

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NÖRAL TÜP DEFEKTLİ (NTD) ÇOCUKLAR VE ANNELERİNDE
ZIP14 (*SLC39A14*) GENİNİN TARANMASI

Didem TORUN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Nejat AKAR

2008 – ANKARA

KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Didem Torun tarafından hazırlanan bu çalışma 22 /07/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Nejat AKAR İmza :.....

Üye : Doç.Dr. Mustafa TEKİN İmza :.....

Üye :Prof. Dr. Saadet ARSAN İmza :.....

Üye : Doç.Dr. Begüm ATASAY İmza :.....

Üye: : Doç.Dr. Murat SÖNMEZER İmza :.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Alp CAN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Nöral Tüp Defekli Çocuklar ve Annelerinde ZIP14 (SLC391A4) Gen Değişimlerinin İncelenmesi

Nöral tüp defektleri (NTD), ciddi komplikasyonlarla sonuçlanan ve nöral tüpün hatalı kapanması sonucu oluşan doğumsal anomalilerdendir. Türkiye'de nöral tüp defektlerinin sıklığını araştıran çeşitli araştırmalar bu sıklığın bin canlı doğumda üç civarında olduğunu göstermektedir.

Genetik faktörler, annede yüksek ateş, diabet, folik asitten fakir beslenme, ilaçlar ve çevresel kirleticilerin nöral tüp defektinin ortaya çıkmasında rol oynadığı bilinmektedir. Çinko eksikliği nöral tüp defekti patojenezinde yer alan faktörlerden biridir. Hücre içerisine çinko alınımında rol oynayan SLC (Solute carrier) ailesine ait genlerden birisi ZIP 14 (SLC39A14) genidir.

Biz bu çalışmamızda çinko ile ilişkili genlerden ZIP14 geninde meydana gelebilecek olası bir gen değişiminin nöral tüp defekti oluşumunda rolü olup olmadığını araştırmayı planladık. Bu çalışmada 70 nöral tüp defekli bebek ve annelerine ait DNA lar ile Cezayirden gelen NTD'li 35 hasta DNAsı kullanılmıştır. Kanlardan izole edilen DNA lar sırasıyla PCR, SSCP, DNA Dizi Analizi teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda Türk ve Cezayir hasta grubuna ait DNA larda NTD ile ZIP14 geni arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Nöral tüp defekti, Çinko, ZIP14

ABSTRACT

The neural tube defects are congenital malformations caused by missclosure of the neural tube that result in serious complications. Various studies have shown the high incidence of neural tube defects (NTD) in Turkey. The estimated incidence is around 3 per 1000 live births.

Several factors influence the development of neural tube defects. Zinc deficiency is one of the flawed factor for the pathogenesis of NTD's. Either nutritional factors and /or genetic defects related zinc may cause zinc deficiency among women which may predispose to NTD's. SLC (Solute carrier family) gene family in which Zip14 provides uptake of zinc into the cell.

So, we investigated a zinc related gene, i.e. ZIP14. 70 NTD mothers, 70 NTD babies and 35 Algerian samples were included. Following DNA extraction, PCR, SSCP and DNA sequencing of the promotor and HHH motife were analyzed. However, no relation of neural tube defects and ZIP14 was detected in Turkish and Algerian NTD patients.

Key Words: Neural tube defects(NTD), Zinc, ZIP14

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren benden desteğini ve bilgisini hiç esirgemeyen, beni her zaman yönlendiren ve bundan sonraki çalışma hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr.Nejat AKAR'a, çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na; benden yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa TEKİN'e; bu tezin deney aşamasından yazılmasına kadar geçilen her aşamasında bana destek ve yardımcı olan , her türlü imkanı sağlayan, tecrübeleriyle, değerli fikirleriyle ve arkadaşlığıyla her zaman yanımda olan Bio. Dr. Erkan Yılmaz'a; ilgi ve sevgisini her zaman hissettiren, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Ece AKAR'a; tez çalışmam sırasında ortaya çıkan her olumsuzlukta bana sürekli moral veren ve beni sabırla destekleyen, çalışmam dışında hayatın keyifli anlarını paylaştığım Uzm. Bio. Yonca Eğin'e; çalışmam boyunca arkadaşlığıyla, bilgi ve önerileriyle yanımda olan Uzman Bio.Ayşenur Öztürk'e; tez çalışmam sırasında dostluğuyla her daim yanımda olan, bilgisini, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Uzm.Bio.L.Yasemin KOÇ'a; bu tezi yaparken ve yazarken sıcak çalışma ortamını paylaşmaktan büyük keyif aldığım değerli çalışma arkadaşlarım Tek.Kadir SİPAHİ, Bio.Afife Karabıyık, Bio.Zehra VELİ, Bio. Cennet YILDIZ, Bio.Özge CUMAOĞULLARI, Uzm.Bio.Aslı SIRMACI, Uzm.Bio.Filiz Başak CENGİZ, Uzm.Bio.Duygu DUMAN, Uzm.Bio.İdil ASLAN, Bio.Emel USLU, Bio.Zafer ERİK ve ismini saymadığım tüm Pediyatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim. Bana verdikleri sonsuz sevgi, sabır ve destek için, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
DİZİLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nöral Tüp Defekti (NTD)	3
2.2. Nöral Tüp Defekti (NTD) Çeşitleri	4
2.2.1. Spina Bifida	5
2.2.2. Anensefali.....	7
2.2.3. Ensefalosel.....	8
2.3. Nöral Tüp Defektinin Nedenleri.....	9
2.3.1. Folat Eksiliği	9
2.3.2. Annede Yüksek Ateş	12
2.3.3. Annede Şişmanlık.....	12
2.3.4. Annede Diabetes Mellitus	12

2.3.5. Annenin Kullandığı Bazı İlaçlar.....	13
2.3.6. Annenin Maruz Kaldığı Bazı Çevresel Kirleticiler	17
2.3.7. Akrodermatitis Enteropatika	14
2.4. ÇİNKO	15
2.4.1. Önerilen günlük çinko miktarı	16
2.4.2. Çinko metabolizması ve biyolojik fonksiyonları	16
2.4.3. Çinko Eksikliğinin Nedenleri.....	17
2.5. ÇİNKO İLE İLİŞKİLİ GENLER.....	18
2.5.1. Metalloiyoneinler (Mt).....	19
2.5.2. Çinko Parmak (zinc finger) motifi proteinleri.....	20
2.5.3. ZNT4 Ailesi.....	22
2.5.4. ZIP Gen Ailesi.....	23
2.5.5. ZIP Protein Topolojisi	25
2.5.6. ZIP14 (SLC39A14.....	26
2.6. MOLEKÜLER TEKNİKLER.....	27
2.6.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar	27
2.6.2. DNA Ekstraksiyonu.....	27
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	28
2.6.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesim	30
2.6.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP	31
2.6.6. DNA Dizi Analizi.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. YÖNTEM.....	34
3.1.1. DNA İzolasyonu	34
3.1.2. ZIP14 Gen Değişimlerinin Belirlenmesi	35

3.1.3. ZIP14 Gen Değişimlerinin İncelenmesindeki PCR Koşulları	36
3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	40
3.1.5. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	40
3.1.6. SSCP Jeli için Gümüş Boyama	42
3.1.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon	42
3.1.8. DNA Dizi Analizi.....	43
3.2. ARAŞTIRMA BULGULARI	
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları.....	44
3.2.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları ..	45
3.2.3. Promotor I.bölge için DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	47
3.2.4. Promotor II.bölge için DNA Dizi Analizi Sonuçları	48
3.2.5. HHH Motifi için DNA Dizi Analizi Sonuçları	49
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa No:

Çizelge 1.1. Folik asidin yaş ve cinsiyete göre alınması gereken miktarlar11

Çizelge 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarlar36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No:
Şekil 1. Spina bifida	5
Şekil 2. Spina bifida occulta.....	6
Şekil 3. Meningosel ve meningomiyelosel	7
Şekil 4. Folik asitin yapısı	10
Şekil 5. Metalloiyonein yapısı.....	19
Şekil 6. Çinko parmağı (zinc finger) proteini.....	21
Şekil 7. Çinko taşınmasında ZNT ve ZIP gen aileleleri.....	22
Şekil 8. Ökaryotlarda ZIP gen ailesi 20	
Şekil 9. Zip protein topolojisi.....	24
Şekil 10. Polimeraz zincir reaksiyonunun çalışma prensibi.....	25
Şekil 11. ZIP14 geni promotor bölgesi	29
Şekil 12. ZIP14 geni promotor I.bölge PCR ürünleri	36
Şekil 13. ZIP14 geni promotor II.bölge PCR ürünleri	44
Şekil 14. ZIP14 geni 7. ekzon HHH motifi PCR ürünleri.....	44
Şekil 15. ZIP14 geni promotor I.bölge SSCP jel görüntüsü	45
Şekil 16. ZIP14 geni promotor II. Bölge SSCP jel görüntüsü 40	
Şekil 17. ZIP14 geni 7.ekzon HHH motifi SSCP jel görüntüsü.....	45
Şekil 18. ZIP14 promotor I. Bölge forward primerleri ile yapılan DNA dizi analizi	47
Şekil 19. ZIP14 promotor I. Bölge reverse primerleri ile yapılan DNA dizi analizi	47
Şekil 20. ZIP14 promotor II. Bölge DNA dizi analizi	48

Şekil 21.	HHH motifi forward primerle yapılan DNA dizi analizi.....	49
Şekil 22.	HHH motifi reverse primerle yapılan DNA dizi analizi	50
Şekil 23.	HHH motifi forward primerle yapılan DNA dizi analizi.....	50
Şekil 24.	HHH motifi reverse primerleriyle yapılan DNA dizi analizi.....	50
Şekil 25.	Cezayirden gelen NTD li hastaya ait HHH primerleriyle yapılan DNA dizi analizi	51
Şekil 26.	Alu I restriksiyon enzimi	51
Şekil 27.	AluI restriksiyon enzimiyle yapılan kesimin PAGE’de görüntüsü	52

DİZİLERİN LİSTESİ

Dizi	<u>Sayfa No:</u>
Dizi 2.1. ZIP14 geni promotor I. Bölge için PCR ile çoğaltılmış dizi.....	37
Dizi 2.2. ZIP14 geni promotor II. Bölge için PCR ile çoğaltılmış dizi.....	38
Dizi 2.3. ZIP14 geni 7. ekzon HHH motifi için PCR ile çoğaltılmış dizi.....	39

SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
g	: Gram
kDa	: Kilo dalton
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
M	: Molar
MT	: Metalloiyonein
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
NTD	: Nöral Tüp Defekti
p	: Kromozomun kısa kolu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Pikomol
q	: Kromozomun uzun kolu
sn	: Saniye
SSCP	: Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
TE	: Tris EDTA
TAE	: Tris Asetik asit EDTA
TBE	: Tris, Borik asit, EDT
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nöral tüp defektleri (NTD) embriyonel hayatın ilk haftalarında beyin, spinal kord ve omurgada kapanma hatası sonucu ortaya çıkan bir grup beyin ve spinal kord malformasyonudur. Beyin ve omuriliğin geliştiği nöral tüp, fetal yaşamın ilk dört haftasında oluşur. Henüz tam olarak nedeni bilinmeyen ancak genetik ve çevresel etmenlerin birlikte rol oynadığı düşünülen bazı durumlarda nöral tüp oluşumunu tamamlayamaz ve anensefali, ensefalosel, meningosel, meningomiyelosel, spina bifida gibi nöral tüp defektleri (NTD) denilen ciddi doğumsal anomaliler oluşur. Anensefalili bebekler doğumdan kısa bir süre sonra kaybedilirler. Diğer nöral tüp defektleri ise yaşam boyu sürecek ciddi sakatlıklara neden olurlar. (Wald NJ, 1995)

Nöral tüp defekti oluşumunda genetik faktörlerin yanında annenin yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi sağlık sorunları, kullandığı bazı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel kirleticiler yanında annenin A vitamini, B12 vitamini, folik asit ve çinko bakımından yetersiz beslenmesinin nöral tüpün hatalı kapanmasında rolü oldukları bilinmektedir.

Çinko organizma için önemli bir mineral olup optimal sağlık için her gün belirli bir miktar alınması gereken biyolojik bir eser elementtir. Tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alır. Çinko eksikliğinde anemi, büyüme ve gelişme geriliği, tümör oluşumu, görme bozuklukları, deri hastalıkları ve konjenital anomaliler meydana gelir. (Saner G, 2002)

Çinko metabolizmasından sorumlu olduğu düşünülen genler metallothioneinler, çinko parmak proteini, ZNT gen ailesi ve ZIP gen ailesidir. ZIP gen ailesi hücreyi çinko içerisine almakla görevli olup insanda 12 adet ZIP kodlayan gen bulunmaktadır.(Akar N, Belgemen T; 2004)

Yetersiz inko alımı dolaşımdaki çinko miktarının azalmasına ve gelişen fetüste nöral tüp gelişiminin yavaşlamasına neden olabilmektedir. Bizim çalışmamızda; ZIP gen ailesinden Zip14 (SLC39A14) geninde meydana gelebilecek herhangi bir gen değişiminin çinko alımını engelleyebileceği, bu durumun da nöral tüp defekti oluşumunda rolü olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ (NTD)

İnsan embriyosunun gelişiminde toplam 23 adet evre olup, ortalama 60 gün sürmektedir. Sürecin bitiminde 30 mm uzunluğuna erişen embriyo fetal döneme girmektedir. Bu embriyolojik dönemde zigottan öncelikle ana hatları ile ekdoderm, endoderm ve mezoderm tabakası oluşarak, bu tabakalardan da sistemler oluşmaktadır. İkinci haftanın başında oluşan üç tabakadan ekdoderm deri ve sinir sistemini, mezoderm iskelet, kas sistemleri ve bağ dokusunu, endoderm ise sindirim, solunum ve genitouriner sistemlerini oluşturur. Dolayısı ile spinal kord ekdodermden, çevre spinal kanal ise mezodermden oluşmaktadır.

Üçüncü embriyolojik hafta içerisinde, embriyonun dorsal orta hattında bulunan ekdoderm kalınlaşmaya başlar ve nöral tabakayı oluşturur. Bu tabakanın her iki lateral sınırı yükselti yaparak ortalarında boylu boyunca uzanan çukurumsu oluk oluşumuna neden olurlar. İşte bu tabaka lateralinde oluşan yükselti nöral katlantı , ortadaki oluk ise nöral oluk olarak adlandırılır. Bu oluşan nöral oluk, lateralinde yükselti olarak bulunan nöral katlantıların ortaya doğru yaklaşarak birleşmesi ile silindirik şeklinde kapanır ve nöral tüpü oluşturur. Nöral tüp oluşumu 4. embriyolojik haftanın ortalarında tamamlanmış olur. Daha sonra bu nöral tüp, ön kısımda farklılaşarak beyin ve beyincığı; diğer kısımlar ise spinal kordu oluşturacaktır. Tahmin edileceği gibi, nöral tüp içerisinde kalan kanalın ön kısımları ventrikülleri, diğer kısımları da santral kanalı oluşturacaktır. Ana hatları ile sistem parçalarının oluştuğu dönemde meydana gelebilecek aksaklık, konjenital bozukluklara neden olmaktadır. Bu bozukluklardan en önemlisi embriyonel hayatın ilk haftalarında beyin, spinal kord ve omurgada kapanma hatası sonucu ortaya çıkan bir grup beyin ve spinal kord malformasyonları olarak tanımlanan nöral tüp defektleridir. (Şenel A.)

Nöral tüp defektleri bebeklerde görülen doğumsal anomaliler arasında sıklık açısından kardiyak defektlerden sonra ikinci sırada yer alır. Normalde nöral tüpün kapanması aynı anda beş değişik bölgede hem baş hem de kuyruk yönüne doğru düzensiz olarak gerçekleşmektedir. Tüpün baş bölgesindeki açıklık fertilizasyonun 25. gününde, kuyruk ucundaki açıklık ise 27. günde kapanmaktadır (Fishman 2000; Tinkle ve Sterling 1997). Henüz nedeni tam olarak bilinmeyen çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı düşünülen bu durumlarda nöral tüpün oluşumunu tamamlayamaması sonucu anensefali, ensefalosel, meningosel, spina bifida, miyelosel gibi konjenital anomalilerin en ağırlarından sayılan nöral tüp defektleri meydana gelir. Bunların dışında daha az görülen major nöral tüp defektleri ise hidrosefali, dermal sinüs, siringomiyeli, diastomitemeyoli, konus medallurisi, tethered kord olarak sayılabilir. Ayrıca nöral tüp defekti ile ilişkili olarak görülen Di George sendromu, Velokardiofasial Sendromu, Fetal Valproate Sendromu, Lateral Meningosel Sendromu ve Marfan Sendromları vardır.

Yapılan çalışmalarda nöral tüp defektinin ebeveynlerden birinde olması durumunda birinci derece akrabalarından bir kardeşte tekrarlama riski %4-5; iki kardeşte tekrarlama riski % 10-12 olarak bulunmuştur.

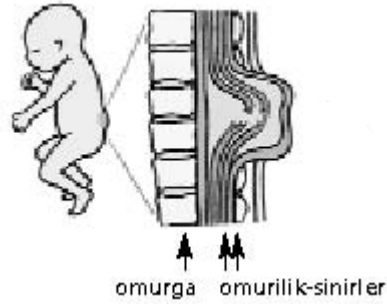
2.2. NÖRAL TÜP DEFEKTİ ÇEŞİTLERİ

En yaygın görülen nöral tüp defektlerini iki ana başlık altında toplayabiliriz:

1. Omurganın arka kısmında bir kapanma hatası sonucu ortaya çıkan spina bifida (meningosel, meningomiyelosel)
2. Omurganın ön kısmında bir kapanma hatası sonucu oluşan anensefali ve ensefalosel

2.2.1. Spina bifida

Spina bifida vertebral kanalı çevreleyen kemik elemanların disrafik durumuna denir. Disrafizm ise normalde birleşen iki yapının birleşmemesi kapanamaması durumudur. Spina bifida, vertebra ve omuriliğin gelişimsel anomalisi olup spinöz çıkıntıların bulunamayışından çeşitli vertebra ve/veya omurilik anomalilerine, işlev bozukluklarına kadar geniş bir yelpazeyi kapsar. Embriyonik dönemde bebeğin omurgası ilk oluştuğunda kapalı değildir her iki yanı açıktır Döllenmeyi takip eden 29. günde her iki yanda oluşan omurga ortada birleşir ve kapalı bir oluşum haline gelir. Spina bifidada bu kapanma ya hiç olmaz yada bazı bölgelerde meydana gelmez.



Şekil 1. Spina bifida

Spina bifidanın spina bifida okulta ve spina bifida sistika olmak üzere iki formu vardır:

a.) Spina bifida okulta: Spina bifidanın en hafif şeklidir. Spina bifida okulta oluşumunda omuriliği oluşturan vertebralardan birinde veya bir kaçında küçük boşluklar oluşur. Bu durumda medulla spinalisin üstü sadece deri ile örtülür ve kemikteki açıklık dışarıdan fark edilmez. Bu herhangi bir omurda meydana gelebilir fakat daha çok sırtın altında ya da omurganın aşağısında oluşur. Omurilik ve sinirler normal olduğu için bu tip hastalarda hiçbir belirti, semptom oluşmaz ve nörolojik problemler yaşamazlar. Çoğunlukla lumbasacral bölgede görülür. Bazen bu bölgede deri üzerinde küçük bir kıl demeti de olabilir bu durum okultanın göstergesidir. (Pittman 2008)



Şekil 2. Spina bifida occulta (Akar N; 1981)

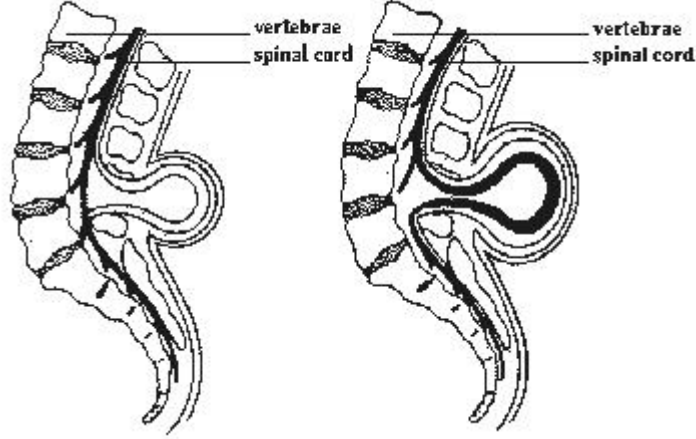
b.) Spina bifida sistika: Keseli spina bifida olarak bilinir. Sırtta ince bir deri tabakasıyla örtülü bir kese ya da kist gözlenir. Meningosel ve meningomiyelosel olmak üzere iki türü vardır.

b.1) Meningosel: Spina bifida sistikanın bu türünde bebeğin sırtında meninkslerden oluşan bir kese görülür. Kesenin içinde omuriliği ve omurilik sıvısını saran dokular vardır. Omuriliği çevreleyen zarlar omurganın açık kısımlarından dışarıya doğru fıtıklaşırlar. Fıtık kesesi içinde beyin ve omuriliği koruyan ve çevreleyen serebrospinal sıvı bulunur. Bu durumda sinirler fazla zarar görmediğinden çok az hasara neden olur. (Şekil 2)

b.2) Meningomiyelosel (Mm): Spina bifida sistika grubunda en sık rastlanan doğumsal defektir. Doğumla birlikte görülen omurga üzerinde posterior hatta nöral dokunun bir membranla örtülü veya örtülü olmadığı ve çoğunlukla dışarıya beyin omurilik sıvısı (BOS) akıntısının olduğu çeşitli nörolojik defektleri beraberinde bulunduran bir keseyi ifade eder.

Fıtıklaşan kese içinde meningeselde bulunan zarların yanı sıra sinir kökleri ve omuriliğin kendisi de bulunabilir. Bazen kist olmaz omuriliğin kendisi de tamamen fıtıklaşabilir. (Reeder 1998); (Tinkle MB; Sterling BS 1997). Meningomiyelosel görülme sıklığı 1000 canlı doğumda 1'den (A.B.D) -9'a (İrlanda) kadar değişebilir. Bir önceki hamilelikte Mm'li bebek mevcutsa, tekrar Mm'li çocuk doğurma olasılığı

% 2-3; eğer daha önce 2 Mm'li çocuk mevcut ise bu olasılık %6-8'e kadar yükselecektir. Yakın akrabalarda, özellikle anne tarafında Mm'li çocuk varsa görülme olasılığı artacaktır .



Şekil 3. Meningosel ve meningomiyelosel

2.2.2. Anensefali

NTD' nin bir tipi olan anensefali en sık görülen (1/500) konjenital beyin anomalisidir. Bütün nöral tüp defektleri gibi düşük sosyoekonomik gruplarda ve 40 yaşından daha büyük annelerin bebeklerinde daha sıktır. Nöral tüpün sefalik kısmının altıncı haftaya kadar kapanmamasıyla oluşmaktadır. Anensefalide beyin hemisferleri gelişebilir, ancak bazı etkilerle yıkılır. Beyin sapı ve serebellum korunabilir. Beynin bu ciddi anomalilerine karşın, yüz kemikleri ve kafatası tabanı hemen hemen normaldir. Tüm vakalarda frontal kemik yoktur ve beyin dokusu anormaldir.

Anensefali iki alt tipe ayrılır: Meroakrani hafif formu olup; kranial kılıfta serebrovasküler yapıyla kaplı küçük bir defekt vardır. Ağır formu olan holoakroni de ise beyin tamamen yok olmuş durumdadır. Anensefali, maternal hipotermi, folik asit ve çinko eksikliğine bağlı olabilir. Anensefali ile ilişkili hastalıklar folat yetmezliği, maternal hipotermi, kromozom 13 trizomisi, kromozom 18 trizomisi, turner sendromu, ekstremiteler ve karın duvarı defektleri olabilir. Anensefalik bebeklerde

serebral korteks olmadığından bilinç yoktur, ancak beyin sapı fonksiyonları farklı derecelerde mevcuttur. Fetüsler komada değildir. Bebek, ekstremitelerini spontan hareket ettirebilir. Korkutulduğunda myoklonik tepki verir. Kas tonusları ve derin tendon refleksi artmıştır. Tehlikeli uyaranlara yanıt olarak beslenme ve solunumla ilgili ilkel refleksi gösterirler. Bebekler doğumdan kısa süre sonra kaybedilir. Nadiren bir hafta kadar yaşarlar.

2.2.3. Ensefalosel

Anensefalinin daha hafif formu olup kranial yapıların bir defektten çıkması şeklinde görülen bir konjenital anomalidir. Posterior yerleşimleri anterior yerleşimlerine göre daha sık görülür. Kase içinde sadece beyin omurilik sıvısı (BOS) varsa kranial meningesel, nöral dokular varsa ensefalosel adı verilmektedir. 5000 canlı doğumda bir görülen bir konjenital anomalidir. (Mutluer S; 2007)

2.3. NÖRAL TÜP DEFİKTİNİN NEDENLERİ

Nöral tüp defektinde beş kapanma bölgesindeki her bir kapanmanın değişik genler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. (Reeder, Martin, Koniak-Griffin ve ark. 1997; Tinkle ve Sterling 1997). Ancak annenin yetersiz beslenmesi, yüksek ateş, obezite, diabetes mellitus, hipertansiyon gibi sağlık sorunları, kullandığı bazı ilaçlar, maruz kalınan çevresel kirlenmeler ve genetik faktörler nöral tüpün hatalı kapanmasına neden olabilmektedir. (Daly S, Scott JM 1998)

2.3.1. Folat Eksikliği

Folik asit normal DNA yapımı için gerekli nükleotidlerin sentezi ve hücre içi metilasyon reaksiyonları için esansiyel olan bir maddedir. B grubundan bir vitamindir. Adını yaprak anlamına gelen “folium” dan alan folik asit, suda eriyen B grubu vitaminlerden birisi olup, ilk olarak 1943 yılında doğal besinlerden

ayrıştırılmıştır. Folik asit, pürin ve timidilat sentezi ile fosfolipidler, proteinler, DNA ve nörotransmitterleri içeren önemli biyolojik maddelerin metilasyonu için gerekli olan tek karbon ünitesini sağlamaktadır. Böylece nükleik asitlerin yapımı ve bazı amino asitlerin birbirine dönüşmesi (serin, glisin ve homosisteinin metiyonine dönüşümü, histidinin glutamik asite katabolizması) sağlanmaktadır (Jacob A. ;2000).

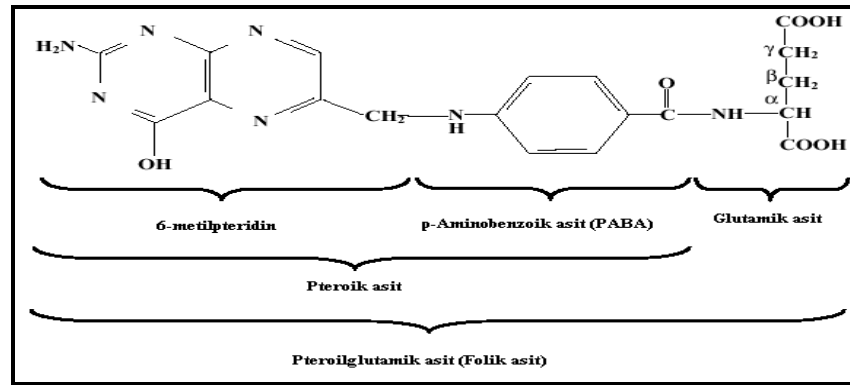
Folik asit yetersizliğinde; B12 vitamini yetersizliğinde olduğu gibi özellikle hamile kadınlarda kırmızı kan hücrelerinin tam olgunlaşmadığı megaloblastik anemi ile ilişkisinin tam olarak açıklanamadığı kolon, mide, uterus kanserleri görülmektedir. Ayrıca yükselmiş serum homosistein düzeyi ile görülen kalp-damar hastalıkları ve nöral tüp defektleri oluşmaktadır. (Benoist ;1998)

1960'lı yıllarda yetersiz beslenmenin, özellikle B kompleks vitaminlerinden esansiyel bir besin maddesi olan Folik asit (B9 vitamini, Foliacin) eksikliğinin nöral tüp defektlerine neden olacağı hipotezi öne sürülmüştür. Folik asidin vücut içinde kullanılmak üzere girdiği değişik şekillere genel olarak folat adı verilmektedir. Folik asidin hücre bölünmesinde ve gelişmesindeki rolü kesin olarak belirlendikten sonra, bu vitaminin NTD oluşumu üzerindeki etkileri konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. İngiltere Tıbbi Araştırmalar Birliği'nin (UK Medical Research Council) 1991'de yaptığı deneysel araştırmada, daha önce NTD'li bebek doğuran kadınlara perikonsepsiyonel dönemde günde 4 mg. folik asit verildiğinde yeniden NTD'li gebelik geçirme riskinin %60-72, doğurganlık dönemindeki kadınlara günde 0.4 mg. folik asit verildiğinde ise, ilk kez ortaya çıkacak NTD'li gebelik riskinin %50 azaldığı ortaya çıkmıştır (Daly ve Scott 1998; Le Mone 1999). Eritrosit folat düzeyinin yükselmesi ile NTD riskinde önemli ölçüde azalma olduğu, benzer çalışmalarda %60'ın altına düşmeyen risk azalması olduğu görülmüştür. (Tinkle MB; Sterling BS 1997)

Folik asidin NTD gelişmesini nasıl önlediği konusunda bilinenler sınırlı olmakla birlikte, nöral tüpün kapanmasında son derece kritik olan hızlı hücre döngüsünü kolaylaştırdığı saptanmıştır. Folatlar DNA ve RNA biyosenteziyle hücre içi reaksiyonlarda görev yapan enzimlerin kofaktörü olarak rol alırlar. Folat eksikliğinin NTD gelişimi üzerindeki etkileri konusunda iki temel hipotez vardır. Her ikisinde de NTD oluşumunu etkileyen mikrobeyin ve genetik faktörler üzerinde durulmaktadır. İlk hipotezde düşük serum folat düzeyi durumunda, folik asidin

embriyonun hücrelerine sınırlı olarak ulaşması nedeniyle normal hücre fonksiyonlarının bozulduğu ve proliferasyonun sınırlandığı ileri sürülmektedir. Folik asit yetersizliğinde metiyonin yapımı azalır, hücre içi S-adenosilmetiyonin düzeyi düşer. Bu da DNA da sitosin ve timinin metilasyonunu bozarak uygunsuz protoonkojenlerin aktivasyonuna yol açar, malignant dönüşümü uyarır ve mutant gen oluşumunu önleyemez. Timidilat yapımının sınırlanması da hatalı DNA yapımına yol açarak megaloblast oluşumunu uyarır. Ayrıca folik asit eksiliğinde hücreler bölünme durumunda metafaz ve anafazda ilerleyemez. İkinci hipoteze göre ise folik asit eksikliğinde plazma homosistein seviyesi artar. Homosistein de nöral epiteldeki N-metil-D-asparate reseptörlerini baskılayarak nöral tüpün kapanmasına engel olur (De Marco P ; 2001).

Folat eksikliği, folik asidin gıdalarla yetersiz alınması, metabolizmanın yüksek olması ve/veya genetik defektlere bağlı olarak gereksinimin artması sonucu gelişir (Donnelly; 2001) İnsan vücudu folik asidi üretmediği için dışarıdan alınması gerekmektedir. Kadının alkol tüketimi anoreksiya veya bulimiya rahatsızlığının olması, taze sebze ve meyve yememesi, sebzeleri fazla pişirerek tüketmesi, renal dializ uygulanması ve kronik hemolitik anemisinin olması folik asit eksikliğinin diğer nedenlerindendir.



Şekil 4.: Folik asitin yapısı

Uluslar arası düzeyde yapılan bir araştırmanın sonucunda folik asit kullanımıyla 1996 yılından önceki NTD oranının 100000 canlı doğumda 37.8'den

1998-1999 yılları arasında 100000 canlı doğumda 30.5'e düştüğü, başka bir ifade ile NTD'li bebek doğum prevalansının %19 oranında azaldığı saptanmıştır (Honein, Paulozzi, Mathews ve ark.2001). 1992 - 1998 yılları arasında yapılan bir çalışmada da (Stevenson, Allen, Pai ve ark. 2000) daha önce NTD'li bebek doğuran ve sonraki gebeliklerinde folik asit takviyesi alan annelerde NTD'li gebelik prevalans oranınının 1.89'dan 0.95'e düştüğü ortaya konmuştur.

İnsan vücudu folik asidi üretemediği için bu vitaminin dışardan alınması gerekmektedir. Folik asidin hangi dozlarla alınması gerektiği konusunda ise bir çok çalışma yapılmıştır.

Çizelge 1.1: Folik asidin yaş ve cinsiyete göre alınması gereken miktarları

YAŞ	CİNSİYET	DOZ (mg)
0- 6	KIZ/ ERKEK	0.05 - 0.09
7 – 9	KIZ/ ERKEK	0.125
10-18	ERKEK	0.150- 0.185
10 -18	KIZ	0.145 - 0.180

Gebelikte bu gereksinim 0.3 mg artmıştır. Dolayısıyla gebelikte alınması önerilen folik asit miktarı, eksikliğin durumuna göre ayarlanabilmekle birlikte, 0.4-0.475 mg.dır.(Bower ;2001) Emzirme döneminde ise normal gereksinime ek olarak günde 1 mg folik asit alınmalıdır. Bağırsak emiliminin bozuk olduğu durumlarda da günde 1 mg'lık dozlar halinde verilebilir. (Le Mone 1999; Tinkle MB; Sterling BS 1997). Daly, Mills, Molloy ve ark. (1998) günlük 0.1 mg folik asit takviyesi ile NTD riskinin %22; 0.2 mg ile % 41; 0.4 mg ile % 47 oranında azaldığını göstermişlerdir. Plazma homosistein seviyesi yüksek olanlara 0.650 mg., daha önce NTD'li bebeği olanlara 4 mg folik asit verilmesi uygun görülmektedir (Krishnaswamy ve Madhavan 2001; Le Mone 1999; Spina Bifida Association of Canada 19).

2.3.2. Annede yüksek ateş

Vücut sıcaklığının 41°C veya daha yüksek bir değere ulaşmasıyla ortaya çıkan termoregülatör mekanizmaların bozulmasına neden olan duruma hipertermi denilmektedir. Halk arasında yüksek ateş diye bilinen hiperterminin gelişmekte olan bebekler üzerindeki zarar verici etkisi fetal gelişimin denk geldiği evresi ile yüksekliğin miktarı ve süresine bağlıdır.

Embriyonun sinir dokusunun gelişmeye başladığı günlerde annenin yüksek ısıya maruz kalmasının NTD'lerin gelişiminde etkili olduğu öne sürülmüştür(Lundberg 2003). Yüksek ısının teratojenik olduğu gözlenmiştir. Sinir dokularının geliştiği günlerde sauna benzeri ortamlarda bulunan ya da hastalık nedeniyle beden ısıları 24 saatten fazla süre 38.9 - 41°C'den yüksek olan annelerin NTD'li bebek doğurma riskinin 3 kat arttığı saptanmıştır (Tinkle MB, Sterling BS (1997).

2.3.3. Annede şişmanlık (Obezite)

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda hamile kadının kilosu ile NTD'li bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir.(Eichholzer 2006) NTD'li bebek sahibi olma riskinin 50-59 kg. ağırlığındaki kadınlarla kıyaslandığında, 80-89 kg. ağırlığındaki kadınlarda iki kat, 110 kg.ın üstündeki kadınlarda ise 4 kat arttığı saptanmıştır. Obeziteye yol açan fizyolojik nedenler ve şişman annelerin bazı besin maddelerini eksik alma durumlarının, nöral tüp gelişiminde rol oynayan metabolik süreçleri etkileyerek nöral tüp defektlerinin oluşma riskini arttırdığı belirtilmektedir (Lowdermilk DL, Perry SE, Bobak IM , 2001).

2.3.4. Annede Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus vücudun çeşitli nedenlerle kan şeker seviyesini ayarlayamaması sonucunda ortaya çıkan bir rahatsızlıktır. Yapılan araştırmalarda

kandaki glikoz düzeyinin yükselmesinin embriyonun gelişmesini ve hücre siklusunu düzenleyen genlerin ekspresyonunu engelleyerek ve hücre duvarında yer alan proteinlere bağlanarak erken hücre ölümüne ve hatalı morfolojik gelişmeye yol açtığı belirlenmiştir. Böylece annenin diabeti ile konjenital doğum defektleri arasında ilişki olduğu kesin olarak belgelenmiştir (Ray ;2007).

Diabetes mellituslu annelerden doğan bebeklerde major malformasyon riskinin 2-3 kez arttığı ve karşılaştırma yapıldığında diabetik annelerin diabetik olmayan annelere kıyasla 15 kat daha fazla anensefali veya spina bifidalı bebek doğurma riski taşıdıkları ortaya konmuştur. (Tinkle MB, Sterling BS; 1997).

2.3.5. Annenin Kullandığı Bazı İlaçlar

Hamileliğin ilk üç ayındaki maternal folik asit eksikliği nöral tüp defektlerindeki artmış riski beraberinde getirir. Bu nedenle tüm anne adaylarının günlük 400 mg. folik asit almaları gerektiği daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Annenin hamilelik döneminde aldığı bazı ilaçlar folat düzeyini olumsuz etkileyerek konjenital malformasyonlardan nöral tüp defekti oluşumuna neden olabilir. Bu ilaçları şu şekilde gruplandırabiliriz:

1. Folat antagonistleri: metotreksate, trimetreksate, trimethoprim
2. Antimalaria ilaçları: Pyrietamine
3. Antikonvülsanlar: Phenytoine, valproik asit, carbamazepine
4. Psikotropolikler: Phenothiazine, trisiklik antidepresanlar
5. Diğer: Sulfasalazine, izoniazid, cycloserine, antiasidler, safra asidi bağlayıcıları, eritropoietinler, estrogenler (clomiphene), ranitidine, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar,alkol vb. (Hernandez-Diaz; 2001).

2.3.6. Annenin Maruz Kaldığı Bazı Çevresel Kirleticiler

Yapılan araştırmalarda içme suyunun dezenfeksiyonu için kullanılan klorun suyun yüzeyinde bulunan organik maddelerle tepkimesi sonucu ortaya çıkan ikincil ürünlerden biri ve teratojen olan trihalometanları (kloroform, bromodiklormetan ve bromoform) içeren su içen annelerin NTD'li bebek doğurma riskinin üç kat arttığı saptanmıştır. Bunlardan bromodiklormetanın NTD oluşturma riskini 1.5'dan 5.1'e çıkardığı saptanmıştır. Kloroformun ise solunum yolu ile alındığı zaman kromozom anomalilerine yol açtığı, bir başka klorlama ikincil ürünü olan haloasetonitrilin de embriyo ve fetüs üzerinde toksik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür ((Dodds 2001; Kury 2002) Diğer bir çalışmada ise, yüksek oranda çözücülerin ve pestisitlerin bulunduğu ortamlarda çalışan kadınların çocuklarında anensefali görülme riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tinkle MB, Sterling BS 1997). Dünya Sağlık rgt Uluslararası Ime Suyu Standartlarına göre suda bulunabilecek maksimum sülfat oranı 400 mg/l dir. Bu orandan daha fazla sülfat içeren sular içildiği takdirde kanserler, sindirim sistemi bozuklukları ve ölümler meydana geldiği saptanmıştır. Chien ve ark.ları tarafından yapılan bir araştırmada 630-1150 mg/ l oranında aşırı sülfat içeren suyu içen  çocukta ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. Ancak şimdiye kadar aşırı miktarda sülfat içeren su tüketimi ve nöral tüp defekti arasında bir ilişki olup olmadığı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

2.3.7. Akrodermatitis Enteropatika

Otozomal resesif geçiş paterni gösteren nadir görülen bir hastalıktır. Dünyanın her yerinde görülebilir. Irk veya cinsiyet ayrımı yoktur. Akrodermatitis enteropatikalı hastalarda çinko emilimi bozuktur.

Normal bireylerde emilim oranı %27-65 iken, bu hastalarda %2-3 civarındadır. Emilim bozukluğunun spesifik nedeni bilinmemekle birlikte hastalığın kromozomal yerleşimi 8q 24.3 şeklinindedir. Bebek anne sütünden kesildikten 4-6 hafta sonra veya anne sütü almayan bebeklerde doğumdan sonra belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Anne sütünde çinkoyu bağlayıp emilmesini sağlayan bir peptid bulunmaktadır.

Anne sütü ve inek sütündeki çinko miktarı benzer olmasına rağmen, hastalığın, inek sütünde bu peptidin bulunmamasına bağlı olarak geliğtiği dğnlmektedir.

İnsanda inko metabolizmasında primer bir defekt sonucu ortaya çıkan tek kalıtsal hastalıktır. Tüm vücut çinko depolarının boğaldığı ağır bir çinko eksikliği olup tüm organ sistemleri etkilenebilir. Semptomları nonspesifik olup sıklıkla fark edilmez. Çinkonun tağınmasında görev alan proteinlerin sentezinin bozulması nedeni ile çinko enterositlerin apikal membranından sitoplazma içine tağınamaz. Çinko eksikliği nedeniyle iŐtahsızlık, koku ve tat duyusu bozukluğu, kiŐilik deėiŐiklikleri ve anlama, idrak etme fonksiyonlarında azalma izler. Simetrik akral ve sirkumorifisyal dermatit, ishal, gelişme geriliği, hipogonadizm, emosyonel deėiŐiklikler, irritabilite, depresyon, blefarit, konjunktivit, fotofobi ve/veya korneal opasiteler gibi göz bulguları, immün fonksiyonlarda azalma, enfeksiyonlara yatkınlıkta artış ve ölüm gibi klinik bulgular ortaya çıkar.

Çinkonun intestinal emiliminde azalmanın bu genetik hastalıktan sorumlu olduğu, çinko spesifik membran taŐıyıcılarında intrensek intestinal defekt sonucu duodenum ve jejunumdaki ince barsak mukozasında aktif çinko transportunda bir defekt ortaya çıktığı dğnlmektedir (Kury; 2002).

2.4. ÇINKO

Canlılarda hücrelerin proliferasyon, replikasyon ve farklılaŐması için aminoasitler, glikoz, yağ asitleri ve vitaminler yanında minerallere de ihtiyaç vardır. Çinko vücudun esansiyel eser elementlerinden biridir. Optimal sağlık için her gün belirli miktarda alınması gereken biyolojik bir eser elementtir. Tüm organlar, dokular ve vücut sıvılarında yer alır. nemli proteinlerin yapısına girer. Enzimlerin aktif bölgelerine bağlanır, katalitik bölgelerinde anahtar rol oynar. İntraselüler bir düzenleyici olup, moleküler etkileŐimlerde proteinler için yapısal destek sağlar. Biyolojik membranların ve iyon kanallarının stabilitesini ve bütünlüğünü korur. Nükleik asit veya diğer gen düzenleyici proteinlerde yapısal element olarak rol oynar. Redoks aktivitesinin olmaması nedeniyle bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir.

Karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asit, hem sentezi, gen ekspresyonu, üreme ve embriyogenezde de görevleri vardır (Black MM, Gawkrödger DJ; 1998).

2.4.1. Önerilen günlük çinko miktarı

İnsan vücudunda toplam 1.36 - 2.32 g çinko bulunur. Günlük çinko ihtiyacı ise 2.4 -4.2 mg dır. Deniz ürünleri, baklagiller, kuruyemişler, tahıllar, yeşil yapraklı sebzeler ve meyveler çinko açısından zengindir. Şarap, bira ve diğer alkollü içeceklerde ise çinko oranı çok düşüktür. Çinko ihtiyacının karşılanması besinlerdeki protein içeriğine bağlıdır. Bu nedenle protein alımının yetersiz olduğu durumlarda çinko eksikliği gelişebilir. Ayrıca fitatlar çinko emilimini bozarlar, lif içeriği yüksek yiyecekler bu elementin biyoyararlanımını azaltırlar. Günlük oral çinko alımı 6 aydan küçük bebeklerde yaklaşık 3 mg; 6 ay-1 yaş arası çocuklarda 5 mg; 1-7 yaş arası çocuklarda 10 mg; 11 yaşından büyüklerde 16 mg olmalıdır. Gebe ve emzikli kadınlara ise günde 20-25 mg çinko gereklidir.

2.4.2. Çinko metabolizması ve biyolojik fonksiyonları

Besinlerle alınan çinkonun %15-30 'u duodenumdan emilir, %70'i dışkı ile atılır. İdrar ve ter yoluyla da bir miktar kayıp vardır. Karaciğer; çinko metabolizmasında başlıca rol oynayan organdır. Çinko eksikliği, büyümenin hızlı olduğu dönemler, hamilelik, pretermlik ve yaşlılık gibi fizyolojik nedenlerle olabildiği gibi karaciğer hastalıkları, malabsorbsiyon sendromları ve uzun süre parenteral beslenme gibi patolojik nedenlerle de olabilir (Onosaka; 2002).

Diyetle alım azlığı, luminal (intestinal), mukozal ve sistemik faktörler çinko eksikliğinin ekzojen nedenleridir. Bazı besinler, vitaminler ve mineraller çinko emilimini etkileyerek çinko eksikliği veya fazlalığına neden olabilirler. Fitatlar,

fosfatlar, lifli besinler, kalsiyum, oksalat, bakır, kadmiyum, inorganik demir, kalay ve toprak çinko emilimini azaltırken; proteinler, şarap, metiyonin, D vitamini, B6 vitamini emilimini artırır (Saner G; 2001).

Çinko eksikliğinde, büyüme-gelişme geriliği, hipogonadizm, hepatosplenomegali, parakeratoz, alopesi, yara iyileşmesinde gecikme, konjenital anomaliler, intrauterin büyüme geriliği, enfeksiyonlarda artma, bozulmuş nörofizyolojik performans ve koku-tat duyusu bozukluğu gibi klinik bulgular ortaya çıkar (Golalipour; 2006).

2.4.3. Çinko Eksikliğinin Nedenleri

Çinko eksikliğinin nedenleri primer ve sekonder eksiklikler şeklinde sınıflandırılabilir. Primer eksiklikler genel olarak çinko alınımının azalması (kötü beslenme, çinko bakımından fakir sıvılarla parenteral beslenme) olarak nitelendirilebilir. Sekonder eksiklikler ise dört grup altında incelenebilir:

- a. Emilimin azalması: Malabsorbsiyon sendromları (çölyak hastalığı, kısa bağırsak sendromu), inflamatuvar bağırsak hastalıkları, diyetle yüksek fitat ve lif, toprak yeme, akrodermatitis enteropatika
- b. Atılımın artması: Bağırsak parazitleri, kronik diyare, kronik renal hastalıklar, hepatit, siroz, yanıklar, ilaçlar (EDTA; penisilamin, tiazidler)
- c. Kullanımın Bozulması: Protein eksikliği
- d. Gereksinimin artması: Gebelik, laktasyon, neoplastik hastalıklar, yara iyileşmesi, yanıklar, akne vb.

Türk populasyonu açısından çinkonun önemli olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Türkiyede nöral tüp defektinde çinko eksikliği ile ilgili ilk yayın anensefalide maternal serumda çinko eksikliği bulunarak 1980 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinde Çavdar ve ark.tarafından yayınlanmıştır.Daha sonra Çavdar ve ark. 1981 yılında anensefalide maternal serum,plazma ve saçta çinko seviyesinin azaldığını göstermişler, 1985 yılında ise nöral tüp defektli annelerde çinko seviyesinde azalma, bakır seviyesinde artış olduğunu göstermişlerdir. 1991 yılında Akar ve ark.tarafından yapılan çalışmada hamilelerde oral plazma çinko eksikliği ile nöral tüp defekti ilişkisi ortaya konmuştur.

Bu çalışmaların devamı olarak Akar ve ark. kronik çinko eksikliğinde maternal saç çinko seviyesinin azaldığını ve maternal saç bakır ve magnezyum seviyelerinin belirlendiğini göstermişlerdir.(Akar N; 1995)

2.5. ÇINKO İLE İLİŞKİLİ GENLER

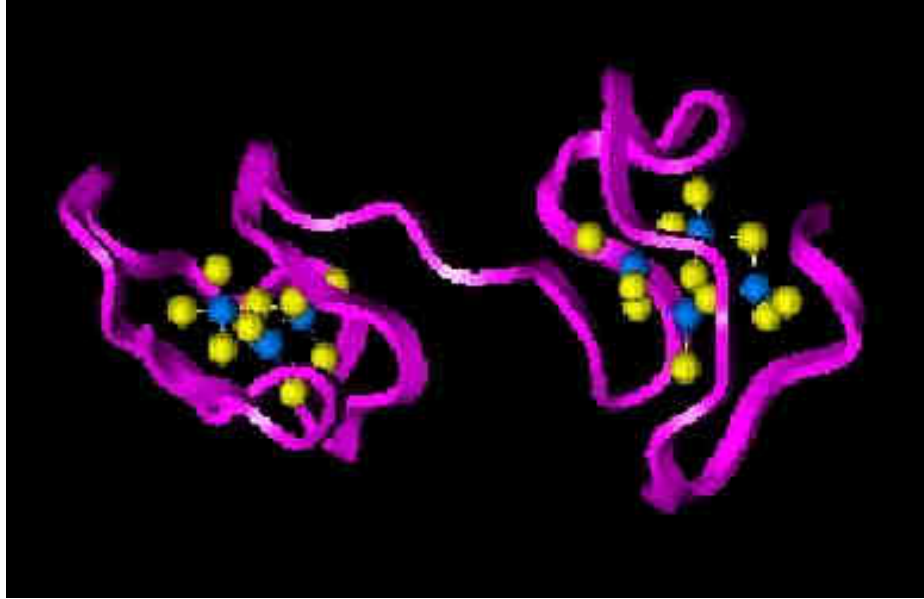
Günümüzde çinko metabolizmasından sorumlu olduğu düşünülen dört faktör belirlenmiştir. Bunlar metalloitiyoneinler, ZNT4(SLC30A4), Zip gen ailesi ve çinko parmak (zinc finger) proteindir (Harris; 2002).

2.5.1. Metalloitiyoneinler (Mt)

Mt sisteince zengin, düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerdir.Oksidatif stres, interferon, iyonize radyasyon, civa, bakır, kadmiyum gibi ağır metaller, etanol hekzan gibi organik çözücüler ve antikanser ajanlar gibi uyarıcılarla ekspresyonları değişir. Radyasyon, lipid peroksidasyonu, antikanser ajanların neden olduğu oksidatif stres ve hiperoksi durumları gibi değişik formlardaki oksidatif hasara karşı dokuları korurlar. MT-I, MT-II, MT-III ve MT-IV olmak üzere dört metalloitiyonein vardır. MT-I ve MT-II hemen hemen her dokuda eksprese

olurlar.Potansiyel homeostatik mekanizmalarının kataliz, depolama, detoksifikasyon ve immün sistemin regülasyonu olduğu düşünülmektedir . MT-III nöron proliferasyonunu inhibe eden ve sadece beyinde eksprese olan bir izoformdur. Ancak nonspesifik olarak tüm hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. MT-IV çok katlı yassı epitelin diferansiyasyonunu indükleyen bir proteindir. Spesifik olarak dil ve deri gibi epitelyal hücrelerde eksprese olur.

Metallotiyoneinlere bağlı haldeki çinko; kadmiyum, bakır ve civa gibi ağır metallere bağlı toksisiteyi azaltır.(Kondoh; 2002) İntrasellüler metal hemostazı sağlar,oksidatif stresten korur, apoptozisi önler.Çinko konsantrasyonu metallotiyonein indüksiyonu ile artar (Akar N ; Belgemen T; 2004).



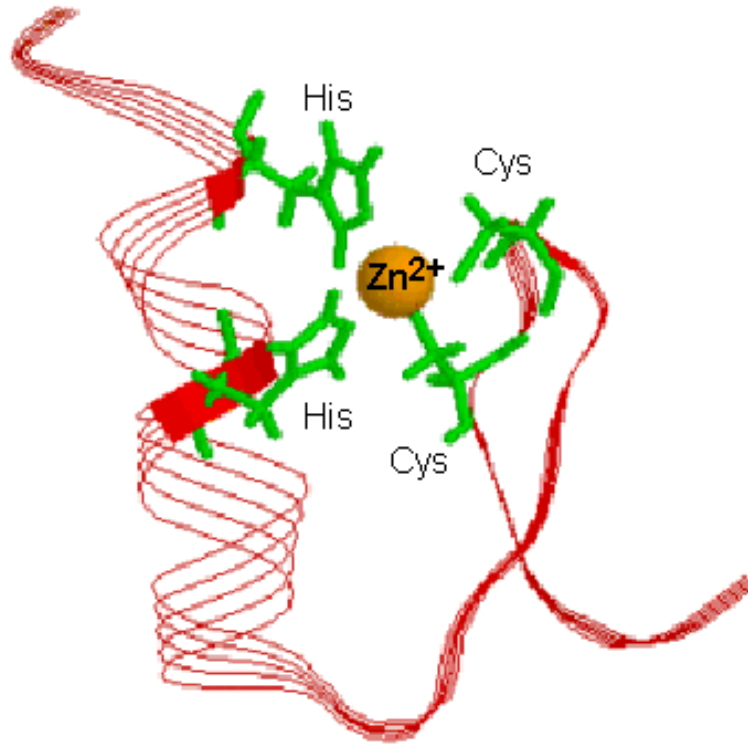
Şekil 5. Metallotiyonein yapısı

2.5.2. Çinko Parmak (zinc finger) Motifi Proteinleri

Bu motif, *Xenopus laevis*'de 5S ribozomal RNA genlerinin faaliyeti ile ilgili çalışmalar sırasında keşfedilmiştir (Fairall L., Rhodes, D., Klug, A. ;1986) Bu genlerin transkripsiyonu, genin merkezi veya ortasındaki 50 nükleotitik bir alan ile düzenlenmektedir. Bu düzenleyici bölgeye iç kontrol alanı iç promotor adı verilmiştir. Bu iç promotor, IIIA transkripsiyon faktörü (TFIIIA) adı verilen 40 kD'luk bir protein tarafından tanınmaktadır. TFIIIA'nın bir molekülü, bir kompleks oluşturmak üzere 5S RNA genine bağlanır. Bu kompleks sırasıyla TFIIIC, TFIIIB ve RNA polimeraz III'e bağlanmaktadır. B ve C faktörleri ayrıca tRNA genlerinin transkripsiyonunu başlatmada da iş görmektedir. TFIIIA'nın DNA'nın yüzeyi ile etkileştiği, bu proteinin amino asit sekansında tekrarlanan bir motifin saptanmasıyla anlaşılmıştır. TFIIIA'nın primer amino asit sekansında her biri yaklaşık otuz amino asit kökü uzunluğunda dokuz tane benzer bölge (Cys-N2-Cys-N12-His-H3-His) bulunmaktadır. Bu tekrarların her biri özdeş kısımlarda iki sistein (Cys) ve iki histidin (His) aminoasiti kökü içermekte olup, bu proteinde aynı zamanda dokuz tane de Çinko (Zn) iyonu bulunmaktadır. (Johnson, F.F., McKnight, S.L.;1989) Klug ve arkadaşlarının yaptıkları X ışını kırınımı deneyleri, her bir çinko atomunun, sisteinlerin kükürt (Cys-S), histidinlerin ise azot (His-N) atomlarına tetrahedral bir şekilde bağlanarak parmak şeklinde yapılar oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. (Fairall L., Rhodes, D., Klug, A. ;1986)

Parmak şeklindeki yapının ucu, DNA'nın büyük ya da küçük oluşuna uymaktadır. Parmak şeklinde yapılara sahip birçok protein, transkripsiyon sırasında bu yapılar aracılığı ile iç kontrol alanına bağlı halde kalabilmektedir. RNA polimeraz, genin bir tarafından diğer tarafına doğru ilerlerken, TFIIIA'nın birkaç parmağı kalıp koldan ayrılmakta diğerleri ise dubleks veya kodlanan kola bağlı halde kalmaktadır.

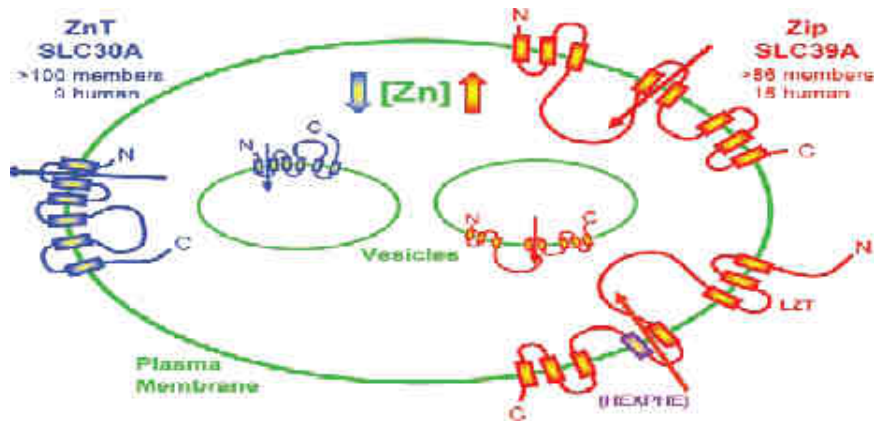
TFIIIA'daki histidin ve sistein köklerinin uzaysal dağılımı, çinko parmağı oluşturan diğer proteinlerin belirtilmesi için yeterli bir ayrıcalıktır. Maya, meyve sineği ve insandan elde edilen gen düzenleyici proteinlerdeki bu yapı, TFIIIA'daki yapı ile büyük benzerlik göstermektedir. Bu motifin önemli özelliği, çinko ile TFIIIA arasında koordinasyon bağları ile oluşan parmak benzeri yapıların tekrarlanması ve çinkonun bu tekrarlarda kritik bir rol oynamasıdır. Mutant TFIIIA proteinleri yapılarındaki parmak motiflerini kaybettikleri zaman DNA'ya karşı sekansa özgü bir şekilde gösterdikleri ilgilerini de kaybetmektedirler. TFIIIA'da bulunan Cys köklerinin yerinin başka bir amino asitle tutulması veya bu köklerin polipeptid zincirinden çıkarılması da DNA'ya diziye özgü bağlanma yeteneğini ortadan kaldırmaktadır.



Şekil 6. Çinko parmağı (zinc finger) proteini

2.5.3. ZNT AİLESİ (SLC30A)

İnsanda 9 tane ZNT, 15 tane ZIP kodlayan gen bulunmaktadır. ZNT ve ZIP genleri çinko homeostasisinde birbirlerine zıt olarak çalışırlar. ZIP genleri çinkoyu hücre içine almakla görevli iken; ZNT genleri çinkoyu hücre dışına serbest bırakma veya internal olarak sekrete etmede görevlidirler (Liuzzi; 2004).



Şekil 7. Çinko taşınmasında ZNT ve ZIP gen aileleri (Liuzzi Juan P, 2004)

ZNT gen ailesinin (SLC30A) filogenetik ağaçta tüm organizmalarda 100'den fazla üyesi vardır. Bu aile 3 alt aileye ayrılmıştır. Altaile 1 prokaryotik organizmaları içerirken; subfamily 2 ve 3 hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunmaktadır. ZNT gen ailesi üyelerinden ;

ZNT1 : Memelilerde çinko taşınmasında ilk keşfedilen proteindir. İnsanda ve farelerde 1. kromozom üzerinde yer alır.

ZNT2 : 1.kromozomda lokalize olup çinko taşınımında görevlidir.

ZNT3 : 388 aminoasitlik protein kodlayan ZNT3 7.kromozom üzerinde yer almaktadır.

ZNT4 : Çinkonun hücresel transportunda görevli olup memeli protein ailesinin dördüncü belirlenmiş üyesidir. 15. kromozomun uzun kolunda 15q21de lokalize olmuştur.

ZNT5 : h ZTL1 adıyla da bilinen ZNT 5 768 aminoasitlik protein kodlamaktadır. 5. kromozom üzerinde lokalize olmuştur. İnsanda pankreasta insülin içeren beta hücrelerinde ZNT5 proteini bulunmuştur.

ZNT6 : 461 aminoasitlik protein kodlayan ZNT6 6.kromozom üzerinde yer alır. Diğer ZNT gen ailesi üyelerinden farklı olarak histidince değil serin aminoasiti bakımından zengin bölgeler içermektedir.

ZNT 7 : 1. kromozom üzerinde yer almakta ve 376 aminoasit kodlamaktadır

ZNT 8 : 369 aminoasiti kodlamakta ve 8. kromozom üzerinde yer almaktadır. ZNT 3 ile % 42 oranında homoloji gösterir.

ZNT 9 : 4. kromozom üzerinde yer almakta ve 569 aminoasit kodlamaktadır.

2.5.4. ZIP GEN AİLESİ

Ökaryotik çinko taşınımında ZIP(ZRT/ ILT related Proteins) ve CDF (Cation Diffusion Facilitator) aileleri olmak üzere iki aile önemli rol oynamaktadır. Zrt/Irt benzeri proteinler olarak adlandırılan ZIP taşıyıcılarından ZRT-1 *sacchomyces cerevisia*'de , IRT-1 ise *arabidopsis thaliana* da belirlenmiştir. (Taylor; 2005) ZRT-1 mayalarda çinko alınımında, IRT-1 bitkilerde demir transportunda görev almaktadır. Şimdiye kadar National Center for Biotechnology Information (NCBI)'e göre öbakterilerde, arkelerde, funguslarda, protozoalarda, bitkilerde ve memelilerde olmak üzere 86 tane ZIP ailesi üyesi belirlenmiştir (Gaither ;2001) .

ZIP1 (SLC39A1) : İnsanda 1. kromozomda lokalize olmuştur. 324 aminoasit kodlayan bu gen 8 tane transmembran domaini içermektedir. DNA' a bağlanmayı sağlayan lösün fermuarı motifi içermektedir (Gaither; 2001).

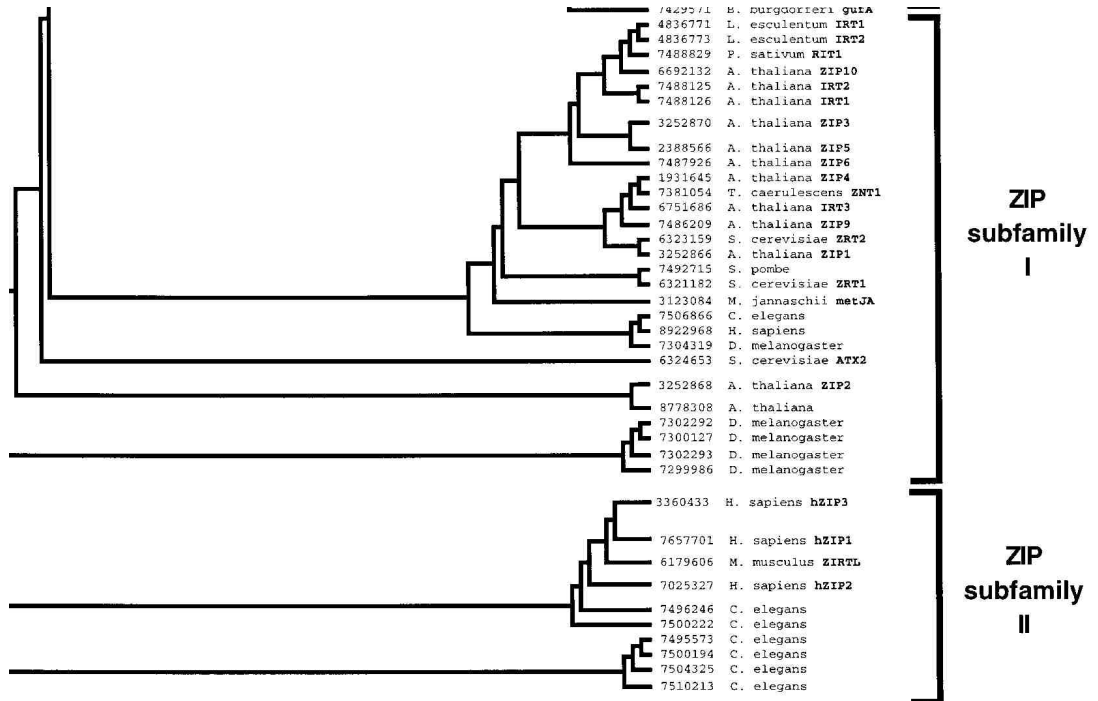
ZIP2 (SLC39A2) : İnsanda 14. kromozomda yer alan ZIP2 309 aminoasit kodlamaktadır. Hücrelere çinko alınımında ve çinko homeostasisinin sağlanmasında önemli rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

ZIP3 (SLC39A3) : İnsanda 19.kromozom üzerinde yer alan ZIP3, 314 aminoasit kodlamaktadır. Yapılan çalışmalarda THP1 hücrelerinde mZIP3

ekspresyonuna bakılmış; kemik iliği ve dalakta yüksek oranda akciğer ve ince bağırsakta minimum düzeyde olduğu görülmüştür.

ZIP4 (SLC39A4): Bu gen histidine zengin çinko uptake proteini olarak görev yapan transmembran protein ailesinin üyesi olan hZIP 4 olarak adlandırılan proteini kodlamaktadır. hZIP 4 çinkonun intestinal emiliminden sorumludur. Yapılan çalışmalarda Akrodermatitis enteropatikaya aday bölge olduğu düşünülen 8q24 üzerindeki 3,5-CM bölgesinde de SLC39A4 geni tespit edilmiştir. Çinko hücrelerin içine veya dışına bir seri taşıyıcı protein aracılığıyla hareket ettirilir. Bu taşıyıcı proteinler ortamdaki çinkoyu temin ederler, hücreleri çinko toksisitesinden korurlar ve metabolik işlevler için yeterli miktarda çinko elde edilmesini sağlarlar.

Guerinot ve ark.'ları 2000 yılında yaptıkları çalışmada ZIP proteinlerini ZIP-1 ve ZIP-2 alt ailesi olmak üzere sınıflandırmışlardır. ZIP-1 ailesi büyük oranda fungal ve bitki grubunu içerirken, ZIP-2 ailesi memeli grubunu içermektedir. Bu ailelere ek olarak ökaryotlarda GUF alt ailesi ve LIV-1 alt ailesi olarak iki subaile daha tanımlanmıştır(Guerinot ML;2000).

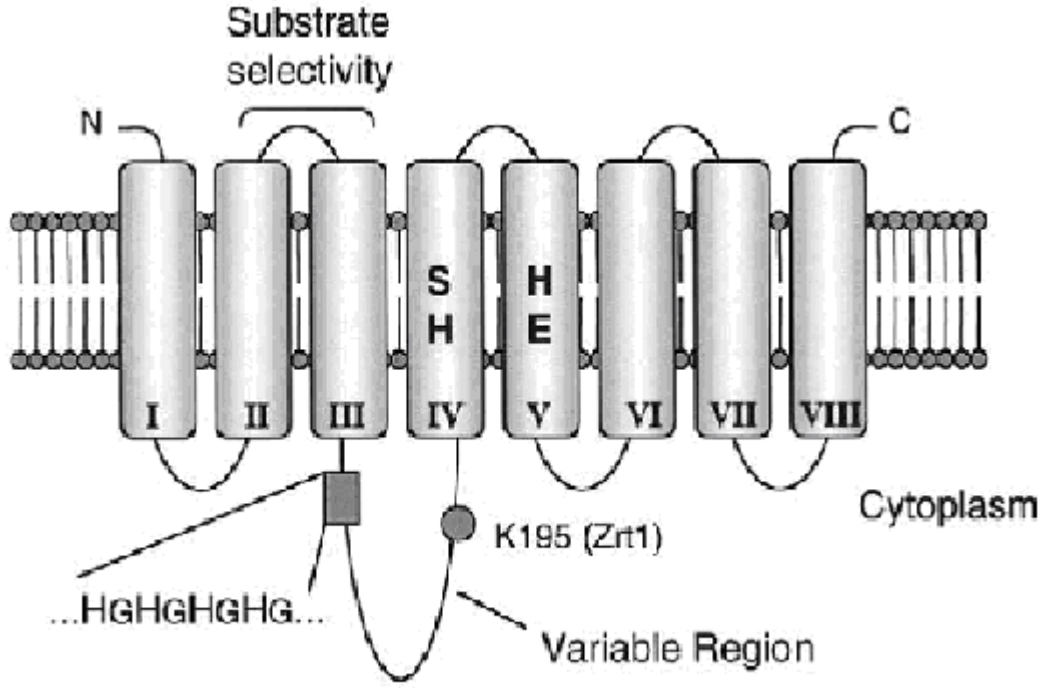


Şekil 8. Ökaryotlarda ZIP gen ailesi

2.5.5. ZIP Protein Topolojisi

Zip proteini sekiz tane transmembran domaini içermektedir. Üçüncü ve dördüncü transmembran domainleri arasında histidine zengin HHHGHSH yada HDHTHDE motifleri bulunmaktadır. (Taylor ;2005) Bu motiflerin fonksiyonu tam olarak bilinmese de potansiyel metal bağlanma bölgeleri olduğu, bu metal iyonların taşınması ve regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir.

Zip 14 geninde yer alan HHHGHSH motifinin ise çinko alınımını sağladığı bilinmektedir (Gaither ;2001).



Şekil 9. Zip protein topolojisi

2.5.6. ZIP14 (SLC39A14)

Hücre içerisine çinko alınımında rol oynayan SLC (solute carrier) süper ailesine ait bir gendir. SLC ailesi 46 aile ve 360 fonksiyonel taşıyıcı genden oluşur. Zip 14 plazma membranında lokalize olmuştur. SLC ailesinden SLC39A14 (ZIP 14) çinko eksikliğinden sorumlu mekanizmalarla birlikte infeksiyon ya da inflamasyonda akut faz cevapta rol oynar. Zip 14 genlerinin düzenlenmesinin IL-6 aracılığıyla hepatik çinko birikmesi ya da inflamasyonda çinko azlığı ile alakalı olduğu bilinmektedir. Zip14; 8.kromozumun kısa kolunda 21.3de (8p21.3) yer almaktadır. 13 ekzon içermektedir (Girijashanker; 2008).

ZIP gen ailesi üyeleri ile nöral tüp defekti hastalığı üzerine şimdiye kadar herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Günümüze kadar ZIP14 üzerine yapılan çalışmalarda LZT (LIV-1 subfamily of ZIP zinc Transporters) ailesinin yapısal ve fonksiyonel analizi yapılmış, LZT ailesinde transmembran domain V de hem metal bağlayıcı özellikte metalloproteaz motifi bulunduğu (HEXPHEXGD), hem de ZIP (Zrt-, Irt-like Proteins) tarafından çinko taşınımının olduğu histidine zengin bir bölge bulunduğu görülmüştür. (Liu ;2008) Liuzzi JP ve ark.' larının yaptığı çalışmada Zip 14 genlerinin düzenlenmesinin IL-6 aracılığıyla hepatik çinko birikmesi ya da inflamasyonda çinko azlığı ile alakalı olduğu görülmüştür.(Liuzzi; 2005) Sisteince zengin proteinler olan metallothioneinlerin kadmiyum, çinko gibi ağır metallere bağlanmasının mangan iyonları tarafından indüklendiği ve IL-6 tarafından ZIP 14 geninin ekspresyonunun düzenlendiği ise yapılan başka bir çalışmadır.(Kobayashi 2007) Girijashanker ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada ise metal bikarbonat iyonlarının taşınımında ZIP14 ve ZIP8 benzerlikleri ortaya konmuştur.Yapılan bu çalışmada ZIP14 ve ZIP8 genleri tarafından kadmiyumun hücre içerisine alınımında en etkili inhibitörün çinko iyonları olduğu bulunmuştur (Girijashanker; 2008).

2.6. MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.6.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar

Bu çalışmada DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için RBC lizis çözeltisi, fenol / kloroform karışımı; polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini görmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için TBE (Tris- HCl Borik asit EDTA), TAE (Tris-HCl Asetik asit EDTA) çözeltileri, SSCP jeli hazırlamak için akrilamid bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi ve TEMED solüsyonları kullanılmıştır.

2.6.2. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA'lar, kan örneklerinden proteinaz K, fenol / kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) spesifik bir DNA dizisinin in-vitro ortamda çoğaltılması yöntemidir. İlk kez 1983 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen bu yöntem bir polimeraz enzimiyle gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA klonlanmasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. (Akar N. ;1999)

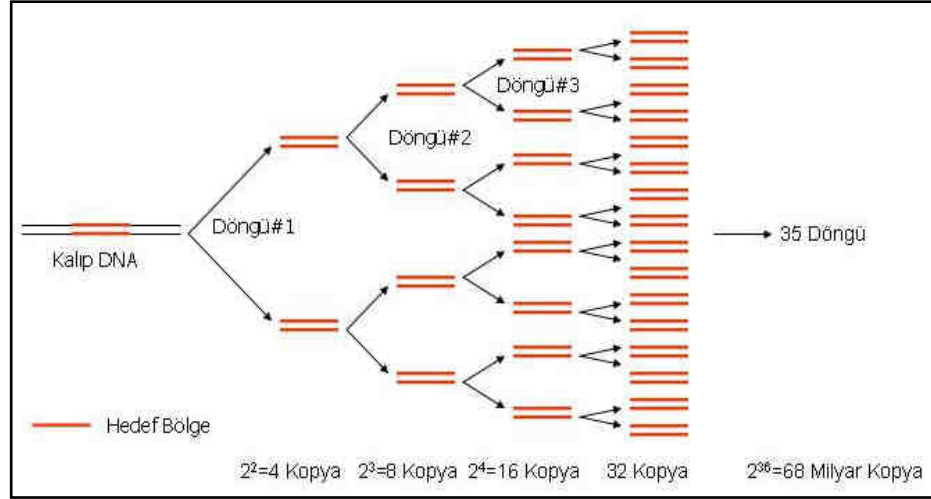
PCR; DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için çok düşük miktarda DNA

bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı diziler ile hibridize olur. Isıya dayanıklı bir polimeraz, deoksिनükleotid trifosfatları (dNTP; A, C, T, G) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl), ayrıca önemli olan bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir (Klug ve Clummings; 2002).

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), son olarak zincirin uzaması (polimerizasyon)'dur. Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40 arasındadır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir PCR işleminde "n" döngü sonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık 2^n kez çoğaltılmış olur. İşlem ısı dönüştürücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar,1999, Klug ve Clummings; 2002).

PCR reaksiyonunda ilk aşamada çoğaltılacak olan çift zincirli DNA 90-95° C de yaklaşık 5 dakika ısıtılmak suretiyle denatüre olur ve tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülerek (bağlanma sıcaklığı) primerlerin tek zincirli DNA'a bağlanması sağlanır. 15-30 nükleotid uzunluğunda olan yapay oligonükleotidlerden oluşan bu primerler; çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Üçüncü

aşama olan DNA sentezi aşaması ise 70-75°C sıcaklıkları arasında gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Öner; 2002).



Şekil 10: Polimeraz zincir reaksiyonunun çalışma prensibi

PCR reaksiyonu için kullanılan DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir.

PCR' dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlı olarak değişir. Taq DNA polimerazın iyi çalışabilmesi için en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyon 10Mm olacak şekilde Tris.HCl pH:8.4 tampon olarak kullanılmaktadır. PCR karışımında 50-60mM düzeyinde potasyum ve 100 µg/ml jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli miktarda artırdığı saptanmıştır.

Magnezyum (Mg) +2 değerlikli olup DNA polimeraz'ın çalışmasını sağlayan en önemli faktördür. Sahip olduğu pozitif yük sayesinde negatif yüklü DNA molekülleri arasına girerek oligonükleotidlerin DNA moleküllerine bağlanmasını kolaylaştırır. DNA, dNTP ve proteinlerin tümü magnezyum(Mg) iyonlarına

bağlandığı için her PCR reaksiyonunda Mg konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg miktarı Taq DNA polimeraz enziminin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzim aktivitesini düşürür ve enzim inaktivasyonuna yol açar (Akar N; 1999).

PCR reaksiyonunda diğer bir önemli faktör deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP)dır ve bunlar son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan her bir deoksinükleotid trifosfatın (dNTP) konsantrasyonunun eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı ise yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur.

PCR spesifikliğinde oligonükleotidlerin uzunluğu önemli yer tutar. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Oligoprimlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(GC)+2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Kullanılan oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri rastgele ancak orantılı olmalıdır. Tekrarlayan diziler içermemeli, guanin sitozin oranı %50'i geçmemelidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak yada uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz etkilenmesine neden olur.

2.6.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesim

PCR ürünlerinin incelenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden birisi PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri kısa DNA dizilimlerini özgül

olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'ı kesen yapılardır. Restriksiyon enzimleri DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilerini şeker ve fosfat omurgasından kırarlar ve bu şekilde DNA'ı manüple ederler.

Tanıma dizileri birçok restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçiğinde de aynıdır ve bunlar 'palindromik diziler ' adını alır. RE lerinin büyük kısmı bakterilerde çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Başlıca görevleri; dışardan bakteriye giren bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonları engellemek ve genetik yönden kararlılığı sağlamaktır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar (Akar N; 1999).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken enzimin elde edildiği cinsin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak bazen soya ait bir harfle birlikte ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamıyla enzimin izolasyon sırası belirtilir. İzosizomerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar N;1999).

2.6.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (SSCP)

Mutasyon belirlenmesinde kullanılan tekniklerden biri olan SSCP denatüre olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayanır. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (Akar N; 1999).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotit dizisine bağlı olarak belirli bir şekil alır. Bir baz değişimi DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur. (Öner; 2002)

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA molekülleri yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilip, elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyon olabileceğinin göstergesidir.

SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 100 bç'ni geçmemesi gerekmektedir. 200 nükleotitlik bir dizide %90'ın, 400 nükleotitlik bir dizide ise %80'lik bir oranda mutasyonları yakalama şansı vardır.

2.6.6. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da "Sequencing" DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotid dizilerinin saptanmasında Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger dideoksi enzimatik yöntemi olmak üzere iki temel teknik geliştirilmiştir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır.

Allan Maxim ve Walter Gilbert kimyasal degradasyon yönteminde dizisi belirlenecek DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif fosfor ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört örnek olarak bölünür. Her örneğe, DNA'da ki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır.

DNA parçalarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi ve elektroforez yöntemiyle sonuç alınır (Maxam AM, Gilbert W.;1992)

Dideoksi yada zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (Sanger; 2004)

Bu yöntem için dizisi belirlenecek olan DNA 'ya, dört farklı dNTPye, dört farklı ddNTPlere, reaksiyonu kataliz edecek DNA polimeraz enzimine ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar ;1999). Yöntemde kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP'den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır. (Akar N. ; 1999)

Günümüzde DNA dizi analizi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı tam otomatik kapiller sistemli çalışan DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine ise floresan boyalar kullanılmaktadır (Öner ;2002). Sistem sahip olduğu lazer ışığı teknolojisiyle farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir hastalık grubuna dahil olmayan 239 birey ile 70 nöral tüp defektli hasta (NTD) ve akrodermatitis enteropatika (AE) hastalığına sahip 10 birey çalışma grubu olarak belirlenmiştir. DNA örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yenidoğan ünitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı, Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kadın Doğum Kliniğinden gönderilmiştir. Ayrıca çalışmaya Cezayir'den gelen 35 nöral tüp defektli hastaya ait DNA'lar da dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

3.1. YÖNTEM

3.1.1. DNA İZOLASYONU

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0.5M Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml.lik falkon tüp içerisinde 25 ml RBC(Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya) 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, çalkalanarak 20 dk buzda bekletilir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si

ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8.0 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Almanya) bekletilir.

İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform(Merck, Almanya), izoamil alkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µL %70'lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüplerin içerisine Tris EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C 'de saklanmıştır.

3.1.2. ZIP14 Gen Değişimlerinin Belirlenmesi

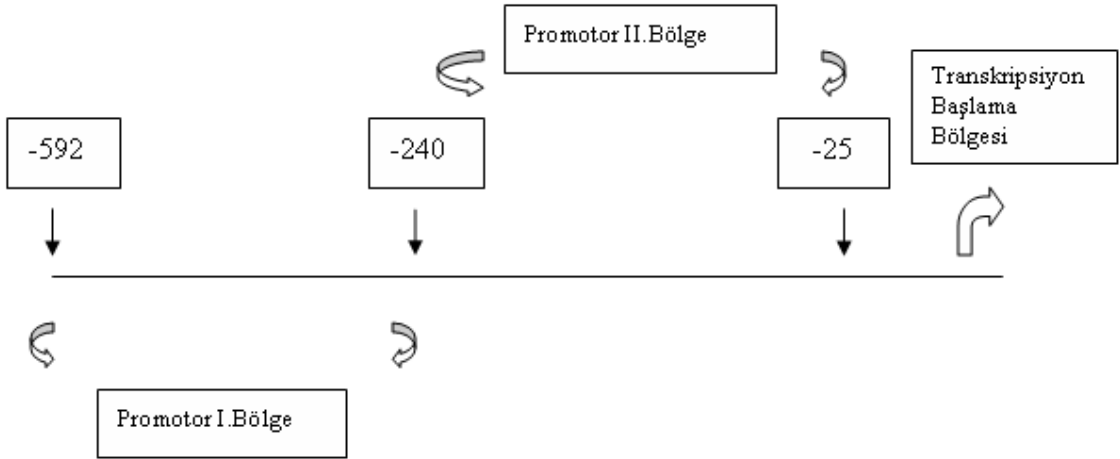
ZIP 14 geni değişimlerinin belirlenmesinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu için yapılan PCR karışımında içeriği üretici firmalar arasında fark olsa da genellikle 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3); 15 mM MgCl₂ bulunur. Bazı tamponlarda BSA (Bovine Serum Albumine), gliserol, betain, DMSO (Dimetil sülfoksit) de bulunabilir. dNTP (Fermentas, Litvanya) karışımından 10 mM stok hazırlanır. Primerler (ABD) liyofilize olarak alınır, 100 µM olacak şekilde stok hazırlanır.

Çizelge 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarlar

	SonKonsantrasyon	Kullanılan Miktar
Distile Su	-	37.8 µl
10x PCR Tamponu	1x	5 µl
dNTP Karışımı	0.2 mM	2 µl
Primer Karışımı	20 µM	2 µl
MgCl ₂	1.5 mM	1 µl
Taq DNA Polimeraz	1 ünite	0.2 µl
DNA Kalıp	100- 300 ng	2 µl
Toplam Miktar		50 µl

3.1.3 ZIP14 Gen Değişimlerinin İncelenmesindeki PCR Koşulları

ZIP14 gen değişimleri incelenmesinde gen ekspresyonunu etkileyebileceği düşüncesiyle öncelikle promotor bölge seçilmiştir. Promotor bölge -592 ile -240 bazları arası birinci bölge; -240 ile -25 arasındaki bölge ikinci bölge olarak iki kısma ayrılmış bu bölgeler için primerler tasarlanarak PCR ları yapılmıştır.



Şekil 11. ZIP14 geni promotor bölgesi

3.1.3.1. ZIP14 Promotor I. Bölge PCR Koşulları

Promotor I.bölge için

F: 5'-TCACCCCCAAATTAACATTTCT-3'

R:5'-GCTAGGCGGTGAGAGCTTC-3' primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

PCR komponentleri yukarda çizelgede belirtilen oranlarda son hacim 50µl olacak şekilde reaksiyona sokulmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise:

95°C de 5 dk	}	35 Döngü
94°C de 0.5 dk		
52°C de 0.5 dk		
72°C de 0.5 dk		

4°C de 5 dk. olarak gerçekleştirilmiştir.(Biorad, ABD). PCR sonrasında 333 bç uzunluğunda oligonükleotid ürünler elde edilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 µl yüklenmiştir.

```
TCACCCCCAAATTAACATTTCTCCCAACTTGGGTTAGTAGGGTTCTTTAGGCGTCTGATCATTGTGGGAAGCGGTGCG  
GCATCAAGTCTGAAAAGTGAATATAATATGGTTTATTGGAACCTGACCAGGAAATTTGGTTCTTTGGCTGGTGGGA  
AATATGCAGAAGAAACACCATCTAAGGGCGCGTCCCCTTCTGAAGTACCTTCCGAACCTGGGGAGGGAAGAGAAAAG  
CTTTTGGGTGAACCAGAAGTGGTAAAATCACATTCAAATAGAGTGGGTAGGACTCTCTCCAGGGGGTGTGGGGTGG  
AGGCTAGGCGGTGAGAGCTTC
```

Dizi 2.1. ZIP14 geni promotor I. Bölge için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (GeneID: 23516)

3.1.3.2. ZIP14 GENİ Promotor II.Bölge için PCR Koşulları

-240 ile -25 bölgeleri arasında yer alan promotor ikinci bölge için

F:5'-CCAGGGAGCAGGTCTTCAC-3'

R:5'-TGACGCGCCGGGTATATAG-3' primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları ise şu şekildedir:

95°C 5 dk,

94°C 0.5 dk

55°C 0.5 dk

72°C 0.5 dk

35 Döngü

4°C 5 dk. olarak gerçekleştirilmiştir.(Biorad,ABD) PCR sonrasında 231 bp uzunluğunda oligonükleotid ürünler elde edilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 µl yüklenmiştir.

CCAGGGAGCAGGTCTTCACGGGAGGTTTCCGGAGGCAGGAGGAGCCTGCGGGTCCTCGGGAGTCACGG
CCGGATGAAGGATGGGAGCGGGCGCCGACCACAGCCAGGGCCGCGAGGCGCAGGAGGGCGCAGGCTGGCCAGG
TCCCCAGCCTGCCGGCCCCACGTGGCAGCCCCGGGGCGAGCGGGGCGGGGCCGGGGCGGGTCCGGCCGCTGACG
CGCCGGGTATATAG

Dizi 2.2. ZIP14 geni promotor II. Bölge için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

3.1.3.3. ZIP14 GENİ 7.Ekzonda yer alan HHH Motifi için PCR Koşulları

7.ekzonda yer alan histidin aminoasiti bakımından zengin olan bu bölgenin (HHHGSH) çinko alınımında rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu bölge çalışmaya dahil edilmiştir.246 bç uzunluğundaki bu bölge için;

F: 5'- CCTCCCTGTCACCCTTCC-3

R:5'-TGCTTGGTGGAGCCTCTAAG-3' primerleri kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları ise şu şekildedir:

95°C 5 dk

94°C 0.5 dk

58°C 0.5 dk

72°C 0.5 dk

35 Döngü

4°C 5 dk. olarak gerçekleştirilmiştir.(Biorad, ABD) PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 µl yüklenmiştir.

*CCTCCCTGTCACCCTTCC*AGCATCATCATGGTCGCTTCCCTCCAAGAAGGACCAGGAGGAGGGGGTGAA
GCTGCAGAACGGGGACCTGGACCACATGATTCTCAGCACTGCAGCAGTGAGCTGGACGGCAAGGCGCCCATGGT
GGACGAGAAGGTCATTGTGGGCTCGCTCTCTGTGCAGGTCAGTGGGCCACCAGC*TGCTTGGTGGAGCCTCTAAG*

Dizi 2.3. ZIP14 geni 7. ekzon HHH motifi için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

3.1.4. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz (Sigma, ABD), kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bizim çalışmamızda PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde değerlendirdik. %2lik jel için 3 gr agaroz tartılıp TAE 1X (Tris-HCl Asetik asit, EDTA) ile 150 ml'e tamamlanır. TAE 1X solüsyonu TAE 50X solüsyonunun 1/5 oranında distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromit (Sigma, ABD)'in %5'lik stok solüsyonundan 5 µl ilave edilir. İyiçe karıştırıldıktan sonra önceden uygun taraklar konularak hazırlanmış olan jel tabağına(Thermo Midicell Primo) dökülür. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Jelin donmasından sonra jel tabağı ile birlikte elektrofrez tankına yerleştirilir. Elektrofrez tankı TAE 1X solüsyonu ile jelin üstü kapanacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10 µl alınıp, 3 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılarak jele yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA Hae III BioLabs, ABD) PCR ürünleri ile birlikte jele 2 µl kadar yüklenir. 80 V akımda 25-30 dk yürütülür. Ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında incelenir ve fotoğraflanır.

3.1.5. SSCP Jeli İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

%7 lik poliakrilamid jelin hazırlanması: Bu jelin hazırlanmasında %40 lık 49:1 oranındaki akrilamid/ bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 196 g akrilamid (Merck , Almanya) ve 4 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) 200 ml distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözdürülür ve hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacime tamamlanarak yapılmıştır.

Jelin polimerleşmesi için kullanılan %10'luk Amonyum Persülfat; 0.3 g Amonyum Persülfat(AppliChem, Almanya) distile su ile 3 ml'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

Akrilamid monomerlerinin polimerleşme reaksiyonunu katalizleyen TEMED (Tetra Etil Metilen deamin) ise hazır olarak bulunur.

Elektroforez Aparatının Hazırlanması: Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulanır. %70'lik alkolle temizlenir ve kurulanır. 1.5 mm'lik spacerlar yardımıyla arada 1.5 mm boşluk bırakılması sağlanır ve klemplerle sabitlenir. Jel döküldükten sonra yine 1.5 mm'lik tarak oturtulur.

Bu çalışmada kullanılan %7 lik poliakrilamid jelin hazırlanmasında stok olarak hazırlanan %30luk akrilamid/ bisakrilamid solüsyonundan 24 ml, TBE 5X tamponundan 25 ml, 600µl 10%'luk Amonyum Persulfat (Sigma, ABD) ve 70.0 ml deiyonize su bir beherde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldıktan sonra üzerine, 60 µl TEMED (Tetra Etil Metilen deamin, Sigma, ABD) konularak, hazırlanan camların arasına dökülür. Yükleme yapılacak kuyucukları oluşturmak üzere uygun taraklar takılarak donması beklenir.

Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur. PCR ürünlerine spesifikliği arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20mM EDTA, %0,05 Xyelene Cyanol, %0,05 Brom-fenol mavisi içermektedir. 40 µl PCR ürünlerine 8 µl yükleme boyası eklenerek 99 °C'de 8 dk denatüre edilir.

Örneklerden 10 µl kuyucuklara yüklenerek 130 V da baz çifti uzunluklarına göre 15-18 saat süreyle +4°C de akıma tabi tutulur. Bantlar, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak görünür hale getirilir.

3.1.6 SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama

Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi %1 lik gümüş nitrat çözeltisidir. 5 g gümüş nitrat (AgNO_3) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml' ye tamamlanır. İkinci çözelti %15 lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisidir. 150 g katı sodyum hidroksit distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise %7,5'lik Sodyum B bikarbonat solüsyonudur ve bu solüsyon %7,5'lik sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan %0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 5 dk muamele edilir. Daha sonra %1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonunu aşamasını takiben jelle muamele edilir.

Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırılır. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenir.

3.1.7 PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon)

ZIP14 geni için belirlenen bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile taranıp SSCP (single strand conformation polymorphism) tekniği ile farklı bant profili veren DNA lar belirlendikten sonra bu DNA lar tekrar PCR yapıldı ve PCR ürünleri PCR pürifikasyon kiti (Agencourt) kullanılarak temizlenir. Mıknatıs özelliğindeki magnet üzerine yerleştirilen plate'e 50 µl pcr ürünü konuldu. Üzerine 1.8 katı kadar (90 µl) agencourt clean solüsyonundan eklendi. 3-4 dk beklenerek DNA'ların mıknatıslı alana yapışması sağlandı. Üst kısımda yer alan supernatant atıldı ve 200 µl %70 lik etanol eklendi. 30 sn. beklendi. Supernatant pipetle uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Oda sıcaklığında örnekler 10-15 dk. kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra 40 µl deiyonize su ile sulandırılarak DNA'nın çözünmesi sağlandı. Daha sonra her bir ekzon için temizlendiği düşünülen DNA'lar %2'lik agaroz jelde incelendi.

3.1.8 DNA Dizi Analizi

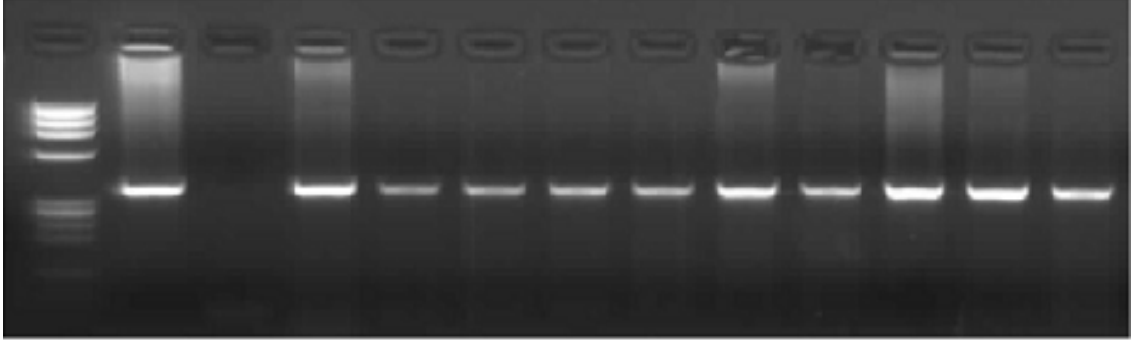
Her bir ekzon için birbirinden farkları tespit edilen DNA örneklerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, USA) kullanıldı. Bunun için 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılıp her bir kuyucuğa 12 µl premiks (2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 5µl temizlenmiş PCR ürünü, 20 pmol primer konularak "cycle sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaklar, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapışma ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60 µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µl eklenip, +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi

3.2. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yaptığımız çalışmada nöral tüp defektli (70), Akrodermatitis enteropatika(10) ve kronik çinko eksikliği olduğu belirlenen 10 hasta DNA sı çalışmaya dahil edildi. ZIP14 geninin promotor bölgesi ve 7.ekzonunda yer alan HHH motifi SSCP tekniğiyle tarandı.

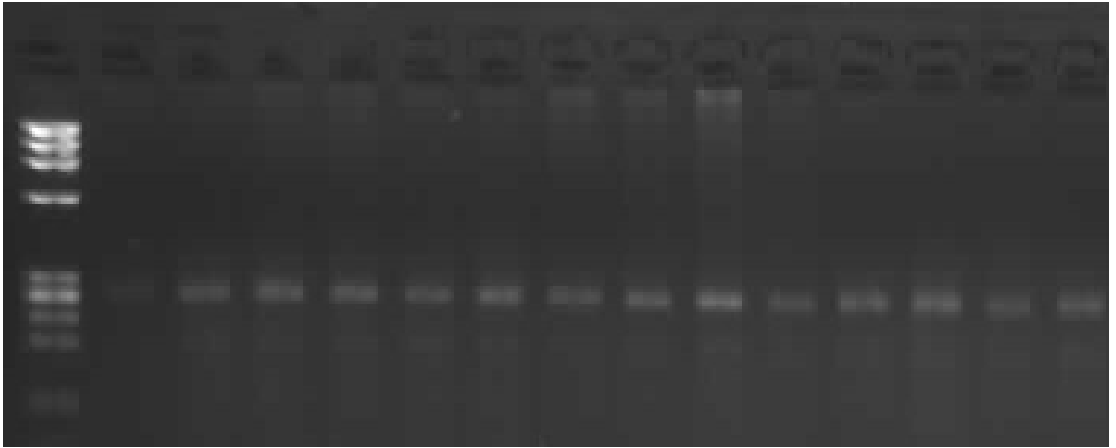
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

3.2.1.1. 333 bç'lik promotor I.bölgeye ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80V da 10 dk yürütülmüştür.



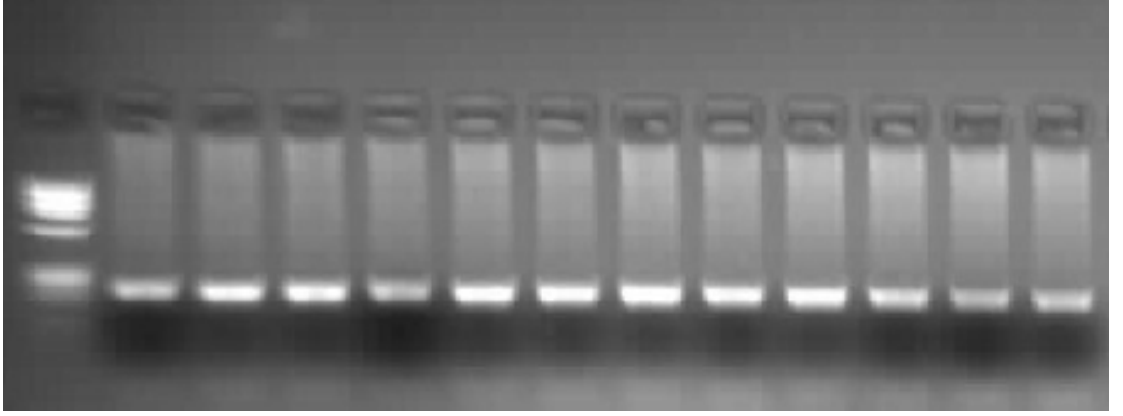
Şekil 12. ZIP14 geni promotor I.bölge PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.2.1.2. 231 bç.'lik promotor II.bölge PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80V da 10 dk yürütülmüştür.



Şekil 13. ZIP14 geni promotor II.bölge PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

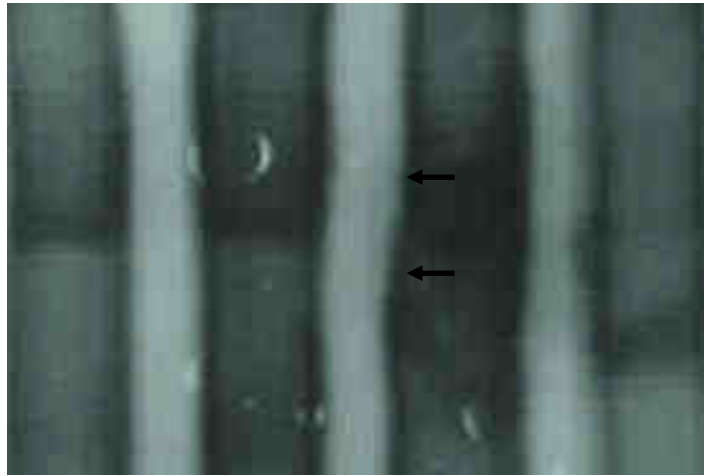
3.2.1.3. 246 bç.'lik 7.ekzonda yer alan HHH motifi PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80V da 10 dk yürütülmüştür.



Şekil 14. ZIP14 geni 7. ekzon HHH motifi PCR ürünlerinin %2 'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.2.2 Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları

3.2.2.1. **Promotor I. Bölge:** 333 bç'lik promotor 1.bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant örneği tespit edilmiştir.



Şekil 15. ZIP14 geni promotor I.bölge SSCP jel görüntüsü

3.2.2.2. Promotor II.Bölge: 231 bç.'lik promotor 2.bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda örnek marker (Φ X174 DNA Hae III)'la karşılaştırıldığında jelde 194 bç uzunluğunda farklı bantlar olduğu görülmüştür.



Şekil 16. ZIP14 geni promotor II. Bölge SSCP jel görüntüsü

3.2.2.2. ZIP14 7.Ekzonda yer alan HHH Motifi: 246 bç.'lik 7.ekzonda yer alan HHH motifinde SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda farklı bir DNA bant örneğine rastlanmıştır.

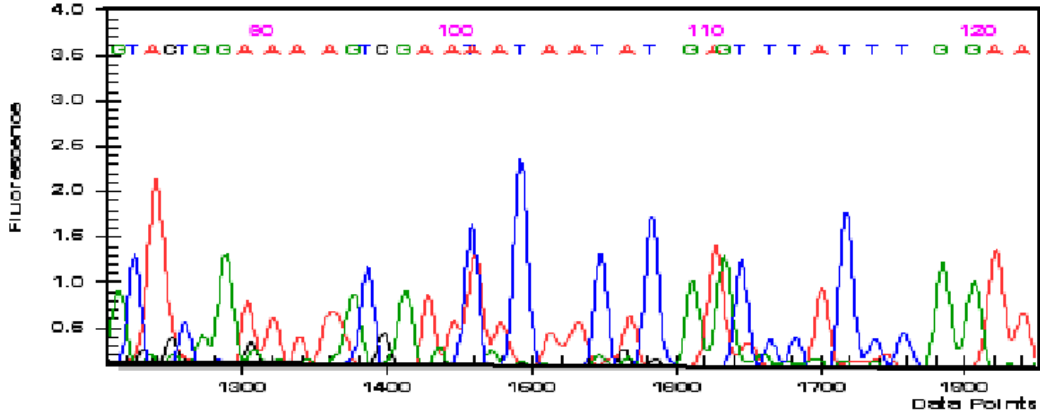


Şekil 17. ZIP14 geni 7.ekzon HHH motifi SSCP jel görüntüsü

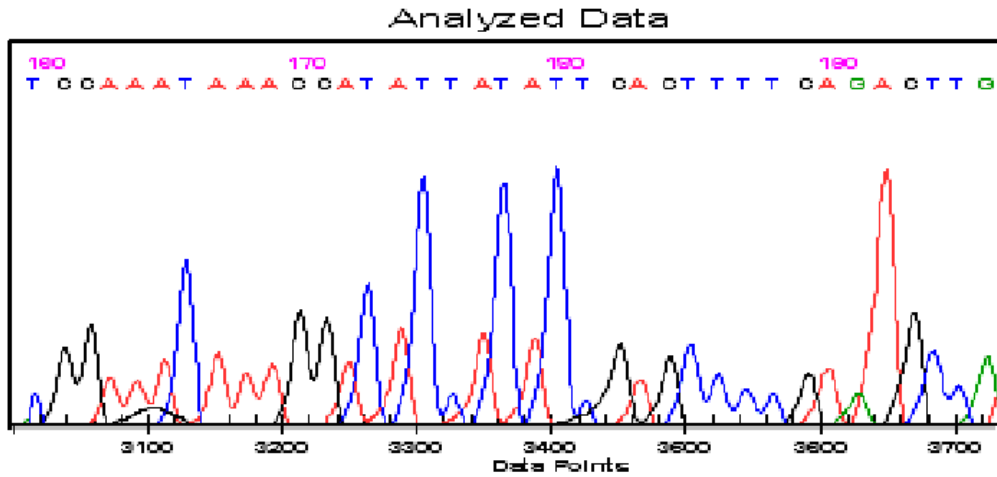
SSCP ler sonucunda farklı bant profili veren DNA lar belirlendikten sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonuçları ZIP 14 geninde taranan bölgeye ait diziyle karşılaştırılarak farklılık olup olmadığına bakılmıştır.

3.2.3 Promotor I.bölge için DNA Dizi Analizi Sonuçları

Bu bölge için SSCP de farklı bant profili veren hasta DNAlarında herhangi bir değişimin olup olmadığının saptanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Promotor I. Bölge için yapılan DNA dizi analizinde;



Şekil 18. K.Y.adlı hastaya ait ZIP14 promotor I. Bölge forward primerleri ile yapılan DNA dizi analizi



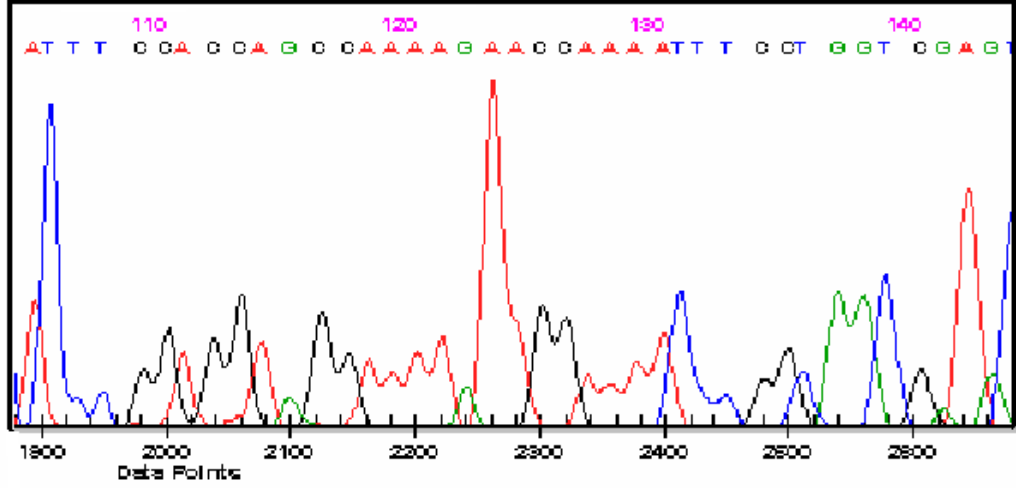
Şekil 19. K.Y.adlı hastaya ait ZIP14 promotor I. Bölge reverse primerleri ile yapılan DNA dizi analizi

Promotor I. Bölgeye ait primerlerle yapılan DNA dizi analizinde yapılan karşılaştırmalar sonucunda herhangi bir değişim saptanamamıştır.

3.2.4. Promotor II.Bölge DNA Dizi Analizi Sonuçları:

Promotor II. Bölge için yapılan SSCP de farklı bant profili veren DNAlar ZIP14 promotor II. Bölge forward ve reverse primerleriyle DNA dizi analizi yapılmıştır.

Analyzed Data

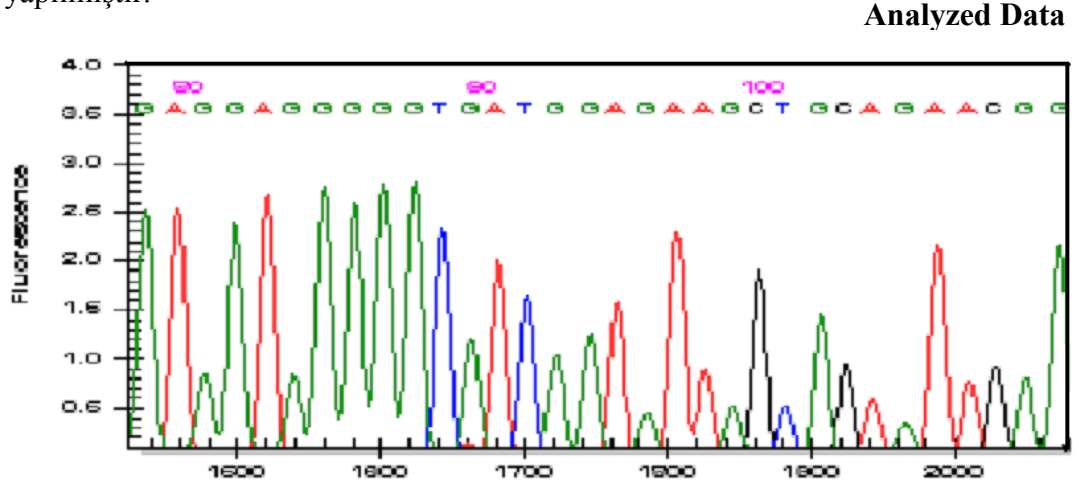


Şekil 20.H.S. adlı hastaya ait DNA dizi analizi

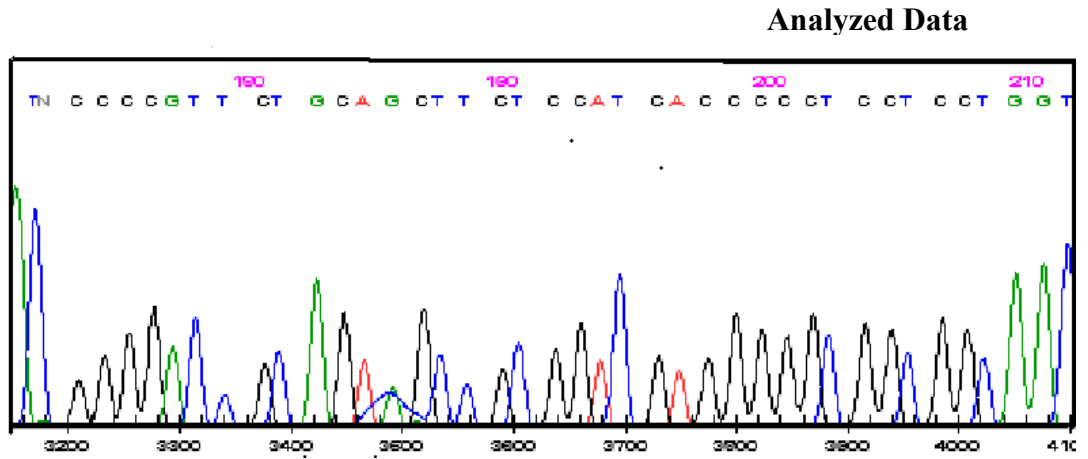
Yapılan karşılaştırmalar sonucunda herhangi bir değişiklik bulunamamıştır.

3.2.5 HHH MOTİFİ DNA Dizi Analizi Sonuçları:

HHH motifi için yapılan SSCP de farklı bant profili veren DNA lara ZIP14 7.ekzonda yeralan HHH motifine ait reverse ve forward primerlerle DNA dizi analizi yapılmıştır.



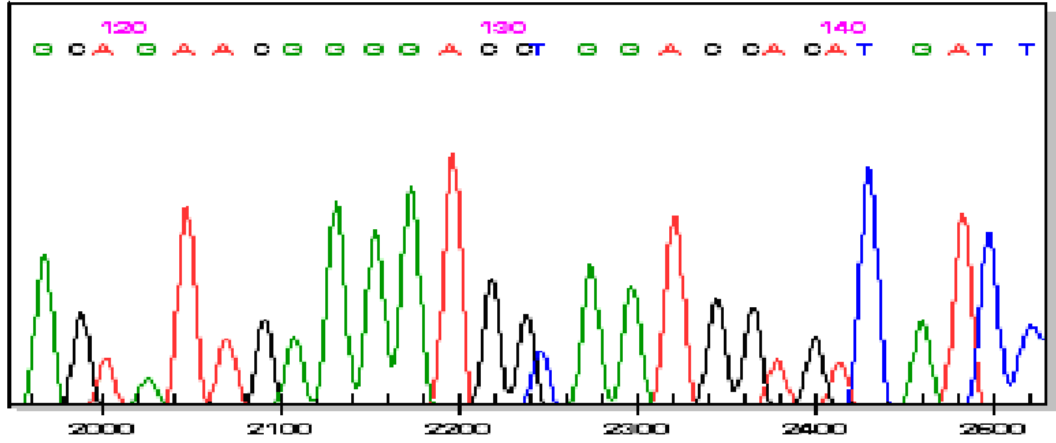
Şekil 21. HHH motifi forward primerle yapılan DNA dizi analizi



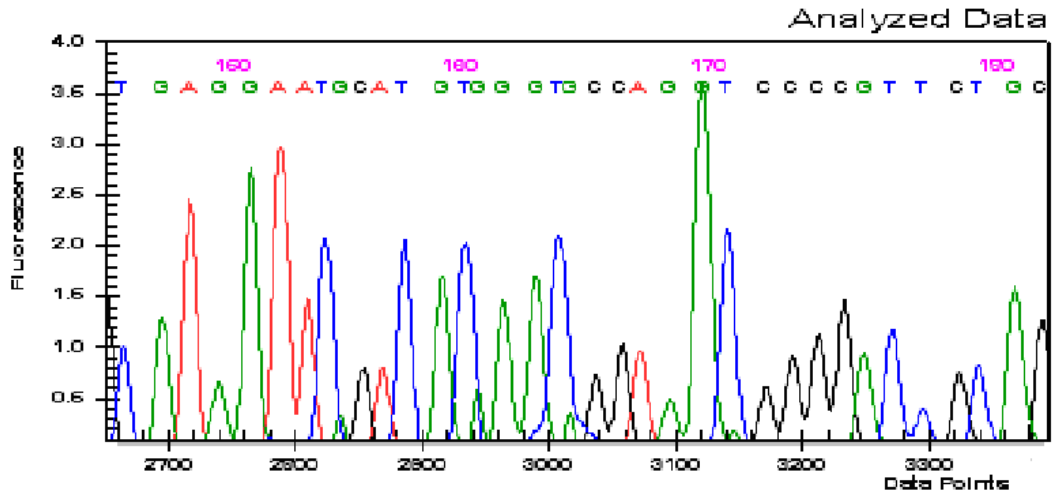
Şekil 22. HHH motifi reverse primerle yapılan DNA dizi analizi

Diziler her iki taraftan karşılaştırıldığında herhangi bir değişim saptanamamıştır.

SSCP de farklı bant profili gösteren F.A adlı hastaya ait DNA ile yapılan DNA dizi analizinde;



Şekil 23. F.A adlı hastaya ait HHH motifi forward primerle yapılan DNA dizi analizi

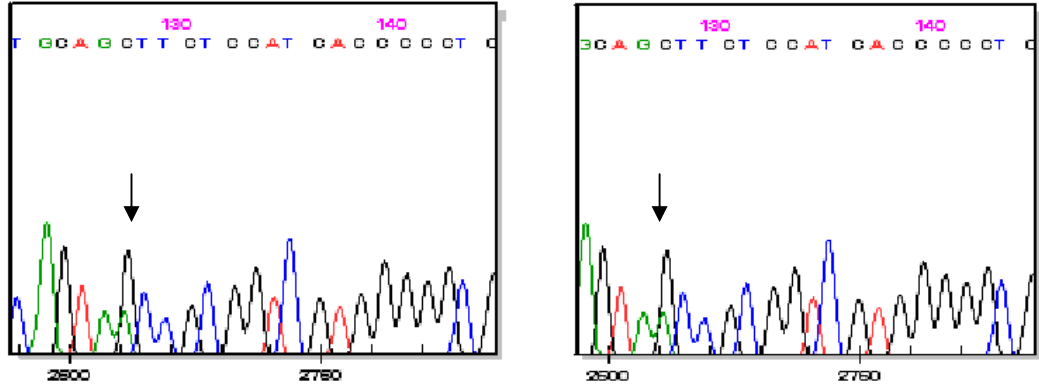


Şekil 24. F.A. adlı hastaya ait HHH motifi reverse primerleriyle yapılan DNA dizi analizi

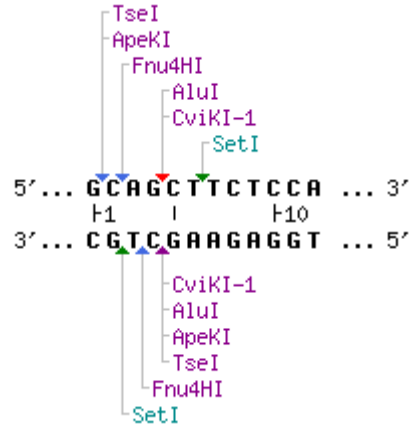
HHH motifine ait primerlerle yapılan DNA dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında herhangi bir değişim bulunamamıştır.

Cezayirden gelen DNA örneklerinin HHH motifi primerleriyle yapılan DNA dizi analizleri sonucunda farklı DNA larda aynı bölgede değişime rastlanmıştır.

Şekil 25. Cezayirden gelen NTD li hastaya ait HHH primerleriyle yapılan DNA dizi analizi

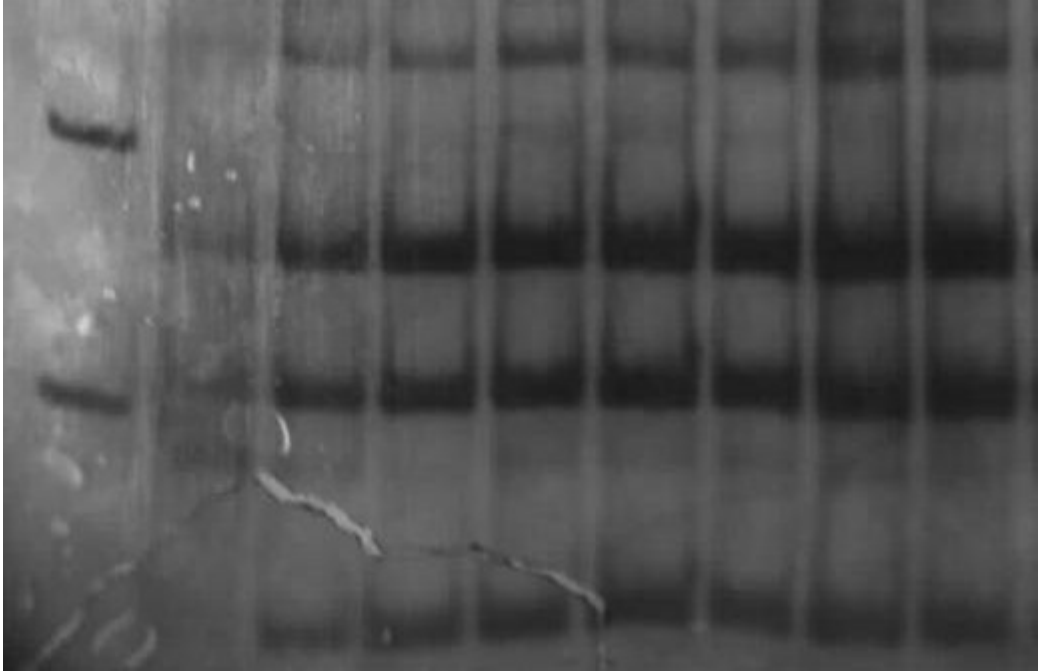


Sekanslarda görülen değişimi saptayabilmek için bu bölgede G/C i tanımlamak amacıyla GCAGC dizini kesen Alu I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim yapılmıştır.



Şekil 26. Alu I restriksiyon enzimi

Reaksiyon komponentleri 12µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl AluI = 15 µl toplam hacim olmak üzere hazırlanır. 37°C'de 16 saat süreyle reaksiyon gerçekleşmiştir. (Biorad, ABD) Enzimle kesim sonunda kesim ürünleri PAGE(poliakrilamid jel elektroforezi)' de 130 V da 4 saat yürütülerek sonuç değerlendirilmiştir.



Şekil 27. AluI restriksiyon enzimiyle yapılan kesimin PAGE'de görüntüsü

Cezayirli NTD hastalarında HHH motifi primerleriyle yapılan DNA dizi analizinde görülen bu değişimin herhangi bir mutasyon olup olmayacağına karar verebilmek için AluI restriksiyon enzimiyle yapılan kesim sonucuna bakıldığında bu bölgede herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Konjenital malformasyonlar tedavi ve rehabilitasyonları zor ve masraflı olan, aile ve topluma çok büyük maddi ve manevi yükler getiren sağlık sorunlarıdır. Perikonsepsiyonel (gebelik oluşmadan 1 ay önce ve gebeliğin ilk 6-8. haftaları arasındaki süre) ve prenatal dönemde konjenital malformasyonlara yol açan faktörler belirlenip gerekli önlemler alınabilmektedir.(Rosano; 2008)

Nöral tüp defektleri (NTD) ciddi komplikasyonlarla sonuçlanan nöral tüpün hatalı kapanması sonucu oluşan doğumsal bir kusurdur. Prenatal dönemde kalp hastalıklarından sonra en fazla bebek ölümüne ve ömür boyu sürececek rahatsızlıkların ortaya çıkmasına yol açan doğumsal defektler arasında yer alır. Türkiyede nöral tüp defektlerinin (NTD) sıklığını araştıran çeşitli çalışmalar bu sıklığın bin canlı doğumda üç civarında olduğunu göstermektedir. Üniversite kliniklerinde yapılan bir çalışmaya göre bu sıklık Kuzey ve Doğu Anadolu'da en yüksek (sırasıyla bin canlı doğumda 4.32 ve 4.54) olup, Batı Anadolu'da en düşüktür (bin canlı doğumda 2.17). Genetik faktörler, ilaçlar ve çevresel kirlenmeler, annede yüksek ateş, diyabet, folik asitten fakir beslenme, B12 ve A vitamini bakımından fakir beslenme, çinko eksikliğinin bu doğumsal kusurun ortaya çıkmasında rol oynadığı savunulmaktadır.(Tuncbilek; 1999)

Tüm vücut çinkosunun %85'i iskelet kasında ve kemikte; %11'i deri ve karaciğerde; geriye kalan %2-3'ü ise diğer dokularda bulunur.Türkiyede çinko eksikliğine bağlı NTD oluşumu üzerine ilk çalışma Cavdar ve ark.'ları (1980) anensefalide maternal serumda çinko eksikliğini(Babacan 1983; Cavdar 1983), anensefalide maternal serum, plazma ve saçta çinko seviyesinin azaldığını (1981), nöral tüp defektli annelerde çinko seviyesinde azalma, bakır seviyesinde artış olduğunu gösteren çalışmalar yapmışlardır.(Cavdar ;1991) Akar ve ark'ları (1988) hamilelerde oral plazma çinko eksikliği ile nöral tüp defekti ilişkisini ortaya koymuş, çinko eksikliği gösteren annelerde çinko supplementasyonunun etkisini göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarla yetersiz çinko alımının dolaşımdaki çinko

miktarının azalmasına ve gelişen fetüste nöral tüp gelişiminin yavaşlamasına neden olduğu düşünülmektedir.(Akar ;1988)

Yapılan genetik çalışma tiplerinden en çok bilineni, hastalıklarla ilgili aday genlerin ortaya konması ve bu genler üzerindeki değişimlerin tanımlanmasıdır. Bunun için bu çalışmada hücre içerisine çinko alınımında görev alan SLC39 ailesinden ZIP14 genindeki değişimler ile nöral tüp defektli anneler ve çocuklar arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. ZIP gen ailesi üyeleri ile nöral tüp defekti hastalığı üzerine şimdiye kadar herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak NTD oluşumunda ZNT gen ailesinden ZNT4 geninin rolü olduğu Akar N ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (Akar N, 2006).

Şimdiye kadar ZIP14 üzerine yapılan çalışmalarda ise LZT (LIV-1 subfamily of ZIP zinc Transporters) ailesinin yapısal ve fonksiyonel analizi yapılmış, LZT ailesinde transmembran domain V de hem metal bağlayıcı özellikte metalloproteaz motifi bulunduğu (HEXPHEXGD), hem de ZIP (Zrt-, Irt-like Proteins) tarafından çinko taşınımının olduğu histidince zengin bir bölge bulunduğu görülmüştür. Liuzzi JP ve ark.'larının yaptığı çalışmada Zip 14 genlerinin düzenlenmesinin IL-6 aracılığıyla hepatik çinko birikmesi ya da inflamasyonda çinko azlığı ile alakalı olduğu görülmüştür.(Liuzzi; 2004) Sisteince zengin proteinler olan metallothioneinlerin kadmiyum, çinko gibi ağır metallere bağlanmasının mangan iyonları tarafından indüklendiği ve IL-6 tarafından ZIP 14 geninin ekspresyonunun düzenlendiği yapılan başka bir çalışmadır.(Liuzzi ;2005) Girijashanker K. ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada ise metal bikarbonat iyonlarının taşınımında ZIP14 ve ZIP8 benzerlikleri ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmada ZIP14 ve ZIP8 genleri tarafından kadmiyumun hücre içerisine alınımında en etkili inhibitörün çinko iyonları olduğu bulunmuştur.

ZIP14 geninde meydana gelen bir mutasyonunun genin fonksiyonu olan çinko alımını engelleyebileceği bu durumun da NTD oluşumundaki rolü üzerine yaptığımız bu çalışmada sonuç olarak;

1. ZIP14 geninin ekspresyonunu etkileyebileceği düşüncesiyle öncelikle promotor bölgesi NTD li hastalarda taranmış; herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm bulunamamıştır.
2. Hücre içerisine çinko alınımında rolü olan histidine zengin bir bölge olan HHH motifi içeren 7.ekzon'un NTDli hastalarda taranması sonucu herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm bulunamamıştır.
3. Bu çalışmada çinko alınımında etkin olabileceği düşünülen iki bölge taranmış olup herhangi bir sonuca ulaşlamamıştır. Diğer ekzonların taranması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Akar, N. Cavdar, A. O. Arcasoy, A. 1988. High incidence of neural tube defects in Bursa Turkey. Paediatr Perinat Epidemiol, 2 (1); 89-92.
2. Akar N, Belgemen T. 2004 . The Genes Involved In Zinc Metabolism Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 57, Sayı 3, 2004
- 3.. Akar N.,Akar E., Araç B, Ulu A. and Ekim M. 2006. Does SLC30A4 (ZNT4) gene exon 5 915 T-C alteration play a role in neural tube defects? Trace Elements and Electrolytes, Volume 23, No. 4/2006 (266-269)
4. Akar N. ,1999; Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş Yayınları
5. American Academy of Pediatrics, Policy statement. Folic acid for the prevention of neural tube defects. Pediatrics September 1993;92(3):493-4)
6. Babacan E., Cavdar A. O., Arcasoy A. , Himmetoglu, O. 1983. Zinc levels in maternal and cord blood serum during normal deliveries. Prog Clin Biol Res, 129 221-6.
7. Bower C., Werler M. M. 2001. Folate before pregnancy: are we doing enough? Med J Aust, 174 (12); 619-20.
8. Cavdar A. O., Babacan E., Asik S., Arcasoy A., Ertem U., Himmetoglu O., Baycu T., Akar N. 1983. Zinc levels of serum, plasma, erythrocytes and hair in Turkish women with anencephalic babies. Prog Clin Biol Res, 129 99-106.
9. Cavdar A. O., Bahceci M., Akar N., Dincer F. N., Erten J. 1991. Maternal hair zinc concentration in neural tube defects in Turkey. Biol Trace Elem Res, 30 (1); 81-5.

10. Dodds L.King, W. D. 2001. Relation between trihalomethane compounds and birth defects. *Occup Environ Med*, 58 (7); 443-6.
11. Donnelly J. G., 2001. Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 38 (3); 183-223.
Eichholzer, M. 2006. [Is low or high body weight associated with an increased risk of neural tube defects?]. *Praxis (Bern 1994)*, 95 (51-52); 2019-26.
12. Gaither L. A., Eide D. J. 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 14 (3-4); 251-70.
13. Gaither L. A., Eide D. J. 2001. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, 276 (25); 22258-64.
14. Girijashanker K., He L., Soleimani M., Reed J. M., Li H., Liu Z., Wang B., Dalton T. P., Nebert D. W. 2008. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol*, 73 (5); 1413-23.
15. Golalipour M. J., Mansourian A. R. , Keshtkar A. 2006. Serum zinc levels in newborns with neural tube defects. *Indian Pediatr*, 43 (9); 809-12.
16. Harris E. D. 2002. Cellular transporters for zinc. *Nutr Rev*, 60 (4); 121-4.
17. Hernandez-Diaz S., Werler M. M., Walker A. M., Mitchell A. A. 2001. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *Am J Epidemiol*, 153 (10); 961-8.
18. Johnson F.F., McKnight S.L. (1989) Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 799–839)
19. Juan P. Liuzzi and Robert J. 2004. Cousins mammalian zinc transporters *Annu. Rev. Nutr.* 24:151–72
20. Kobayashi K., Kuroda J., Shibata N., Hasegawa T., Seko Y., Satoh M., Tohyama C , Takano H., Imura N., Sakabe K., Fujishiro H., Himeno S. 2007. Induction of metallothionein by manganese is completely dependent on interleukin-6 production. *J Pharmacol Exp Ther*, 320 (2); 721-7.

21. Kondoh M., Tsukahara R., Kuronaga M., Higashimoto M., Takiguchi M. Sato, M. 2002. Enhancement of MT synthesis by leptin in fasted mice. *Life Sci*, 71 (20); 2425-33.
22. Kury S., Dreno B., Bezieau S., Giraudet S., Kharfi M., Kamoun R. Moisan, J. P. 2002. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet*, 31 (3); 239-40.
23. Liu Z., Li H., Soleimani M., Girijashanker K., Reed J. M., He L., Dalton T. P., Nebert D. W. 2008. Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 365 (4); 814-20.
24. Liuzzi J. P., Cousins R. J. 2004. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr*, 24 151-72.
24. Liuzzi J. P., Lichten L. A., Rivera S., Blanchard R. K., Aydemir T. B., Knutson, M. D., Ganz T., Cousins R. J. 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (19); 6843-8.
26. Lundberg Y. W., Wing M. J., Xiong W., Zhao J., Finnel R. H. 2003. Genetic dissection of hyperthermia-induced neural tube defects in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67 (6); 409-13.
27. Maxam AM, Gilbert W. A New Method for Sequencing DNA *Natl. Acad. Sci. USA*, 1992
28. Onosaka S., Tetsuchikawahara N. Min, K. S. 2002. Paradigm shift in zinc: metal pathology. *Tohoku J Exp Med*, 196 (1); 1-7.
29. Pittman T. , 2008. Spina bifida occulta. *J Neurosurg Pediatrics*, 1 (2); 113; discussion 113.

30. Ray J. G., Thompson M. D., Vermeulen M. J., Meier C., Wyatt P. R., Wong P. Y., Summers A. M., Farrell S. A., Cole D. E. 2007. Metabolic syndrome features and risk of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth*, 7 21.
31. Reeder S. J., Hoffmann R. 1998. The prognosis for women after an acute myocardial infarction: recommendations for practice. *Dimens Crit Care Nurs*, 17 (2); 75-82.
32. Rosano A., Del Bufalo, E.Burgio A. 2008. [Socioeconomic status and risk of congenital malformations]. *Epidemiol Prev*, 32 (1); 21-6.
33. Saner G., 2001. Mikroelementler . Neyzi O, Ertuğrul T, *Pediatrici 1. Cilt*, 3. Baskı, İstanbul, 174
34. Sanger F. 2004. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci Rep*, 24 (4-5); 237 53.
35. Selcuki M, 2007. Spinal Disrafizm .*Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 3(1):67-73.
36. Taylor K. M., Morgan, H. E., Johnson, A.Nicholson, R. I. 2005. Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett*, 579 (2); 427-32.
37. Tinkle MB, Sterling BS (1997) Neural tube defects: a primary prevention role for nurses, *JOGNN*, 26(5):503-523.
38. Tuncbilek E., Boduroglu K., Alikasifoglu M. 1999. Neural tube defects in Turkey: prevalence, distribution and risk factors. *Turk J Pediatr*, 41 (3); 299-305.
39. <http://www.chg.duke.edu/diseases/ntd.html>
40. <http://www.oxfordhairfoundation.org/news/columnstory/17.htm>
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
42. <http://www.ensembl.org/index.html>

ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler;

Adı Soyadı : Didem TORUN

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 23 /07 /1983

Yabancı Dili : İngilizce

2.Eğitim Bilgileri;

Lise : Çankaya Kılıçarslan Lisesi (1997-2001)

Üniversite : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002-2006)

Staj : A.Ü.T.F. Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik (2005)