

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENTAL RETARDASYONLU OLGULARDA
KROMOZOMAL ANOMALİLERİN ARRAY TEMELLİ
KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON (aCGH)
TEKNIĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ebru Perim AKÇAY

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Tıbbi Biyoloji Programı
için Öngördüğü DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENTAL RETARDASYONLU OLGULARDA
KROMOZOMAL ANOMALİLERİN ARRAY TEMELLİ
KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON (aCGH)
TEKNIĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ebru Perim AKÇAY

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Tıbbi Biyoloji Programı
için Öngördüğü DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ali SAZCI

KOCAELİ

2016

KABUL ve ONAY

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


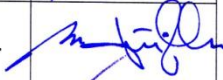

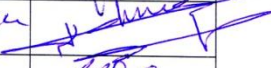

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Mental Retardasyonlu Olgularda Kronik Anomali lehine array temelli CGH tespiti ile doğrulanması

Tez yazarı: F.Bru PERİM AKUAY
Tez savunma tarihi: 13/04/16

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali SAZCI

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye Prof. Dr. Ali Sazcı	
Üye Prof. Dr. M. Doğan Gülkeç	
Üye Prof. Dr. Sübrü Özkırk	
Üye Prof. Dr. Kerem Biçer	
Üye Doç. Dr. Emel Çiyil	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ÖZET

Mental retardasyon (MR) insanın yaşamı boyunca engelli olmasına yol açan, öğrenme ve adaptasyon gücünü ile karakterize bir durumdur. MR'lerin nedenleri çok çeşitlidir. Genetik, metabolik, çevresel etmenler ve santral sinir sisteminin yapısal anomalileri bunların başlıcalarıdır. MR'li olguların ayrıntılı olarak incelenebildiği gelişmiş batı ülkelerinde bile spesifik tanıya varma oranı % 40-60 arasındadır ve genellikle popülasyonun % 0.3'ünü ağır MR'li olgular oluşturmaktadır.

Klasik yöntemlerle sitogenetik tanısı kesinleşemeyen özellikle MR'li olgularda kromozom anomalilerinin daha detaylı aydınlatılması amacı ile ek ileri düzey incelemeler yapılması gerekmektedir. FISH (fluoresan in situ hibridizasyon) tekniği kullanılarak yapılan incelemelerde araştırılacak aday gen/kromozom bölgelerinin klinik ya da sitogenetik yöntemler ile önceden belirlenmiş olması gerekmektedir. Oysa, kromozomların bazı bölgeleri (sentromer, telomer gibi) non-spesifik bant kalıbında olduğundan, bu bölgelerin araştırılması standart ve Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Teknikleri (HRB Tekniği) ile değerlendirilememekte FISH tekniği de her zaman yeterli olamamaktadır. Son yıllarda, temeli FISH tekniğine dayanan, farklı fluoresan boyalar ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen fluoresan renk farklılıklarını gösteren bir moleküler sitogenetik yöntem olan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği (CGH) bütün genomun dengesiz kromozomal materyalinin analizine olanak sağlayan bir teknik olarak geliştirilmiştir.

CGH, genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimlerini inceleyen bir moleküler sitogenetik tekniktir. Belirli bir genomun tamamındaki dengesiz kromozomal materyalin detaylı ve doğru analizi için, daha spesifik olarak da özellikle dengeli genomdan ince sapmalar olduğu zaman CGH tekniği gerekli olmakta ve özellikle array temelli CGH tekniği sayesinde klasik yöntemlerle sitogenetik tanısı kesinleşemeyen kromozom anomalilerinin daha detaylı araştırılması mümkün olmaktadır. Bu çalışmada, GTG Bantlama tekniğiyle 500-550 bant düzeyinde herhangi bir kromozom anomalisi saptanmayan 8 ağır MR'li erkek birey ile bunların akrabası olan 12 ve olmayan 2 normal fenotipe sahip bireyden oluşan toplam 22 olguda array temelli CGH tekniği kullanılarak tüm genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimleri incelenmiştir. Analizler sonucunda mental retardasyonlu 8 erkek olgumuz ve bunlarla akrabalığı olan 3 kadın olgumuzda X kromozomunun p11.22 bölgesinde 52210273-52745818 aralığında 535,5 Kb'lık (535545 bç) bir genomik bölgede farklı boyutlarda kazanç saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: array Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon, Konvansiyonel Sitogenetik, Mental Retardasyon

İNGİLİZCE ÖZET

Mental Retardation (MR) is a condition characterized by learning and adaptation disability which causes lifetime disability. There is a diverse range of causes of MR. Genetic, Metabolic, Environmental Factors and structural anomalies of the central nervous system are among the main causes. Even in western countries where detailed examination of MR could be done, rate of specific diagnosis is between 40-60% and the MR cases usually consist of 0.3% of the population.

When classical cytogenetic methods cannot confirm the diagnosis, advanced analysis should be performed to clarify the chromosomal abnormalities, especially in cases with MR. The use of FISH (fluorescent in situ hybridization) method in such detailed analysis requires predetermination of the candidate gene/chromosomal region either by clinical findings or cytogenetic methods. However some of the chromosomal (centromere, telomere) regions with nonspecific band pattern cannot be analyzed with standard and High Resolution Banding and the FISH technique cannot be always sufficient enough to analyze. In recent years, a molecular cytogenetic technique which is based on FISH Method where Test (Patient) and Reference DNA samples labelled with different fluorescent dyes hybridizing to normal chromosomes, enabling detection of unbalanced chromosomal abnormalities of the whole genome by calculating the differences in between fluorescent signal intensities is developed and named as comparative genomic hybridization.

CGH is a molecular cytogenetic technique, which examines copy number variations across the whole genome DNA sequence. For accurate and detailed analysis of unbalanced chromosomal abnormalities across the whole genome especially in case of small deviations from a balanced genome, CGH is needed and by means of array based CGH method, it is possible to analyze thoroughly the chromosome anomalies whose cytogenetic diagnosis cannot be confirmed by classical methods.

In the framework of this study, whole genome-wide DNA copy number variation analysis was performed on a total of 22 individuals using array-CGH technique. 8 of the individuals included in the study were males with severe MR. All individuals were previously analyzed by GTG banding technique, which showed no chromosomal abnormality at the level of 500-550 bands. The remaining 14 individuals were phenotypically normal, and 12 of them were relatives of the 8 MR patients. We detected variable size of gains at Xp11.22 between 52210273-52745818 bp, within 535,5 Kb (535545 bp)- long genomic region, in 8 male patients plus their 3 female relatives with normal phenotype.

Keywords: array Comparative Genomic Hybridization, Conventional Cytogenetic, Mental Retardation.

TEŞEKKÜR

Hz. Mevlana'nın dediği gibi "Kapı açılır, sen yeter ki vurmayı bil. Ne zaman bilmem, sen yeter ki o kapıda durmayı bil". Benim için de doktoramı tamamlayabilmek aynen böyle oldu, çok uzun zamandır bugünlerin gelmesini bekledim. Çalışmamın gerçekleşmesinde bana inanıp bu yolda ilerlememi sağlayan değerli Hocam **Prof. Dr. Ali SAZCI**'ya, bugüne kadar her konudaki ilgi ve desteği için **Doç. Dr. Emel ERGÜL**'e, tüm yardımları için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ**'a

sonsuz teşekkürler...

Aileme, kaç yaşında olursam olayım her daim ihtiyacım olan sizler iyi ki varsınız, hayatımda olduğunuz için çok şanslıyım.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiŐtir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

.../.../2016

Ebru Perim AKÇAY

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
ÖZET	i
İNGİLİZCE ÖZET	ii
TEŞEKKÜR	iii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kromozomların Değerlendirilme Yöntemleri	2
1.1.1. GTG Bantlama (Giemsa-Tripsin-Giemsa)	2
1.1.2. QFA Bantlama (Quinakrin-Fluoresan-Atebrin)	2
1.1.3. CBG Bantlama (Centromere-Barium-Giemsa)	3
1.1.4. RBG Bantlama (Reverse-BrdU)	3
1.1.5. NOR Boyama (Nucleolar Organiser Region)	3
1.1.6. Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Tekniği (HRBT)	5
1.1.7. Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH)	5
1.1.7.1. Problar	7
1.1.7.1.1. Probların işaretlenmesi	7
1.1.7.1.2. Prob çeşitleri	8
1.1.7.1.2.1. Lokusa özgü problar	8
1.1.7.1.2.2. Tekrarlayan dizi (Satellit) probları	9
1.1.7.1.2.3. Kromozomun tümünü boyayan (Painting) problar	11
1.1.8. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)	12
1.1.8.1. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon dizinleri (Array)	14
1.1.8.2. Mikrodizin çalışma aşaması	15
2. AMAÇ	17
3. YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.2. Kullanılan Aygıtlar	19

3.2.1. Cam Malzeme	20
3.2.2. Kimyasal Maddeler	20
3.2.2.1. Standart periferik kan lenfosit kültürü solüsyonları	20
3.2.2.2. GTG bantlama solüsyonları	21
3.2.2.3. FISH solüsyonları	21
3.2.3. Kullanılan Prob	22
3.2.4. Kullanılan CGH Dizinleri (Array)	22
3.2.5. Standart Periferik Kan Lenfosit Kültürü	23
3.2.6. Kromozom Eldesi	23
3.2.7. GTG Bantlaması	23
3.2.8. Telomerik Problemlerin Kullanımı	24
3.2.9. CGH Dizinleri (Array) Kullanımı	25
3.2.9.1. Periferik kandan DNA izolasyonu	25
3.2.9.2. Saflaştırma	26
3.2.9.3. DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü	26
3.2.9.4. Örneklerin işaretlenmesi	27
3.2.9.5. İşaretli örneklerin temizlenmesi ve miktarlarının tayin edilmesi	28
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR DİZİNİ	89
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MR	:	Mental Retardasyon
MRX	:	X kromozomuna bağlı Mental Retardasyon
MTX	:	Metatroksat
MLPA	:	Multipleks Ligasyon Prob Amplifikasyonu
HRB Tekniği	:	Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Tekniği
FISH	:	Fluoresan In Situ Hibridizasyon
aCGH	:	Array Bazlı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CGH	:	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
GTG Bantlama	:	Giemsa-Tripsin-Giemsa Bantlama
QFA Bantlama	:	Quinakrin-Fluoresan-Atebrin Bantlama
CBG Bantlama	:	Centromere-Barium-Giemsa Bantlama
RBG Bantlama	:	Reverse-BrdU Bantlama
NOR Boyama	:	Nucleolar Organiser Region Boyama
QF-PCR	:	Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. ISCN (kromozomal yeniden düzenlenmelerini listeleme kuralları)'na göre 500-900 bant düzeyinde insan karyotipi (G Bantlama)	4
Çizim 1.2. İn situ Hibridizasyon İşleminin Temel Basamakları	7
Çizim 1.3. 5. kromozomun 5p15.2 bölgesine özgü prob ile yapılmış FISH görüntüsü	9
Çizim 1.4. 13/21 Alfa-satellit probu ile Trizomi 21'li olgunun interfaz FISH ile saptanması	10
Çizim 1.5. 14. kromozomun painting prob ile yapılmış FISH görüntüsü	12
Çizim 1.6. Array temelli CGH (aCGH) Tekniği	13
Çizim 1.7. Mikrodizin çalışmalarına ait genel deney akış şeması	15
Çizim 1.8. Mikrodizin çalışmalarına ait genel deney akış şeması	15
Çizim 3.1. Array-CGH analizi	29
Çizim 4.1. Olgu 1'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	40
Çizim 4.2. Olgu 2'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	42
Çizim 4.3. Olgu 3'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	44
Çizim 4.4. Olgu 4'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	46
Çizim 4.5. Olgu 5'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	48
Çizim 4.6. Olgu 6'ya ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	50
Çizim 4.7. Olgu 7'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	52
Çizim 4.8. Olgu 8'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	54
Çizim 4.9. Kontrol 1'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	56
Çizim 4.10. Kontrol 2'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	58
Çizim 4.11. Kontrol 3'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	60
Çizim 4.12. Kontrol 4'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	62

Çizim 4.13. Kontrol 5'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	64
Çizim 4.14. Kontrol 6'ya ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	66
Çizim 4.15. Kontrol 7'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	68
Çizim 4.16. Kontrol 8'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	70
Çizim 4.17. Kontrol 9'a ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	72
Çizim 4.18. Kontrol 10'a ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	74
Çizim 4.19. Kontrol 11'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	76
Çizim 4.20. Kontrol 12'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	78
Çizim 4.21. Kontrol 13'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	80
Çizim 4.22. Kontrol 14'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. FISH tekniğinin kullanım alanları.....	6
Çizelge 1.2. Satelit problemlerinin çeşitleri ve özellikleri	11
Çizelge 1.3. CGH ile belirlenebilen kromozom anomalileri.....	13
Çizelge 2.1. FISH, Konvensiyonel Sitogenetik ve Array Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH) Tekniği karşılaştırması.....	18
Çizelge 4.1. Klinik bulgusu/ ön tanısı Multiple konjenital anomali ve Mental Retardasyon (Non-sendromik) olan 8 hastadan aCGH tekniği ile elde edilen veriler	30
Çizelge 4.2. X kromozomunun p11.21 ve p11.22 bölgelerinde yer alan a.bilinen genler ve genomik varyantlar, b. genomik varyantlar	38

1. GİRİŞ

Tüm döllenmelerin yaklaşık % 30'unun kromozom anomalisi taşıdığı tahmin edilmekte ve bu oranın yeni doğanda % 0.6'ya düştüğü bilinmektedir (Ferguson-Smith 1997). Doğumsal anomali ve mental retardasyonların (MR) etiyojisinde dengesiz kromozom anomalileri önemli bir yer tutmaktadır. Dengesiz kromozom anomalilerinin yaşama bağdaşmayanlarının büyük bir kısmı, postzigotik evrede kaybedilmekte ve gebelikler spontan düşük ile sonlanmaktadır. 1. trimester spontan düşük olgularında % 50-60 olan kromozom anomali oranı, ölü doğumlarda % 4-6'ya kadar azalmaktadır (Thompson 1991). Büyük canlı yenidoğan serilerinde ise bu oran 1:119 ve 1:154 olarak verilmektedir. Fenotipi etkileyen dengesiz kromozom anomalilerinin sıklığı ise yaklaşık 1:400'dür (Warburton ve Stein 1983) ve çoklu doğumsal anomalilerin etiyojisinde önemli bir yer tutar.

Dengesiz kromozom anomalilerinin içinde sayısal anomaliler en sık görülenleri olup sitogenetik tanısı, klasik bantlama teknikleri ile (400-500 bant/haploid set düzeyindeki) kolaylıkla yapılabilmektedir. Yapısal kromozom anomalilerinde ise çoğu zaman bu yöntemler yeterli olamayabilmekte ve Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Tekniği (HRB Tekniği) ile Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve/veya array bazlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) gibi tekniklerin uygulanması gerekmektedir. Böylece, daha küçük boyuttaki kromozom anomalilerinin tanısında, yüksek rezolüsyonlu (600-1000 bant/haploid set düzeyindeki) profaz ve prometafaz kromozom analizleri Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Tekniği (HRB Tekniği) ve/veya kozmid problemler kullanılarak yapılan FISH analizleri ve son yıllarda da array temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) analizleri ile mümkün olmaktadır (Pollack JR, 1999).

Genetik polikliniklerine gönderilen hastaların büyük çoğunluğunu mental retardasyon saptanan çocuklar oluşturmaktadır. MR'lerin nedenleri çok çeşitlidir. Genetik, metabolik, çevresel etmenler ve santral sinir sisteminin yapısal anomalileri bunların başlıcalarıdır. MR'li çocukların ayrıntılı olarak incelenebildiği gelişmiş batı ülkelerinde bile spesifik tanıya varma oranı % 40-60 arasındadır ve genellikle popülasyonun % 0.3'ünü ağır MR'lu olgular oluşturmaktadır (Hagberg ve Kyllerman 1983). Çoğunlukla bunların % 3'ünde IQ 70 civarındadır. Bununla beraber, ağır intellektüel handikapları nedeni ile % 0.1 kadar

çocuk sürekli bakıma muhtaç durumdadır. MR, 3. Dünya ülkelerinin bir kısmı da dahil olmak üzere dünya çapında bir sorundur (Adams ve Clark 2015). Ailenin işbirliği, izlemelerin sıklığı, yaşın küçük olması, incelemelerin adım adım yapılması, gerektiğinde yakın akrabaların muayene edilmesi ve çocukta mental geriliğe eşlik eden yapısal anomalilerin bulunması tanı oranını % 5-20 arası arttırmaktadır.

Etiyolojik tanının kesinleşmesi ayrıca tedavi programının kararlaştırılması, ileride oluşabilecek komplikasyonlara karşı önlem alınması, bakım seçeneklerinin saptanması ve ilgili kuruluşlarla ilişkiye geçilmesi gibi sorunların çözümünde de yardımcı olacaktır.

1.1. Kromozomların Değerlendirilme Yöntemleri

Kromozomların DNA'ya özgün boyalar ile boyanarak görüntülenmesi olası ise de, bu yolla yapısal anomalilerin ayrıntılı tanısı yapılamamaktadır. Kromozomların fiziksel ve kimyasal yapısının özelliklerini kullanarak, kromozomlar üzerinde farklı boyanma özelliklerinde alanlar oluşturulması esasına dayanan çeşitli bantlama teknikleri geliştirilmiştir (Seabright 1972).

1.1.1. GTG Bantlama (Giemsa-Tripsin-Giemsa)

Kromozomların rutin olarak boyanmasında en yaygın kullanım alanı bulan bantlama tekniğidir. Yöntemde, kromozomal histon ve non-histon proteinleri tripsin ile denatüre edilerek DNA'nın Adenin ve Timin bazlarınca zengin bölgelerine Giemsa'nın girmesi sağlanır. Böylece, bu bölgeler koyu boyanır ve heterokomatin bölgeler adını alır. Boya almayan diğer bölgeler ise ökromatin bölgelerdir ve yapısal genler içerirler (Çizim 1.1) (Seabright 1972).

1.1.2. QFA Bantlama (Quinakrin-Fluoresan-Atebrin)

Fluoresanslı teknikler içinde boyalardan en çok kullanılanı quinakrin dihidroklorid (atebrin) ve quinakrin mustard (quinakrin) akrinin boyalarıdır. Atebrin antimalarial olarak kullanılmaktadır, bu özelliği DNA'ya bağlanarak RNA sentezini durdurmasından ileri

gelir. Kromozomlarda Adenin ve Timin bazlarınca zengin bölgelerin koyu boyanmasına neden olur ve fluoresans mikroskobu ile inceleme yapılabilir. Polimorfik bölgelerin (sentromer, satellit ve Yqh) parlak boyanmaları nedeni ile heteromorfizmleri tanımlamada sıkça kullanılır (Seabright 1972).

1.1.3. CBG Bantlama (Centromere-Barium-Giemsa)

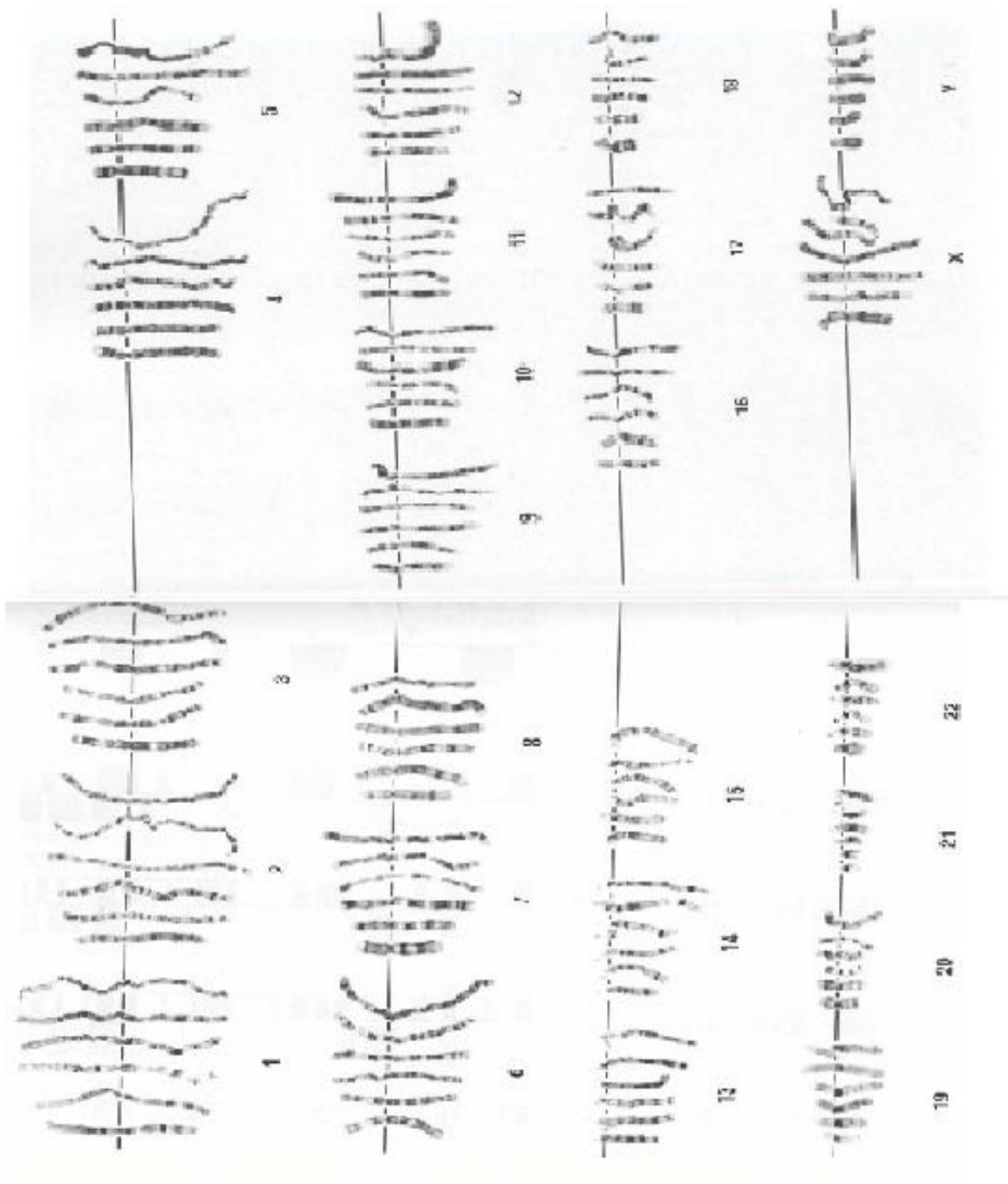
Sentromerleri ve Yqh bölgesini oluşturan konstitutif heterokomatinini özgün olarak boyayan tekniğe C-Bantlama denir. Koyu boyanan C-bantlar insan kromozomlarının (Y dışında) sentromer bölgelerine lokalize olur, fakat Y kromozomunda uzun kolun distal bölgesinde koyu bir bant olarak kendini gösterir. Bu nedenle, sentromere yakın kromozom yeniden düzenlenmelerinin, sentromer varlığının ve polimorfizmlerin araştırmalarında kullanılır (Seabright 1972).

1.1.4. RBG Bantlama (Reverse-BrdU)

Kromozomların G bantlama ile elde edilen açık renkli kısımları Reverse bantlama ile koyu, koyu renkli kısımları ise açık boyanır. Yöntemde, DNA'nın Guanin ve Sitozin bazlarınca zengin bölgeleri koyu boyanmaktadır. G Bant ile tanımlanması zor olan terminal kromozom anomalilerini belirleyebilmek için kullanılır. Bu teknik, fluoresanslı boyalarla ya da ışık mikroskobu teknikleri ile yapılabilir (Seabright 1972).

1.1.5. NOR Boyama (Nucleolar Organiser Region)

Akrosentrik kromozomlarda bulunan nukleolus organizasyonundan sorumlu olan satellitler gümüş nitrat ile özgün olarak boyanabilmektedir. Farklı büyüklüklerde boyanan satellit özelliklerinden yararlanılarak polimorfizmler ve marker kromozomların satellit içerip içermedikleri saptanabilmektedir (Seabright 1972).



Çizim 1.1. ISCN (kromozomal yeniden düzenlenmelerini listeleme kuralları)'na göre 500-900 bant düzeyinde insan karyotipi (G Bantlama) (ISCN, 2013).

1.1.6. Yüksek Çözünürlüklü Bantlama Tekniği (HRBT)

1976 yılında Yunis ve ark.ları (Yunis 1976) tarafından geliştirilen bu teknik metotraksat (MTX) ile lenfosit hücre kültürünü senkronize ederek kromozomların daha az kondanse oldukları prometafaz kromozomlarının eldesi temeline dayanır ve 850-1000 bant düzeyinde analiz edilmesine olanak sağlar. Senkronizasyon için, hücre döngüsünün erken bir evresinde DNA sentezi bir kimyasal olan MTX ile bloke edilir ve daha sonra bu madde uzaklaştırılarak tüm hücrelerin eş zamanlı bölünmeye uyarılması sağlanır. Bu tekniğin laboratuarlarda kullanılmaya başlanmasıyla, kromozomların 5 ile 10 milyon baz çiftlik bölümünü ilgilendiren değişiklikler saptanabilir duruma gelmiştir. En önemlisi, mikrodelesyon sendromları (Miller-Dieker Sendromu, Di George Sendromu gibi) (van Zelderen-Bhola, ve diğerleri 1997) tanımlanabilmiştir.

1.1.7. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

DNA veya RNA sekanslarının kendi doğal hücresel ortamlarında, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nukleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini sağlayan tekniğe **in situ hibridizasyon tekniği** denir (Gall ve Pardue 1969) (Warford ve Lauder 1991).

Moleküler genetikteki ilerlemeler çok sayıda özgün DNA dizilerinin eldesine olanak sağlamış ve bu sayede belirli DNA bölgelerine özgün tek iplikli DNA oligonükleotidleri (prob) elde edilmiştir. Tüm ISH yöntemlerinde temel prensip iki DNA sarmalı arasındaki komplementerliktir. Prob DNA molekülü, nick translasyon yöntemi ile floresanlı boyaarla işaretlenir ve DNA'nın çift sarmal ipliği ile hibridize edilir. Böylece, probun komplementer bölgeleri işaretlenmiş olur.

Gall (Gall ve Pardue 1969) ve Pardue (Pardue ve Gall 1975) ile bunlardan bağımsız olarak çalışan John ve arkadaşlarının (Holmes, ve diğerleri 1993) 1969 yılında radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermeleri, in situ hibridizasyon yönteminin başlangıç noktasını oluşturmaktadır (Höfler 1990).

Ancak, radyoaktif maddelerin biyolojik olarak zararlı maddeler olmaları, raf ömürlerinin oldukça kısa olması ve in situ hibridize olan DNA dizilerini saptamada

uygulanan otoradyografinin zaman alması nedeni ile nükleik asitler fluoresan ya da enzimatik tepkimelerle işaretlenmeye başlanmıştır.

1987 yılında Garson ve arkadaşları (Fusco 1987) tarafından DNA probu, radyoaktif olmayan biotin ile işaretlenmiştir. Daha sonraları, biotin yanı sıra digoksinin ve fluorescein gibi işaretleme molekülleri de kullanılmaya başlanmıştır. İn situ hibridizasyon tekniği, 1991 yılında fluoresanlanmış nükleotid analoglarının kullanılmaya başlanmasıyla Fluoresan in situ hibridizasyon tekniği adını almıştır (Wiegant, 1991).

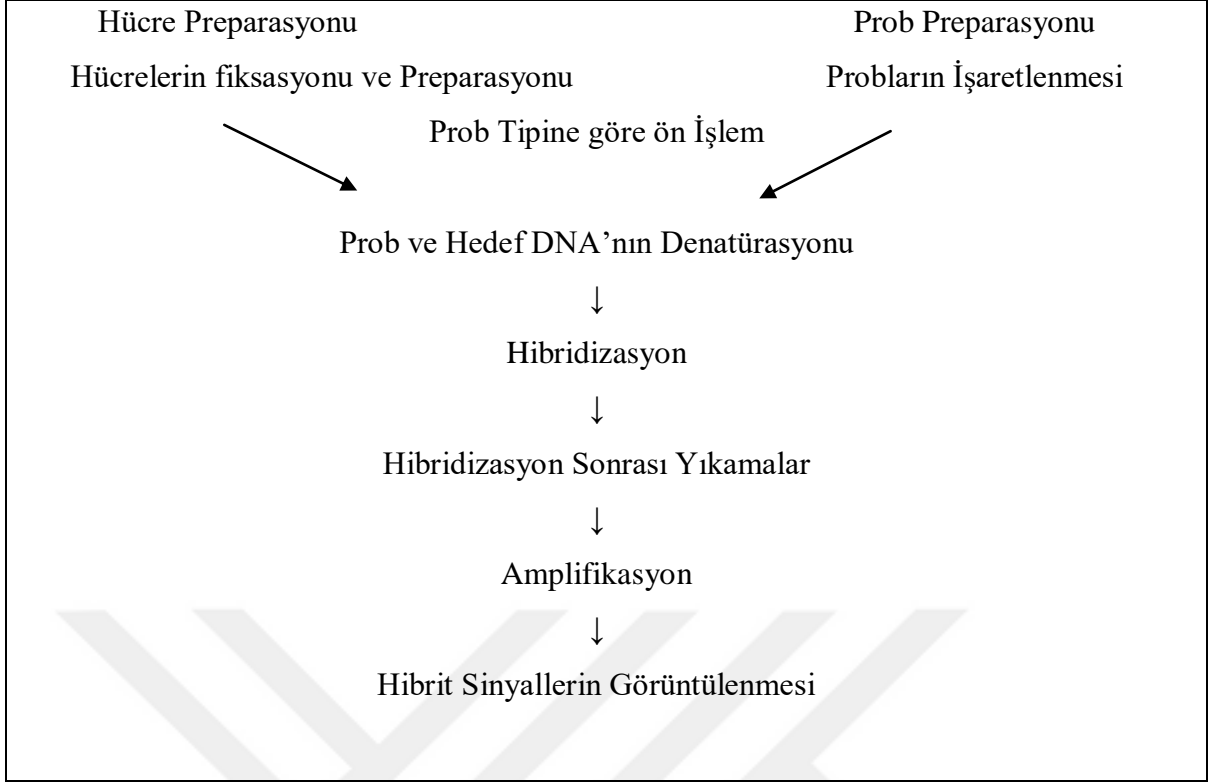
FISH tekniğinin kolay uygulanabilirliği, duyarlılığı ve etkinliği bu yöntemin birçok alanda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Çizelge 1.1’de FISH tekniğinin kullanım alanları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. FISH tekniğinin kullanım alanları

DİAGNOSTİK	ARAŞTIRMA
-İnterfaz sitogenetiği	-Gen haritalaması
-Klinik sitogenetik ve prenatal tanı	-Gen ekspresyon analizi
-Mikrodelesyon sendromlarının tanısı	-Tümör biyolojisi
-Dokularda enfeksiyon ajanların tanısı	-Mikrobiyoloji/viroloji
-Kanser sitogenetiği	-Somatik hücre hibridizasyonu Mayoz/Mitoz analizleri Hücre tanımlaması

FISH tekniğinde izlenen başlıca basamaklar (Çizim 1.2);

- Probu işaretlenmesi,
- Hibridizasyona girecek materyalin fikse edilerek preparatlara yayılması,
- Hedef DNA (metafaz kromozomları veya interfaz nükleusu)’nın denatürasyonu,
- Prob denatürasyonundan sonra prob ile hedef DNA’nın hibridizasyonu,
- Hibridizasyon sonrası yıkamalar ile immünokimyasal ve mikroskopi yöntemleri ile hibridizasyonun görünebilir hale getirilmesi.



Çizim 1.2. İn situ Hibridizasyon İşleminin Temel Basamakları

1.1.7.1. Problar

Problar, izole edilmiş DNA parçasının uygun bir vektör içine (plazmid, bakteriyofaj, kozmid veya YAC) yerleştirilerek konakçı hücrelerde (bakteri veya maya) ya da PCR ile çoğaltılması ile elde edilirler (Chan, Zaki, ve diğerleri 1990).

1.1.7.1.1. Probların işaretlenmesi

Problar ya otoradyografi (radyoaktif olanlar) ile veya immünokimyasal yollarla (non-radyoaktifler) işaretlenirler. Non-radyoaktif problar, direkt ve indirekt olarak işaretlenebilirler.

-Direkt işaretlemede aracı molekül doğrudan proba bağlanır ve hibridizasyondan hemen sonra mikroskopta gözlenebilir (Wilkinson 1992). En sık kullanılan aracı (raportör) gruplar;

-Fluorescein d-UTP

-Rhodamine d-UTP

-Kumarine d-UTP'dir (Lichter ve Cremer 1992).

İndirekt işaretlemede ise aracı molekül kimyasal ya da enzimatik olarak proba bağlanır ve immünohistokimyasal afinite reaksiyonları ile sinyal görünür hale getirilir. Direkt yöntemde göre sinyaller çok daha kuvvetlidir. İndirekt yöntemde en sık biotin-avidin, biotin-streptavidin, digoxigenin ve dinitrofenol kullanılır (Langer, Waldrop ve Ward 1981).

1.1.7.1.2. Prob çeşitleri

İn situ hibridizasyon tekniğinde prob seçimi çok önemlidir. Kromozomal anomalileri saptamak için kullanılan proplar çok çeşitlidir ve hedef dizilerine göre başlıca 3 sınıfa ayrılırlar;

1. Lokusa özgü proplar

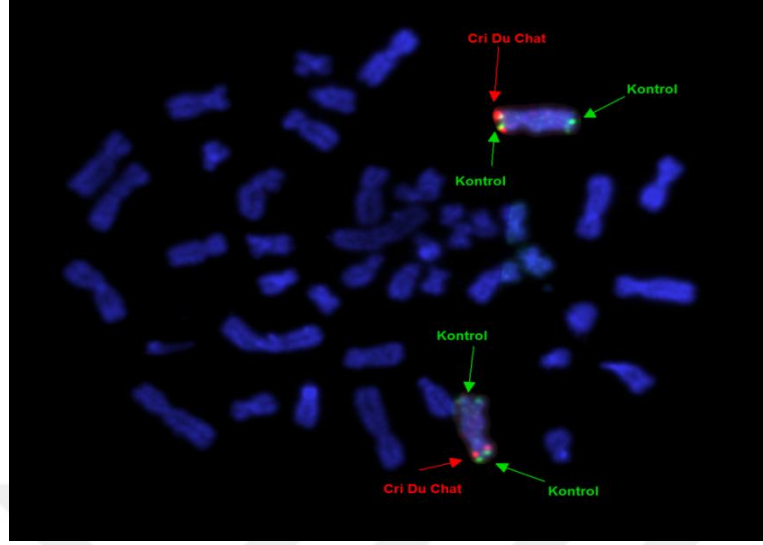
2. Kromozomun belirli bölgesine özgü tekrarlayan dizi propları

3. Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini “boyayan” proplar (Chan, Zaki, ve diğerleri 1990).

1.1.7.1.2.1. Lokusa özgü proplar

Delesyon ya da duplikasyonları saptamada kullanılan bu proplar, interfaz nukleusunda ya da metafaz kromozomlarında yer alan belli bir bölgede parlak bir fluoresan sinyal verir. 15-500 kb. büyüklüğünde olup kozmid ya da YAC vektörüne klonlanmıştır. Klonlanmış genlere özgü dizileri içeren bu proplar ilgili kromozoma ilişkin yapısal düzensizliklerin, mikrodelesyon sendromlarının (van Zelderen-Bhola, ve diğerleri 1997)

(Miller-Dieker Send., DiGeorge Send., Prader-Willi / Angelman Send. gibi) tanısında kullanılır (Çizim 1.3).

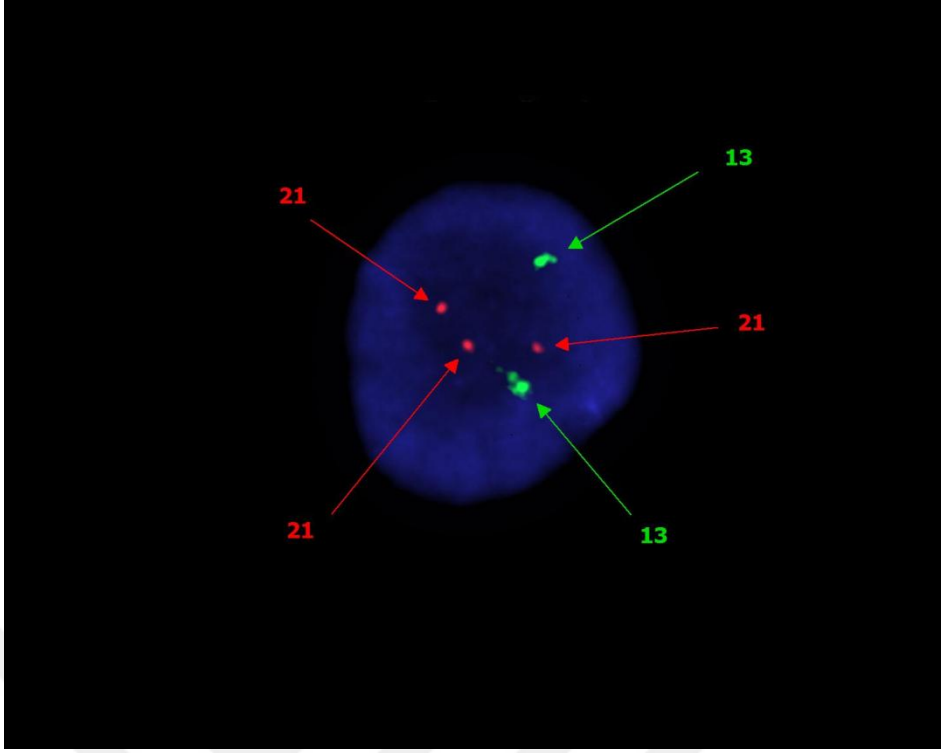


Çizim 1.3. 5. kromozomun 5p15.2 bölgesine özgü prob ile yapılmış FISH görüntüsü.

1.1.7.1.2.2. Tekrarlayan dizi (Satellit) problemleri

Tüm insan DNA'sının %10-%20'sini satellit DNA'sı ve tekrarlayan diziler oluşturur. Kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde 10^5 - 10^6 baz çifti uzunluğunda kısa tandem tekrarlar bulunmaktadır. Bunlar, alfa-satellit, beta-satellit ve diğer satellit DNA'lardan oluşur (Manuelidis 1981) (Çizelge 1.2).

En iyi incelenmiş olanı alfa-satellit DNA'sıdır ve tüm insan kromozomlarının sentromer bölgesinde bulunur. Her bir kromozomun boyuna uzunluğunun % 2'sini kaplar ve 171 bp'lik tandem tekrarlardan oluşur. Büyüklük açısından oldukça polimorfiktir, kişiye özgü olarak bir kromozomdaki boyutları 2-4 kat farklılık gösterebilir (Willard 1990) (Çizim 1.4).



Çizim 1.4. 13/21 Alfa-satellit probu ile Trizomi 21'li olgunun interfaz FISH ile saptanması

Sentromerik proplar, interfaz nukleusunda çok iyi ayırdedilebildiğinden prenatal tanıda aneuploidilerin (trizomi 13, 18, 21 gibi) ve cinsiyete bağlı hastalık riski taşıyanlarda hızlı cinsiyet tayini için, marker ve halka kromozomlarında da sentromer pozisyonlarının araştırılmasında kullanılmaktadır (Tharapel, ve diğerleri 1992).

Beta-satellit proplar, perisentrik heterokromatin bölgelere, akrosentrik kromozomlara ve 9. kromozoma lokalize olurlar. Beta-satellit DNA'da tekrarlayan monomerik dizilerden oluşur, 68 bp uzunluğunda olup Mendel kurallarına göre kalıtılırlar (Willard 1990).

Klasik satelit probları, AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, 15 ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgü DNA dizilerinden oluşurlar (Bhat 1990; Verdier, ve diğerleri 1997).

Telomerik proplar ise TTAGGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak kromozomların telomer bölgelerine lokalize olurlar ve bu bölgelerde meydana gelen yeniden düzenlenmelerin incelenmesinde kullanılırlar (Knight ve Flint 2000).

Delesyonlar kromozomun ucundaki sinyalin yokluğu ile, trizomiler ise üç sinyalin varlığı ile saptanır. Sinyallerin kromozomal konumu, kromozomların sitogenetik karakterizasyonundan kolayca anlaşılır ve bu yüzden dengeli ve dengesiz translokasyonların her ikisi de kolaylıkla saptanabilir (Flint, Thomas, ve diğerleri 1997).

Çizelge 1.2. Satelit problemlerinin çeşitleri ve özellikleri

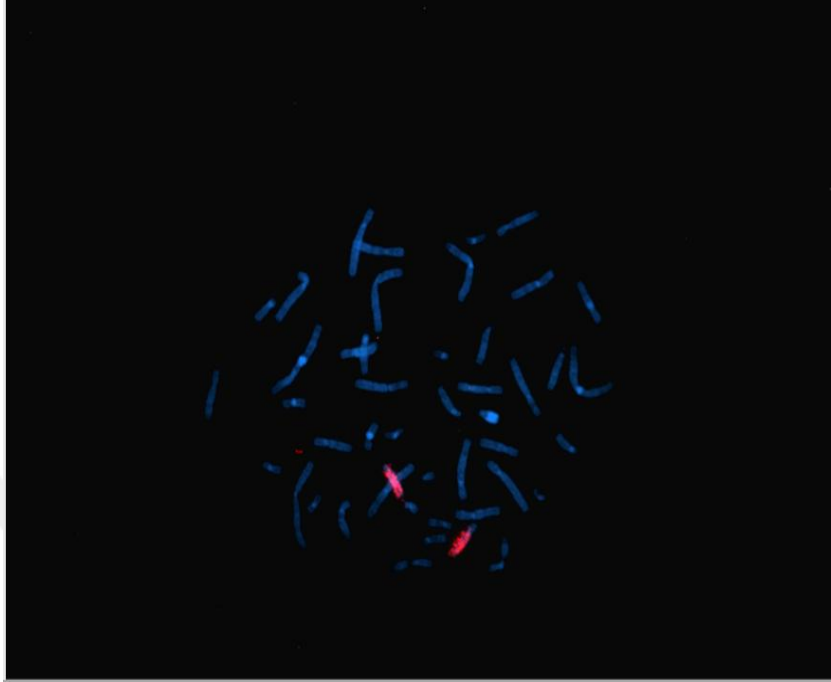
Satellit Tipi	Uzunluğu	Tekrar Birimi	Kromozomal Lokalizasyon
Midi	250-500 kb	40 bp	
Makro	100-350 kb	Büyük (X=3 kb)	
Alfa	Değişken	171 bp	Sentromer
Beta	Değişken	68 bp	Perisentrik Heterokromatin
Klasik	Değişken	AATGG	Heterokromatin
Telomerik	Değişken	TTAGGG	Telomer

1.1.7.1.2.3. Kromozomun tümünü boyayan (Painting) problemler

Belli bir kromozomda çok çeşitli DNA dizilerine homolog olan prob karışımı kullanılarak, o kromozomun tümünün boyanması sağlanır (Çizim 1.5). Painting problemler, ya kromozoma özgü flow-sorted kütüphanelerden, monokromozomal somatik hücre hibritlerinden ya da flow-sorted kromozom DNA'larının PCR ile amplifiye edilmesi ile elde edilirler (Lichter, Boyle, ve diğerleri 1991).

Painting prob elde etmenin bir diğer yolu da, mikrodiseksiyon ile elde edilen kromozom ya da kromozom segmentinin PCR ile çoğaltılarak kullanılmasıdır. Özellikle,

marker kromozom ve kompleks kromozom anomalilerinin kökeninin araştırılmasında revers painting denilen bu yöntem kullanılır (Fusco 1987).



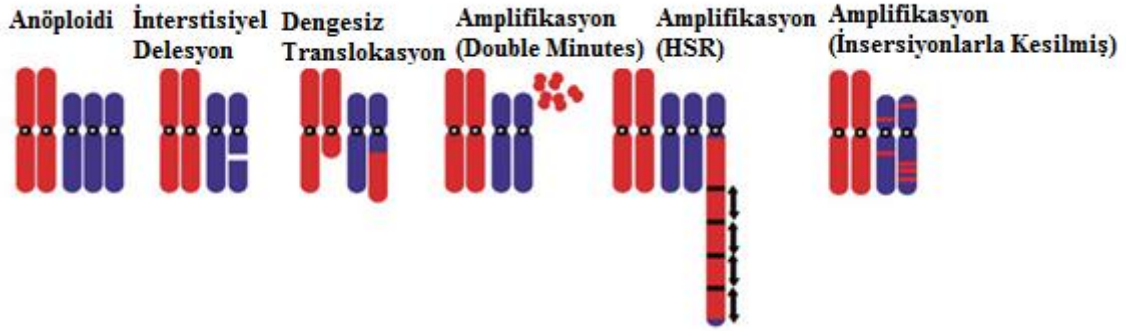
Çizim 1.5. 14. kromozomun painting prob ile yapılmış FISH görüntüsü

1.1.8. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)

Bütün genomun dengesiz kromozomal materyalinin analizine olanak sağlayan bir teknik olan CGH tekniği; temeli FISH tekniğine dayanan, farklı floresan boyalar ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir sitogenetik yöntemdir. CGH tekniği ilk defa, Kallioniemi ve ark. 1992'de Science'da yayınladıkları çalışma ile ortaya konmuştur (Kallioniemi, Kallioniemi, ve diğerleri 1992).

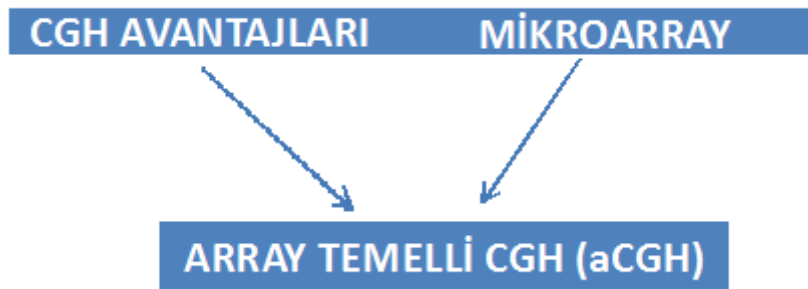
Çok az hücreden elde edilen az miktardaki DNA'dan analiz, CGH ile PCR'ın kombinasyonu ile mümkündür. Bu yöntem ile, hasta DNA'sında kromozomal kayıp veya belli bir bölgede artış olup olmadığı gösterilebilir. Bu teknik, kazanım (duplikasyon, insersiyon veya amplifikasyon) veya net kayıp (materyalde delesyon) gibi kromozom anomalilerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar. CGH ile belirlenebilen kromozom anomalileri Çizelge 1.3'te gösterilmiştir;

Çizelge 1.3. CGH ile belirlenebilen kromozom anomalileri



Bu çalışmada kullanılan bu tekniğin temel avantajı, DNA örneklerinin kullanılarak tüm genomun tek bir deneyde görüntülenebilmesidir, bunun yanı sıra az miktarda DNA örneğinin yeterli olması, test örneği için metafaz kromozomlarının gerekli olmaması, iki renkli görüntüleme sistemi kullanılması sonucunda, metafaz plağı üzerinde kromozom anomalilerinin normal karyotip analizine göre daha güvenilir saptanabilmesi ve en az iki genomun birbirleri ile karşılaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

Klasik CGH tekniğinin avantajları ile mikroarray tekniğinin birleştirilmesi sonucu array temelli CGH (aCGH) Tekniği oluşmuştur. Böylece, klasik yöntemlerle sitogenetik tanısı kesinleşemeyen kromozom anomalilerinin daha detaylı araştırılması array temelli CGH (aCGH) Tekniğinin kullanılması ile mümkün olacaktır. İlk kez 1997 de Solinas-Toldo ve ark. hedef (target) diziyi cam matriks üzerine immobilize ederek array-CGH'nin temelini atmışlardır (Solinas-Toldo, Lampel, ve diğerleri 1997). (Çizim 1.6).



Çizim 1.6. Array temelli CGH (aCGH) Tekniği.

1.1.8.1. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon dizinleri (Array)

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon analizinde tüm genom veya genom üzerinde alt bir bölgeye örneğin ilgilenilen tek bir kromozomal bölgeye veya birden çok lokusa, özel tasarlanmış CGH dizinleri (array) kullanılarak ilgilenilen bir genomun referans bir genom ile arasındaki kopya sayı farklılıkları, kromozomal anomalilerin tespit edilmesi mümkündür.

Roche NimbleGen'in 135.000 probu barındıran yüksek rezolüsyonlu 12x135K multipleks formattaki CGH dizinleri ile tek bir lam üzerinde 12 örnek çiftinin bir arada incelenebilmesi, DNA kopya sayı farklılıkları, kromozomal anomaliler açısından geniş kapsamlı analizi yapılabilmektedir.

Bu dizinleri kullanarak genom boyu kopya sayı farklılıklarının mendelyen kalıtım gösteren hastalıklar, mental retardasyon, otizm, şizofreni, kanser ve otoimmün hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıkla assosiasyonunun incelenmesi mümkündür.

Bunların yanı sıra yüksek rezolüsyonlu CGH dizinleri mental retardasyon, kanser ve diğer kompleks fenotiplerle ilişkili kromozomal anomalilerin tespitinde kullanılan moleküler sitogenetik yöntemlerden biri olmaya başlamıştır.

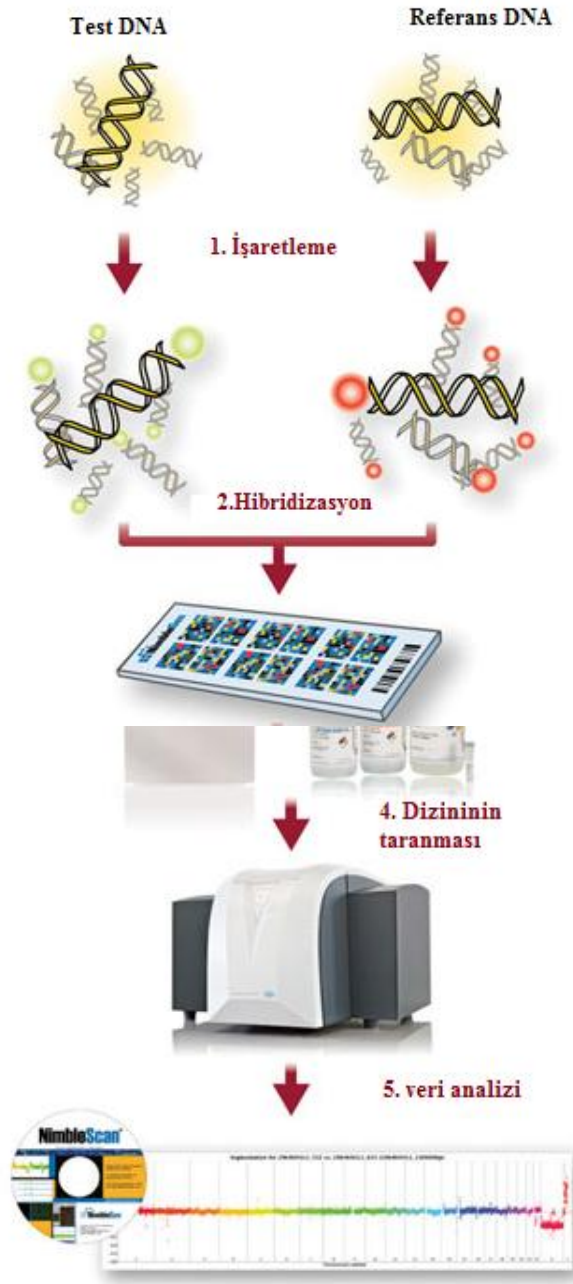
Çalışmamızda, gen başına 3 probun yer aldığı, 60 mer'lik problarla tüm genomu tarayan tek bir mikrodizin lamı üzerine 12 örnek çiftinin hibridizasyonunun yapılabildiği **Human CGH 12x135K Whole-Genome Tiling v3.0 Array** (NimbleGen, Roche mikrodizin)'den 2 platform kullanılmıştır.

1.1.8.2. Mikrodizin çalışma aşaması

Mikrodizin çalışmaları yedi temel adımdan oluşur (Çizim 1.7, Çizim 1.8).



Çizim 1.7. Mikrodizin çalışmalarına ait genel deney akış şeması (Rosenberg, 2006)



Çizim 1.8. Mikrodizin çalışmalarına ait genel deney akış şeması. www.burclab.com (2016)'dan alınmıştır.

2. AMAÇ

Bu çalışmada, mental retardasyon endikasyonu ile Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve tanı amaçlı yapılan kromozom analizlerinde herhangi bir kromozom anomalisi saptanmayan, birbirleri ile akrabalık bağı olan 8 ağır MR'lu erkek birey ile 12 normal fenotipe sahip birey ve bu olgularla akrabalığı bulunmayan biri erkek diğeri kadın 2 bireyin Array temelli CGH Tekniği ile analizleri yapılmıştır. Çalışmanın amacı, bir ailede 3 kuşaktır sadece erkek bireylerde görülen anomalilerin etiyolojik tanısının kesinleşmesi, böylece sonraki kuşaklarda tekrarını önlemeye yönelik izlenecek yola karar verilmesidir. Etiyolojik tanının kesinleşmesi ayrıca tedavi programının kararlaştırılması, ileride oluşabilecek komplikasyonlara karşı önlem alınması ve ilgili kuruluşlarla ilişkiye geçilmesi gibi sorunların çözümünde de yardımcı olacaktır.

FISH incelemelerinde araştırılacak aday gen/kromozom bölgelerinin klinik ya da sitogenetik yöntemler ile önceden belirlenmiş olması gerekmektedir. Oysa, kromozomların bazı bölgeleri (sentromer, telomer gibi) non-spesifik bant kalıbında olduğundan, bu bölgelerin araştırılması standart ve HRB Teknikleri ile değerlendirilememekte FISH tekniği veya son yıllarda CGH tekniği gibi tekniklerin uygulanması gerekmektedir. CGH tekniğine göre Standart Multicolor FISH tekniğinin bazı dezavantajları bulunmaktadır.

Bu dezavantajlar:

- Daha küçük kromozomal bölgeleri içeren yeniden düzenlenmelerin tespitinde yetersiz kalması,
- Metafaz plaklarının gerekli olmasına karşın metafaz elde edilemeyen olguların analizlerinin interfazda gerçekleştirilmesi,
- İnterfazdaki kromozomal bozukluğun tespitinin güç olması,
- Duplikasyon veya triplikasyon gibi genomik artışların oranını spesifik bir şekilde ortaya çıkaramaması,

olarak sayılabilir ve bu dezavantajlar nedeni ile ayrıca MR düzeyi hafiften ağıra kadar olan olgularda, subtelomerik problemler ile yapılan analizlerde anomali saptama oranı yaklaşık %10 civarında iken özellikle ağır MR'lu olgularda array temelli CGH tekniğinin geliştirilmesi ile genomik yeniden düzenlenmelerin saptama oranı % 20-24'lere kadar çıkarılabildiğinden (Çizelge 2.1), bu çalışmada FISH tekniği yerine ek ileri düzey

inceleme olarak tüm genomun yüksek kararlılıkta analizine olanak sağlayan Array temelli CGH Tekniğinin uygulanması planlanmıştır.

Çizelge 2.1. FISH, Konvensiyonel Sitogenetik ve Array Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH) Tekniği karşılaştırması.

MR düzeyi	Metod	Örnek Sayısı	Yeniden Düzenlenmeler		Saptama Yüzdesi (%)	Referans
			Yapısal	Sayısal		
Hafif – Orta	Subtelomer FISH					
	Multiprobe FISH	182	1		0.5	Knight et al
	Multiprobe FISH	103	1		1.0	Van Karnebeek et al
	Multiprobe FISH	40	4		10.0	Dawson et al
	Çeşitli	4 çalışma	Kaydedilmemiş	Kaydedilmemiş	0.5	Van Karnebeek et al
		44	% 1	% 3		
	Konvensiyonel Sitogenetik					
	Çeşitli	5			0.0	Rossi et al
	400–550 bant düzeyi	200			4.1	Van Karnebeek et al
	Array-CGH	Karşılaştırılmamış			4.1	Rossi et al
Orta – Ağır	Subtelomer FISH					
	Multiprobe FISH	284	21		7.4	Knight et al
	Multiprobe FISH	254	13		5.2	Riegel et al
	Multiprobe FISH	81	0		0.0	Van Karnebeek et al
	Multiprobe FISH	117	12		10.2	Rossi et al
	Çeşitli	4 çalışma	Kaydedilmemiş	Kaydedilmemiş	6.7	Van Karnebeek et al
	Konvensiyonel Sitogenetik					
	Çeşitli	9 çalışma	% 3.8	% 7.8	13.3	Van Karnebeek et al
	Array-CGH					
	1 Mb BAC/PAC array	50	12		24	Shaw-Smith et al
1 Mb BAC/PAC array	20	4		20	Vissers et al	

3. YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmanın materyalini, Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda MR ön tanısıyla incelemeye alınan belirli bir ailenin üyesi olan ve standart sitogenetik analizler ile normal kromozom yapısı saptanan olgular (n=8) ile bunların akrabası olan olgulara (n=12) ve bu 20 olgu ile akrabalığı olmayan biri erkek diğeri kadın (n=2) olguya ait kan örneğinden elde edilmiş DNA örnekleri oluşturdu.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

3.2. Kullanılan Aygıtlar

- Laminar Air Flow
- Zaman ayarlı santrifüj (Heraeus)
- Mikrosantrifüj (Heraeus)
- Işık Floresan Mikroskop (Leica)
- İverted mikroskop (Nikon)
- Hassas terazi (Mettler)
- Vortex
- Deep freze (Bosch)
- Etüv (Nüve)
- Mikropipet (Eppendorf)
- pH metre (Nel pH 890)
- Su Banyosu (Nüve)
- Enjektör
- Cam kalemi
- 365/480 ve 540/550 dalga boyunda floresan mikroskobu filtreleri

3.2.1. Cam Malzeme

- Lam
- Lamel
- Beher
- Mezür
- Şale
- Santrifüj tüpü
- Petri kabı
- Pastör pipeti

3.2.2. Kimyasal Maddeler

3.2.2.1. Standart periferik kan lenfosit kültürü solüsyonları

Karyotyping PB (Peripheral Blood) Medium (Biological Industries) 100 ml

Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin (Biological Industries) 1 ml

-20 °C'de saklanan bu complete medyum kullanımdan önce 37 °C'lik etüvde ısıtıldı.

Kolşemid (Biological Industries)

+4 °C'de buzdolabında saklandı.

Hipotonik Solüsyon (0.075 M KCl)

KCl (Merck) 5.6 g

Distile su 1000 ml

Stok solüsyon olarak hazırlandı ve 37 °C'lik etüvde bekletildi.

Carnoy Fiksativi

Methanol ve Asetik Asit 3:1 (v/v) oranında taze hazırlanıp +4 °C'de buzdolabında saklanarak kullanıldı.

3.2.2.2. GTG bantlama solüsyonları

Giemsa

A+B Fosfat tamponu	95 ml
Giemsa	5 ml

Fosfat Tampon Çözeltisi (0.06 M)

KH ₂ PO ₄ (A)	18.1 g
Na ₂ HPO ₄ (B)	18.96 g

Stok solüsyon olarak hazırlanıp oda ısısında bekletildi.

Tripsin Solüsyonu

% 0.9 NaCl (Merck)	100 ml
Tripsin (1:250)	50 mg

37 °C'lik su banyosunda ısıtılarak kullanıldı.

% 0.9 NaCl Çözeltisi	1000 ml
NaCl (Merck)	9 g
Distile su	1000 ml

Stok solüsyon olarak hazırlanıp oda ısısında bekletildi.

3.2.2.3. FISH solüsyonları

20xSSC (Standart Saline Citrate) Stok Solüsyonu

NaCl (Merck)	175.3 g
Na Sitrat	88.2 g

Distile su ile 1000 ml.'ye tamamlandı ve 5 M'lık HCl ile pH'sı 7.0'a ayarlandı.

4xSSC: (20xSSC'nin 1/5 dilüsyonu)

20 ml 20xSSC + 80 ml distile su

2xSSC: (20xSSC'nin 1/10 dilüsyonu)

10 ml 20xSSC + 90 ml distile su

1xSSC: (20xSSC'nin 1/20 dilüsyonu)

5 ml 20xSSC + 95 ml distile su

Oda ısındaki %70, %90 ve absölü etanol serisi.

Formamide (FA) (Merck)

Yıkama Solüsyonu: %50 FA/1xSSC

Cytocell Hibrizol Solüsyonu: (FA, Dekstran Sülfat, SSC)

Tween 20

Tween 20 stok solüsyonu (%10'luk): 10 ml Tween 20 + 90 ml distile su.

Tween 20 yıkama solüsyonu (1000 ml): 400 ml 2xSSC + 590 ml distile su

+ 10 ml %10'luk Tween 20 stok solüsyonu.

3.2.3. Kullanılan Prob

Çalışmada kullanılması planlanmış olan telomerik prob direkt işaretlenmiş olarak CYTOCELL firmasından alındı.

3.2.4. Kullanılan CGH Dizinleri (Array)

Çalışmamızda kullanılan, gen başına 3 probun yer aldığı, 60 mer'lik problemlerle tüm genomu tarayan tek bir mikrodizin lamı üzerine 12 örnek çiftinin hibridizasyonunun yapılabilirdiği **Human CGH 12x135K Whole-Genome Tiling v3.0**

Array (NimbleGen, Roche) mikrodizini Roche firmasından alındı ve 2 array platformu kullanıldı.

3.2.5. Standart Periferik Kan Lenfosit Kültürü

- Chang Pb medyumundan 5 ml. steril santrifüj tüpüne konuldu.
- Heparinize enjektöre hastanın damarından çekilmiş olan yaklaşık 2 ml. kandan 5 damla bu santrifüj tüpündeki medyuma ilave edildi.
- Tüp sıkıca kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C'lik etüve kaldırıldı.
- Bu kültür 72 saat 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. 67.5'ncü saatte EtBr (50µl) konularak 3 saat 37 °C'lik etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda 2 damla kolşemid (son konsantrasyonu 0.2 g/ml) konularak 1.5 saat daha inkübe edildi.

3.2.6. Kromozom Eldesi

- Bu sürenin sonunda 1200 rpm.'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine vortekslenerek yaklaşık 7 ml. 0.075 M'lık KCl (hipotonik solüsyon) yavaş damlalar halinde konuldu ve 9 dakika sonra tekrar 1200 rpm.'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak yeniden vortekslenerek yavaş damlalar şeklinde fiksatif (3 metanol/ 1 asetik asit) ilave edildi.
- Fiksatif ile yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı ve bu yıkama sonunda yayma aşamasına geçildi.
- Son kez santrifüj edilen tüpün süpernatantı atıldı. 0.5 ml.'lik dip materyali bırakıldı.
- Bu dip materyal pipetle iyice karıştırılıp temizlenmiş lamlara 2-3 damla/lam yayıldı.
- Preparatlar GTG bantlaması yapılmak üzere eskitildi.

3.2.7. GTG Bantlaması

(Seabright, 1972'den modifiye edilmiştir).

- En az 2 gece etüvde bekletilen veya hot-plate'de yüksek ısı derecelerinde daha kısa zamanda esktilen preparatlar, 10 sn.- 40 sn. arasında değişen bir süre tripsin çözeltilinde tutuldu (uygun süreyi ayarlayabilmek için her olguya ait 1 preparat kullanıldı, optimize ettikten sonra geri kalanları da bantlandı).
- Distile su ile yıkandı.
- Giemsa çözeltilinde 5 dk. boyandı.
- İki kere daha distile suda çalkalandı ve kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan preparatlar ışık mikroskobunda kontrol edildi ve bantları aranan özelliklere uygansa (koyu ve açık bantlar çok iyi ayırt ediliyor ve kromozom morfolojisi bozulmamışsa) analizi yapıldı.

3.2.8. Telomerik Probların Kullanımı

Ön İşlem

- Periferik kan lenfosit kültürü ile elde edilen hücreler lamlara yayıldı.
- Faz kontrast mikroskobunda kaliteli ve yeterli metafaz olup olmadığı kontrol edildi.
- Preparat 2xSSC'de oda ısısında 2 dk. bekletildi.
- Oda ısısındaki sırasıyla %70, %90 ve absöü etanol serisinde 2'şer dk. dehidrate edildi ve kurumaya bırakıldı.
- Preparat üzerine 1 µl prob damlatılıp lamel ile kapatıldıktan sonra etrafı yapıştırıcı ile sıkıca kaplandı.

Denatürasyon

- Prob ve hedef DNA 75 °C'de 2 dk. tutularak denatüre edildi.

Hibridizasyon

- Preparat 37 °C'de nemli ve karanlık bir kutu içinde bir gece bekletilerek hibridize edildi.

Hibridizasyon sonrası yıkamalar

- 45 °C'deki su banyosuna 300 ml. %50 FA/ 1xSSC, 80 ml. 1xSSC ve 80 ml. Tween 20 solüsyonu konuldu.

- Lamel etrafındaki yapıştırıcı soyulduktan sonra dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Preparat 5'er dakika 3 defa 100 ml. %50 FA/ 1xSSC'de yıkandı.
- 80 ml. 1xSSC'de 5 dakika yıkandı.
- 45 °C'deki 80 ml. Tween 20 solüsyonunda 5 dakika yıkandıktan sonra 2 defa oda ısısındaki Tween 20 solüsyonunda yıkandı.

Hibrid sinyallerin görüntülenmesi

- Preparat Tween 20 solüsyonundan çıkarıldı.
- Üzerine 10 µl. DAPI-Antifade damlatıldı.
- En az 10 dakika karanlık ve nemli bir kutuda +4 °C'de buzdolabında bekletildi.
- Floresan mikroskopunda preparat taranarak uygun metafazlar otomatik görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.
- Sinyallerin değerlendirilmesi DAPI bantları ile her kromozom çiftinin telomer sinyalleri değerlendirilebilene kadar metafaz sayısı artırıldı.

3.2.9. CGH Dizinleri (Array) Kullanımı

Test (hasta) ve referans örneklerden (Referans DNA olarak piyasada hazır olarak satılan ticari kontrol DNA'sı: kadın, erkek, NCBI Build 36-hg18 kullanıldı.) DNA izolasyonu için taze veya dondurularak saklanan doku veya hücre popülasyonları kullanıldı.

3.2.9.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

1. 10 ml. periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktararak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant atılarak pellet süspanse edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pellet tamamen süspanse edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.

4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm’de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Süpernatantın üzerine 20 ml. etanol eklendi ve DNA’nın toplanması beklendi.
6. DNA alınarak bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1ml % 70’lik etanol konuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı.
7. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu
8. Elde edilen DNA’nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA, pH=8.0) tamponu eklenerek 56°C’de 1 saat bekletilerek +4°C’de muhafaza edildi.

Optimal düzeyde işaretleme ve hibridizasyon için çalışmada kullanılacak genomik DNA’nın saflaştırılmış, parçalanmamış-degrade ve çoğaltılmamış olması gerekmektedir. CGH’de kullanılmak üzere konsantrasyonu 250 ng/µl ila 1,000 ng/µl arasında değişen en az 0,5 µg test edilecek genomik DNA elde edilmeye çalışılmıştır.

3.2.9.2. Saflaştırma

Pürifikasyon işlemi için magnetic bead ve magnetic stand kullanıldı.

1. Thermal cycler’den çıkan örnek üzerine magnetic bead eklendi.
2. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen karışım magnetic stand üzerine alındı.
3. Beadlere bağlanan DNA uygun tamponlar kullanılarak yıkandı ve çözdürüldü.
4. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecek ise örnekler -20°C’de saklandı.

3.2.9.3. DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü

1. Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99 µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.

3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyunda absorpsiyon değerleri okundu
4. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:
5. Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/μl DNA
6. OD 260/280 > 1,8 RNA, < 1,8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

İzole edilen DNA'lar %1 konsantrasyonlu agaroz jelde yürütülerek degradasyon açısından kontrol edildi. Referans DNA olarak piyasada hazır olarak satılan ticari kontrol DNA'sı: kadın, erkek, NCBI Build 36-hg18 kullanıldı.

3.2.9.4. Örneklerin işaretlenmesi

DNA örneklerinin işaretlenmesi NimbleGen Dual Color DNA Labeling (NimbleGen, Roche) işaretleme kiti ile gerçekleştirildi. Test edilecek örnekler kit içeriğindeki Cy5 Random nanomerler kullanılarak işaretlenirken, referans olarak alınacak kontrol örnekleri kit içeriğindeki Cy3 random nanomerler kullanılarak işaretlendi. Cy5 ve Cy3 İşaretleme primerleri β-Mercaptoethanol ve primer tamponu ile çözüldükten sonra küçük bölüntüler halinde kullanılıncaya kadar ışıktan korunaklı bir şekilde -20°C'de saklandı.

- 0,2ml'lik ince cidarlı PCR tüplerinde işaretlenecek test gDNA'dan 0,5μg'ın, 40μl dilue Cy5-Random Nonamers pimerinin, 2 μl işaretleme kontrolünün-1 (Labeling and Hybridization Control-1 LHC-1) ve toplam hacmi 80μl'ye tamamlayacak kadar Nuclease-free suyun kullanıldığı karışım hazırlandı. Benzer şekilde 0,2ml'lik başka bir tüp içinde referans DNA, 40μl dilue Cy3-Random Nonamers pimeri LHC-2 ve suyun kullanıldığı karışım hazırlandı. Örnek işaretleme karışımları termal döngü cihazında 98°C'de 10 dk. denatüre edildikten sonra 10 dk. sulu buz üzerinde soğutuldu.
- Her bir örnek için dNTP / Klenow master karışımı, 10μl- 10mM dNTP Mix, 2μl- Klenow Fragment (3'->5' exo- 50U/μl) 8μl Nuclease-free H₂O kullanılarak total hacim 20μl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım denatüre örneklerin üzerine aktarılarak pipetajla tamamen karıştırıldı.

- Kapağı ısıtılmış termal döngü cihazında 37°C’de 2 saat ışıktan korunaklı bir şekilde inkübe edilen reaksiyon, içeriğinde 0.5M EDTA bulunan Stop Solution (durdurma solüsyonu) ile sona erdirildi.

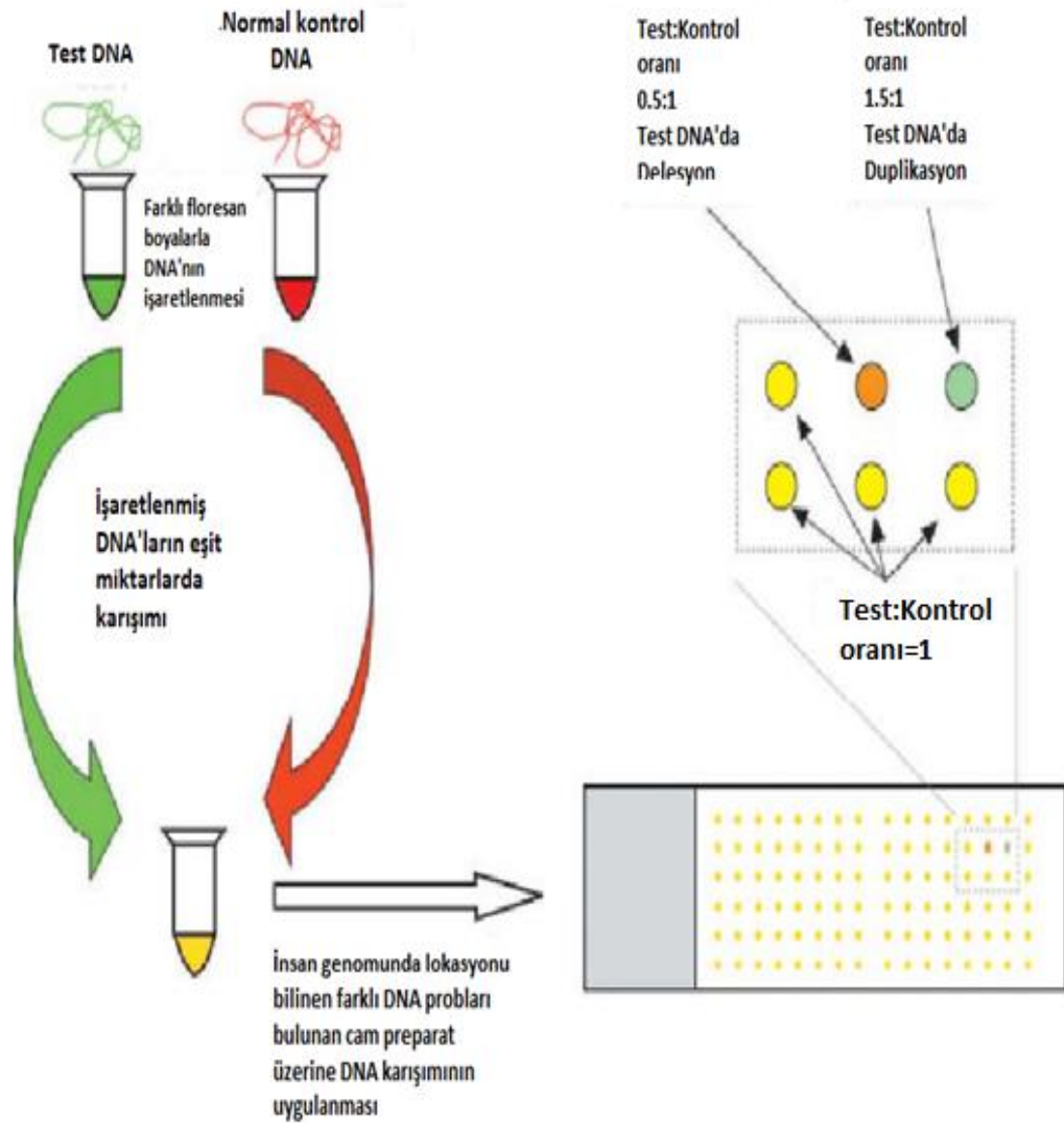
3.2.9.5. İşaretli örneklerin temizlenmesi ve miktarlarının tayin edilmesi

Stop solüsyonu eklenen işaretleme reaksiyon karışımı içerinde 110µl Isopropanol bulunan 1,5ml’lik tüplere aktarıldı. Vorteksenerek karıştırılan tüpler ışıktan korunaklı bir şekilde oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi.

Daha sonra uygulanacak 12,000xg’de 10dk. santrifügasyon sonrası süpernatant atılarak pembe (Cy3) ve mavi (Cy5) peletler, 500µl %80 buz soğukluğundaki etanol eklenerek yıkandı ve 12,000xg’de 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılarak tüp içeriği ışıktan korunaklı bir biçimde SpeedVac sisteminde düşük ısıda 5 dk. kurutuldu. Bu aşamada kurutulan işaretli örnekler -20°C’de bir ay kadar saklanabilmektedir.

Peletler reaksiyon başına 35µl Nuclease-free su (kit içeriğinde yer alan) ile rehidre edildikten sonra miktarları Nanodrop’ta (ThermoScientific) ölçülerek, konsantrasyonu, Konsantrasyon (µg/ml) = A260 x 50 x Dilüsyon Faktörü formülü ile hesaplandı.

Mikrodizine hibridizasyon çalışmalarında kullanılacak olan 20µg (12x135K dizini için) veya 31µg (3x720K dizini için) işaretli test ve referans DNA için gerekli olan hacim hesaplanarak 1,5ml temiz mikrofüj tüplerde birleştirilerek SpeedVac’te düşük ısıda ışıktan korunaklı bir şekilde kurutuldu (Çizim 3.1).



Çizim 3.1. Array-CGH analizi

* Test ve normal referans (hg18) DNA'lar farklı florokrom'larla işaretlenir (çizimde, test yeşil, normal ise kırmızı) ve insan genomunda pozisyonları bilinen DNA klonları içeren bir microarray'le co-hibridizasyona bırakılır. Analiz çözünürlüğü hem DNA klonlarının boyutu hem de klonlar arasındaki boşluk boyutu tarafından belirlenir. En sık kullanılan arrayler genom boyunca 1.000.000 baz çifti aralıklarla ayrılmış 200.000 baz çiftlik 3.000-4.000 klon içerir. Bu klonlanmış parçalar üzerindeki test/normal örneklerin hibridizasyonları arasında gözlenen yoğunluk farklılıkları o pozisyonadaki kopya sayısı varyasyonları (CNV) olarak değerlendirilebilir. Örneğin; eğer test ve kontrol DNA hibridizasyonu eşit ise kırmızı/yeşil florokrom sinyallerinin karışımı sarı renk verecektir. Eğer, test DNA'sı delesyon içeriyor ise kırmızı>yeşil ve bir turuncu sinyal gözlenecektir. Eğer, test DNA'sı duplikasyon içeriyor ise yeşil florokrom kırmızı'dan daha baskın olacaktır. www.burclab.com (2013)'den alınmıştır.

4. BULGULAR

Klinik bulgusu/ ön tanısı çoklu doğumsal anomali ve non-sendromik Mental Retardasyon olan 8 MR'lu olgunun aCGH tekniği ile elde edilen verileri değerlendirildiğinde bu olguların tümünde ortak genomik bir değişimin olduğu tek bir kromozom bölgesi saptanabilmiştir (Çizelge 4.1). X kromozomunun kısa kolunun (p kolu) 11.22 bölgesinde saptanan bu genomik kazanç boyut olarak bireyler arasında farklılık göstermekle beraber ortak bir genomik lokusta yer almaktadır. Çizelge 4.2'de gösterilmiş olan diğer kromozomlardaki, 8 olgudan birinde ya da ikisinde olacak şekilde gözlenen, genomik kazanç ya da kayıplar çalışma gurubumuzdaki ailede 8 olguda da ortak olan fenotipik bulgulara neden olabilecek değişimler olarak değerlendirilmemiştir. Ayrıca, aynı aileden normal fenotipe sahip 3 kadın olguda da aynı genomik lokusta farklı boyutlarda genomik kazanç gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Klinik bulgusu/ön tanısı Multiple konjenital anomali ve Mental Retardasyon (Non-sendromik) olan 8 hastadan aCGH tekniği ile elde edilen veriler.

Kromozom No	Aberasyon	Başlangıç	Bitiş	Boyut (bp)	Aberasyon içerisinde yer alan OMIM Genleri	Aberasyon içerisinde yer alan Sendrom Bölgesi	Aberasyonun görüldüğü hasta sayısı ve yüzdesi
1	dup(1)(p32.2)	56700310	56830858	130,548	-	-	1(%12,5)
1	dup(1)(p36.33)	37196	614850	577,654	PPAP2B	-	2(%12,5)
1	del(1)(p36.11)	25458061	25616507	158,446	CTPP, CPP, CTPA	1p36.11 Delesyon Sendromu	2(%25)
1	del(1)(q41)	213505520	213903422	397,902	USH2A	-	1(%12,5)
2	dup(2)(q21.1)	130881189	131081360	200,171	CFC1	-	1(%12,5)
2	del(2)(p14)	66043428	66081566	38,138	-	-	1(%12,5)
3	dup(3)(p26.1)	6519627	7163365	643,738	GRM7	-	1(%12,5)

Kromozom- No ^a	Aberasyon ^a	Başlangıç ^a	Bitiş ^a	Boyut- (bp) ^a	Aberasyon- içerisinde- yeralan- OMIM- Genleri ^a	Aberasyon- içerisinde- yeralan- Sendrom- Bölgesi ^a	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi ^a
4 ^a	del(4)(p15.31) ^a	22514006 [¶]	22648842 [¶]	134,836 [¶]	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
4 ^a	del(4)(p16.1) [¶]	10349474 [¶]	10559596 [¶]	210,122 [¶]	- ^a	Wolf- Hirschorn- Sendromu ^a	1(%12,5) ^a
5 ^a	dup(5)(q13.2) ^a	68833995 [¶]	70704817 [¶]	1870822 [¶]	NAIP ^a	- ^a	3(%37,5) ^a
		68897382 [¶]	70690787 [¶]	1793405 [¶]	- ^a	- ^a	
		68964999 ^a	70784999 ^a	1820000 ^a	- ^a	- ^a	
5 ^a	del(5)(q14.2) ^a	82575452 [¶]	82731992 [¶]	156,540 [¶]	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
6 ^a	dup(6)(p25.2) ^a	3520777 [¶]	3739331 [¶]	218,554 [¶]	PXDC1 ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
6 ^a	dup(6)(p21.2) ^a	40472801 [¶]	40494553 [¶]	21752 [¶]	LRFN2 ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
6 ^a	del(6)(c24.3) ^a	148854675 [¶]	148888231 [¶]	33556 [¶]	SASH1 ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
6 ^a	del(6)(c)(26) ^a	162877339 [¶]	162997592 [¶]	120253 [¶]	PARK2 ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
7 ^a	dup(7)(p11.2) ^a	55590587 [¶]	55762056 [¶]	171469 [¶]	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
7 ^a	dup(7)(p22.1) ^a	5217258 [¶]	5504097 [¶]	286839 [¶]	FBXL18 ^a	- ^a	2(%25) ^a
		5217258 [¶]	6185297 [¶]	968039 [¶]	WIPI2 ^a	- ^a	
7 ^a	dup(7)(p22.3) ^a	130978 [¶]	164965 [¶]	33987 [¶]	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
7 [¶]	dup(7)(q22.1) [¶]	101949835 [¶]	102125708 [¶]	175873 [¶]	- ^a	- ^a	2(%25) ^a
		101815666 ^a	102125708 ^a	310042 ^a	CAMK2B ^a	- ^a	

Kromozom- No ^a	Aberasyon ^a	Başlangıç ^a	Bitiş ^a	Boyut- (bp) ^a	Aberasyon- içerisinde- yeralan- OMIM- Genleri ^a	Aberasyon- içerisinde- yeralan- Sendrom- Bölgesi ^a	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi ^a
7 ^a	dup(7)(q35) ^a	143528314 ^a	143705113 ^a	176799 ^a	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
7 ^a	del(7)(q22.1) ^a	101904918 ^a	102064180 ^a	159262 ^a	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
8 ^a	dup(8)(p23.1) ^a	7214999 ^a	8124999 ^a	910000 ^a	- ^a	- ^a	3(%37,5) ^a
		7217188 ^a	7884934 ^a	667746 ^a	- ^a	- ^a	
		7228101 ^a	8168054 ^a	939953 ^a	- ^a	- ^a	
8 ^a	del(8)(p23.1) ^a	7192514 ^a	7821154 ^a	628640 ^a	HE2 ^a	- ^a	2(%25) ^a
		7228101 ^a	7884934 ^a	656833 ^a	- ^a	- ^a	
9 ^a	dup(9)(p13.1-q13) ^a	39194999 ^a	70134999 ^a	30940000 ^a	- ^a	Perisentrik inv(9) ^a	1(%12,5) ^a
9 ^a	dup(9)(p13.1-p12) ^a	40095541 ^a	40204377 ^a	108836 ^a	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
9 ^a	dup(9)(p11.2-p11.1) ^a	46247098 ^a	46834555 ^a	587457 ^a	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
9 ^a	dup(9)(q12-q13) ^a	68390533 ^a	70202700 ^a	1812167 ^a	CBWD6 ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
10 ^a	dup(10)(q11.21- q11.22) ^a	46089618 ^a	46842787 ^a	753169 ^a	- ^a	- ^a	1(%12,5) ^a
10 ^a	dup(10)(q11.22) ^a	46125139 ^a	46842787 ^a	717648 ^a	FAM35B2- BMS1P5 ^a	- ^a	4(%50) ^a
		46215614 ^a	47878153 ^a	1662539 ^a	FA21B ^a	- ^a	
		48447477 ^a	48610072 ^a	162595 ^a	- ^a	- ^a	
		49065036 ^a	49180991 ^a	115955 ^a	FRMPD2 ^a	- ^a	

Kromozom- No	Aberasyon	Başlangıç	Bitiş	Boyut- (bp)	Aberasyon- içerisinde- yeralan- OMIM- Genleri	Aberasyon- içerisinde- yeralan- Sendrom- Bölgesi	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi
10	dup(10)(q22.3)	80944577	81612940	668363	-	-	3(%37,5)
		81054999	81574999	520000	-	-	
		81148306	81612940	464634	-	-	
10	dup(10)(q23.2)	88724444	89248990	524546	FAM35A	-	3(%37,5)
		88724444	89251878	527434	-	-	
		88831891	89248990	417099	-	-	
10	del(10)(p11.23)	30772578	30826842	54264	MAP3K8	Alzheimer- Disease	1(%12,5)
10	del(10)(q11.21)	46003461	46093737	90276	-	-	1(%12,5)
10	del(10)(q11.22)	48376006	48555199	179193	-	-	4(%50)
		48652320	49059131	406811	-	-	
		48305970	48555199	249229	-	-	
		48626079	49059131	433052	-	-	
10	del(10)(q21.3)	69202639	69968478	765839	MYPN	Alzheimer- Disease	1(%12,5)
10	del(10)(q24.2)	100266260	100445146	178886	HPSE2	Alzheimer- Disease	1(%12,5)
10	del(10)(q24.33)	104990064	105360675	370611	PDCD11	-	1(%12,5)
11	dup(11)(p15.5)	171667	941685	770018	TALDO1	-	1(%12,5)

Kromozom- No ^a	Aberasyon ^a	Başlangıç ^a	Bitiş ^a	Boyut- (bp) ^a	Aberasyon- içerisinde- yer alan- OMIM- Genleri ^a	Aberasyon- içerisinde- yer alan- Sendrom- Bölgesi ^a	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi ^a
11 ^a	dup(11)(p11.2) ^a	45482912 ^a	45729088 ^a	246176 ^a	CHST1 ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
12 ^a	dup(12)(p13.33) ^a	33393 ^a	219292 ^a	185899 ^a	SLC6A12 ^a	Astrocytom a ^a	1(%12.5) ^a
12 ^a	dup(12)(q14.1) ^a	56876213 ^a	57124161 ^a	247948 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
12 ^a	dup(12)(q24.11) ^a	108512463 ^a	108817868 ^a	305405 ^a	C12orf34 ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
12 ^a	del(12)(q13.13) ^a	51834791 ^a	52213748 ^a	378957 ^a	C12orf10 ^a	Vitiligo ^a	1(%12.5) ^a
13 ^a	dup(13)(q32.1) ^a	93883450 ^a	94061940 ^a	178490 ^a	TGDS ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
13 ^a	del(13)(q21.31) ^a	62031515 ^a	62791450 ^a	759935 ^a	- ^a	- ^a	2(%25) ^a
		62031515 ^a	62639779 ^a	608264 ^a	- ^a	- ^a	
14 ^a	dup(14)(q11.1-q11.2) ^a	18407780 ^a	19124606 ^a	716626 ^a	POTEG ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
14 ^a	del(14)(q11.1-11.2) ^a	18407780 ^a	19359937 ^a	952157 ^a	POTEG ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
14 ^a	del(14)(q11.2) ^a	21646729 ^a	22029109 ^a	382380 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
14 ^a	del(14)(q31.3) ^a	85263503 ^a	85538405 ^a	274902 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
14 ^a	del(14)(q32.33) ^a	105357167 ^a	106342076 ^a	984909 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
15 ^a	dup(15)(q11.1-q11.2) ^a	18394999 ^a	21124999 ^a	2730000 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
15 ^a	dup(15)(q23) ^a	66104926 ^a	66421276 ^a	316350 ^a	ITGA11 ^a	- ^a	1(%12.5) ^a
16 ^a	dup(16)(p11.2) ^a	31888699 ^a	33475311 ^a	1586612 ^a	- ^a	- ^a	1(%12.5) ^a

Kromozom- No	Aberasyon	Başlangıç	Bitiş	Boyut- (bp)	Aberasyon- içerisinde- yer alan- OMIM- Genleri	Aberasyon- içerisinde- yer alan- Sendrom- Bölgesi	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi
16	dup(16)(q12.1)	45600079	45984377	384298	ITFG1	-	1(% 12.5)
16	dup(16)(q12.2)	52896387	53023484	127097	-	-	1(% 12.5)
17	dup17(p11.2)	18881245	19054809	173564	-	-	3(% 37.5)
17	dup(17)(q21.2-q21.31)	37114999	37894999	780000	-	-	1(% 12.5)
17	dup(17)(q21.31- q21.32)-	41755952	42121258	365306	-	-	4(% 50)
		41709705	42121258	411553	NSF	-	
		41541432	42121258	579826	-	-	
		41561663	42179460	617797	-	-	
18	dup(18)(q21.1)	44354016	44544076	190060	KIAA0427- (CTIF)	-	1(% 12.5)
18	dup(18)(q22.1)	60005605	60571669	566064	-	-	1(% 12.5)
18	dup(18)(q22.3)	67404999	67924999	520000	-	-	1(% 12.5)
19	dup(19)(p13.11)	19423483	19606128	182645	GATAD2A	-	1(% 12.5)
19	dup(19)(q13.13-q13.2)	43340963	43810785	469822	RASGRP4	-	1(% 12.5)
19	dup(19)(q13.43)	62037657	62260210	222553	EF110915	-	1(% 12.5)
22	dup(22)(q11.21)	19660346	20277400	617054	HIC2-C2H2	Cat-eye- Sendromu	2(% 25)
		18752218	18961060	208842	-	-	

Kromozom No	Aberasyon	Başlangıç	Bitiş	Boyut (bp)	Aberasyon içerisinde yer alan OMIM Genleri	Aberasyon içerisinde yer alan Sendrom Bölgesi	Aberasyonun görüldüğü hasta sayısı ve yüzdesi
X	dup(X)(p11.22)	52210273	52745818	535545	XAGE1D-A-E-B-C	-	8(%100)
		52210273	52282612	72339	XAGE1D-A-E-B-C		
		52512174	52565054	52880	XAGE1D-A-E-B-C		
		52251163	52745818	494655	XAGE1D-A-E-B-C		
		52529643	52568478	38835	XAGE1D-A-E-B-C		
		52194999	52714999	520000	XAGE1D-A-E-B-C		
		52251163	52282612	31449	XAGE1D-A-E-B-C		
		52529643	52565054	35411	XAGE1D-A-E-B-C		
X	del(X)(p22.33)	324098	404661	80563	PPP2R3B	-	4(%50)
		3759962	3863418	103456	PRKX	-	
		3761569	3928516	166947	PRKX	-	
		3759962	3863418	103456	PRKX	-	
X	del(X)(q21.33)	94964999	95744999	780000	-	-	1(%12.5)
X	del(X)(q22.3)	104318292	104857310	539018	IL1RAFL2	X'e bağlı MR	1(%12.5)
X	del(X)(q26.3)	134682758	134857720	174962	CT45A2	Testis CA	2(%25)
X	del(X)(q27.1)	139914065	139975204	61139	-	-	1(%12.5)

Kromozom- No	Aberasyon	Başlangıç	Bitiş	Boyut- (bp)	Aberasyon- içerisinde- yer alan- OMIM- Genleri	Aberasyon- içerisinde- yer alan- Sendrom- Bölgesi	Aberasyonun- görüldüğü- hasta sayısı- ve yüzdesi
Y	dup(Y)(q11.22-q12)	21935342	57695831	35760489	DAZ3	-	2(%25)
		21904999	57642915	35737916	TSPY4, CDY1B	-	
Y	del(Y)(p11.32)	327016	397557	70541	-	-	1(%12.5)

Çizelge 4.1’de 8 hastadan aCGH tekniği ile elde edilen verilere göre;

3 olguda gözlenen 5. kromozomun q13.2 bölgesindeki duplikasyon bu olgulardan sadece 1 tanesinde OMİM genlerinden *NAIP* (nöronal apoptozis inhibitör protein) genini içermekte ancak geri kalan 2 olguda aberasyon bölgesi içinde gen bulunmamaktadır. 3 olguda gösterilen 8. kromozomun p23.1 bölgesindeki duplikasyon bölgesi içinde gen bulunmamaktadır. Olgulardan 4’ünde 10. kromozomun q11.22 bölgesindeki duplikasyon gözlenen aberasyon aralığında olgulardan 1’inde *FAM35B2* (*family with sequence similarity 35 member D*), bir diğer olguda da hücre polarizasyonunun sağlanması ve korunmasında görevli olan *FRMPD2* (*FERM and PDZ domain containing 2*) geni bulunmaktadır. Olgulardan 3’ünde gözlenen 10. kromozomun q22.3 bölgesindeki duplikasyonun bulunduğu aberasyon aralığında gen bulunmamaktadır. 3 olguda duplikasyon gözlenen 10. kromozomun q23.2 bölgesinde, olgulardan birinde *FAM35A* (*family with sequence similarity 35 member A*) geni bulunmaktadır. 10. kromozomun q11.22 bölgesinde delesyon gözlenen 4 olguda aberasyon aralığında gen bulunmamaktadır. 17. kromozomun p11.2 bölgesinde duplikasyon gözlenen 3 olguda aberasyon aralığında gen bulunmamaktadır. 17. kromozomun q21.31-q21.32 bölgesinde duplikasyon gözlenen 4 olgudan 1’inde aberasyon aralığında plazma membranı ile veziküller arasında füzyonu sağlayan faktör geni olan *NSF* (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) geni bulunmaktadır. X kromozomu p22.33 bölgesinde delesyon saptanan 4 olguda ise aberasyon aralığında gen bulunmamaktadır. Oysa, ağır MR’lu 8 olgunun hepsinde duplikasyon gözlenen X

kromozomu p11.22 bölgesinde aberasyon aralığında *XAGE* (*X antijen ailesi*) multigen ailesi (Çizelge 4.2) yer almaktadır.

Çizelge 4.2. X kromozomunun p11.21 ve p11.22 bölgelerinde yer alan **a.** bilinen genler ve genomik varyantlar, **b.** genomik varyantlar.

a.

Database of Genomic Variants (human genome build 36)

Variation Locus - Human Genome Assembly Build 36 (hg18)

Filter: On
Go page: 9 <<First <Previous Next> End>> 50 records per page Record: 401 to 450 (Total: 1171)

#	Locus	Landmark	VariationID	Variation Type	Cytoband	Position (Mb)	Known Genes in the Locus
426	chrX:52248021-52284085	chrX:52,249,115-52,262,084	Variation_106623	CopyNumber	Xp11.22	52.2	XAGE1D XAGE1B XAGE1A XAGE1C XAGE1E
		chrX:52,270,822-52,282,733	Variation_106625	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
		chrX:52,249,031-52,283,521	Variation_67978	CopyNumber	Xp11.22	52.2	
		chrX:52,248,021-52,261,447	Variation_83522	CopyNumber	Xp11.22	52.2	
		chrX:52,256,515-52,261,447	Variation_83523	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
		chrX:52,270,512-52,284,085	Variation_83524	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
		chrX:52,248,021-52,261,447	Variation_96684	CopyNumber	Xp11.22	52.2	
		chrX:52,252,679-52,255,967	Variation_96685	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
		chrX:52,270,512-52,284,085	Variation_96686	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
		chrX:52,270,512-52,276,052	Variation_96687	CopyNumber	Xp11.22	52.3	
427	chrX:52520902-52570049	chrX:52,521,897-52,534,868	Variation_106626	CopyNumber	Xp11.22	52.5	XAGE1D XAGE1B XAGE1A XAGE1C XAGE1E
		chrX:52,543,707-52,568,599	Variation_106627	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
		chrX:52,521,897-52,569,823	Variation_73976	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
		chrX:52,521,971-52,535,044	Variation_73977	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
		chrX:52,520,902-52,535,376	Variation_83525	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
		chrX:52,543,491-52,570,049	Variation_83526	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
		chrX:52,520,902-52,535,376	Variation_96688	CopyNumber	Xp11.22	52.5	
428	chrX:52534857-52596558	chrX:52,534,857-52,596,558	Variation_37381	Inversion	Xp11.22	52.5	XAGE1D XAGE1B XAGE1A XAGE1C XAGE1E
429	chrX:52626586-52626586	chrX:52,626,586-52,626,586	Variation_29329	InDel	Xp11.22	52.6	
430	chrX:52640433-52848159	chrX:52,640,433-52,848,159	Variation_73978	CopyNumber	Xp11.22	52.6	SSX7 SSX8 SPANXN5 SSX2 SSX2B
		chrX:52,642,888-52,841,681	Variation_83527	CopyNumber	Xp11.22	52.6	
		chrX:52,642,888-52,841,681	Variation_96690	CopyNumber	Xp11.22	52.6	
		chrX:52,764,659-52,788,940	Variation_96691	CopyNumber	Xp11.22	52.8	
431	chrX:52722461-52867671	chrX:52,722,461-52,867,671	Variation_37382	Inversion	Xp11.22	52.7	XAGE5 SPANXN5 SSX2 SSX2B
432	chrX:52907733-55696471	chrX:54,912,614-54,918,281	Variation_105896	CopyNumber	Xp11.21	54.9	GPR173 MAGEH1 XAGE3 ALAS2 GNL3L PAGE2 HSD17B10 MTRNR2L10 TSPYL2 PFKFB1 MIRLET7F2 MAGED2 FAM156A TRC FOXR2 FGD1 FAM156B MR38 SMC1A USP51 WNK3 SNORA11 KDM5C FAM104B PAGE5 PAGE3 FAM120C IQSEC2 ITHSL PHF8 PAGE2B TSR2 RIBC1 APEX2 HUWE1
		chrX:53,119,495-53,121,708	Variation_107526	CopyNumber	Xp11.22	53.1	
		chrX:54,933,141-54,933,874	Variation_107527	CopyNumber	Xp11.21	54.9	
		chrX:55,693,939-55,695,679	Variation_107528	CopyNumber	Xp11.21	55.7	
		chrX:53,187,556-53,189,240	Variation_107661	CopyNumber	Xp11.22	53.2	
		chrX:53,555,788-53,565,299	Variation_107976	CopyNumber	Xp11.22	53.6	
		chrX:53,494,342-53,508,866	Variation_22864	CopyNumber	Xp11.22	53.5	
		chrX:52,907,733-55,696,471	Variation_23256	CopyNumber	Xp11.21	52.9	
		chrX:55,695,684-55,695,684	Variation_23921	CopyNumber	Xp11.22	55.7	
		chrX:53,778,100-53,799,504	Variation_37046	CopyNumber	Xp11.21	53.8	
		chrX:55,599,861-55,633,913	Variation_37047	CopyNumber	Xp11.22	55.6	
		chrX:55,194,770-55,203,194	Variation_43647	CopyNumber	Xp11.21	55.2	
		chrX:55,189,375-55,202,288	Variation_44414	CopyNumber	Xp11.21	55.2	
		chrX:55,189,409-55,202,319	Variation_44415	CopyNumber	Xp11.21	55.2	
		chrX:55,189,437-55,204,289	Variation_44416	CopyNumber	Xp11.21	55.2	
		chrX:54,612,976-54,646,399	Variation_53007	CopyNumber	Xp11.21	54.6	
		chrX:55,202,320-55,204,330	Variation_62973	CopyNumber	Xp11.22	55.2	
		chrX:55,189,296-55,202,382	Variation_63100	CopyNumber	Xp11.21	55.2	
		chrX:53,789,028-53,794,761	Variation_67979	CopyNumber	Xp11.21	53.8	
		chrX:53,100,475-53,102,585	Variation_73979	CopyNumber	Xp11.22	53.1	
		chrX:53,496,324-53,507,947	Variation_73981	CopyNumber	Xp11.22	53.5	
		chrX:53,557,054-53,564,913	Variation_73983	CopyNumber	Xp11.22	53.6	
		chrX:55,103,478-55,138,630	Variation_73984	CopyNumber	Xp11.22	55.1	
		chrX:53,122,671-53,125,170	Variation_83528	CopyNumber	Xp11.21	53.1	
		chrX:55,116,992-55,136,713	Variation_83529	CopyNumber	Xp11.22	55.1	
		chrX:55,131,160-55,136,713	Variation_83530	CopyNumber	Xp11.21	55.1	
		chrX:55,133,624-55,136,713	Variation_83531	CopyNumber	Xp11.21	55.1	
		chrX:52,939,558-52,962,090	Variation_96692	CopyNumber	Xp11.21	52.9	
		chrX:53,122,671-53,125,170	Variation_96693	CopyNumber	Xp11.22	53.1	
		chrX:53,122,671-53,123,691	Variation_96694	CopyNumber	Xp11.22	53.1	
		chrX:53,123,538-53,124,609	Variation_96695	CopyNumber	Xp11.22	53.1	
		chrX:53,470,032-53,482,478	Variation_96696	CopyNumber	Xp11.22	53.5	
		chrX:53,495,806-53,507,374	Variation_96699	CopyNumber	Xp11.22	53.5	
		chrX:55,116,992-55,139,168	Variation_96700	CopyNumber	Xp11.22	55.1	
		chrX:55,133,008-55,136,088	Variation_96701	CopyNumber	Xp11.21	55.1	

b.

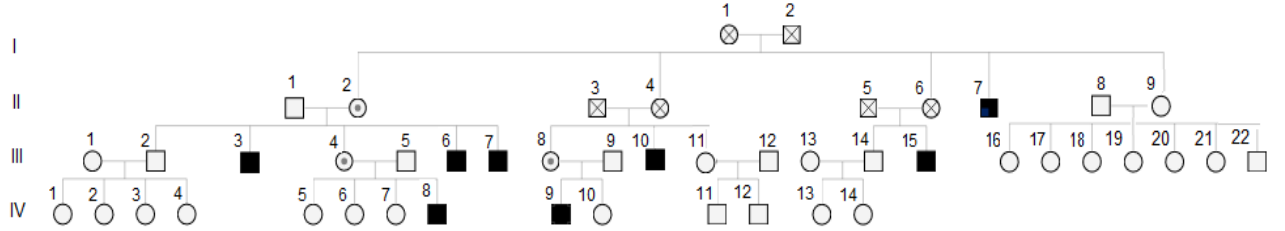


XAGE 1A-B-C-D ve E genler, GAGE ailesine üye genlerdir.

OLGU 1 (AF.G.) (III-7)

50 yaşındaki erkek olgu, olgu 2 (II-7)'nin yeğeni olup Olgu 2 (II-7), Olgu 1'in dayısıdır. Olgu 1, olgu 3 (III-6) ve olgu 8 (III-3) ile kardeştir.

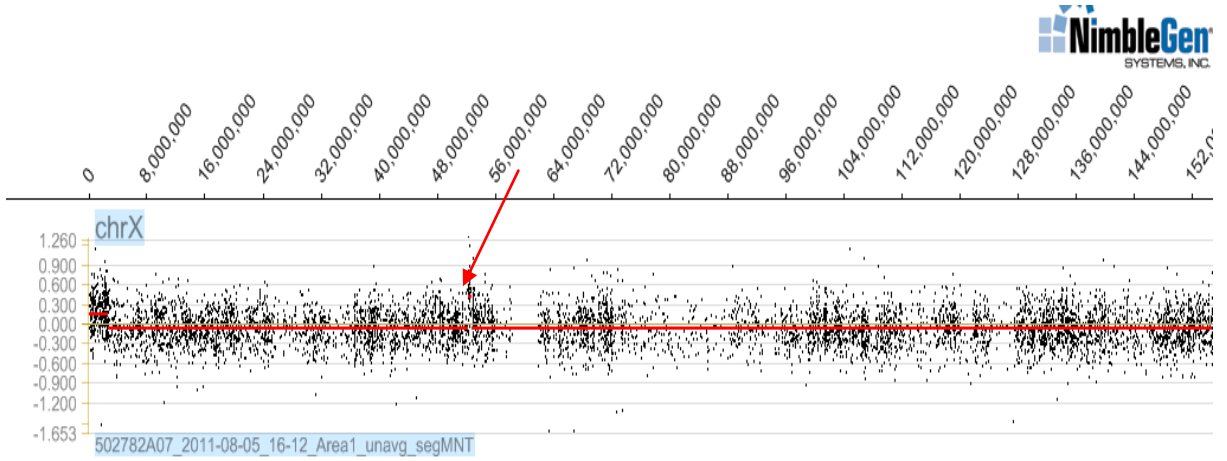
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

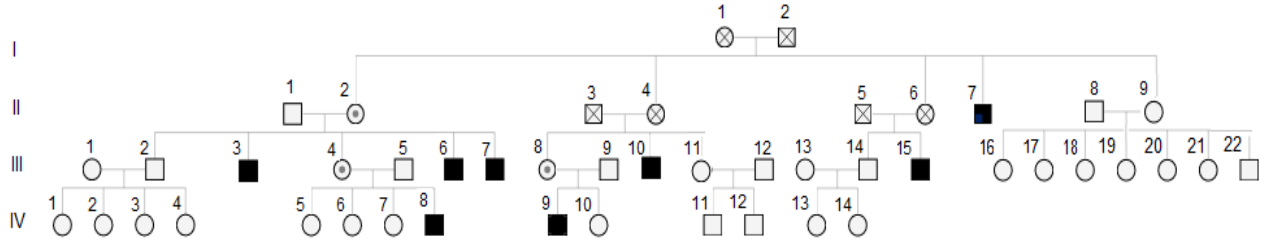
Çizim 4.1. Olgu 1'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı

Olgu 1'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52210273 ve aberasyon bitiş 52745818 aralığında 535545 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

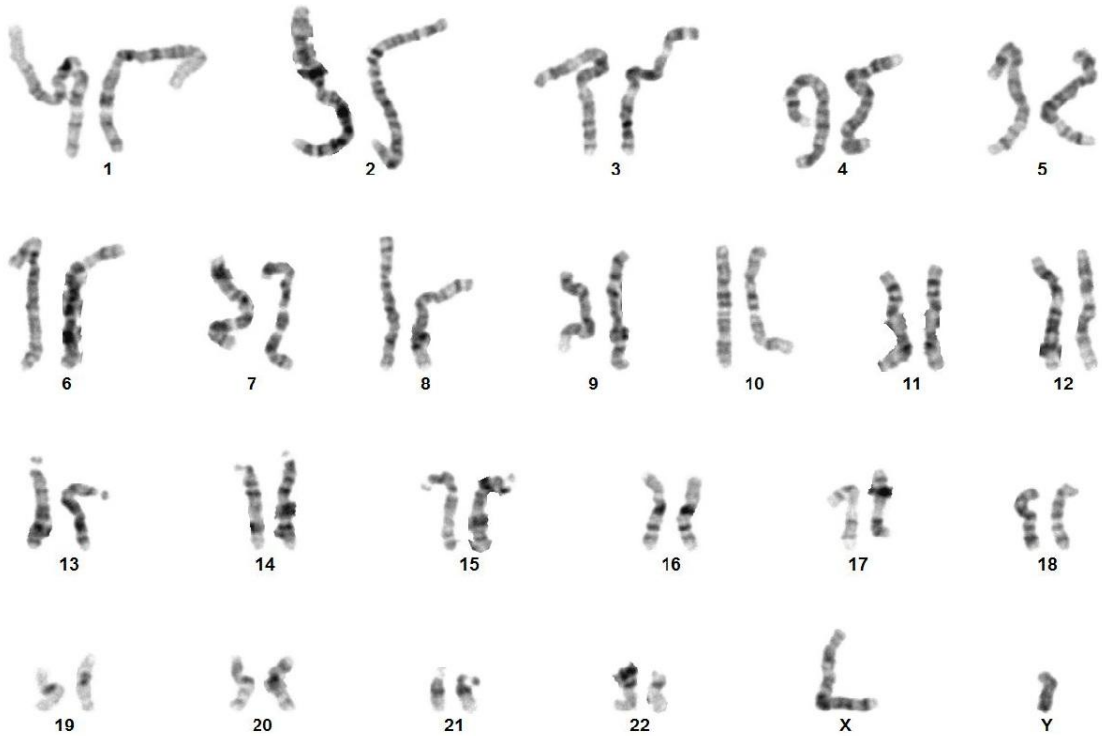
OLGU 2 (K.S.) (II-7)

65 yaşındaki erkek olgu, ailede mental retardasyon ve çoklu doğumsal anomalilerin ilk görüldüğü olgudur. Olgu 2, olgu 1(III-7), 3 (III-6) ve 8 (III-3)'in dayısıdır.

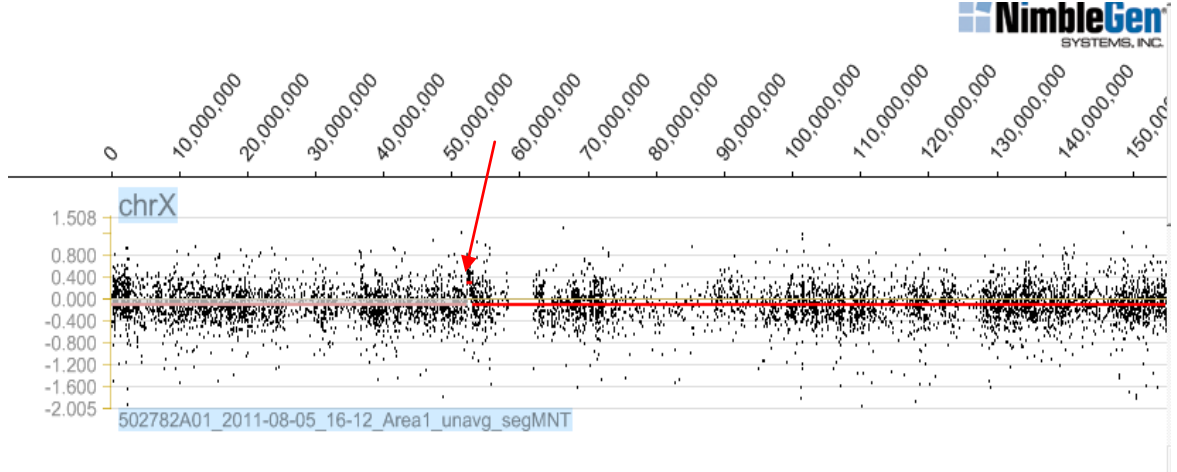
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

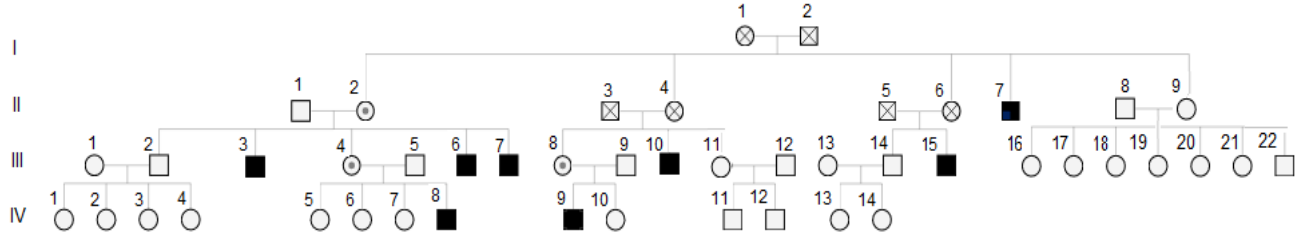
Çizim 4.2. Olgu 2'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı

Olgu 2'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52210273 ve aberasyon bitiş 52282612 aralığında 72339 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

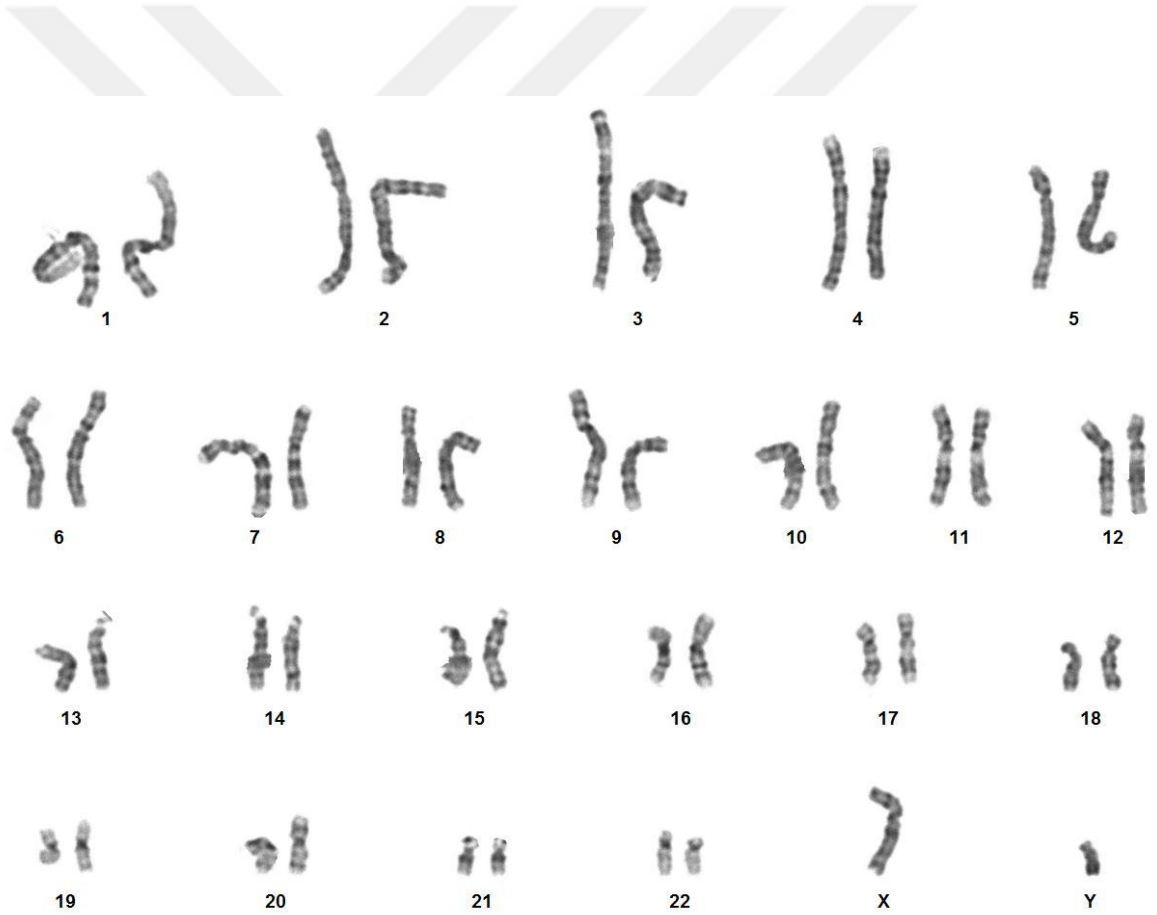
OLGU 3 (L.G.) (III-6)

48 yaşındaki erkek olgu, olgu 2'nin yeğeni olup Olgu 2 (II-7), Olgu 3'ün dayısıdır. Olgu 3, olgu 1(III-7) ve olgu 8 (III-3) ile kardeştir.

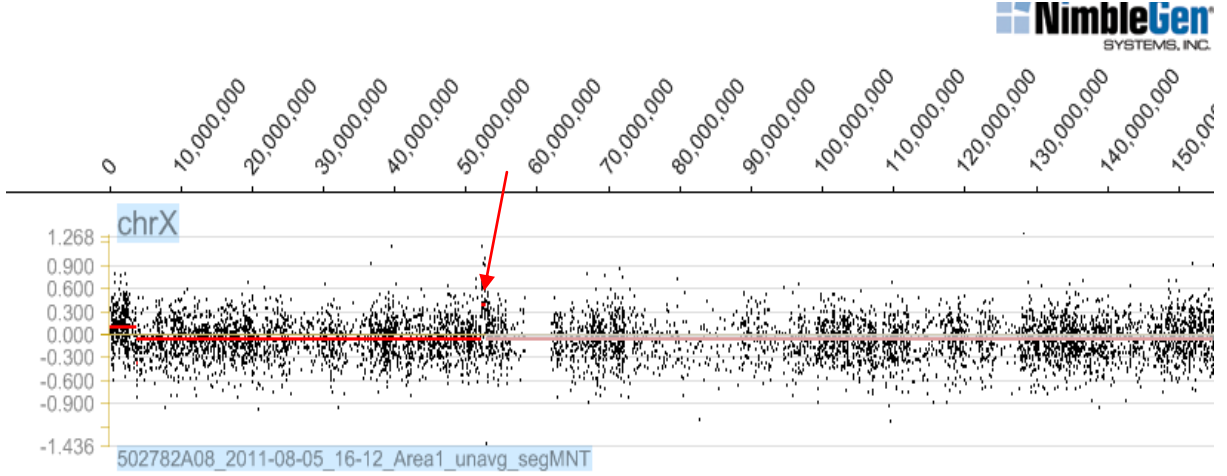
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

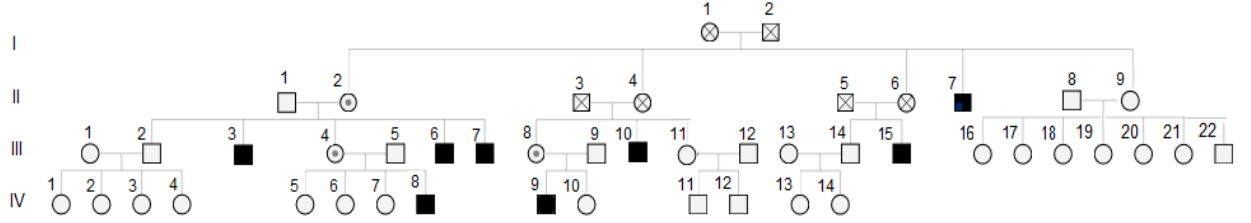
Çizim 4.3. Olgu 3'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı

Olgu 3'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52512174 ve aberasyon bitiş 52565054 aralığında 52880 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

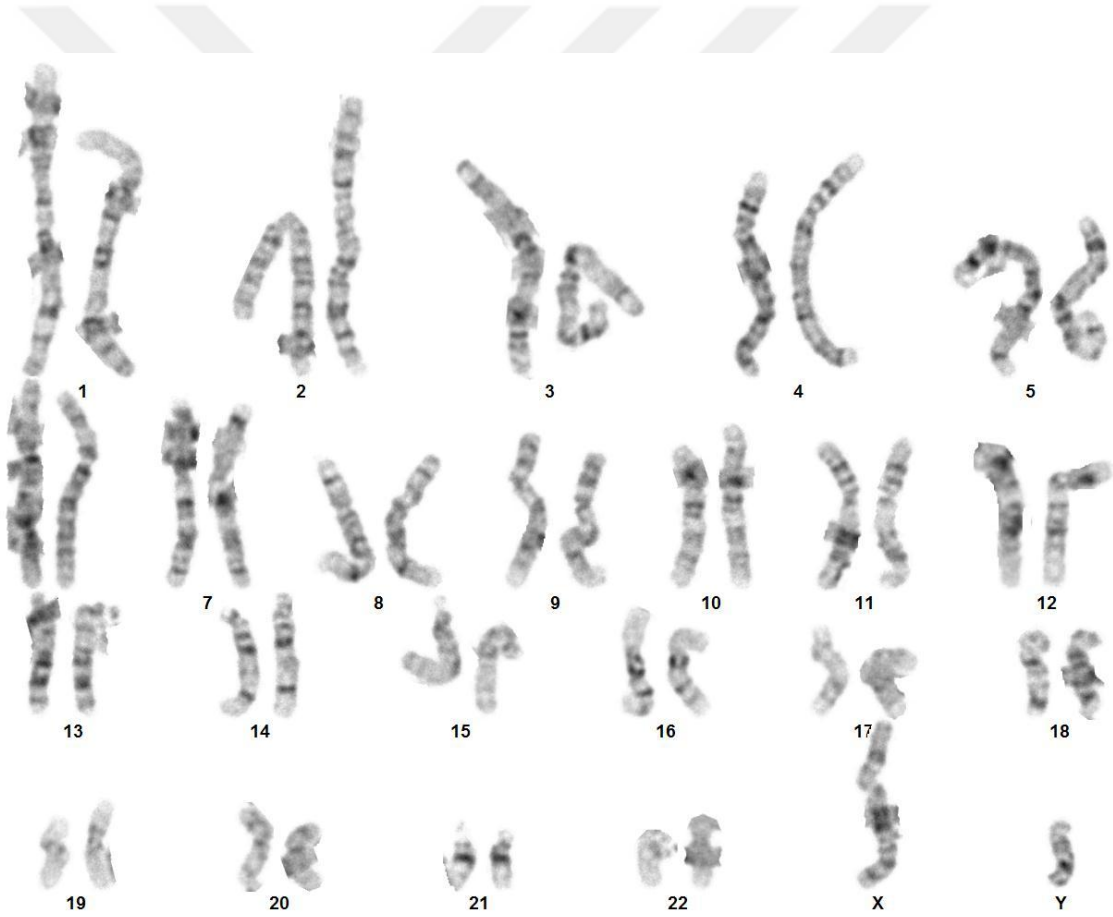
OLGU 4 (H.Y.) (IV-8)

17 yaşındaki erkek olgu, olgu 1 (III-7), 3 (III-6) ve 8 (III-3)'ün yeğeni olup Olgu 1(III-7),3 (III-6) ve 8 (III-3) Olgu 4'ün dayısıdır.

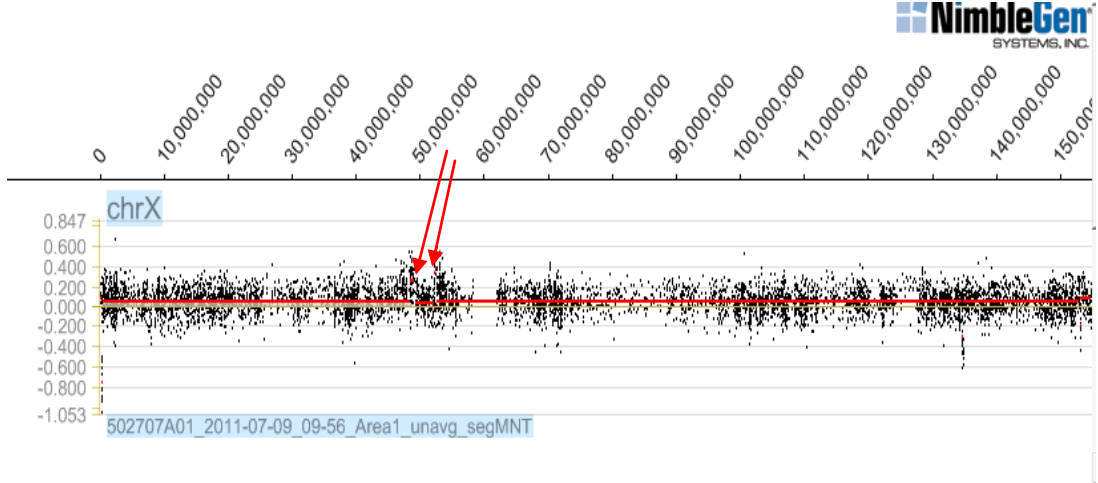
a.



b.



c.



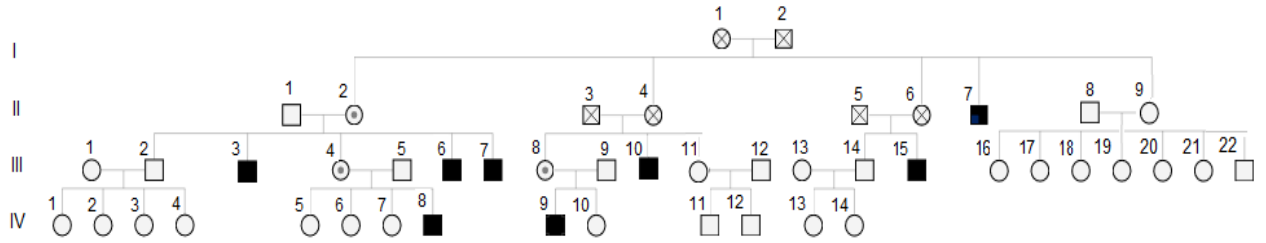
- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

Çizim 4.4. Olgu 4'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı
Olgu 4'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52251163 ve aberasyon bitiş 52745818 aralığında 494655 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

OLGU 5 (M.P.) (IV-9)

21 yaşındaki erkek olgu, olgu 6 (III-10)'nın yeğeni olup Olgu 6 (III-10), Olgu 5'in dayısıdır.

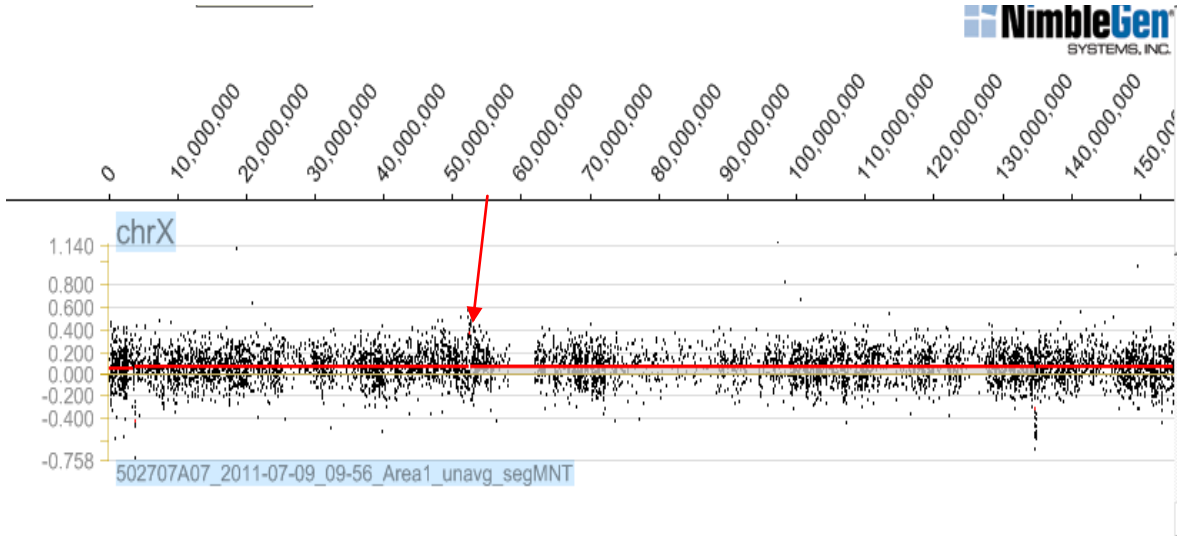
a.



b.



c.



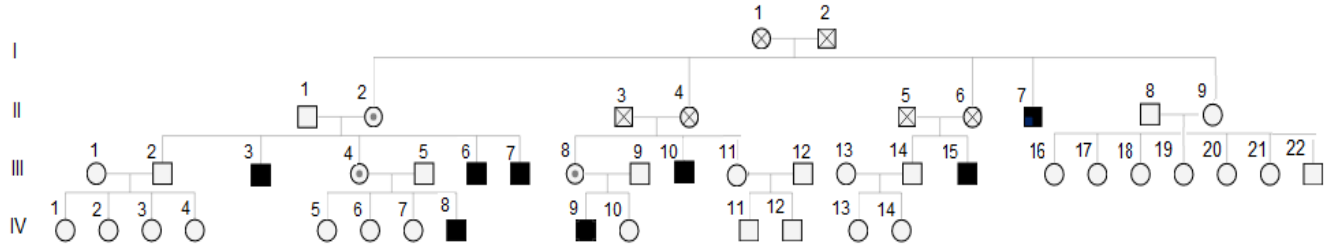
- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

Çizim 4.5. Olgu 5'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı
Olgu 5'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52529643 ve aberasyon bitiş 52568478 aralığında 38835 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamasıyla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

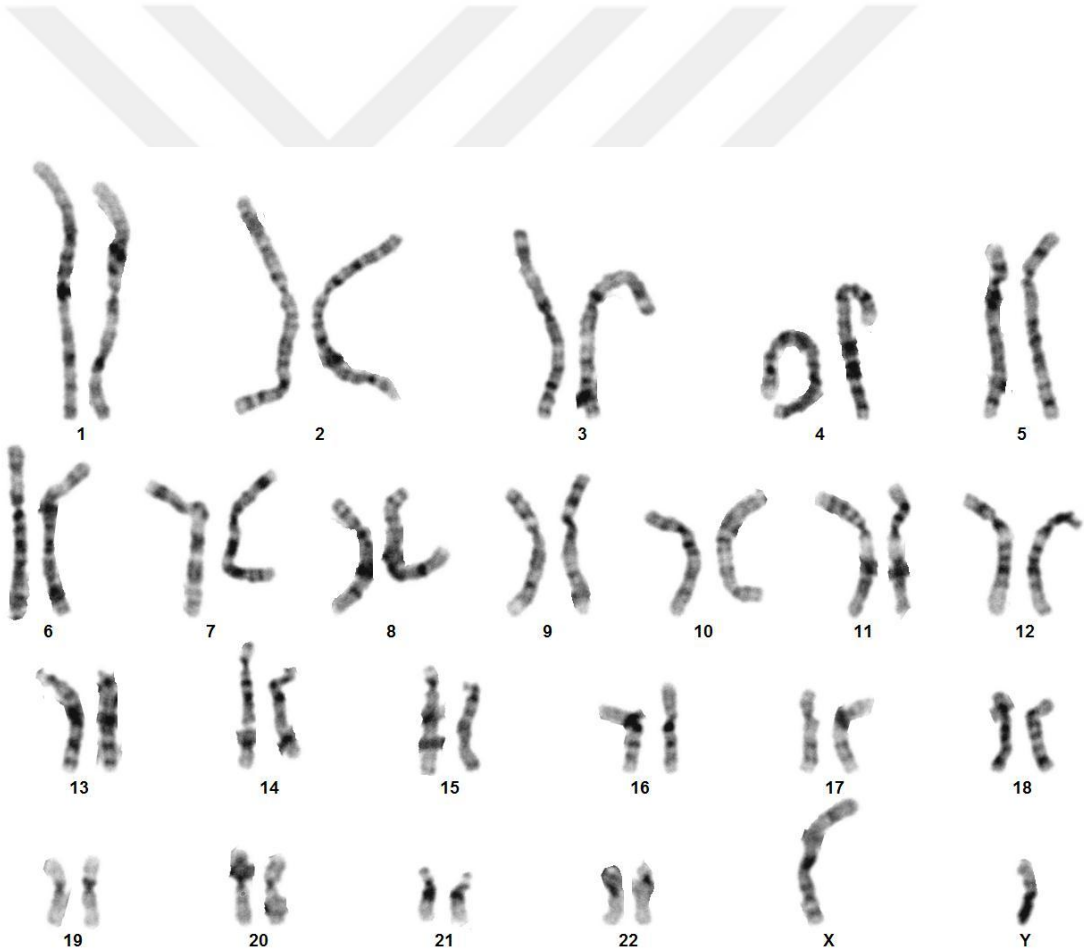
OLGU 6 (M.A.) (III-10)

45 yaşındaki erkek olgu, olgu 2 (II-7)'nin yeğeni olup Olgu 2, Olgu 6'nın dayısıdır.

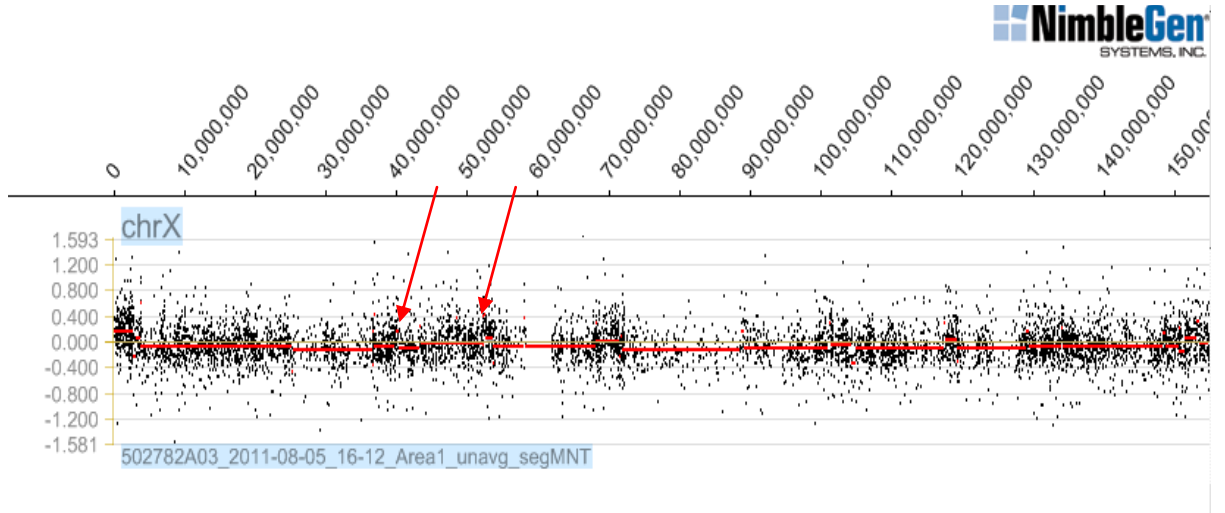
a.



b.



c.



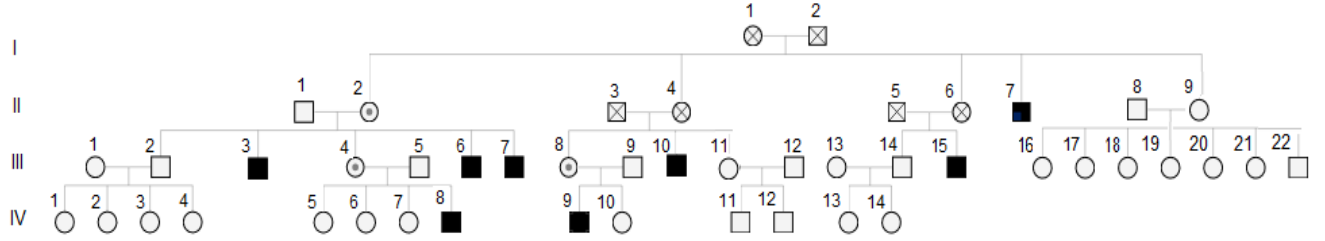
- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

Çizim 4.6. Olgu 6'ya ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı
Olgu 6'da yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52194999 ve
aberasyon bitiş 52714999 aralığında 520000 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon
içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE
1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

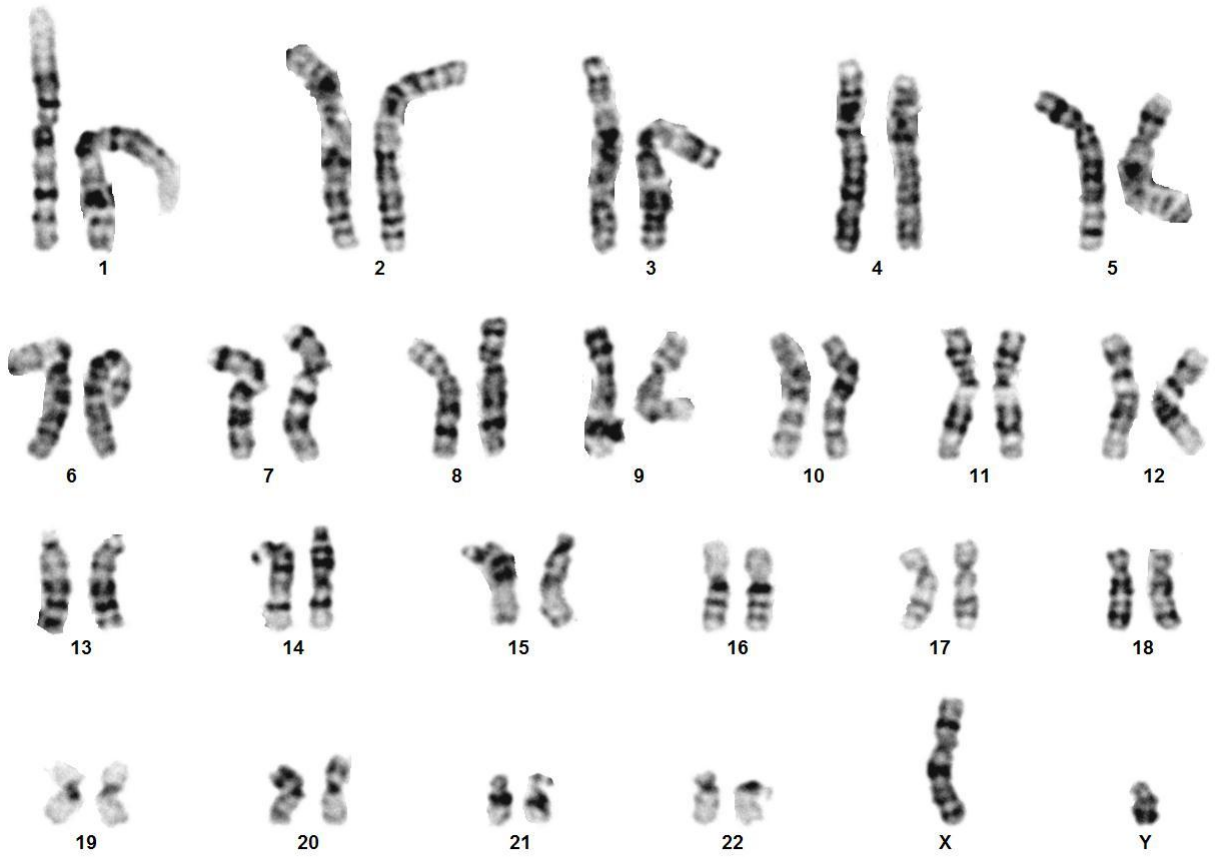
OLGU 7 (C.A.) (III-15)

45 yaşındaki erkek olgu, olgu 2 (II-7)'nin yeğenidir.

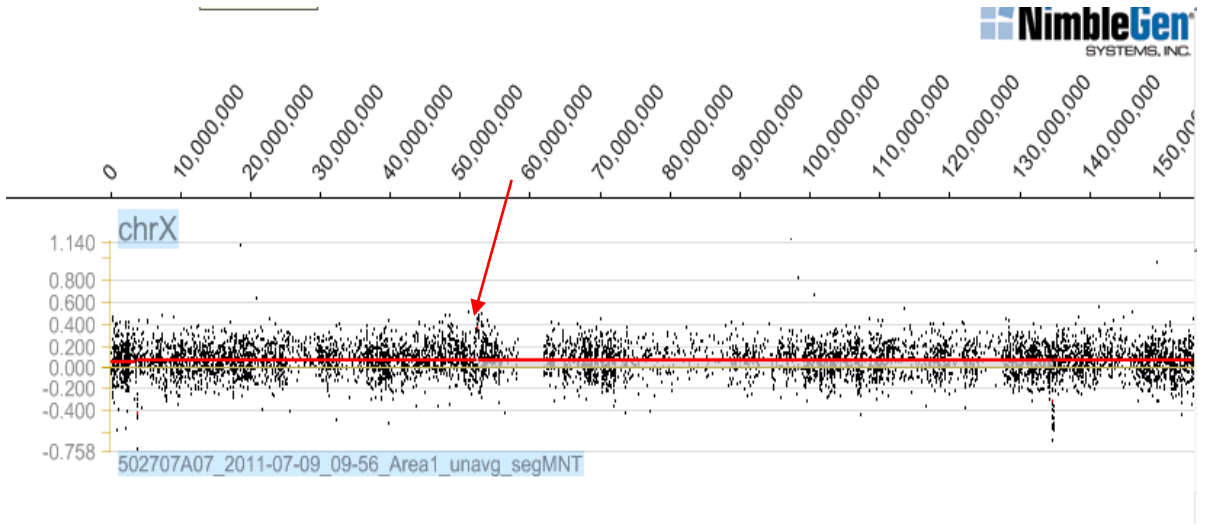
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

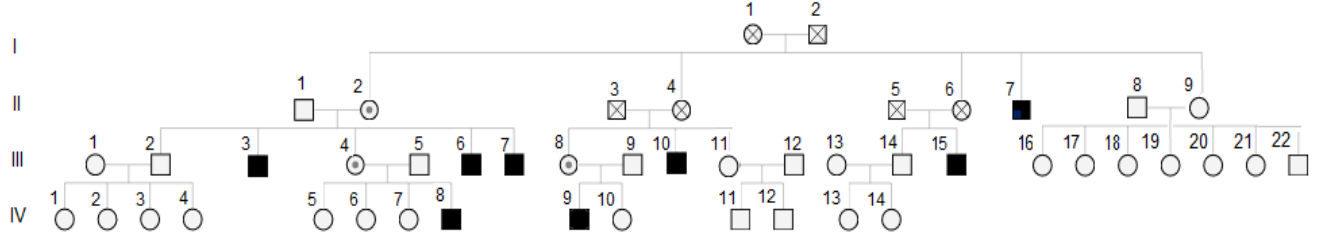
Çizim 4.7. Olgu 7'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı

Olgu 7'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52251163 ve aberasyon bitiş 52282612 aralığında 31449 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

OLGU 8 (A.G.) (III-3)

54 yaşındaki erkek olgu, olgu 2 (II-7)'nin yeğeni olup Olgu 2 (II-7), Olgu 8'in dayısıdır. Olgu 8, olgu 1(III-7) ve olgu 3 (III-6) ile kardeşdir.

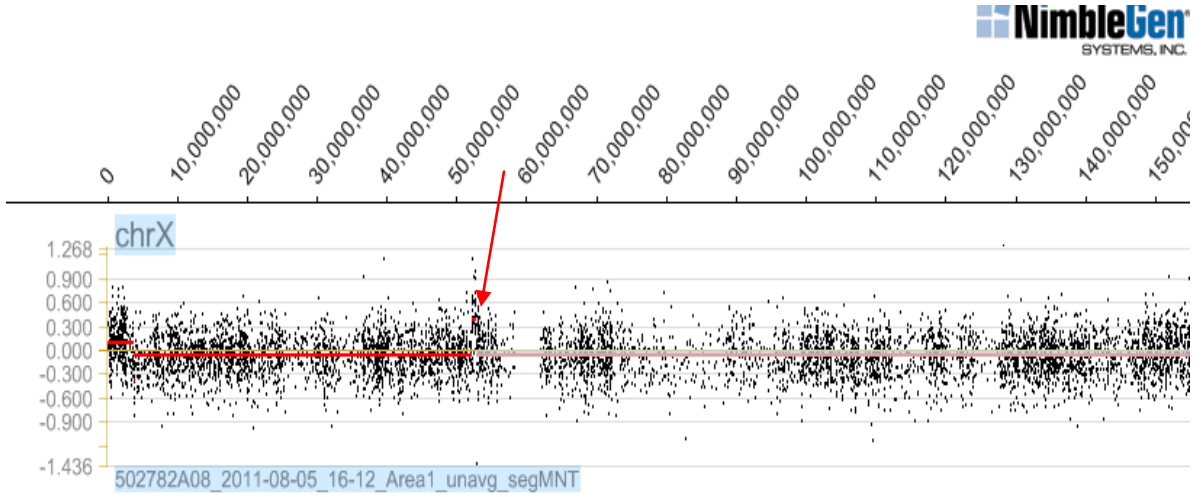
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

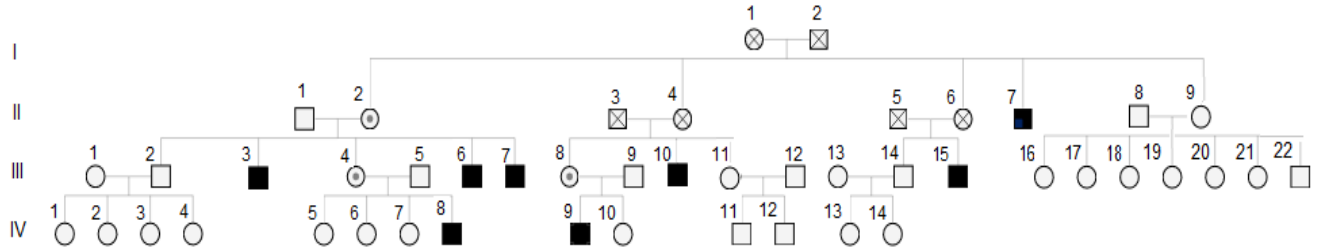
Çizim 4.8. Olgu 8'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı

Olgu 8'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52529643 ve aberasyon bitiş 52565054 aralığında 35411 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

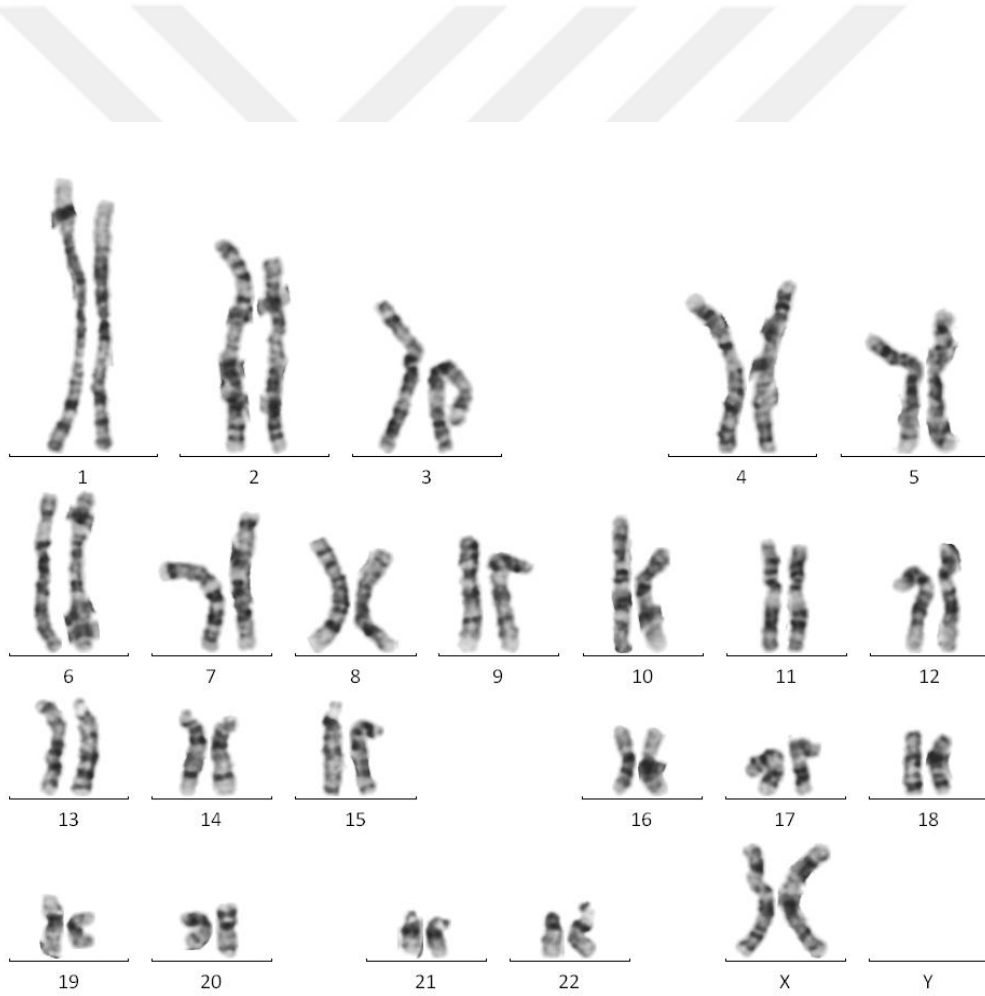
KONTROL 1 (G.S.) (II-9)

68 yaşındaki kadın olgu, olgu 2 (II-7)'nin kız kardeşidir.

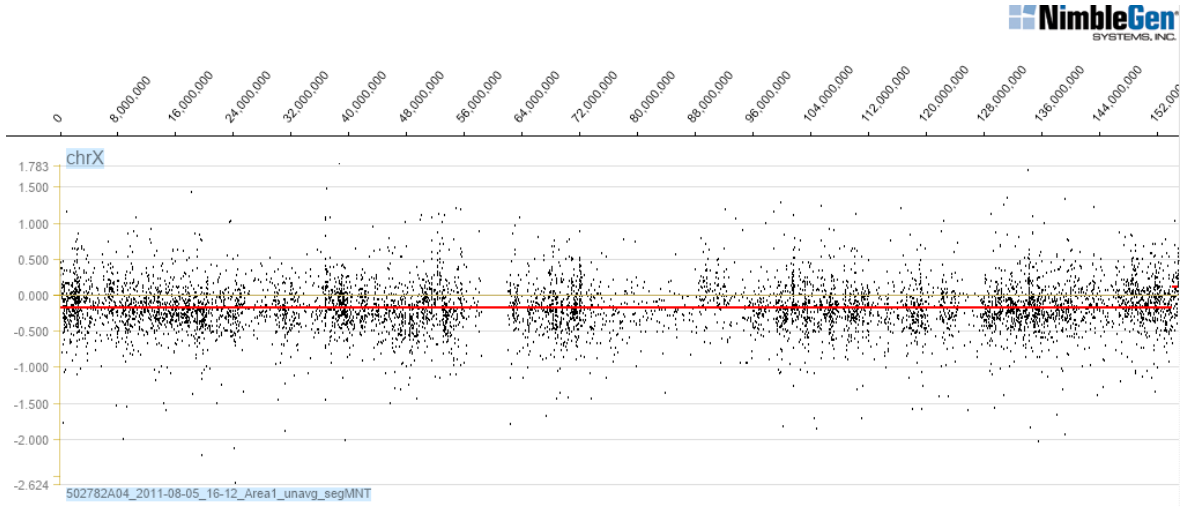
a.



b.



c.



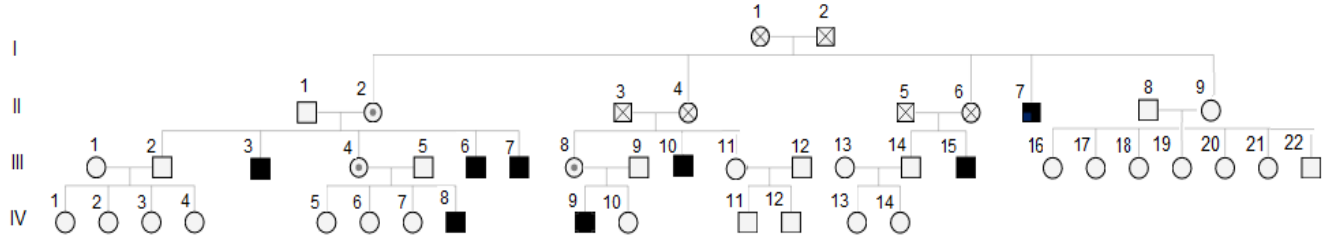
- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

Çizim 4.9. Kontrol 1'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı. GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

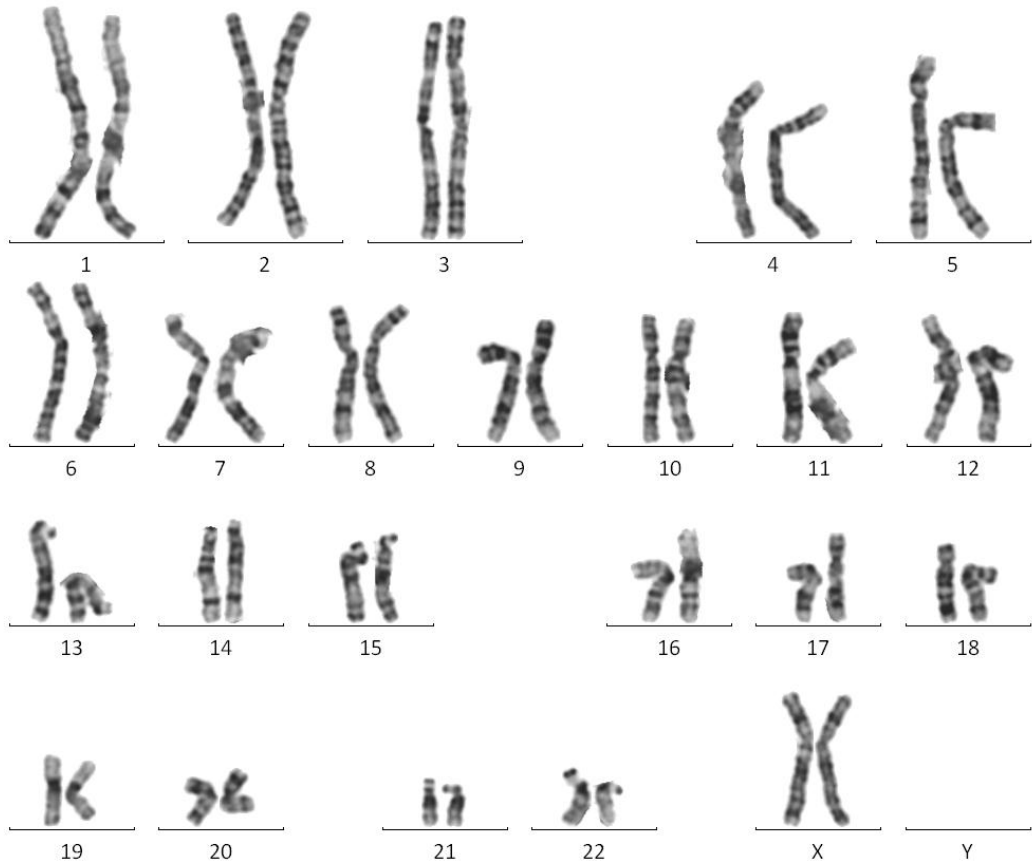
KONTROL 2 (G.G.) (II-2)

76 yaşındaki kadın olgu, olgu 2 (II-7)'nin kız kardeşidir.

a.



b.



c.



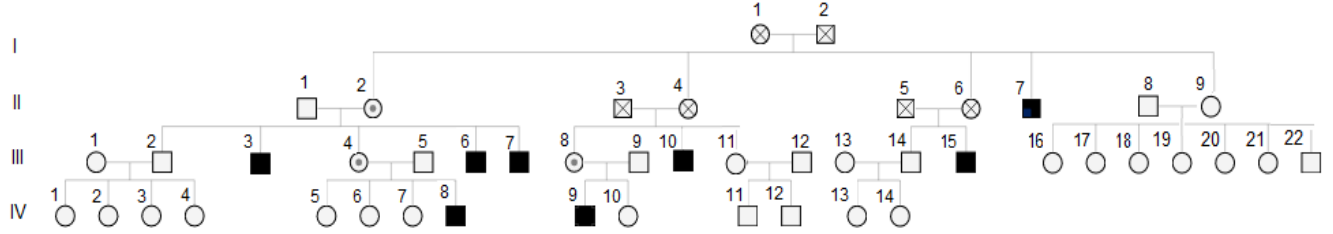
- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

Çizim 4.10. Kontrol 2'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı. GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Kontrol 2'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52530786 ve aberasyon bitiş 52568478 aralığında 37692 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmama ile birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

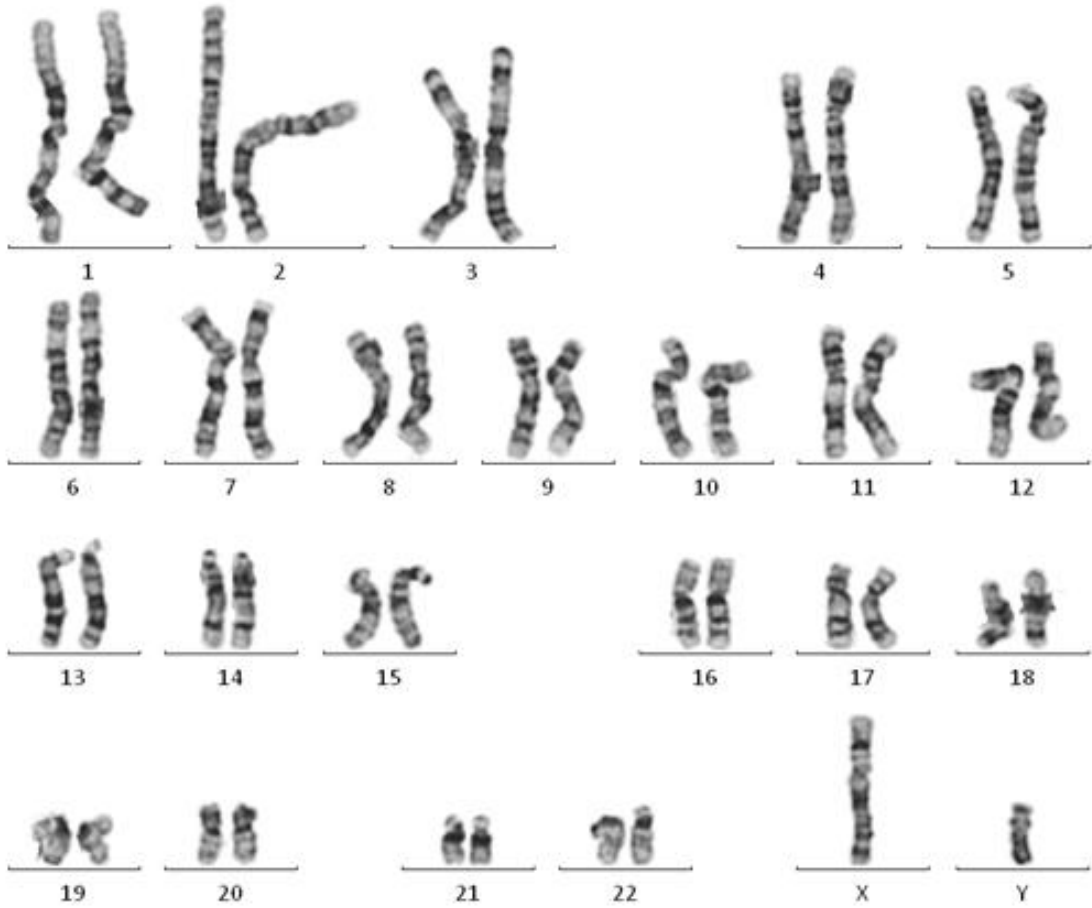
KONTROL 3 (G.G.) (II-1)

86 yaşındaki erkek olgu, olgu 2 (II-7)'nin eniştesidir.

a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

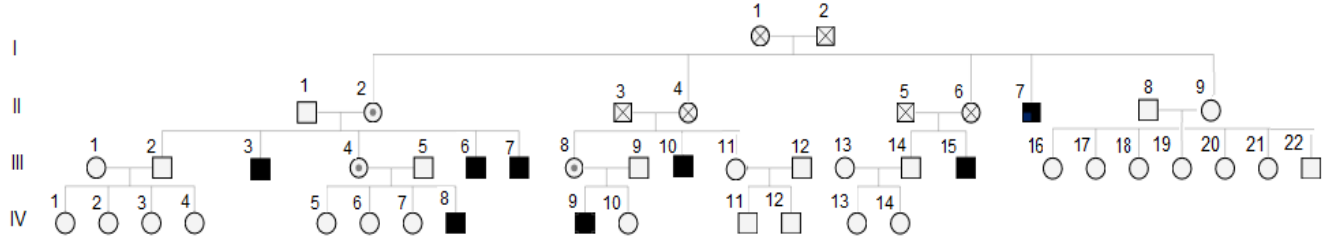
Çizim 4.11. Kontrol 3'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

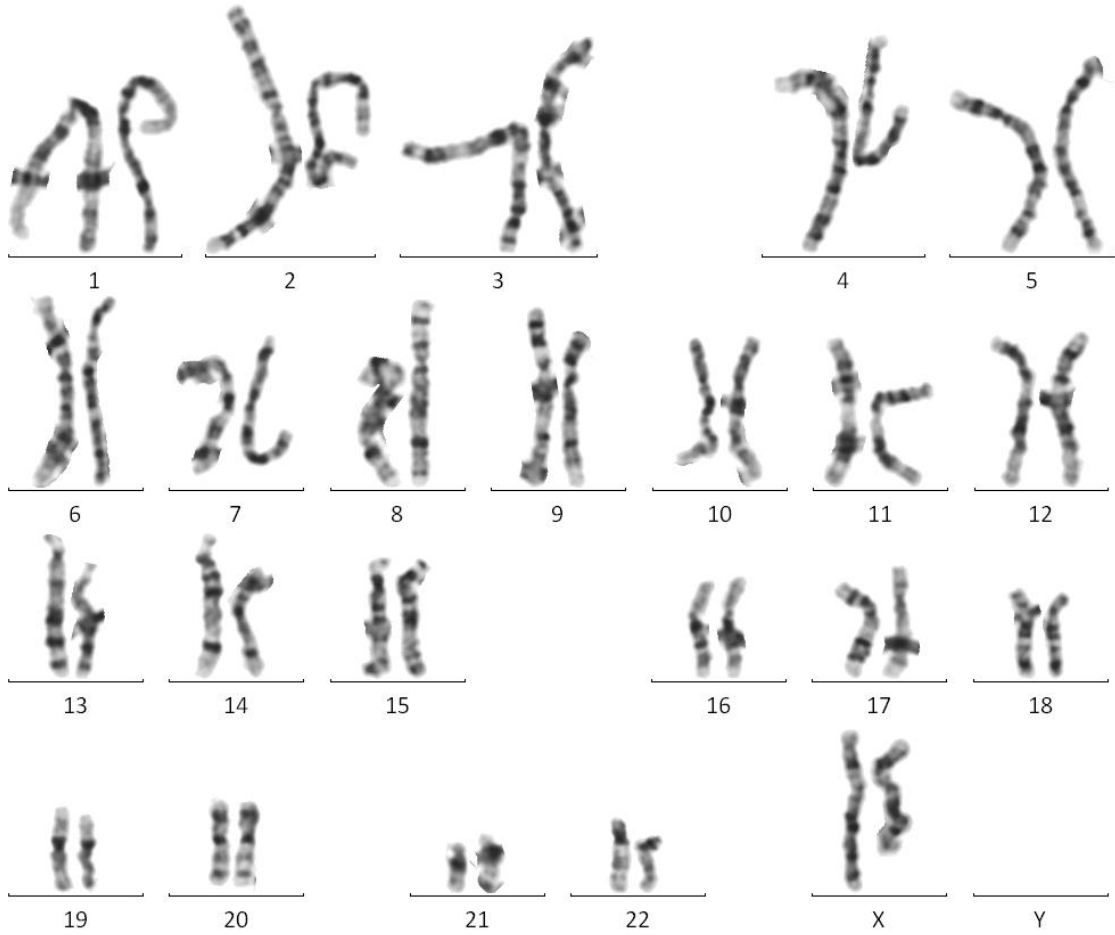
KONTROL 4 (A.Y.) (III-4)

48 yaşındaki kadın olgu, olgu 4 (IV-8)'ün annesidir.

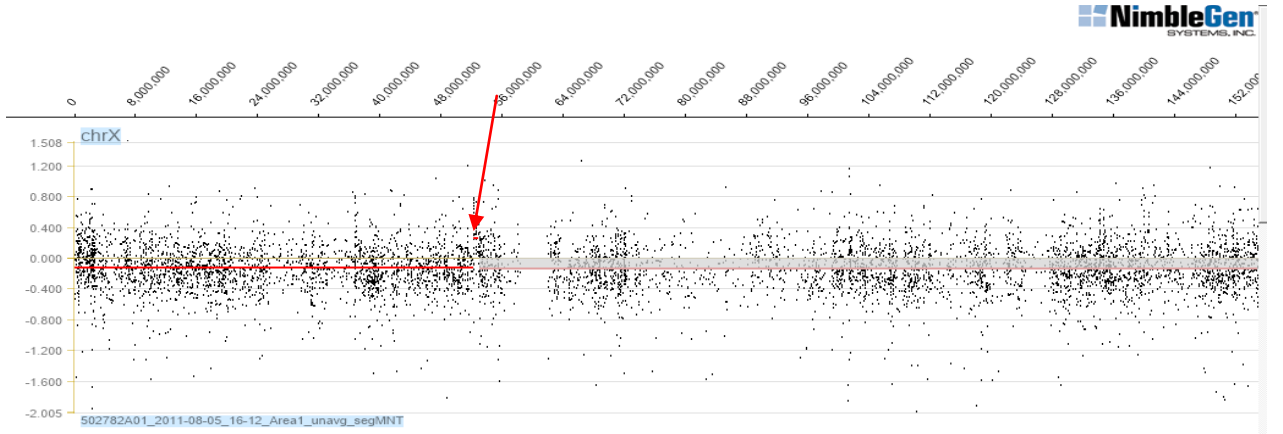
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

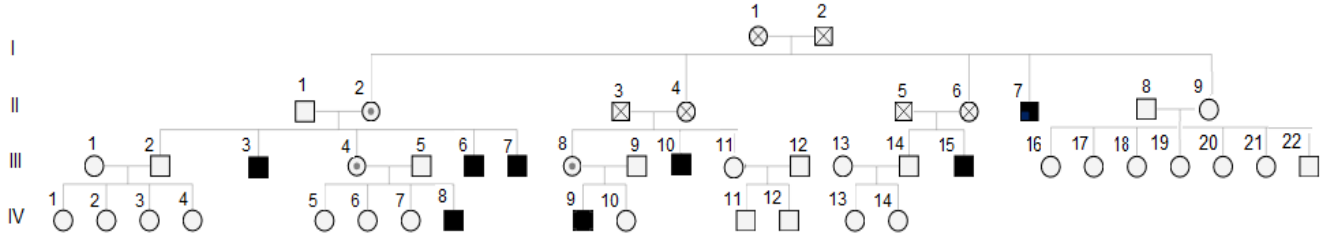
Çizim 4.12.. Kontrol 4'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Kontrol 4'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52521897 ve aberasyon bitiş 52534868 aralığında 12971 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamakla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

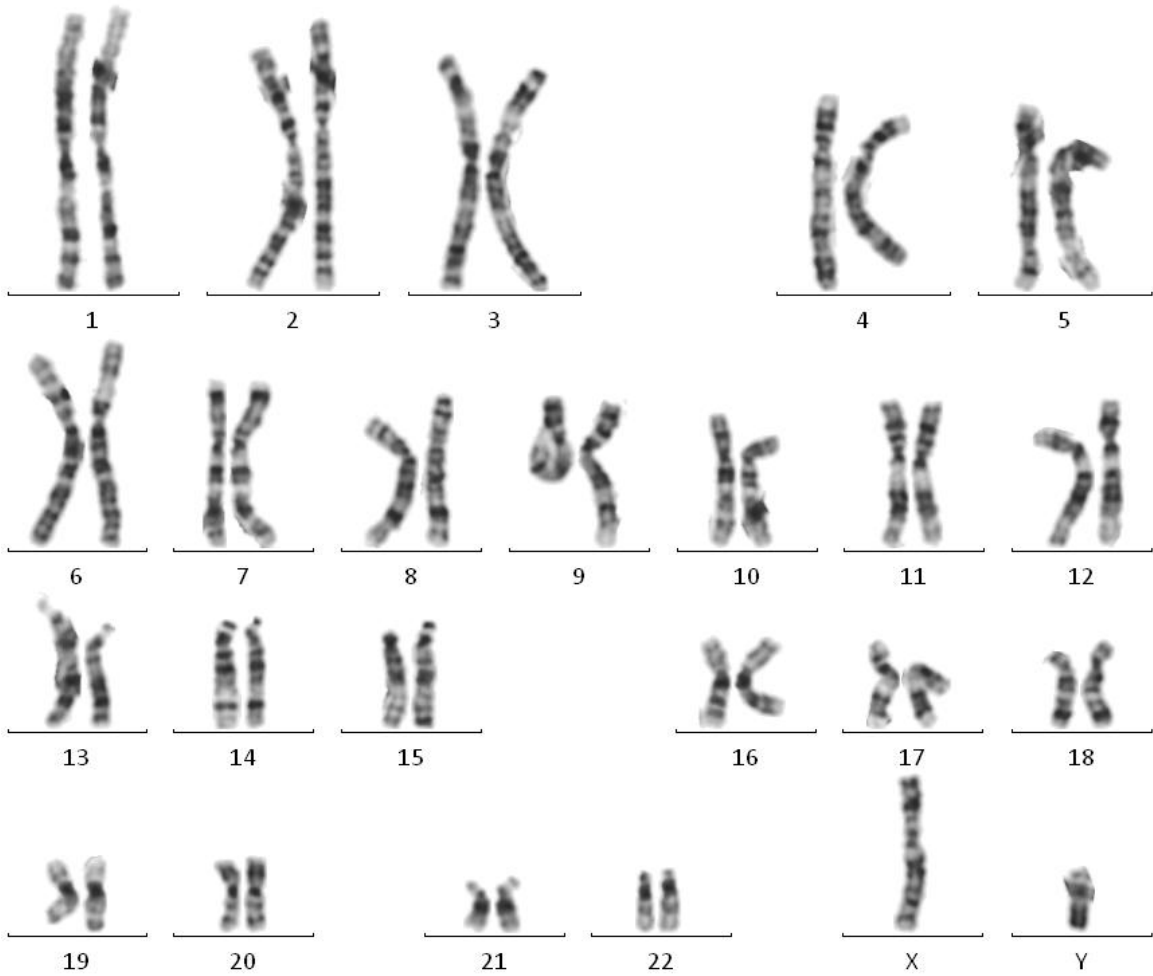
KONTROL 5 (A.Y.) (III-5)

52 yaşındaki erkek olgu, olgu 4 (IV-8)'ün babasıdır.

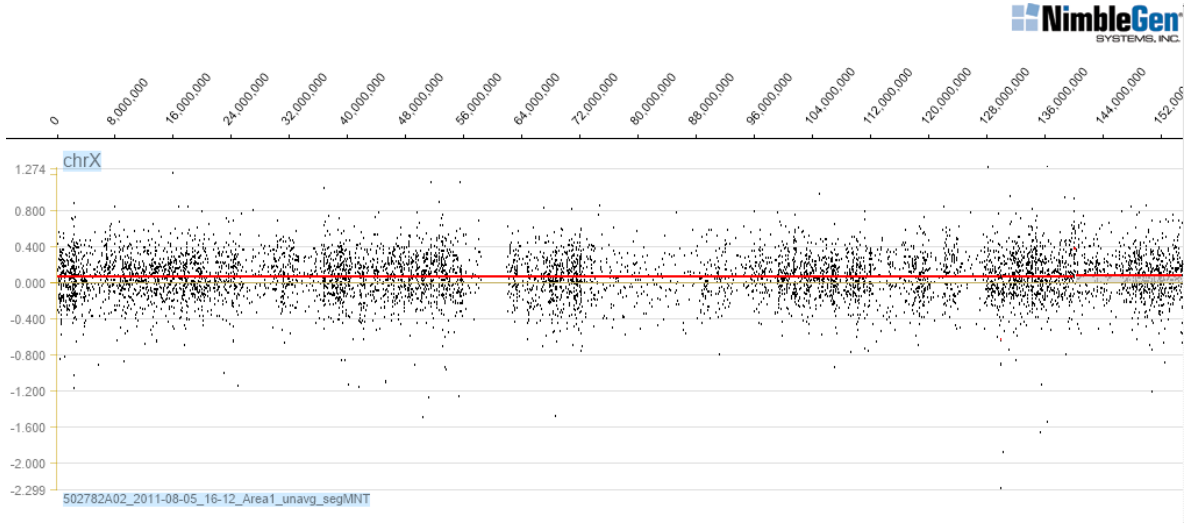
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

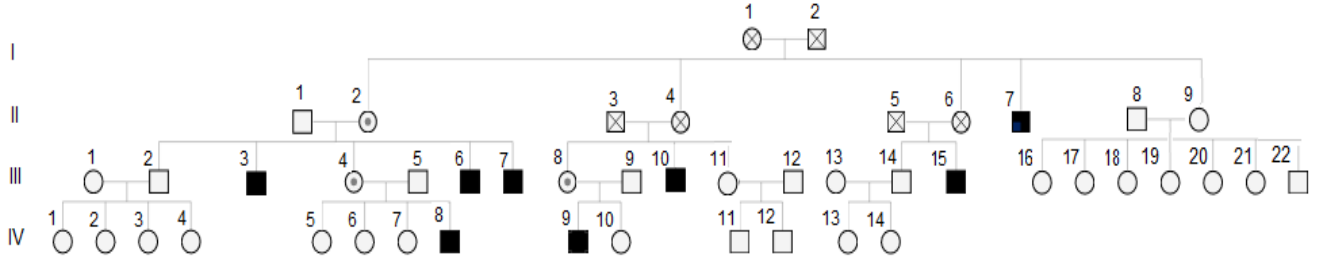
Çizim 4.13. Kontrol 5'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

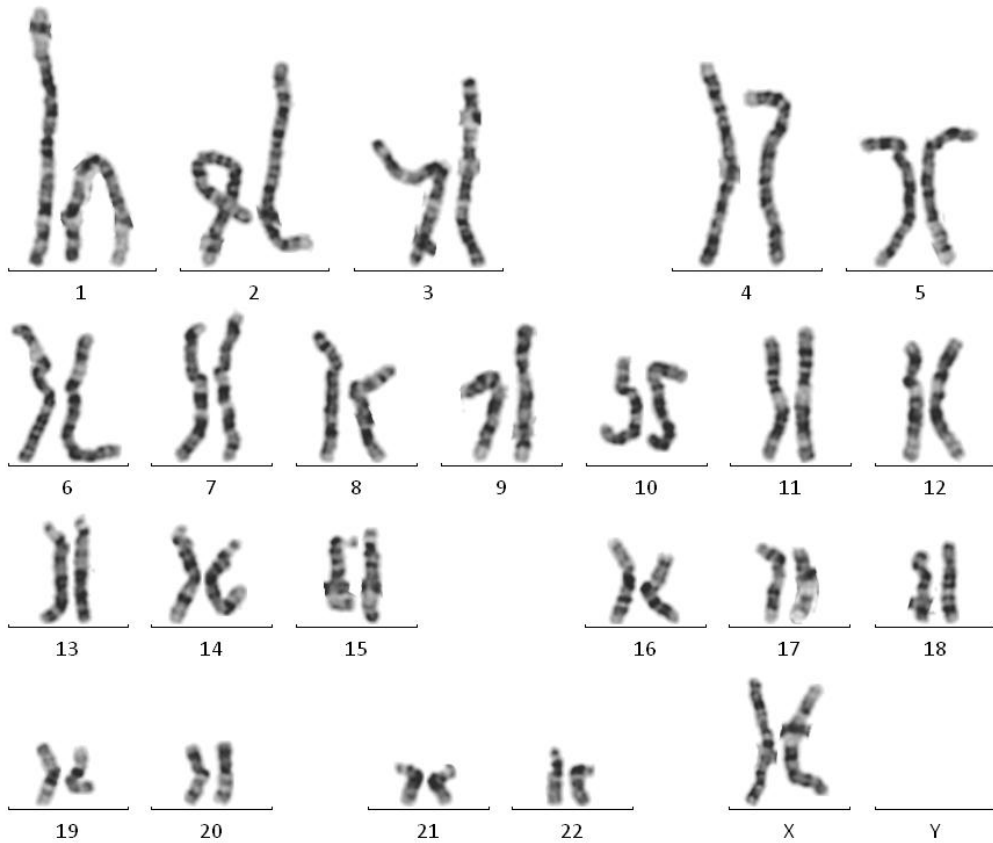
KONTROL 6 (N.P.) (III-8)

46 yaşındaki kadın olgu, olgu 5 (IV-9)'in annesidir.

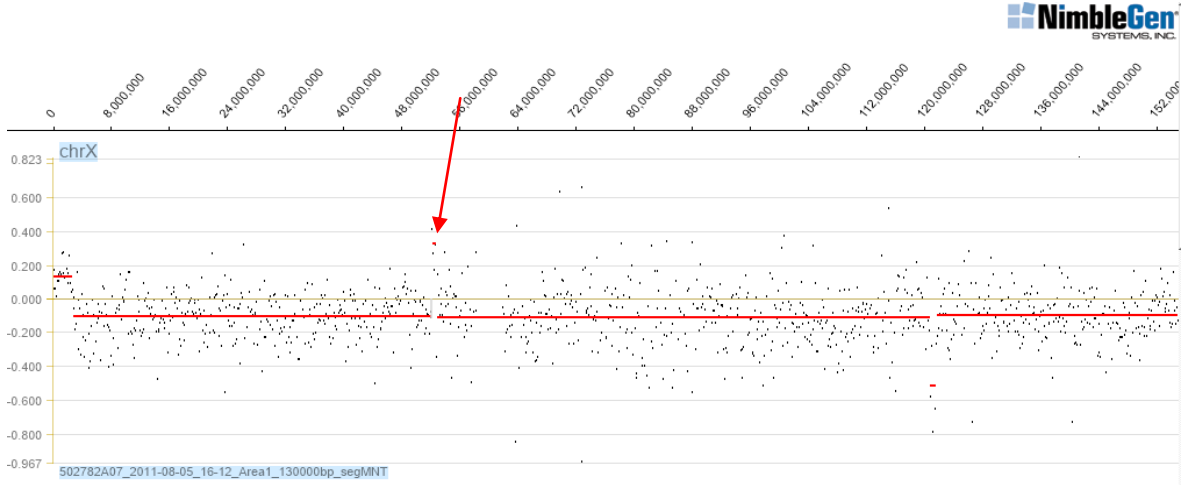
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

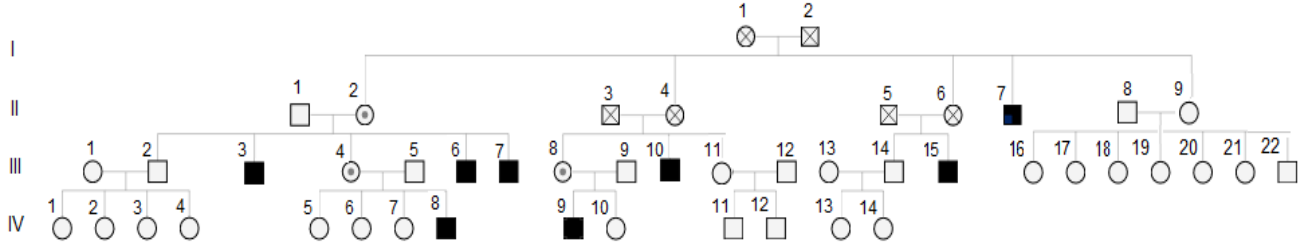
Çizim 4.14. Kontrol 6'ya ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kurulumu saptanmıştır. Kontrol 4'de yapılan array CGH analizi sonucunda aberasyon başlangıç 52543707 ve aberasyon bitiş 52568599 aralığında 24892 bç.'lik duplikasyon saptanmıştır. Aberasyon içerisinde yer alan sendrom bölgesi bulunmamasıyla birlikte aberasyon içerisinde XAGE 1D-A-E-B-C OMIM genleri yer almaktadır.

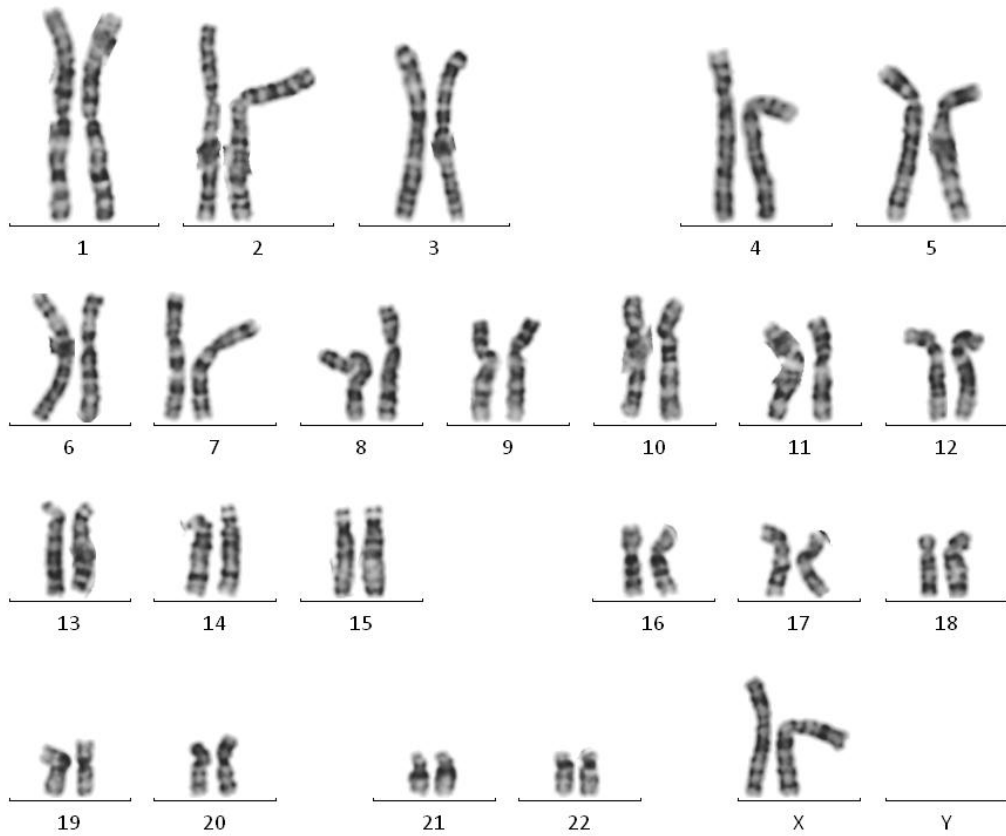
KONTROL 7 (G.A.) (III-11)

32 yaşındaki kadın olgu, olgu 6 (III-10)'nın kız kardeşidir.

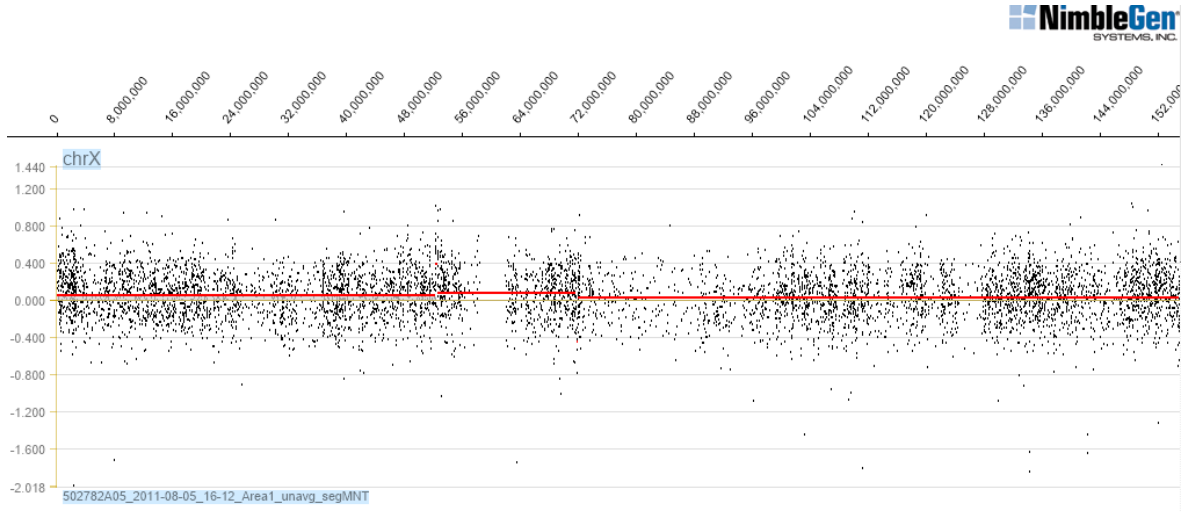
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

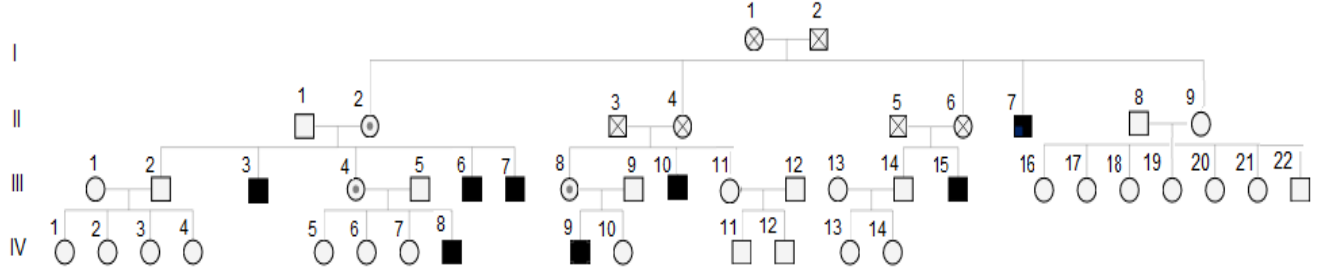
Çizim 4.15. Kontrol 7'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

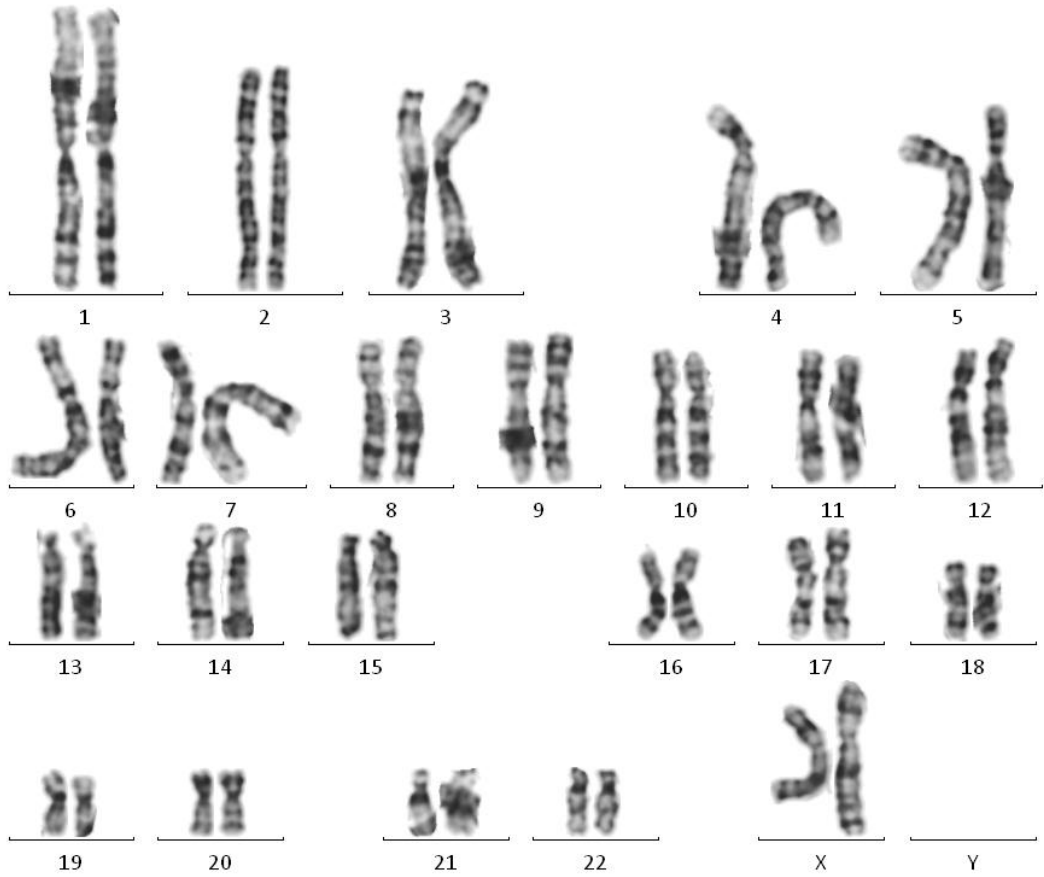
KONTROL 8 (A.G.) (IV-4)

17 yaşındaki kadın olgu, olgu 1 (III-7), 3 (III-6) ve 8 (III-3)'in yeğenidir.

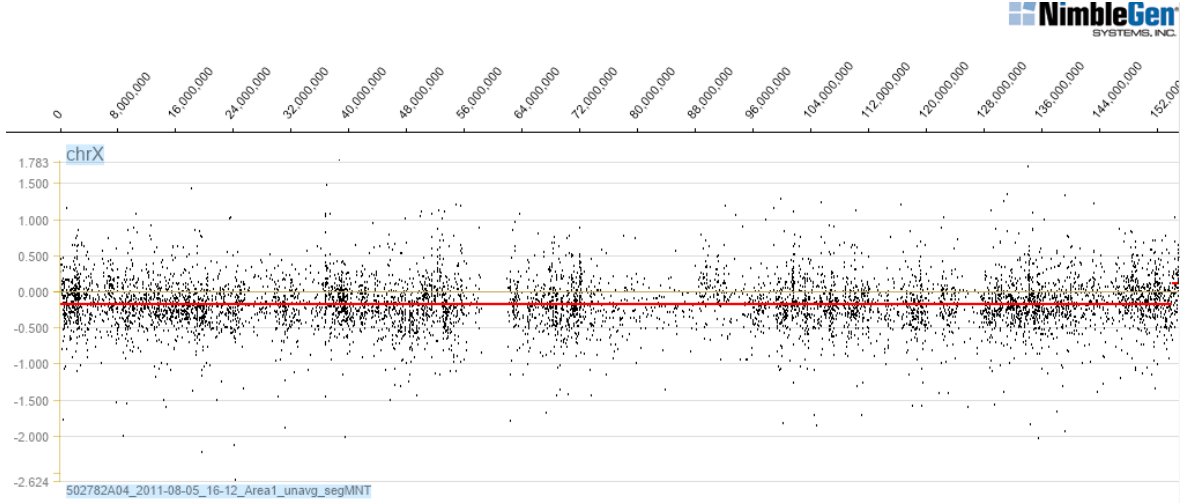
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

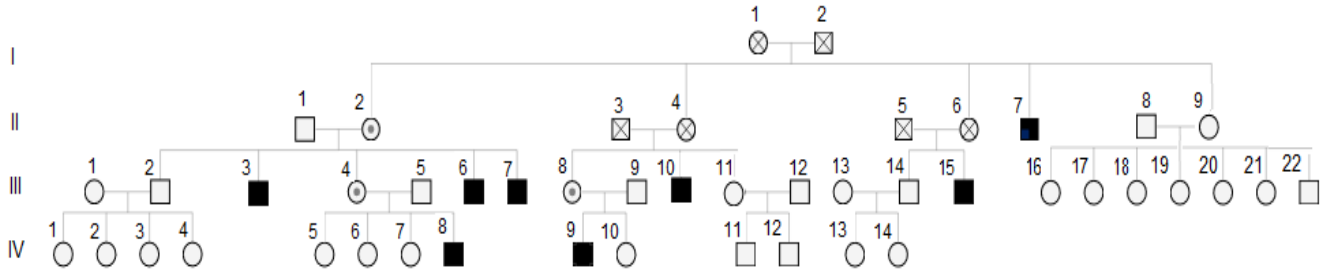
Çizim 4.16. Kontrol 8'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

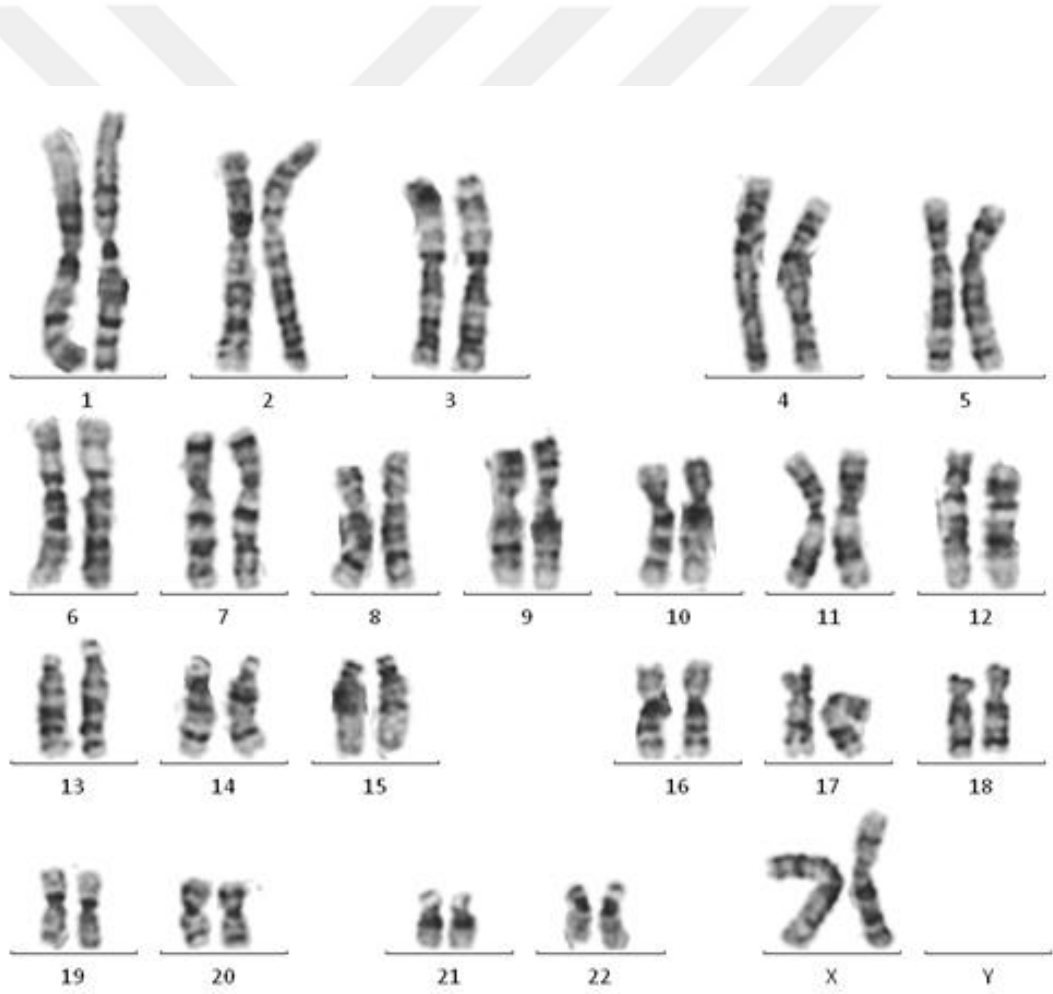
KONTROL 9 (N.Y.) (IV-5)

36 yaşındaki kadın olgu, olgu 4 (IV-8)'ün kız kardeşidir.

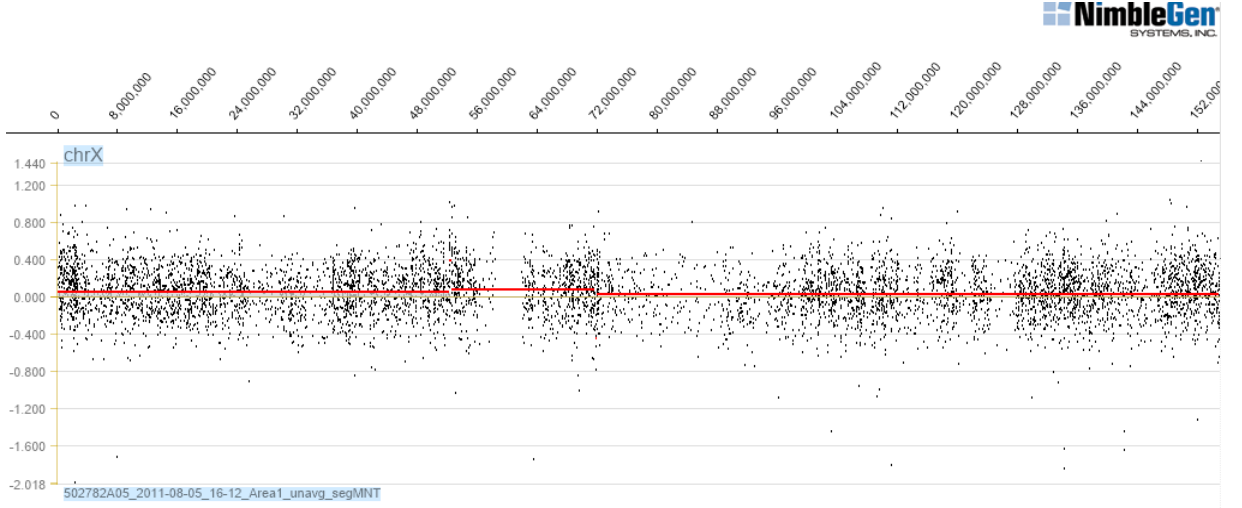
a.



b.



c.



- Aile ağacı
- GTG Bantlı karyotip
- Array-CGH analizi

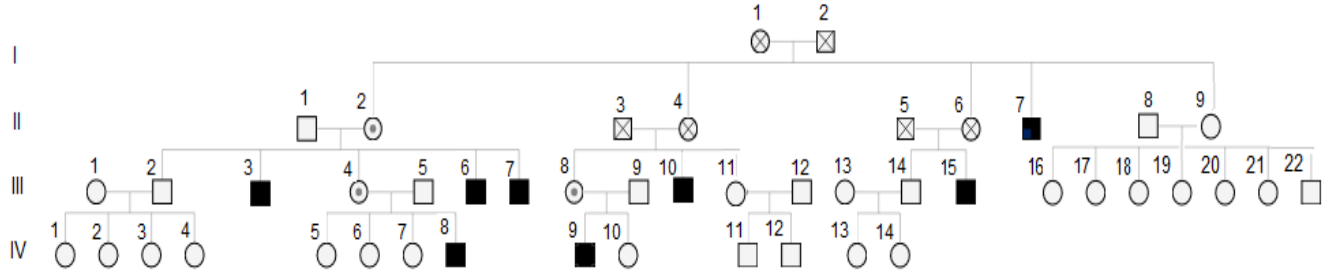
Çizim 4.17. Kontrol 9'a ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

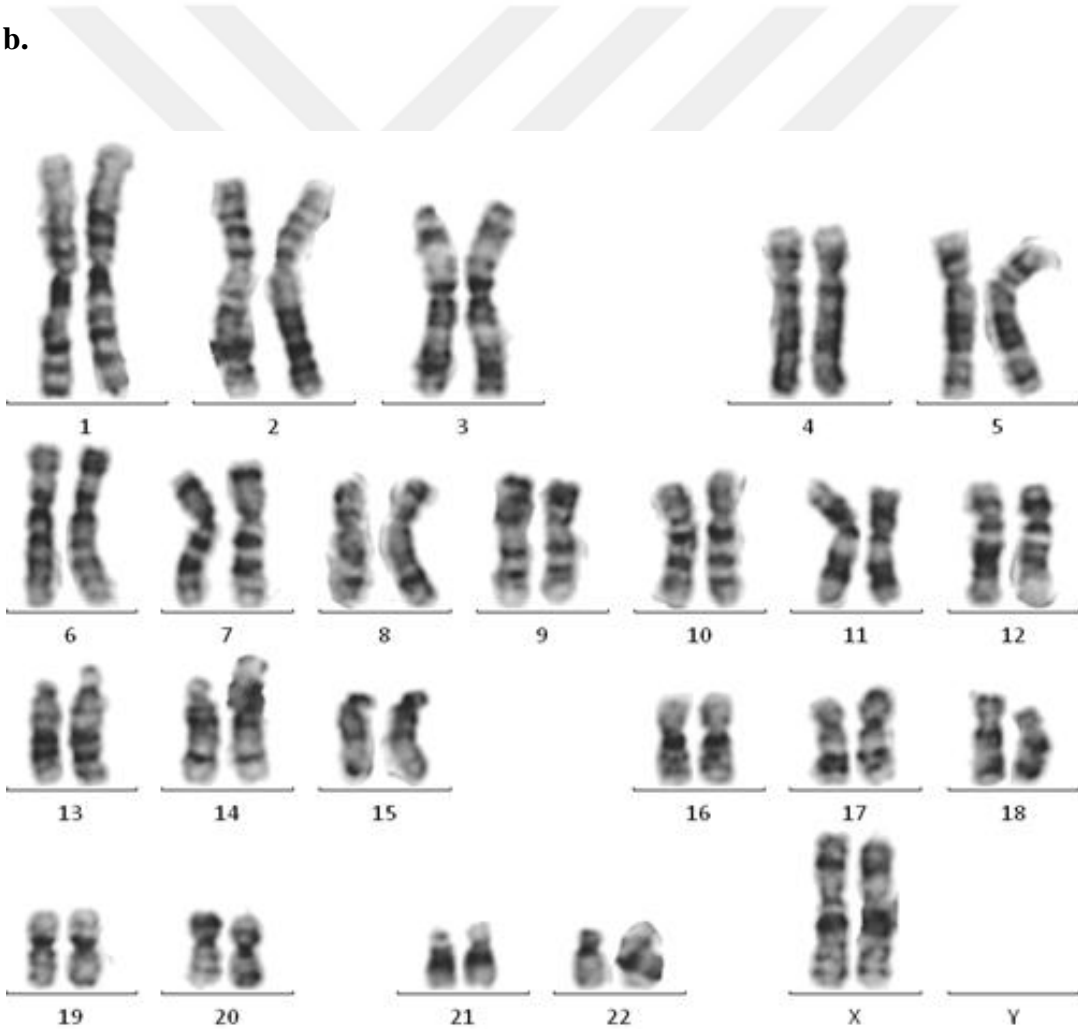
KONTROL 10 (B.Y.) (IV-6)

22 yaşındaki kadın olgu, olgu 4 (IV-8)'ün kız kardeşidir.

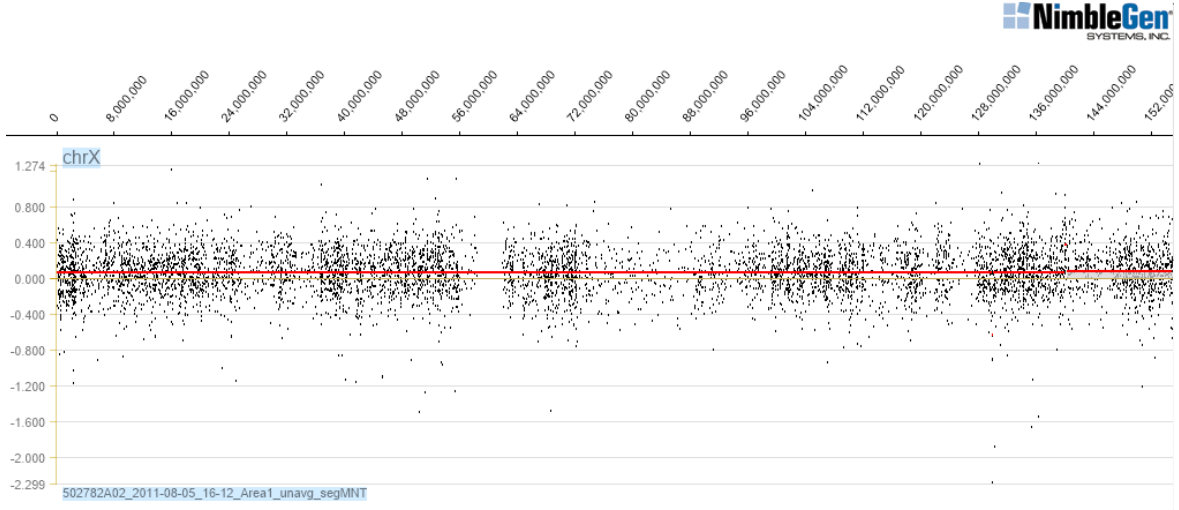
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

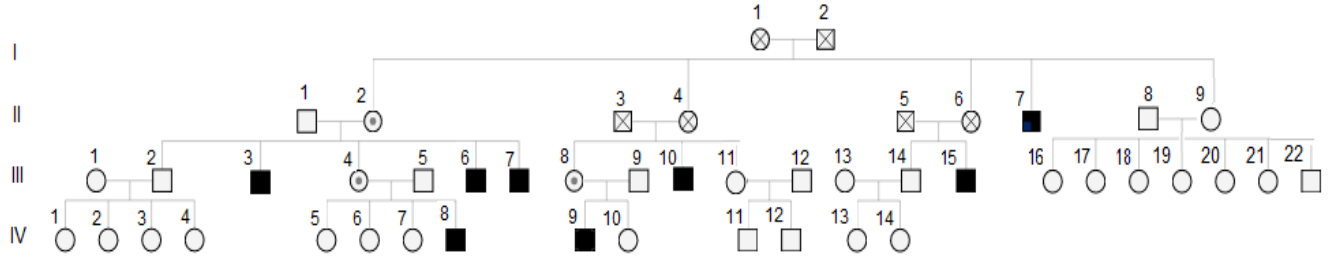
Çizim 4.18. Kontrol 10'a ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

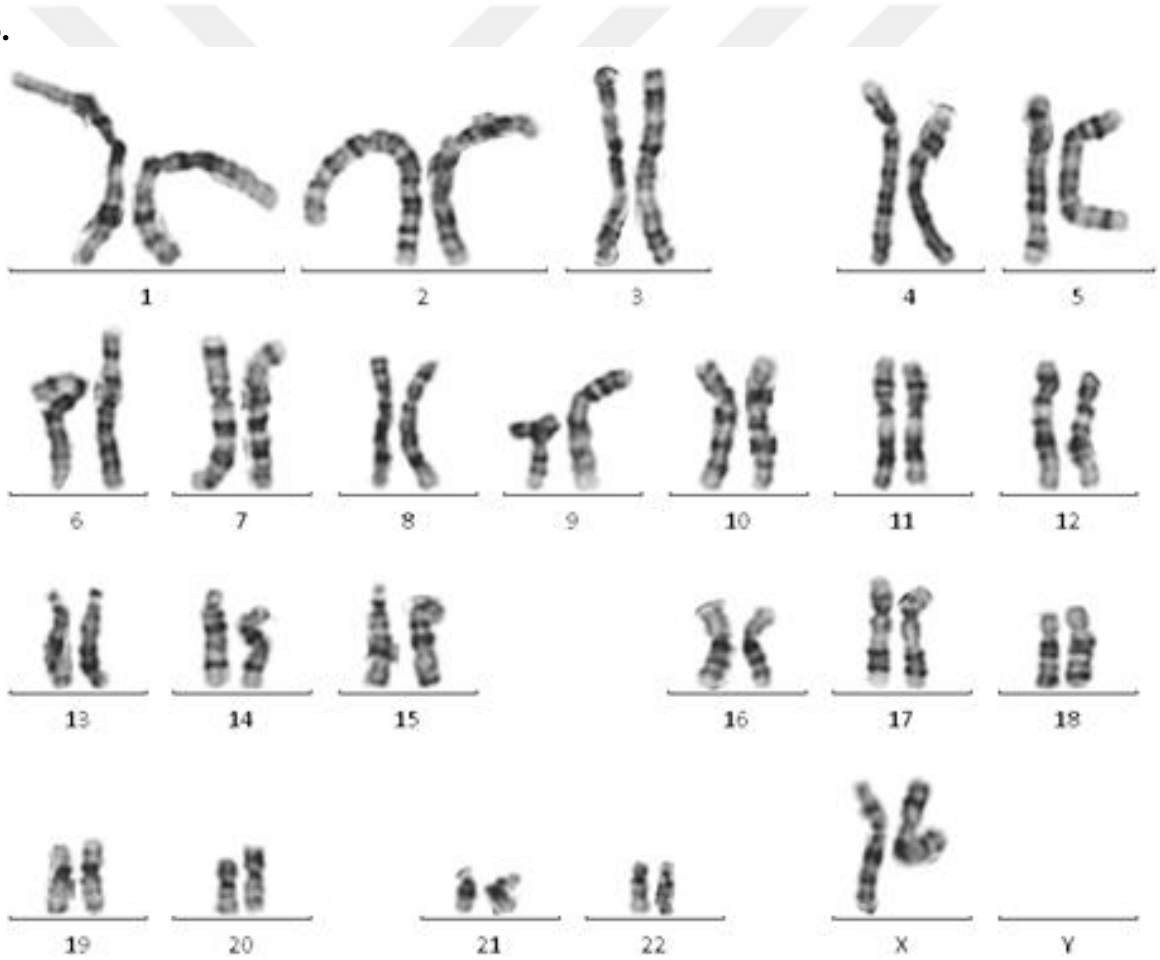
KONTROL 11 (G.Y.)

23 yaşındaki kadın olgu, olgu 4 (IV-8)'ün kız kardeşidir.

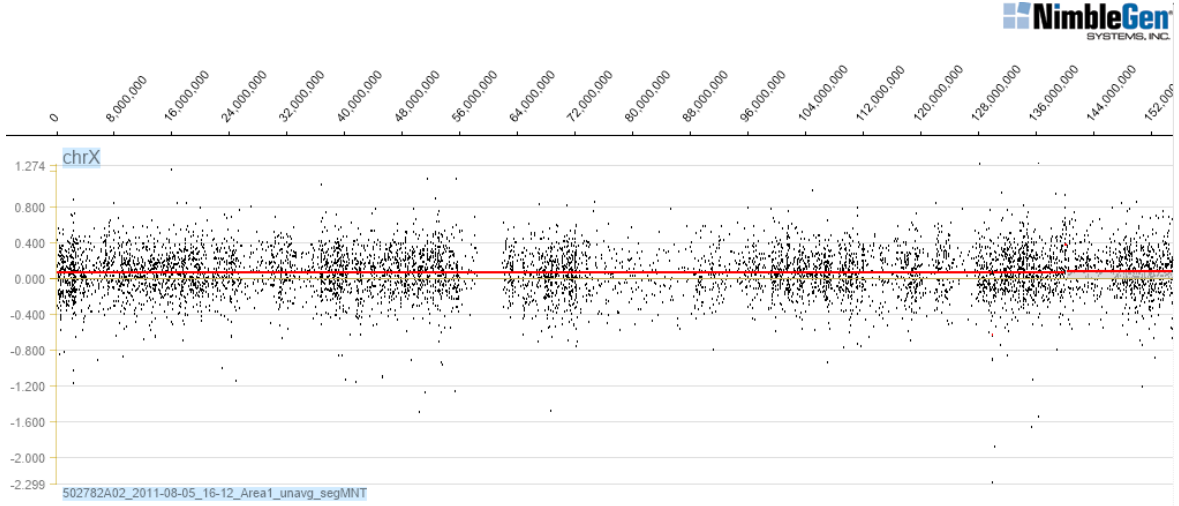
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

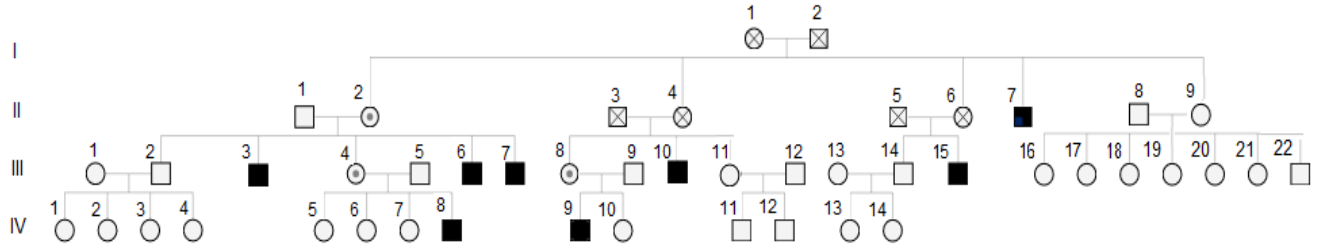
Çizim 4.19. Kontrol 11'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

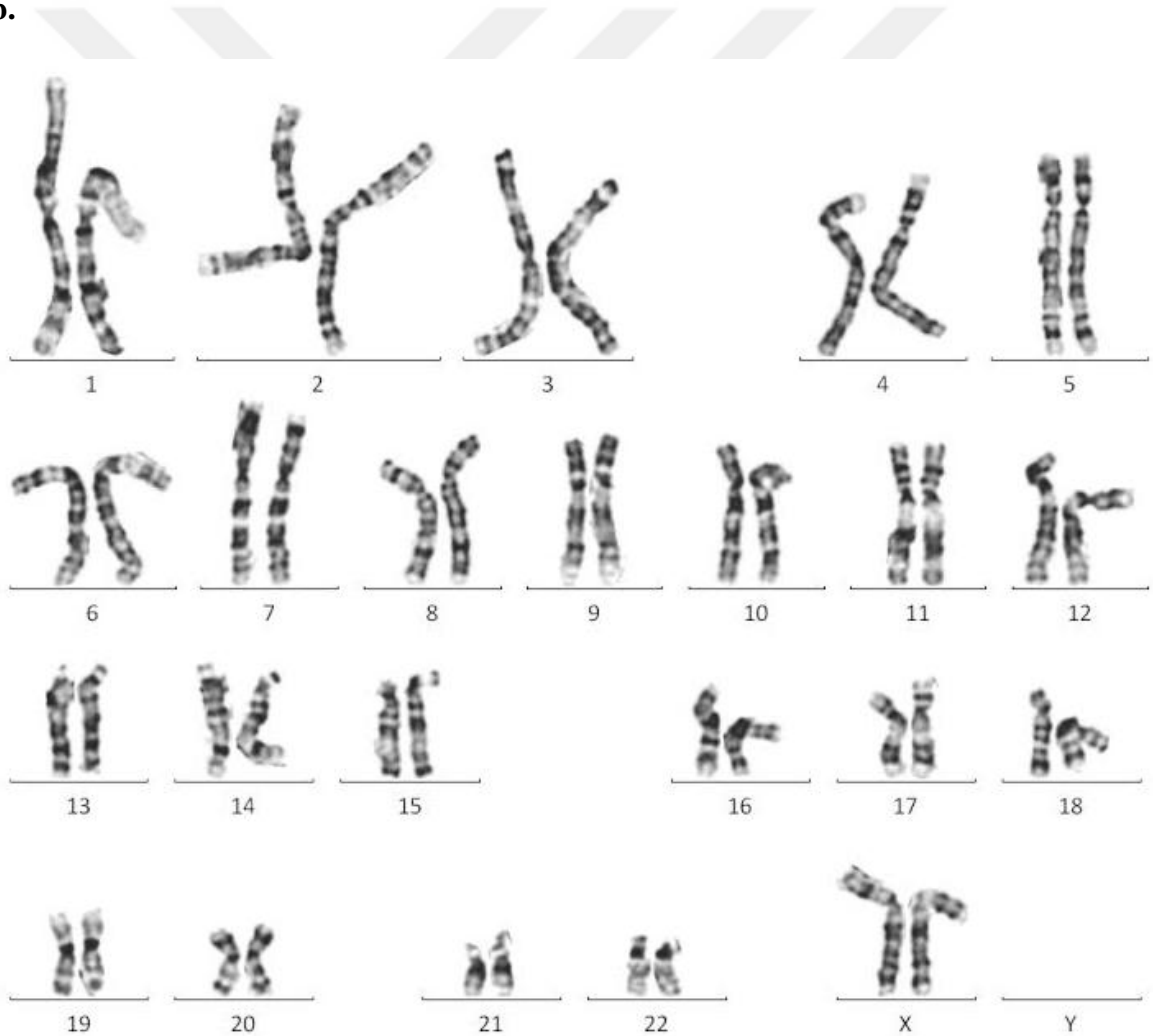
KONTROL 12 (F.P.) (IV-10)

30 yaşındaki kadın olgu, olgu 5 (IV-9)'in kız kardeşidir.

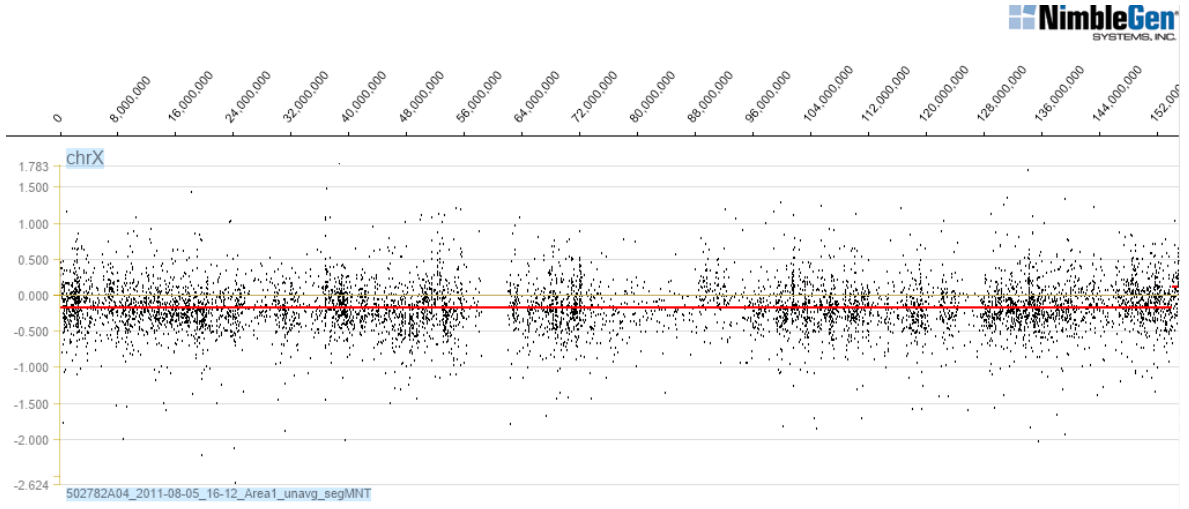
a.



b.



c.



- a. Aile ağacı
- b. GTG Bantlı karyotip
- c. Array-CGH analizi

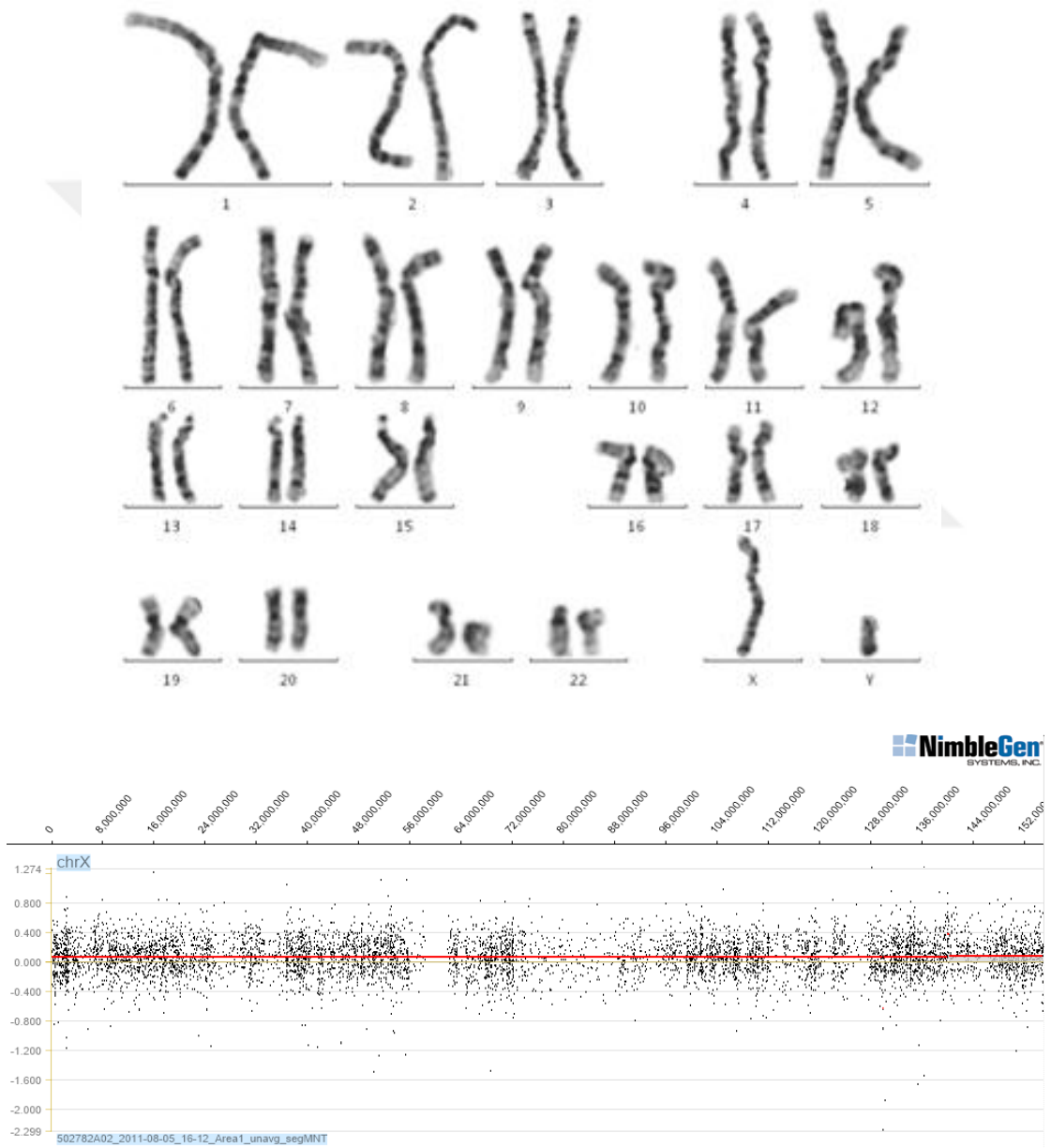
Çizim 4.20. Kontrol 12'ye ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları ile aile ağacı.

GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

KONTROL 13 (A.S.)

8 olgumuz ve 12 kontrol grubumuzdaki olgularla akrabalık bağı olmayan erkek olguda GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

a.



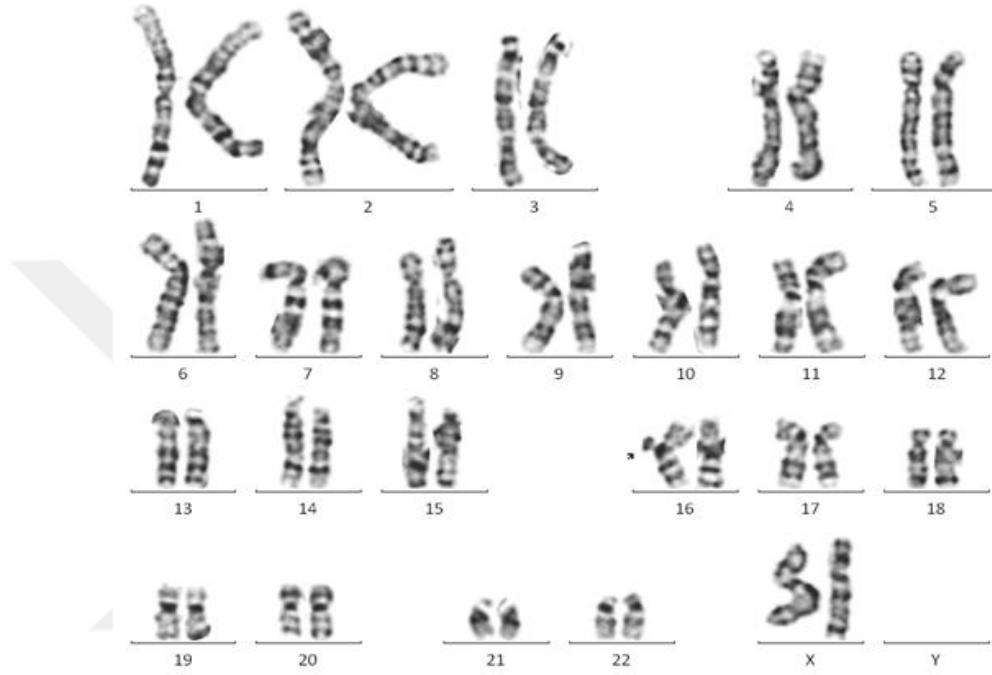
- a. GTG Bantlı karyotip
- b. Array-CGH analizi

Çizim 4.20. Kontrol 13'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları

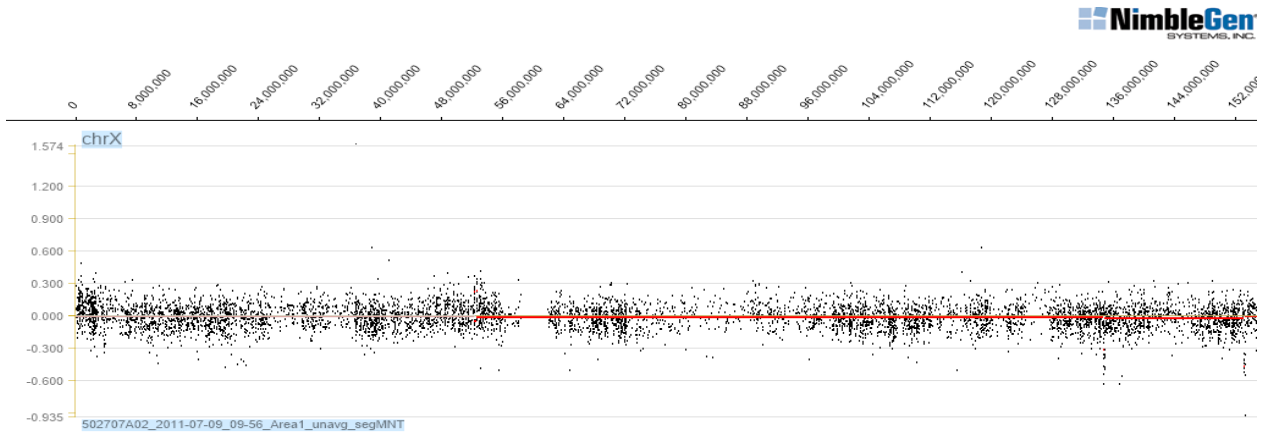
KONTROL 14 (E.E.)

8 olgumuz ve 12 kontrol grubumuzdaki olgularla akrabalık bağı olmayan kadın olguda GTG Bantlama ile normal kromozom kuruluşu saptanmıştır. Array CGH analizinde de X kromozomunun ilgili bölgesinde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.

a.



b.



- a. GTG Bantlı karyotip
- b. Array-CGH analizi

Çizim 4.21. Kontrol 14'e ait GTG Bantlama ve Array-CGH analizi sonuçları

5. TARTIŞMA

Genel populasyonda % 2-3 (Roeleveld, Zielhuis ve Gabreëls 1997) oranında görülen mental retardasyonun etiyojisi genellikle açıklanamamaktadır. Önemli bir MR etmeni olan kromozom anomalilerinin bu gruptaki oranı hasta seçimi ve kullanılan tekniklere bağlı olarak % 4-28 arasında bildirilmektedir (de Vries, ve diğerleri 2001). Bu anomaliler (delesyon, duplikasyon ve translokasyonlar), genellikle mikroskobik olarak görülebilen 2-3 Mb'dan büyük değişimlerdir.

Çoklu doğumsal anomali ve mental retardasyon etiyojisinde önemli bir etmen olan dengesiz kromozom anomalilerinden sayısal anomaliler grubu, klasik bantlama teknikleri ile kolaylıkla tanınabilirken, yapısal anomalilerin tanısında bu teknikler yetersiz kalabilmektedir. 1980'li yıllarda HRBT, 90'lı yıllarda FISH analizleri ve son yıllarda da CGH hatta array CGH analizleri bu alanda önemli tanısal teknikler olarak kendini ispatlamıştır. Genel olarak koyu boyanan G bantlar az, açık boyanan G bantlar ise genler açısından zengindir. Telomer bölgeleri ise, genler açısından en zengin bölgelerdir (Ghaffari, ve diğerleri 1998). Telomere özgün problemlerin geliştirilerek FISH teknolojisinde kullanımı ile bu bölgelerin delesyon ve duplikasyonlarının tanınabilmesi ile MKA/MR etiyojisindeki rolünün araştırılması 1990'lı yılların sonlarında büyük önem kazanmıştır (Flint, Wilkie, ve diğerleri 1995).

Mental retardasyon etiyojisinin açıklanmasında klasik sitogenetik tekniklerin yetersizliği Wilkie'yi (Wilkie AOM, 1993) telomerik anomaliler ve uniparental dizomilerin tanısı için, yüksek değişkenlikteki DNA polimorfizmlerinin kullanımını içeren bir strateji ileri sürmeye itmiştir (de Vries, ve diğerleri 2001). Flint ve arkadaşları (Flint, Wilkie, ve diğerleri 1995) ise, bu stratejiyi submikroskobik ya da telomerik yeniden düzenlenmelerin, idiyopatik mental retardasyonun bir nedeni olup olamayacağını anlamak için yaptıkları bir pilot çalışmada kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda, idiyopatik mental retardasyonun en az % 6'sının, telomerik submikroskobik yeniden düzenlenmeler ile oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Buna göre, telomerik yeniden düzenlenmelerin, mental retardasyonun Down sendromundan sonra en yaygın ikinci nedeni olabileceğini ve bu yüzden tüm olası telomerleri ve daha büyük bir diziyi içine alacak şekilde çalışmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimlerini inceleyen bir moleküler sitogenetik teknik olan array-CGH tekniği sayesinde klasik yöntemlerle sitogenetik tanısı kesinleşemeyen kromozom anomalilerinin daha detaylı araştırılması mümkün olmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda kromozom analizleri normal olarak sonuçlanmış olan hem MR'lu hem de kontrol grubundaki olgulara array temelli CGH Tekniği uygulanmıştır.

Olgularımızda en dikkat çekici durum, ailede 3 kuşaktır sadece erkek bireylerde anomalinin ortaya çıkmış olması ve bu anomalinin taşıyıcı kadınlar tarafından bir sonraki kuşağa aktarılmış olduğunun gözlenmesidir. Bu durum da bize aslında X kromozomuna bağlı bir kalıtımın söz konusu olduğunu düşündürmektedir. Çizelge 4.1'de klinik bulgusu/ön tanısı Çoklu doğumsal anomali ve Mental Retardasyon (Non-sendromik) olan bu 8 hastadan array CGH tekniği ile elde edilen verilerde de X kromozomunun p11.22 bölgesinde 52210273-52745818 aralığında 535,5 Kb'lık (535545 bç'lik) bir bölgede farklı boyutlarda duplikasyon varlığının saptanmış olduğu gösterilmiştir.

Mikrodelesyon ve mikroduplikasyonlar *low copy repeat* (LCR) aracılıklı homolog olmayan rekombinasyon sonucunda resiprokal olarak ortaya çıktıkları düşünülen kromozomal düzensizliklerdir. LCR, ökaryotik genomda evrimsel süreçte segmental duplikasyonlar aracılığıyla ortaya çıktığı varsayılan, toplumda polimorfizm gösterdiği bilinen ve tipik olarak birkaç yüz kilobaz kadar uzun olabilen DNA dizileridir (Strachan 2004). Bu tekrar dizilerinden zengin olan kromozom bölgeleri mayotik eşleşme sırasında karşı karşıya gelmelerinde bir hata olursa homolog olmayan kromozom bölgelerindeki LCR'ler karşı karşıya gelerek eşleşebilir (non-allelik homolog rekombinasyon) (Flint, Thomas, ve diğerleri 1997). Böyle eşleşmelerde kardeş kromatid değişimi karşılıklı olarak eksik (delesyon) ve fazla (duplikasyon) segmentler içeren kromatidlerle sonuçlanır. Mental retardasyonlu olgularda duplikasyon sıklığı yaklaşık olarak % 0.33'dür.

Roberto Giorda ve ark. (Giorda, ve diğerleri 2009) 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada, Xp11 bölgesinin non-sendromik X'e bağlı MR (MRX) altında yatan tüm gen defektlerinin yaklaşık % 30'unu taşıdığını öne sürmektedir. Çalışmalarında, izole veya sendromik MR'lu 2400 olguda tüm genom aCGH tekniği ile 200 kb.'dan daha büyük olup daha önce rapor edilmemiş olası tüm kopya sayısı (CNVs) değişikliklerini incelemişler ve iki erkek ile altı kadın (% 0,33) olguda Xp11.22 - p11.23 bölgesinde mikroduplikasyon tespit etmişlerdir. Olgularından 3 tanesinde anomaliler ailevi iken 3 tanesinde ise de novo

olarak ortaya çıkmıştır. Ancak, tüm etkilenmiş bireylerde sınırda veya ağır mental retardasyon ile konuşma güçlüğü aynı bizim olgularımızda da olduğu gibi gözlenmektedir. Olgularımızla ortak olan anomaliler; Artikülasyon bozukluğu, boğuk ve/veya nazal sesin genellikle mevcut olması, pes planus ve/veya pes cavus, 5. parmak hipoplazisi ve sindaktili gibi alt ekstremite anomalileri ile izole nöbetlerdir. X inaktivasyonu paterninin, olgularında duplikasyon boyutuyla ve etkilenmiş kişilerde X - inaktivasyonu derecesinin klinik fenotip şiddeti ile de ilişkili olmadığını göstermişlerdir. X - inaktivasyon paterni ve klinik bulgular değişken olsa da, duplikasyonlu X kromozomunu taşıyan kadınların çoğunun fenotipik olarak normal olmaları bizim ailemizde de olduğunu düşündüğümüz gibi X-inaktivasyonunun rastgele değil anormal X yönünde seçilmiş olarak yapıldığını düşündürmektedir. Ailemizde de sadece erkek bireylerde anomaliler gözlenmiştir.

Xp11.2, birkaç nörojenetik bozukluk için kritik bağlantı aralığında olan MRX (X kromozomuna bağlı Mental Retardasyon) genlerini barındıran genlerce zengin yeniden düzenlenmelere eğilimli bir bölgedir. Roberto Giorda ve ark.'larının çalışmasında saptanan duplike olan bölgede bulunan sekiz genden üçü (*SSX*, *MAGE*, *GAGE* ve *XAGE* dışındakiler) bilinen kalıtsal hastalıklarla ilgilidir; *SHROOM4* [MİM 300.579] bir MRX genidir. Bizim olgularımızda da gördüğümüz *XAGE 1A-B-C-D* ve *E* genleri, *GAGE* ailesine üye genlerdir. *GAGE* genleri, çeşitli tümörlerde, bazı fetal ve reproduktif dokularda eksprese olmaktadır. Özellikle Ewing's sarkoma'da eksprese olan bu genlerden kodlanan protein nükleer lokalizasyon sinyali içerir ve diğer *GAGE/PAGE* proteinleri ile dizi benzerliği gösterir. Bu proteinin, ekspresyon özelliği ve dizi benzerliği nedenleri ile CT (kanser-testis) antijenleri ailesine ait olduğu düşünülmektedir. Bu genin alternatif kırılma mekanizması nedeni ile alternatif transkripsiyon başlangıç bölgelerine ek olarak çeşitli transkripsiyon varyantları da oluşturduğu tespit edilmiştir (Nakagawa K, 2005). Bildiğimiz kadarıyla, Xp11.22 - p11.23 duplikasyonları bugüne kadar herhangi yayınlanmış bir çalışmada polimorfik değişiklik olarak rapor edilmemiştir.

Froyen ve ark.'ları (Froyen, G., ve diğerleri, 2012) 2012 yılında, 6 birbirinden bağımsız aileden non-sendromik MR'lu bireylerde yapmış oldukları array CGH çalışmasında Xp11.22 bölgesinde 0.4 ile 1.0 Mb arasında değişen büyüklükte duplikasyonlar saptamışlardır. Tüm olgularda MR, fasiyal dismorfizm, ürogenital anomaliler, gastroözofagial reflü, ve anormal yürüme gibi ortak özellikler gözlemelerine rağmen bu sendrom için ayırt edici bir fenotipik özellik belirleyememişlerdir. Ancak, tüm taşıyıcı kadınların fenotipik olarak normal olduğu sonucuna varmışlardır.

Mathieu Bertrand ve ark. (Bertrand, ve diğeri 2004) 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada, X kromozomu üzerinde çoğu ortak bir genomik lokus paylaşan (Scanlan, ve diğeri 2002) çoklu gen ailelerinin üyesi olan, melanoma antijen (*MAGE*), G antijeni (*GAGE*) ve X kromozomu antijeni (*XAGE*) multigen ailelerini de içeren kanser testis antijenleri listesinde yer alan *MAGE* genleri üzerinde araştırma yapmışlardır. Özellikle Tip I *MAGE*'ler X kromozomu üzerinde üç küme halinde kodlanmış 45'den fazla gen içerir ve son kanıtlar, tümör oluşumu ve kanser hücresi canlılığında aktif rol oynadıklarını göstermektedir (Cilensek, ve diğeri 2002) (Duan, ve diğeri 2003) (Liu, ve diğeri 2008) (Yang, ve diğeri 2007) Biyokimyasal ve hücre analizler *MAGE* proteinlerin RING domain proteinlerinin ubiquitin ligaz aktivitesini arttırmakta olduğunu göstermektedir. Ailemizde de etkilenmiş bireyler arasında kanser tedavisi görenler bulunmaktadır.

Holden ve ark.ları (2010) ise zihinsel engelli ve yapısal beyin anomalileri olan Xp11.22–p11.4 bölgesinde de novo duplikasyonlu kız olguda tam kandan izole edilen DNA'da yaptıkları X inaktivasyon analizinde hücrelerin çoğunda normal X kromozomunun tercihli inaktive olduğunu göstermişlerdir. Oysa, Matsuo ve ark.ları daha büyük duplikasyonlarda kadın anormal X kromozomunun tercihli inaktive olduğunun rapor edilmiş olmasına rağmen Xp11.2 - Xp11.4 bölgeleri ile sınırlı duplikasyonlarda genellikle X inaktivasyonunun rastgele olduğunu (Matsuo, ve diğeri 1999) (Portnoi, ve diğeri 2000) (Vokac, ve diğeri 2002) savunmuşlardır. Bizim ailemizde de kadınların (II-2, III-4, III-8) taşıyıcı olmaları ve sadece erkek olgularda anomalilerin görülmesi hücrelerin çoğunda kadınlarda tercihli olarak anormal X kromozomunun inaktive olduğunu düşündürmektedir.

Bonnet ve ark.ları ise (Bonnet, ve diğeri 2006) Xp11.22 - p11.23 bölgesinde de novo 5 Mb'lık duplikasyon olan bir erkek olguda fenotipik ve moleküler karakterizasyon ile ilgili yaptıkları çalışmada, erkeklerde X duplikasyonunun fenotipi gen dozajındaki artmaya bağlı olarak etkilemekte olduğunu, kadınların çoğunda ise aksine duplikasyonlu X kromozomunun inaktive olması nedeni ile fenotipik olarak normal olduğunu göstermişlerdir. Erkek olgularda özellikle mental retardasyon, fasiyal dismorfizm, ayak anomalileri, kısa boy ve nöbetler ortak fenotipik özellikler arasında sayılabilir. Ancak, erkeklerde tek tek genlerin duplikasyonlarının fenotipik etkileri ve genotip-fenotip korelasyonu hakkında bugüne kadar yapılmış olan tüm yayınlarda anlamlı ortak sonuçlara

varılamamıştır. Bu nedenle, söz konusu bölgeye ait duplikasyonların fenotipik etkilerine özgü daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Duplike olan bölgenin boyutunun fenotip üzerine etkisi olgularda klinik muayene ile değerlendirilmelidir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, standart sitogenetik analizlerle normal kromozom yapısı saptanmış olan belirli bir ailede, tekrarlayan farklı seviyelerdeki konjenital anomali ve/veya MR'ların etyolojisinde etkili olan genomik yeniden düzenlenmelerin araştırılmasında, FISH tekniğinin de araştırılacak aday gen/kromozom bölgelerinin klinik ya da sitogenetik yöntemler ile önceden belirlenmiş olmasının gerekliliği başta olmak üzere çeşitli dezavantajlarının bulunması nedeni ile yetersiz kalabildiği, hasta grubumuzda array temelli CGH Tekniğinin uygulanarak belirli bir ailede 3 kuşaktır sadece erkek bireylerde görülen anomalilerin etiyolojik tanısının kesinleşmesi böylece sonraki kuşaklarda tekrarını önlemeye yönelik izlenecek yola karar verilmesi amaçlanmıştır.

CGH tekniği geliştirilmeden önce rutin sitogenetik teknikler ile normal kromozom kuruluşu saptanmış olan özellikle MR düzeyi hafiften ağıra kadar olan olgularda, subtelomerik problemler ile tanı konulmaya çalışılmış ve yaklaşık %10'unda anomali saptanabilmiştir. Ancak, son yıllarda CGH tekniğinin özellikle de array temelli CGH tekniğinin geliştirilmesi ile genomik yeniden düzenlenmelerin saptanma oranı % 20-24'lere kadar çıkarılabilmektedir.

8 ağır MR'lu erkek olgu ile bunlarla akrabalık bağı olan normal fenotipe sahip 12 ve aileden olmayan 2 olgu olmak üzere toplam 22 olgudan oluşan çalışma grubumuzda, GTG bantlama tekniği ile 500-550 bant düzeyinde herhangi bir kromozomal anomali saptanamazken array temelli CGH tekniği ile 8 mental retarde olgunun tümünde X kromozomunun p11.22 bölgesinde 52210273-52745818 aralığında 535,5 Kb'lık (535545 bp'lık) bir genomik bölgede farklı boyutlarda kazanç saptanmıştır. Ayrıca, aynı aileden normal fenotipe sahip 3 kadın olguda da aynı genomik lokusta farklı boyutlarda genomik kazanç gözlenmiştir.

Çalışmamızda, gen başına 3 probun yer aldığı, 60 mer'lik problemlerle tüm genomu tarayan tek bir mikrodizin lamı üzerine 12 örneğin hibridizasyonunun yapılabildiği **Human CGH 12x135K Whole-Genome Tiling v3.0 Array** (NimbleGen, Roche mikrodizin)'den 2 array platformu kullanılmıştır. Mikrodizin çalışmasında kromozomal ve kopya sayı farklılıkları saptanan bölgelerin doğrulanması (validasyon) için farklı yöntemler izlenebilir. Bu yöntemlerin hangisinin kullanılacağına veya kaç mer'lik prob kullanılması

gerektiğine bulunan değişimin cinsine göre karar verilmesi doğru olur. Değişim bir delesyon ise farklı bir yöntem düşünölebilecekken duplikasyon ise daha başka bir yöntem düşünölebilecektir.

Delesyonlarda konfirmasyon çalışması için BAC klonlar kullanılarak özel olarak dizayn edilmiş problemlerle FISH çalışması yapılabilir ve sinyal yokluğu ile delesyon kolaylıkla gösterilebilir. Ayrıca, duplikasyonlarda da biri duplike olan bölgenin proksimaline diğeri ise distaline lokalize olmak üzere iki çeşit BAC klon kullanılarak FISH çalışması yapılabilir. Böylece, duplike segmentlerin lokasyon ve rölatif yerleşimi bu teknikle belirlenebilir.

Bulunan duplikasyon bölgesi içinde yer alan informatif SNP'ler kullanılarak bağlantı analizi ile kritik duplikasyon bölgesi biraz daha daraltılabilir. Daha sonra daraltılan bu duplikasyon bölgesi ailenin diğer bireyleri ve normal popülasyondan alınmış DNA örneklerinde konfirme edilir. Bu konfirmasyon çalışması, bölgenin büyüklüğüne göre MLPA (Multipleks Ligasyon Prob Amplifikasyonu) veya FISH gibi diğer bir yöntemle yapılabilir. Duplike bölgenin aile içi kalıtımı, informatif SNP'lerin kullanıldığı haplotip analizi ile belirlenmeye çalışılır. Kadın kontrollerden üçünde (II-2, III-4, III-8) 535,5 Kb.'lık kritik bölgemizde bulunan duplikasyonların yer aldığı X kromozomunun hücrelerin çoğunda inaktive olduğunu göstermek amacıyla bir sonraki aşamada X-inaktivasyon analizleri yapılabilir. Taşıyıcı kadınlardan elde edilen DNA örneklerinde Androjen-reseptör gen metilasyon analizi ile metilasyon durumu dolayısıyla inaktivasyon belirlenebilir.

Bunlara ek olarak, kritik duplikasyon bölgesi içinde kalan genlerin ekspresyonunda değişiklik olup olmadığı da kantitatif gerçek zamanlı PCR tekniği ile analiz edilebilir.

Ayrıca, 52210273-52745818 aralığında 535,5 Kb'lık bulduğumuz kritik bölgenin olgular, taşıyıcı kadınlar ve normal olduğunu düşündüğümüz aile bireylerinde yeni nesil dizi analizi ile incelenmesi yapılabilir. Çıkan veri hastalıkla ilişkilendirilebilecek gen bölgesi açısından biyoinformatik analizlerle değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, DJ, ve DA. Clark. «Common genetic and epigenetic syndromes.» *Pediatr Clin North Am.*, 2015: 411-26.
- Bertrand, M, I Huijbers, P Chomez, ve O. De Backe. «Comparative Expression Analysis of the MAGED Genes During Embryogenesis and Brain Development.» *Developmental Dynamics* 230, 2004: 325–334.
- Bhat SP. «Synthesis of nucleic acid probes on membrane supports: a procedure for the removal of unincorporated precursors.» *Anal Biochem*, 1990: 59-62.
- Bonnet C, M Gre´goire, K. Brochet, E Raffo, B Leheup, ve P. Jonveaux. «Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22–p11.23 in a male:phenotypic and molecular characterization.» *J Hum Genet*, 2006: 815–821.
- Burç Laboratuvarı, 2013. Erişim: 02 Ocak 2016, <http://www.burclab.com>
- Cilensek Z.M, F Yehiely, R.K Kular, ve L.P. Deiss. «A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation.» *Cancer Biol. Ther.* 1, 2002: 380–387.
- de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. «Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist.» *J Med Genet*, 2001: 145-150.
- Duan Z, ve diğerleri. «Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines.» *Clin. Cancer Res.* 9, 2003: 2778–2785.
- Ferguson-Smith MA. «Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications.» *Eur J Hum Genet*, 1997 : 263-265.
- Flint J, AO Wilkie, VJ Buckle, RM Winter, AJ Holland, ve HE. McDermid. «The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation.» *Nat Genet.*, 1995 : 132-40.
- Flint J, Thomas K, Micklem G, Raynham H, Clark K, Doggett NA, King A, Higgs DR. «The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region.» *Nat Genet.*, 1997: 252-7.
- Fusco, JC. «Human chromosome-specific DNA libraries: use of an oligodeoxynucleotide probe to detect non-recombinants.» *Gene.*, 1987: 291-6.
- Froyen, G., Belet, S., Martinez, F., Santos-Reboucas, C. B., Declercq, M., Verbeeck, J., Donckers, L., Berland, S., Mayo, S., Rosello, M., Pimentel, M. M. G., Fintelman-Rodrigues, N., and 12 others. «Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements. » *Am. J. Hum. Genet.*, 91: 252-264, 2012.

- Gall JG, ve ML. Pardue. «Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.» *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 1969 : 378–383.
- Ghaffari S, E Boyd, L Tolmie, J Crow, A Trainer, ve J. Connor. «A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation.» *J Med Genet*, 1998: 225-233 .
- Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P, Urquhart J, Sharkey FH, Zucca C, Grasso R, Marelli S, Castiglia L, Di Benedetto D, Musumeci SA, Vitello GA, Failla P, Reitano S, Avola E, Bisulli F, Tinuper P, Mastrangelo M, Fiocchi I, Spaccini L, Torniero C, Fontana E, Lynch SA, Clayton-Smith J, Black G, Jonveaux P, Leheup B, Seri M, Romano C, dalla Bernardina B, Zuffardi O. «Complex Segmental Duplications Mediate a Recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) Associated with Mental Retardation, Speech Delay, and EEG Anomalies in Males and Females.» *The American Journal of Human Genetics*, 2009: 394–400.
- Hagberg, B, ve M. Kyllerman. «Epidemiology of mental retardation--a Swedish survey.» *Brain Dev.*, 1983: 441-449.
- Holden, S, A Clarkson, S Thomas, K Abbott, J Matthew, ve W. Lionel. «A De Novo Duplication of Xp11.22–p11.4 in a Girl With Intellectual Disability, Structural Brain Anomalies, and Preferential Inactivation of the Normal X Chromosome.» *American Journal of Medical Genetics part a Received 1*, 2010 : 1735-40.
- Holmes, EC, LQ Zhang, P Simmonds, AS Rogers, ve AJ. Brown. «Molecular investigation of human immunodeficiency virus (HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon.» *J Infect Dis.*, 1993: 1411–1414.
- Höfler, H. «Oncogenes and oncogene products--possibilities and significance of their detection.» *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1990: 319-27.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. «Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.» *Science.* , 1992 : 818-21.
- Knight, S, ve J. Flint. «Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis.» *J Med Genet*, 2000: 401–409.
- Langer, PR, AA Waldrop, ve DC. Ward. «Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1981: 6633-7.
- Lichter, P, AL Boyle, T Cremer, ve DC. Ward. «Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization.» *Genet Anal Tech Appl.* , 1991: 24-35.
- Lichter, P, ve T. Cremer. *Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In: Human Cytogenetics A Practical Approach.* Oxford: IRL Press, 1992.
- Liu, W, S Cheng, S.L Asa, ve S. Ezzat. «The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis.» *Cancer Res.* 68, 2008: 8104–8112.

- MA Ferguson-Smith. «Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications.» *Eur J Hum Genet*, 1997: 253-65.
- Manuelidis, L. «Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs.» *Chromosoma*, 1981.
- Matsuo M, Muroya K, Kosaki K, Ishii T, Fukushima Y, Anzo M, Ogata T. «Random X-inactivation in a girl with duplication Xp11.21-p21.3: Report of a patient and review of the literature.» *Am J Med Genet* 86, 1999: 44–50.
- Nakagawa K, Noguchi Y, Uenaka A, Sato S, Okumura H, Tanaka M, Shimono M, Ali Eldib AM, Ono T, Ohara N, Yoshino T, Yamashita K, Tsunoda T, Aoe M, Shimizu N, Nakayama E. «XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients.» *Clin Cancer Res.*, 2005 Aug 1;11(15): 5496-503.
- Pardue, ML, ve JG. Gall. «Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations.» *Methods Cell Biol*, 1975: 1–16 .
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. «Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays.» *Nat Genet.*, 1999 : 2341–46.
- Portnoi, MF, ve diğerleri. «Molecular cytogenetic analysis of a duplication Xp in a female with an abnormal phenotype and random X inactivation.» *Clin Genet* 58, 2000: 116–122.
- Roeleveld, N, GA Zielhuis, ve F. Gabreëls. «The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature.» *Dev Med Child Neurol*, 1997: 125-32.
- Rosenberg C., Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. «Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. » *J. Med. Genet.*, 2006: 43:180-186.
- Scanlan, M.J, A.O Gure, A.A Jungbluth, L.J Old, ve Y.T. and Chen. «Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy.» *Immunol. Rev.*, 2002: 22–32.
- Seabright M. « Human chromosome banding. » *Lancet*, 1972 Apr 29;1(7757):967.
- Solinas-Toldo, S, ve diğerleri. «Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances.» *Genes Chromosomes Cancer*, 1997: 399-407.
- Strachan, T. «Read AP. Instability of the human genome: mutation and DNA repair. Chapter II. In: Strachan T, Read AP (eds).» *Human Molecular Genetics*, 2004: 316-349.
- Tharapel, SA, RS Wilroy, AM Keath, ML Rivas, ve AT. Tharapel. «Identification of the origin of ring/marker chromosomes in patients with Ullrich-Turner syndrome using X and Y specific alpha satellite DNA probes.» *Am J Med Genet*, 1992: 720-3.
- Thompson, Mc Innes ve Willard, Thompson and Thompson: Genetics in medicine. 1991.

- van Zelderen-Bhola, SL, ve diğerleri. «Prenatal and postnatal investigation of a case with Miller-Dieker syndrome due to a familial cryptic translocation t(17;20) (p13.3;q13.3) detected by fluorescence in situ hybridization.» *Prenat Diagn*, 1997 : 173-9.
- Verdier, S, G Restrepob, M Mosquerab, A Duqueb, ve R. Laberry. «Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela V.» *Phytopathology*, 1997: 601-608.
- Vokac, N, S Ciglenecki, A Erjavec, B Zagradisnik, ve A. Zagorac. «Partial Xp duplication in a girl with dysmorphic features: The change in replication pattern of late-replicatingdup X chromosome.» *Clin Genet.*, 2002: 54–61.
- Warburton, D, ve Z. Stein. «In utero selection against fetuses with trisomy.» *Kline J. Am J Hum Genet*, 1983: 1059-1064.
- Warford, A, ve I. Lauder. «In situ hybridisation in perspective.» *J Clin Pathol*, 1991: 177–181.
- Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK. «In situ hybridization with fluoresceinated DNA.» *Nucleic Acids Res.* 1991 Jun 25;19(12):3237-41.
- Wilkie AOM, Buckle VJ, Harris PC, Lamb J, Barton NJ, Reeders ST, Lindenbaum RH, Nicholls RD, Barrow M, Bethlenfalvay NC, Hutz MH, Tolmie JL, Weatherall DJ, Higgs DR. «Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. » *Am J Hum Genet.*, 1990;46: 1112–26.
- Wilkinson DG. *In Situ Hybridization A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1992.
- Willard, HF. «Centromeres of mammalian chromosomes.» *Trends Genet*, 1990: 410-416.
- Yang, B, ve diğerleri. «MAGE-A, Mage-B, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines.» *Cancer Res.* 67, 2007: 9954–9962.
- Yunis, JJ. «High resolution of human chromosomes.» *Science*, 1976: 1268-1270.
- Zaki SR, Austin GE, Chan WC, Conaty AL, Trusler S, Trappier S, Lindsey RB, Swan DC. «Chromosomal localization of the human myeloperoxidase gene by in situ hybridization using oligonucleotide probes.» *Genes Chromosomes Cancer*, 1990: 266-70.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	EBRU PERİM AKÇAY (ÖNAL)
Doğum Tarihi-Yeri	:1970, İstanbul
Medeni Durum	: Evli
Adres	: Atatürk Mah. 43-A-Ada Gardenya 2-6 k:7 d:32 ATAŞEHİR/İST
GSM	: (0532) 452 46 90
Doktora	Kocaeli Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Kocaeli 2008- İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik, İstanbul
Yüksek Lisans	2003- İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik, İstanbul
Üniversite	1998-2001 İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü, İstanbul 1992-1998 Mimar Sinan Üniversitesi Mimarlık Fakültesi, İstanbul 1987-1992
Lise	Özel Toros Koleji, Mersin 1981-1987
İş Deneyimleri	Nesiller Genetik Tanı Merkezi, Sitogenetik Laboratuvar Sorumlusu, 2013- Ati Teknoloji Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Sitogenetik Laboratuvar Sorumlusu, 2010-2013 Amerikan Hastanesi, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Sitogenetik Laboratuvar Sorumlusu, 2006- 2010

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fak. PRETAM,

Sitogenetik Asistanı,

1997- 2006

Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Genetik Bölümü,

Stajyer,

1996

Araştırma Deneyimleri

Pre-natal (Amniyotik Sıvı, Koriyonik Villus, Kordon Kanı),

Post-natal (Periferik Kan, Deri Biyopsisi, Gonad Biyopsisi, Kemik İliği) ve Hematolojik-onkolojik olgularda tanı amacıyla sitogenetik teknikler ile FISH tekniklerinin uygulanması ve gerekli analizlerin yapılmasının tüm aşamaları üzerine güçlü 19 yıllık bir iş deneyimi.

Aşağıdaki gibi rutin sitogenetik prosedürlerde etkinlik;

- Kısa ve Uzun Süreli Hücre kültürlerinin hepsinin hazırlanması (primer kültürlerin hazırlanması, gerekli durumlarda pasaj yapılması, hücre tutunmalarının ve kültür devamının sağlanması, kültür kontrollerinin yapılması).
- Harvest
- Preparasyon
- GTG ve diğer bantlama teknikleri
- Pre-post natal kromozom analizleri
- Karyotipleme
- Solüsyon hazırlanması
- Mikroskop analizlerinin yapılması ve bu amaçla her çeşit görüntüleme sistemlerinin kullanılması,
- Spesifik sitogenetik tekniklerin (FISH) uygulanması ve analizlerinin yapılması,
- Mevcut metodların geliştirilerek güncellenmesi,
- Ayrıca, hasta sonuçlarının yorumlanarak raporlandırılması.

Yabancı Dil

İngilizce

Bilgisayar Bilgileri

Microsoft Ofis Programları

Otomatik Görüntüleme ve Tarama Sistemleri (Cytovision)