

Fenilketonüri Hastalığında Prenatal-Postnatal Tanıda VNTR Bağlantısı ve Direkt Mutasyon Analizleri Birlikteliğinin Avantajları

Advantages of The Combination of VNTR Linkage and Direct Mutation Analysis in Prenatal and Postnatal Diagnosis of Phenylketonuria

M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU¹, Naci ÇİNE², Muhsin ÖZDEMİR¹, Oğuz ÇİLİNGİR¹, Nurettin BAŞARAN³, Beyhan DURAK¹, Mustafa SOLAK⁴, Sevilhan ARTAN¹

¹ Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı, ESKİŞEHİR

² İ. Ü. DATAE Moleküler Genetik AD, İSTANBUL ³ Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR ⁴ Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik AD., AFYON

ÖZET: Bu çalışmada, Fenilketonüri tanısı konulmuş hasta bir çocuğa sahip 20 ailede, hasta çocuğun kardeşlerinin taşıyıcı olup olmadıklarını saptamak için PAH geni dışındaki VNTR polimorfizimlerinden faydalanarak alel segregasyonu yapılmıştır. Hastalarda IVS10nt546 mutasyonun varlığını araştırmak için DdeI restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi yöntemi uygulanmıştır. DNA venöz kandan ekstrakte edilmiştir. Ekstragenik VNTR dizileri PCR kullanılarak amplifiye edilmiş ve alel segregasyonu yapmak için de PCR ürünü jelde yürütülmüştür. İnformatif ailelerde hasta çocuğun kardeşlerinin taşıyıcılığı tesbit edilmiştir. Yirmi aileden 18 tanesi informatif, 9 çocuk taşıyıcı ve 6 çocuk sağlam bulunmuştur. İnformatif ailelere prenatal tanı yapılabileceği bildirilmiştir.

Aynı hasta çocuklarda IVS10nt546 mutasyonuna yönelik olarak amplifiye edilen PAH geni PCR ürünü DdeI restriksiyon enzimi ile direkt mutasyon analizine tabi tutulmuştur. Toplam 40 aileden 12 sinde (%30) IVS10nt546 mutasyonu bulunmuştur. PAH-VNTR polimorfizimleri ile alel segregasyonu yapılamayan bir ailede hasta çocuğun IVS10nt546 mutasyonunu homozigot olarak taşıması, kardeşinin PKU taşıyıcısı olduğunu ortaya koymamızı sağlamıştır. Yalnız başına PAH-VNTR polimorfizimleri ile taşıyıcı tespiti başarısı %90 iken, DdeI restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi yöntemiyle birlikte kullanıldığında başarı oranı %95 e çıkmıştır.

[Anahtar Kelimeler: Fenilketonüri, PAH geni, PCR, VNTR, DdeI enzimi]

ABSTRACT: In this dissertation, allele segregation was performed utilizing VNTR polymorphisms outside the PAH gene in order to determine whether the siblings of a child who has been diagnosed with PKU are carriers. Blood samples from 20 children who had PKU and their parents as well as their siblings were studied. DdeI restriction enzyme direct mutation analysis technique was applied to determine whether the IVS10nt546 mutation existed in patients. DNA was extracted from the venous blood sample. The extragenic VNTR sequences were amplified using PCR, and the PCR product was run on the gel for allele segregation. With this process, it was determined whether a sibling of a sick child is a carrier in "informative" families. With this method, 18 families out of 20 were found to be "informative"; 9 children, carriers; 6 children, normal. It was concluded that the prenatal diagnosis was applicable to those informative families.

In the samples from the PKU patients, the PAH gene which was amplified by PCR regionally including the IVS10nt546 mutation. IVS10nt546 mutation was found in 12 alleles out of 40 (30%) by digesting the PCR products with DdeI restriction enzyme. In a noninformative family, where the allele segregation with PAH-VNTR polymorphism failed, a sick child was found to carry IVS10nt546 mutation homozigote. This led to the conclusion that the sibling of the child was a PKU carrier. While the success rate in carrier determination was 90% with PAH-VNTR polymorphism alone, the rate increased to 95% when DdeI restriction enzyme direct mutation analysis was used additionally.

[Key words: Phenylketonuria (PKU), PAH gene, PCR, VNTR, DdeI restriction enzyme]

GİRİŞ

Kalıtsal metabolik hastalıkların en önemlilerinden biri fenilketonüri ("phenylketonuria", PKU) dir (1). PKU ile ilgili bilgilerimiz 1934 yılında, Asbjörn Fölling'in 10 ağır mental retardasyonlu ve postnatal

hiperfenilalaninemisi olan hastaya kendi isimlendirdiği "Imbecilites phenylpyruvica" tanısını koymasıyla başlamıştır (2). Daha sonra 1946'da Penrose ve Quastel hastalığa fenilketonüri ismini vermişlerdir (3). Otozomal ressesif kalıtılan bu hastalıkta, fenilalanini tirozine çeviren fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin eksik ya da hiç sentezlenmediği tesbit edilmiştir. Böylece PAH enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşmeyen fenilalanin aminoasidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenillaktik asit, fenilasetik asit) hastanın

kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır (1).

PKU'nin ülkemizdeki sıklığı konusundaki yayınlar arasında farklılıklar olmakla birlikte ortalama 1/4500 olduğu bildirilmiştir (4). Diğer yandan, Akkraba evliliklerinin % 21.21 gibi yüksek değerlerde olduğu ülkemizde fenilketonüri gibi dramatik sonuçlar doğuran, otozomal resesif kalıtım yoluyla kalıtılan hastalıkların önemli bir sorun teşkil ettiği aşikardır (5). PKU tanısı klasik tanı teknikleri ile ancak doğum sonrasında teşhis edilebilirken, başdöndürücü bir hızla gelişen moleküler tanı teknikleri ile bugün prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti yapılabilmektedir. PKU hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebileceğinden, tarama ve prenatal tanı teknikleri çok büyük önem arz etmektedir(2).

PKU'da prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti, PAH geni ekstragenik VNTR polimorfizmleri ile alel segregasyonu yapılarak gerçekleştirilebildiği gibi, mutasyonların PAH genindeki herhangi bir restriksiyon enzimi kesim bölgesini değiştirmesine bağlı olarak da yapılabilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda fenilketonüri tanısı konarak, kan fenilalanin düzeylerine bakılmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen 14 aile (54 kişi) ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tanısı konarak Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvarına taşıyıcı tesbiti için sevk edilen 6 aile (22 kişi) ile birlikte toplam 20 aile (76 kişi) den alınan venöz kandan elde edilen DNA larla gerçekleştirilmiştir.

DNA lar fenol/kloroform yöntemi ile elde edilmiştir. PCR amplifikasyonu için 50 µl'lik karışımlar hazırlanmıştır. PAH-VNTR polimorfizmi için Alexei A. Goltsov ve arkadaşlarının kullandığı 5'-GCT TGA AAC TTG AAA GTT GC-3' ve 5'- GGA AAC TTA AGA ATC CCA TC-3' primer çifti kullanılmıştır. 94°C de 5 dakika, 94°C de 30 saniye, 55°C de 1 dakika, 72°C de 1 dakika, şeklinde 35 döngü, sonunda ise 72°C de 10 dakika tutularak ürün artırılması sağlanmıştır.

PAH-IVS10nt546 mutasyonu için kullanılan primer dizileri Özgüç ve arkadaşlarının kullandığı 5'-TGC AGC AGG GAA TAC TGA TC-3' ve 5'-TAGACATTGGAGTCCACTCTC-3' oligonükleotidleri seçilmiştir. Amplifiye edilen DNA lar DdeI Restriksiyon Enzimi ile klasik kesim şartları uygulanarak kesilmiştir.

BULGULAR

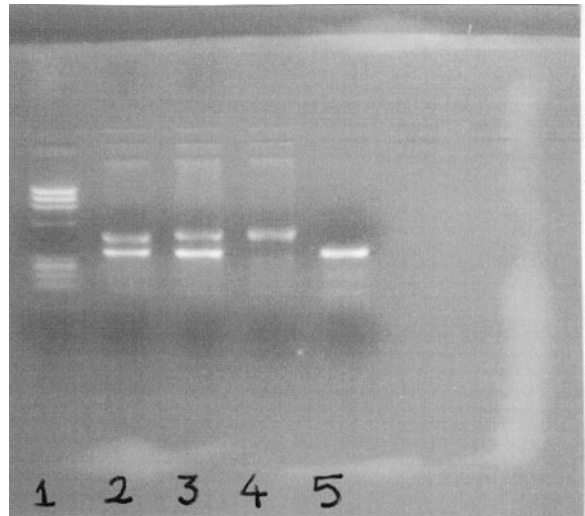
Anne, baba, hasta çocuk ve varsa kardeşlerden alınan kandan DNA lar elde edilmiştir. Bu DNA ların pürifiye olup olmadıklarını anlamak için spektrofotometrede 260nm/280nm oranlarına bakılmış ve oranın 1.8 civarında bulunması üzerine DNA ların temiz olduklarına karar verilmiştir.

Resim 1'de PAH-VNTR polimorfizm PCR uygulaması sonucunda elde edilen ürün %3'lük agaroz jelde yürütülmüş ve Resim 1'deki veriler elde edilmiştir. PAH-VNTR PCR ürünü, anne, baba ve çocuğa ait 13'üncü ekzon dışında bulunan VNTR tekrar sayılarının polimorfizm göstermesinden dolayı değişik bantlar vermiştir. Amniyosentezle elde edilen hücrelerden ekstrakte edilen fetüse ait DNA tamamen normal bulunmuştur.

PKU li hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak alel segregasyonu yapılmış ve taşıyıcı tesbiti gerçekleştirilmiştir. Yirmi aileden 18 i informatif aile olarak değerlendirilmiştir. İki aile ise noninformatif bulunmuştur. Toplam 16 kardeşten 9 tanesinin taşıyıcı, 6 tanesinin ise normal olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 1).

Yirmi hasta çocuğun toplam 40 mutant alelinden 12 tanesinin (%30) IVS10nt546 mutasyonunu taşıdığı tesbit edilmiştir (Resim 2). Bu çocuklardan 3 tanesi mutant alelleri homozigot olarak taşımakta olup, 6 tanesi ise IVS10nt546 mutasyonu yönünden heterozigottur (Tablo 2).

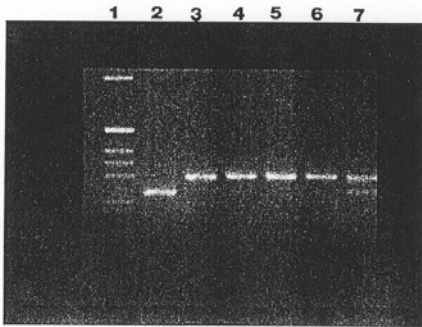
VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak alel segregasyonu yapılması sonucu taşıyıcı tesbiti yapılabilmek oranının %90 (20 aileden 18 tanesi informatif) olduğu, noninformatif ailelerden birinin hasta çocuğunun IVS10nt546 mutasyonunu homozigot taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu hasta çocuğun kardeşinde taşıyıcı olduğu bu yolla saptanmıştır.



Resim 1. 1: Marker, 2: Baba, 3: Anne, 4: Hasta Çocuk, 5: Fetüs

Tablo 1. Fenilketonüri hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizmi taşıyıcı tesbiti bulguları

Aile No	Baba	Anne	Hasta Çocuk	Kardeş		Aile (VNTR Polimorfizmine Göre)		TOPLAM
				Taşıyıcı	Sağlam	İnformatif	Noninformatif	
1	1	1	1	1	1	+		5
2	1	1	1	-	-	+		3
3	1	1	1	-	-	+		3
4	1	1	1	-	1	+		4
5	1	1	1	1	-	+		4
6	1	1	1	1	-	+		4
7	1	1	1	-	1	+		4
8	1	1	1	-	-			3
9		1	1	1	-	+		4
10	1	1	1	1	-	+		4
11	1	1	1	-	1	+		4
12	1	1	1	-	-	+		3
13	1	1	1	-	-	+		3
14	1	1	1	1	-	+		4
15	1	1	1	1	-	+		4
16	1	1	1	-	1	+		4
17	1	1	1	-	-			3
18	1	1	1	-	-	+		3
19	1	1	1	1	1	+		5
20	1	1	1	1	-	+		4
Toplam	20	20	20	9	6	18		75



Resim 2. Ddel ile kesim sonucu oluşan bantlar: 1: Maker, 2: IVS10nt546 homozigot, 3,4,5,6: IVS10nt546 mutasyonu olmayanlar, 7: heterozigot hasta

TARTIŞMA

Kalıtsal metabolik hastalıklar grubuna giren fenilketonüri, hepatik fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin eksikliğinden kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. Fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliği sonucunda tirozine dönüşmeyen fenilalanin amino asidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitleri (fenilpirüvik, fenil laktik asit, fenil asetik asit) hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikerek mental-motor geriliğe neden olmaktadır. PKU hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebilmektedir (1). Ülkemizde PKU insidansı 1/4500'dür. Moleküler genetikteki son gelişmeler sonucunda PKU bakımın-

dan riskli ailelerde doğum öncesi tanı verilmesi gündeme gelmiştir. Böylece fenilketonüri hastalığının tanısı çok erken dönemde konabilmekte ve hastalarda oluşabilecek hasar diyet tedavisiyle önlenebilmektedir (4).

Tablo 2. PKU'li çocuklarda Ddel enzimi ile kesilen aleller

Aile	PKU'li Çocuk Ddel Kesimi IVS10nt546 Mutasyonu		
	Alel	Alel	Toplam N=40 %
1	-	+	1
2	-	+	1
3	-	+	1
4			
5			
6			
7			
8	+	+	2
9			
10			
11			
12	+	+	2
13	+	+	2
14			
15			
16			
17			
18	-	+	1
19	-	+	1
20	-	+	1
Toplam	3	9	12 %30

PAH geninin klonlanması ile genin yapısı iyice anlaşılmış, genin içinde veya yakınında tanımlanan polimorfik bölge kesimleri ile birçok haplotipin meydana geldiği ortaya konmuştur. Bu polimorfizmlerin tespiti için Bg/II, PvuII, EcoRI, MspI, XmnI, HindIII, EcoRV ve SphI enzimleri kullanılmıştır. Birçok durumda, bu RFLP lerden sorumlu nükleotid substitüsyonlarının fenotipik bir etkisi bulunmamaktadır. Ama bazı hallerde polimorfik kesim bölgeleri genin kodlanan kısmında yer almaktadır. Bu bölgelerdeki mutasyonlar sabit veya polimorfik fragmanların uzunluklarını değiştirmektedir. Bu polimorfik bölgelerin fiziksel harita uzunlukları ve standardize bağlantı disekilibryumları arasındaki kaba ilişki insan PAH geninde rekombinasyon için herhangi bir hot-spot tanımlanmamıştır. PAH geni üzerindeki mutasyonlar ile bu RFLP ler arasında sıkı bağlantı vardır. Bu nedenle PKU alellerinde RFLP ler normal veya mutan kromozomların geçişlerinin takibinde, doğum öncesi tanı ve taşıyıcı tanısında kullanılabilirler. Birçok farklı popülasyonda normal veya mutant kromozomlar üzerinde bu polimorfizmlerin frekansları tespit edilmiştir. Genel Avrupa popülasyonunda, tüm PKU alellerinin %86'sının bir veya daha fazla bölge açısından heterozigot olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık doğulular içinde bu frekanslar %32 olarak bildirilmiştir. Dolayısıyla RFLP ler Asya popülasyonlarında taşıyıcı tanısı ve prenatal tanı için daha az yararlıdır (2,6,7,8,9,10,11,12,13,14).

Kalıtılmal hastalıkların tanı ve taşıyıcı tespiti için kullanılan en etkin yöntemlerden biri de hastalığa neden olan mutasyonun direkt tespitine dayalı tanı yöntemidir. Eğer ailede hastalığa neden olan mutasyonu biliniyorsa hastalığın tanısı bu tip durumlarda oldukça kolay ve %100'lük bir kesinlikle yapılabilmektedir. Hastalığa neden olan nokta mutasyonu bir restriksiyon enziminin kesim bölgesini değiştiriyorsa, bu durumda enzim kesim bölgesini içeren gen bölgesi PCR ile çoğaltılarak uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek elektroforez işlemi sonunda jelde incelenmektedir. Oysa, PAH enzimi yetersizliği gösteren hastalarda geniş bir klinik fenotip spektrumu olduğunu Servier ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları Mendeliyen hiperfenilalaninemi adlı makalede ortaya koymuşlardır. Bu fenotipik varyasyon altta yatan moleküler düzeydeki heterojeniteyi ve dolayısıyla PAH mutant alellerinin çeşitliliğini göstermekte olduğunu ise Guldeberg ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları DDGE ile fenilketonüri mutasyonlarının tespiti ile ilgili makalede bildirmişlerdir. Danimarkalılar'da (Charhaborby ve arkadaşları 1987), Almanlar'da (Riess ve arkadaşları 1988; Lichter-Konecki ve arkadaşları 1988; Aulehla-Scholz ve arkadaşları 1988; Herrman ve arkadaşları 1986), Fransızlar'da (Rey ve arkadaşları 1988); Stuhmann ve arkadaşları 1989) belirli haplotiplerle, fenilalanin hidroksilaz enziminin

değişik derecelerde eksikliği arasında ilginç ve bilgi verici bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Özgüç ve arkadaşları, Türkiye'de 44 fenilketonüri hastada çeşitli mutasyonları taramışlardır. Bu hastaların alellerinin %32'sinde IVS10nt546 mutasyonu bulmuşlar ve 11 hastada da haplotip 6 ile bu mutasyonların bağlantılı olduğunu ortaya koymuşlardır. Dworniczak ve arkadaşları; 1991'de, Dasovich ve arkadaşları; 1991'de, Kolaydjieva ve arkadaşları; 1991'de, Eisensmith ve arkadaşları; 1992'de, haplotip 6 kromozomları ile IVS10nt546 mutasyonu arasında özellikle Güney Avrupa popülasyonlarında güçlü bir assosiyasyon bulunduğunu yayınlamışlardır. Ddel restriksiyon enzimi ile yapmış olduğumuz mutasyon analizlerinde 40 mutant alelin 12 sinin kesilmesi sonucu, alel frekansının %30 olduğu, dolayısıyla yukarıda adı geçen araştırmacıların çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmüştür (15).

Spesifik PAH mutasyonları ile RFLP haplotipleri arasında birçok popülasyonda kuvvetli assosiyasyonlar olmakla beraber hem mutant haplotiplerin dağılımı hem de mutasyon/haplotip assosiyasyonları değişik etnik gruplarda farklı bulunmaktadır. Şimdiye kadar gözlenen en kuvvetli assosiyasyon sırasıyla haplotip 2, 3 ve 6 ile R408W, IVS12nt1, ve IVS10nt546 arasında olmuştur. Dilella ve arkadaşlarının 1986 da mutant haplotip 3 ile IVS12nt1 mutasyonu arasındaki assosiyasyon Danimarka popülasyonu için kesin olup, mutasyon sadece bu haplotipte bulunmuştur ve mutant haplotip sadece bu mutasyonu taşımaktadır. Fakat Türkiye'de ve birçok Avrupa popülasyonunda böyle bir bağlantı henüz tanımlanamamıştır.

Alexei Goltsov ve arkadaşları, 1992 yılında PAH genindeki mutasyonlarla VNTR lar arasında da bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Haplotip çalışmaları sırasında Hind/III restriksiyon enziminin meydana getirdiği 4.0 kb, 4.4 kb ve 4.2 kb lık fragmentleri içerisinde belli sayılarda VNTR lar bulunduğunu gözlemişlerdir. 4.0 kb lık fragment içerisinde 30 baz çiftlik tekrardan 3 adet, 4.4 kb lık fragment içerisinde ise 12 adet tekrar dizisi bulunmaktadır. 4.2 kb lık fragment içerisinde ise bu tekrar dizisinden 6, 7, 8 ve 9 adet gibi değişik sayıda olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değişken sayıda tandem tekrarların her biriyle mutasyonlar arasında bir bağlantı olduğunun keşfi, RFLP ile mutasyonlar arasındaki ilişkinin tanı ve taşıyıcı tespitinde bilgi verici olmasından daha detaylı ve daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır(16). Bu nedenle biz de taşıyıcı tespitine yönelik 20 PKU ailesinde VNTR lardan yararlanmayı tercih ettik. VNTR polimorfizmlerinden faydalanarak alel segregasyonu analizleri sonucunda 18 ailenin taşıyıcı tespitini gerçekleştirebilmemiz, VNTR larla çalışılmasının %90 gibi bir sonuç verme yüzdesine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Yaptığımız çalışmada, IVS10nt546 mutasyonunun tespit edilmesine yönelik olarak, 20 hastanın DNA ları amplifiye edildikten sonra DdeI restriksiyon enzimi ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. 40 mutant alelden 12 tanesi (%30) kesilmiştir. VNTR polimorfizimlerinden yararlanılarak yapılan alel segregasyonu ile informatif olmayan 2 aileden birinin hasta çocuğunun iki mutant aleli de kesime uğramış ve bu hastanın IVS10nt546 mutasyonunu homozigot olarak taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu ailede prenatal tanı ve taşıyıcı tesbitinin mümkün olduğu görülmüştür. Bundan dolayı VNTR polimorfizimleri ile taşıyıcı tesbitinin yapılması yüzdesi çok yüksekse de DdeI ile direkt mutasyon analizinin de yapılmasının taşıyıcı tesbit yüzdesini artıracağı kanaatine varılmıştır.

SONUÇ

1. PKU li hasta bir çocuğa sahip ailelerde VNTR polimorfizimlerinden faydalanarak alel segregasyonu ile taşıyıcı tespiti gerçekleştirilmiştir. Yirmi aileden 18 i informatif aile olarak değerlendirilmiştir. İki aile ise noninformatif bulunmuştur. Toplam 16 kardeşten 9 tanesinin taşıyıcı, 6 tanesinin ise normal olduğu tespit edilmiştir.

2. Yirmi hasta çocuğun toplam 40 mutant alelinden 12 tanesinin IVS10nt546 mutasyonunu taşıdığı (%30) DdeI restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi ile tespit edilmiştir. Bu çocuklardan 3 tanesi mutant alelleri homozigot olarak taşımakta olup, 6 tanesi ise IVS10nt546 mutasyonu yönünden heterozigottur.

3. VNTR polimorfizimlerinden faydalanıp alel segregasyonu ile taşıyıcı tespiti yapılabilme imkanının %90 (20 aileden 18 tanesi informatif) olduğu, noninformatif ailelerden birinin hasta çocuğunun IVS10nt546 mutasyonunun homozigot taşıdığı DdeI restriksiyon enzimi direkt mutasyon analizi ile tespit edilmiştir. Bu hasta çocuğun kardeşinin de taşıyıcı olduğu aynı yöntemle saptanmıştır.

Dolayısıyla PKU li ailelerde her iki yöntem birlikte uygulandığında 20 aileden 19 unda taşıyıcı tespiti yapılabildiği görülmüştür. Tek başına VNTR uygulaması taşıyıcıların tesbitinde %90 sonuç verirken her iki yöntem bir arada uygulandığında bu oran %95'e çıkmıştır.

KAYNAKLAR

1. Neyzi, O., Ertuğrul, T.; *Pediatric Kitapı*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1990
2. Scriver, C.R., Beaududet, A.L., Sly, W.S.; *Metabolic Basis of Inherited Disases (7th Edition)* New York, Mc Graw Hill, 1994

3. Scriver, C.R.; Phenylketonuria-Genotypes and Phenotypes. *The New England Journal of Medicine*. 324, 1280-1281, 1991
4. Özalp, İ., Coşkun, T., Tokatlı, A., Tokol, S., Özgüç, M., Köksal, G., Erdem, G., Yurdakök, M.; Neonatal PKU screening in Turkey: 7 years experience in a developing country. *Elsevier Screening*, 4, 139-147, 1995
5. Başaran, N., Cenani, A., Şaylı, B.S., Özkınay, Ö., Artan, S., Seven, H., Başaran, A., Dinçer, S.; Consanguineous Marriages Among parents of Down Patients. *Clin. Genet.*, 42: 13-15, 1992
6. Berthelon, M., Caillaud, C., Rey, F., at al. Spectrum of phenylketenuria mutations in Western Europe and North Africa, and their relation to polymorphic DNA haplotypes at the PAH locus. *Hum. Genet.* 86:355-358, 1991
7. Daiger, S.P., Chakraborty, R., Reed, L., at all.: Polymorphic DNA haplotypes at the PAH locus in European Families with PKU. *Am. J. Hum Genet.* 45:310-318. 1989
8. Desviat, L.R., Perez, B., Ugarte, M.: PKU in Spain: RFLP haplotypes and linked mutations. *Hum. Genet.* 92:254-258, 1993
9. Dilella, A.G., Huang, W.M., Woo, S.L.C.: Screening for PKU Mutations By DNA Amplification with the PCR. *The Lancet*. 497-499, 1988
10. Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C.: Molecular Basis of PKU and Related Hyperphenylalaninemas: Mutations and Polymorphisms in the Human PAH Gene. *Hum. Mutation*. 1:13-23, 1992.
11. Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C.: Updated listing of haplotypes at the PAH locus. *Am. J. Hum Genet* 51: 145-148, 1992
12. Gütter, F., Ledley, F.D., Lidsky, A.S., at al.: Correlation between polymorphic haplotypes at PAH locus and clinacal phenotypes of PKU. *The J. Pediatrics*. Vol.110,68-71,1987
13. Stuhmann, M., Riess, O., Mönch, I., Kurdoğlu, G.: Haplotypes analysis of the PAH gene in Turkish PKU families. *Clin. Genet.* 36:117-121, 1989
14. Woo, S.L.C.: Coralation of RFLP Haplotypes at the Human PAH Locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 43:781-783, 1988
15. Özgüç, M., Özalp, İ., Coşkun, T., at all.: Mutation Analysis in Turkish PKU Patients. *J. Med. Genet.*, 30:129-130, 1993
16. Goltsov, A.A., Eisensmith, R.C., Konecki, D.S., at al.: Associations Between Mutations and a VNTR in the Human PAH Gene. *Am J. Hum. Genet.* 51:621-636, 1992

