelişiminde önemli rol oynadığı ve 5-HT1A reseptörlerinin aktivasyonunun öğrenme ve hafızada bozulmalara yol açtığı belirtilmektedir (60).

2.3.2.2.2.2.4. GRIK2

Motazacker ve ark. (61) yaptıkları bir çalışmada ORNSMR ile ilişkili bulunan 6q16.1-q21 bölgesinde yer alan *GRIK2* genini tanımlayarak, GLU_{K6} (*glutamate receptor-6 kainate-preferring*) proteinini kodladığını belirtmişlerdir. GLU_{K6} beyin, plasenta, böbrek, karaciğer, kulak, deri, göz, kas, kemik dokularında eksprese olmaktadır. GLU_{K6} nın 5 adet izoformu (Q13002-1, Q13002-2**,** Q13002-3 **,** Q13002-4, Q13002-5) bulunmaktadır (45). GLU_{K6}, proteininde hücre dışı N terminal domaini, iki adet ligand bağlayıcı domain (S1 ve S2), 3 adet transmembran domain ve 1 adet *pore loop* bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2-2). N terminal domaini, S1 ve S2 domainleri, nörotransmitterleri bağlarken *pore loop,* kanal oluşumu ve iyon seçiminde rol oynamaktadır (45). GLU_{K6} kainat reseptörlerinin alt ünitesidir. Kâinat reseptörleri, AMPA ve NMDA reseptörlerinin de bulunduğu iyonotropik glutamat reseptörleri grubuna girmektedir. Kainate reseptörleri hipokampustaki yosunsu lif aksonlarının uyarılabilirliğini değiştirerek sinapslarındaki uzun-süreli potansiyasyonu (*Long Term Potantiation*/LTP) indüklemede rol oynamaktadır (61). *GRIK2* geninde, 7 ve 8 inci eksonların delesyonu, 9, 10 ve 11 inci eksonları kapsayan yaklaşık 80 kb lik inversiyon mutasyonu –ki bu durum 11 inci eksonun yaklaşık 20 kb lik bir bölümünde de delesyona yol açar- saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, bu mutasyonun, birinci ligand bağlayıcı domainin (S1), komşu transmembran domainin ve *pore loop*'un delesyonuna yol açtığını göstermiş ve proteinin fonksiyonunun tamamen ortadan kalktığını öngörmüştür (61).



Şekil 2-2: GLU_{K6} proteininin yapısı- Motazacker (61)' den

2.3.2.2.2.2.5. TUSC3

ORNSMR ile ilişkili son gen *TUSC3 (Tumor suppressor Candidate3)*, 8p22 bölgesinde yer almakta ve endoplazmik retikulum membranına bağlı olarak bulunan oligosakkariltransferaz kompleksinin proteinlere oligosakkarit zinciri ekleyen alt ünitesini kodlamaktadır (92). *TUSC3* geni, prostat, akciğer, karaciğer, kolon ve birçok epitel kökenli tümor hücresinde eksprese olmaktadır (13). Dört tane transmembran domainine sahip TUSC3 proteininin 2 adet izoformu (Q13454-1, Q13454-2) bulunmaktadır (45).

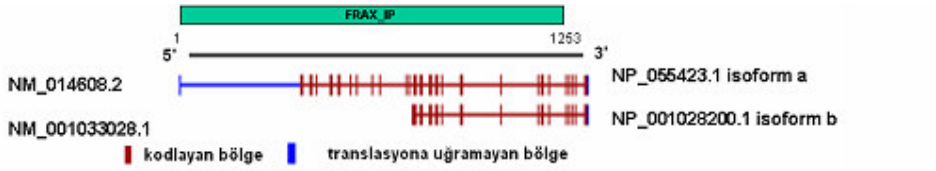
Garshasbi ve ark. (91), akraba evliliği yapmış 7 NSMR li bireyin bulunduğu geniş bir İranlı ailede 8p22 bölgesinde *TUSC3* geninin ilk eksonunu da kapsayan 120-150 kb lik homozigot bir delesyon saptamışlardır. Daha sonra Molinari ve ark. (92), Fransız bir ailede 1° kuzen evlilik ürünü olan 2 ağır NSMR li kardeşte *TUSC3* geninde erken dur kodonu oluşumuna neden olan 1bç lik homozigot bir delesyonun varlığını saptamışlardır. Ayrıca *TUSC3* geninin metastatik prostat kanserlerinde delesyon görülen bölgede yer aldığı gösterilmişir (93).

2.4. Aday Genler

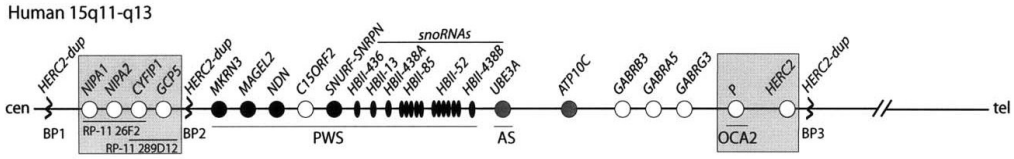
2.4.1. CYFIP1

15q11 de lokalize olan *CYFIP1* (*Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1*) geni 1994 yılında Nomura ve ark. (62) tarafından klonlanmıştır. İlk olarak, KIAA0068 ismi ile anılan bu proteinin, Northern blot analizleri sonucunda beyin, kan, deri, kolon, göz, kalp, iskelet kası, testis, plasenta, deri, böbrek gibi pek çok dokuda eksprese olduğu en fazla ekspresyonunun akciğer, over, prostat, dalak ve böbrekde gerçekleştiği gösterilmiştir (62). Schenck ve ark. (64) 2001 yılında *FMR1* geninin kodladığı FMRP ile etkileşen proteinleri tanımlamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada KIAA0068 i ilk kez karakterize ederek *CYFIP1* olarak isimlendirmişlerdir.. *CYFIP1* geni 1253 amino asitlik bir protein kodlamakta olup, yüksek oranda korunmuştur. Gen boyutu 111.4 kb olan *CYFIP1* geni, 31 eksondan oluşmakta ve 5' ucunda çok sayıda CpG adacığı bulunmaktadır (63). CYFIP1 in 3 adet (Q7L576-1, Q7L576-2, Q7L576-3) izoformu bulunmaktadır. Q7L576-2 de ekson 1-13 ün kodladığı 1-431 inci rezidüleri içermezken, Q7L576-3 de ekson 1-22 nin kodladığı 1-806 ıncı rezidüler bulunmamaktadır. İzoform Q7L576-1, Q7L576-2, Q7L576-3 sırasıyla 1253, 822, 447 aa den oluşmaktadır (45). CYFIP1 in yapısında, FMRP ile etkileşim gösteren FragX_IP motifi bulunmaktadır (Şekil 2–3). FMRP nin CYFIP1 ile etkileşime katılan 7 inci eksonu aynı zamanda FXR ailesinin hetero-homomerizasyonundan sorumlu olan bölgesidir (64). CYFIP1 proteinin, mRNP partikülünde sadece FMRP ile etkileştiği ve sitoplazmada genellikle FMRP ve ribozomlarla birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir. 1994 yılında Kobayashi ve ark. (65) tarafından yapılan bir çalışmada CYFIP1 in Rac 1 GTPase ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Rac 1, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan Rho-GTPase ailesinin bir üyesidir. Rho-GTPase'lar aktin hücre iskeletinin kontrolü yoluyla dendrit olgunlaşması ve korunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Frajil X hastalarının nöronlarında normalden daha uzun, ince ve çok sayıda anormal dendritik omurganın (*spine*) oluştuğu gösterilmiştir. Schaeffer ve ark. (22, 64), CYFIP1 in FMRP ile ilişkili olduğu görüşüyle öne sürdükleri bir hipotezde; frajil X hastalarında FMRP yokluğunun ortamda CYFIP1 artışına neden olduğuna; bu artışın aktin polimerizasyonunu ve dolayısıyla dentritik omurga olgunlaşmasını etkilediğini belirtmişlerdir. CYFIP1 geni, PW/AS kritik bölgesi ile sentromer arasında yer almaktadır (Şekil 2-4). PW/AS ye yol açan delesyonlar için bugüne kadar kırık noktaları birbirinden farklı 2 tip delesyon tanımlanmıştır (BP1-BP3 ve BP2-BP3). BP3 tüm delesyonlarda ortak kırık noktadır

(Şekil 2-4). BP1 ve BP3 kırık noktaları arasındaki delesyonlar *CYFIP1* geninin de delesyona uğramasına yani haplo yetersizliğe yol açmaktadırlar. Kültür edilmiş lenfoblastlarda ve beyin dokusunda yapılan imprinting analizlerinde *CYFIP1*'in bi-allelik olarak eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *CYFIP1* in de delesyona uğradığı PW/AS olgularında, fenotipin temel sorumlusu olmasa da, haployetersizliğinin, fenotipin daha ağırlaşmasına yol açabileceği ileri sürülmektedir (66).



Şekil 2-3: CYFIP1 proteinin yapısı ve transkript varyantları- (90)'dan



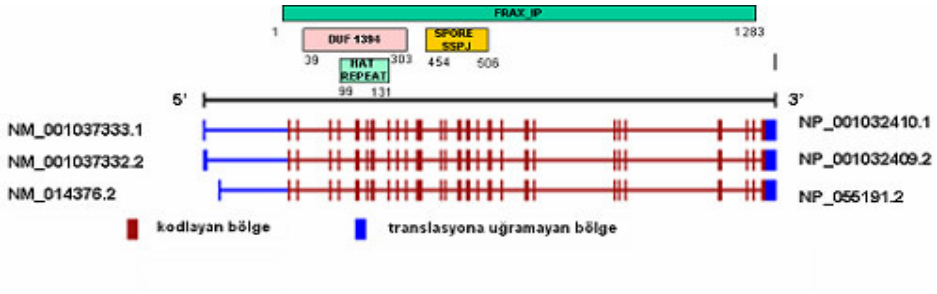
Şekil 2-4: 15q11-q13 bölgesindeki PWS/AS kırılma noktaları (BP1,2,3) ile imprinted ve non imprinted genler- Chai (63)' den

Siyah daireler imprinted genleri, beyaz daireler non imprinted uğramayan genleri gösterir.

2.4.2. CYFIP2

CYFIP2 (*Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*) geni, *CYFIP1* geni ile aynı protein ailesine (CYFIP) ait olup amino asit dizisi % 88 oranında benzeşmektedir. Saller ve ark (67), yaptıkları bir çalışmada CYFIP2 yi, p53 e bağlı apoptosisi indüklediği için PIR121 (p53-inducible protein 121) olarak adlandırmışlardır. Daha sonra, Schenck ve ark (64) tarafından yapılan bir başka araştırmada, PIR121 in CYFIP1 ile birlikte FMRP ye bağlandığı gösterilmiş ve bu gen *CYFIP2* olarak isimlendirilmiştir. CYFIP2, CYFIP1 den farklı olarak FMR Proteini dışında FXR ailesinin diğer üyeleri olan FXR1 ve FXR2 ile de etkileşime girmektedir. *CYFIP2* , beyin, kan, deri, göz, kalp, iskelet kası, testis, plasenta, deri, böbrek gibi çok sayıda dokuda eksprese olmaktadır. CYFIP2 sitoplazmada CYFIP1 ile birlikte lokalizasyon göstermekte ve perinüklear bölgede yüksek miktarda sentez edilmektedir. CYFIP2 nin 2 adet izoformu (Q96F07-1 ve

Q96F07-2) vardır. Q96F07-1 1278 aa dan, Q96F07-2, 1253 aa dan oluşmakta ve bu ikinci izoformunda ekson 16 nın kodladığı 558-582 inci rezidüler bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, beyinde post-transkripsiyonel ADAR editing (*adenosine deaminase acting on RNA*) mekanizmasına maruz kalarak, 320 inci pozisyonda lisini (K) kodlayan kodonun glutamine (E) dönüştüğü bildirilmiştir (45, 68). CYFIP2 nin yapısında 4 adet protein motifi bulunmaktadır: FragX_IP, DUF 1394, HAT *repeat* (*half a repeat TPR*) ve *Spore* SSJP (Şekil 2-4). DUF1394, yaklaşık 320 rezidüden oluşan ve fonksiyonu henüz bilinmeyen bir motiftir (69). HAT *repeat*, belli aralıklı 3 aromatik rezidü ile karakterize edilen tekrar düzenine sahip bir motifdir. Tekrarlar TPR (*tetratricopeptide repeats*) ye benzese de, bu tekrar dizilerinde korunmuş olan alanin ve glisin residülerini taşımamamaktadır. HAT tekrarları taşıyan proteinler, RNA işlenmesinde görev alan makromolekül komplekslerinin bileşenleridir. Bu tekrarların protein-protein etkileşiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (69, 70). *Spore* SSPJ motifi 1052-1093 rezidüleri arasında yer almaktadır. Bu motif, *bacillus subtilis* de karakterize edilen küçük, asitte çözünebilen proteinleri içermektedir (69, 71). CYFIP2 nin aktin polimerizasyonunda görevli WAVE 1 proteinin baskılanmasına karışan komplekste yer aldığı gösterilmiştir (72). Ayrıca CYFIP2 nin multiple sklerozlu hastaların $CD4^+$ T lenfositlerinde yaklaşık 4 kat fazla miktarda bulundukları gösterilmiş ve bu durumun T hücrelerinin adhezyonunu arttırdığı bildirilmiştir (73).



Şekil 2-4: CYFIP2 proteinin yapısı ve transkript varyantları- (90)'dan

2.5. Hastalıklarla İlişkili Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Hastalığa neden olan genlerin tanımlanması için, genom boyu bağlantı analizi ve/veya aday gen yaklaşım modeli uygulanmaktadır. Genom boyu bağlantı analizi için, genelde, ailede birden fazla kuşakta ya da branşta, en az 3-4 etkilenmiş bireyin olması koşulu aranmaktadır. Bu özellik, istatistiksel analizin gücünü arttırmaktadır. Aday gen yaklaşımı ise, pozisyona bağımlı ya da bağımsız olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu strateji küçük aileler için (tek kuşakta 1-2 etkilenmiş birey) uygun bir yöntemdir. Pozisyona bağımsız aday gen yaklaşımı, hastalığın ve/veya aday genin kromozomal lokusu bilinmeksizin, hastalığın protein ürünü, fonksiyonu ve biyokimyasal yolakları üzerinde oluşturduğu olası değişikliklerden yola çıkılarak ya da model organizmadaki mekanizmalarla parellelik kurularak gerçekleştirilebilmektedir. Pozisyonel aday gen yaklaşımı ise hastalıkla aynı kromozomal bölgede olduğu düşünülen genler üzerinde yapılmaktadır (78).

Otozomal resesif kalıtım modeline uyan bir genetik hastalığı olan ailelerde, etmen genin saptanması için, her iki allelin de hastalığa yol açan mutasyonu taşıdığı varsayımından yola çıkılarak, ilk aşamada seçilen aday gene informatif bir bağlantının kurulması ve ardından bu gende mutasyon analizinin yapılması yöntemleri izlenir. Özellikle akraba evliliklerinde ortak ata nedeniyle gen içi ve yakın çevresinde rekombinasyon olasılığı düşük olduğundan polimorik markör analizlerinde homozigotluk (bağlantı eşitsizliği) gösterilebilmektedir. Homozigot bölgelerin belirlenmesi bu bölgelerde yer alan hastalıkla ilişkili gen/lerin araşırılmasına yardımcı olur. Bu incelemeye "homozigotluk haritalaması" adı verilir. Bu teknik, akraba evliliği yapmış ailelerde daha informatif olmakla birlikte, genomun başka bölgelerinin de homozigot olabilmesi güçlükler yaratabilmektedir. Teorik olarak, birinci dereceden kuzen evlilikleri sonucunda dünyaya gelen çocukların genomlarının 1/16'sı homozigot olacaktır. Hastalık geninin içinde bulunduğu bölge için sağlıklı kardeşlerin farklı (heterozigot) ve hasta kardeşlerin ise aynı (homozigot) olması beklenmektedir. Homozigotluk haritalaması, otozomal resesif hastalıkların haritalanmasındaki istatiksel analizin gücünü arttırmakta ve küçük ailelerde bile yüksek lod skor değerlerinin elde edilmesini olası kılmaktadır (74,75,77).

Homozigotluk haritalanmasında, "DNA havuzlama" tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemde; otozomal resesif bir hastalığın görüldüğü akraba evliliği yapmış

ailelerdeki etkilenmiş çocukların eşit konsantrasyondaki DNA'ları bir araya toplanmakta, genom-boyu taramada kullanılan STR (*short tandem repeat*) markörleri ile çoğaltılmakta ve genotiplenmektedir. Bu yöntemin temelinde, etkilenmiş çocukların hepsinin hastalıkla ilişkili markör/markörler için homozigot olacağı düşüncesi yatmaktadır. Bu teknik sayesinde otozomal resesif hastalıkların genom-boyu bağlantı analizinde gereken PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifikasyonlarının ve kullanılan jel kuyucuklarının sayısı azaltılmış ve böylece genom-boyu bağlantı analizinin daha az maliyet ile daha kısa sürede yapılabilmesi sağlanmıştır. Ayrıca her birey için genotiplemeye gerek olmadığından genotipleme sadece havuzlanmış örneklerde yapılmaktadır (76, 77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu 1997–2008 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalına, ailede mental retardasyon bulunması nedeniyle başvuran, klinik, metabolik ve görüntüleme teknikleri ile herhangi bir sendrom varlığı, yapısal ve sayısal kromozom anomalisi, subtelomerik bölge anomalisi dışlanan ve *FMR1* geni tekrar dizi artışları normal bulunan, otozomal resesif non-sendromik mental retardasyon tanısı alan 20 aile oluşturdu. Genetik incelemeler, bu ailelerdeki 22 si erkek (20 ağır MR, 2 hafif MR) ve 9 u dişi (8 ağır MR, 1 hafif MR) olan 31 MR li olguya ait olmak üzere toplam 90 bireyden elde edilen DNA materyali üzerinde gerçekleştirildi. 15 ailede MR den etkilenmiş bireylerin ebeveynlerinde akrabalık öyküsü bulunurken beşinin aynı küçük yerleşim biriminden geldikleri bildirildi (Şekil 3-1).

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmaya katılan tüm aile üyeleri ve sağlıklı bireylerden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genlerin Yapılarının ve Dizilerinin Analizi

CYFIP1 ve *CYFIP2* genlerine ait tüm varyantlara, eksonlara, intronlara, genomik DNA dizilerine, transkriptlerine, tek nükleotidlik polimorfizmlerine (SNP), tekrar dizilerine, insersiyon/delesyon olarak varolan polimorfik yapılarına (indelSNP), tanımlanmış mikrosatelit markörlerine, kodladığı proteinin amino asit dizilerine ve domainlerine, "UCSC Genome Browser" (www.genome.ucsc.edu)', "ENSEMBL Genome Browser" (http://www.ensembl.org), "NCBI Home Page" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)', ve "GDB Human Genome Data Base" (http://www.gdb.org)'den ulaşıldı.

3.2.2. Homozigosite Haritalamasında Kullanılan Polimorfik Markörlerin Seçimi

Polimorfik markörlerin toplumumuzdaki heterozigotluk oranları bilinmediğinden, her bir gen için en az 4 polimorfik markör seçilmesi amaçlandı. Bu sayı, non informatiflik durumunu azaltma konusunda olduğu kadar, olası kompleks gen yapıları nedeniyle çalışmayan PCR reaksiyonlarına karşı da bir tedbir olarak görüldü.

CYFIP1 genine ait polimorfik markör seçimi için ilk aşamada UCSC Genome Browser'daki veri bankası tarandı. Bu gen bölgesinde ve/veya yakınında tanımlanmış herhangi bir mikrosatellit markörü bulunamadı. SNP lerin analizi dizileme ile yapılabilirken, en az 2 bç ye kadar olan indelSNP lerin analizi, elektroforetik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir Bu nedenle, NCBI sitesinin SNP veri tabanındaki "human indelSNP" 'ler incelendi. CYFIP1 için tamamı gen içinde kalan (iki adet intron 1 de, bir adet intron 11 de ve bir adet intron 26 da) toplam 4 adet polimorfik markör belirlendi. *CYFIP2* geni için ise intron 3 de bir mikrosatelit markörü, intron 8 de iki indelSNP, intron 20 de bir mikrosatelit markörü ve intron 23 ve 27 de birer indelSNP olmak üzere toplam altı adet polimorfik markör belirlendi (Tablo 3-1).

Homozigosite haritalamasında informatiflik durumu haplotiplerin ayırt edici özellikte bulunup bulunmamasına göre tanımlandı: anne ve babanın sahip olduğu allellerin birbirinden farklı haplotipler göstermesi durumu tam informatif, bir ortak haplotip bulunması durumu yarı informatif ve birden fazla ortak haplotip bulunması durumu ise non informatif olarak değerlendirildi.

3.2.3. Primerlerin Tasarlanması

Primerler tasarlanırken, seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP üzerine gelmemesine, tekrarlayan diziler üzerinde bulunmamasına, ileri geri oligonükleotidlerin bağlanma ısılarının birbirleri ile aynı ya da en fazla +/- 2°C farklı olmasına, içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-22 nükleotid içermesine ve gen bölgesi için özgün olmasına özen gösterildi (79). Özgünlük, USCS Genome Browser'dan "in silico PCR" interaktif sistemi ile test edildi.

IndelSNP markörleri için gerekli ileri ve geri primerler markör alanını kapsayacak genişlikte ve yaklaşık 150-500 baz çiftlik bir bant bölgesini çoğaltacak biçimde tasarlandı.

Mikrosatelit markörlerin primerleri standart olup, GDB.org'da tasarlanmış olarak sunulduğundan, diziler bu siteden elde edildi. C*YFIP2* geni için gerekli dizileme primerleri, ekson-intron bağlantı bölgelerinden en az 50 baz çift introna girecek biçimde tasarlandı. Homozigosite haritalamasında kullanılan primerlerin dizileri (Tablo 3-1) ve *CYFIP2* genlerinin dizisi için kullanılan primerler (Tablo 3-2) 'de sunulmaktadır.

3.2.4 DNA Eldesi

DNA izolasyonları 5ml K_3 EDTA'lı tüplere toplanan periferik kandan, kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche Diagnostics) kullanılarak, firma protokolüne uygun olarak elde edildi.

3.2.5 Homozigosite Haritalamasında Kullanılan Polimorfik Markörlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

Polimorfik markörler, kullanılan enzimin uygulama talimatları modifiye edilerek PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Her bir PCR reaksiyonu için, 200-400 ng gDNA, 1X tampon solüsyonu [10X $(NH_4)_2SO_4$], 1,5 mM $MgCl_{2,}$, % 4-10 DMSO (Sigma), 200 µM dNTP, 300-800 µM ileri ve geri primerler ve 0.8 U Taq polimeraz enzimi (MBI Fermentas) kullanıldı. Reaksiyon karışımı, bidistile su (H_20) ile 25 µl ye tamamlandı. PCR, 94 °C'de 4 dk, ardından 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 62 °C'den 52°C'ye kadar kademeli olarak düşürülen 30 sn lik bağlanma ısılarında ve 70 °C'de 70 sn uzama basamaklarından oluşan toplam 40 döngü ve son olarak 70 °C'de 10 dk lık uzama olacak şekilde, *touch-down* PCR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası PCR örneklerinden 5 µl alınarak, 123 bç lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 10 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2 lik agaroz (Sigma) jelde, 1x TBE tamponunda, 80 V da, 20-25 dk. yürütülerek boyutlarına göre ayrıldı. Elde edilen bantlar ultraviyole (Omes, Fotodyne, ABD) ışık altında görüntülenerek fotoğrafları kayıt edildi.

3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Gümüş Boyama ile Görüntüleme

Çoğaltılan markörler, ayarlanabilir vertikal elektroforez cihazında (24x16 cm boyutundaki camlarda OWL ayarlanabilir # ADJ-1 Vertikal Elektroforez Cihazı ve 42x33 cm boyutundaki camlarda C.B.S. SCIENTIFIC CO. #SG-400-33 Elektroforez Cihazı), ürün boyutlarına göre, 150-250 bç ler için %10'luk (19:1) ve 250-500 bç ler için %8 lik (19:1), yarı-denatüran poliakrilamid jel karışımı (PAJ) kullanılarak, ön yürütme süresinden hemen sonra (OWL'da 400 Voltta 30dakika, C.B.S.'de 1000 Voltta

1 saat) yürütüldü. PCR ürünleri akrilamid jelin kuyucuklarına yüklenmeden önce, ön yürütme yapılan akrilamid jelin sıcaklığının denatürant etkisini gösterebilmesi için 50-55 °C ye ulaşması sağlandı. 20 µl'lik PCR ürününün üzerine 2:3 oranında olacak şekilde formamid eklendi. 98 °C'de 30 dk denatüre edilen PCR ürünü-formamid karışımlarından 8'er µl alınarak jelin kuyucuklarına yüklendi. PCR ürünleri boyutlarına göre kendi aralarında gruplandırıldı ve her bir grup için yürütme süresi ve voltaj düzeyi değişmekle birlikte C.B.S.'de 700-1000 Voltta 12-17 saat, OWL'da, 400 Voltta 14-19 saat yürütüldü. Jeller yürütüldükten sonra 10 dk fiksasyon solüsyonunda (% 10 etanol, %0.5 asetik asit) fikse edildi. Daha sonra, 30 dk, %0.1 $AgNO_3$ (Sigma) çözeltisi ile boyandı. Son olarak %1.5 NaOH (Sigma), %0.4 formaldehit (Sigma), %0.01 $NaBH_4$ (Sigma) solüsyonunda bantlar jel üzerinde belirene kadar bekletildi (80). Jel üzerindeki bantlar değerlendirilerek genotiplendi.

3.2.7. Restriksiyon Enzimi Kesim Yöntemi

Bir ailede, CYFIP1 geninde intron 26 da amplifiye edilemeyen bir indelSNP yerine, enzim kesimi (MspI, MBI Fermentas) ile analiz edilebilen, aynı bölgede yer alan ve heterozigotluk oranı 0,12 olan başka bir SNP (rs3751569) belirlendi. Enzim kesim bölgesi ekson 26 nın çoğaltılması için tasarlanan ileri/geri primer çiftleri kullanılarak uygun bağlanma sıcaklıklarında (Tm), üç aşamalı ısı döngüsünde çoğaltıldı.

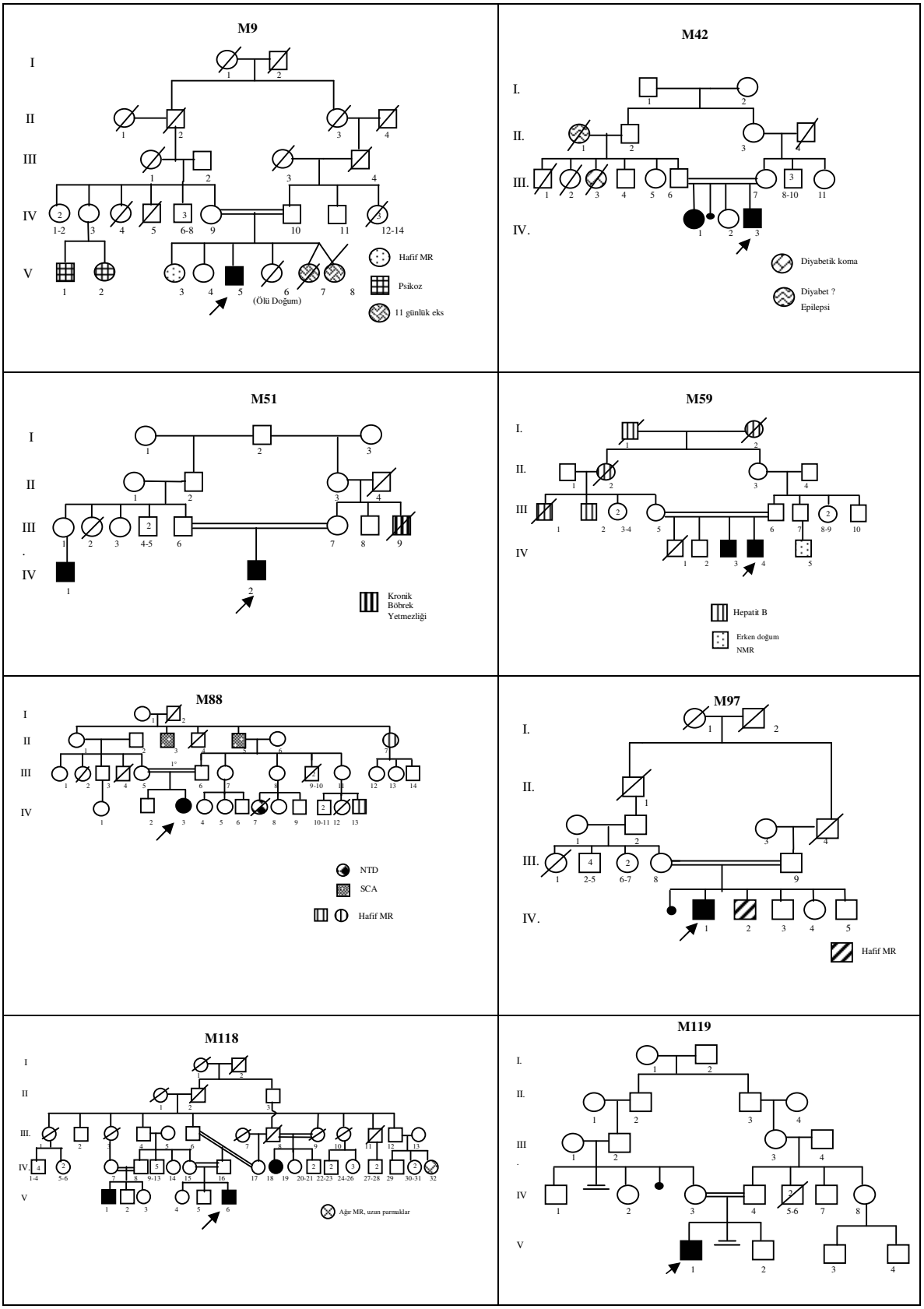
PCR ürünleri, MspI restriksiyon enzimi ile üretici firmanın (MBI Fermentas) protokolüne uygun olarak 37°C de gece boyu kesime bırakıldı. Enzim kesimi ürünleri %2 'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jelde (Roche Diagnostics) 100 V gerilimde 45 dk yürütüldükten sonra genotiplendi. Restriksiyon enzim kesim analizi ile ilgili bilgiler Tablo 3-3'de sunulmaktadır.

3.2.8. Dizileme Öncesi Genlerin Ekson Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

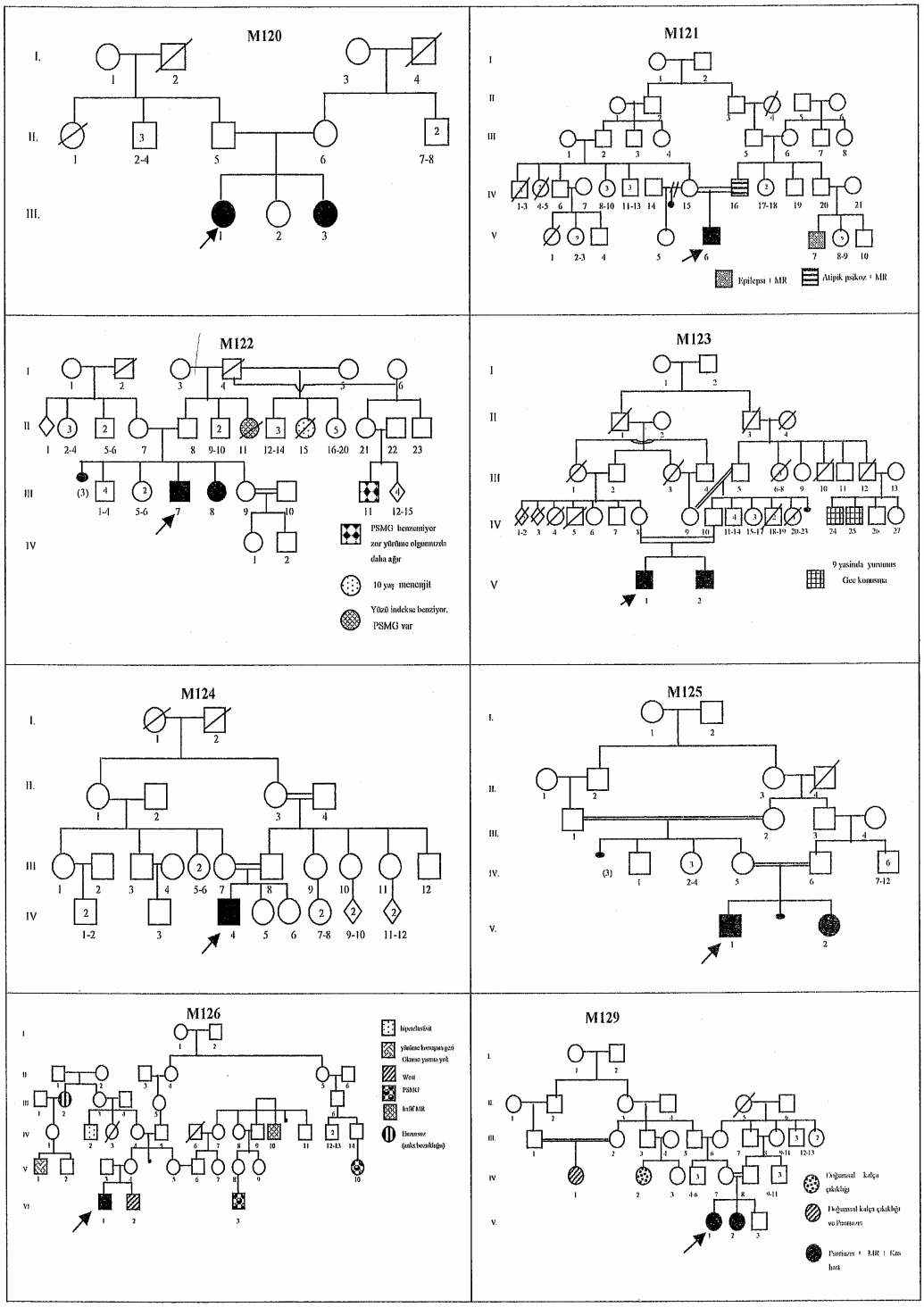
Polimorfik markörler için homozigot olan bireylerin ekson bölgelerinin dizilenebilmesi için, 3.2.5 bölümünde belirtilen PCR reaksiyonu koşullarında, uygun bağlanma ısıları (Tm) ve bu ısıların -/+ 2°'leri kullanılarak, iki veya üç aşamalı ısı döngülerinde çoğaltıldı.

3.2.9. DNA Dizi Analizi

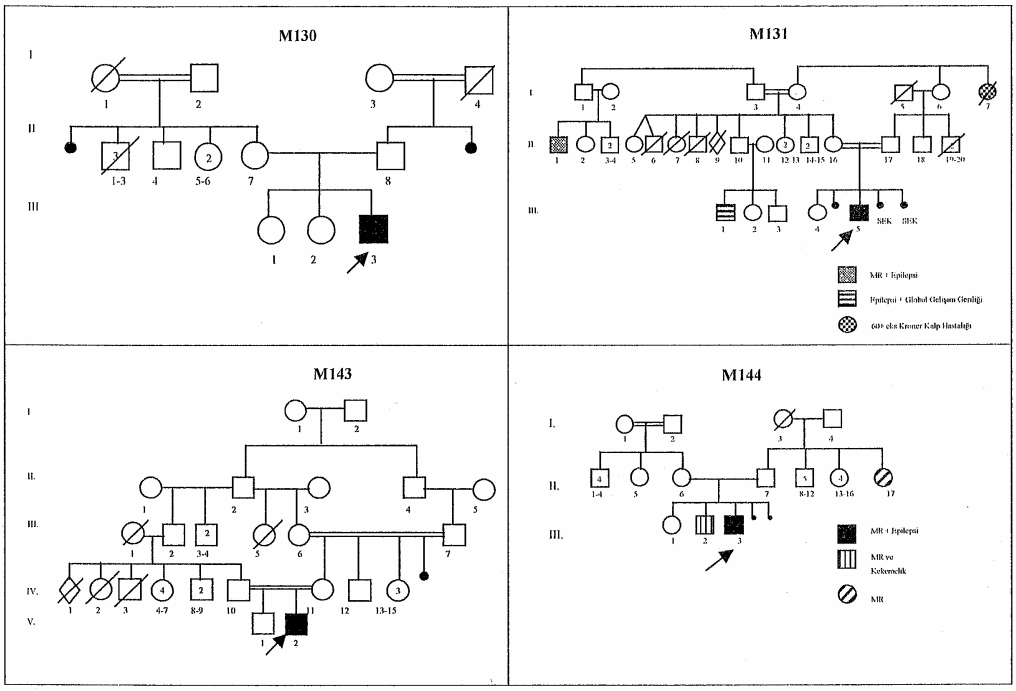
PCR yöntemi ile çoğaltılan ekson bölgeleri ABI 3730 XL otomatik kapiler DNA dizileyicisinde (Applied Biosystems, Macrogen Inc., Seul, Kore), hizmet alımı olarak bir dış laboratuarda gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları Chromas 2.32 (www.technelysium.com.au/chromas.html) ve NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Dizi analizi sonucunda saptanan değişimlerin tanımlanmış SNP olup olmadıkları "NCBI Entrez SNP" (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) ve "ENSEMBL GeneSNPView" (http://www.ensembl.org/genesnpview) veri tabanları kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 3-1: Çalışmaya alınan olgulara ait aile ağaçları



Şekil 3-1: Çalışmaya alınan olgulara ait aile ağaçları (devamı)



Şekil 3-1: Çalışmaya alınan olgulara ait aile ağaçları (devamı)

Tablo 3-1: *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin homozigosite haritalamasında kullanılan indelSNP ler ve STR markörler

Gen	Markör	Allel	Yer	Primer Dizisi	Bant boyu, bp
CYFIP1	rs11280843	-/TTGAATCA	İntron 1	5'-GCT GAG CAC GAG AGA CAT CT-3' 5'-CTT CTC CAC ACA GCA GAC AT-3'	488
	rs3083510	-/GCAT	İntron 1	5'-TGG AAG CTG GGA GAA AGA AA-3' 5'-CAG CGA CAG AGT GAG GTG AG-3'	243
	rs3083545	-/ATTTATTT	İntron 11	5'-CTC TGC AGC ACG CCC TT-3' 5'-CCA AAG TCA CAC GTG TGA-3'	395
	rs10640110	-/TATA	İntron 26	5'-GAT GAA CAG CAG TTG CTC A-3' 5'-CAT CAT GCC GAA CTG CTC T-3'	189
	rs3751569	G/T	Intron 26	5'-GTC AGA ACG GCA GGT GCT -3 5'-CTA AAG TCT CAA CAG CCA CA -3	376
CYFIP2	D5S2949	tetranucleotide/GTAT	İntron 3	5'-GTG ATG AAG CTG GGA TTT G-3' 5'-GAG GCT GCA ATG AGC TTA G-3'	157
	rs10549956	-/TTTG	İntron 8	5'- CGT AGT CAC CTT TCC AGA-3' 5'- CAG CAT ACA CTG CTT GGG T-3'	347
	rs5872509	-/GTGTGTGTGT	İntron 8	5'-GAC TTA CAT TTC CTG CCT TT-3' 5'-CAT CTT GGC GCT GGT AA-3'	351
	D5S2948	dinucleotide/GT	İntron 20	5'-GCA CTT CTC CTC TGC AAT C-3' 5'- CAG CAT ACA CTG CTT GGG T-3'	260
	r 10551072	-/TCT	İntron 23	5'-GTG GTT CCT GCA ACA GGT-3' 5'-CAT GTT TTA CTG GAG CAG GA-3'	157
	rs2910159	-/A/ATTATTCCCACTATATGATA/T	İntron 27	5'-CAG TAG ACA GAC TGT GGT TCT TA-3' 5'-GGG AGG AGT TAA TGA GTA AAA G-3'	139

Tablo 3-2: *CYFIP2* geninin amplifikasyonu için kullanılan ileri-geri primerler

Gen	Ekson	İleri primer (5'→3')	Geri primer (5'→3')
CYFIP2	1 (Variant 1&2)	CAGCCATTTCCTGCCCTTTGT	CAGACCTGCTCCTCTCTCAT
	1 (Variant 3)	GTAGCACAAGAGAGGTGG GT	CACACATTCAGGAGGCTCCT
	2	CTTTATTCTCCCAAAGGATGCT	CACCTTCTAGATGCAGACCT
	3	GACGCAGCAGGAGGTTT	CATGCCTCTGGTGTGAGA
	4	ACCCGTCTTGTTCCTCC	GGATAAGAGGACCTGCTT
	5	CAGTAATAAGACAACAGGTGTA	CATGGCACAAAACTGCAGA
	6	CTCGAGAGGGCTGGCTCT	CTCCATTCTCTTCCTCCA CT
	7	GATGTCACTCTGTGTTAGGT	CCTCTACACGCCTGCCTA
	8	GACCACACCGGCCAGCT	CCGTAAGATCTGTATCAATGT
	9	GACTTACATTTCCTGCCTTT	CATCTTGGCGCTGGTAA
	10	GAAGCAGAAACTAGGGGT	GTGTTCTGATGGAATCCA
	11	CTGAGCACCAGGAGCAGCT	GTTCTTTCCTGGCTGCTCCT
	12-13	CAGTAATTTATAAACCTTCAGT	CTTGCTCAGAACTACTCA
	14-15	CTCATGCCTCTGGACATCT	CAGCCATGATGATCTACCATA
	16-17	CTGGGAGGTTGGAGTGT	TCTTAGCGGCTCTGAGA
	18-19	GTACCTGCTACATACCTA	CTAATAGCAAAAGACTGGA
	20	GAATGCACTCTGGGCAAT	GAAGGGAGGTTTCACAACA
	21	GTGGGTAGATCCTATGATCT	GATCTCTATGCTAACTTCGCA
	22	CAGTGTGAATTTTAAGTAACT	CAGATGGAAAGAGACTCA
	23	CTTGCGTGAACAGAAGCAGT	CATGTTTTACTGGAGCAGGA
	24	CAGTGCACTTGTACCAGT	CTCTGCACCTTCTTACTCT
	25	CAGAACATCTGCCAGGACT	CTACAGGTAGAGCTGCAGT
	26	CTCTCAGAGGTCTCAGCA	CTGGCATGTTAGAGAAGCA
	27	GCTATCCCAGAGTCAGGTCT	CAATGCTGCAGGAGCCTCA
	28	CACAGTGAGTAGAAGAGCCA	CTAGATCTGAGTTGACTGCA
	29	GAATGCAGATACATCATCAGGT	GTTTCCTGACCTGTACAATGA
	30	CAAGACCAGTTCTGGTGA	CGTTTCTGGCTGAACTCT
	31	CAGGCCTGCTTAGTAGCT	CCATCACAAGCAGCTCCT
	32-1	TGACATGATCACTGATGCA	GGAGAAAGGGTGAAACTAGGA
	32-2	GTGCATGCTCTCCCATGAC	GCATCACACAAACCTCTTGCT
	32-3	GAGCATGTCATTGTCAAAGGA	CTGTTTTAGGTTGTTTGC TTAGT
c5orf40	1	GCTGACTGACAGCATTTGAG GCAGAGGAAACTGGACATCTA	GAAATGTGCAATAAATGGTGGCT
c5orf40	2	CAGGTCCGTCTCCCTTA	GCATCGTGCGTACAGAT

Tablo 3-3: MspI enzim kesim analizi

Enzim	Değişim	İleri/geri primer çifti (5'→3')'	PCR ürünü (bç)	Kesim ısısı (°C)	RE kesimi sonrası ürün boyutlar (bç)		
					WT	Het	Hom
MspI	G/T	5'-GTCAGAACGGCAGGGCT-3' 5'-CTAAAGTCTCAACA CCACA-3'	377	37	234 96 47	330 234 96 47	330 47

Kısaltmalar: bç, baz çifti; Het, heterozigot; Hom, homozigot; RE, restriksiyon enzimi; WT, *wild*-type.

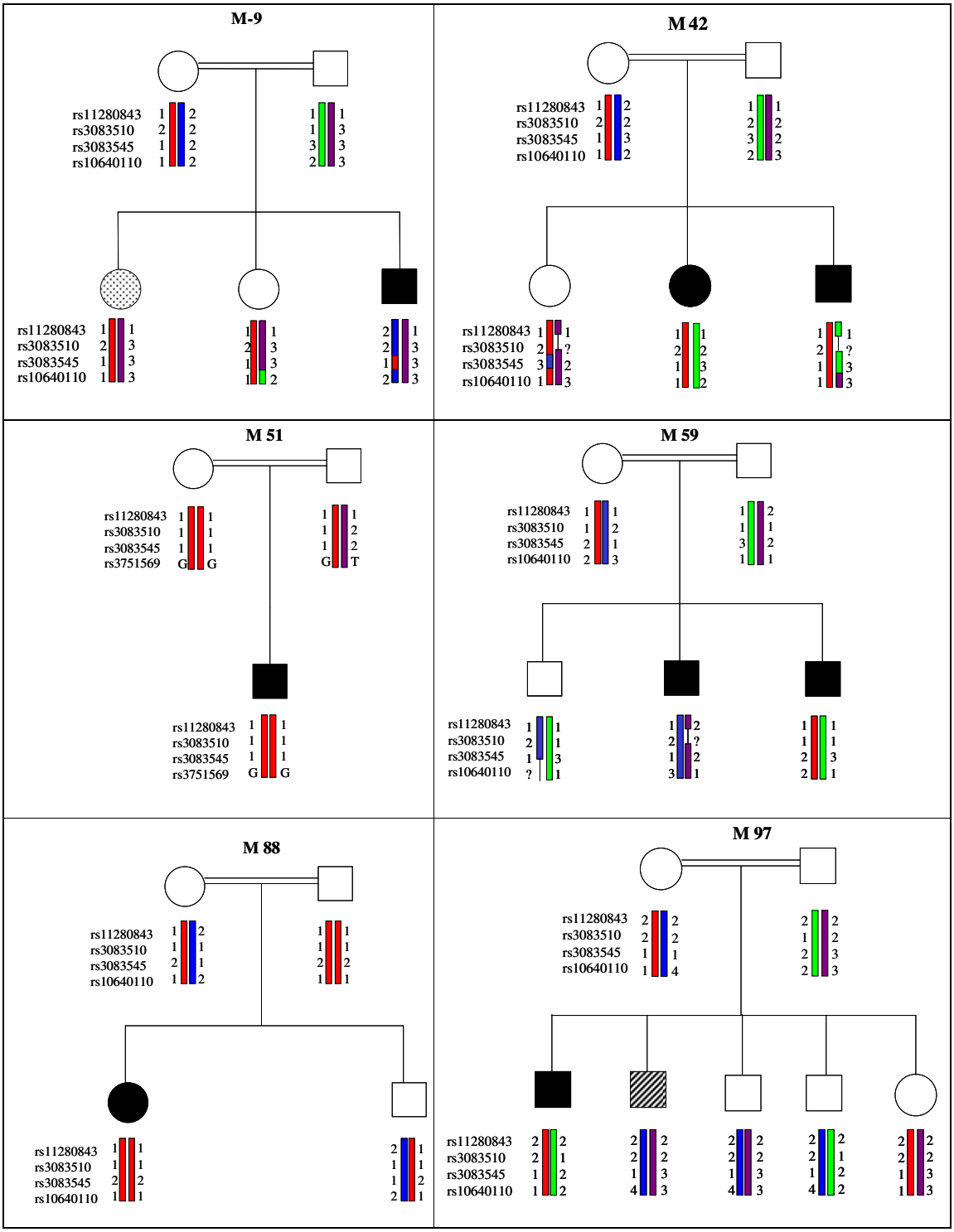
4. BULGULAR

4.1. CYFIP 1 Geni

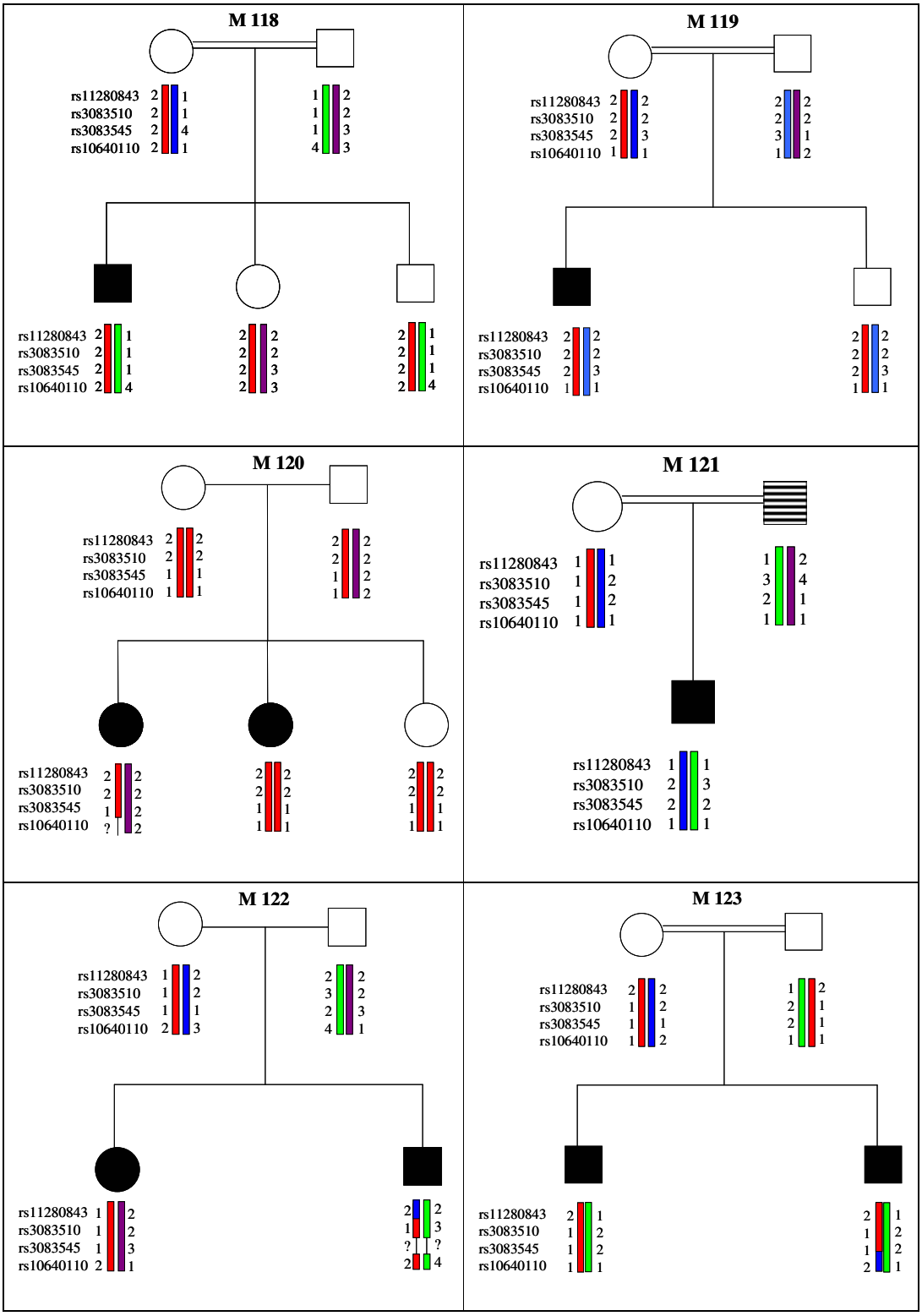
CYFIP1 genindeki homozigosite haritalaması, rs11280843, rs3083510, rs3083545 ve rs10640110 markörleri kullanılarak gerçekleştirildi. Haritalama sonucunda incelenen 20 aileden 15 i informatif, 2 si yarı informatif (M119, M123) ve 3 ü non-informatif (M51, M88, M120) bulundu (Şekil 4-1). İnformatif ailelerin hiç biri bölgeye homozigot bağlantı göstermedi. Non informatif bulunan ailelerden birinde (M51), rs10640110 indel SNP nin analizi gerçekleştirilemediği için olası homozigotluğu dışlamak amacıyla aynı bölgede yer alan rs3751569 SNP si PCR+RE (enzim kesimi) yöntemi ile gerçekleştirildi. Anne ve etkilenmiş olgu bu SNP için homozigot baba ise heterozigot olarak bulundu (şekil 4-2). Etkilenmiş bireyin anne ile aynı haplotipi taşıması nedeniyle aile non informatif olarak değerlendirildi.

4.2. CYFIP 2 Geni

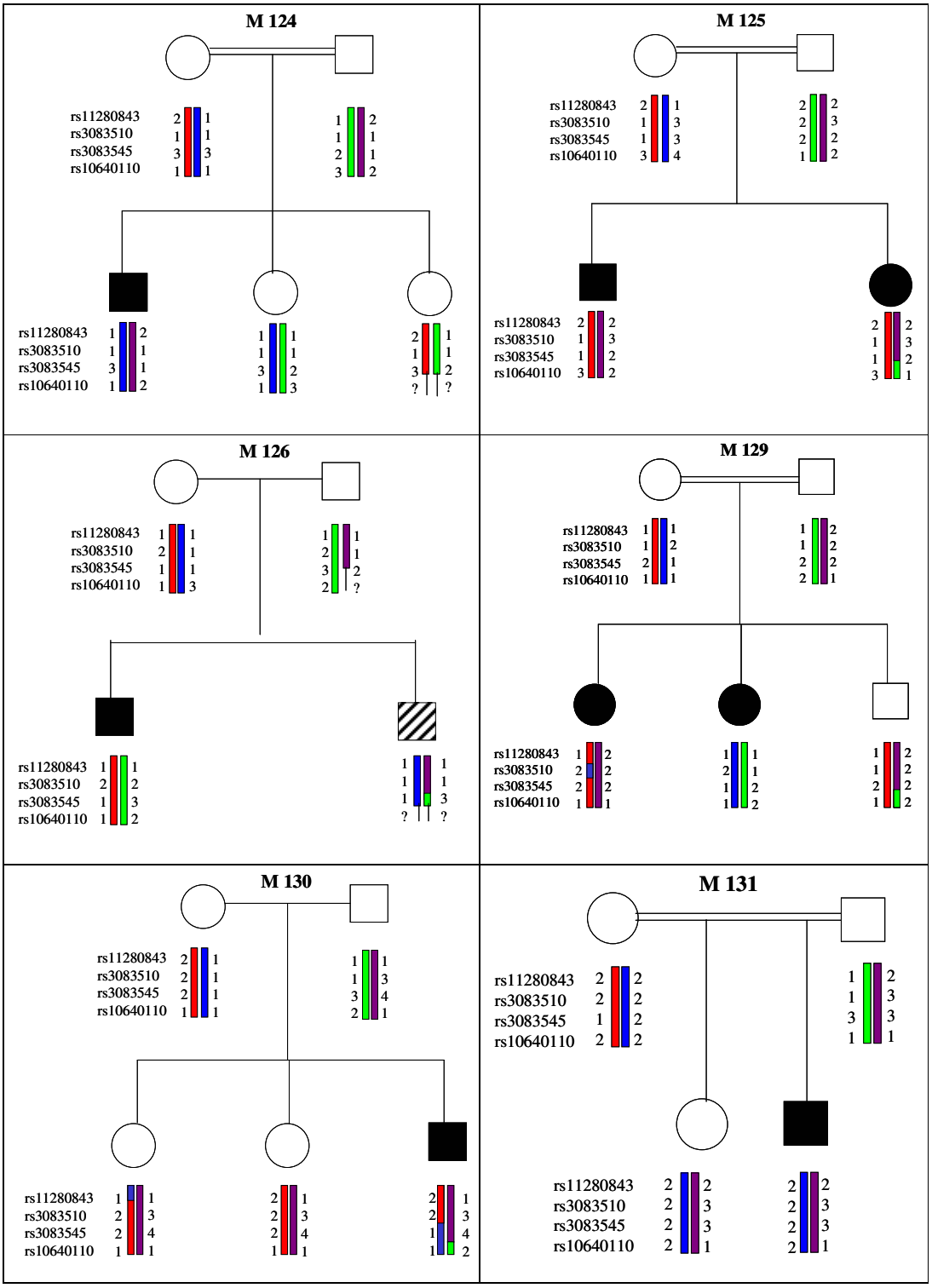
rs10549956, rs5872509, rs10551072, rs2910159 indel SNP ve D5S2948, D5S2949 mikrosatelit markörlerinin (STR) kullanıldığı *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması sonucunda incelenen 20 aileden 15 i informatif, 4 ü yarı informatif (M42, M121, M125, M143), 1 i non informatif (M9) sonuç verdi (Şekil 4-3). M59 ailesinde benzer bulgulara sahip 2 etkilenmiş kardeşin farklı alleller için homozigot haplotiplere sahip olmaları nedeniyle bölge için bağlantısız oldukları düşünülüp dizi analizine alınmadılar. M143 ailesinde ise etkilenmiş birey tüm markörler için homozigot haplotipe sahip iken sağlıklı kardeş rs10549956-rs2910159 arasındaki bölgeler için homozigotluk gösterdi. Bu durum, ailede *CYFIP2* geninin ekson 9-27 arasının etkilenmiş ve etkilenmemiş bireyler için homozigot olmaları nedeniyle bağlantısız, ekson 4-8 arasının ise informatif homozigot haplotipe sahip olması nedeniyle bağlantılı olabileceği düşündürdü. M143 olgusunda *CYFIP2* geninin ekson 4-8 arasının dizilenmesi planlandı. Üç ailede (M88, M123 ve M124) etkilenmiş bireylerin *CYFIP2'* nin polimorfik markörlerini homozigot olarak kalıttıkları belirlendi. *CYFIP2* gen bölgesinde bulunan, fibronektin tip-III domaine sahip ters zincirde okunan küçük bir gen, *c5orf7*, *CYFIP2* geni dizilenirken rastlantı nedeniyle dizilendi, ancak SNP dışında herhangi bir bulgu ile karşılaşılmadı.



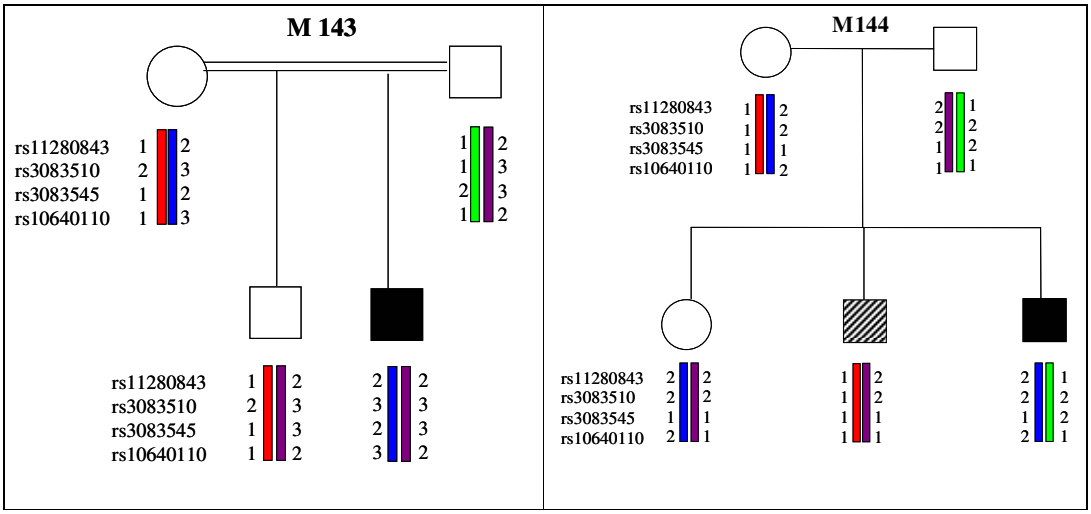
Şekil 4-1: ***CYFIP1 g*****eninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler**



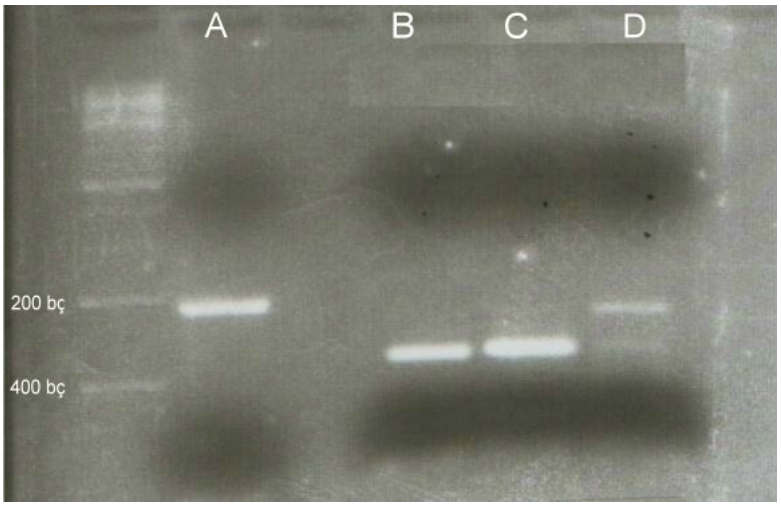
Şekil 4-1: ***CYFIP1*** **geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler- devamı**



Şekil 4-1: ***CYFIP1*** **geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler- devamı**

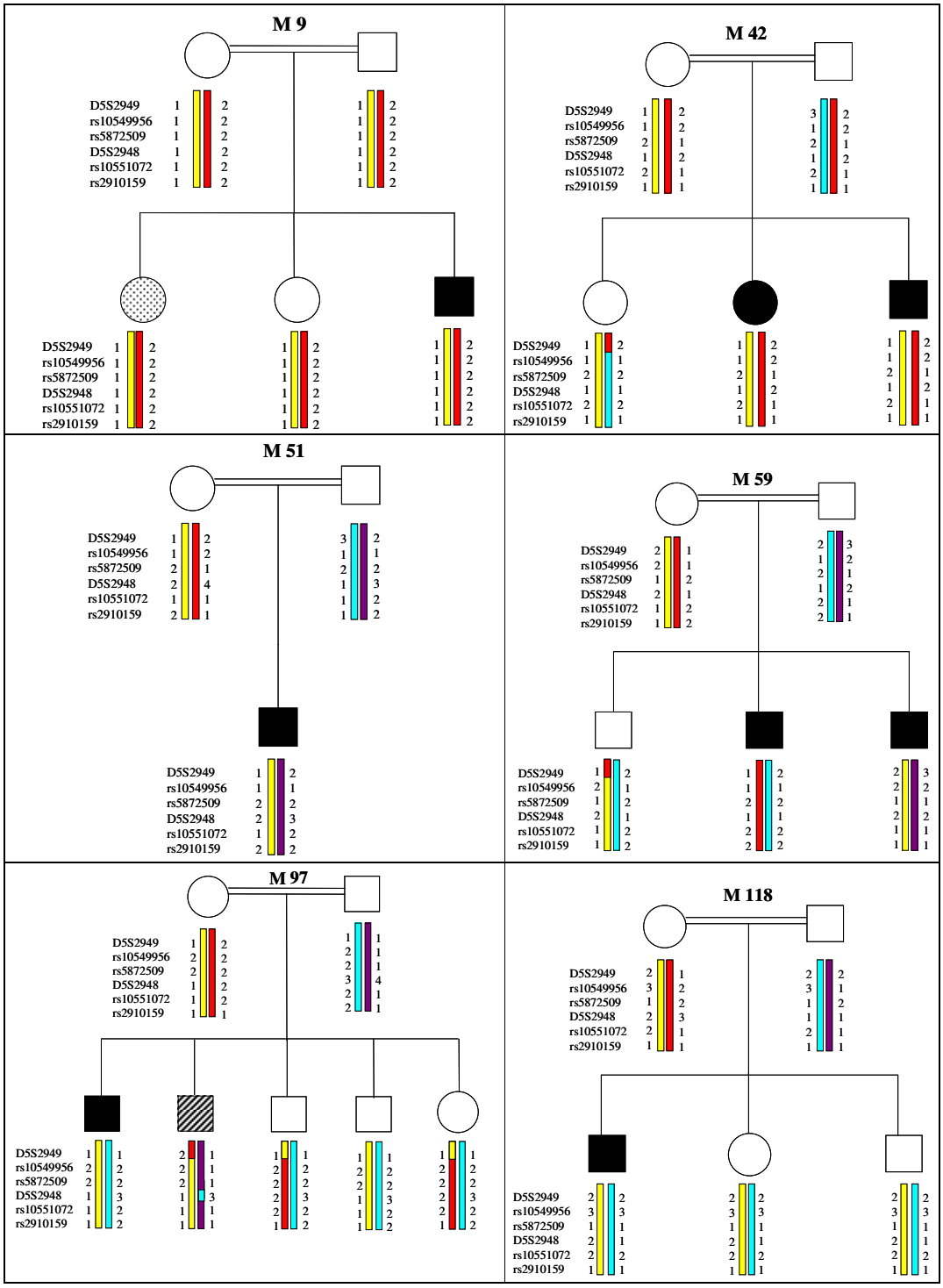


Şekil 4-1: *CYFIP1* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler- devamı

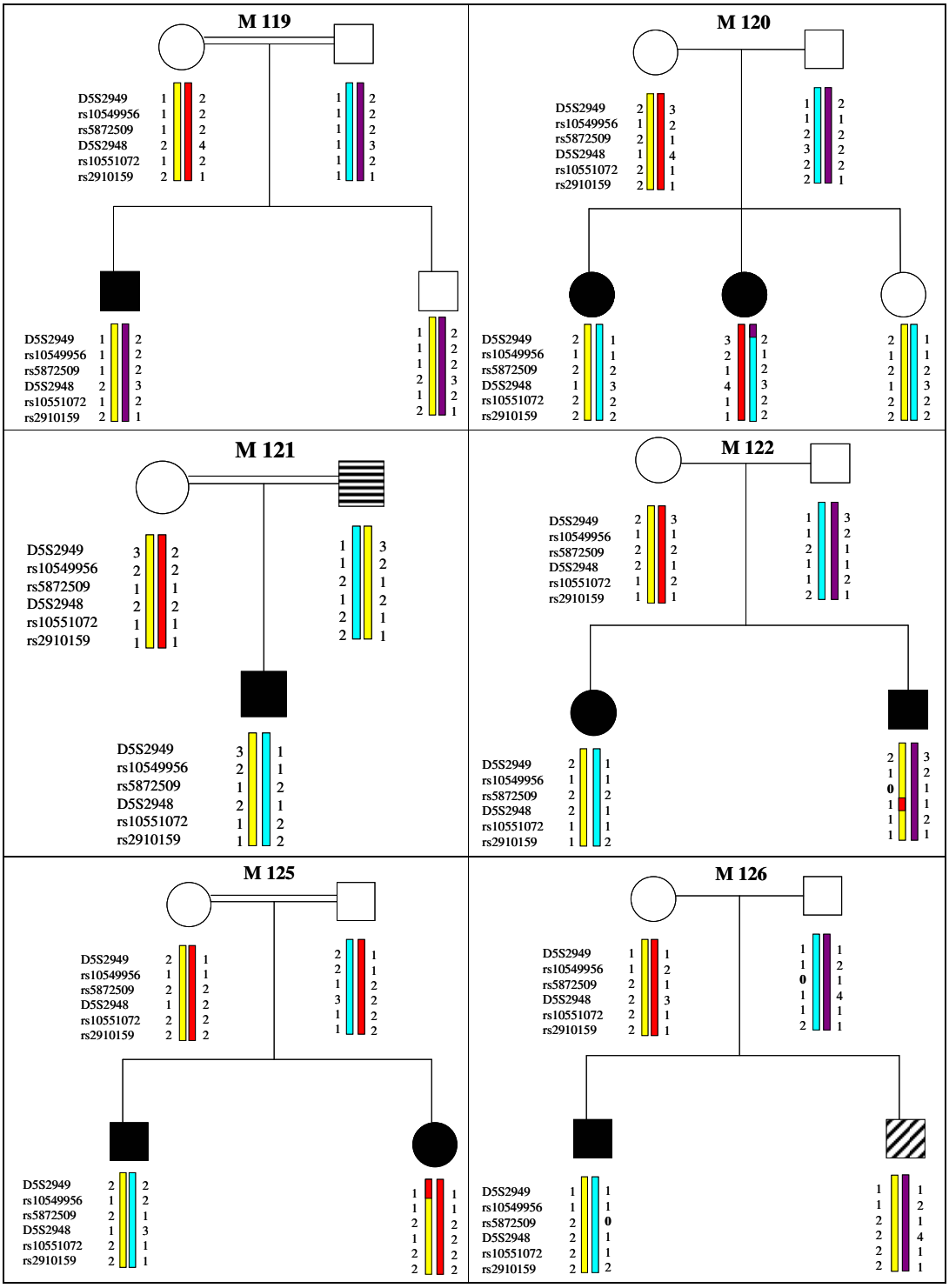


Şekil 4-2: M-51 ailesinin RE kesimi sonrası jelde elde edilen görüntüsü.

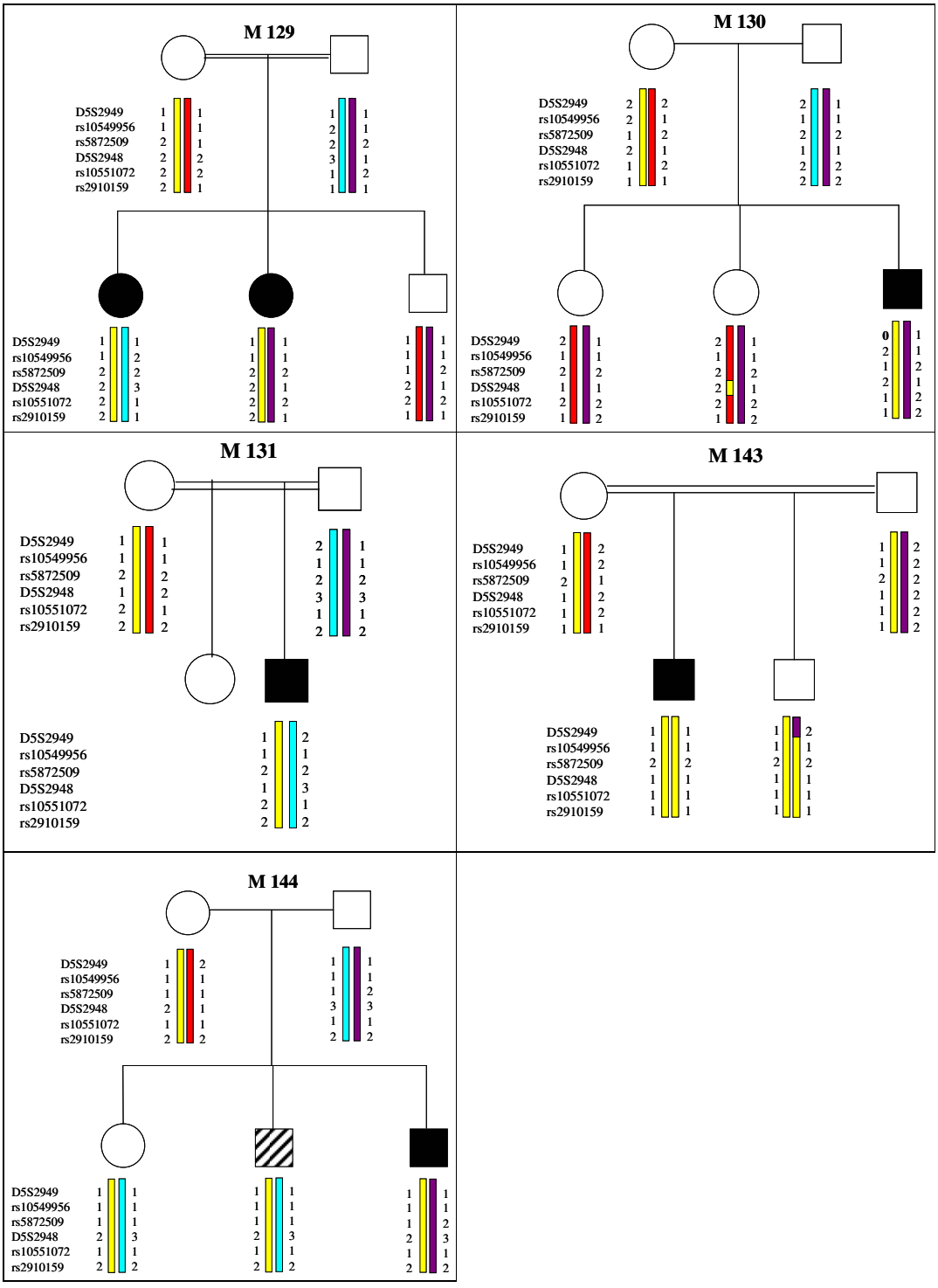
A) kesilmemiş kontrol B) anne-homozigot C) olgu-homozigot D) baba-heterozigot



Şekil 4-3: ***CYFIP2*** **geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler**



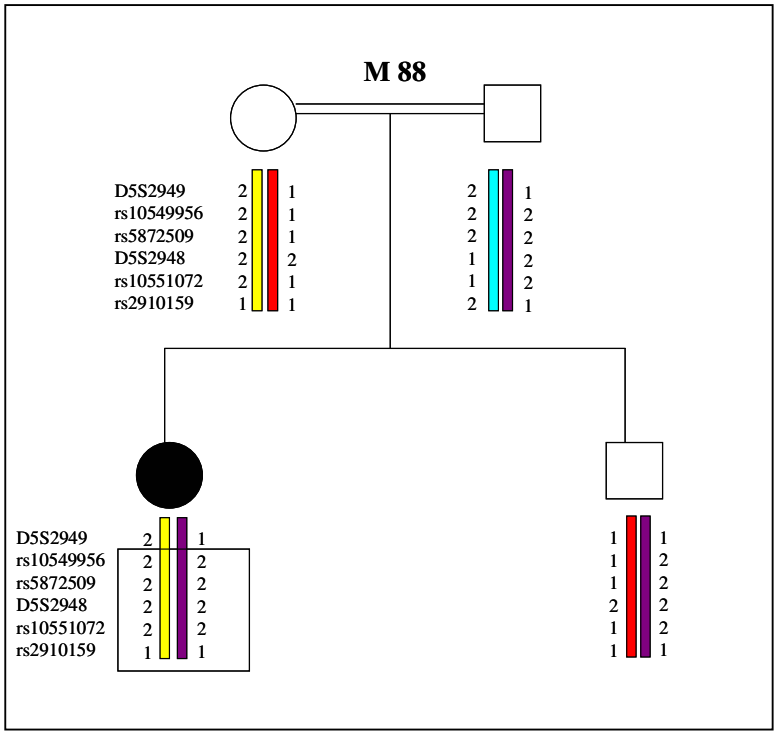
Şekil 4-3: ***CYFIP2*** **geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler- devamı**



Şekil 4-3: ***CYFIP2*** **geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler- devamı**

M-88 Ailesi

Aralarında 1 inci derece akrabalık ilişkisi bulunan (kuzen evliliği) ve aynı yerleşim biriminden gelen, FMF hastası baba ile sağlıklı annenin, bir sağlıklı erkek ve bir hafif MR kız çocuğu bulunmakta idi. Hafif MR kız çocuğunun klinik muayenesinde, dismorfik yüz bulguları, psikomotor gelişim geriliği ve sınır mikrosefali varlığı belirlendi. Homozigosite haritalaması sonucunda rs10549956 ve rs2910159 markörleri arasında kalan bölgenin (ekson 9-27) homozigot olduğu saptandı (Şekil 4-4). *CYFIP2* geninde yapılan dizi analizi, birçok tanımlanmış homozigot SNP ve genin 32. eksonunun translasyona uğramayan bölgesinde tanımlanmamış yeni heterozigot bir dizi değişiminin (c.*2380 T/G) varlığını ortaya çıkardı (Tablo 4-1, Şekil 4-5).

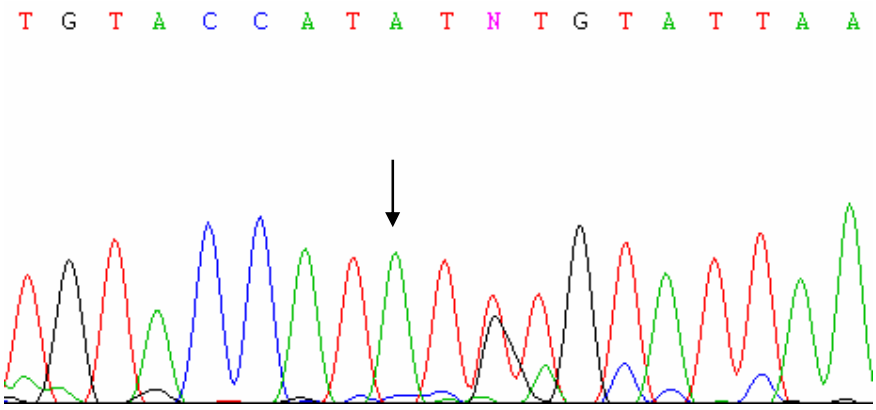


Şekil 4-4: M-88 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler

Tablo 4-1: M-88 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişimi ve/veya SNP ler

Ekson 1 variant 3	IVS 1	Ekson 4	IVS 24	Ekson 32
rs767007 (C/G)	rs187458 (C/G)	rs5872508 (-/C)	rs33982592 (-/AA) rs6239098 (A/G)	rs6555991 (G/T) rs6555992 (A/G) rs3734034 (T/C) rs6880851 (GC/TT) rs3087968 (T/C) rs10073822 (G/A) **c.*2380 (T/G) het**

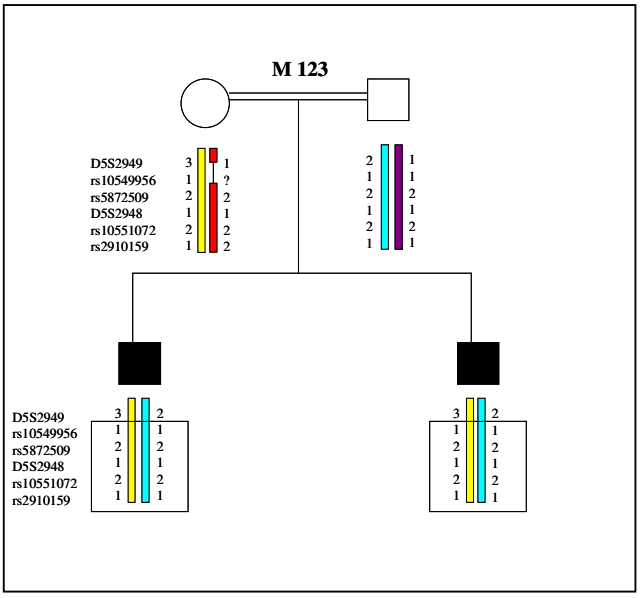
het: heterozigot



Şekil 4-5: M-88 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizilenmesi sonucu elde edilen heterozigot dizi değişimini gösteren kromatogram

M-123 Ailesi

Aralarında çift taraflı 1.5 derece akrabalık ilişkisi (kuzen evliliği) bulunan ve aynı yerleşim biriminden gelen sağlıklı anne ve babanın 2 ağır MR erkek çocuğunda yapılan klinik incelemelerde her iki kardeşte benzer minimal yüz dismorfizmi, psikomotor gelişim geriliği, nörolojik muayenede spastisite ve klonus gibi 1. motor nöron bulguları ile kraniyal MRG'de korpus kallosum gelişim anomalileri olduğu belirlendi. CYFIP2 geni için seçilen markörler ile yapılan homozigosite haritalamasında her iki kardeşin de rs10549956 ve rs2910159 markörleri arasında kalan bölge (ekson 9-27) için homozigot haplotipe sahip olduğu gözlendi (Şekil 4-6). *CYFIP2* geninin dizi analizi birçok tanımlanmış homozigot ve heterozigot SNP varlığını gösterdi (Tablo 4-2).



Şekil 4-6 : M-123 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler

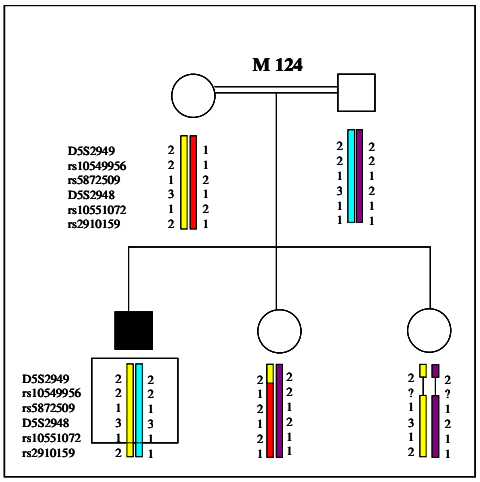
Tablo 4-2: M-123 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen SNP ler

Ekson1 variant 3	Ekson 4	IVS 24	Ekson 32
rs767007 (C/G)	rs5872508 (-/C)	rs33982592 (-/AA) rs6239098 (A/G) het	rs6880851 (GC/TT) het rs3734034 (T/C) het rs6555991 (G/T) het rs6555992 (A/G) het rs3734034 (T/C)

het: heterozigot

M–124 Ailesi

Aralarında 1 inci derece akrabalık ilişkisi bulunan (kuzen evliliği) sağlıklı anne ve babanın sağlıklı bir kız çocuğu, hafif MR erkek çocuğu ve konuşma geriliği bulunan kız çocuğu bulunmaktadır. Hafif MR erkek çocukda NMR (Nöromotor Retardasyon), BGG (Büyüme Gelişme Geriliği) ve dismorfizm bulunmaktadır. Homozigosite haritalaması sonucunda etkilenmiş bireyin D5S2949 ile rs10551072 (ekson 4-23) markörleri arasındaki bölge için homozigot olduğunu saptandı (Şekil 4-7). *CYFIP2* geninin dizi analizi sonuçları birçok tanımlanmış homozigot ve heterozigot SNP varlığını gösterdi (Tablo 4-3).



Şekil 4-7 : M-124 ailesinde *CYFIP2* geninin homozigosite haritalaması ile elde edilen genotiplerden oluşan haplotipler

Tablo 4-3: M-124 ailesinin etkilenmiş bireyinde *CYFIP2* geninin dizi analizi sonucunda elde edilen SNP ler

Ekson 1 variant 3	Ekson 4	IVS 12	IVS 14	Ekson 15
rs767007 (C/G) het	rs5872508 (-/C)	rs895309 (A/G) rs895308 (A/T) rs1867669 (C/T)	rs7730231 (C/T) rs6555939 (G/T) rs2863198 (C/G)	rs1823035 (A/G)
IVS 22	**IVS 23**	**IVS 24**	**IVS 27**	**Ekson 32**
rs3734027 (A/G)	rs3734027 (A/G) rs3734028 (G/A) rs33939580 (CTT/-)	rs33982592 (-/AA) rs7715719 (C/T) rs10037485 (C/T)	rs3816319 (A/T) rs7711035 (G/T)	rs6555991 (G/T) het rs6555992 (A/G) het rs3734034 (T/C) het rs6862302 (T/C) het

het: heterozigot

5. TARTIŞMA

Mental retardasyonun dünya nüfusunun yaklaşık %2-3 ünü etkilediği bildirilmektedir (2). Etiyolojik çalışmalar mental retardasyonun etmenlerinin son derece hetorojen olduğunu; prematüre doğum, prenatal enfeksiyonlar, kromozom anomalileri ve tek gen mutasyonları gibi genetik ve genetik olmayan faktörlerin çeşitli boyutlarda etkin olduğunu göstermektedir (3).

Tek gen mutasyonlarına bağlı mental retardasyonlar, sendromik (MRS) ve non-sendromik (NSMR) olmak üzere 2 grupta incelenmektedir. MR ye ek olarak herhangi bir tanınabilen fiziksel, nörolojik, nöro-radyolojik ya da metabolik anormalliklerin olduğu durumlar sendromik MR, bilişsel yetersizliğin tek majör bulgu olduğu durumlar ise non sendromik MR olarak adlandırılmaktadır (32). Non sendromik mental retardasyonlu olguların yaklaşık %25 inde otozomal resesif (ORNSMR), %75 inde ise X e bağlı kalıtım gözlenmektedir (MRX). Bugüne kadar MRX ile ilişkili 24 gen tanımlanmıştır (2, 39). Bu genlerden 11 tanesi hem sendromik hem de non sendromik mental retardasyona yol açmaktadır.

Günümüzde, ORNSMR konusunda çok az bilgi bulunmaktadır. Heterojenite genetik incelemeleri zorlaştırsa da, etkilenmiş bireyin çok sayıda olduğu geniş ailelerde, genom boyu bağlantı analizi ve ardından bağlantılı bölgelerde aday gen taraması yapılarak sorumlu genlere ulaşılabilmektedir. Küçük ailelerde ise, genom boyu bağlantı analizi ile yol gösterici bir sonuca ulaşmak mümkün olamadığından, bilinen ve/veya araştırılan bir aday gen için önce bir bağlantı analizi incelemesi sonra informatif bulunanlarda dizi analizi uygulanarak sorumlu genetik mutasyonlara ulaşılabilmektedir. Günümüze kadar, literatürde genom boyu bağlantı analizi ile saptanmış beş gen (*PRSS12*, *CRBN*, *CC2D1A*, *GRIK2*, *TUSC3*) ORNSMR ile ilişkilendirilmiş olup, her biri tanımlandıkları geniş ailelerle sınırlı kalmıştır (52, 53, 56, 57, 60, 61, 91, 92). Bu sonuç, MR nin yüksek genetik heterojenitesini göstermektedir. Otozomların aksine, X kromozomu üzerinde daha fazla genin tanımlanmış olması, toplumda X e bağlı MR nin daha sık görülmesi ve bağlantı analizinin tek bir kromozomla sınırlı kalmasının çalışmaları hem kolaylaştırmasına hem de hızlandırmasına dayandırılmaktadır.

FMRP eksikliği, insanlarda en sık karşılaşılan mental retardasyon etmeni olup frajil X sendromuna yol açmaktadır. FMRP nin hem RNA ya hem de proteine bağlanma özelliği bulunmaktadır. Bir çalışmada, beyindeki total mRNA nın yaklaşık %4 ünün FMRP ye bağlandığı gösterilmiştir (22). Bir başka çalışmada ise saflaştırılmış FMRP nin G-kuartet yapısı oluşturabilen mRNA dizilerine yüksek afinitede bağlanma yatkınlığı bulunduğu gösterilmiştir (83, 84). Günümüzde bazı proteinlerin ve RNA ların büyük ribonükleer kompleksler biçiminde, FMRP ile etkileşime girdiği saptanmıştır. Bir araştırmada, sinir hücresindeki dFXR'nin (insan FMRP proteininin *Drosphila*'da bulunan homoloğu) RNA nın uyardığı baskılayıcı kompleks (RISC) ile etkileşime girerek, bazı transkriptlerin translasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (85, 86). FMRP yapısındaki, nükleer lokalizasyon ve nükleer eksport sinyallerinin varlığı bu proteinin çekirdek ile sitoplazma arasında gidip geldiğine işaret etmektedir (26). Bu durumlar, FMRP nin, özgün mRNA ların transport ve translasyonunundan sorumlu olduğunu ve post sinaptik alanlardaki lokal protein sentezinde kritik bir rol oynadığını düşündürmüştür. Ayrıca, FMRP den yoksun farelerde (FMR1 *knock outs*) ve frajil X hastalarının dendrit uçlarında anormal yapının gözlenmesi FMRP-mRNP kompleksindeki fonksiyonel bozulmaların yetersiz sinaps oluşumuna yol açtığı ve algılanan dış sinyallere verilecek uyumlu cevap ya da davranışın kaybolduğunu göstermektedir (81, 87). FMRP bir çok dokuda ifade edilmekle birlikte, özellikle nöronların sitoplazmasında ve nörotransmitter aktivitesine bir yanıt olarak lokal ekspresyonunun artış gösterdiği distal dendritlerde yüksek oranda ifade edilmektedir (24).

Klinik olarak frajil-X tanısı alan hastaların ancak %15-20 sinde FMR1 geninin üçlü tekrar dizilerinde artış olduğu görülmekte ve bu artışların frajil-X sendromunun %99 undan sorumlu olduğu ($\leq$ %1 inde FMR1 de nokta mutasyonu saptanmaktadır) bildirilmektedir. FMR1 tekrar dizileri normal olan grubun bir kısmında FMRP ile etkileşime giren diğer proteinlerin rolünün olabileceği öne sürülmekte ise de literatürde bu tür bir aday gen yaklaşımı kullanılarak yapılmış herhangi bir başka çalışmaya rastlanmamaktadır.

Immünopresipitasyon çalışmaları, 8 farklı proteinin FMRP ye bağlandığını göstermektedir. Bunlar, nukleolin, YB-1, FXR1, FXR2, NUFIP1, NUCIF1, CYFIP1 ve CYFIP2 dir. Bunların arasında CYFIP1 sadece FMR1 ve FMRP ye bağlanması ile diğer

proteinlerden ayrı bir özellik göstermektedir. Oysa diğer proteinler kendi aralarında ya da başka proteinlere bağlanabilmektedir (24). CYFIP1 ile %88 homoloji gösteren CYFIP2 ise FMRP ye benzeyen diğer proteinlere (FXR1 ve FXR2) bağlanmakta ve bunlarla da etkileşime girebilmektedir.

Araştırmamız kapsamında, genetik etiyolojisi klinik (sendrom), sitogenetik (kromozom, mikrodelesyon, subtelomerik incelemeler), frajil-X ve tek gen hastalıklarına yönelik enzim ve DNA analizleri ile belirlenememiş, NSMR ön tanısı almış olgularda, *CYFIP1* ve *CYFIP2* genlerinin moleküler açıdan incelenmesi amaçlandı.

Mental retardasyona yol açan ve laboratuar koşullarımızda incelenebilen etiyolojik faktörlerin dışlandığı ORNSMR olgularında, FMRP ile ilişkiye giren bütün protein genlerinin dizi varyasyonları açısından değerlendirilmesi MR nin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında önemli görülmektedir. Ancak, gerek süresi ve gerekse de bütçe olanakları açısından ele alındığında, bu yüksek lisans tez kapsamında, FMRP ile etkileşime giren bütün proteinlerin çalışılması olanaklı görülmemiş ve genler arasında bir seçim yapılması uygun bulunmuştur. Bu nedenle, *CYFIP1* ve bununla yüksek homoloji gösteren *CYFIP2,* aday genler olarak seçilmiştir.

CYFIP1 geninin kodladığı protein (CYFIP1), mRNP kompleksi içinde yer alan ve sadece FMR1 ve FMRP ile etkileşime giren bir özellik göstermektedir. CYFIP1 ayrıca, Rac1 faktörü ile de etkileşime giren bir proteindir (65). Rac 1, Rho GTPase ailesinin, üzerinde en çok inceleme yapılmış komponentidir. Bu yapının, maya ve bazı bitki türleri dâhil bütün ökaryotlarda bulunan birçok aktin türünü yönettiği bilinmektedir (82). Daha önce GTPase yolağındaki bazı genlerin, *oligophrenin*-1 (*a Rho-GTPase-activating protein*), *α GDI* (*a guanine nucleotide dissociation inhibitor*) ve *guanine-nucleotide exchange factor ARHGER6*, ORNSMR ile ilişkileri gösterilmiştir (82). İmprinting çalışmaları, kültür edilmiş lenfoblastlarda ve beyin dokusunda *CYFIP1*'in bi-allelik olarak eksprese olduğunu göstermektedir (63). Bu nedenle, *CYFIP1* in de delesyona uğradığı PW/AS olgularında, fenotipin temel sorumlusu olmasa da, haployetersizliğinin, fenotipin daha ağırlaşmasına yol açabileceği ileri sürülmektedir (66).

CYFIP2 nin kodladığı protein, CYFIP1 ile yapısındaki amino asitler bakımından %88 benzerlik göstermekte olup yapısı türler arasında çok iyi korunmuş bir protein ailesine aittir (64). CYFIP1 den farklı olarak, CYFIP2, FXR1, FXR2 and WAVE-1 kompleksleri ile etkileşime girebilmektedir (64, 83). WAVE-1, GTPase Rac'dan Arp2/3 kompleksine kadar uzanan sinyal iletişimine dayanarak aktinin yeniden düzenlenmesini yönlendiren bir *scaffold* proteinidir. Tümör supresör (p53) gen ağının tamamında, transkripsiyonel olarak regüle edilen hedef genlerin tanımlanmasına yönelik uygulanan bir çalışmada, CYFIP2 nin p53 tarafından hazır bir biçimde endüklendiği ve p53 e bağımlı apoptoz işlevi içinde yer aldığı gösterilmiştir (67). Bu işlevin, CYFIP2 transkribinde saptanan beyin spesifik RNA-*editing* durumuna bağlı olarak regüle edilip edilmediğinin aydınlatılması, henüz çok az bildiğimiz CYFIP2 proteinin hücresel fonksiyonu konusunu daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır (68). Gen ekspresyonları ile yapılan bir başka çalışmada da, multiple sklerozlu hastaların CD4+ T lenfositlerinde CYFIP2 nin artış yönünde regüle edildiği ve CYFIP2 düzeyindeki artmanın fibronektin-bağımlı bağlanmaları arttırdığı bildirilmiştir (73). Bu bulgu ile bağlantılı olarak, *CYFIP2* gen bölgesinde, ters zincirde okunan küçük bir genin, *c5orf7*, fibronektin tip-III domaini bulunduğunu ve *CYFIP2* geni dizilenirken rastlantı nedeniyle bu küçük genin de dizilendiğini, ancak SNP dışında herhangi bir bulgu ile karşılaşılmadığını burada belirtmek isteriz.

Hasta grubumuzu oluşturan 20 adet küçük NSMR ailesinde, aile ağaçları ayrıntılı değerlendirildiğinde, OR kalıtımın tek olası kalıtım modeli olduğu düşünülen 16 aile olduğu ve geriye kalanlarda, X e bağlı kalıtım olasılığının dışlanamayacağı belirlendi. Bu ailelerde, sayısal ve büyük yapısal kromozom anomalileri, subtelomerik yeniden düzenlenmeler ve *FMR1* geninde CGG üçlü tekrarlarının dışlanması, çalışma grubumuzun belirlenmesinde seçici davranıldığını göstermektedir.

CYFIP1 genindeki homozigotluk çalışmalarında 20 aileden 15 i informatif 2 si yarı informatif allel vermiş ve hiç biri bölge ile homozigot bağlantı göstermemiştir. Yüksek akrabalık oranına rağmen, saptanan bu sonuç oldukça dikkat çekicidir. Jiang ve ark. (66) yaptıkları bir çalışmaya dayanarak, bu bölgenin yüksek düzeyde polimorfik olduğunu belirtmesi, yüksek informatiflik oranını açıklamaktadır. İnformatif ailelerimizde, OR kalıtımı destekleyecek olan homozigotluk saptanmadığından, *CYFIP1* geni için dizileme yapılmamıştır.

CYFIP1 ile aynı protein ailesinde olması, yüksek homoloji göstermesi ve FMRP ye bağlanan proteinlerden biri olması nedeniyle aday gen olarak seçilen CYFIP2 geni için uygulanan homozigotluk haritalamasında, 20 ailenin 15 i informatif, 4 ü yarı informatif sonuç verdi. M59 ailesinin benzer bulgulara sahip 2 etkilenmiş kardeşin farklı alleller için homozigot haplotiplere sahip olmaları nedeniyle bölge için bağlantısız oldukları düşünüldü. M143 ailesinde etkilenmiş birey tüm markörler için homozigot haplotipe sahip iken sağlıklı kardeş ekson 9-27 arasındaki bölge için homozigotluk gösterdi. Bu durum, ailede CYFIP2 geninin ekson 9-27 arasının etkilenmiş ve etkilenmemiş bireyler için aynı polimorfik yapıya sahip olmaları nedeniyle bağlantısız, ekson 4-8 arasının ise informatif homozigot haplotipe sahip olması nedeniyle bağlantılı olarak değerlendirildi. Bu nedenle, M143 olgusunda CYFIP2 geninin ekson 4-8 arasının dizilenmesi planlandı. Homozigotluk gösteren 3 aileden 3 olguda *CYFIP2* nin 16-17 inci eksonlar dışındaki tüm eksonları dizilenmiştir. Pek çok kez, tüm koşullar değiştirilerek yapılan çalışmalara rağmen bu eksonların PCR ile çoğaltılması mümkün olamamıştır. Diğer eksonların PCR işleminde sorun yaşanmazken bu eksonlarda ciddi sorun yaşanmasının, seçilen primerler ile ilgili olabileceği görüşüne varılmıştır. CYFIP2 nin primer tasarımları 2006 yılında gerçekleştirilmişti. Ekson 16 ve 17, çok yakın yerleşimli olduklarından, bir çift primerle her iki eksonun birlikte amplifiye edilmesi amaçlanmıştı. Primer tasarımlarında uluslararası kullanıma açık moleküler genetik veri-tabanlarından faydalanılmaktadır. Bu elektronik veritabanları tüm canlı genomlarının yapılarını ve işlevlerini genelde ücretsiz olarak dünyadaki tüm araştırmacıların kullanımına sunmaktadır. Araştırmalardan elde edilen yeni bilgilerle içeriği düzenli olarak güncellenmektedir. 2008 yılındaki güncellenmiş veri tabanı incelemelerinde, "ileri" primerde (CYFIP2F14) bir SNP olduğu ve "geri" primerin de (CYFIP2R14) bir STR markörü içinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu yeni bilgi ile, daha önce tasarlanan geri primerin non spesifik amplifikasyonlara yol açacak biçimde yanlış yerleşimli olduğu ve PCR daki başarısızlığının nedeni olduğu kararına varıldı. Ekson 16 ve 17 için ayrı ayrı yeni primerler tasarlanarak çalışmaya bu primerlerle devam edilmesi planlandı.

CYFIP2 geni için tamamlanan diğer dizi analizlerinde tanımlanmış birden fazla SNP nin varlığı saptandı. M88 ailesindeki etkilenmiş bireyde, genin 3' translasyona uğramayan bölgesinde daha önceden tanımlanmamış yeni bir dizi değişimi (c.*2380 T/G) heterozigot olarak saptandı. Bu gende 3' yönünde kullanılan en son markör intron 27 de yer almaktadır. Bu nedenle, saptadığımız dizi değişimi haplotip için seçilen

markörlerin dışında yer almaktadır. Bu nedenle c.*2380 T/G dizi değişiminin otozomal resesif bir etkisi söz konusu değildir. Genlerin 3' UTR bölgelerinde çok sayıda SNP görülebilmektedir. Bazı genlerin bu bölgelerinde -AAUAAA- olarak yer alan çok korunmuş sinyal dizileri bulunduğu bildirilmektedir. Bu özgün diziden 30-35 nükleotid sonra mRNA lar kırılarak, yerine poli(A) kuyruğu takılmaktadır. Sinyal dizisinin gen ekspresyonunda önemli olduğu vurgulanmakta ve poli(A) kuyruğunun mRNA stabilitesini arttırdığı belirtilmektedir (89). *CYFIP2* gen dizisinin 3' UTR bölgesi incelendiğinde, poli(A) kuyruk takma sinyal dizisi olarak kabul edilen -AAUAAA- dizisine rastlanmamıştır. Bizim saptadığımız dizi değişimi, genin "dur" kodonundan 3' yönüne doğru 2504 nükleotid uzakta yer almaktadır. Bu nedenlerle, saptadığımız dizi değişiminin yeni bir SNP olduğuna ve bu bilginin NCBI'nın SNP veri tabanına bildirilmesi ve uluslararası kullanıma verilmesine karar verildi.

M88 ve M124 de saptanan SNP lerin homozigot ve heterozigot durumları, homozigosite haritlaması ile uyumlu bulunurken, M123 de ise intron 24 de saptanan heterozigot SNP, homozigosite haritalaması ile uyumsuz bulunmuştur. Bunun nedeni, her bir SNP nin her bir toplumda farklı heterozigotluk oranlarında görülmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Buradaki sonuçlar, *CYFIP1* veya *CYFIP2* nin bizim ORNSMR ailelerimizde etkin olmadığına vurgu yapsa da, yüksek genetik heterojenite nedeniyle, bu genlerin başka MR ailelerinde otozomal resesif ve/veya yeni mutasyonlarla otozomal dominant etkide kendini göstermesi olasılığı göz ardı edilmemelidir. Bundan sonraki aşamada, ailelerimizde FMRP ile etkileşime giren diğer proteinlerin incelenmesinin, MR nin moleküler patofizyolojisi konusunda yapılan çalışmalara katkı getireceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV).* American Pyschiatric Association. Washington, DC: APA; 1994.

2. Ropers H. X linked mental retardation : many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2006; **16**: 260-269.

3. Taşdemir HA. Motor-Mental Gerilik. İçinde Aysun S, editor. *Çocuk Nörolojisi*. Ankara: Alp Ofset Matbaacılık; 2006. pp. 159-177.

4. Daily DK, Ardinger HH, Holmes GE. Identification and evaluation of mental retardation. *Am Fam Physician* 2000; **61**: 1059-67.

5. Moog U. The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. *Am J Med Genet* 2005; **137A**: 228-231.

6. Kodama Y. Cytogenetic and dermatographic studies on severely handicapped patients in an institution. *Acta Medica Okayama* 1982; **36**: 383-398.

7. Felix TM, Leite JC, Maluf SW, Coelho JC. A genetic diagnostic survey in a population of 202 mentally retarded institutionalized patients in the south of Brazil. *Clin Genet* 1998; **54**: 219-223.

8. Hou JW, Wang TR, Chuang SM. An epidemiological and aetiological study of children with intellectual disability in Taiwan. *J Intellect Disabil Res* 1998; **42**: 137–143.

9. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005. pp. 159-164.

10. Vries BBA, Winter R, Schinzel A, Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; **40**: 385–398.

11. Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006; **117**: 2304-2316.

12. Çoğulu Ö, Karaca E, Özkınay F. Mental retardasyon ve kromozomlarda subtelomerik bölge. *Med J Bakırköy* 2006; **2**: 73-81.

13. *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM)* (internette), Erişim 07.04.2008, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD) World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.

14. Chelly J, Mandel JJ. Monogenic causes of X linked mental retardation. *Nature Rew* 2001; **2**:669-680.

15. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 422–434.

16. *GeneTests* (internette), Erişim 07.04.2008, University of Washington (Seattle) World Wide Web URL: http://www.genetests.org.

17. Roelfsema JH., Peters DJ. Rubinstein-Taybi syndrome: clinical and molecular overview. *Expert Rev Mol Med* 2007; **9**: 1-16.

18. Roelfsema JH, White SJ, Ariyurek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet* 2005; **76**: 572–580.

19. Ozalp I, Coskun T, Ceyhan M, Tokol S, Oran O, Erdem G, Tekinalp G, Durmus Z, Tarikahya Y. Incidence of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in a sample of the newborn population. *J Inher Metab Dis 9 Suppl* 1986; **2**: 237.

20. Oostra BA, Willemsen R. A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 249-257.

21. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 901-908.

22. Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moine H. The Rna binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell* 2003; **5**:221-228.

23. Kooy RK, Willemsen R, Oostra BA. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol Med Today* 2000; **6**: 193-198.

24. Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. The fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull* 2001; **56**: 375-382.

25. Willemsen R, Oostra BA, Bassell GJ, Dictenberg J. The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology. *Men Ret and Dev Dis* 2004; **10**: 60-67.

26. Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT. Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 863-869.

27. Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1315-1322.

28. Bardoni B, Willemsen R, Weiler IJ, Schenck A, Severijnen LA, Hindelang C, Lalli E, Mandel JL. NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneurosomes. *Exp Cell Res* 2003; **289**: 95-107.

29. Ceman S, Nelson R , Warren ST. Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 904-908.

30. Ceman S, Brown V, Warren ST. Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 7925-32.

31. Jin P, Alisch RS, Warren ST. Rna and microRnas in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1048-1053.

32. Vanagaite L Genetics of autosomal recessive non syndromic mental retardation: recent advances. *Clin Genet* 2007; 72: 167-174.

33. Uyguner O, Kayserili H, Li Y, Karaman B ve ark. A new locus for autosomal recessive non syndromic mental retardation maps to 1p21.1-p13.3. *Clin Genet* 2007; 71: 212-219.

34. Najmabadi H, Motazacker M, Garshasbi M, Kahrizi K ve ark. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* 2007; **121**: 43-48.

35. Guzauskas GF, Ukadike K, Rimsky L, Anand K. tSNP-based identification of allelic-loss of gene expression in a patient with a balanced chromosomal rearrangement. *Genomics* 2007; **89**: 562-565.

36. Holinski-Feder E, Reyniers E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P ve ark. Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3) *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 16–25.

37. Brouwer PM, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BBA, van Bokhoven H ve ark. Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX Consortium. *Hum Mutat* 2007; **28**: 207-208.

38. Buisson NB, Chelly J, Portes V. Update on the genetics of X-linked mental retardation. *Rev Neurol* 2006; **162**: 952-963.

39. Kerr B, Turner G, Mulley J, Gedeon A, Partington M. Non-specific X linked mental retardation . *J Med Genet* 1991; **28**: 378–382.

40. Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 8-20.

41. Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington M, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nature Genet* 1998; **20**: 25-30.

42. Bienvenu T, des Portes V, McDonell N, Carrie A, Zemni R, Couvert P, Ropers HH, Moraine C ve ark. Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Med Genet* 2000; **93**: 294-298.

43. Gedeon AK, Nelson J, Gecz J, Mulley JC. X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet* 2003; **120A**: 509-517.

44. Peippo M, Koivisto AM, Sarkamo T, Sipponen M, von Koskull H, Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K ve ark. PAK3 related mental disability: further characterization of the phenotype. *Am J Med Genet* 2007; **143A**: 2406-2416.

45. *Uniprot/SWISSPROT* (internette), Erişim 22.04.2008, World Wide Web URL: http://beta.uniprot.org

46. Froyen G**,** Corbett M**,** ve ark. Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 432-443.

47. Yoon SY, LeeY, Kim JH, Chung AS, Joo JH, Kim CN, Kim NS, Choe IS, Kim JW. Over-expression of human UREB1 in colorectal cancer: HECT domain of human UREB1 inhibits the activity of tumor suppressor p53 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 7–17.

48. Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, Imafuku I, Udagawa Y, Kanazawa I ve ark. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum Molec Genet* 1999; **8**: 977-987.

49. Poirier K, Lacombe D, Gilbert-Dussardier B, Raynaud M, Desportes V, de Brouwer APM ve ark. Screening of *ARX* in mental retardation families: consequences for the strategy of molecular diagnosis. *Neurogenetics* 2006; **7**: 39-46.

50. Sherr EH. The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. Curr Opin Pediatr 2003; **15**: 567–571.

51. Smith M, editor. *Mental Retardation and developmental delay : genetic and epigenetic factors.* New York: Oxford University Press; 2006

52. Molinari F, Rio M, Meskenaite V, Encha-Razavi F, Auge´ J, Bacq D ve ark. Truncating Neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 2002; **298**:1779-1781.

53. Molinari, F.; Meskanaite, V.; Munnich, A.; Sonderegger, P.; Colleaux, L. Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: R195-R200.

54. Patthy L, Trexler M, Banyai L, Varadi A, Vali Z. Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS* 1984; **171**: 131-136.

55. Heider H, Dobler M, Hellsten M. The scavenger receptor cysteine rich (SRCR) domain of human macrophage scavenger receptor A1 is involved in chemotaxis. *Atherosclerosis* 2002; **3**: 122-123.

56. Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney J.P. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation**.** *Neurology* 2004; **63**: 1927-1931.

57. Higgins JJ, Rosen DR, Loveless JM, Clyman JC, Grau MJ. A gene for nonsyndromic mental retardation maps to chromosome 3p25-pter. *Neurology* 2000; **55**: 335-340.

58. Botos I, Melnikov EE, Cherry S, Tropea JE ve ark. The Catalytic Domain of *Escherichia coli* Lon Protease Has a Unique Fold and a Ser-Lys Dyad in the Active Site. *J Biol Chem* 2004; **279**: 8140-8148.

59. Xin W, Xiaohua N, Peilin C, Xin C. Primary function analysis of human mental retardation related gene CRBN . *Mol Biol Rep* 2007; epub

60. Basel-Vanagaite L, Attia R,Yahav M. ve ark. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet* 2006; **43**: 203–210.

61. Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann B, ve ark. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 792-798.

62. Nomura N, Nagase T, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Sato S, Seki N. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes.II. the coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0080) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res* 1994; **1**: 223-229.

63. Chai JH, Locke DP ve ark. Identification of Four Highly Conserved Genes between Breakpoint Hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman Syndromes Deletion Region That Have Undergone Evolutionary Transposition Mediated by Flanking Duplicons. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 898–925.

64. Schenck A, Bardoni B, Moro A, Bagni C, Mandel JL. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein and displaying selective interactions with FMRP- related proteins FXR1P and FXR2P. *PNAS* 2001; **98**: 8844-8849.

65. Kobayashi K, Kuroda S, Fukata M, Nakamura T, Nagase T, Nomura N, Matsuura Y, Yoshida-Kubomura N, Iwamatsu A, Kaibuchi K. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 291-295.

66. Jiang Y, Wauki K, Liu Q, Bressler J, Pan Y, Kashork CD, Shaffer LG, Beaudet AL. Genomic analysis of the chromosome 15q11-q13 Prader-Willi syndrome region and characterization of transcripts for GOLGA8E and WHCD1L1 from the proximal breakpoint region. *BMC Genomics* 2008; **9**: Published online.

67. Saller E, Tom E, Brunori M ve ark. Increased apoptosis induction by 121F mutant p53. *EMBO J* 1999; **18**: 4424-4437.

68. Levanon EY, Hallegger M, Kinar Y, Shemesh R, Djinovic-Carugo K, Rechavi G, Jantsch MF, Eisenberg E. Evolutionarily conserved human targets of adenosine to inosine RNA editing. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:1162-1168.

69. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Sequence Similarity DataBase* (internette) Erişim 22.05.2008, http://ssdb.genome.jp.

70. Preker PJ, Keller W. The HAT helix, a repetitive motif implicated in RNA processing. *Trends Biochem Sci.* 1998; **1**:15-16.

71. Bagyan I, Setlow B, Setlow P. New small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *J Bacteriol* 1998; **180**: 6704-6712.

72. Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein.*Neuron* 2003; **38**: 887-898.

73. Mayne M, Moffatt T, Kong H, McLaren PJ, Fowke KR, Becker KG, Namaka M, Schenck A, Bardoni B, Bernstein CN, Melanson M. CYFIP2 is highly abundant in CD4+ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 1217-1227.

74. Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 1987; **236**: 1567-70

75. Fukushima K, Ueki Y, Smith RJ. Sensorineural hearing impairment, non-syndromic: DFNB5, 6, 7. Homozygosity mapping to localize genes causing autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Adv Otorhinolaryngol* 2000; **56**:152-7.

76. Woods CG, Valente EM , Bond J, Roberts E. A new method for autozygosity mapping using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and EXCLUDEAR. *J Med Genet* 2004; **41**:e101.

77. Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR, Ni L, Chen A, O'Neill M, Van Camp G, Coucke P, Smith SD, Kenyon JB ve ark. Consanguineous nuclear families used to identify a new locus for recessive non-syndromic hearing loss on 14q. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1643-8.

78. Strachan T, Andrew PR. *Human Molecular Genetics 3*, 3rd ed. New York: Garland Publishing; 2004. pp. 416-423.

79. Burpo FJ. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. 2001

80. Ghanbari Marand A. De novo yapısal kromozom anomalilerinde mikrosatellit analizleri ile parental kökenin belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. İstanbul. 2005.

81. Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex* 2000; **10**: 1038-1044.

82. Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition . *Trends Neurosci* 2002; **25**: 191-199.

83. Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell J, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD ve ark. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell.* 2001; **107**: 477–487.

84. Gantois I, Frank Kooy R. Targetting fragile X. *Genome Biol* 2002; **3** (85), published online.

85. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 2002; **16**: 2491-96.

86.Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and sibosomal proteins. *Genes Dev* 2002; **16**: 2497-2508.

87. Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 7101-06.

88. Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. Mechanism of regulation of WAVE1 induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 2002; **418**: 790-3.

89. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4rd ed. New York: Garland Publishing; 2002. pp.326-328.

90. *Enterez Gene* (internette), Erişim 07.04.2008, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD) World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/enterez.

91. Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F ve ark. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 1158-1164.

92. Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J ve ark. Oligosaccharyltransferase subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 1150-1157.

93. Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB. Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomis* 1996; **35**: 46-54.

FORMLAR

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTES
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Proje Adı:

Hastalık adı:

Tarih:

Bu araştırma, kalıtsal bir hastalığı bulunan hastalar ile ailelerini ilgilendiren bir çalışmadır. Böylesi bir çalışmaya katılma kararı vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Aşağıdaki **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Olur Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı:

Araştırmanın amacı sizde/ aile bireylerinizde yukarıda belirtilen genetik hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Yapılan epidemiyolojik ve genetik çalışmalar, bu hastalığa genetik faktörlerin yol açabileceğini düşündürmektedir. Hastalığa neden olan gen ve genlerin tanımlanabilmesi amacı ile yapılacak analizler için sizden ve ailenizin etkilenmiş ve etkilenmemiş üyelerinden kan örnekleri almamız gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır. Bu çalışma için sizden alınan kanlardan elde edilecek DNA örnekleri başka bir çalışma için kullanılmayacaktır.

2. Olası riskler ve faydalar :

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Ancak yaptığımız testlerin sizin veya ailenizin bir bireyinin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabileceğini belirtmek isteriz. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizde psikolojik sorun da yaratabilir. Sizde böyle bir gen bulunduğunu saptadığımızda bulgularımızı istediğiniz takdirde size bildireceğiz. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

ve bunun ilerdeki kuşaklar için bir risk oluşturduğunu bulabiliriz. Bu bulgularımız çocuklara erişkin çağa ulaşıncaya kadar anlatılmayacak ve onlarla tartışılmayacaktır. Erişkin dönemlerinde kendi arzuları doğrultusunda bilgi ve genetik danışma sağlanacaktır. Bu açıklamalar doğrultusunda çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı ailenizde saptanan genetik hastalığa neden olan veya ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada size veya çocuğunuza doğrudan yada dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte diğer hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz taktirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

---

(Doktor Adı)

hastaya, ---

(Aile Adı)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :

Doktorun imzası:

Kontak kurulabilecek kişiler: Doç. Dr. Z. Oya UYGUNER
Bio. Z.Gamze GÜVEN

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 631 13 63
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 - 32327

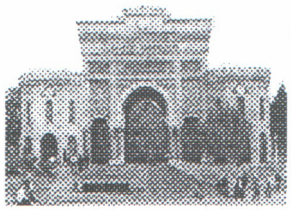
Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: guvengamze@yahoo.com

İzin: Yukarıda tanımlanan araştırmanın uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

	Adı Soyadı	Doğum tarih	İmza	(Ebeveyn)
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2192 **Tarih : 11/11/2006**

Konu : Doç.Dr.Z.Oya Uyguner hk.

Sayın Doç.Dr.Z.Oya Uyguner
İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İlgi : 18.09.2006 tarih ve 039426 sayılı yazınıza cevaben.

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Zeynep Gamze GÜVEN'in yürüteceği 2006/1858 dosya no'lu "Non-spesifik mental retardasyon olgularında CYFIP1 (FMR1 etkileşimli sitoplazmik protein1) geninin incelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi kurulumuzun 11.10.2006 tarihli,10 sayılı toplantısında onaylandığına ilişkin tutanağımız ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 11/10/2006

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırıcılığını Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Z.Oya UYGUNER'in, üstlendiği Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Zeynep Gamze GÜVEN'in yürüteceği 2006/1858 protokol numaralı "Non-spesifik mental retardasyon olgularında CYFIP1 (FMR1 etkileşimli sitoplazmik protein1) geninin incelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilimdalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBECİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Nuran YİLDIRIM
Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

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

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL
Patoloji A.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL
Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep Gamze	**Soyadı**	GÜVEN
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	03.06.1982
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	10018848976
Email	guvengamze@yahoo.com	**Tel**	0532 470 10 93

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Genetik Programı	2008
Lisans	İstanbul Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2004
Lise	F.M.V. Nişantaşı Işık Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**ÜDS Puanı**	**TOEFL Puanı**
İngilizce	Çok İyi	İyi	Çok İyi	76.250	243

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
ALES Puanı	72.778	74.234	75.346

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Ulusal Kongre Özetleri

1. Candan Ş, Kayserili H, **Güven G**, Eriş H, Başaran S, Uyguner O. Aristaless homeobox (ARX) geni. I. Nörogenetik Sempozyumu, 04-06 Kasım 2007; İzmir. Kongre Kitapçığı syf. 22 (sözlü sunum)

2. **Güven G**, Kayserili H, Üzümcü A, Eriş H, Yılmaz K, Karaman B, Başaran S, Uyguner O. Otozomal resesif non-sendromik mental retardasyon olgularında CYFIP1 ve CYFIP2 genlerinin incelenmesi. Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008; Çanakkale. Kongre Kitapçığı sf.197 (poster)

Uluslararası Kongre Özetleri

1. **Güven G**, Kayserili H, Üzümcü A, Eriş H, Yılmaz K, Karaman B, Başaran S, Uyguner O. Investigation of CYFIP1 and CYFIP2 genes in patients with autosomal recessive non-syndromic mental retardation. European Society of Human Genetics Conference 2008 (31 Mayıs- 3 Haziran Barcelona)

2. Uyguner O, Kayserili H, **Güven G,** Emiroğlu M, Baserer N, Wollnik B. A novel homozygous *COLL11A2* deletion causes a C-terminal protein truncation without mRNA decay in a Turkish patient. European Society of Human Genetics Conference 2008 (31 Mayıs- 3 Haziran Barcelona)