

Spinal Müsküler Atrofi Hastalarında SMN Geni Ekzon 7 ve 8'in Moleküler Analizi / Molecular Analysis of Exon 7 and 8 of SMN Gene in Spinal Muscular Atrophy Patients

Sabriye Kocatürk Sel,¹ Halil Kasap,¹ Filiz Koç,² Ali İrfan Güzel,¹ Özlem Hergüner,³ Yakup Sarıca²

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji¹, Nöroloji² Anabilim Dalı, Pediatrik Nöroloji³ Bilim Dalı, ADANA

ABSTRACT

Molecular Analysis of Exon 7 and 8 of SMN Gene in Spinal Muscular Atrophy Patients

Scientific background: The spinal muscular atrophy (SMA) causing degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord is the most common autosomal recessive disease, affecting approximately 1 in 6.000-10.000 live births and having a carrier frequency of approximately 1 in 40-60. SMA is diagnosed with detection of homozygous deletions of SMN1 (exon 7 - 8 or exon 7) gene in molecular level.

Objectives: It is aimed to conduct molecular analysis of exon 7 and 8 of SMN gene in a hundred and eight subjects of SMA (53 patients and 55 suspected subjects).

Materials and methods: PCR-RFLP method is used for detection of homozygous exon 7 - 8 deletions. PCR-SSCP method was used either to identify for intragenic mutations and especially compound heterozygotes or to confirm some SMA patients homozygous deletions detected by RFLP.

Conclusion: In this study, 92.4% (49/53) of SMA patients including all types were found homozygous for exon 7 and 8 deletions with RFLP method. The rate of homozygous deletions determined was 94.7% (18/19) in type I patients, 91.6% (11/12) in type II and 89.4% (17/19) in

type III. SSCP method was used only for 4 subjects who are clinically diagnosed as SMA patients but not confirmed with RFLP analysis. The results of SSCP analyses led to decision that patients may be of compound heterozygous or intragenic mutations.

ÖZET

Bilimsel zemin: Spinal müsküler atrofi (SMA), 6.000-10.000 canlı doğumda bir görülen, 1/40-60 oranında taşıyıcı frekansına sahip, omuriliğin ön boynuz hücrelerinde dejenerasyona neden olan otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. SMA moleküler düzeyde, SMN1 geninin exon 7 ve 8 veya yalnızca exon 7 homozigot delesyonunun saptanması ile teşhis edilir.

Amaç: SMA tanısı alan veya SMA olasılığı taşıyan 108 kişide (53 hasta ve 55 olası hasta) SMN geni ekzon 7 ve 8'in moleküler analizi amaçlanmıştır.

Yöntem: PCR-RFLP yöntemi homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonlarını belirlemek için kullanılmıştır. PCR-SSCP methodu, hem diğer intragenik mutasyonlar ve özellikle birleşik (compound) heterozigotları hem de RFLP yöntemi ile homozigot delesyon saptanan bazı SMA hastalarının sonuçlarını konfirme etmek için kullanılmıştır.

Keywords: RFLP, SMA, SMN gene, SSCP

Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

Sabriye Kocatürk Sel
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Balcılı/ ADANA
Tel: +90-322-338 60 60-3498
selsabriye@gmail.com

Anahtar kelimeler: RFLP, SMA, SMN geni, SSCP

Dergiye Ulaşma Tarihi/Received: 03.08.2006

Kesin Kabul Tarihi/Accepted: 07.08.2006

Sonuçlar: RFLP yöntemi ile tüm SMA hastalarının (tiplerine bakılmaksızın) %92.4 (49/53)'ünde SMN1 geni homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonu tespit edilmiştir. Tipleri dikkate alındığında ise Tip 1 hastalarının %94,7 (18/19), Tip 2 hastalarının %91.6 (11/12), Tip 3 hastalarının %89.4 (17/19)'ünde homozigot delesyon bulunmuştur. PCR-RFLP yöntemi ile ekzon 7 ve 8'de homozigot delesyonunun olmadığı belirlenen fakat klinik olarak SMA hastası olan 4 olguda ise SSCP yöntemi kullanılmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde ise birleşik heterozigot veya intragenik mutasyonlu hasta olabileceği sonucuna varılmıştır.

GİRİŞ

Spinal müsküler atrofi (SMA), henüz tedavisi olmayan bir grup hastalığa verilen addir.¹ Bu hastalığın tüm tiplerinde omuriliğin ön boynuz hücrelerinde dejenerasyon meydana gelir.^{2,3} Hastalığın genel popülasyonda görülme sıklığı 1/6000-10000, taşıyıcı insidansı ise 1/40-60'tır.^{4,5,6,7,8,9,10,11} Uluslararası SMA Konsorsiyumunun, hastalığın başlama yaşı, klinik bulgular, kas biyopsisi ve elektrofizyolojik kriterlere dayanan hastalık şiddetine göre yaptığı sınıflandırmaya göre çocukluk çağında ortaya çıkan SMA'lar; Tip I SMA (Akut form / İnfantil form / Werdnig-Hoffmann), Tip II SMA (Ara form / Intermediate form), Tip III SMA (Hafif form / Kugelberg-Welander) olarak, yetişkin çağda görülen tipi de Tip IV SMA olarak sınıflandırılmıştır.^{12,13,14}

SMA Tip III %98 oranında otozomal resesif olarak kalıtılırken, Tip IV'de bu oran %70 olup %2-%30 gibi bir oranda ise farklı genlerin etkisiyle ortaya çıkan otozomal dominant veya X'e bağlı resesif kalıtım görülmektedir.^{15,16}

Genetik bağlantı çalışmaları ile gerek çocukluk çağı ve gerekse yetişkin yaşta görülen SMA tiplerine neden olan gen bölgelerinin kromozom 5q13 bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir.^{9,17} Hastalıktan sorumlu olan bölgede, survival motor nöron (SMN), nöral apoptozis inhibitör protein (NAIP), p44 ve fonksiyonu henüz bilinmeyen fakat SMA ile ilişkili olduğu düşünülen H4F5 (SMA modifiye edici) geni bulunmaktadır.^{18,19,20}

Hastaların %94'ünde SMN geninde delesyon görülmesi, hastalıktan sorumlu olan asıl genin SMN

olduğunu göstermiştir.¹⁹ SMN geni 20 kb'lık 9 ekzondan oluşmakta ve 294 amino asitlik 38 kDa'luk bir proteini kodlamaktadır.^{2,21,22,23,24} SMN geninin telomer ve sentromer yakınlıklarına göre adlandırılan telomerik (SMN1 veya SMN1; OMIM 600354) ve sentromerik (SMN2 veya SMN2c, cBCD54; OMIM 601627) kopyaları bulunmaktadır.^{20,25} Birbirlerine yüksek derecede (%99) homoloji gösteren bu kopyalar arasında beş nükleotidlik fark bulunmaktadır.^{19,23,26,27,28,29} İntronlar arasında üç nükleotidlik fark bulunurken, ekzonlar arasında sadece iki nükleotidlik fark bulunmaktadır. Bu farklılıklardan bir tanesi intron 6'da, iki tanesi de intron 7'dedir. Ekzon 7'de mRNA'da kodon 280'de C→T (TTC→TTT) sessiz transisyonu görülürken ekzon 8'in 3' translasyonu uğramayan bölgesinde nükleotid 1155'te (G→A) nükleotid farklılığı görülür.^{14,19,25,30}

SMN1 ve SMN2 genelde aynı proteini kodlamasına rağmen SMN1'de görülen mutasyonlar SMA ile doğrudan ilişkilidir. SMN1'in d ve b olmak üzere 2 tip transkript varyantı vardır. Bunlardan, d izoformu tam uzunluktadır ve 294 amino asitlik aktif proteini kodlamaktadır. İzofom b ise 262 amino asitlik aktif olmayan proteini kodlamaktadır. SMN2'nin ise a [ekzon 7 eksik (Iso7-SMN)], b [ekzon 5 eksik (Iso5-SMN)], c [ekzon 5 ve 7 eksik (Iso57-SMN)] ve d (tam uzunlukta) olmak üzere 4 tip transkript varyantı vardır. SMN2'nin bu varyantlarından yalnızca izoform d tarafından tam uzunlukta aktif protein kodlanmaktadır.^{24,29} SMN2 tarafından kodlanan ürünlerden %60'ında ekzon 7 bulunmazken %40'ında bulunmaktadır ve oluşturulan ürün aktif formdadır.³¹ Bundan dolayı SMA fenotipi üzerine SMN2 geninin etkisi vardır.²⁴ SMN2 geninin homozigot delesyonunun olduğu durumlara da rastlanmış olmasına rağmen bu durum SMA ile ilgili klinik bir sonuç doğurmamaktadır.^{31,32}

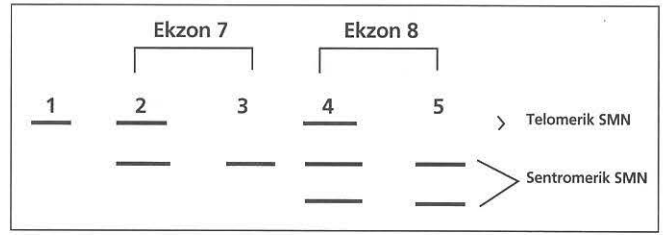
SMN1 ekzon 7 ve 8 veya yalnızca ekzon 7'nin homozigot delesyon oranı SMA hastalarının %94'ü olmakla birlikte SMA tiplerine göre de farklılık gösterir.^{14,19,33} Nadir durumlarda SMN1 geninde görülen bir takım intragenik mutasyonlar da bu

hastalığa sebep olmaktadır. Şimdiye kadar 23 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır.¹⁹ Bu mutasyonlar; zincir sonlandırıcı mutasyonlar (nonsense), çerçeve kayması mutasyonları (frameshift), yanlış anlamlı mutasyonlar (missense), delesyonlar, inversiyonlar ve kesim bölgesi mutasyonları (splice site mutations) şeklindedir.^{19,23,28}

Ayrıca SMA fenotipi göstermeyen fakat homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonuna sahip bazı bireyler tespit edilmiştir.^{6,19,27} Bu bireylerde homozigot ekzon 7 ve 8 yokluğunu telafi eden bazı genetiksel ve çevresel faktörlerin olabileceği düşünülmektedir.⁶

SMN1 geninin homozigot delesyonu veya SMN1 geninin SMN2 genine dönüşmesi (gen değişimi) dışında sadece bir kromozomdaki delesyon bağlı olarak da hastalığın ortaya çıktığı belirlenmiştir.^{19,31} Birleşik heterozigotluk olarak tanımlanan bu durumda delesyon görülmeyen diğer kromozom üzerinde intragenik nokta mutasyonları saptanmıştır.^{9,11,19,31} SMA Tip I hastalarının büyük çoğunluğu homozigot SMN1 delesyonuna sahipken Tip II ve Tip III hastalarında daha çok gen değişimi ile sayısı 3-4 arasında değişen SMN2 kopyasına sahiptir. Bu yüzden bu tip hastalarda SMN2 sayısı arttıkça hastalığın şiddeti de azalmaktadır.^{4,9,14,19, 22,23, 27,31}

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Length Fragment Polimorphism-RLFP) analizlerinde, ekzonlardaki nükleotid farklılıklarından faydalanılır. SMN geni 7. ekzon analizinde Dral ve 8. ekzon analizinde Ddel restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılır.³⁴ Sentromerik kopyada kesim yapan bu enzimler, nükleotid farklılığından dolayı telomerik kopyayı kesemezler, bu sayede telomerik /sentromerik kopyalar birbirinden ayrılır ve telomerik kopyadaki delesyonlar görülebilir.^{26,31,35} Dra I (Aha III) enzimi 188 bç uzunluğundaki DNA'yı TTT / AAA nükleotid bölgesinden 149 ve 39 bç uzunluğundaki 2 parçaya böler. Ddel enzimi ise 187 bç uzunluğundaki DNA'yı 5' C / TNAG 3' bölgelerinden 123 ve 64 bç uzunluğundaki parçalara böler^{7,36} (Şekil 1).



Şekil 1. SMN geni ekzon 7 ve 8'in restriksiyon enzimleri kesimi sonucu oluşan band profilleri. Dral ve Ddel enzimleri sentromerik kopyada kesim yapmakta ve bu şekilde telomerik ve sentromerik kopya birbirinden ayrılmaktadır. **1.** PCR ürünü **2.** Ekzon 7 delesyonu taşımayan birey **3.** Ekzon 7 delesyonu taşıyan birey **4.** Ekzon 8 delesyonu taşımayan birey **5.** Ekzon 8 delesyonu taşıyan birey.²⁶

Çalışmada SMA hastalarında SMN geni ekzon 7 ve 8'in moleküler analizi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı kliniğine başvurarak SMA tanısı alan veya SMA şüphesi olan 108 kişi çalışma hakkında bilgilendirilip oluru alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

DNA izolasyonu ve PCR

Periferik kandan Miller ve ark.'nın geliştirdiği salting out (tuzla çöktürme) yöntemi kullanılarak DNA izole edilmiştir.³⁷ SMN (Survival Motor Neuron) geninin Ekzon 7 ve Ekzon 8 bölgelerini çoğaltmak için Lefebvre S, van der Steege G ve ark.'nın çalışmalarında kullandıkları primerler (Ekzon 7 için **X7-Dra I:** 5' CCTTCCTCTTTTGGATTTTGT 3' **R111:** 5' AGACTATCAACTTAATTCTGATCA3'; Ekzon 8 için **541C960:** 5' GTAATAACCAA-TGCAATGTGAA 3' **541C1120:** 5' CTACAACACC-CTTCTCAC 3') seçilerek PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.^{38,39}

SMN geni Ekzon 7 ve Ekzon 8'in optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PCR reaksiyonu toplam hacmi 50 µl olacak şekilde; 1X PCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 200 İM dNTP, 0.05U/İl Taq Polimeraz enzimi, 20 pmol Primer 1 ve Primer 2, 500 ng genomik DNA (1/10 sulandırılmış), 36,6 µl bidistile su final konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları; 95.0 °C, 5 dk. ön denatürasyon, 94.0 °C, 45 sn. denatürasyon, 57.0 °C, 30 sn.

yapışma (annealing), 72.0 °C, 30 sn. sentez, her seferinde denatürasyon döngüsüne giderek toplam 30 döngü, 72.0 °C, 5 dk. final uzama periyodundan sonra 22.0 °C'de uzun süre olacak şekilde ayarlanmıştır.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

Agaroz jel elektroforeziyle amplifikasyon kontrolü yapılan DNA örnekleri, van der Steege ve ark.'nın yöntemine göre restriksiyon endonükleaz enzimleri ile (her birinden 10U) toplam hacmi 25 µl olacak şekilde 37 °C'de bir gece boyunca kesim reaksiyonuna alınmıştır.³⁹ Kullanılan restriksiyon enzimlerinin aktivite kontrolü için, hazırlanan her reaksiyon karışımı ile bir normal bir de mutant örnek kesimi yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri, %8'lik poliakrilamid jele [%40 (29:1)] akrilamid /bisakrilamid stok solüsyonu, 10 X TBE tamponu, %25 APS (Amonyum persülfat), TEMED ve bidistile su ile hazırlandı] yüklenerek 100V ve 70 mAmp akımda 1 saat 25 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. EtBr ile boyanıp Uvidoc jel görüntüleme cihazı ile görüntülenerek değerlendirilmiştir.

SSCP (Single Stranded Conformational Polimorphism) Analizi

Tek zincirde konformasyon polimorfizmi (Single Stranded Conformational Polimorphism-SSCP), tek zincir DNA'nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların oluşması ve poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir.

SSCP yapmadan önce çalışılacak örneklerin ekzon 7 PCR'ları yapıp non spesifik bantları içeren örnekleri dışlamak için %8'lik poliakrilamid jel elektroforezi ile spesifikliği kontrol edilmiştir. Denatürasyon solüsyonundan (%95 Formamid, 100mM NaOH, %0.25 Bromfenol mavisi) 4,5 µl alınıp 3 µl PCR ürünü ile karıştırılarak Thermal Cycler cihazında 95 °C'de 7 dakika denatüre

edilmiş ve denatürasyon işlemi sona ererken örnekler hızla buz üzerine alınmıştır. Buz kabı -20 °C'de 10 dakika bekletilmiş, jelin 1. kuyusuna marker DNA (3 µl), diğer kuyulara örnekler 7 µl olarak yüklenerek jeller, Bassam ve ark.'nın uyguladığı protokole göre gümüş boya ile boyanmıştır.⁴⁰

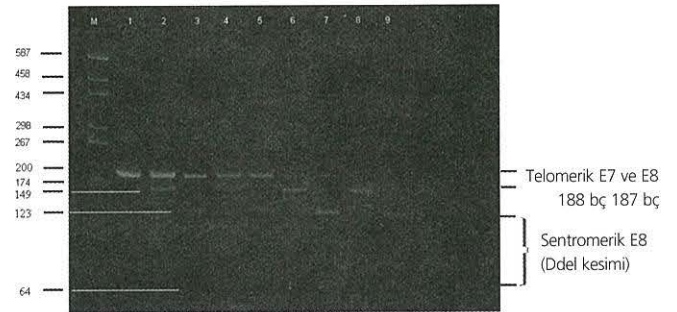
Yapılan ön denemelerde 700 volt (kısa süreli yürütme) ve 110 volt (uzun süreli yürütme) en uygun akım gücü ve süresi olarak belirlenmiştir. Sonuçların analizinde farklı uygulama koşullarının önemi yorumlanmaya çalışılmıştır.

BULGULAR

RFLP Bulguları

Uluslararası SMA konsorsiyum kriterleri dikkate alınarak hastalık tipine göre sınıflandırılan 108 olgudan 53 (%49)'üne klinik olarak SMA tanısı konulmuştur. Elde edilen sonuçlar oluru alınan 100 sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 1-2). RFLP yöntemi ile 53 hastanın 49 (49/53=%92.4)'unda homozigot ekzon 7 ve 8 kayıpları bulunmuştur (Tablo 1).

İkisi Tip III, diğerleri ise Tip I ve Tip II olan toplam dört hastada (4/53) ise SMN1 geninde homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonu bulunamamıştır.



Şekil 2. SMN geni ekzon 7 (188 bç) ve ekzon 8'in (187 bç) PCR-RFLP poliakrilamid jel (%8) elektroforez görüntüleri **M:** Markır (pUC 18 Hae III kesimi) **1:** PCR ürünü, **2 ve 4:** kontrol ekzon 7 (*Dra* I kesimi) (149 bç ve 39 bç: 39 bç uzunluğundaki parçalar küçük olduğu için jelde görülmez), **3 ve 5:** kontrol ekzon 8 (*DdeI* kesimi) (123 bç ve 64 bç: 64 bç uzunluğundaki DNA parçaları jele fazla diffüze olduğundan baskıda iyi çıkmamıştır), **6 ve 8:** ekzon 7 kaybı olan hastalar **7 ve 9:** ekzon 8 kaybı olan hastalar.

Tablo 1. Tiplerine göre SMA hastalarında SMN1 E7 ve E8 homozigot delesyon oranları

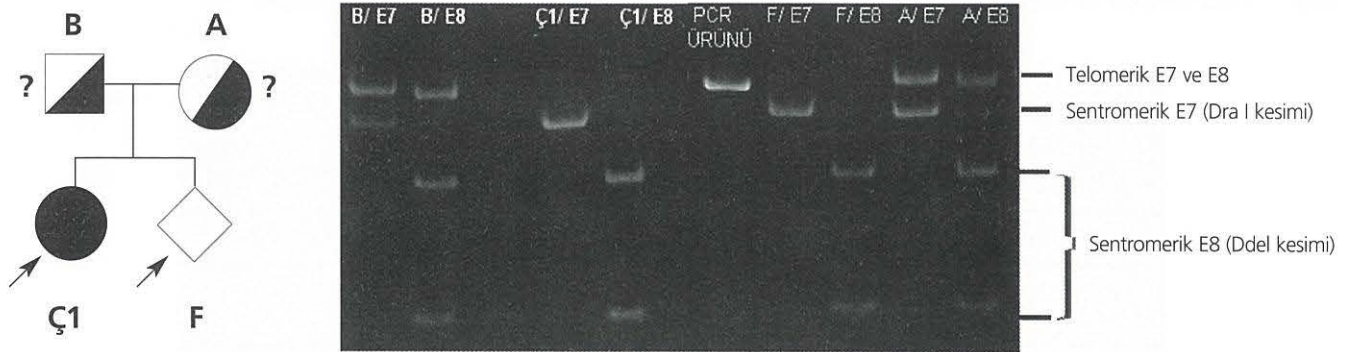
SMA tipi	n=53	Hom. E7 ve E8 del. hasta sayısı n=49	Hom. E7 ve E8 del. hasta sayısının, toplam del. hastalara oranı (%)	Hom. E7 ve E8 del. olan hasta sayısının, toplam SMA hastalarına oranı (%)	Tiplerine göre hom. E7 ve E8 del. olanların oranı (%)
TİP 1	19	18	%36.7 (18/49)	%33.9 (18/53)	%94.7 (18/19)
TİP 2	12	11	%22.4 (11/49)	%20.7 (11/53)	%91.6 (11/12)
TİP 3	19	17	%34.6 (17/49)	%32 (17/53)	%89.4 (17/19)
Tiplendirilme yapılamayan	3	3	%6.1 (3/49)	%5.6 (3/53)	

Hom.: Homozigot E: Ekzon Del.: Delesyon

Hastaların birinde ise ailenin isteği üzerine prenatal tanı yapılmıştır (Şekil 3). Fetüste (F) homozigot ekzon 7 ve ekzon 8 kaybının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu ailenin 5 yaşındaki Tip 3 SMA'lı kız çocuğunda (Ç1) homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonu tespit edilirken ebeveynlerin homozigot delesyona sahip olmadıkları belirlenmiştir. SMA'nın otozomal resesif kalıtıldığı dikkate alınacak olursa her iki çocukta da mutasyonlar spontan değilse ebeveynlerin zorunlu taşıyıcı olabilecekleri düşünülmüştür.

allelede de nokta mutasyonu taşıyan hastalar olabileceği düşünülerek bunlar, moleküler açıdan şüpheli hasta (Ş) grubu başlığı altında Ş 109 (Tip 3 SMA), Ş 140 (Tip 2 SMA), Ş 218 (Tip 1 SMA), Ş 394 (Tip 3 SMA) olarak kodlanmıştır. Ayrıca SMA hastası olmayan fakat yalnızca sentromerik ekzon 7 ve ekzon 8 homozigot delesyonuna sahip bir olgu da (Ş 381 kodlu) bu gruba dahil edilmiştir.

Kontrol grubu olarak alınan 100 sağlıklı kişiden 26'sı ve 12 homozigot delesyonlu hasta SSCP



Şekil 3. Prenatal tanısı yapılan fetüsün ve ailesinin pedigrisi ve PCR-RLFP poliakrilamid jel (%8) elektroforez görüntüleri. F ve Ç1 homozigot ekzon 7 ve 8 delesyona sahipken anne ve babada homozigot delesyon bulunmamıştır. Hastalık otozomal resesif kalıtıldığı için ebeveynler muhtemelen zorunlu taşıyıcıdır. B: Baba Ç1: Hasta çocuk F: Fetüs A: Anne

SSCP Bulguları

RFLP yöntemi, birleşik heterozigot hastaların belirlenmesinde yetersiz kaldığı için hem birleşik heterozigot hastaları belirlemek hem de RFLP yöntemi ile saptanan homozigot delesyonlu SMA hastalarını doğrulamak için SSCP yöntemi uygulanmıştır.

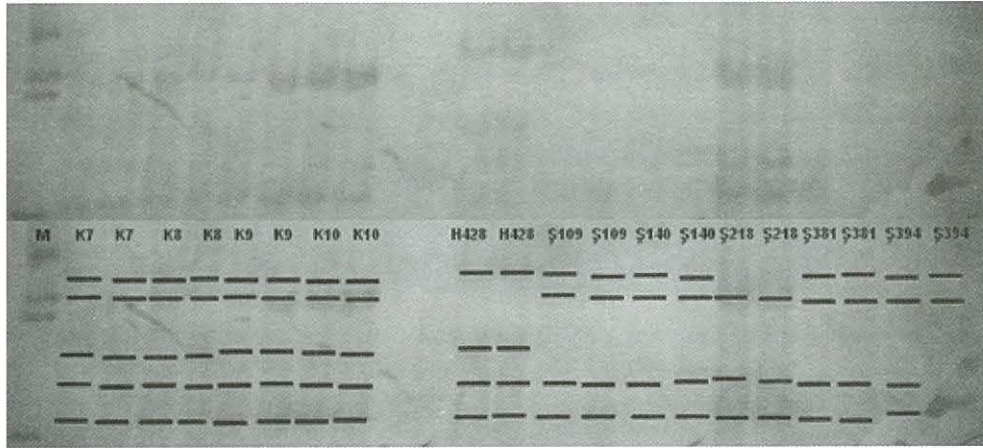
RFLP yöntemi ile homozigot ekzon 7 ve ekzon 8 delesyonu tespit edilemeyen dört hastanın, muhtemelen birleşik heterozigot veya her iki

yöntemi ile çalışılmıştır. Yöntemin standardizasyonunu yapmak için uygulanan beş farklı elektroforez koşulunda beş çeşit DNA bant motifi saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol olarak 26 sağlıklı, 12 homozigot delesyonlu hasta ve nokta mutasyonlu bileşik heterozigot SMA şüphesi ile araştırılan 5 hastanın SSCP yöntemi ile saptanan DNA bandı motifleri

MOTİF (Bantların sayı ve konumu itibari ile oluşturduğu özgün kompozisyonları) ve ELEKTROFOREZ KOŞULLARI	SAĞLIKLI HASTA KONTROLÜ (Örnek sayısı)*	HOMOZİGOT DELESYONLU HASTA KONTROLÜ (Örnek sayısı)*	ŞÜPHELİ HASTA (Örnek kodu)
1. MOTİF (İki kez tekrarlandı) 700 voltta 2 s 40 dk. yürütüldü.	(2) (1) == == ==	(2) == ==	(§109, §140, §218, §381, §394) == == ==
2. MOTİF 700 voltta 2 s. 30 dk. yürütüldü.	(3) (1) == == ==	(2) == ==	(§140) (§109, §218, §381, §394) == == ==
3. MOTİF 90 voltta 15 s. ve 150 voltta 3 s. yürütüldü	(1) == == ==	(1) (1) == ==	(§381) (§218) (§394) (§109, 140) == == ==
4. MOTİF (Şekil 4) 110 voltta 17 s 24 dk. yürütüldü.	(4) == == ==	(1) == ==	(§109, §140, §381, §394), (§218) == == ==
5. MOTİF (İki kez tekrarlandı) 110 voltta 16 s 22 dk. yürütüldü.	(17) == == ==	(8) == == ==	(§218, §381, §394) (§140, 109) (§109) == == ==

* Sağlıklı hasta kontrolü ve homozigot delesyonlu hasta kontrollerinin her bir motifteki çalışılan örnek sayısı.



Şekil 4. 4. motifi gösteren SSCP bant profilleri. Kontrol 7,8,9,10'da 5 bant görülmekteyken, hasta 428'de 4 bant görülmektedir. Şüpheli hastalardan §109,140, 381 ve 394'te 4 bant, §218'de 3 bant görülmektedir. §394'ün ikinci kuyusunun bulunduğu alan yırtıldığı için jelin alt tarafı görülemiyor.

Not: Tekniğin özelliğinden dolayı SSCP jellerindeki DNA bant görüntüleri RFLP bantlarına göre zayıf kaldığından ve jellerde görülebilen bazı bantların da baskılarda net çıkmamasından ötürü, şeklin üst bölümünde jelin orijinal görünümü verilmiş, alt bölümünde ise kopyası üzerinde bantların bilinen yerleri elle işaretlenmiştir.

Elde edilen motiflerde şüpheli hastalar 1. motif hariç diğer motiflerde en az bir kere kontrollere göre farklı bantlar vermiştir. Motif 3 ve 5'te ise şüpheli örneklerin bazıları birbirleriyle aynı sayıda fakat farklı pozisyonda bant oluşturmuştur. Elektroforezde 110 voltta 17 saat 24 dakikalık yürütme ile elde edilen 4. motif, şüpheli hastaları

homozigot delesyonlu hasta kontrolleri ve sağlıklı kontrolü birbirinden %100 ayıran, ayırım gücü en yüksek motif olmuştur (Şekil 4). Tüm örneklerin ayrı ayrı koşullarda oluşturdukları bantların kontrollerden toplam farkı incelendiğinde bir hastanın (§ 140 kodlu) en fazla ayırma uğradığı görülmektedir. En az ayırım ise § 381 kodlu

örnekte görülmüştür. Ş 381 kodlu örnek diğer şüpheli örneklerle göre yalnızca sentromerik ekzon 7 ve ekzon 8 delesyonuna sahip olması yönünden farklı olup SSCP ile sadece 4. motifte kontrolden ayrılabilmiş, diğer motiflerde kontrol ile aynı sayıda ve pozisyonda bant vermiştir.

TARTIŞMA

PCR-RFLP yöntemi, %95 hassasiyete ve %99 özgünlüğe (yani ekzon 7 delesyonuna sahip olan birinin SMA hastası olma olasılığının %99 olması) sahip olduğu için kullanılabilirlik ve güvenilirlik açısından tercih edilmektedir.^{5,9,14,34} SMA hastalarında PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda genel delesyon oranları %92 ve %94 olup bu oran Türk SMA hastalarında %92.1-%93 olarak belirlenmiştir.^{14,19,33,41,42} SMA tiplerine göre delesyon oranları dikkate alındığında Wirth ve ark. Tip I, Tip II ve Tip III hastalarında bu oranı sırası ile %96, %94 ve %86 olarak bulmuşlardır.¹⁹ Erdem ve ark. ise Türk SMA hastalarında bu oranı sırası ile %93.7, %93.3 ve %75 olarak raporlamıştır.⁴¹ Bizim serimizde ise RFLP yöntemi ile hastalık tipine bakılmaksızın saptadığımız SMN1 geni homozigot ekzon 7 ve ekzon 8 delesyon oranı %92.4 olarak bulunmuş, tiplerine göre ise bu oran sırasıyla %94.7, %91.6 ve %89.4 olarak saptanmıştır. Bu bulgular genel literatür verileri ile örtüşmektedir.

PCR-RFLP yöntemi birleşik heterozigot hastaların ve intragenik mutasyonların belirlenmesinde yetersiz kaldığından daha farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.³⁴ Bu yöntemlerden biri olan PCR-SSCP ile mutasyon içeren DNA molekülü, farklı tek bir baz bile içerse normal diziden farklı bir bant oluşturmakta ve bu bant nondenatüre jel elektroforezinde normalden farklı yerlerde gözlenmektedir. Buda mutasyonun varlığına işaret etmektedir.^{43,44,45,46} Ayrıca bu yöntem ile birleşik heterozigot hastalar da saptanabilmektedir.²⁶

Biz RFLP yöntemi ile homozigot delesyon saptadığımız bazı olgularda SSCP yöntemi ile de

bu sonucumuzu doğruladık. Fakat RFLP yöntemi ile şüpheli olarak nitelediğimiz olgular SSCP yöntemi ile ancak bazı koşullarda ayırt edilebilmiştir. Çünkü SSCP analizlerinde ortamın (jelin) ısısı, jel yürütme tamponunun konsantrasyonu (iyonik gücü), denatüran ajanların (formamid, sodyum hidroksit, üre ya da metilmerkürük hidroksit gibi) varlığı, jele gliserol eklenmesi veya eklenmemesi ve DNA ipliğinin moleküler ağırlığı SSCP'nin hassasiyetini etkilemektedir.^{47,48} Çalışmamızda ortam ısısı soğutma kontrollü elektroforez tankı ile sabit tutularak denatürasyonla oluşan tek iplikli DNA'nın stabil kalması sağlanmıştır. Renatürasyon aşamasında, denatüre DNA ipliklerinin kendi üzerlerine katlanmalarını sağlamak için buz üzerine alma işlemi hızlandırılmıştır. Bu işlemle her bir ipliğin kendi üzerine katlanması beklenirken ipliklerinin komplementleri birbirleriyle veya başka bir ipliğin komplementeri ile eşleşerek homodubleksler veya heterodubleksler oluşturmalarından dolayı beklenmedik bantlar ortaya çıkmakta buda yanlış yorumlara neden olabilmektedir.⁴⁵ Jel içine gliserol eklenmesi bazı çalışmalarda bantların açılımını artırırken bazı çalışmalarda azaltmıştır.⁴⁷ Çalışmamızda jele gliserol eklemenin bantların açılımına pozitif etki yaptığı saptanmıştır.

SSCP yöntemi karmaşık bir yöntem olmaması ve çok fazla araç ve gerece ihtiyaç duymaması, radyoaktif işaretlemenin yanı sıra çoğunlukla floresan işaretli primerlerin ya da gümüş boyamanın kullanılması gibi oldukça önemli avantajlara sahip olmasından dolayı yöntemin yaygın olarak kullanımını sağlamıştır.^{45,49} Fakat bunların aksine duyarlılığının yani mutasyonları tarama özelliğinin %35-100 arasında değişmesi, mutasyonun tam yerinin saptanamaması, araştırılan DNA fragmentinin büyüklüğünün sınırlı olması, jel sonuçları yorumlanma güçlüğü, ısı ve iyon derişimi gibi faktörlerin standardize edilmesindeki güçlükler SSCP yönteminin dezavantajını oluşturmaktadır.^{47,48} Bizim çalışmamızda da bu koşulların değişkenliğinden dolayı

tekrarlanabilirlik her seferinde yakalanamamış olup farklı koşullarda uygulanan elektroforez süreleri ve voltajları farklı bant profil kompozisyonları (motifleri) elde etmemize neden olmuştur. Dezavantajlardan biri olan elektrik yükü, oluşan üç boyutlu DNA ipliği yapısının kararlılığını etkilemekte olup yüksek voltaj bu yapıları kararsız hale getirmektedir.⁴⁷ Çalışmamızda ayrıca yüksek elektrik alanı (700 volt) ve düşük yürütme süresinde elde edilen motifler (Motif 1 ve 2) kontroller ile homozigot delesyonlu hastaları %100 ayrılabilirdiği halde, aynı ayırım şüpheli olan hastalarda sağlanamamıştır. Düşük voltaj ve daha uzun süre elektroforez yürütmesinde ise (Motif 3, 4 ve 5) yapılan değişiklikler bantların farklı pozisyonda fakat aynı sayıda bant profili vermesine neden olmuştur. Bu üç motifte de kontroller ile homozigot delesyonlu hastalar birbirlerinden %100 ayrılırken şüpheli hastalar tam olarak ayırlanamamıştır. Bu motiflerdeki şüpheli ve delesyonlu hastalarda görülen bantların sayısının ve pozisyonlarındaki farklılığın çalışma koşullardan ileri geldiği düşünülmektedir. Bunun yanında zaman zaman tek iplikli farklı iki konformasyonel yapının jelde aynı yere göç ederek bant sayısını ve profilini değiştirebildiği de saptanmıştır.⁴⁵ Motif 4 hariç diğer motiflerde, sentromerik homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonuna sahip olan hastada (Ş 381) kontrolden bir farklılık gözlenmemiştir. Şüpheli hastaların kesin olarak mutasyonlarının belirlenebilmesi için DNA dizi analizinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sarıca Y ve Özeren A. Spinal Müsküler Atrofiler. Ç. Ü. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 1996;5(3):202-219.
2. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=253300>
Erişim tarihi:01.04.2004
3. Lefebvre S, Bürglen L, Frézal J, Munnich A, Melki J. The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. Human Molecular Genetics, 1998;7(10):1531-1536.
4. Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G and Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. Eur J Hum Genet, 2001;9:484-491.
5. Panigrahi I, Kesari A, Fadke SR and Mittal B. Clinical and Molecular Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy. Neurology India, 2002; 50:117-122.
6. Wang CH, Xu J, Carter Ta, Ross BM, Dominski MK, Bellcross CA, Penchaszadeh GK, Munsat TL and Gilliam TC. Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. Human Molecular Genetics, 1996;5(3):359-365.
7. Chang J-G, Jong Y-J, Lin S-P, Soong B-W, Tsai C-H, Yang T-Y, Chang C-P and Wang W-S. Molecular analysis of Survival motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) genes in spinal muscular atrophy patients and their parents. Hum Genet, 1997;100: 577-581.
8. Scheffer H, Cobben JM, Mensink RGJ, Stulp RP, Buys C HCM and van der Steege G. SMA carrier testing – validation of hemizygous SMN exon 7 deletion test for the identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients with a single allele deletion. European Journal of Human Genetics, 2000;8:79-86.
9. McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR and Prior TW, Burghes AH. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. Am J Hum Genet, 1997; 60:1411-1422.
10. Parsons DW, McAndrew PE, Monani UR, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW. An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. Hum Mol Genet. 1996;5:1727-1732.
11. Cusco I, Barcelo MJ, Baiget M, Tizzano EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic Laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. Human Mutation, 2002;20:452-459.
12. Munsat TM, Davies KE. Meeting report: International SMA consortium meeting. Neuromuscular Disord 1992; 2:423-428.
13. Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G and Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. Eur J Hum Genet, 2001;9:484-491.
14. Ogino S and Wilson RB. SMN Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). Hum Genet, 2002;111:477-500.
15. Brahe C and Bertini E. Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis. J Mol Med. 1996;74:555-562.
16. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM and Marsden DC. Neurology in Clinical Practice Volume II.3th. Ed., Butterworth Heinemann., 2000; s1997-2004.
17. Savas S, Eraslan S, Kantarci S, Karaman B, Acarsoz D, Tukul T, Cogulu O, Ozkinay F, Basaran S, Aydinli K, Yuksel-Apak M, Kirdar B. Prenatal prediction of childhood-onset spinal muscular atrophy (SMA) in Turkish families. Prenat Diagn, 2002; 22:703-709.
18. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603011>
Erişim tarihi: 26.09.2004.
19. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). Hum Mutat, 2000;15:228-237.
20. Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. Science, 1994; 264:1474-1477.
21. Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active Transport of the Survival Motor Neuron Protein and the Role of Exon-7 in Cytoplasmic Localization. The Journal of Neuroscience, 2003;23(16):6627-6637.
22. Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes A, Androphy E. Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. Human Molecular

- Genetics, 1999;8(7):1219-1226.
23. Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C and Melki J. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002;12:294-298.
24. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=600354> Erişim tarihi: 15.06.2004.
25. Le TT, Coover DD, Monani UR, Morris GE and Burghes AHM. The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics*, 2000;3:7-16.
26. Erdem H. Spinal m¼sk¼ler atrofisinin molek¼ler biyolojik ¼zellikleri. *Katki Pediatri Dergisi*, 1999; 20 (Ek-2):1-10.
27. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Sch¼neborn SR, Wienker T, Zerres K. Quantitative Analysis of Survival Motor Neuron Copies: Identification of Subtle SMN1 Mutations in Patients with Spinal Muscular Atrophy, Genotype-Phenotype Correlation, and Implications for Genetic Counseling. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999;64:1340-1356.
28. Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, Sendtner M. The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol*, 2000;247:37-42.
29. Semprini S, Tacconelli A, Capon F, Brancati F, Dallapiccola B, Novelli G. A Single Strand Conformation Polymorphism-Based Carrier Test for Spinal Muscular Atrophy. *Genetic Testing*, 2001;5:33-37.
30. Erişim: www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/synmot.html Erişim tarihi: 02.2004.
31. Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AHM, Prior TW, Intragenic telSMN Mutations: Frequency, Distribution, Evidence of a Founder Effect, and Modification of the Spinal Muscular Atrophy Phenotype by cenSMN Copy Number. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;63:1712-1723.
32. Zatl'kova A, Hahnen E, Wirth B and Kadasi L. Analysis of the SMN and NAIP genes in Slovak spinal muscular atrophy patients. *Human Heredity*, 2000;50:171-174.
33. Ogino S, Leonard DGB, Rennert H, Gao S, Wilson RB. Heteroduplex formation in SMN gene dosage analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2001;3(4):150-157.
34. Xu R, Ogino S, Lip V, Fang H, Wu BL. Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. *Genetic Testing*, 2003;7(4):277-281.
35. Őimřek M, Buluřu TA, Shanmugakonar M, Barwanı HSA, Bayoumı R. Allele-Specific Amplification of Exon 7 in the Survival Motor Neuron (SMN) Genes for Molecular Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy. *Genetic Testing*, 2003;7:325-327.
36. Erişim: <http://internalmed.wustl.edu/divisions/enzymes/comRM.htm> Erişim tarihi: 21.06.2005.
37. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988;16(3):215.
38. Lefebvre S, B¼rglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, ViolletL, Benichou B, Cruaud M, Millasseau P, Zeviani M, LePaslier D, Frezal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of the spinal muscular atrophy determining gene. *Cell*, 1995;80:155-165.
39. van der Steege G, Grootsholten P, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CHCM. PCR based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet*, 1995;345:985-986.
40. Bassam BJ, Caetano-Anolles G and Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991;196:80-83.
41. Erdem H, Pehlivan S, Topaloęlu H, Yalnızoęlu D, Akç¼ren Z. Deletions in the survival motor neuron gene in Turkish spinal muscular atrophy patients. *J Inher Metab Dis*, 1996;19:724-728.
42. Erdem H, Pehlivan S, Topaloęlu H, ¼zg¼c M. Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Development*, 1999;21:86-89
43. ¼ner C. Genetik kavramlar. 6. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:517,744-746.
44. Tuli A. Single Stranded Conformational Polymorphism. Tanıda DNA Teknikleri. Adana-T¼rkiye, Eyl¼l 2001:52-61.
45. Liu L, Gladwell W, Teng C. Detection of exon polymorphisms in the human lactoferrin gene. *Biochem. Cell Biol.*, 2002;80:17-22.
46. Erişim:http://www5.amershambiosciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/elpho_applications%5Celpho_applications_fragment_analysis%5Celpho_applications%5C2.+SSCP Erişim tarihi: 16.04.2005
47. Orita M, lwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Genetics*, 1989;86:2766-2770.
48. Solak M, Baęcı H, Őengil AZ, ¼ztař S. Molek¼ler genetik ve rekombinant DNA teknolojisi. Afyon: Uyun Ajans, 2000:130-133, 135.
49. Erişim: <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/sscp.htm> Erişim tarihi: 09.05.2005.