

48834

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Genetik Anabilim Dalı

**KROMOZOMLARDA ÇEŞİTLİ SİTOGENETİK  
YÖNTEMLERLE HETEROMORFİK BÖLGELERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

48834

**Tıbbi Biyolog Ayşe ÇIRAKOĞLU**

**Danışman : Y. Doç. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU**

**İstanbul - 1995**



T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Genetik Anabilim Dalı

**KROMOZOMLARDA ÇEŞİTLİ SİTOGENETİK  
YÖNTEMLERLE HETEROMORFİK BÖLGELERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

T 48834

(Yüksek Lisans Tezi)

**Tıbbi Biyolog Ayşe ÇIRAKOĞLU**

**Danışman : Y. Doç. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**İstanbul - 1995**

## TEŐEKKÜR

Yaptığım çalıőmanın birçok aőamasında, t¼m lisans ve y¼ksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Cerrahpaőa Tıp Fak¼ltesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler B¼l¼m Baőkanı, sayın hocam Prof. Dr. Asım Cenani'ye,

Tezimin planlanması, y¼r¼t¼lmesi ve sonuçlanmasında katkılarını, teővik ve yardımlarını g¼rd¼ę¼m, Tıbbi Biyolojik Bilimler Genetik Anabilim Dalı Baőkanı, sayın hocam Yard. Doç. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Birlikte alıőtıęım s¼rece bilgilerini benimle paylaőan Tıbbi Biyolog Yelda Tarkan'a,

Yardımları için Uzm. Bio. Dr. Ayhan Deviren, Uzm. Tıp. Bio. Dr. Aslı Silahtaroğlu ve Tıbbi Biyolog Ufuk Őerafettinoęlu'na ve b¼l¼m¼m¼z¼n diğer t¼m elemanlarına,

Çalıőmam s¼resince desteğini esirgemeyen sevgili arkadaőım Dr. Vedia Metti'ye,

Ve t¼m yaőamım boyunca olduğu gibi, bu çalıőmam sırasında da beni daima destekleyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme sonsuz sevgi ve teőekk¼rlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
II. GENEL BİLGİLER .....	3
II.1. DNA Yapısı .....	3
II.2. İnsan Kromozomlarının Yapısı ve Fonksiyonu .....	4
II.3. Kromozomların Elde Edilmesi .....	7
II.4. İnsanda Kromozomların Sınıflandırılması .....	7
II.4.1. Denver Sınıflamasına Göre Kromozom Grupları .....	8
II.5. İnsan Genomundaki DNA Çeşitleri .....	11
II.6. Kromatin Tipleri .....	13
II.6.1. Ökromatin .....	13
II.6.2. Heterokromatin .....	13
II.7. Kromozomların Özel Yapıları .....	15
II.7.1. Sentromerler .....	16
II.7.2. NOR (Nuclear Organizing Regions: Nükleola Organize Bölgeler) .....	17
II.7.3. Telomerler .....	18
II.7.4. Satelitler .....	19
II.8. Kromozomal Polimorfizmler .....	19
II.9. İnversiyon .....	20
II.10. Bantlama Teknikleri .....	22
II.10.1. Q Bantlama .....	23
II.10.2. C Bantlama .....	24
II.10.3. DA/DAPI Boyama .....	26
II.10.4. NOR'ların Gümüşle Boyanması .....	28

III. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....	30
III.1. Materyal .....	30
III.2. Yöntemler .....	30
III.2.1. Periferik Kan Kültürü .....	30
III.2.2. Preparatların Hazırlanması .....	31
III.2.3. Bant Teknikleri .....	31
IV. BULGULAR .....	37
V. TARTIŞMA .....	53
VI. ÖZET .....	61
VII. SUMMARY .....	62
VIII. KAYNAKLAR .....	63

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan somatik hücreleri 23 çift kromozoma sahiptir. Çeşitli sitogenetik boyama ve bantlama yöntemleri ile incelenerek 23 çift kromozom ayrı ayrı sınıflandırılmıştır. Kromozomlarda, çeşitli sayı ve şekil düzensizlikleri ve bu düzensizliklerin meydana getirdiği klinik bulgular gösterilmiştir (7,17,48). Bunların yanısıra belli bazı kromozomların boylarında görülen farklılıkların klinik olarak herhangi bir bulguya sebep olmadığı farkedilmiştir (7,17,48). Toplumda yüksek sıklıkta rastlanan ve fenotipik etki göstermeyen genetik değişimler "Polimorfizm" olarak tarif edilmiştir (35). Paris Konferansı'nda, kromozomlardaki genetik değişkenliklere "Polimorfizm" yerine "Heteromorfizm", bu değişken bölgelere de "Heteromorfik Bölgeler" terimlerin kullanılması uygun görülmüştür (2,35).

Heteromorfik bölgelerin, çok tekrarlayan DNA dizilerinden oluştuğu ve gen kodlamadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle fenotip üzerinde bir etkisinin bulunmadığı düşünülmektedir (46). Mendelyen kalıtım gösterdikleri, kalıcı (stabil) oldukları ve düşük mutasyon oranı gösterdiklerinden, insan kromozomlarındaki heteromorfizmlerden çeşitli alanlardaki çalışmalarda yararlanılmaktadır: Trizomilerde fazla kromozomların orijinlerinin saptanmasında, amniotik hücre kültürlerinde maternal kontaminasyonun belirlenmesinde ve babalık tayininde heteromorfizmlerden yararlanılmaktadır (34,51).

Heteromorfik bölgelerin, gen kodlamayan dizilerden oluştuğu tespit edilmiş olsa da bu bölgelerin, henüz bilinmeyen bazı fonksiyonlara sahip olduğu düşünülmektedir. Heteromorfizmlerin, konjenital malformasyonlar (13,38,39), mental retardasyon (8), kanser (1,24,50), tekrarlayan düşükler (15,19,30,62) ve yaşla (56) olan ilişkisi sürekli araştırılan konular arasında yer almaktadır.

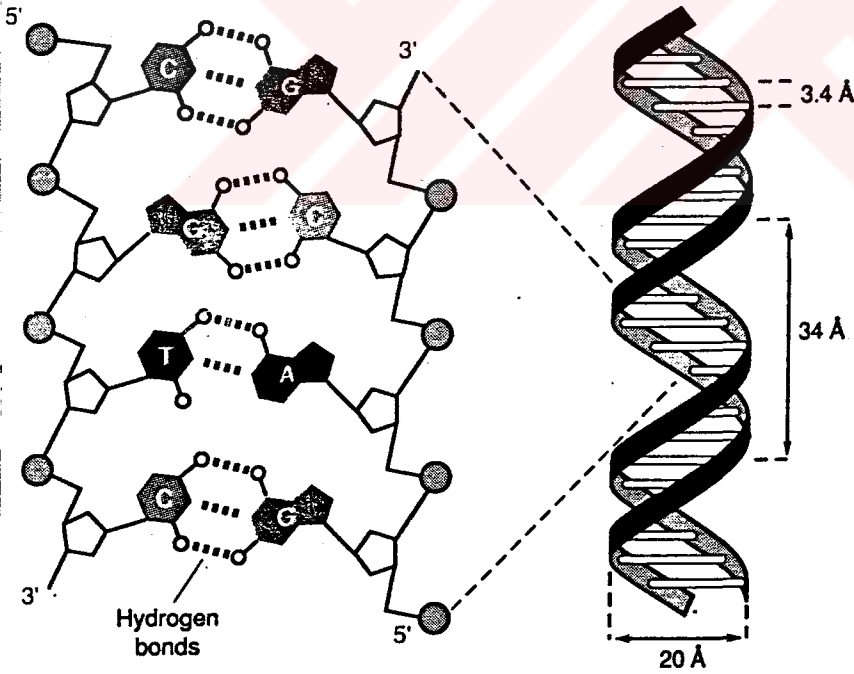
Heteromorfizmleri tespit etmek için en çok kullanılan sitogenetik yöntemler; CBG (Baryum Hidroksit kullanılarak Giemsa boyama ile C bantlama), QFQ (Quinacrine kullanılarak Fluoresan Q bantlama), DA/DAPI (Distamycin A/4,6-Diamidino-2-Phenylindole), Ag-NOR (Gümüfleme ile NOR bölgelerin gösterilmesi), G-11 (Giemsa-11) gibi boya ve bantlama teknikleridir (2).

Bu çalışmada CBG, QFQ ve DA / DAPI yöntemleri kullanılarak heteromorfizmlerin gösterilmesi ve yöntemlerin karşılaştırılması amaçlandı. Akrosentriklerin NOR bölgelerinin aktivitesini göstermek amacıyla da Ag-NOR yöntemi kullanıldı. Rutin sitogenetik analiz sırasında tespit edilen şüpheli kromozomların ve marker kromozomların heteromorfik olup olmadığı, bu bant yöntemleri ile incelenerek orijinlerinin belirlenmesine çalışıldı.

## II. GENEL BİLGİLER

### II.1. DNA YAPISI

DNA, polimerik bir nükleik asid molekülüdür ve üç bölümden oluşur: 5 karbonlu bir şeker molekülü olan deoksiriboz, azot içeren bir baz ve bir fosfat grubu. DNA yapısında yer alan bazlar, pürin ve pirimidin olmak üzere iki tiptir. DNA'da iki pürin bazı, timin (T) ve sitozin (C) bulunur. Baz, fosfat ve şekerin birleşmesi ile nükleotid oluşur ve fosfodiester bağları ile 5'-3' yönündeki komşu deoksiriboz kısımlarına bağlanarak uzun polinükleotid zincirleri oluşturur. İnsan kromozomlarında, çift sarmal yapısındaki bu polinükleotid zincirleri yüz milyonlarca nükleotidden oluşmuştur (48).



Şekil II.1. : DNA Molekülü (48)

## II.2. İNSAN KROMOZOMLARININ YAPISI VE FONKSİYONU

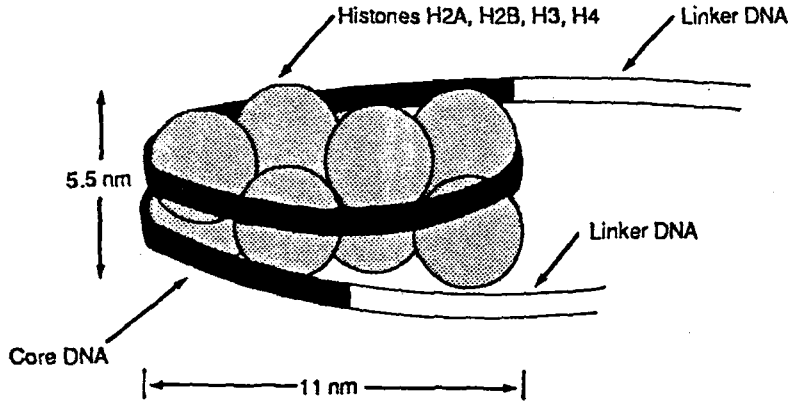
Kromozomlar, bölünen hücrelerde koyu boyanmış kısımlar olarak görülürler. Hücre bölünmesinin interfaz döneminde kromatin ipliği halindeyken, metafaz safhasında en kompakt şekli alırlar. Mitokondride bulunan küçük bir miktar DNA dışında, bir hücredeki genetik materyalin hemen hemen tümü, kromozomlarda taşınmaktadır (17, 48).

İnsanda, somatik hücrelerde kromozomların sayısı 46 olup, 23'ü anneden, 23'ü de babadan gelmektedir. Cinsiyet kromozomlarına gonozom, bunlar dışında kalan kromozomlara ise otozom adı verilir. İnsanda 23 çift otozom, bir çift de gonozom vardır. Kadında cinsiyet kromozomları XX, erkekte ise XY'dir (17, 48).

Bir insan hücre nükleusunda yaklaşık  $6 \times 10^9$  nükleotid baz çifti bulunur. 3000 nükleotid baz çifti  $1 \mu$  uzunluğuna karşılık gelir. Buna göre hücre içindeki DNA boyu yaklaşık 2m'dir. Bu uzun DNA ipliği, kromozomlara paketlenerek nükleusa sığabilecek hale gelir.

Kromozomlar sadece çıplak DNA'dan oluşmaz. Histon adı verilen bazik proteinler ve nonhiston adı verilen asidik proteinler ile kompleks halinde bulunur. Bu, DNA ve protein kompleksi kromatin adını alır. Histonlar, H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere beş tiptir. Bunlar, kromatinin doğru paketlenmesinde önemli rol oynarlar. H2A, H2B, H3 ve H4'ün ikişer kopyası, bir oktamer yapısı oluşturur. 140 baz çiftlik DNA, bu oktamerin etrafında yaklaşık iki dönüş yaparak histon çekirdeğini (core) oluşturur. Kısa bir "bağlayıcı (=linker)" DNA segmentinden (20-60bp) sonra, diğer çekirdek DNA kompleksi oluşur. Bu olay bu şekilde devam ederek kromatine boncuk dizisi görüntüsünü verir. DNA ile çekirdek histonlarının kompleks meydana getirmiş hali, nükleozom olarak adlandırılır ve kromatinin temel yapısal bölümünü oluşturur (Şekil II.2). Histon 1 (H1) nükleozomlar arasındaki ara bölgede, nükleozomların ucundaki DNA'yı

bağlar. Çekirdek nükleozom ve ara bölgeyi içeren bir kromatin ünitesi ile birlikte DNA'nın miktarı yaklaşık 200 baz çiftidir (46, 48).

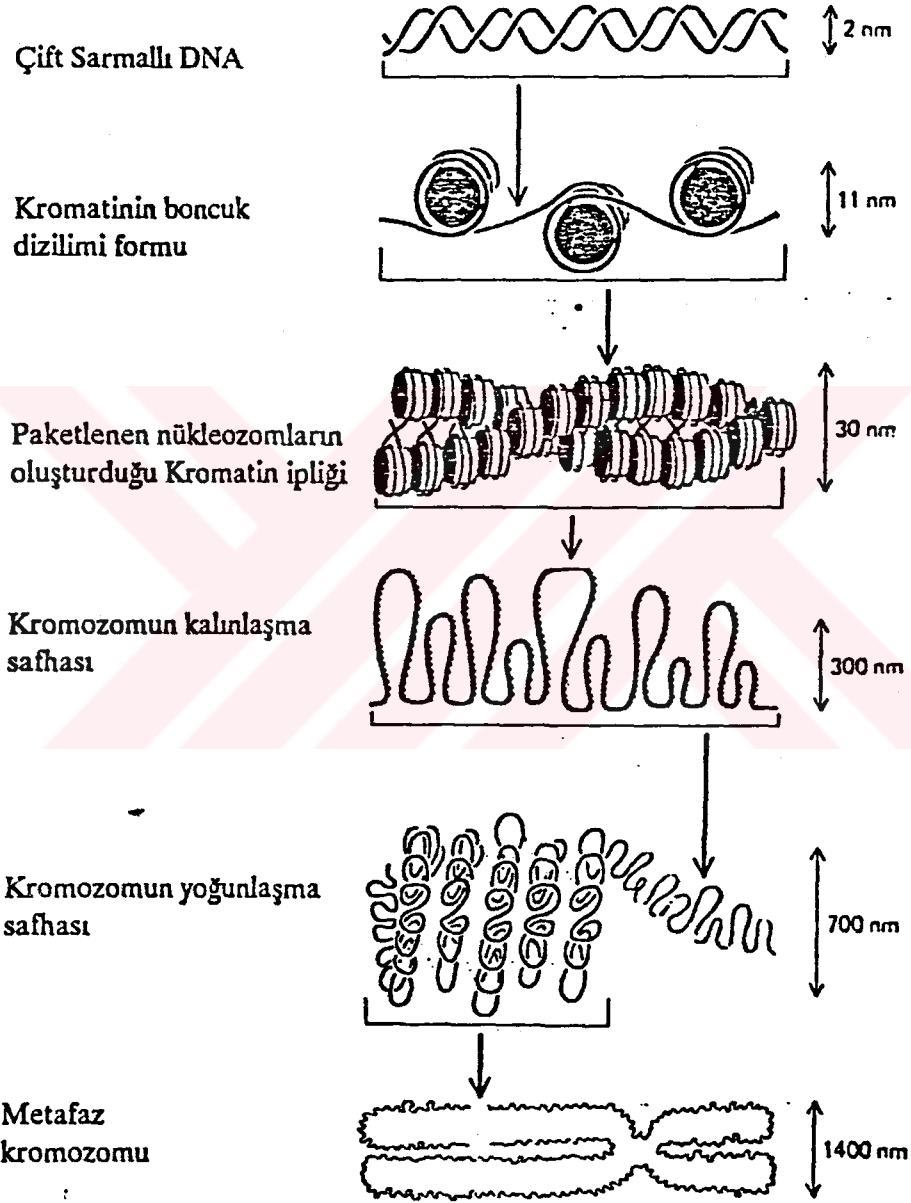


**Şekil II.2.** : DNA ile çekirdek histonlarının oluşturduğu nükleozom kompleksi (3)

Hücre siklusü boyunca, kromozomlar, kondansasyon ve decondansasyon safhalarında düzenli olarak incelenmiştir. Kromatinin en az kondanse olarak bulunduğu interfaz safhasında, DNA, uzunluğunun yaklaşık onda biri kadar kondanse durumdadır. Yani çıplak çift sarmal iken yaklaşık 15cm uzunluğundaki, insan 1. kromozomunun DNA'sı, kromozomal proteinlerle kompleks yaptığında 1.5cm olur (48).

Uzun nükleozom iplikleri, kendi üzerlerine heliks şeklinde katlanarak sekonder kromatin yapısı olan SOLENOİD yapıyı oluşturur. Bu yapı, nükleozomal iplikten yaklaşık 3 kez daha yoğun olup, elektron mikroskopunda 30nm çapında kalın bir iplik olarak görülmektedir. Solenoidin her dönüşü yaklaşık 6 nükleozom içerir. Böylece bu katlanma düzeyinde interfaz nükleusunda 1. kromozomu meydana getiren kromatin yaklaşık 0.3cm olur. Solenoidler yaklaşık 10-100 kilobaz aralıklarla bir nonhiston iskeleti veya matriksine bağlı ilmekler veya domainler olarak kendi üzerlerine katlanır. Bu ilmeklerin, erken profaz kromozomlarında görülen, kromomer olarak nitelendirilen yoğunlaşma bölgelerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Kromomerler birleşerek G-bantlı profaz ve metafaz kromozomlarında koyu boyanan bantları oluştururlar.

Profazda 1. kromozom, çıplak çift sarmal uzunluğunun 1/3000'i kadar kondanse olmuş ve boyu yaklaşık 50nm'ye kısalmıştır. En fazla kondanse olduğu dönem olan metafazda, kromozomlardaki DNA, gerçek uzunluğunun 1/10000'i kadardır (18, 46, 48).



**Şekil II.3. :** DNA'dan kromozom oluşumu "Solenoid Modeli" (46)



### II.3. KROMOZOMLARIN ELDE EDİLMESİ

Kromozomlar, bölünen hücrelerden elde edilir. Hücreleri, bölünme sırasında elde etmek için değişik kültür yöntemleri kullanılabilir: Uzun süreli, kısa süreli, çok kısa süreli kültürler. Kromozomların en iyi incelenebildiği dönem geç profaz ve metafaz safhalarıdır. Hücre bölünmesini bu safhada durdurmak için mitotik iğ iplikçığı inhibitörü olarak Kolşisin kullanılır. Kolşisin, mitotik iğ iplikçiklerini oluşturan mikrotubullerin polimerizasyonlarını inhibe ederek, mikrotubullerin yapılaşmasını engellerler. Böylece kromozomların kutuplara gitmesi önlenerek metafaz plağında kalması sağlanır. Bu aşamadan sonra hücreye hipotonik şok uygulanır. Hipotonik şok için kullanılan solüsyonun, sitoplazmadan daha küçük konsantrasyonda tuz içermesi gerekir. Bunun için en uygun solüsyon, 0.075M KCl (potasyum klorür) dür. Su, konsantrasyon gradiyenti nedeniyle hücre içine girer. Suyun sitoplazmik membrandan devamlı geçişinden dolayı hücre şişer ve içinde kromozomların süspansiyonu olduğu, içi su dolu bir balona benzer. Daha sonra hücrelerin sabit olarak tutulması, hücre fonksiyonlarının durması ve hücrelerin daha fazla şişmelerini önlemek amacı ile hücreler tespit edilir. Karnoy Fiksatif (3:1 Metanol:Asetik asit) en yaygın olarak kullanılan fiksatiftir. Tespit işleminden sonra hücreler yayılıp boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenir (2, 29, 33).

### II.4. İNSANDA KROMOZOMLARIN SINIFLANDIRILMASI

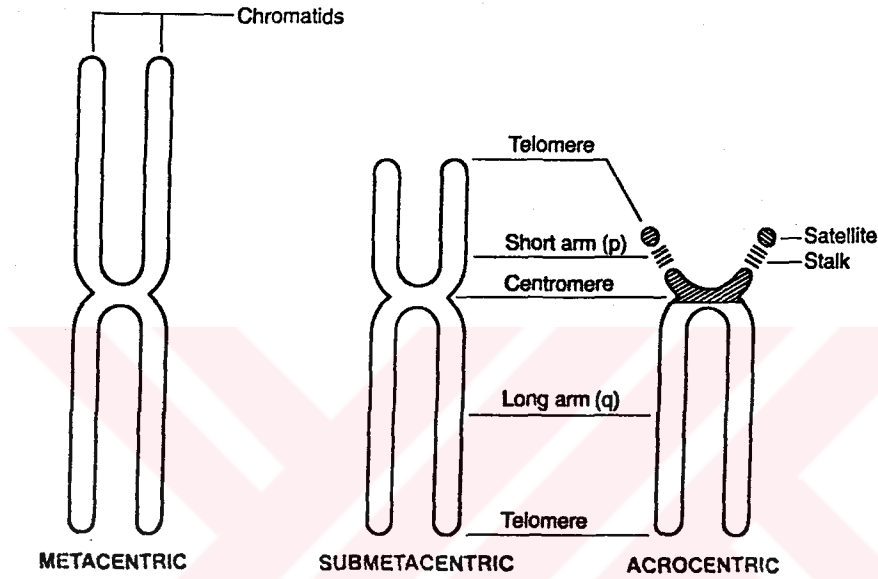
Kromozomlar sentromer pozisyonlarına göre sınıflandırılır (17, 46).

*Metasentrik* : Sentromerin merkezde olduğu ve kolları birbirine eşit olan kromozomlardır.

*Submetasentrik* : Sentromerin merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlardır.

*Akrosentrik* : Sentromerin kromozomun bir ucuna yakın olduğu kromozomlardır.

Sentromerleri kromozomun ucunda olan ve telosentrik olarak adlandırılan kromozomlara insanda rastlanmaz.



**Şekil II.4. :** Sentromer pozisyonlarına göre kromozomlar (48)

Kromozomlar, büyüklükleri ve sentromer pozisyonları dikkate alınarak Denver Sınıflamasına göre gruplara ayrılmışlardır (17, 48).

#### **II.4.1. Denver Sınıflamasına Göre Kromozom Grupları**

##### **A GRUBU (1, 2, 3)**

Üç çift kromozomdan oluşur. 1 no'lu kromozom en büyük kromozomdur ve metasentriktir. Uzun kolunun merkeze yakın kısmında sekonder konstriksiyon (darlık) adı verilen ikinci bir darlık taşıyabilir. 2. kromozom büyük submetasentrik bir kromozomdur. 3. kromozom metasentriktir ve bu gruptaki en kısa kromozomdur.

#### B GRUBU (4, 5)

Uzun submetasentrik kromozomlardır ve ancak bant yöntemleri ile birbirlerinden ayrılabilirler.

#### C GRUBU (6-12, X)

Genel olarak submetasentrik, orta uzunlukta kromozomlardır. Sadece sentromer pozisyonları ve uzunlukları ile birbirlerinden ayırdedilebilmeleri güçtür. 6, 7, 8 ve 11 no'lu kromozomların sentromerleri diğerlerine göre ortaya daha yakındır. X kromozomu ise metasentriğe yakındır ve büyüklük olarak 6. kromozomdan sonra gelir. Bu grup içinde, 9. kromozom, sekonder darlık taşıyabilir.

#### D GRUBU (13-15)

Büyük akrosentrik kromozomlardır.

#### E GRUBU (16-18)

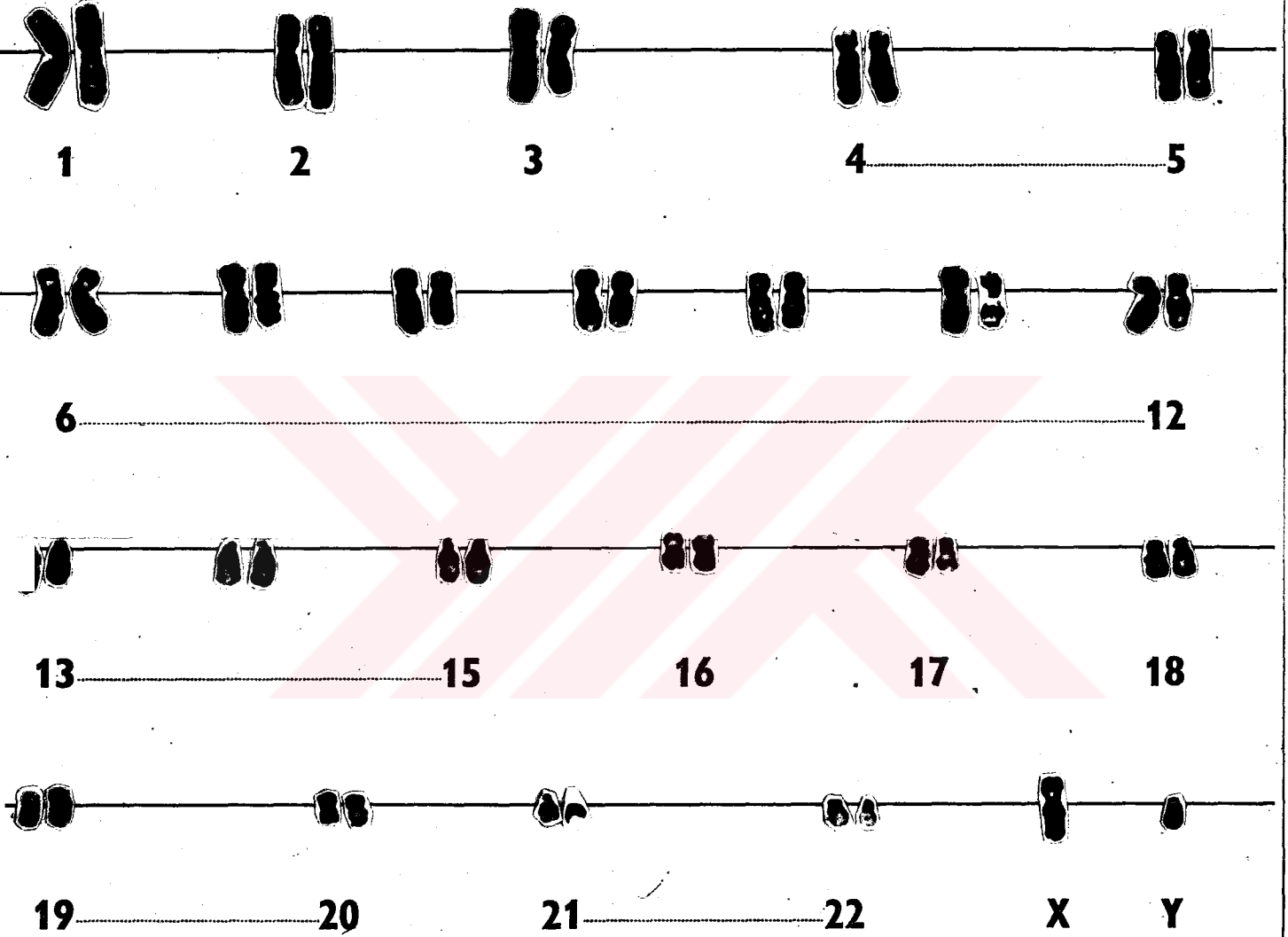
Küçük submetasentrik kromozomlardır. 16. kromozom metasentriğe yakındır ve uzun kolunda sekonder darlık bölgesi bulunabilir.

#### F GRUBU (19, 20)

Küçük metasentrik kromozomlardır.

#### G GRUBU (21, 22, Y)

Küçük akrosentrik kromozomlardır. Y kromozomu, boyunun kişiden kişiye değişmesi ve uzun kolların birbirine paralel olması ile 21 ve 22. kromozomlardan ayrılabilir.



**Şekil II.5. :** Normal bir erkeğe ait karyogram ( G-bantlı )

## II.5. İNSAN GENOMUNDAKİ DNA ÇEŞİTLERİ

İnsan genomunda üç çeşit DNA bulunmaktadır:

*Tek-Kopya DNA (Tek diziler)* : Genomun %75'ini oluşturur. Tek-kopya DNA bir haploid genomda sadece bir, veya en fazla birkaç kez tekrarlanan dizilerden oluşur. Tek-kopya DNA'nın küçük bir kısmı protein kodlayan diziler içerir. Bu nedenle birçok fonksiyonu bilinmemektedir. Genomda uzun tek-kopya DNA dizileri (>25kb) oldukça seyreklerdir. Çoğu, kısa olarak (birkaç kilobaz veya daha az) ve tekrarlayan DNA ailelerinin değişik üyeleri ile içiçe bulunur (48).

*Dağınık Tekrarlayan DNA (Orta derecede Tekrarlayan Diziler)* : Genom içinde dağınık olarak bulunan yakın dizilerden oluşurlar. Genomun %15'ini oluştururlar.

Bu DNA dizilerinde en çok çalışılan üyeler Alu ailesine bağlıdır. Böyle adlandırılmasının sebebi bu ailenin üyelerinin çoğunun özel bir bakteriyel restriksiyon endonükleaz (Alu I) ile kesilmesidir. Alu ailesinin üyeleri yaklaşık 300bp uzunluğundadır. Genomda yaklaşık 500.000 Alu ailesi vardır ve insan DNA'sının tahminen %3'ünü oluştururlar. Alu ailesinin fonksiyonu bilinmemektedir.

Dağınık Tekrarlayan DNA'nın ikinci büyük ailesi LINE dizilerinden L1'dir. L1 üyeleri genomda yaklaşık 10000 kopya olarak bulunan, uzun (6kb kadar), tekrarlayan dizilerdir. L1 ailesinin de genomdaki rolü bilinmemektedir.

Dağınık tekrarlayan DNA'nın bu iki büyük üyesi genomda rastgele yerleşmez. Alu ailesi üyeleri, en çok GC'den zengin R bantlarında, L1 ailesi üyeleri de AT'den zengin G ve Q bantlarında yerleşmişlerdir (48).

Ribozomal RNA, histonlar, immunoglobulin genleri de dağınık tekrarlayan DNA dizileri içinde yer almaktadır (17).

*Satellit DNA (Çok Tekrarlayan Diziler)* : Genomun %10'unu oluştururlar ve ardışık olarak tekrarlayan kopyalardan oluşurlar. Böyle ardışık tekrarların değişik tipleri satellit DNA'lar olarak adlandırılır ve çeşitli sınıfları vardır.

Satellit DNA aileleri genomdaki yerleşimine, ardışık sıraların toplam uzunluğuna ve dizileri oluşturan tekrar ünitelerinin uzunluğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. İnsan satellit DNA'larının çoğu bir beşli nükleotid dizisinin ardarda tekrarlanması ile oluşur. Bu uzunluktaki tekrar sıraları 1, 9 ve 16. kromozomların uzun kollarının proksimalinde ve Y kromozomunun yaklaşık olarak tüm kolunu kapsayan heterokromatik bölgesinde bulunmaktadır. Diğer satellit DNA'lar daha uzun tekrarlardan oluşur (28,38). Örneğin; insan kromozomunun sentromerik bölgesinde bulunan  $\alpha$ -satellit ailesi, yaklaşık 171 baz çiftlik bir ünitenin farklı kopyalarının ardarda tekrarlanması ile oluşur (26,59,60,61).

İnsan DNA'sında 8 satellit DNA'sı bildirilmiştir (I, II, III, IV, A, B, C ve D). Ayrıca Manuelidis (1978), Hoechst 33258 kullanarak AT'den zengin bir satellit DNA'sını daha gösterilmiştir (31). Satellit DNA'ları I-IV'ün primer olarak yerleşiminin, bazı kromozomların perisentrik bölgelerinde ve Y'nin uzun kolunda, satellit B'nin, akrosentrik kromozomların NOR (Nuclear Organizing Regions) larında bulunduğu bildirilmiştir. Diğer satellitler A, C ve D'nin genomdaki yerleşimi ise daha azdır.

Satellit DNA dizilerinin gen içermediği ve fonksiyonlarının olmadığı düşünölmekte, hatta bu DNA'dan "çöp (junk)" DNA olarak da bahsedilmektedir. Moleküler teknikler bu DNA'nın, genomun %10'unu oluşturduğunu ortaya koymuştur (2,17,48,56,57,58).

## II.6. KROMATİN TIPLERİ

İçerdiği DNA çeşitlerine göre kromatin iki gruba ayrılmaktadır:

### II.6.1. Ökromatin

Orta tekrarlayan DNA dizieri ve tek dizilerden oluşur. Yapısal genlerin bulunduğu bölgeleri oluşturur ve R+ bantlara karşılık gelir.

### II.6.2. Heterokromatin

Daha kondanse boyanan bölgelerdir.

Çoğunlukla çok tekrarlayan (satellit) DNA'dan meydana gelmişlerdir. İnaktiftirler ve geç sentezlenirler. Üç türlü heterokromatin vardır:

- a. Fakültatif Heterokromatin
- b. Araya giren (Intercalary) Heterokromatin
- c. Konstitütif Heterokromatin

#### a). *Fakültatif Heterokromatin* :

Yaşamın değişik dönemlerinde farklı bulunabilen heterokromatindir. En bilinen örneği, memeli dişilerindeki inaktif X kromozomudur. Dişilerde, her hücredeki blastosit evresi sırasında rastgele inaktivasyona uğrar. Bundan sonra bu X kromozomu, heterokromatinden oluşmuş gibi davranır. İnterfazda kondansedir ve transkripsiyona uğramaz. S fazında geç replike olur. Profaz ve metafazda bile diğer kromozomlardan daha kondansedir. İnaktivasyondan önce her iki X kromozomu da aktiftir. Oogenezisten önce inaktif X kromozomu tekrar aktifleşir. Fakültatif heterokromatinin davranışını belirleyen mekanizma hala bilinmemektedir (46).

#### b). *Araya Giren (Intercalary) Heterokromatin* :

Q ve G(+) bantlarda yerleşmiştir. Geç replike olur ve Q ve G(-) bantlara göre çok az gen içerir. Hakkında çok az şey bilinmektedir (17).

c). *Konstitütif Heterokromatin* :

İnsan kromozomlarındaki konstitütif (veya "C bant") heterokromatin dört tip olarak sınıflandırılabilir:

- Sentromerik heterokromatin (Y de dahil tüm sentromerler)
- Akrosentrik heterokromatini (D ve G grubu kromozomlarının kısa kolları ve satellitleri)
- Sekonder darlık heterokromatini (1, 9 ve 16. kromozomların uzun kollarının proksimalleri)
- Y kromatini (fluoresan Y kromatinine uyan, Y'nin uzun kolunun distali) (9)

Konstitütif heterokromatin, tekrarlayan DNA'nın satellit DNA ailelerinden meydana gelmektedir. 1., 9. ve 16. kromozomların sekonder darlık bölgesinde ve Y kromozomunun uzun kolunda bulunan heterokromatin dört tip satellit DNA (I-IV) içerir. Bu kromozomlar üzerindeki toplam miktar ve satellit DNA tipleri farklı olmaktadır. 9. ve Y'nin heterokromatin bölgeleri en kompleks olanlardır ve satellit DNA'nın dört tipini de değişik miktarlarda içermektedirler. 9. kromozom, en fazla satellit III DNA içerir. 1. kromozom satellit II DNA'sına ve ayrıca diğer üç tipin çok az miktarına sahiptir. 16. kromozomun uzun kolunda bulunan heterokromatin çok az miktarda tip II satellit DNA içerir (40,42,57). Satellit I DNA'sı en fazla Y kromozomunda bulunmuştur (27). Bunların dışında, 13, 14, 15, 20, 21 ve 22. kromozomlar da bir veya daha fazla tipte satellit DNA'ya sahiptirler (2).

İnsan genomunun yaklaşık %20'sini oluşturan C bant heterokromatinin %4'lük bölümünü satellit DNA'ları oluşturur. Heterokromatin satellit DNA'lar dışında farklı diziler de içermektedir. İnsan DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu, bu bölgelerde satellit benzeri bazı diziler bulunmuştur. Buna göre, insan konstitütif heterokromatini basit ve kompleks satellit DNA dizileriyle birlikte, satellit benzeri diziler de içerir (2).

Konstitütif heterokromatin interfazda kondanse durumdadır ve S fazında geç replike olur (46). Konstitütif heterokromatinin gen içermediği ve



transkribe olmadığı da ortaya konmuştur. Bu nedenle C bantlarındaki çok büyük varyasyonlar bile fenotipe yansımaz (10,20,24,42,47). Hemen hemen tüm hayvan ve bitki kromozomlarında konstitutif heterokromatin bulunmaktadır. Sıklıkla sentromerde yerleştiği için sentromerik heterokromatin adını da almaktadır (46).

Heterokromatik bölgelerin, eşit olmayan (unequal) krosing-over'den kaynaklandığı düşünülmektedir (16,57).

Tekrarlayan DNA'lardan oluştuğu için fonksiyonunun olmadığı düşünülse de önemli rolleri olduğu varsayılmaktadır. Heterokromatinin evolüsyonda rol aldığı ve genomda fenotipe yansıyabilecek mutasyon ihtimalini azaltarak genetik maddeyi koruduğu düşünülmektedir. Yine de esas rolü, şu ana kadar ortaya konamamıştır (8,13,56).

Konstitutif heterokromatin ve fakültatif heterokromatin, birçok yönden benzer davranışlar gösterirler, fakat temel yapıları arasında farklar vardır. Fakültatif heterokromatin öökromatik DNA'dan meydana gelmiştir, ancak embriyonal gelişim evreleri boyunca farklı davranır. Konstitutif heterokromatin, heterokromatik DNA'dan meydana gelmiştir ve embriyonal gelişim evreleri boyunca sabittir (46).

Konstitutif ve fakültatif heterokromatinlerin ortak özellikleri ise genetik pasiflikleri, S fazı sırasında geç replike olmaları ve genel allosiklik (farklı zamanlarda replike olması) tir (46).

## **II.7. KROMOZOMLARIN ÖZEL YAPILARI**

Mikroskopta incelenen kromozomların bazı özel bölgelere sahip olduğu görülmüş ve bu bölgeler incelenmiştir.

### II.7.1. Sentromerler

Memelilerde metafaz kromozomları üzerinde daralma şeklinde görülen, özelleşmiş bölge, primer darlık veya sentomer olarak adlandırılır. sentromerin kromozomlar üzerindeki yerleşimi her kromozomda farklı, homolog kromozomlarda ise aynıdır (7,17,46,48).

Sentromer, mitoz ve mayozda kromozom segregasyonu ile ilgili esas bölgedir. Sentromer, mikrotubullerin (iğ iplikleri) kromozoma bağlanma bölgesidir. Sentromer bölgesinde yapısal olarak üç farklı bölge yer alır:

- Sentromerin dış yüzeyi boyunca uzanan kinetokor bölgesi,
- Sentromerin ana bölgesi; Sentral bölge,
- Sentromerin iç yüzeyindeki eşleşme bölgesi (40).

Kinetokor, elektron mikroskopunda primer darlığın her iki tarafında dizili iki paralel tabaka halinde gözlenir. Üç bölgeden oluşmuştur:

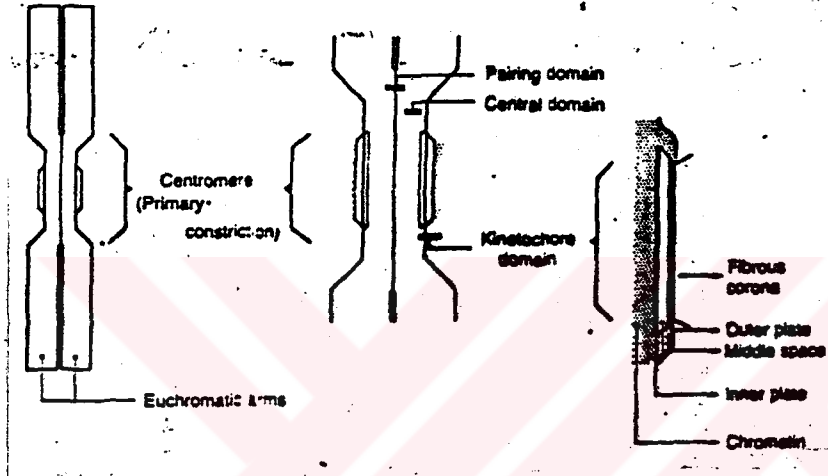
- Sentromer boyunca uzanan iç tabaka,
- Orta tabaka,
- Dış tabaka.

Mikrotubuller primer olarak elektron yoğun olan dış tabakaya bağlanır. Mikrotubuller olmadığında dış tabakayı fibröz korona olarak adlandırılan dördüncü bir tabaka kaplar.

Sentral bölge, sentromer bölgesinin en geniş kısmını oluşturur. High resolution insitu hibridizasyon çalışmaları alfa-satellit DNA'nın sentral bölgeye dağıldığını, ayrıca alford dizilerin kinetokor bölgesinde de bulunduğunu göstermiştir (37).

Eşleşme bölgesi primer darlığın iç kısmında yer alır ve kardeş kromatidlerin kromozomun uzun koluna dik bağlanmasını sağlar (61).

Sentromerler 33258 Hoecht ve 5 Azasitidin gibi ilaçlara duyarlıdır. Bu iki ajanın varlığında, kromozomların interfaz-mitotik dönüşümü esnasında sentromerin normal kondansasyonu engellenir (40).



Şekil II.6. : Sentromerdeki bölgelerin yerleşimi (40)

### II.7.2. NOR (Nuclear Organizing Regions : Nükleolar Organize Bölgeler)

Nükleolar Organize Bölgeler mitoz sonunda nükleoller etrafında gelişen yapılardır. Solid boyanmış kromozomlarda NOR'lar az boyanmış bölgeler ve sekonder konstriksiyon bölgelerine benzer olarak görülürler. İnsanda 18S ve 28S rRNA genleri, bu bölgelerde kümeleşmişlerdir (2). Bu genlerin yerleşimi beş çift akrosentrik kromozom üzerinde (13, 14, 15, 21 ve 22. kromozom) bulunur. NOR'lardaki rRNA genlerinin sayısı değişkenlik gösterir. Bu varyasyonlar Mendelyen tarzda kalıtılırlar. NOR'ların bir hücredeki toplam sayısı ondur, fakat aktif ribozomal sistonları gösteren

Ag-NOR yöntemi ile ortalama 6-8 bölge gösterilebilir. NOR'ların miktarı ve pozisyonu, türler arasında değişiklik gösterir (3,45).

Ag-NOR, sitogenetik preparasyonlarda, kromozomları tanımlamak, rRNA genlerinin varlığını ve de özellikle NOR fonksiyonlarını değerlendirmek amacı ile kullanılmaktadır. Bir dokuda eksprese olan NOR sayısı, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve neoplastik transformasyonun hızı ile ilgilidir. Bu tekniğin neoplastik potansiyelin gösterilmesinde ve malign neoplazmların aktivitesinin ve prognozunun değerlendirilmesinde, yani diagnostik patolojide pratik kullanımı önerilmektedir (45).

Metafaz yaymalarında akrosentrik kromozomlar sıklıkla birbirlerine yakın yerleşirler. Bu olay "akrosentrik asosiyasyonu" olarak adlandırılır (2).

Bu bölgelerin heteromorfizmi spesifik hastalıklarla korelasyon göstermesine rağmen, akrosentrik varyasyonları ile hastalık ya da fenotip arasındaki ilişki görülememiştir (27).

### **II.7.3. Telomerler**

Telomerler, ökaryotik kromozomların fiziksel uçlarıdır. R bantlama uygulaması uzatıldığı zaman telomerik bölgelerin spesifik olarak boyandığı ve T bantları olarak adlandırılan bantların oluştuğu gösterilmiştir. Elektron mikroskopunda telomerler, kromozomların yanı sıra küresel distal uçları olarak görünürler (2).

İnsanda telomerler  $(TTAGGG)_n$  dizisinin ardışık kopyalarından oluşur. Bu da kromozom uçlarının replikasyonunun kendine özgü olmasına sebep olur (48).

Telomerler kromozomların ucu için koruyucu bir başlık oluşturmaktadır. Böylece disentrik kromozom oluşumu ve subtelomerik bölgelerdeki genetik bilgi kaybı önlenmektedir.

Bazı çalışmalar telomer uzunluğunun, yaş ve hücre bölünme uzunluğunun artışı ile azalmakta olduğunu gösterilmişlerdir (4). Telomer kaybının kansere yol açtığı da ileri sürülmektedir (18).

#### **II.7.4. Satellitler**

Satellitler, insan akrosentrik kromozomlarında (Y kromozomu hariç) kısa kolların distalinde bulunurlar. Kromozomların sap bölgeleri olarak nitelenen ve ribozomal sistronlar içeren NOR'lara komşudurlar ve morfolojik olarak farklı yapılardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda 24nm boyundaki kromatin ipliklerinden oluşmuş, düzensiz küreler olarak görülürler. Bu küresel yapıların çapı çok değişkendir. Sitokimyasal özellikleri bilinmemektedir. Ancak DIPI ve Mitramisin ile boyanarak yapılan çalışmalar, bu bölgelerin AT'den zengin DNA'dan oluştuğunu göstermiştir. Bazı kişilerde bu yapılar, satellit DNA'lara sahiptirler (2).

#### **II.8. KROMOZOMAL POLİMORFİZMLER**

Kromozomlar, morfolojilerine göre homologları ile karşılaştırıldığında zaman belli bölgelerin oldukça değişken olduğu görülmüştür. Bu kararsız bölgeler, kromozomal varyasyonların büyük bir kısmını oluşturur. Türler içinde, aynı türün bireyleri arasındaki bu genetik varyasyon "heteromorfizm" olarak adlandırılır. "Polimorfizm" ve "Varyasyon" terimleri de aynı amaçla kullanılmaktadır. Ancak Paris Konferansı'nda insan sitogenetik nomenklatürüne "heteromorfizm" olarak geçmiştir.

Heteromorfizmler, fenotipe yansımayan, kromozomal varyantlardır. Üç ana grupta toplanabilirler:

- Y kromozomunun uzun kolunun varyasyonu: En sık rastlanan heteromorfizmdir. Y'nin uzun kolu, transkribe olmayan, çok tekrarlayan DNA içermektedir. Özel fluoressan boyaarla (Quinakrin) çok parlak fluoressan verir. Erkeklerin yaklaşık %10'unda normalden kısa veya uzun bir q kolu bulunabilir (2,17,46,48).

- Sentromerik heterokromatin bölgelerin boyu: 1, 9 ve 16. kromozomlar, sentromerlerine yakın, ikinci bir darlık (sekonder konstriksiyon) bölgesine sahiptirler (qh). Bu bölge konstitutif heterokromatin içerir ve heterokromatin miktarının çok değişken olması nedeniyle sekonder darlığın boyu da değişebilir. Konstitutif heterokromatin, aktif genler içermediğinden, bu bölgelerdeki varyasyonlar fenotipi etkilemez (2,7,16,17, 46,48).

- Satellit Polimorfizmi: Akrosentrik kromozomlarda bulunan satellitlerin büyüklükleri ve fluoresan karakteristikleri değişiklik gösterebilir. Bu varyasyonların nedeni, çok tekrarlayan DNA ve buralarda bulunan ribozomal genler olabilir. Satellit DNA'ların büyüklüğünün, mayoz sırasında, eşit olmayan krosing-over gibi yanlış eşleşmeler sonucunda değiştiği düşünülmektedir (2,7,17,46,48).

Bunların dışında frajil bölgeler olarak adlandırılan, kromozomlarda bazı kırılmaya yatkın bölgeler de heteromorfik olarak değerlendirilmektedir ve popülasyonun %30'unda mevcuttur. Sadece X kromozomunun q27 bölgesi frajil olursa heteromorfik değildir ve Frajil X Sendromu'na neden olur (7,17).

## **II.9. İNVERSİYON**

Belli kromozomlarda görülen inversiyonlar gibi kromozomal anomaliler de heteromorfik görünümler meydana getirmektedir.

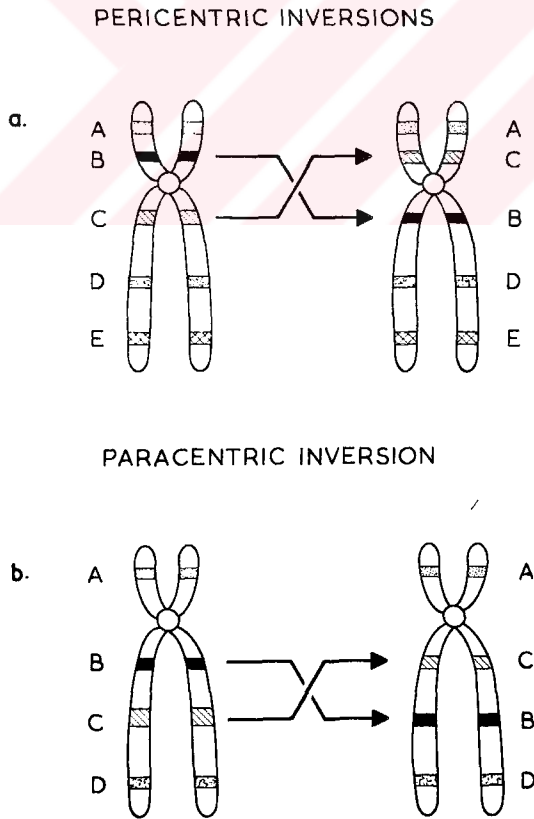
İnversiyon, kromozomun iki yerden kırılarak, parçanın 180° dönüp tekrar birleşmesinden meydana gelir. İki kırık da aynı koldaysa ve sentromeri içine alıyorsa perisentrik inversiyon adını alır. Genellikle bu değişim, gen dengesinde bir değişiklik meydana getirmediğinden, kliniğe yansımaz. Dengesiz gametlerin oluşması ve aktarılması riskinin artması nedeniyle önemlidir (7,11).

İnversiyonlar mayoz sırasında homolog kromozomların eşleşmesine karşı ve segment içinde krosing-over bastırılır (25).

Parasentrik inversiyonlar taşıyıcılarda klinik bir anormallik yapmaz ve prenatal tanı endikasyonu taşımazlar.

Perisentrik inversiyon taşıyıcıları, klinik olarak anormal değillerdir fakat inversiyon, özellikle kromozomun büyük bir kısmını içine alıyorsa dengesiz gametler oluşma riski vardır. Taşıyıcı anne için risk %8, taşıyıcı baba için risk %4'tür (7).

9. kromozomun perisentrik inversiyonu, inversiyonlar içinde en yaygın görülen polimorfizm olarak kabul edilmektedir ve klinik bir önemi olmadığı düşünülmektedir (11).



**Şekil II.7. :** İnvrsiyon tiplerinin şematik olarak gösterilmesi

Polimorfizmler tıbbi genetikte çeşitli alanlarda kullanılırlar (12, 34, 48).

**Tablo II.1. :** Polimorfizmlerin tıbbi genetikte kullanım alanları

- Kromozom anomalilerinin parental orjininin belirlenmesi
- Ovaryan teratomaların partenogenetik orjininin belirlenmesi
- Kemik iliği transplantasyonlarında verici hücrelerin alıcı hücrelerinden ayırt edilmesi
- Babalık tayini
- Amniyotik hücre kültürlerinde maternal ve fetal hücrelerin ayrılması
- Marker kromozomların trisomi ya da triploidilerde fazla kromozomun orjininin belirlenmesi
- Akrosentrik kromozomların *de novo* kromozom anomalilerinde mutasyonun orjininin araştırılması
- Kromozomlardaki gen lokuslarının belirlenmesi ve gen haritalaması

## II.10. BANTLAMA TEKNİKLERİ

İnsan sitogenetiğinin ilk yıllarında, insan kromozomları uniform olarak görülmüş ve sentromerlerinin durumuna göre sınıflandırılmıştır (Denver Konferansı, 1960). 1970-80 yılları arasında bazı kimyasallar ve DNA bağlayıcı ajanlar tarafından indüklenerek oluşturulan bantlama teknikleri geliştirilmiş, böylece insan kromozomları daha iyi tanınmıştır. Bazı ajanlar, kromozomların kollarında açık ve koyu, parlak ve soluk bölgeler olarak farklı bant modelleri oluştururken, bazıları kromozomlarda çok özel bölgeleri boyarlar. Bu bantlar her kromozomun kendine özgüdür ve kollarda, yatay çizgisel düzende, boyanın farklı yoğunlukları şeklinde görülürler. Bant modelleri türler içinde değişmez, sabittir (2).

Bantlama teknikleri modern tıpta çok büyük pratik öneme sahiptir. DNA dizilerinin anlaşılması ve kromatinin kromozomlara özel olarak düzenlenmesi ile ilgili araştırmalara öncülük etmiştir (2).



**Tablo II.2. :** Boya ve bant yöntemlerinin tarihçesi

1960	Moorhead ve Nowell	Konvansiyonel (solid)
1968	Casperson ve arkadaşları	Q-Bantlama
1970	Pardue ve Gall	In Situ Hibridizasyon
1971	Sumner ve arkadaşları	G-Bantlama
1971	Arrighi ve Hsu	C-bantlama
	Yunis ve arkadaşları	
1971	Dutrillaux ve Lejeune	R-Bantlama
1972	Gagne ve Laberge	G-11
1973	Matsui Sasaki	Ag-NOR
1978	Schweizer, Ambros ve Andrie	DA / DAPI

Heteromorfizmler, birçok bant tekniği ile gösterilebilmektedir. Bu bant tekniklerinden bazıları; QFQ, CBG, DA/DAPI ve Ag-NOR yöntemleridir. Heteromorfizmler için boyanma veya fluoresan yoğunlukları, büyüklük ve renk gibi parametreler kullanılmaktadır (2).

### II.10.1. Q Bantlama

İlk kez 1969'da Casperson ve arkadaşları tarafından quinakrin mustard ile indüklenerek Q bantlama gerçekleştirilmiştir (6). Bundan sonra quinacrine mustard ve quinacrine dihidroklorid, insan sitogenetiğinde yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (3).

Quinacrine ile boyanmış kromozomların kollarında fluoresan parlak ve soluk bantlar ortaya çıkmaktadır. Quinacrine, AT baz çiftlerinin zengin olarak bulunduğu heterokromatin içeren bölgelere bağlanır. Bu nedenle bu bölgeler parlak olarak boyanır ve Q(+) bölgeler olarak gösterilirler. Q(+) bantları, G(+) bantlarına karşılık gelir (3).

Klinik bakımdan Q bantlama spesifik kromozomların ve yapısal düzensizliklerin teşhisine imkan sağlayan güvenilir bir tekniktir. Özellikle Y kromozomunun D, E ve G grup kromozomlarından ayrılmasında kulla-

nırlıdır. Ayrıca quinacrine heteromorfizmleri (belli bazı kromozomların satellitleri veya sentromerlerinin değişken bölgeleri), maternal ve fetal hücreleri, verici ve alıcı hücreleri ve de kalıtsal kromozomal varyantların belirlenmesinde kullanılır (2,53).

QFQ (Quinacrine kullanılarak Floresan Q bantlama) tekniği, yaymadan hemen sonra uygulanabildiği ve kolay bir teknik olduğu halde, kalıcı olmaması, çabuk solması ve mikroskopta incelenmesi zor olması nedeniyle çok kullanışlı değildir (2,3,53).



**Şekil II.8. :** Q-bantlı metafaz örneği

### **II.10.2. C-Bantlama**

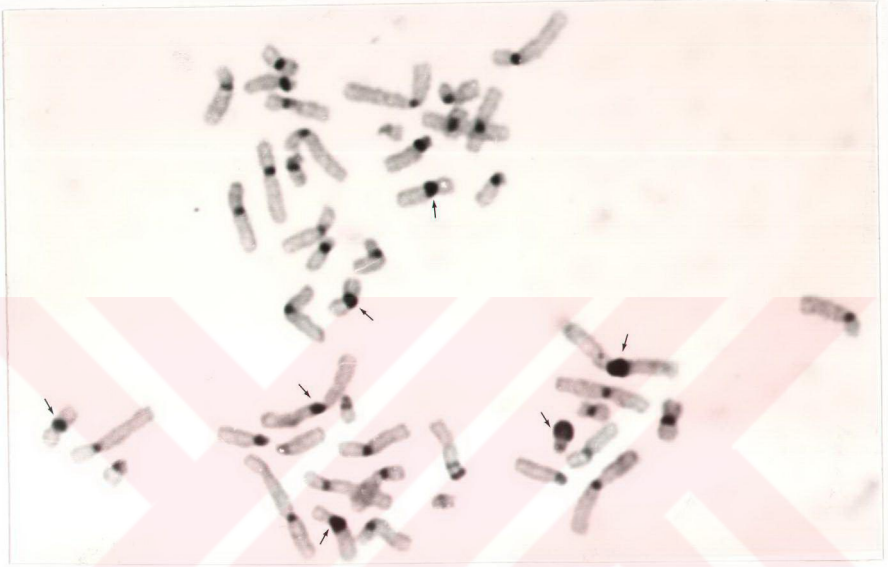
Boya yöntemleri arasında başlıca metodlardan biridir. C-bantlama belli kromozomal bölgelere özgüdür. İlk olarak Pardue ve Gall (1970) in situ

hibridizasyon kullanarak değişik boyanan perisentrik bölgeler göstermişlerdir (3). Bu bulgulara dayanarak Arrighi ve Hsu (1971) özellikle perisentrik bölgeleri boyayan C-bantlama yöntemini açıklamışlardır (22). Aynı yıl Yunis ve arkadaşları da ayrı olarak C-bantlama yöntemini geliştirmişlerdir (63). Arrighi ve Hsu'nun bildirdiği yöntem, sıcak tuz solüsyonunda inkübasyonundan sonra kromozomal DNA'nın alkali ile denatürasyonundan meydana gelmekteydi. Alkali ile denatürasyon için NaOH (sodyum hidroksit) kullanılmaktaydı. Daha sonra Sumner tarafından bu yöntem modifiye edilmiş ve NaOH yerine daha hafif bir alkali olan Ba(OH)<sub>2</sub> (baryum hidroksit) kullanılmıştır (1972). NaOH çok kuvvetli bir alkali olduğu için kromozom kaybına yol açabilmektedir. Bu nedenle Ba(OH)<sub>2</sub> kullanılması denatürasyonun daha iyi kontrol edilmesini sağlar (3).

C-bantlama sonucunda kromozomların konstitütif heterokromatin bölgeleri koyu boyanmaktadır.

C-bantlama işlemi sırasında asid ve alkali muamelesi uygulanır ve ökromatik bölgelerdeki DNA denatüre edilir. Heterokromatinin bu uygulamaya direncini sağlayan faktörler kesin bilinmemektedir. Ancak son yıllarda yapılan incelemeler sonucu heterokromatin yakınında bağlı olan bazı özel proteinlerin, heterokromatine bu direnci sağladığı ileri sürülmektedir (3).

C-bantlama tekniği esas olarak, kromozomlarda artmış veya azalmış heterokromatik bölgelerin (1qh, 9qh, 16qh, Yqh) uzunlukları ve 9. kromozom veya diğer kromozomların inversiyonları veya yeniden düzenlenmeleri gibi bazı polimorfik varyantları belirlemek için kullanılır. Ayrıca fazla ve marker kromozomların karakterizasyonu, somatik hücre hibridlerinde özel kromozomların tanınması için de kullanılır (2).



**Şekil II.9. :** C-bantlı metafaz örneği

### **II.10.3. DA/DAPI (Distamycin A/4'-6'-diamidino-2-phenil indol) Boyama**

DAPI, AT bölgelerine spesifiktir ve bu metotta primer boya olarak kullanılmaktadır. Distamisin A, fluoresan olmayan temel oligopeptid bir antibiyotiktir ve tecihli olarak AT'den zengin çift iplikli DNA'ya kalıcı olarak bağlanır. Bağlanma hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimle olmaktadır. Distamisin A'nın bağlandığı bölgeler, Q(+) bantlarına uymaktadır (3).

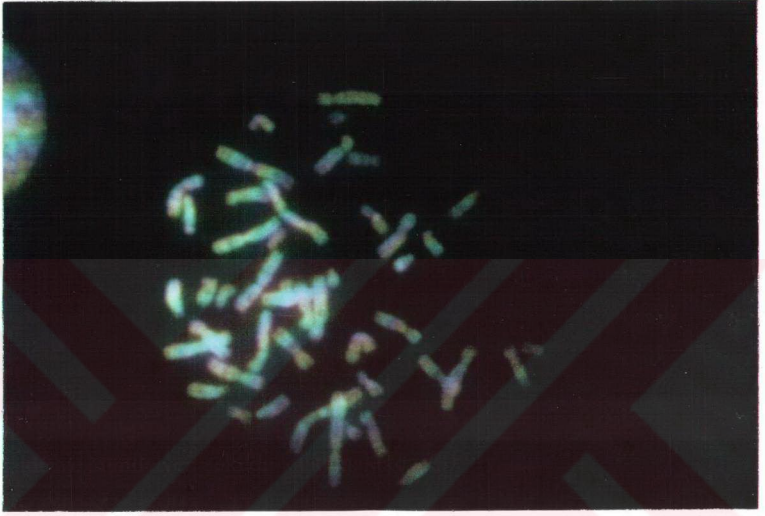
DAPI ve DA kombine boyama ile 15p11, Yqh ve 1, 9, 16. kromozomların konstitüif heterokromatin içeren belli bölgeleri özellikle parlak boyanır. C-bantlarının koyu bölgelerine de uyan bu qh bölgeleri, fluoresan yoğunluklarına göre şöyle sıralanmaktadır: 16qh > 1qh > 9qh (3).

DAPI/DA-pozitif heterokromatinin kimyasal özellikler ile bu bantlama özelliği henüz bilinmemektedir. Genelde tüm DAPI/DA parlak bölgeler çok tekrarlayan DNA, özellikle AT'den zengin değişik DNA çeşitlerini içerir. Tüm bu bölgeler heterokromatiktir fakat değişik satelit DNA'ların kromozomal dağılımı ve parlak DAPI/DA noktalarının yerleşimi arasındaki ilişkiyi saptamak mümkün olamamıştır (2,3,55).

Donlon ve Magenis, diğer bir AT-spesifik boya olan Metil Green (MG)'in Distamycin A yerine kullanılabileceğini göstermişlerdir (3,55).

Klinik sitogenetikte, DAPI/DA tekniği, kromozomal düzensizliklerde perisentromerik kırılma noktalarını ve standart bant teknikleri ile belirlenemeyen küçük kromozomal düzensizlikler-örneğin bisatellitli 15. kromozom inv dup (15)- veya 15. kromozomun düzensizliklerini belirlemede kullanışlıdır (2,3). QFQ-parlak olan akrosentrik kromozomların polimorfik kısa kolları, 15p hariç, DAPI/DA ile genelde parlak fluoresan vermezler. Bu nedenle DAPI/DA yöntemiz aynı zamanda, Y kromozomu ile otozom translokasyonlarından şüphelenilen durumlarda Y kromozomunu belirlemek için de kullanılmaktadır (3).





**Şekil II.10. :** MG/DAPI boyama uygulanmış metafaz örneği

#### **II.10.4. NOR'ların Gümüşle Boyanması**

NOR'lar türler içinde çok farklı olarak dağılmışlardır. İnsanda NOR'lar 18S ve 28S rRNA'dan oluşan genler içerirler (3,44). 5 çift akrosentrik kromozomda (13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar) yerleşmişlerdir. In situ hibridizasyon çalışmaları ile hibridizasyon miktarının yani her NOR için rDNA genlerinin miktarının sabit olmadığını göstermiştir. Bu varyasyonlar kalıtsaldır ve Mendelyen şekilde kalıtılmaktadır (3).

Miller (1976) gümüş boyama yönteminin rRNA genlerinin varlığı ile birlikte aktivitesini de gösterdiğini bildirmiştir (3).

Gümüş boyama, pratikte, orijini bilinmeyen kromozomlar veya kromozom parçalarının tanınması, satellit assosiyasyonları ve kromozomal heteromorfizm çalışmalarında kullanılmaktadır (3).



**Şekil II.11.** : Ag-NOR uygulanmış metafaz örneği

### III. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### III.1. MATERYAL

Materyalimiz, İ.Ü. GETAM (Genetik ve Teratoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) 'ne değişik nedenlerle başvuran olgular arasından rastgele olarak seçilmiş 28 kadın, 22 erkek, toplam 50 olgudan alınan periferik kandan oluşmaktadır.

#### III.2. YÖNTEMLER

##### III.2.1. Periferik Kan Kültürü

Moorhead'den modifiye edilmiş yöntem kullanıldı.

*Besi ortamı için kullanılan maddeler:*

100mL	RPMI 1640 Medyum (Sigma)
20mL	Fetal Calf Serum (Sigma)
1mL	L-Glutamin (Gibco)
0.2mL	Penisilin
0.2mL	Streptomisin
1.5mL	Phytohemaglutinin (Seromed)

*Besi ortamının hazırlanması:*

Yukarıdaki maddeler karıştırılarak 100mL'lik stok hazırlanır ve 5'er mL olmak üzere kapaklı tüplere bölünür. Bunlar hemen kullanılmayacaksa buzlukta saklanır. Kullanılacağında buzluktan çıkarılır ve çözülür. Heparinlenmiş steril enjektöre yaklaşık 2mL venöz kan alınır. Steril ortamda, daha önce hazırlanmış besi ortamları içeren tüplere 0.3mL (1'lik enjektörle



13-14 damla) kan eklenerek tüpler kapatılır. Hafifçe çalkalandıktan sonra 72 saatlik kültür için 37°C'lik etüve kaldırılır. 70. saatin sonunda tüplere 0.05mL kolsemid (veya kolşisin) konur. 72 saat sona erdiğinde tüpler etüvden çıkarılır ve 1200rpm'de 7 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve 7mL 0.075M KCl eklenir. Hipotonik şok için 37°C'de 15 dakika inkübe edilir. Süre sonunda yine 1200rpm'de 7 dakika santrifüj edilir, süpernatant atılır. Tüplere 7mL Carnoy Fiksatif (3:1 Metanol:Asetik asid) eklenerek 7 dakika 1200rpm'de santrifüj edilir, süpernatant atılır. Bu işlem 3-4 kez tekrarlanır. Son yıkamadan sonra süpernatant atılır ve 1-2 damla fiksatif eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanır.

### III.2.2. Preparatların Hazırlanması

Musluk suyunda yıkayıp temizlenen lamalar, distile su içinde buzdolabında soğutulur. Yayma yapılacağı zaman, ıslak lam 45° eğimle tutularak üzerine 50-60cm uzaklıktan 1-2 damla hücre süspansiyonundan damlatılır ve havada kurutulur.

### III.2.3. Bant Teknikleri

*C-Bantlama (CBL-Leishman boyası ve Ba(OH)<sub>2</sub> kullanılarak yapılan C bantlama):* Summer'den modifiye edilmiş C-bantlama tekniği kullanıldı (3).

#### Kullanılan solusyonlar

- 0.2N HCl : 16.6mL 12N HCl deiyonize suyla 1000mL'ye tamamlanır.
- %2.5 Ba(OH)<sub>2</sub> : 2.5g Ba(OH)<sub>2</sub> / 100mL deiyonize su
- pH'ı 6.9-7.1 olan 2xSSC (0.03 mol/L NaCl: 0.3mol/L trisodyum sitrat)=17.53g NaCl ve 8.82g trisodyum sitrat (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) deiyonize suyla 1000mL'e tamamlanır ve 20xSSC hazırlanır (4°C'de sabit kalabilir). 20xSSC solusyonundan 10mL, deiyonize suyla 100mL'ye tamamlanarak 2xSSC solusyonu hazırlanır.

- Fosfat tamponu : pH=6.8

53mL 0.025M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.402g/1000mL)

+

47mL 0.025M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4.449g/1000mL)

- Leishman boyası : 3g toz Leishman, hareket halindeki 2L meta-metanol içinde 24 saat karıştırılır.

10mL Leishman, 90mL fosfat tamponu ile karıştırılarak boya solusyonu hazırlanır.

- Ayrıca 50° ve 60°C'lik su banyoları.

### Yöntem

1. Preparatlar 1 hafta-10 gün oda sıcaklığında yaşlandırılır.
2.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  solusyonu sıcak su banyosunda 50°C'ye ve 2xSSC 60°C ısıtılır.
3. Yaşlanmış preparatlar 0.2N HCl içinde 1 saat oda ısısında bekletilir.
4. Preparatlar deiyonize sudan geçirilir.
5. Preparatlar 50°C'lik  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  içinde 5-6 dakika bekletilir.
6. Tekrar 0.2N HCl içine konur ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$  kristallerini arındırmak için). Deiyonize sudan geçirilir.
7. 60°C'deki 2xSSC solusyonu içinde 1 saat bekletilir.
8. Deiyonize sudan geçirilir.
9. Preparatlar 15-20 dakika Leishman boya solusyonunda boyanır. Deiyonize suda çalkalanır. Havada kurutulduktan sonra lamelle kapatılarak mikroskopta incelenir.

*Q-Bantlama (QFQ = Quinakrin boyası kullanılarak fluoressan Q-bantlama) (54)*

### Kullanılan solusyonlar

- Mc Ilvaine Tamponu (pH 5.4) : 2.1g Sitrik asid ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), 3.9g sodyum fosfat dibazik-7 hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) veya 9.97g sodyum fosfat dibazik-12 hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) kullanılırsa yine aynı tampon elde edilebilir.

- Quinacrine boya solusyonu : 100mg atebirin 200mL Mc Ilvaine tamponu (pH=5.4) içinde çözülür ve süzülür. Karanlıkta 2°-5°C'de saklanır.

### Yöntem

1. Preparatlar quinacrine boya solusyonunda, karanlıkta 10-15 dakika boyanır.
2. Fazla quinacrinin giderilmesi için akan musluk suyunda çalkalanır.
3. 1 dakika Mc Ilvaine tamponunda tutulur.
4. Preparat aynı tampon ile kapatılır.
5. Floresan mikroskobunda 450-500nm dalga boyunda incelenir.

### *DAPI/MG (4'-6' diaminido 2-fenil indol / Metil Green) Boyama* (3,42,54)

#### Kullanılan solusyonlar

- Mc Ilvaine Tamponu (pH 4.0) : 2.95g Sitrik asit ( $H_3C_6H_5O_7$ ), 5.17g Sodyum fosfat dibazik-7 hidrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ), 500mL distile su içinde çözülerek hazırlanır.

- Mc Ilvaine Tamponu (pH 7.0) : 0.63g sitrik asit, 11.69g Sodyum fosfat dibazik-7 hidrat, 500mL distile suda çözülür.

- MG Solusyonu :

Stok: 1.76g MG 100mL Mc Ilvaine (pH 4.0) de çözülür.

Boyama solusyonu: Taze hazırlanır. 1mL stok solusyonundan 50mL Mc Ilvaine (pH 7.0) ile karıştırılarak hazırlanır.

- DAPI Solusyonu :

Stok: 2mg DAPI-2HCl, 10mL distile suda çözülerek hazırlanır. 1mL'lik stoklara ayrı ayrı saklanır. 20°C'de 6 aydan fazla dayanabilir.

Boyama solusyonu: 1mL DAPI stok solusyonu 100mL Mc Ilvaine tamponu (pH 7.0) ile karıştırılarak elde edilir.

- Kapama Solusyonu : 5mL gliserol, 5mL Mc Ilvaine tamponu (pH 7.0) ve magnezyum klorid (50mM) 50µL karıştırılarak elde edilir.

### Yöntem

1. Preparatlar 20-30 dakika MG solusyonunda bekletilir.
2. 2 kez pH 7.0 Mc Ilvaine tamponunda yıkanır.

3. Kurutulur.
4. Karanlıkta preparatlar DAPI ile kaplanır. 5-20 dakika boyanır.
5. Distile suda çalkalanır.
6. Havada kurutulur.
7. Kapama solusyonundan 2 damla preparatlar üzerine damlatılır. Hava kabarcığı kalmaması sağlanarak lamelle kapatılır.
8. 24-72 saat karanlıkta ve oda ısısında bekletilir.
9. Floresan mikroskobunda 360-390nm dalga boyunda incelenir.

### *Ag-NOR Boyama*

Goodpasture ve arkadaşlarının kısaltılmış yöntemi (1976) kullanıldı (54).

### Kullanılan Solusyonlar

-  $AgNO_3$  (gümüş nitrat) solusyonu (%50): 5g  $AgNO_3$  10mL distile suda çözülerek hazırlanır.

### Yöntem

1. Petri kutusunun dibi kurutma kağıdı ile döşenerek distile su ile nemlendirilir (preparatların kurummasını önlemek için).
2. Preparat petri kutusuna yerleştirilir ve pipetle 3-4 damla %50'lik  $AgNO_3$  solusyonu preparat üzerine damlatılır. Lamelle kapatılır (24x50mm).
3. 37°C'lik etüvde 18-36 saat inkübe edilir.
4. Preparat kehribar rengine dönüşmeye başlayınca mikroskopta kromozomların boyanma yoğunlukları kontrol edilir.
5. Yeterince boyanan preparatlar, yıkanarak, üzerindeki lamel atılır.
6. 1:100 (Giemsa:Distile su) boya solusyonunda 1-2 dakika boyanır.
7. Suyu yıkanır. Lamelle kapatılarak mikroskopta incelenir.

### **C-Bantlarının Değerlendirilmesi**

C-bantlama yöntemi insanda spesifik olarak 1, 9 ve 16. kromozomların sekonder darlık (qh) bölgelerini, tüm kromozomların sentromerlerini, akrosentriklerin satellitlerini ve Y kromozomunun distal ucunu boyar.



1, 9 ve 16. kromozomların sekonder darlıkları popülasyonda geniş varyasyon gösterdikleri gibi aynı bireyin değişik metafazları içinde de farklı görülebilirler. Bu nedenle incelenirken aynı metafaz içinde değerlendirme yapılması gerekir.

Olgularımızın her birinden ortalama 3 metafazın fotoğrafı çekilerek 1, 9, 16 ve Y kromozomlarının parsiyel karyogramı hazırlandı. Bantların değerlendirilmesi tek kişi tarafından yapıldı. Kromozomal polimorfizm büyüklük ve pozisyon olmak üzere iki yönden incelendi.

- 1, 9 ve 16. kromozomların qh bölgelerinin boyu 16. kromozomun kısa kolu ile karşılaştırılarak değerlendirildi (3,14,36,50). Bu ölçümlerde 16. kromozomun kısa kolunun kriter olarak alınmasının nedenleri; kompaktlaşma sonucu, 16p'nin çok değişiklik göstermemesi, 1, 9 ve 16. kromozomların qh bölgeleriyle karşılaştırıldığında ortalama bir büyüklüğe sahip olması ve ayrıca kolay ayıt edilebilir bir kromozom olmasıdır (36).

C bant varyantları 5 derece olarak sınıflandırılmıştır:

1. derece :  $\leq 0.5 \times 16p$
2. derece :  $> 0.5-1 \times 16p$
3. derece :  $> 1-1.5 \times 16p$
4. derece :  $> 1.5-2 \times 16p$
5. derece :  $> 2 \times 16p$

Y kromozomunun heterokromatin büyüklüğünün değerlendirilmesi aynı metafazdaki 19. ve 22. kromozomlarla kıyaslanarak yapıldı. 19. kromozoma eşit büyüklükteki Y kromozomu "büyük" (B), 19. kromozomdan büyük Y kromozomu "çok büyük" (ÇB), 22. kromozoma eşit Y kromozomu "normal" (N) ve 22. kromozomdan küçük Y kromozomu "küçük" (K) olarak değerlendirildi (12).

- Paris Konferansı'nda (1971), her üç kromozom (1, 9, 16) için de C bantlarının normal pozisyonunun, uzun kolun proksimalinde olduğu bildirilmiştir. Fakat bazen C-bantlarının tümü veya bir kısmının kısa kolda da bulunabildiği görülmüştür. Kromozomların C-bant bölgelerinin değerlendirilmesinde bu bölgelerin pozisyonu 3 grupta sınıflandı: Normal pozisyonda yer alan C bant bölgesi "normal" (N), C-bant bölgesinin tamamını kapsayan inversiyon "total inversiyon" (TI), bir kısmını kapsayan inversiyon "parsiyel inversiyon" (PI) (53).

## IV. BULGULAR

C-bantları büyüklüğüne ve pozisyonuna göre iki kategoride değerlendirildi.

### **C bantlarının büyüklüğüne göre değerlendirilmesi:**

C bantlama uygulanan toplam 50 olgunun 47'sinde heterokromatin bölgeleri ölçülebildi. Bunların dışında kalan 3 olguda kromozom elde edilmesine rağmen fotoğraflarının eldesindeki aksaklıklar nedeniyle ölçümleri yapılamadı.

**Şekil IV.1. : C-bantlarının büyüklükleri değerlendirilen 47 olgu  
(sayfa 38 - 47)**

Olgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	Kromozom 16			
1	D E R E C E					
	2	3	2	2	1	5
2						
	2	3	3	3	2	2
	3					
2		3	2	3	2	2
4						
	3	4	2	2	1	2
	5					
2		3	2	2	1	2



Olgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	Kromozom 16			
	D E R E C E					
6						
	2	2	1	2	1	2
7						
	3	3	2	2	2	3
8						
	2	2	2	2	2	2
9						
	3	4	2	2	2	2
10						
	4	4	2	3	2	2

Olgu No	Kromozom 1		Kromozom 9		Kromozom 16	
	D E R E C E					
11						
	3	3	2	2	2	3
12						
	2	3	3	3	1	2
13						
	2	3	2	2	1	1
14						
	1	1	1	1	1	1
15						
	2	2	2	2	2	2

Olgu No	Kromozom 1		Kromozom 9		Kromozom 16	
	D E R E C E					
16						
	1	2	2	2	2	2
17						
	2	2	2	2	2	2
18						
	2	4	2	2	1	1
19						
	3	3	3	3	1	2
20						
	1	1	1	2	1	1

Olgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	D E R E C E			
21						
	2	3	2	2	2	2
22						
	2	3	3	3	2	2
23						
	2	2	2	2	1	1
24						
	3	3	3	3	2	2
25						
	1	1	1	1	1	1

Olgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	Kromozom 16			
	D E R E C E					
26						
	2	3	2	2	1	2
27						
	2	2	2	4	2	2
28						
	3	3	2	3	2	3
29						
	1	2	2	2	1	1
30						
	3	3	3	3	2	2

Ojgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	Kromozom 16			
	D E R E C E					
31						
	3	3	2	5	1	2
32						
	2	3	2	2	1	1
33						
	2	3	3	3	1	1
34						
	1	2	1	2	1	1
35						
	2	3	2	3	1	2



Ojgu No	Kromozom 1		Kromozom 9		Kromozom 16	
	D E R E C E					
36						
	2	2	2	2	1	1
37						
	1	2	2	2	1	2
38						
	2	2	2	2	2	2
39						
	3	3	2	2	2	2
40						
	2	4	2	2	1	1

Olgu No	Kromozom 1	Kromozom 9	Kromozom 16			
	D E R E C E					
41						
	3 3	2 2	2 2			
42						
	3 3	1 inv	2 2			
43						
	3 3	2 inv	1 2			
44						
	3 3	2 inv	1 2			
45						
	2 3	2 inv	2 2			





Tablo IV.1.'de heterokromatik bölgeleri değerlendirilen 47 olgunun büyüklük derecelerinin sıklığı gösterilmektedir.

**Tablo IV.1. :** Olgularımızın qh büyüklük derecelerinin dağılımı

Büyüklük derecesi	İncelenen kromozom sayısı	1. Kromozom		9. kromozom		16. kromozom	
		n	%	n	%	n	%
1	94	10	10.6	10	10.6	41	43.6
2	94	36	38.3	61	64.9	48	51
3	94	42	44.7	22	23.4	4	4.3
4	94	6	6.4	-	-	-	-
5	94	-	-	1	1.1	1	1.1

1. kromozom için en sık rastlana grubu %44.7 ile 3. derece olarak değerlendirilen grup, en seyrek rastlanan grubu ise hiç rastlanmayan 5. derece olarak değerlendirilen grup oluşturdu.

9. kromozom için en sık rastlanan grubu %61 ile 2. derece olarak değerlendirilen grup oluşturdu. Bunu sırasıyla %23.4 oranıyla 3. derece, %10.6 oranıyla 1. derece, %1.1 oranıyla da 5. derece olarak değerlendirilen gruplar oluşturdu. 9. kromozomun 4. derece varyantını gösteren olguya rastlanmadı.

16. kromozomun en sık rastlanan grubu %51 oranıyla 2. derece varyantı oluşturdu. İkinci grubu %43 oranı ile 1. derece varyant grubu, sonraki grupları sırasıyla %4.3 oranı ile 3. derece ve %1.1 oranı ile 5. derece varyantları oluşturdu. 16. kromozomun 4. derece varyantına rastlanmadı.

Wilcoxon Matched - Pairs Testi kullanılarak yapılan istatistiksel çalışma ile 1, 9 ve 16. kromozomlarda homologlar arası değişimler incelendi. 1. kromozomda çok ileri düzeyde anlamlı fark, 9. kromozomda anlamlı fark, 16. kromozomda ise ileri düzeyde anlamlı fark bulundu.

Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Testi kullanılarak yapılan istatistiksel çalışma sonucu 1 ve 9. kromozomlar arası değişimlerde anlamlı fark bulunamadı. 1-16. kromozomlar arasında ve 9-16. kromozomların değişimleri arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark bulundu.

Çalışmamızda Y kromozomunun heterokromatin bölgesinde en büyük grupları %42.9 oranında "B" ve "N" olarak değerlendirilen varyantlar oluşturdu. "K" olarak değerlendirilen varyant ise %9.5 sıklıkta bulundu. En seyrek rastlanan varyant %4.8 oranıyla "ÇB" varyantı oldu (Bkz Tablo IV.2.). Olgularımızın birinde yine kromozom elde edilmesine rağmen fotoğraflarındaki aksaklıklar nedeniyle değerlendirme 21 olguda yapıldı.

**Tablo IV.2. :** Y kromozom-varyantlarının dağılımları

Toplam erkek sayısı	ÇB		B		N		K	
	n	%	n	%	n	%	n	%
21	1	4.7	9	42.9	9	42.9	2	9.5

**Şekil IV.2. :** Y kromozomu değerlendirilen 21 olgunun parsiyel karyogramı (sayfa 50)

Olgu No.	Krz. 19	Krz. Y	Krz. 22	Y'nin boyu	Olgu No.	Krz. 19	Krz. Y	Krz. 22	Y'nin boyu
1				B	22				N
2				B	24				B
8				B	26				N
9				K	28				N
12				N	31				N
13				B	34				K
14				N	42				ÇB
15				B	44				B
16				N	47				B
17				N					
19				N					
21				B					

### C bantlarının pozisyonlarına göre değerlendirilmesi:

**Tablo IV.3. :** C bant pozisyon varyantlarının 1, 9 ve 16. kromozomlara dağılımı

	İncelenen kromozom sayısı	p		q		p q	
		n	%	n	%	n	%
1. kromozom	94	-	-	94	%100	-	-
9. kromozom	94	6	%6.4	88	%93.6	-	-
16. kromozom	94	-	-	94	%100	-	-

1. kromozomda C-bantının "TI" ve "PI" pozisyonuna hiç rastlanmadı. Tüm olgularda C bandı q pozisyonunda bulundu.

9. kromozomda C-bantının "TI" pozisyonu %6.4 olarak bulundu. 9. kromozomda "N" pozisyonu %93.6 oranında bulundu. "PI" pozisyonuna rastlanmadı.

16. kromozomun C bandının "TI" ve "PI" pozisyonlarına rastlanmadı.

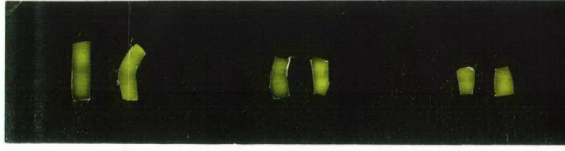
Çalışmamızdaki olgulara fluoreсан yöntemleri Q ve DA/DAPI, örnekleme olarak uygulandı (Şekil IV.3.).

Uyguladığımız teknikler sonucu marker kromozom tespit edilen iki olguda, markerlerin ikisinin de heterokromatin içermediği görüldü.

**Tablo IV.4. :** Homologların h Bölgelerinde Boy Polimorfizmlerinin Dağılımı

Kromozomlar	Büyüklik Dereceleri															Toplam
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.2	2.3	2.4	2.5	3.3	3.4	3.5	4.4	4.5	5.5	
1	3	4	-	-	-	8	14	2	-	13	2	-	1	-	-	47
9	2	6	-	-	-	25	4	-	1	9	-	-	-	-	-	47
16	13	14	-	-	1	15	4	-	-	-	-	-	-	-	-	47
Toplam	18	24	-	-	1	48	22	2	1	22	2	-	1	-	-	141
%	12.8	17	-	-	0.7	34.1	15.6	1.4	0.7	15.6	1.4	-	0.7	-	-	





a) 1. krz. 9. krz 16. krz.



b) 1. krz. 9. krz. 16. krz Y KRZ'u

**Şekil IV.3. :** a). QFQ ve CBL yöntemleri uygulanan olguda parsiyel karyogramların karşılaştırılması b). MG/DAPI ve CBL yöntemleri uygulanan olguda parsiyel karyogramların karşılaştırılması



a



b

Şekil IV.4. : a, b. Ag-NOR uygulanan metafaz örnekleri



## V. TARTIŞMA

Kromozomal polimorfizm çalışmalarında en sık kullanılan yöntemler, CBG, QFQ, DA/DAPI, NOR, G-11'dir. Bu yöntemler spesifik olarak heterokromatik bölgeleri boyamaktadır. Çalışmamızda, bu yöntemlerden heterokromatik bölgeleri göstermek, ayrıca boyama yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla CBG (CBL), QFQ, DA/DAPI (MG/DAPI) yöntemlerini, akrosentriklerin NOR bölgelerini göstermek amacıyla da Ag-NOR yöntemini kullandık.

Fluoresan yöntemlerinin kalıcı olmaması, fotoğraf eldesinin zorluğu, yöntemlerin gerektirdiği maddelerin pahalı olması nedeniyle olgularımıza QFQ ve MG/DAPI yöntemleri örnekleme olarak kullanıldı.

C bantlama ile heteromorfik bölgeler Patil ve Lubs'un (36) yöntemiyle değerlendirildi. Bu yönteme göre 1, 9 ve 16. kromozomların C-bant büyüklükleri, 16. kromozomun kısa kolu ile kıyaslanarak 1'den 5'e kadar değerlendirildi. Kompaktlaşma sonucu, 16p'nin çok değişiklik göstermemesi, 1, 9 ve 16. kromozomların qh bölgeleriyle karşılaştırıldığında ortalama bir büyüklüğe sahip olması ve kolay ayırt edilebilir bir kromozom olması nedeniyle 16p kriter olarak alındı.

Diğer gruplarla karşılaştırırken bizim 1-5'e kadar değerlendirdiğimiz derecelerden, sırasıyla ÇK, K, N, B, ÇB olarak bahsedeceğiz.

Araştırma Grupları	Buckton ve ark. (1976)		Fogle ve ark. (1980)		Craig-Holmes (1973)		Ghosh ve Singh (1976)		Tsezou ve ark. (1993)						
C Banlı	1	9	16	1	9	16	1	9	16	1	9	16			
Kromozomlar	1	9	16	1	9	16	1	9	16	1	9	16			
Sınıflandırma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Çok küçük	2.7	4.8	3.5	7.1	10.7	-	10	8.0	-	1.9	7.6	44.5			
Küçük	93.3	92	94.6	89.3	82.2	89.3	87.5	87	89.3	64	86.8	55.6			
Normal	3.7	2.8	2	3.6	7.1	10.7	2.5	5	10.7	34.1	5.6	-			
Büyük	0.3	0.4	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Çok Büyük	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
İncelen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Kromozom Sayısı	1854			162			40			60			234		

Araştırma Grupları	Podugolnikova (1983)			Engür (1991)			Verma ve ark. (1978)			Bulgularımız		
C Banlı	1	9	16	1	9	16	1	9	16	1	9	16
Kromozomlar	1	9	16	1	9	16	1	9	16	1	9	16
Sınıflandırma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Çok küçük	1.75	2	3.25	-	-	-	10	24	48	10.6	10.6	43.6
Küçük	30.75	22.75	37.5	22.3	22.3	19.2	44	53	44	38.3	64.9	51.0
Normal	51.25	39.75	47.25	54.6	61.6	66.1	45	21	8	44.7	23.4	4.2
Büyük	15.5	30	10.75	23.1	16.1	14.6	1	2	0	6.4	-	-
Çok Büyük	0.75	5.5	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İncelen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kromozom Sayısı	200			130			160			94		

Çalışmamızda 1. kromozomun en büyük grubunu, diğer çalışmaların çoğunda olduğu gibi (5,9,12,14,16,39,51) "N" varyantı oluşturdu. İkinci büyük grubu Craig-Holmes (9), Fogle ve arkadaşları (14), Podugolnikova ve arkadaşları (38), Verma ve arkadaşları (51) 'ın çalışmalarında olduğu gibi "K" varyantı oluşturdu. Üçüncü büyük grubu Tsezou ve arkadaşları (50) ve Verma ve arkadaşları (51) 'nın çalışmasına uygun olarak "ÇK" varyantı oluşturdu. Diğer çalışmalarda (5,9,12,14,16,38) "ÇK" varyantına rastlanmamıştır. Bazı çalışmalarda (5,12,16) ikinci büyük grubu oluşturan "B" varyantı, bizim çalışmamızda, Verma ve arkadaşları (51)'nin çalışmasında olduğu gibi dördüncü büyük grubu oluşturdu.

"ÇB" varyantı tüm çalışma gruplarının sonuçlarında hemen hemen hiç rastlanmayan veya en az rastlanan grubu oluşturmuştur. Bizim çalışmamızda da 1. kromozomun "ÇB" varyantına rastlanmadı.

9. kromozomun en büyük grubunu Tsezou ve arkadaşları (50) ve Verma ve arkadaşları (51) çalışmasındaki gibi "K" varyantı oluşturdu. Diğer çalışmalarda (5,9,12,14,16,38) 9. kromozomun en büyük grubunu "N" varyantı oluşturmuştur. Çalışmamızda 9. kromozomun ikinci büyük grubunu "N" varyantı oluşturdu. Üçüncü grubu "ÇK" varyantı, dördüncü grubu "ÇB" varyantı oluşturdu. Diğer çalışmaların çoğunda (5,9,12,14,16) "ÇK" varyantına rastlanmamıştır. Çalışmamızda 9. kromozomun "B" varyantına rastlanmadı.

16. kromozomun en büyük grubunu Tsezou ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi "K" varyantı oluşturdu. İkinci büyük grubu, yine Tsezou ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi "ÇK" varyantı oluşturdu. Çalışmamızda üçüncü büyük grubu diğer çalışmaların çoğunda (5,9,12,14, 16,38) en büyük grubu oluşturan "N" varyantı oluşturdu. Çalışmamızda 16. kromozomun dördüncü büyük grubunu diğer çalışmalarda hemen hemen rastlanmayan "ÇB" varyantı oluşturdu. Diğer çalışmaların çoğunda (5,9,12, 14,16,38) ikinci ve üçüncü büyük grupları oluşturan "B" varyantına, Tsezou

ve arkadaşları ile Verma ve arkadaşları (51)'nin çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da rastlanmadı.

Değişik araştırma gruplarının sonuçlarının karşılaştırılması çok anlamlı olmamaktadır. Çünkü her grubun C-bant değerlendirme yöntemleri farklıdır. Buckton ve arkadaşları, Fogle ve arkadaşları, Craig-Holmes, C bantlarını sadece "B", "K" ve "N" olmak üzere üç grupta değerlendirmişlerdir. Bu yöntemle göre birbirinden oldukça farklı boyda C bandına sahip kromozomlar aynı kategoride sınıflandırılabilir (51). Bizim kullandığımız değerlendirme yöntemi Tsezou ve arkadaşları (50) ile Verma ve arkadaşları (51)'nin yöntemleri ile aynıdır. Görüldüğü üzere, sonuçlarımız en çok bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumaktadır.

Y kromozomunun heteromorfizmleri ile ilgili çalışmaların çoğunda "N" olarak değerlendirilen varyantın, en büyük grubu oluşturduğu bildirilmiştir (13,52). Bizim çalışmamızda "N" ve "B" varyantları %42.9 ile en büyük grupları oluşturdu. Yine Verma ve arkadaşları (52) ile Engür'ün çalışmalarında olduğu gibi ikinci büyük grubu %9.5 oranıyla "K" varyantı oluşturdu.

1, 9 ve 16. kromozomların C-bant pozisyon varyantlarının karşılaştırılması tablo V.2.'de gösterilmektedir.

1. kromozomun parsiyel ve total inversiyonuna hiç rastlanmadı. Yapılan araştırmaların hemen tümünde 1. kromozomun total inversiyonuna rastlanmamıştır. 1. kromozomun parsiyel inversiyonunu, bazı araştırmacılar (21) çok düşük oranda bulmuşlardır. Değişik çalışmalarda ise (5,12) 1. kromozomun parsiyel inversiyonu değişik oranlarda bulunmuştur.

Çalışmamızda 9. kromozomun parsiyel inversiyonuna hiç rastlanmadı. Bu, Craig-Holmes (9), Hsu ve arkadaşları (21), Ghosh ve Singh (16)'in çalışmalarına uygunluk göstermektedir. 9. kromozomun parsiyel inversiyonunu tespit eden çalışmaların oranlarında ise farklılıklar gözlenmektedir (5,12,14).

Yapılan çalışmaların hemen tümünde 9. kromozomun total inversiyonuna değişik oranlarda rastlanmıştır. Bizim alışmamızda 9. kromozomun total inversiyonu %6.4 oranında bulundu.

Çalışmamızda diğer grupların (5,9,14,16,21) alışmalarında olduğu gibi 16. kromozomun parsiyel veya total inversiyonuna rastlanmadı.

Yapılan çalışmaların tümünde pozisyon heteromorfizmini en sık gösteren kromozomun 9. kromozom olduğu gösterilmiştir.



Araştırma Grupları	Buckton ve arkadaşları		Fogle ve arkadaşları		Craig-Holmes (1973)		Hsu ve arkadaşları (1987)		Ghosh ve Singh (1976)	
	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9
İncelenen Kromozomlar	1	16	1	16	1	16	1	16	1	16
Total Inversiyon	-	1.4	-	3.6	-	2.5	-	1.98	-	3.3
Parsiyel Inversiyon	1.3	0.8	-	7.1	-	-	0.032	-	-	-
İncelenen Kromozom Sayısı	1854		162		40		12500		60	

Araştırma Grupları	Engür (1991)		Bulgularımız	
	1	9	1	9
İncelenen Kromozomlar	1	16	1	16
Total Inversiyon	-	2.3	-	6.4
Parsiyel Inversiyon	3.9	16.1	1.5	-
İncelenen Kromozom Sayısı	130		94	

Tablo V.2.



## Bant Yöntemlerinin Karşılaştırılması

1, 9, 16 ve Y kromozomlarını oluşturan heterokromatin, farklı satellit DNA'lardan meydana gelir. Bu nedenle farklı boya yöntemleri ile farklı görüntülenirler. Örneğin C bantlama ile tümü de aynı yoğunlukta boyanın bu bölgeler diğer boyalarla farklı görüntülenir. Örneğin, Y'nin heterokromatin bölgesi QFQ ile parlak gösterilirken, 1, 9 ve 16. kromozomların heterokromatin bölgeleri soluk gösterilir (13).

Örnekleme olarak uyguladığımız Q bantlama ve MG/DAPI boyama yöntemlerini C bantlama ile karşılaştırdık. Floresan yöntemlerle yapılan değerlendirmeler, tek bir preparattan ve tek kişi tarafından yapılabildiğinden C bantlamaya göre daha subjektif kalmaktadır. Floresan yöntemler ve C bantlama, kromozomda aynı bölgeyi yansıtmazlar (5).

Q-bantlama, parlak (P) veya soluk (S) olarak değerlendirilmektedir (61). Bizim çalışmamızın amacı Q-bantlama ile populasyon taraması olmadığı, amaç C-bantlama ile karşılaştırma olduğu için olgularımızda floresan bantlarının değerlendirilmesine gerek duymadık. Q bantlama ve C bantlama arasında yaptığımız karşılaştırma sonucu heterokromatik bölgelerin ve bunların varyasyonlarının gösterilmesinde C bantlamanın daha kullanışlı olduğu sonucuna vardık. Q bantlamanın, C bantlama gibi objektif olmaması, inversiyonların belirlenmesinde daha az bilgi verici olması, diğer floresan tekniklerde olduğu gibi mikroskop incelemesindeki güçlükler, preparatların çabuk solması, bu sonuca varmamıza neden oldu.

1, 9 ve 16. kromozomların qh bölgeleri C bantlama ile eşit koyulukta boyanmaktadır. Fakat qh bölgesinin proksimalinde ve distale yakın kısmındaki heterokromatin yapıları farklıdır. C bantlama ile her ikisi de pozitif olarak boyanır, fakat DA/DAPI (MG/DAPI) ile sadece distaldeki heterokromatin boyanmaktadır. 15. kromozomun kısa kolu da DA/DAPI ile pozitif boyanmaktadır. DA/DAPI yöntemi, inversiyonların qh bölgesinden

mi, sentromerden mi kaynaklandığını araştırmak ve 15p'deki varyasyonları tespit etmek için kullanışlı olabilir (49). C-bantlama ile karşılaştırılırsa fluoresan yöntemlere ait dezavantajlarından dolayı heteromorfizm taramalarında rutin kullanım için tercih edilir bir yöntem değildir.

QFQ ve MG/DAPI yöntemlerinde karşılaştığımız en büyük zorluk, fluoresan fotoğrafların banyosu ve basılmasında, yeterli bilgiye ve deneyime sahip fotoğraf uzmanı ve ekipmanı olmamasından kaynaklanan fotoğraf kalitesinde yetersizlik oldu.

Polimorfizm çalışmalarında fluoresan yöntemler, bazı durumlarda C bantlamayı destekleyici yöntemler olarak kullanılabilir. Bugün C-bantlamanın yetersiz kaldığı durumlarda, çok daha spesifik olan moleküler sitogenetik yöntemler bilgi verici olmaktadır. Restriksiyon enzimleri ile istenilen bölgenin kesilip Giemsa ile boyanması (Alu I/Giemsa, Taq I/Giemsa) (28,56) ve In situ hibridizasyon teknikleri daha özgün olmaktadır. Moleküler tekniklerin pahalı ve uygulanması zor teknikler olması sebebiyle C bantlama ön çalışma olarak kullanılmaktadır.



## VI. ÖZET

Heteromorfizmler toplumda yüksek sıklıkla rastlanan ve fenotipik bir etki göstermeyen kromozomal değişikliklerdir. Kromozomlardaki bu polimorfik bölgeleri incelemek amacıyla CBL, QFQ, MG/DAPI ve Ag-NOR yöntemleri kullanıldı. Bu yöntemlerden CBL tüm olgulara, MG/DAPI, QFQ ve Ag-NOR örnekleme şeklinde uygulanarak bu yöntemlerin birbirlerine üstünlükleri karşılaştırıldı.

İ.Ü. Genetik ve Teratoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne kromozom analizi için başvuran 50 olguda uygulanan CBL bant yöntemiyle, heteromorfik bölgelerin değerlendirilmesi yapıldı. 1. kromozomun qh bölgesinin "Normal" olarak değerlendirilen varyant, 9. ve 16. kromozomların qh bölgelerinin "küçük" olarak değerlendirilen varyantlar, Y kromozomunun "Büyük" ve "Normal" olarak değerlendirilen varyantları en büyük grubu oluşturdu.

Fluoresan yöntemlerdeki güçlükler sebebi ile rutin polimorfizm taramalarında CBL bantlamanın daha kullanışlı olduğu ortaya kondu. Fluoresan yöntemlerin de CBL'yi destekleyici yöntem olarak kullanılmasının daha uygun olacağı sonucuna varıldı.

Ag-NOR yöntemi ise akrosentriklerin NOR bölgelerini gösterdiği için diğer yöntemlerle karşılaştırması yapılmadı. Akrosentriklerin NOR'larında varyasyon örnekleri gösterildi.

## **VII. SUMMARY**

Heteromorphisms are chromosomal variants seen in high frequency in the population without having a phenotypic effect.

CBL, QFQ, MG/DAPI and Ag-NOR techniques were used to analyse the chromosomal polymorphisms. While CBL banding has been applied on all cases, MG/DAPI, QFQ and Ag-NOR techniques were applied on selected cases in order to compare the efficiency of the methods in the analysis of heteromorphisms.

The heteromorphic sites of the 50 cases referred to Istanbul University, Genetic and Teratology Research Center (GETAM) were evaluated by CBL banding. "Normal" variant of the qh region of chromosome 1, "Small" variant of the qh regions of chromosomes 9 and 16 and "Large" and "Normal" variants of the Y chromosome were found in higher frequency.

Due to the inadequacy of the fluorescent techniques, CBL was observed to be more useful in routine screening of the polymorphisms. And the fluorescent techniques were needed to be used to support CBL.

Ag-NOR technique was not compared with the other techniques since it is only used to show the variations in NOR regions in the acrocentric chromosomes.

## VIII. KAYNAKLAR

1. Aguilar L, MD, Lisker R, MD, Ruz L, PH D, and Mutchinick O, MD : Constitutive Heterochromatin Polymorphisms in Patients with Malignant Diseases. *Cancer* 47:2437-2439, 1981
2. Babu A and Verma RS : Chromosome Structure : Euchromatine and Heterochromatine. *Int. Rev. of Cytology*, Vol. 18: 1-60, 1987
3. Barch MJ : The Act Cytogenetics Laboratory Manual. Raven Press, London. Second edition, 1991
4. Blackburn HE : Structure and function of telomers. *Nature*, Vol. 350, 18 Apr 1991: 569-573
5. Buckton KE, O'Riordan ML, Jacobs PA, Robinson JA, Hill R and Evans HJ : C and Q-Band Polymorphisms In The Chromosomes of three human populations. *Ann. Hum. Genet.*, Lond (1976), 40, 99-112
6. Casperson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ : Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agent. *Chromosoma (Berl.)* 30: 215-217 (1970)
7. Connor JM, Ferguson-Smith MA : *Essential Medical Genetics*, Blackwell Scientific Publications, fourth edition, 1993
8. Craig-Holmes AP, Moore FB, and Shaw MW : Polymorphism of Human Constitutive Heterochromatine. *Science* Vol.174, 702-704, 1971

9. Craig-Holmes AP, Moore FB, and Shaw MW : Polymorphism of Human C-Band Heterochromatine. Am. J. Hum. Genet. 25: 181-192, 1973
10. Docherty Z, Hulten MA : Rare variant of chromosome 9. Am. J. Med. Genet. 45: 105-106, 1993
11. Emery AEH, Mueller R : Elements of Medical Genetics, Student Note, ELBS with Churchill Livingstone, eight edition, 1992
12. Engür A : CBG-Bantlama Yöntemi ile Türk Populasyonunda "Kromozomal Polimorfizm" Taranması. Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 1991
13. Ertman B : Aspect of Evalvation, Significance and Evolution of Human C Band Heteromorphism (Rev.). Hum. Genet. 61: 281-294, 1982
14. Fogle TA and Mc Kenzie WH : Cytogenetic Study of a large Black Kindred : Inversions, Heteromorphisms, and Segregation Analysis. Hum. Genet. 55: 345-352, 1980
15. Ford JH, Collen DF, Roberts CG, and Jahnke AB : Interactions Between C-Bands of Chromosomes 1 and 9 in Reccurent Reproductive Loss. Hum. Genet. 663: 58-62, 1983
16. Ghosh PK and Singh IP : Morphologic Variability of Human Chromosomes: Polymorphism of Constitutive Heterochromatine. Hum. Genet. 32: 142-154, 1976
17. Hacıhanefioğlu S : Sitigenetik Ders Notları, 1990
18. Hastie MD, Dempsler M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC: Telomere Reduction in Human Colorectal Carcinoma and with Ageing. Nature. Aug. 30, 1990, 346 (6287): 866-868

19. Hemming L and Burns C : Heterochromatic polymorphism in sportaneus abortions. *J. Med. Genet.* 16: 358-362, 1979
20. Hoo JJ : A new chromosome 9 variant : an extra band within the 9 qh region. *Clin. Genet.* 41: 157-158, 1992
21. Hsu LYF, Benn A, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD : Chromosomal Polymorphisms of 1, 9, 16 and Y in 4 Major Ethnic Groups. *Am. J. Med. Genet.* 26: 95-101, 1981
22. Hsu TC and Arrighi FE : Distribution of Constitutive Heterochromatine in Mammalian Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 34: 243-253, 1971
23. Islam MQ, Köpf I, Levan A, Granberg S, Friberg L-G and Levan G : Cytogenetic Findings in 111 Ovarian Cancer Patients: Therapy-Related Chromosome Aberrations and Heterochromatic Variants. *Cancer Genet. Cytogenet.* 65: 35-46, 1993
24. Jalal SM, Kukolich MK, Garcia M, Day DW : Euchromatic 9 q+ Heteromorphism in a Family. *Am. J. Med. Genet.* 37: 155-156, 1990
25. Kaiser P : Pericentric Inversions (Review Article). *Human Genet.* 68: 1-47, 1984
26. Kokaly-Vokac N, Almedia A, Viegas-Pe'quignot E, Jean-Pierre M, Malfoy B and Dutrillaux B : Specific induction of uncorling and recombination by azacytidine in classical satellite-containing constitutive heterochromatine. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 11-15, 1993
27. Lindner LE : Improvement in the Silver Staining Technique for Nucleolar Organizer Regions (Ag-NOR). *The J. Histochemistry and Cytochemistry* Vol. 41, No.3, 439-445, 1993

28. Luke S, Verma RS, Conce RA and Mathews T : Molecular Characterization of the Secondary Constriction Region (qh) of Human Chromosome 9 with Pericentric Inversion. *J. Cell. Science* 103: 919-923, 1992
29. Lüleci G : *Sitogenetik Uygulama Yöntemleri*, Meteksan A.Ş., 1990
30. Maes A, Staessen C, Hens C, Vamos E, Kirsch-Volders M, Lauwers MC, Defrise-Gussenhoren E and Susanne C : C heterochromatine variation in couples with recurrent early abortions. *J. Med. Genet.* 20: 350-356, 1983
31. Manuelidis L : Chromosomal Localization of Complex and Simple Repeated Human DNA's. *Chromosoma (Berl.)* 66: 23-32, 1978
32. Mayer M, Matsuura J and Jacobs P : Inversions and other unusual heteromorphisms detected by C-Banding. *Hum. Genet.* 45: 43-50, 1978
33. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA : Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613-616, 1960
34. Olson SB, Magenis RE, Lourien EW : Human Chromosome Variation: The Discriminatory Power of Q-Band Heteromorphism (Variant) Analysis in Distinguishing Between Individuals with Specific Application to Cases of Questionable Paternity. *Am. J. Hum. Genet.* 38: 235-252, 1986
35. Paris Conference (1971) Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects. Original Article Series Vol 8, No 7, The National Foundation, New York (1972)
36. Patil SR and Lubs HA : Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9 and 16 by C-Banding. *Hum. Genet.* 38: 35-38, 1977

37. Pluta AF, Cooke CA, and Earnshaw WC : Structure of the human centromere at metaphase. (Rev.). TIBS 15 May 1990, 181-185
38. Podugolnikova OA and Blumino MG : Heterochromatic Regions on Chromosomes 1, 9, 16 and Y in Children with some Disturbances Occuring During Embryo Development. Hum. Genet. 63: 183-188, 1983
39. Podugolnikova OA, Grigorjova NM, and Blumina MG : Relationship of the Variability of the Heterochromatic Regions of Chromosomes 1, 9, 16 and Y to some anthropometric Characteristic in Children With Embryopathies of Unknown Etiology and In Children with Down Syndrome. Hum. Genet. 68: 254-257, 1984
40. Rattner JB : The Structure of the Mammalian Centromere. Bio. Essays. Vol 13, No 2, Feb. 1991, 51
41. Robinson A, Buckton KE, Spoward G, Newton M, Jacobs PA, Evans HJ and Hill R : The Segregation of Human Chromosome Polymorphisms. Ann. Hum. Genet. 46: 113-121, 1976
42. Roland B, Chernos JE, Cox DM : 9 qh+ Variant Band in Two Families. Am. J. Med. Genet. 42: 137-138, 1992
43. Rooney DE and Czepulkowski : Human Cytogenetics, a practical approach. IRL Press, 1986
44. Sozansky OA, Zakharov AF, and Banjush VA : Intercellular NOR-AG Variability in Man. Hum. Genet. 68: 299-302, 1984
45. Spinner NB, Eunpu DL, Schmickell RD, Zackai EH, Mc Eldrew D, Banin GR, Dermid MC and Emanuel S : The Role of Cytologic NOR Variants in the Etiology of Trisomi 21. Am. J. Hum. Genet. 44: 631-638, 1989



46. Therman E : Human Chromosomes Structure, Behavior, Effects, Springer, New York, Berlin Heidelberg Tokyo, 1986
47. Thompson PW and Roberts SH : A new variant of chromosome 16. Hum. Genet. 76: 100-101, 1987
48. Thompson and Thompson : Genetics in Medicine, fifth edition, WB Saunders Company, 1991
49. Tofanelli S, Stanyon R, Agostini M, Franceschi MG and Paoli G : Variability of DA/DAPI and C Heterochromatic Regions: A population Study. Hum. Biology. Aug. 1993, Vol 65, No 4, 635-646
50. Tsezou A, Kitsiou S, Kosmidis H, Pardousi K, Katsouyanni K, Sinaniotis C : Constitutive Heterochromatin Polymorphisms in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric Hematology and Oncology, 10: 7-11, 1993
51. Verma RS, Dosik H and Lubs HA : Size and Pericentric Inversion Heteromorphisms of Secondary Constriction Regions (h) of Chromosomes 1, 9 and 16 as Detected by CBG Technique in Caucasians: Classification, Frequencies, and Incidence. Am. J. Med. Genet. 2: 331-339, 1978
52. Verma RS, Dosik H, Schorfand T, Lubs HA : Length Heteromorphisms of Fluorescent (f) and Nonfluorescent (nf) segments of Human Y Chromosome : Classification, Frequencies, and Incidence in Normal Caucasians. J. Med. Genet. 15: 277-281, 1978
53. Verma RS and Dosik H : Human Chromosomal Heteromorphisms : Nature and Clinical Significance. Int. Rev. Cyt. Vol 62: 361-383, 1980
54. Verma RS and Babu A : Human Chromosomes, Manual of Basic Techniques, 1989, Pergamon Press

55. Verma RS, Conte RA, Luke S, Sindwani V and Macera MJ : Deciphering the Fluorescent Variability of Human Genomic Heterochromatine by DA/DAPI Technique. Clin. Genet. 42: 267-270, 1992
56. Verma RS, Luke S, Mathews T, Conte RA : Molecular Characterization of the Smallest Secondary Constriction Region (qh) of Human Chromosome 16. GATA 9(5-6): 140-142, 1992
57. Verma RS, Luke S, Brennan JP, Mathews T, Conte RA, and Macera M : Molecular Topograph of the Secondary Costriction Region (qh)of Human Chromosome 9 with an Unusual Euchromatic Band. Am. J. Hum. Genet. 52: 981-986, 1993
58. Warburton PE, Waye JS, and Willard HF : Nonrandom Localization of Recombination Events in Human Satellite Repeat Unit Variants: Implications for Higher-Order Structural Characteristics within Centromeric Heterochromatine. Molecular and Cellular Biology, Oct. 1993, 6520-6529
59. Willard HF : Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. Am. J. Hum. Genet. 37: 524-532, 1985
60. Willard HF and Waye JS : Hierarchical order in chromosome specific alpha satellite DNA. Trend Genet. Vol 3, z: 192-198, July 1987
61. Willard HF : Centromeres of Mammalian Chromosomes (Review Article). TIG, December 1990, Vol 6, No 12, 110-115
62. Yılmaz Ş : Tekrarlayan Düşükleri Olan Çiftlerde Sitogenetik İncelemeler. Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, 1991
63. Yunis JJ, Roldan L, Yasmineh WG, Lee JC : Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. Nature, Vol 231, No 5304, 532-533, June 25, 1971