

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA

PROJE KESİN RAPORU

EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC

RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO: 2014-TIP-080

CNTNAP2 rs2107856 polimorfizminin

Psödoeksfoliatif sendrom'a yatkınlıktaki rolünün

belirlenmesi

PROJE YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Melis PALAMAR ONAY

ARAŞTIRMACILAR

Dr. Irmak KARACA

Uzm. Dr. Suzan GÜVEN YILMAZ

Doç. Dr. Ayça AYKUT

Doç. Dr. Hüseyin ONAY

Prof. Dr. Feriştah Ferda ÖZKINAY

Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Faculty of Medicine

Department of Ophthalmology

Bornova-İZMİR

2016

ÖNSÖZ

“CNTNAP2 rs2107856 polimorfizminin Psödoeksfoliatif sendrom’a yatkınlıktaki rolünün belirlenmesi” başlıklı projede Psödoeksfoliatif Sendrom (PXS) ve/veya Psödoeksfoliasyon Glokomu (PXG) tanısı almış olgularda CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi sıklığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları polikliniğine başvuran PXS tanısı almış 43 olgu, PXG tanısı almış 46 olgu ve sağlıklı 99 olgunun genetik analizleri incelemeye alınmıştır. Hastalarda tam oftalmolojik muayene, santral kornea kalınlığı, Optik Koherens Tomografi (OKT) ile belirlenen peripapiller retina sinir lifi tabakası (RSLT) kalınlık ölçümünü takiben EDTA’lı tüpe genetik analiz amacıyla 2 mL kan alınmıştır.

Yapılan araştırma sonucunda bu çalışmadaki Türkiye popülasyonunda CNTNAP2 genine ait rs2107856 tek nükleotid polimorfizminin PXS ve PXG durumlarına yatkınlıkta rol oynamadığı saptanmıştır.

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle teşekkür ederiz.

YAYINLAR

Proje ile ilgili yayınımız yoktur.

DEMİRBAŞ

Proje için alınmış demirbaş yoktur.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	7
SUMMARY	9
1. GİRİŞ	11
2. LİTERATÜR ÖZETİ	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	21
6. KAYNAKLAR	24

KISALTMALAR

CNTNAP2: Kontaktin assosiye protein-benzeri 2

DNA: deoksiribonükleik asit

dNTP: deoksinükleotid trifosfat

GİB: Göziçi basıncı

GST: Glutasyon transferaz

LOXL-1: Lizil oksidaz benzeri protein-1

MgCl: Magnezyum klorür

NO: Nitrik oksit

PCR: Polymerase chain reaction

PXG: Psödoeksfolyatif glokom

PXM: Psödoeksfolyatif materyal

PXS: Psödoeksfolyasyon sendromu

RNFL: Retina sinir lifi tabakası

Taq polimeraz: Thermus aquaticus polimeraz

TNF alfa: Tümör nekrozis faktör alfa

ÖZET:

AMAÇ: LOXL1 geni pek çok popülasyonda PXS ve PXG ile en çok ilişkili gen olarak bulunmakla birlikte CNTNAP2 ve GST (Glutasyon transferaz) genlerinin de bu durumlarla yüksek ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, Türkiye popülasyonunda PXS ve/veya PXG tanısı alan ve yaş - cinsiyet açısından benzer sağlıklı kontrol olgularında CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM: Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine Aralık 2014 ile Mayıs 2016 tarihleri arasında başvuran 43 PXS, 46 PXG tanısı almış toplam 89 olgu ve yaş - cinsiyet açısından benzer 99 kontrol olgusu dahil edildi. Tüm hastaların kliniğimizde tam oftalmolojik muayene, santral kornea kalınlığı, Optik Koherens Tomografi (OKT) ile belirlenen peripapiller retina sinir lifi tabakası (RSLT) kalınlık ölçümlerini takiben EDTA'lı tüpe 2 mL kanları alınarak CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmini incelemek üzere Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı'na gönderildi. Saptanan polimorfizmin hastalığa yatkınlıkta etkisi olup olmadığı sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Çalışmaya dahil edilen 188 (81 kadın, 107 erkek) hastanın ortalama yaşı normal olgularda 64.6 ± 8.3 (51-91) yıl, PXS'lilerde 70.0 ± 8.0 (51-86) yıl, PXG'lilerde 71.2 ± 8.8 (51-93) yıl idi. Homozigot birey oranı normal, PXS'li ve PXG'li olgularda sırasıyla %21.2, %11.6, %10.9 saptanırken heterozigot birey oranı sırasıyla %42.4, %41.9, %45.7 olarak hesaplandı. Gruplar arasında CNTNAP2 rs2107856 tek nükleotid polimorfizm genotipi ve allel sıklığı açısından anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0.429$, $p=0.178$; Ki-kare testi). PXG'lilerde polimorfizm, pozitif olgularda negatif olgularla karşılaştırıldığında RSLT daha kalın izlenmesine

rağmen (66.9 ± 16.9 mikron ve 61.9 ± 20.3 mikron; $p=0.503$, Kruskal Wallis testi), genotip ile yaş, cinsiyet, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği, RSLT, SKK, cup/disk oranı, göz içi basıncı, kullanılan ilaç sayısı, geçirilen operasyon sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

SONUÇ: Bu çalışmadaki Türkiye populasyonunda CNTNAP2 genine ait rs2107856 tek nükleotid polimorfizminin PXS ve PXG yatkınlıkta rol oynamadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: psödoeksfolyasyon, glokom, CNTNAP2, gen, polimorfizm

SUMMARY

PURPOSE: In addition to LOXL-1 gene, the most associated, CNTNAP2 and GST genes are also found to be related with PXS and PXG. In this study, our aim is to investigate the prevalence of CNTNAP2 related rs2107856 single nucleotide polymorphism in patients with PXS and/or PXG, also age-sex matched healthy controls in Turkish population.

MATERIALS&METHODS: Cases with the diagnosis of PXS (43) and/or PXG (46) and age-sex matched controls (99) admitted to EUTF Ophthalmology outpatient clinic between December 2014 and May 2016 were enrolled. Complete ophthalmological examination, measurement of central corneal thickness, peripapillary retinal nerve fiber layer thickness (RNFL) were completed. Blood samples of 2 mLs with EDTA were obtained and sent to Medical Genetics Department, Molecular Genetics Laboratory for CNTNAP2 related rs2107856 single nucleotide polymorphism (PCR and agarose gel imaging) analysis. The role of the detected polymorphism on disease tendency, comparing with age-sex matched healthy controls were evaluated.

RESULTS: The mean age of 188 patients (81 female, 107 male) was 64.6 ± 8.3 (range, 51-91) in healthy controls, 70.0 ± 8.0 (range, 51-86) in PXS group and 71.2 ± 8.8 (range, 51-93) in PXG group. The percentage of homozygote individuals is %21.2, %11.6, %10.9 and heterozygote individuals is %42.4, %41.9, %45.7 in healthy controls, PXS and PXG, respectively. There was no statistically significant difference between groups in regards to both genotypes and allelic frequencies of CNTNAP2 related rs2107856 single nucleotide polymorphism ($p=0.429$ and $p=0.178$, respectively; Chi-square test). Polymorphism positive individuals had thicker RNFL as compared to polymorphism negative individuals in PXG group; however, there was no statistically significant difference between genotype and age, sex, best corrected visual acuity,

RNFL, central corneal thickenss, cup/disc ratio, intraocular presssure, number of drugs used, and number of surgeries underwent ($p>0.05$).

CONCLUSION: In this Turkish population rs2107856 polymorphism in CNTNAP2 gene has been found to have no effect on disease tendency in PXS and PXG.

Key words: pseudoexfoliation, glaucoma, CNTNAP2, gene, polymorphism

1. GİRİŞ

PXS coğrafi açıdan dağılımı değişiklikler göstermekle birlikte, dünya üzerinde yaklaşık 60 milyon insanı etkileyen bir durumdur.[1] PXS özellikle göz ve viseral organları etkileyen ekstrasellüler matriksin kompleks sistemik bir hastalığı olarak bilinmektedir.[2] Prevalansı yaşla birlikte artış gösterir ve kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir.[3]

Son çalışmalar, eksfoliyatif değişikliklerin oksidatif stres ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Genellikle katarakt veya PXG klinik olarak aşikar hale gelene kadar tanınması çok güç olan bu durumda olgularda sık görülen lensteki nükleer değişikliklerin ön segmenti etkileyen oksidatif stresten kaynaklandığı düşünülmektedir. Tam anlamıyla açıklanamamış olmakla birlikte, PXS ile katarakt gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir. Normal popülasyona göre PXS olgularında katarakt insidansı daha yüksektir ve sıklıkla cerrahi gereksinimi doğmaktadır. Bu hastalarda katarakt cerrahisindeki komplikasyon oranları normal olgulara göre çok daha yüksektir. PXS'li olgularda yapılan çalışmalarda normal bireylere göre kornea endotel dansitesinin daha düşük, ön kamaranın daha dar, irisnin daha ince, zonüllerin ve pupilla dilatasyonunun zayıf, gözyaşı osmolaritesinin, aköz hümor ve serumda selenyum düzeyinin düşük olduğu ve kornea histerezisinin azaldığı görülmüştür.

Diğer taraftan eksfoliyasyonun sistemik bir sendrom olduğuna dair de bir çok kanıt bulunmaktadır.[2] Yapılan çalışmalarda PXS'li olgularda kardiyak volümün daha az olduğu, abdominal aort anevrizması, kardiyovasküler hastalık ve renal arter stenozu insidansının daha yüksek olduğu görülmüş olup bunun hastalığın morbiditesini arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca bu bireylerde kalbin pompa fonksiyonunun ve kapiller perfüzyonun azaldığını ve iskemik kalp hastalığı prevalansının arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Sistemik bir sendrom olduğunu gösteren diğer bulgular ise artmış sensorinöral işitme kaybı insidansı, plazma trombosit düzeyi, C-reaktif protein, tümör nekrozis faktör alfa (TNF alfa), antifosfolipid, VEGF, homosistein,

vitamin B6 ve NO (Nitrik oksit) düzeylerinin kontrollere göre daha fazla olması, venöz kan ve aköz humordeki eritropoetin düzeylerinin daha yüksek olması, plazmadaki eritropoetin, folik asit, D vitamini ve total antioksidan düzeyinin daha düşük olmasıdır.

PXS'li olguların yaklaşık %30'unda GİB yüksekliği görülmektedir ki bu oran normal popülasyonun yaklaşık 6-10 katıdır. Ayrıca %10'unda da PXG gelişmektedir.[4] PXG geliştikten sonra, GİB'in diüurnal ritmi bozulur. PXG olgularında prognoz açık açılı glokoma göre daha kötüdür. GİB'de gün içindeki karakteristikler değiştiğinden dolayı, bu hastalarda hedef GİB'e ulaşmak için agresif medikal tedaviye rağmen, hastaların çoğunda laser veya cerrahi tedaviye gereksinim duyulur. Ancak yapılan tüm tedavilere rağmen hastaların büyük bir kısmında geri dönüşsüz görme kaybı gelişmesi kaçınılmazdır.

Hastalığın moleküler temeline bakıldığında, eksfoliatif materyalin (PXM) elastin metabolizmasının yan ürünü olduğu düşünülmektedir. PXM, fibriler bir yapıdadır ve 8 – 10 nm çapındaki her bir mikrofibrilin lateral agregasyonu ile meydana gelmektedir.[2] PXM fibrilleri; elastin, tropoelastin, amiloid P, vitronektin (ekstraselüler matrikste bulunan glikoproteinlerden biri), fibronektin, heparan sülfat, proteoglikan, fibrillin-1, mikrofibril-assosiyasyon glikoprotein, emilin ve latent transforme büyüme faktörü β bağlayıcı proteinler gibi elastik fibril ve bazal membran bileşenlerini içermektedir.[5] PXM birikiminin aşırı senteze mi yoksa yetersiz yıkıma mı bağlı olduğu henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte [6-8], birikiminin her iki durumun birlikte bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

PXS bulunan bireylerde lizil oksidaz benzeri protein 1 (LOXL1) gen polimorfizminin 2007 yılında keşfedilmesiyle birlikte, sendromun genetik alt yapısı büyük oranda ortaya çıkarılmıştır.[9] LOXL1 genindeki spesifik mutasyonların PXS ve PXG gelişimi ile güçlü bir ilişkisi vardır.[10] LOXL1 geni disfonksiyonunun PXM'in progresif birikimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Güven Yılmaz ve arkadaşları [11] ise Türkiye popülasyonundan 50 PXG'lu hastanın genetik analizi sonucunda hiçbir olguda LOXL1 mutasyonu saptamamışlardır. Ayrıca

çalışmada bu hasta grubunda F184F polimorfizmi ilk defa tanımlanmış olup A320A, R141L ve F184F tek nükleotid polimorfizimleri ile hastalık şiddeti arasında ise ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle farklı popülasyonlarda hastalık temelinde rol oynayabilecek farklı gen ve polimorfizmlerin var olabileceği düşünülebilir. Ayrıca PXS'deki histolojik bulguların ve eksfoliyasyonla ilgili ilişkili komplikasyonların daha iyi anlaşılması açısından genetik temelin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca LOXL1 geni pek çok popülasyonda en çok ilişkili gen olarak bulunmakla birlikte CNTNAP2 (Kontaktin assosiyasyon protein benzeri 2) ve GST (Glutasyon transferaz) genlerinin de yüksek ilişkili olduğu saptanmıştır.[12,13] LOXL1 genine göre daha zayıf olmakla birlikte, CNTNAP2 proteininin oküler dokularda ve PXM oluşumu ile ilgili hücrelerin membranlarındaki lokalizasyonu hastalığın biyolojik temeli açısından aday bir gen olduğunu kanıtlar niteliktedir. Yine de hastalığın genetik temelini aydınlatılabilmesi için bu gen ve ilişkili polimorfizmler açısından popülasyon temelli çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma sayesinde de Türkiye popülasyonunda elde edilecek veriler ile dünya literatürüne katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, PXS ile ilişkili pek çok gen tespit edilmiştir. Bunlar içerisinde LOXL1 geni pek çok popülasyonda en çok ilişkili gen olarak düşünülmektedir.[9-11, 14-18] Bununla birlikte CNTNAP2 (Kontaktin assosiyasyon protein benzeri 2), clusterin ve GST (Glutasyon transferaz) gibi genlerin de ilişkili olduğu gösterilmiştir.[12, 13] CNTNAP2; voltaj bağımlı potasyum kanal A alt-ailesinin (Kv1.1) paketlenmesinde rol alan transmembran bir proteindir.[19] Nöron membranlarındaki potasyum kanallarının regülasyonunda, dolayısıyla membran stabilizasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir.[20] CNTNAP2 geni çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili olup, 7. kromozomda lokalizedir. Ayrıca CNTNAP2

proteininin oküler dokularda ve PXM oluşumu ile ilgili hücrelerin membranlarında da lokalize olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, CNTNAP2 geni de hastalığın biyolojik temeli açısından aday bir gen olarak görülmektedir.[12] Genom wide assosiasyon çalışmasında, CNTNAP2 gen varyantlarının PXS ile ilişkili olduğu görülmüştür. 610 PXS/PXG- 364 kontrol olgusundan oluşan Alman kohortunda ve 249 PXS/PXG- 190 kontrol olgusundan oluşan İtalyan kohortunda CNTNAP2 tek nükleotid polimorfizmleri çalışılmış olup, yalnızca Alman kohortunda rs2107856 ve rs 2141388 tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) PXS/PXG ile ilişkili olduğu görülmüştür.[21] Japon popülasyonunda ise CNTNAP2 geninde rs1404699 ve rs7803992 tek nükleotid polimorfizmleri PXS ile ilişkilendirilmiştir.[22]

Güven Yılmaz ve arkadaşları [11] Türkiye popülasyonundan 50 PXG'lu hastanın genetik analizi sonucunda hiçbir olguda LOXL1 mutasyonu saptamamışlardır. Ayrıca CNTNAP2 geni LOXL1 geninden sonra PXS ile ilişkilendirilen en önemli genlerden birisidir. Şimdiye kadar sadece Alman, İtalyan ve Japon popülasyonlarından CNTNAP2 geni ile ilişkili polimorfizmler incelenmiş olup, genin hastalıkla ilişkisinin aydınlatılması açısından popülasyon temelli çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır. Biz bu çalışma ile CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizminin Türkiye popülasyonunda ilk kez incelenmesini amaçlamaktayız.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Göz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine Aralık 2014 ile Mayıs 2016 tarihleri arasında başvuran 43 PXS, 46 PXG tanısı almış toplam 89 olgu ve yaş - cinsiyet açısından benzer 99 kontrol olgusu dahil edildi. Tüm hastaların kliniğimizde tam oftalmolojik muayene (otorefraktometri ile belirlenen refraksiyon kusurunun düzeltilmesi sonrası elde edilen en iyi görme keskinliği, biyomikroskopi ile ön segment ve 90 diyoptri mercek yardımıyla arka segment muayenesi, açığı muayenesi, GİB ölçümü), santral kornea kalınlığı, Optik Koherens Tomografi (OKT) ile belirlenen peripapiller

retina sinir lifi tabakası (RSLT) kalınlık ölçümleri yapıldı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden tüm olgulardan EDTA'lı tüpe 2 mL kan alınarak CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi değerlendirildi. Tüm hastalar klinik özelliklerine göre PXS bulunanlar Grup 1'e, PXG görülenler Grup 2'ye ve yaş - cinsiyet benzer kontrol olguları Grup 3'e dahil edildi. Polimorfizm sonuçları ve RSLT ölçümleri ile ilişkisi gruplar arasında karşılaştırıldı.

Moleküler Çalışmalar:

CNTNAP2 Primerlerin Sulandırılması:

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda ddH₂O eklenerek, 100 pikomol/mikrolitrelik stok çözeltiler hazırlandı.

PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pikomol/mikrolitrelik konsantrasyonlu 100 mikrolitrelik sulandırılmış primerler hazırlandı.

İşlem 5 basamaklıdır. Bu basamaklar;

1. DNA izolasyonu: Olgulardan EDTA'lı tüpe 2cc venöz kan örneği alındı. Kan lenfosit hücrelerinden protokole uygun olarak, MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Product No: 0300039900001; Roche, USA) kiti kullanılarak MagNa Pure Robotik DNA izolasyon cihazı ile DNA izolasyonu yapıldı.

2. PCR: Elde edilen DNA'lardan çalışılan gen bölgeleri PCR yöntemi ile uygun primerler kullanılarak çoğaltıldı. Kullanılacak primerler;

CNTNAP2 F 5' CTCCTATACCACGACCCCC 3' (ileri primer)

CNTNAP2 R 5' AAAAACGTTGGAGAGTGCTGA 3' (geri primer)

CNTNAP2 PCR Reaksiyon Karışımı:

Her bir örnek için hazırlanan total PCR reaksiyon karışımı 25 mikrolitre olarak ayarlandı. H₂O, 10X buffer, MgCl₂ (25 Mm), dNTP, primerler ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

PCR miks hazırlanışı:

H₂O: 12.5 mikrolitre
 10X buffer: 2.5 mikrolitre
 MgCl₂ (25 Mm): 2.5 mikrolitre
 dNTP (10 mM 1 mikrolitre
 primerler: F: 1 mikrolitre
 R: 1 mikrolitre
 Taq Polimeraz: 0.5 mikrolitre
 DNA: 100 nanogram
 Toplam 25 µl
 İzlenecek PCR Programı:
 Denatürasyon 94 °C 5 dakika
 Denatürasyon 94 °C 30 saniye
 Bağlanma 58 °C 30 saniye 35 döngü
 Uzama 72 °C 45 saniye
 Final Uzama 72°C 5 dakika
 Bekleme 4 °C
 Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4 0 C' de saklandı.

Agaroz jel elektroforezi

PCR ürününde amplifikasyon olup olmadığının kontrolü için, %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 ml'lik erlen içine, 2 gr agaroz ve 100 ml 0.5XTBE konulup mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Berrak görünüm sağlanınca, 16 mikrolitre etidyum bromür eklenip karıştırılıp hazırlanan tabağa döküldü. Jelin donması için beklendi. Jel donduktan sonra örnekler jele yüklenirken, bir parça parafilm üzerine 5 mikrolitre orange G ve 5 mikrolitre PCR ürünü karıştırılıp, jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elde edilen PCR ürünlerinin doğru amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için, her jele marker yüklendi. 120 volt akımda yürüdüktan sonra jel görüntüleme sistemi ile incelendi.

3.PCR Ürünlerinin 1. Saflaştırılma İşlemi

Bu işlem PCR sonrası ve PCR ürünün içerisindeki fazla PCR bileşenlerinden ayrılmasını sağlamak amacıyla yapıldı. Herhangi bir ticari purifikasyon kiti ile yapılabilmekle birlikte purifikasyon için FERMENTAS GENEJET PCR PURIFICATION KIT kullanıldı. Purifikasyon işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

4.Cycle sequencing: En çok kullanılan yöntem dideoksi metodudur. Buna zincir sonlandırma metodu da denir. PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünler birinci saflaştırma işlemi sonrasında aşağıdaki maddeler ile karıştırılarak cycle sequencing miksi hazırlandı.

1. Primer: DNA tek zincirine bağlanan kısa dizidir.
2. Normal (deoksi) nükleotidler: dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP
3. Dideoksi nükleotidler: ddNTP; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP
4. DNA Polimeraz (enzim)

DNA 4 deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) molekülünün birbirine bağlanmasıyla oluşan dev bir polimerdir. Her yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3' OH ucuna eklenir. Dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) ise 3' OH ucu içermez. Dolayısıyla böyle bir molekül zincir uzamasını durdurur ve zincirin son nükleotidini oluşturur. Dizisi saptanacak DNA tek dizi halinde hazırlandı. Bu kalıp DNA yanına 4 deoksiribonükleotidden de (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bol miktarda içeren bir karışım; her biri ayrı floresan molekülle işaretlenmiş ve dolayısıyla ayrı renkler veren 4 dideoksiribonükleotid trifosfat (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) içeren bir karışım ve DNA Polimeraz eklendi. İşlem süresince deoksiribonükleotidler bağlandıkça zincir uzamaya devam eder ve rastlantısal olarak dideoksiribonükleotid bağlandığında zincir uzaması durur. Bu yolla farklı boyutlarda birçok DNA parçası elde edilir. Sonraki aşamada karışım, molekülleri boylarına göre ayıran jel elektroforezi ile birbirlerinden ayrıldı. Jel üzerindeki değişik floresan renkler veren bantlar izlenerek dizi analizi gerçekleştirildi. Daha sonraki aşamada ise analiz edilen dizilerin okunması yer aldı.

Uzun dizi bilgisi elde edebilmek için, kısa okumaların birbiriyle birleştirilmelerinde bilgisayara gereksinim duyuldu.

Bu işlem bir kit yardımı ile yapıldı ve bu kit içerisinde sonlandırıcı nükleotitler içermektedir. Ör;

ABI Prism V1.1 BIG-DYE TERMINATÖR KİT

Bu aşamada;

- 8 µl Big Dye PCR tüplerine dağıtıldı
- Her tüp için 7,5 µl ultra saf su
- 0.5 µl Forward veya Reverse primer kullanıldı (Dizide taranacak bölgeye uygun olarak tasarlanabilir)
- 4 µl purifiye PCR ürünü kullanıldı
- Total volume 20 µl idi.
- Bu PCR miksi ABI PRİSM 9700 PCR cihazının perkin elmer (<pe>) Big Dye Terminator programı ile başlatıldı.

İzlenen PCR programı

Denatürasyon 96 °C 10 saniye
 Bağlanma 50 °C 5 saniye 25 döngü
 Uzama 60 °C 4 dakika
 Bekleme 4 °C

5. İkinci Saflaştırma İşlemi (Zymo DNA Sequencing Clean-Up Kit): Bu işlem cycle sequencing aşamasından sonra yapıldı. Ortaya çıkan PCR ürününün içerisindeki florasan işaretli ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla yapıldı. Herhangi bir ticari purifikasyon kiti kullanılabilmeyle birlikte bu işlem için Zymo Research DNA Sequencing Clean Up Kit kullanıldı. Purifikasyon işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Örneklerin Cihaza Yükleme Aşaması

Dizi analizi örneklerinin yürütülmesi için ABI 310 cihazı kullanılacaktır. 10 mikrolitre purifiye olmuş ürün kullanıldı. Alete yüklemeden önce 5 dakika denaturasyon yapıldı ve 2 dakika buzda bekletilen örnekler alete yüklendi.

CLC Bio programı kullanılarak sonuçlar analiz edildi. Bulunan mutasyonlar ve polimorfizmler ENSEMBL ve HGMD veritabanlarındaki verilerle bakarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 188 (81 kadın, 107 erkek) hastanın ortalama yaşı normal olgularda 64.6 ± 8.3 (51-91) yıl, PXS'lilerde 70.0 ± 8.0 (51-86) yıl, PXG'lilerde 71.2 ± 8.8 (51-93) yıl idi. Homozigot birey oranı normal, PXS'li ve PXG'li olgularda sırasıyla %21.2, %11.6, %10.9 saptanırken heterozigot birey oranı sırasıyla %42.4, %41.9, %45.7 olarak hesaplandı. Gruplar arasında CNTNAP2 rs2107856 tek nükleotid polimorfizm (SNP) genotipi ve allel sıklığı açısından anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0.429$, $p=0.178$; Ki-kare testi). PXG'lilerde polimorfizm pozitif olgularda negatif olgulara kıyasla RSLT daha kalın izlenmesine rağmen (66.9 ± 16.9 mikron ve 61.9 ± 20.3 mikron; $p=0.503$, Kruskal Wallis testi), genotip ile yaş, cinsiyet, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği, RSLT, SKK, cup/disk oranı, göz içi basıncı, kullanılan ilaç sayısı, geçirilen operasyon sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo-1'de olguların demografik, klinik özellikleri, Tablo-2'de genetik özellikleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo-1. Olguların demografik ve klinik özellikleri

Özellikler	Grup 1 - PXS (n=43)	Grup - PXG (n=46)	Grup 3 - Kontrol (n=99)	
Yaş (yıl)	70.0 ± 8.0 (51-86)	71.2 ± 8.8 (51-93)	64.6 ± 8.3 (51-91)	$p=0.000$
Cinsiyet (K/E)	16/27	13/33	52/47	$p=0.016$
EİDGK (logMAR)	0.15 ± 0.08 (0.04-0.30)	0.57 ± 0.81 (0-3)	0.17 ± 0.08 (0.04-0.30)	$p=0.026$
GİB (mmHg)	14.12 ± 1.49 (12-17)	14.78 ± 2.97 (8-23)	14.36 ± 1.36 (12-16)	$p=0.310$
SKK (μm)	555.05 ± 22.00 (512-582)	554.87 ± 31.02 (503-640)	548.38 ± 19.43 (509-582)	$p=0.197$
C/D	0.23 ± 0.08 (0.1-0.3)	0.74 ± 0.28 (0.1-1.0)	0.24 ± 0.06 (0.1-0.3)	$p=0.000$
RSLT (μm)	97.72 ± 8.81 (86-120)	64.72 ± 18.39 (25-101)	101.10 ± 9.91 (88-127)	$p=0.000$

Tablo-2. Olguların CNTNAP2 rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) açısından genetik özellikleri

CNTNAP2 rs2107856 polimorfizm	Grup 1 - PXS (n=43)	Grup - PXG (n=46)	Grup 3 - Kontrol (n=99)	
Homozigot (%)	11.6	10.9	21.2	<i>p=0.429</i>
Heterozigot (%)	41.9	45.7	42.4	<i>p=0.429</i>
G/T allel oranı	58/28	61/31	114/84	<i>p=0.178</i>

CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi saptanan olguların RSLT kalınlık ölçümleri her bir grup içerisinde karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte PXG'lilerde, polimorfizm pozitif olgularda negatif olgularla karşılaştırıldığında RSLT daha kalın olarak saptandı. Tablo-3'de ise PXS ve PXG'li olgularda CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 polimorfizmi görülme oranları ile RSLT kalınlık ölçümlerinin karşılaştırılması ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo-3. PXS ve PXG'li olgularda CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 polimorfizmi görülme oranları ile RSLT kalınlık ölçümlerinin karşılaştırılması

RSLT	CNTNAP2 rs2107856 polimorfizm - homozigot	CNTNAP2 rs2107856 polimorfizm - heterozigot	Polimorfizm negatif	
Grup 1 - PXS (n=43)	93.80±6.46 (89-105)	98.72±9.39 (86-120)	97.80±8.88 (86-116)	<i>p=0.443</i>
Grup 2- PXG (n=46)	76.40±25.81 (46-101)	64.62±13.98 (43-97)	61.90±20.23 (25-90)	<i>p=0.503</i>

5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

PXS özellikle göz ve viseral organları etkileyen ekstrasellüler matriksin kompleks sistemik bir hastalığıdır.[2] PXS prevalansı yaşla birlikte artış göstermekte; kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir.[3] Genellikle katarakt veya eksofoliyatif glokom klinik olarak aşikar hale gelene kadar hastalığın tanınması çok güçtür. Olguların yaklaşık %30'unda GİB yüksekliği görülürken %10'unda PXG gelişmektedir.[4]

PXS bulunan bireylerde lizil oksidaz benzeri protein 1 (LOXL1) gen polimorfizminin 2007 yılında keşfedilmesiyle birlikte, sendromun genetik alt yapısı büyük oranda ortaya çıkarılmıştır.[9, 23] LOXL1 genindeki spesifik mutasyonların PXS ve PXG gelişimi ile güçlü bir ilişkisi vardır. LOXL1 geni disfonksiyonunun PXM'in progresif birikimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. LOXL1 geni pek çok popülasyonda en çok ilişkili gen olarak bulunmakla birlikte CNTNAP2 (Kontaktin assosiyasyon protein benzeri 2), clusterin ve GST (Glutasyon transferaz) gibi genlerin de ilişkili olduğu gösterilmiştir.[12,13] Türkiye popülasyonunda ise Güven Yılmaz ve arkadaşları [11] 50 PXG'lu hastanın genetik analizi sonucunda hiçbir olguda

LOXL1 mutasyonu saptamamışlardır. Ayrıca farklı popülasyonlarda hastalık temelinde rol oynayabilecek farklı gen ve polimorfizmlerin var olabileceği düşünüldüğünde CNTNAP2 geni ve ilişkili polimorfizmlerin çalışılması gündeme gelmiştir.

CNTNAP2 geni çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili olup, 7. kromozomda lokalizedir. Ayrıca CNTNAP2 proteininin oküler dokularda ve PXM oluşumu ile ilgili hücrelerin membranlarında da lokalize olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, CNTNAP2 geni de hastalığın biyolojik temeli açısından aday bir gen olarak görülmektedir.[12] Genom wide assosiasyon çalışmasında, CNTNAP2 gen varyantlarının PXS ile ilişkili olduğu görülmüştür. 610 PXS/PXG ile 364 kontrol olgusundan oluşan Alman kohortunda ve 249 PXS/PXG ile 190 kontrol olgusundan oluşan İtalyan kohortunda CNTNAP2 tek nükleotid polimorfizmleri çalışılmış olup, yalnızca Alman kohortunda rs2107856 ve rs 2141388 tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) PXS/PXG ile ilişkili olduğu görülmüştür. İtalyan kohortunda rs2107856 tek nükleotid polimorfizminin hastalık ile ilişkisi saptanmamıştır.[21] Malukiewicz ve arkadaşlarının [24] Polonya popülasyonunda yaptıkları çalışmada da CNTNAP2 genine ait rs2107856 ve rs214138 tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmış ancak iki polimorfizmin de PXS ile ilişkisi saptanmamıştır. Japon popülasyonunda ise CNTNAP2 geninde rs1404699 ve rs7803992 tek nükleotid polimorfizmleri PXS ile ilişkilendirilmiştir. [22]

Bu çalışma ise Türkiye popülasyonunda CNTNAP2 genini ve ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmini araştıran ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Türkiye popülasyonunun çoğunluğunu beyaz ırka ait bireyler oluşturması ve Avrupa popülasyonu ile benzerlik gösterdiği varsayılarak çalışmada CNTNAP2 geni ile ilişkili rs2107856 tek nükleotid polimorfizmi araştırılmıştır. Ancak çalışma popülasyonunda bu polimorfizmin PXS ve PXG'e yatkınlık oluşturmadığı gözlenmiştir. Allel sıklıklarına bakıldığında ise özellikle PXS grubundaki Krumbiegel ve ark. ın inceledikleri Alman kohortu ve Malukiewicz ve arkadaşlarının çalışmasındaki PXS grubunun allel sıklıklarıyla benzerlik göstermektedir. Bu benzer oranlara

rağmen istatistiksel anlamlılık açısından görülen bu farklılık çalışmamız ve Malukiewicz ve ark. nin çalışmasındaki örneklem sayısının az olmasına bağlı olabileceği gibi, Avrupa popülasyonundaki genetik heterojeniteyle ilişkili olarak da yorumlanabilir.

RSLT kalınlık ölçümü glokomatöz defektin önemli bir göstergesi olup klinik bulgularla birlikte glokom tanısının konmasında ve yönetiminde özellikle erken evrede büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda, PXG'lilerde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte RSLT'nin polimorfizmin görülmediği bireylerde daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu da CNTNAP2 rs2107856 polimorfizminin hastalık açısından koruyucu olabileceğini akla getirebilir. Bu da yine ancak örneklem sayısının daha fazla olduğu çalışmalarla ortaya konabilecektir.

Çalışmamız Türkiye popülasyonunda CNTNAP2 genini ve ilişkili rs2107856 polimorfizmini araştıran ilk çalışma olması yanısıra, bu bireylerde polimorfizm durumunun hastalığa ait klinik özellikler ile ilişkisini de araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir. Bu nedenle literatüre önemli katkı sağlamaktadır. Yine de, hastalığın genetik temelini aydınlatılabilmesi için bu gen ve ilişkili polimorfizmler açısından popülasyon temelli çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.[25] Ayrıca klinik özelliklerle birlikte ilişkilendirilen çalışmalarla desteklendiğinde, riskli bireylerin göziçi basıncından bağımsız bir şekilde belirlenmesi ve daha erken müdahale edilmesiyle hastalığın progresyonu yavaşlatılabilecektir.

Sonuç olarak; bu çalışmadaki Türkiye popülasyonunda CNTNAP2 genine ait rs2107856 tek nükleotid (SNP) polimorfizminin PXS ve PXG yatkınlıkta rol oynamadığı saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Young AL, Tang WW, Lam LS. The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Chinese people. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(2):193-5.
2. Schlotzer-Schrehardt U, Naumann GO. Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2006;141(5):921-937.
3. Kang JH, Loomis S, Wiggs JL, Stein JD, Pasquale LR. Demographic and geographic features of exfoliation glaucoma in 2 United States-based prospective cohorts. *Ophthalmology*. 2012;119(1):27-35.
4. Sowka J. Pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma. *Optometry*. 2004;75(4):245-50.
5. Ritch R, Schlotzer-Schrehardt U. Exfoliation (pseudoexfoliation) syndrome: toward a new understanding. *Proceedings of the First International Think Tank. Acta Ophthalmol Scand*. 2001;79(2):213-7.
6. Ho SL, Dogar GF, Wang J, Crean J, Wu QD, Oliver N, Weitz S, Murray A, Cleary PE, O'Brien C. Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(2):169-73.
7. Zenkel M, Kruse FE, Jünemann AG, Naumann GO, Schlötzer-Schrehardt U. Clusterin deficiency in eyes with pseudoexfoliation syndrome may be implicated in the aggregation and deposition of pseudoexfoliative material. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1982-90.
8. Rönkkö S, Rekonen P, Kaarniranta K, Puustjärvi T, Teräsvirta M, Uusitalo H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the chamber angle of normal eyes and patients with primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(5):697-704.
9. Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, Walters GB, Gudbjartsson DF, Stefansson H, Jonsson T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Stefansdottir G, Masson G, Hardarson GA, Petursson H, Arnarsson A, Motallebipour M, Wallerman O, Wadelius C, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Jonasson F, Stefansson K. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science*. 2007;317(5843):1397-400.
10. Kasım B, İrkeç M, Alikışıfoğlu M, Orhan M, Mocan MC, Aktaş D. Association of LOXL1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population. *Mol Vis*. 2013;19:114-20.
11. Yılmaz SG, Palamar M, Onay H, İlim O, Aykut A, Ozkinay FF, Yagci A. LOXL1 gene analysis in Turkish patients with exfoliation glaucoma. *Int Ophthalmol*, 2016 Jan 13. [Epub ahead of print]

12. Schlotzer-Schrehardt U. Genetics and genomics of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011;18(1): 30-6.
13. Elhaway E, Kamthan G, Dong CQ, Danias J. Pseudoexfoliation syndrome, a systemic disorder with ocular manifestations. *Hum Genomics*. 2012;6:22.
14. Ozaki M, Lee KY, Vithana EN, Yong VH, Thalamuthu A, Mizoguchi T, Venkatraman A, Aung T. Association of LOXL1 gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3976-80.
15. Jonasson F. From epidemiology to lysyl oxidase like one (LOXL1) polymorphisms discovery: phenotyping and genotyping exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma in Iceland. *Acta Ophthalmol*. 2009;87(5):478-87.
16. Sagong M, Gu BY, Cha SC. Association of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome in Koreans. *Mol Vis*. 2011;17:2808-17.
17. Jaimes M, Rivera-Parra D, Miranda-Duarte A, Valdés G, Zenteno JC. Prevalence of high-risk alleles in the LOXL1 gene and its association with pseudoexfoliation syndrome and exfoliation glaucoma in a Latin American population. *Ophthalmic Genet*. 2012;33(1):12-7.
18. Metaxaki I, Constantoulakis P, Papadimitropoulos M, Filiou E, Georgopoulos G, Chamchougia A, Papakonstantinou D, Markomichelakis N, Koutsandrea C, Halkiadakis I. Association of lysyl oxidase-like 1 gene common sequence variants in Greek patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis*. 2013;19:1446-52.
19. Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(12):968-80.
20. Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL. The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol*. 1997;139(6):1495-506.
21. Krumbiegel M, Pasutto F, Schlötzer-Schrehardt U, Uebe S, Zenkel M, Mardin CY, Weisschuh N, Paoli D, Gramer E, Becker C, Ekici AB, Weber BH, Nürnberg P, Kruse FE, Reis A. Genome-wide association study with DNA pooling identifies variants at CNTNAP2 associated with pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(2):186-93.
22. Shimizu A, Takano Y, Shi D, Yokokura S, Yokoyama Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T, Fuse N. Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. *Mol Vis*. 2012;18:1395-401.
23. Fingert JH, Alward WL, Kwon YH, Wang K, Streb LM, Sheffield VC, Stone EM. LOXL1 mutations are associated with exfoliation syndrome in patients from the midwestern United States. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(6):974-975.

24. Malukiewicz G, Lesiewska-Junk H, Linkowska K, Grzybowski T, Kaźmierczak K. Analysis of CNTNAP2 polymorphisms in Polish population with pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(8):660-1.
25. Sein J, Galor A, Sheth A, Kruh J, Pasquale LR, Karp CL. Exfoliation syndrome: new genetic and pathophysiologic insights. *Curr Opin Ophthalmol.* 2013;24(2):167-74.