

18195

T.C.

İstanbul Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Anabilim Dalı

Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı

TURNER SENDROMUNDAKİ X KROMOZOMU MORFOLOJİK  
DÜZENSİZLİKLERİNİN İNCELENMESİ

**Y. G.**

**Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Tıbbi Biolog Yelda TARKAN

Danışman : Prof.Dr.Asım CENANİ

İstanbul-1991

## İ Ç İ N D E K İ L E R

SAYFA

Ö N S Ö Z

GİRİŞ ..... 1

GENEL BİLGİLER ..... 3

MATERYAL METOD ..... 55

BULGULAR ..... 63

TARTIŞMA ..... 69

ÖZET ..... 76

SUMMARY ..... 78

KAYNAKLAR ..... 80

## Ö N S Ö Z

İ.Ü. Genetik ve Teratoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (GETAM) Sitogenetik Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışma sırasında, Engin bilgi ve deneyiminden yararlandığım tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca üzerimde büyük emeği bulunan, bilimsel açıdan eseri olduğum değerli hocam, danışmanım Sayın Prof.Dr.Asım CENANİ'ye,

Çalışmam sırasında gereksinim duyduğumda beni yalnız bırakmayan, değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Öğr.Gör. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU'na,

Bulguların istatistik olarak değerlendirilmesindeki yardımlarından ötürü Sayın Prof.Dr.Mustafa ŞENOCAK'a,

İhtiyaç duyduğumda bilgisine başvurduğum Sayın Doç.Dr Tülay İREZ'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm Bio.Ayhan DEVİREN'e,

Gereksinim duyduğumda daima yanımda bulunan, en yoğun anlarımda beni yalnız bırakmayan, çalışmam sırasında çok değerli yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Uzm.Tıb.Bio.Aslı N. SİLAHTAROĞLU'na, Bio.Gonca GÖKYAR'a, Tıb.Bio.Şükriye YILMAZ'a,

Fotoğraf laboratuvarındaki benim için çok değerli çaba-  
larından ötürü İlnur BAYAZIT'a,

Materyal temininde yardımcı olan hemşire Zekiye ERBAŞ'a  
Bio.Seher KAYA'ya,

Ve tüm yaşamım boyunca olduğu gibi bu çalışma sırasın-  
da da beni destekleyen ve yardımcı olan aileme,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yelda TARKAN,

## G İ R İ Ő

Bilindiđi gibi memelilerin erkeklerinde bir, dişilerinde iki adet X kromozomu bulunur. Fakat normalde cinsler arasında X kromozomu üzerindeki genlerin belirlediği nitelikler açısından bir farklılık yoktur. Bu durum X kromozomundaki genler için bir dozaj kompensasyon mekanizması olduğunu dűşündürműştür. 1961'de Mary Lyon, bugün kendi adıyla anılan hipoteziniileri sürerek bu duruma açıklık getirmiştir. Bu hipoteze göre, memelilerin diři hücrelerinde bulunan iki X kromozomundan biri, rastgele bir seçimle, embriyonel hayatın erken dönemlerinde fonksiyonel olarak inaktifleşir ve kondanse olarak X kromatinini oluşturur.

Diğer taraftan, anormal bir X kromozomuna sahip hastalarda yapılan çalışmalar, inaktifleşecek olan X kromozomunun seçimindeki rastgeleliğin zaman zaman ortadan kalktığını göstermiştir. Bu tür olgularda ağırlıklı olarak defektif olan X kromozomunun inaktivasyona uğradığı ve inaktif X kromozomunun karakteristik özelliği olan S fazında geç replikasyona uğradığı bildirilmektedir.

İnaktif X kromozomunun S fazında diğer kromozomlardan daha geç bir zamanda replikasyona uğramasından yararlanarak, DNA'ya <sup>3</sup>H-timidin inkorpore edilen otoradyografi ya da BrdU

inkorporasyonundan sonra çeşitli fluoressan boyalarla boyama yöntemleri ile inaktif X kromozomunu diğer kromozomlardan ayırd etmek mümkündür.

Bu çalışmada, seçilen inaktif X kromozomunu gösterme yöntemlerinin laboratuvarımızda denenerek rutin olarak kullanılabilir hale getirilmesi ve değişik kromozom yapılarına sahip Turner Sendromu hastalarının lenfositlerindeki X inaktivasyon patternlerinin incelenerek, seçimin tesadüfi olup olmadığının normal ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### X Kromozomu :

Cinsiyeti belirleyen kromozomlardan (gonozomlar) biri olan X kromozomu normal kadında 44 adet otozomun yanında iki adet bulunurken, normal erkekte bir X ve bir Y kromozomu bulunur. X kromozomu haploid karyotip uzunluğunun % 5,3'ünü oluşturur ve sentromer indeksi 0,38'dir (57).

Y kromozomunun aksine, üzerinde çok sayıda gen taşır. Çeşitli laboratuvarlarda yürütülen kromozom haritalama yöntemleri ile bu güne kadar X kromozomuna 150 kadar gen yerleştirilmiştir (15).

Belirli bir X kromozomal hastalıktan sorumlu olduğu bilinen X kromozom üzerindeki genler ve ilgili oldukları hastalıklar Tablo 1'de görülmektedir (39). Tablo 2'de ise, hastalıkla ilgili olduğu düşünüldüğü halde, hastalıkla gen arasındaki ilişkinin direkt olarak molekül ar ya da biyokimyasal metodlarla kanıtlanamadığı durumlar gösterilmiştir (39).

X kromozomu erkekte bir adet, kadında iki adet bulunduğu için, üzerindeki genlerin ekspresyonu da cinsler arasında bazı farklar gösterir. Örneğin; X kromozomu üzerindeki

resesif bir genin etkisi sadece erkeklerde görülür. Çünkü kadınlar genellikle bu tür genler için heterozigot durumda bulunurlar. X kromozomal genler erkekte daima hemizigot durumda olduklarından, resesif de olsalar, etkilerini fenotipte gösterebilirler. X'e bağlı resesif bir hastalığın kadında ortaya çıkabilmesi için, homozigot durumda bulunması gereklidir. Ya da bu hastalığı taşıyan kadın X kromozomu monozomisi veya o gen bölgesi için parsiyel monozomisi olan Turner Sendromlu bir birey veya kadın görünümünde olduğu halde, 46, XY kromozom yapılı testiküler feminizan bir hasta olabilir.

#### X K r o m a t i n i :

X kromotini, cinsiyet kromatini ya da Barr cisimciği, normalde yalnızca dişi cinsiyetli memelilerde bulunan özel bir kromatindir. Çekirdek zarına yapışık ve 0.7-1.4 büyüklüğünde, genellikle çekirdek içine bakan yüzü dış bükey ve koyu boyanan bir cisim görünümündedir. Resim 1. (3).

X kromatini ilk kez 1949 yılında Barr ve Bertram tarafından dişi kedilerin sinir hücrelerinde gösterilmiştir. Feulgen (+) olan ve methyl-green-pyronin tekniği ile yeşil renge boyanan X kromatininin çekirdekçik gibi RNA değil, DNA yapısında olduğuda gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla, X kromatininin dişi kedilerin yalnızca sinir hücrelerinde değil, tüm vücut hücrelerinde bulunduğu, ayrıca insan da dahil tüm diğer memelilerin dişilerinde de varlığı ortaya çıkarılmıştır.





Resim 1.

Normalde erkeklerde hiç X kromatinine rastlanmazken, kadınlarda bir adet X kromatini bulunur. Buna karşın, tek bir X kromozomu taşıyan 45,XO kromozom yapılı Turner Sendromlu kişilerde normal kadınların aksine hiç X kromatini görülmez. 47, XXY kromozom konstitüsyonuna sahip Klinefelter Sendromlu bireylerde ise normal erkeklerin aksine bir adet X kromatini vardır.

Fibroblast kültürlerinden, vaginal smeardan ve kıl köklerinden de elde edilebilmesine karşın, X kromatini çalışmaları en çok yanak mukozasında yapılır. Yanak mukozasından hazırlanmış preparatlarda X kromozomları sayı ve şekil bakımından normal olan kadınlar için X kromatini sıklığı % 20-80 arasında değişir. Bu değişkenliğin nedeni hem kullanılan teknik ve materyale, hem de fizyolojik etkenlere bağlıdır. X kromatininin en yüksek oranda görüldüğü materyal amniyotik zarlardır (% 95 kadar). Ayrıca bu değişkenlik laboratuardan laboratuara da ortaya çıkar (3).

Önceleri, X kromatininin dişi hücrelerindeki iki X kromozomunun heterokromatik bölgelerinin birleşmesi ile meydana geldiği düşünülmüşse de, yapılan çalışmalar X kromatininin tek bir X kromozomu tarafından meydana getirildiğini göstermiştir (48). X kromatini normal kadındaki iki X kromozomundan birinin rastgele olarak yoğunlaşması ve inaktivasyonu sonucu oluşmakta ve yalnızca hücre siklüsünün S fazında görülebilmektedir. Eğer kadında üç X kromozomu varsa, bunlardan ikisi heteropiknotik durum alır ve iki X kromatini görülür.

TABLO 1 : X Kromozomu Üzerindeki Hastalık Genleri

Bölgesel Lokalizasyon	Gen Sembolü	Marker	Hastalık
Xp 22.32	STS	Steroid Sulfataz	İktiyozis
Xp 22.1	PDHAL	Piruvat Dehidrogenaz El alfa sub ünitesi	X'e bağlı Lak- tik Asidoz
Xp 21.3-p21.1	DMD	Distrofin	Duchenne ve Becker Musku- ler Distrofi
Xp 21.1	CYBB	Sitokrom b -245	Kronik Granü- lomatoz
Xq 12	AR	Androjen Reseptörü	Testiküler Feminizan
Xq 21.3-q 22	GLA	Alfa-galaktozidaz	Fabry Hastalığı
Xq 21.3-q 22	PLP	Proteolipid Protein	Pelizaeus-Merz- bacher Hastalığı
Xq 21-Xq 22	TBG	Tiroksin Binding Prot.	Tiroksin Binding Protein Eksikliği
Xq 21-q27	PRPS	Fosforibozil Pirofos- fat Sentetaz 1	Gut
Xq 26	HPRT	Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transfe- raz	Lesch-Nyhan Sendromu
Xq 26.3-q27.1	F9	Koagülasyon Faktör 9	Hemofili B
Xq 27.3-q 28	IDS	İduonat-2-Sulfataz	Hunter Sendromu
Xq 28	F8C	Koagülasyon Faktör 8C	Hemofili A
Xq 28	G6PD	Glükoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	G6PD Eksikliği
Xq 28	GCP	Yeşil Koni Pigmenti	Renk Körlüğü, Protan
Xq 28	RCP	Kırmızı Koni Pigmenti	Renk Körlüğü Protan
Xq 28	PGK 1	Fosfogliserat kinaz 1	PGK eksikliği hemolitik anemi

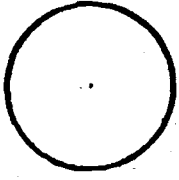
TABLO 2 : Hastalık - Gen İlişkisi

A D A Y G E N			H A S T A L I K		
Bölgesel			Bölgesel		
Lokalizasyon	Sembol	Marker	Lokalizasyon	Sembol	Hastalık
Xp22.31-p22.1	AMG	Amelogenin	Xp22	AIH 1	Amelogene- sis imper- fekta
Xp21.3-p21.2	GK	Gliserol kinaz	Xp21.3-p21.2	GK	Gliserol kinaz ek- sikliği
Xp11.4	PFC	Properdin P faktörü Kompleman	Xp21-p11	PFD	Properdin faktör B eksikliği
Xq12-q13	PHKA	Fosforilaz kinaz alfa sub ünitesi	X	PHK	Fosforilaz kinaz ek- sikliği
X	ALAS2	Aminolevuli- nat delta sentetaz 2	X	ASB	Sideroblas- tik Anemi

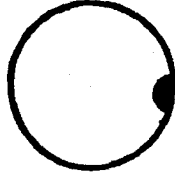
Aynı şekilde, hücrelerinde iki X kromozomu taşıyan Kli-  
nefelter Sendromlu bir erkekte de X kromozomlarından biri inak-  
tifleşip yoğunlaşır ve bir X kromatini görülür. Yani hücrede  
kaç X kromozomu varsa, bir tanesi dışında hepsi inaktifleşerek  
X kromatini oluştururlar. Buna n-1 kuralı denir ve.

$$B = n - 1$$

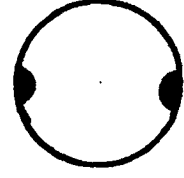
şeklinde gösterilir. Burada B Barr cisimciği sayısını, n ise  
X kromozomu sayısını ifade etmektedir. Şekil 1 (3).



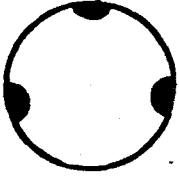
46,XO  
46,XY  
47,XXY



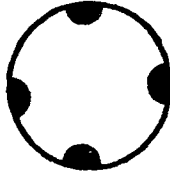
46,XX  
47,XXY



47,XXX  
46,XXXY



48,XXXX  
49,XXXXY



49,XXXXX

Şekil 1.

Poliploidi durumlarında, her diploid kromozom seti için bir aktif X kromozomu bulunacak şekilde inaktivasyon olur. Bu durumda, n-1 kuralı aşağıdaki gibi ifade edilir :

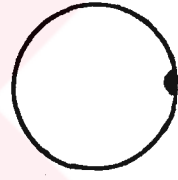
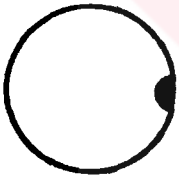
$$B = X - \frac{P}{2}$$

Buradaki B simgesi yine X kromatini sayısını, X simgesi hücrede bulunan X kromozomu sayısını, ve P simgesi de hücrenin ploidi derecesini göstermektedir (3).

X kromatini sayısının normalden sapmasına neden olan bir durum da organizmanın mozaik olmasıdır. Örneğin normal

ve XO hücreleri birlikte taşıyan mozaik Turner olgularında X kromatini sayısı normalden az çıkmaktadır (3).

X kromatininin normalden büyük ya da küçük olması X kromozomlarında yapısal bir anomalinin bulunduğunu gösterir. Örneğin, normalden daha küçük gözükken X kromatini X kromozomunda bir eksilme ( $46,X(Xq-)$  ya da  $X(Xp-)$ ), bir kısa kol izokromozomu ( $46,Xi(Xp)$ ) ya da, bir halka kromozom ( $46,Xr(X)$ ) olduğunu gösterir. Buna karşılık, normalden daha büyük gözükken X kromatini ise, X kromozomundaki bir artma ya da uzun kol izokromozomunu belgeler ( $46,Xi(Xq)$ ). Şekil 2 (3).



Normal X Kromatini

46,XX

Normalden Büyük

46, $Xi(Xq)$

46, $X(Xq+)$

46, $X(Xp+)$

Normalden Küçük

46, $X(Xp-)$

46, $X(Xq-)$

46, $Xr(X)$

46, $Xi(Xp)$

Şekil 2.

Ayrıca X kromozomu periferik nötrofil lökositlerde drumstick (davul tokmağı) denen çekirdek çıkıntılarını oluşturur. Bunlar kadınlardan yapılan periferik kan yaymalarında % 5 dolayında gözükür ve erkeklerde bulunmaz. X kromozomundaki düzensizliklerin bu oluşumlara yansımaları da kuramsal olarak olasıdır fakat X kromozom düzensizliklerini incelemek için drumstick incelemeleri pek geçerli bir yöntem değildir (3).

## X Kromozomunun Replikasyonu:

1960'lı yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından, otoradyografi yöntemi ile kromozomların replikasyon patternlerini ortaya çıkarmaya yönelik olarak yapılan çalışmalarda, memelilerde, dişi hücrelerindeki iki X kromozomundan birinin, diğer kromozomlardan farklı replikasyon özellikleri gösterdiği dikkati çekmiştir (2). X kromozomlarından biri diğer kromozomlarla aynı zamanda replikasyona uğrarken, diğeri (ya da fazla X varsa diğerleri), öteki kromozomlar replikasyonlarını tamamladıkları ya da tamamlamak üzere oldukları bir sırada, S fazının sonlarında replike olmaktadır (19).

Daha sonra, bu geç replike olan X kromozomunun Barr cisimciğini oluşturan X kromozomu olabileceği düşünülmüş, (19) nitekim, katırlar üzerinde yapılan çalışmalar bunun doğruluğunu kanıtlamıştır. Şöyleki, at ve eşek X kromozomları morfolojik olarak ayırd edilebilirler ve bu iki tür kendilerine özgü G6PD varyantı taşırlar. Bu G6PD varyantları elektroforetik olarak ayırdedilebilir ve böylece hücrede hangi X'in aktif olduğu anlaşılabilir. Katır hücrelerinde at G6PD varyantının ağırlıkta olduğu bulunmuştur. Bu da at X'inin aktif, eşek X'inin inaktif olduğunu gösterir. Aynı zamanda, otoradyografi ile % 90 oranında eşek X kromozomunun geç replike olduğu da gösterilmiştir. Yani, inaktif olan X kromozomu aynı zamanda da geç replikasyon yapmaktadır (57).

Gen Dozaj Kompansasyon Mekanizması Olarak X İnaktivasyonu:

Daha 1932'de Müller, kadınlarda iki, erkeklerde bir X kromozomu bulunmasına karşılık, iki cins arasında X kromozomal genlerle oluşturulan nitelikler açısından bir fark bulunmamasını kadınlardaki fazla genlerde bir dozaj kompansasyonu meydana geldiğini söyleyerek açıklamaya çalışmıştır.

1961'de Mary Lyon, kendi adıyla anılan hipotezini ileri sürmüştür. Lyon hipotezine göre;

1 - Memeli dişi embriyolarında bulunan iki adet X kromozomundan birisi fonksiyonel olarak inaktif duruma gelerek X kromatinini oluşturur. Bu inaktivasyon olgusu erken embriyonik dönemde meydana gelir. X kromatinin ilk görülmeye başladığı dönem türler arasında blastosit döneminden erken primitif çizgi dönemine, implantasyon öncesinden sonrasına farklar gösterir. Örneğin domuz embriyosunda Barr cisimciği sadece 50 civarında hücrenin bulunduğu dönemde görülmeye başlanırken, tavşanda implantasyondan önce birkaç yüz hücreli döneme denk gelir. Sığıçanda X kromozomu differensiyasyonunun belirtileri implantasyon sonrasında ortaya çıkar. Farede de hemen hemen aynı zamanlarda, gelişmenin 4 ya da 5.gününde yer alır, implantasyon ise 5.günde olur (36). İnsanda, 2.haftanın sonunda primitif çizgi meydana gelene kadar Barr body görülmez. Ve X kromatini bütün embriyoda 2 haftanın sonunda



aynı zamanda meydana gelir (66). Fakat trofoblastlarda biraz daha erken (12.günde) görülmeye başladığı bildirilmiştir (22).

2 - Embriyoda lyonizasyon rastgeledir. Yani her hücredeki inaktivasyon olgusu, komşu hücredekinden bağımsızdır. Bir kısım hücrelerde maternal kökenli X kromozomu inaktive olurken, bir kısmında paternal kökenliler inaktifleşirler. Fakat, Harrison ve Warburton, in vitro kültüre edilmemiş koryonik villüs hücrelerinin hepsinde değilse bile çoğunda paternal X'in inaktive olduğu rastgele olmayan bir inaktivasyon patterni gözlemişlerdir. Fare embriyosunda da sadece embriyoyu oluşturacak olan primitif ektoderimde rastgele inaktivasyon görülür. Trofoektoderm ve primitif endoderimde, bütün hücrelerde paternal X inaktive olur. Ayrıca bu hücre soylarında X inaktivasyonu primitif ektoderme göre daha erken bir dönemde meydana gelmektedir (37). Keseli hayvanlarda ise daima paternal X kromozomunun inaktive olduğu bilinmektedir (57).

3 - İnaktivasyon irreversibldir. Bir hücrede hangi X kromozomu inaktifleşmişse, o hücreden meydana gelen bütün hücrelerde de aynı X Barr body'i oluşturacaktır.

Tek aktif X kromozomu hipotezine göre, X kromozomundaki bir gen için heterozigot olan dişilerde, herbirinde farklı allelin eksprese edildiği iki farklı hücre popülasyonu bulunmalıdır. Nitekim, kürk rengi ile ilgili ve cinsiyete bağlı bir mutant gen için heterozigot olan dişi

farelerde benekli bir kürk rengi görülür (35).

İnsanda bu durumun bir örneği oküler albinizmdir. X'e bağlı oküler albinizmde, hemizigot erkeklerde retinal epitel-yal pigment eksikliği vardır ve göz dibi soluk görünür. Heterozigot kadınlarda ise düzensiz pigmentasyon vardır ve göz dibi benekli görünür (66).

İnsan G6PD varyantları ile yapılan çalışmalardan da bu tek aktif X hipotezi için kanıtlar elde edilmiştir. Gerçekte Beutler 1962'de Lyon hipotezinden haberi olmaksızın, insan G6PD varyantlarından elde edilen bulgulara dayanarak bir X inaktivasyon kavramı geliştirmiştir. Kadınlarda iki, erkeklerde bir X kromozomu bulunduğu halde, her iki cinste ve normalden fazla X kromozomu taşıyan kişilerde G6PD enzim aktivitesi açısından fark bulunmamıştır. Yani bir dozaj kompasasyon mekanizması söz konusudur. Eğer bir kadın elektroforetik G6PD varyantlarından biri için heterozigot ise, rastgele inaktivasyon hipotezine göre bazı hücrelerde normal allel, bazı hücrelerde ise mutant allel aktif kalacaktır. Yani tek bir hücrede sadece bir tip enzim varyantı bulunur. Bu mozaicism ilk olarak Beutler tarafından eritrositlerde indirekt yöntemlerle gösterilmiş, daha sonra başka araştırmacılarca da değişik teknikler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu yaklaşımlardan birinde, doku kültüründe klonlanan fibroblastlar kullanılır. Siyah ırkta, G6PD geni polimorfiktir, en çok GdA ve GdB allelleri görülür. Bu alleller için heterozigot olan bir kadının klonlanan fibroblast hücreleri nişasta-jel elektroforezinde bu allellerden yalnızca birini (ya GdA ya da GdB)



X İ n a k t i v a s y o n u n u n M e k a n i z -  
m a s ı :

Gelişme boyunca X kromozomunun inaktivasyonunun kontrolü 4 basamakta ele alınabilir :

- 1 - Erken embriyoda X kromozomunun differensiasyonunun inisiyasyonu,
- 2 - İnaktivasyon olayının kromozom boyunca yayılması,
- 3 - Canlının ileriki yaşamı boyunca inaktif durumun sürdürülmesi,
- 4 - İnaktif X'in oosit veya erken embriyoda reaktivasyonu.

X kromozom inaktivasyonunun nasıl meydana geldiği konusunda yıllar boyunca çok çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Cooper, erkekte mayoz bölünme sırasında, muhtemelen Y kromozomu tarafından X kromozomuna, inaktifleşmesini sağlayacak bir kontrol faktörü sokulduğunu ileri sürmüştür. Bunun anlamı daima baba kaynaklı X kromozomunun inaktif olacaktır ki, keseli hayvanlarda gerçekten böyledir. Oysa yüksek memelilerde farklı hücrelerde farklı kaynaktan X kromozomları inaktif olabilirler. Bu yüzden yüksek memeliler için Cooper, kontrol faktörünün erken gelişme dönemlerinde bulunduğu paternal kaynaklı X'ten çıkartılıp, daha sonra X'lerden birine rastgele olarak yeniden inkorpore olduğunu kabul etmiştir. Kendisinin de belirttiği gibi, Cooper'in

modelinin bazı açık noktaları vardır, örneğin; bu haliyle normalden fazla sayıda X kromozomu taşıyan bireylerde biri hariç bütün X kromozomlarının inaktive olmasını ve baba kaynaklı X kromozomuna sahip olan 45,X0 kromozom yapılı kişilerde bu paternal kaynaklı X kromozomunun aktif durumda olmasını açıklayamamaktadır (36).

Bu açıkların bir kısmı, inaktivasyonu sağlayan bir faktör yerine, aktivasyonu sağlayacak bir faktörün inkorpore olduğu kabul edilerek giderilebilir ki, bu da Grumbach ve arkadaşları tarafından önerilen epizomal aktivatör modelidir. Şekil 4'te (52) görüldüğü gibi, Grumbach ve arkadaşları bir

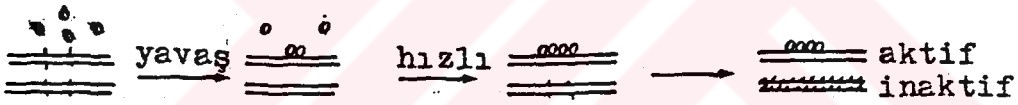


Şekil 4.

"epizomal faktörün" X kromozomundaki bir "spesifik reseptör lokusa" inkorpore olduğunu ve hem epizomu taşıyan X'in aktif kalmasını, hem de hücredeki inkorpore olmamış diğer epizomal faktörlerin inaktivasyonuna yol açan bir madde yapılmasını sağladığını öne sürmüşlerdir. Bu modelde, gelecek generasyonda inaktivasyonun yine rastgele olabilmesi için oogenezye da spermatogenez sırasında aktif X'teki epizomal faktörün ayrıldığını kabul etmek gerekir (36,52).

Cattanach, kontrol elemanının kromozomda değil, hücre içinde olduğunu, Hücre içi ortamdaki değişikliklere cevap olarak inaktivasyon olayının meydana geldiğini ileri sürmüştür. Eicher'in modelinde ise, X kromozomu boyunca her birinin başlangıcı ve sonu belli olan inaktivasyon üniteleri yerleşmiştir (36).

Diğer taraftan Ohno ve Lyon, inaktivasyon merkezine bağlanarak kromozomun aktivasyonunu sağlayan diziyeye özgü DNA binding proteinlere (non-histon proteinler) dayanan modeller ileri sürdüler. Şekil 5'deki Ohno'nun modelinde, otozomların yaptığı birtakım proteinlerin X kromozomunun inaktivas-



Şekil 5.

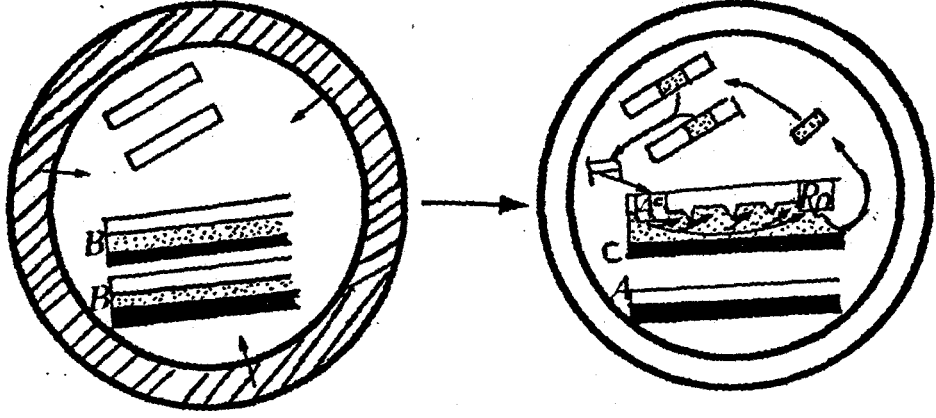
yon merkeziyle birleştiği ileri sürülür. İlk molekül rastgele bağlanır, diğerleri de aynı kromozomda ilk moleküle bitişik olarak bağlanır. Daha sonra, inaktivasyon merkezi aktivatör proteinlerle kaplı olmayan X kromozomlarını inaktifleştirmek üzere bir X kromozom repressör maddesi üretilir.

Bu modellerde ilk başlangıç basamağı yavaş, devamı hızlı olmalıdır. Yoksa her iki X kromozomu birden inaktif

olabilirdi. Epizom modelinde, yavaş olan adım ilk epizomun integrasyonudur. Arkasından diğer epizomlarhızla yıkılarak diğer X'e integre olmaları önlenir. DNA binding protein modelinde ise yavaş süreç ilk proteinin bağlanması, hızlı süreç ise diğer aktivatör proteinlerin ilkinin yanına bağlanmaları basamağıdır.

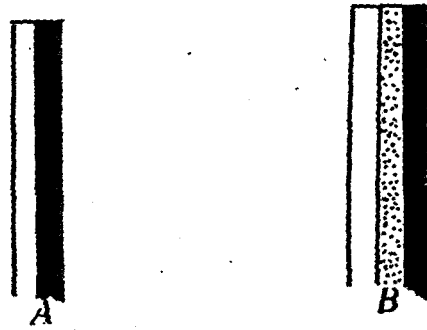
Grumbach'ın epizom aktivatör modeli X inaktivasyonunun birçok yönünü, özellikle rastgele oluşunu ve sürekliliğini açıklayabilir, fakat inaktivasyonun kromozom üzerinde nasıl yayıldığını açıklayamaz. DNA binding proteinler modeli ise inaktivasyonun kalıcılığı konusunda problemler içerir. Çünkü replikasyon sırasında bu proteinler DNA üzerinden ayrılacaktır. DNA replikasyonu memeli hücrelerinde sn.de 30-50 nukleotidle görece yavaş bir olaydır. Oysa 2 sn.de, bir protein difüzyonla nukleusta rastgele dağılacaktır. Ayrıca, replikasyonun her turu için yeni proteinlerin yapımına gerek duyulacaktır.

Lyon'un modeli ise, belirli bir safhada bir çift otozomun birlikte, tek bir X üzerindeki bir lokusu dereprese eden tek bir molekül sentezlemeleri olasılığıdır. Bu lokusun ürünleri X kromozomu tarafından non-histon protein yapılmasını başlatacaktır. Şekil 6 (36). Bundan önce, DNA histon proteinlerle kaplı ve inaktiftir. Fakat X kromozomu non-histon proteinleri sentezleyerek histonları kendisinden uzaklaştırdığında uyarılara cevap verecek yani aktif hale gelecektir.



Şekil 6.

Şekil 7 (36). Otozomların X kromozom differensiasyonu ile ilgili olduklarına dair bazı kanıtlar vardır. İnsan ve tavşan triploidlerinde (3 otozom : 3 X) artmış olan G6PD



İnaktif

Aktif

Beyaz kısımlar:DNA

Siyah kısımlar:Histon

Noktalı kısımlar:Non-histon

Şekil 7.

aktivitesi, 3 X kromozomu taşıyan bir diploidde (2 ot.:3X)



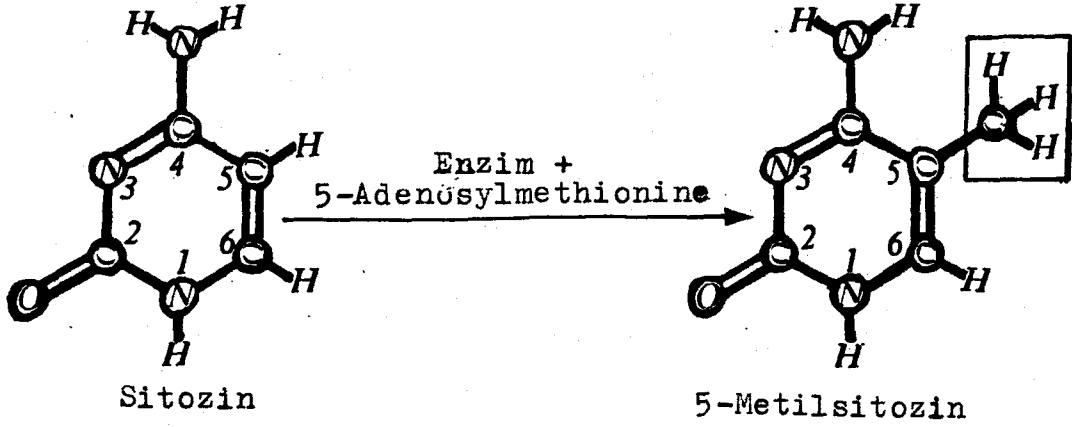
bir X aktif iken, triploidlerde 2 X'in aktif kaldığını göstermektedir.

Bu model, X kromozomunun daha sonra X'i repress edecek bir otozomu aktifleştirmesi şeklinde tersine de çevrilebilir. Önceleri X kromozomunun her iki homoloğu da aktifken, ilgili gen ürününün iki kat miktarda bulunması otozomal repressörü aktive edebilir. X'lerden biri baskılanır baskılanmaz, kalan X'in tek doza düşen gen ürünü otozomal repressör lokusunu aktif tutmaya yetmez ve repressörün etkisi bir X'i aktif bırakarak biter. Bu model diploidlerde tek bir X'in aktif kalmasını açıklar. Triploidlerde, üç otozomal lokusu aktif tutmak için 3 kat X'e bağlı gen ürününe gerek duyulacaktır. Dolayısıyla, X'in baskılanması 2 X'i aktif bırakarak bitecektir. Bu modelde, n-ploid bir canlıda (n-1) X kromozomunun aktif kalması beklenebilir (36).

Comings'in ileri sürdüğü gibi, bir olasılık da X kromozomunun nukleus içinde belirli bir bölgeye ya da intranuclear organelle bağlanmasıdır. İki X kromozomu farklı bölgelere bağlanırlar ki, bu bölgelerden yalnızca birisi X kromozomundaki genlerin aktivitesini başlatacak moleküllerle etkileşmesine olanak verir. Poliploid bir hücrede bu bölgeler artmıştır, ve kromozomal aktivitedeki değişiklikler bölgelerin sayısındaki değişikliklerle meydana gelir. Bilinen kromozom bağlanma bölgeleri nuklear membran ve nukleolustadır fakat X inaktivasyon bölgesi olarak özel bir yer bilinmemektedir (36).

Keselilerdeki paternal X inaktivasyonu için değişik bir model ileri sürülebilir. Önemli olan nokta, yarıklanma bölünmeleri sırasında anne ve baba kaynaklı kromozomlar arasındaki farkın korunmasıdır. En basit model, paternal genler spermatogenez sırasında kapatılırken, diği germ hücresinde aktif olan maternal kaynaklı genlerin yarıklanma dönemindeki yumurtada da aktif kalmaya devam etmesidir. Paternal X inaktivasyonu yüksek memelilerdeki rastgele X inaktivasyonundan daha basit bir sistemdir. Nitekim Cooper, yüksek memelilerdeki sistemin evrimsel olarak keselilerden daha ileri olduğunu ileri sürmüştür.

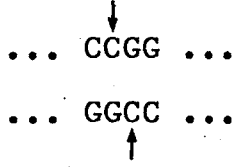
Riggs ve Holliday'ın 1975'te ayrı ayrı ileri sürdükleri metilasyon modelinde ise, zigotta X'in farklılaşmasından önce metillenmemiş durumda olan inaktivasyon merkezi, spesifik bir enzim tarafından tanınarak metillenir. Metilasyon, DNA üzerindeki sitozin bazlarınının spesifik bir metilaz enzimi aracılığı ile, S-adenosyl-L-methionine varlığında, pirimidin halkasının 5. karbonuna bir metil grubunun bağlanmasıdır. Burada 5-adenosyl-L-methionine metil grubu vericisi olarak kullanılır Şekil 8 (16 sf 42). Metillenmemiş bir inaktivasyon merkezinin metillenmesi saatler isteyen yavaş bir işlemdir. Yine de, sonunda primer inaktivasyon merkezlerinden biri metillenir ve bu da bu kromozomun aktifleşmesine yol açar. Bu aktivasyonun direkt veya indirekt sonucu olarak iki protein (ya da iki fonksiyonlu bir protein) sentezlenir. Bir protein (ya da proteinin bir fonksiyonu) metilazı, diğer



şekil 8.

metillenmemiş inaktivasyon merkezini metillenmesini olanaksız kılacak şekilde değiştirir. Fakat bu sırada, metilaz hala tek zinciri metillenmiş olan yarı metillenmiş inaktivasyon merkezini hızla metilleyebilecek durumdadır. İkinci protein fonksiyonu ise, metillenmemiş inaktivasyon merkezi taşıyan her X kromozomunun kondanse olmasını ve inaktifleşmesini sağlar. Böyle yarı metillenmiş bir inaktivasyon merkezini metilleyebilen fakat metillenmemiş bir inaktivasyon merkezini metilleyemeyen bir metilazın varlığında, X kromozomlarının differensiasyonları replikasyondan sonra da devam edecektir.

(52). Bu modelde, replikasyondan sonra metilazın tanıyabileceği bir bölge oluşması için, inaktivasyon merkezinin palindromik bir dizi içermesi gereklidir. Okaryotik DNA'da genellikle aynı zincir üzerinde bir guanin tarafından izlenen sitozinler metillenmektedir. Örneğin;



dizisi tipik bir metilasyon bölgesidir ve palindromun iç bölgesindeki okla işaretli sitozinler metillenir (45).

Her diploid kromozomal set için yalnızca bir X kromozomun aktif kalmasını açıklamak için, X kromozomunun metilazı etkileyerek, sadece hibrit yarı metillenmiş bölgeleri metilleyebilecek hale getiren bir proteini kodladığı kabul edilir. Bu protein metilaz seviyesinde, veya biraz daha fazla yapılmalıdır. Metilaz ve metilaz inhibitörünün birleşmesi sonucu oluşan basit feedback halkası her diploid otozomal set için bir aktif X sonucunu verir (52).

Bu model X inaktivasyonunun şu yönlerini açıklar görünmektedir : Kalıcılık; bir kere meydana geldikten sonra inaktivasyon merkezinin farklılaşmış durumu korunacaktır. Yüksek memelilerde rastgele inaktivasyon; eğer spermde X inaktivasyon merkezi metillenmemiş ise ve kritik metilasyon olayı fertilizasyondan sonra olursa rastgelelik meydana gelir. Keselilerde paternal inaktivasyon; eğer inaktivasyon merkezinin metilasyonu fertilizasyondan önce olursa, tercihten maternal aktivasyon olacaktır. Anöplidi ve poliploidiler; Bunlar yukarıda basit feedback loop'u ile açıklandı. X'e bağlı metilaz inhibitör seviyesi otomatik olarak, otozomal metilaz gen setlerinin sayısı ile denkleştirilir. Örneğin, tetraploidilerde, metilasyon iki X kromozomu aktif kalıncaya

kadar sürecektir. Sonraki kuşakta geriye dönüş; oogenez veya spermatogenez ya da fertilizasyonu izleyen hızlı replikasyon siklüsleri boyunca DNA replikasyonu sırasında DNA metilasyonu önlemediğinde, metilasyon sonucu meydana gelen farklılaşma silinir (52). Bu model, inaktivasyonun bütünlüğünü, yani inaktivasyon ve kondansasyonun inaktivasyon merkezinden bütün X kromozomuna yayılmasını açıklamaz (52).

Öne sürülen bu çeşitli hipotezlerde genellikle inaktivasyonun X kromozomu üzerindeki belirli bir bölgeden başlayarak daha sonra bütün kromozoma yayıldığı düşünülmektedir. İnaktivasyon merkezi ile ilgili kanıtlar faredeki X-otozom translokasyonları çalışmalarından elde edilmiş, (37) Therman ve arkadaşlarının ABD'de, Mattei grubunun Fransa'da, morfolojik bozukluk gösteren insan X kromozomları ile yaptıkları çalışmalarla insan X inaktivasyon merkezinin X'in uzun kolunun proksimalinde yer aldığı anlaşılmış, nihayet Xq 12- q13 bölgesine PGK 1 geni yakınlarına yerleştirilmiştir. Öye ki, bu bölgenin duplikasyonunda Barr cisimciği iki parçalı görülmektedir. Yayılmanın ise nasıl olduğu henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, metilasyonun burada da bir rolü olduğu kesindir.

Özellikle genlerin 5' uçlarındaki sitozin residüellerinin metilasyonu transkripsiyonel aktivite ile ilişkilidir. Ortama 5-azacytidine katıldığında, DNA'nın metilasyonu inhibe edilir. 5 azacytidine ve 5 azadeoksicytidine'de pirimidin halkasının 5. pozisyonundaki C atomu yerine N bulunduğundan, metilaz

bu bölgeyi metilleyemez. Dolayısı ile replikasyon sırasında ortama sitozin yerine bu sitidin analogları katılırsa, yeni sentezlenen DNA'lar hipometile olur (23). Yapısal olarak normal bir inaktif insan X kromozomu taşıyan ve HPRT eksikliği gösteren hibrit bir fare - insan somatik hücre klonu ile yapılan çalışmada, hibrit hücreler 5-azacytidine ile muamele edilmiş ve insan X kromozomunun reaktivasyonu ve ekspresyonu incelenmiştir. 5-azacytidine uygulanan hücrelerde HPRT (+) klonların oranı 5-azacytidine maruz kalmamış hibrit hücrelerden elde edilenlerden 1000 kez daha fazla bulunmuştur ve isoelectric focusing ile bu HPRT'nin insan enzimi olduğu anlaşılmıştır. 5-azacytidine DNA'nın hipometilasyonuna sebep olduğundan, metilasyonun X kro. inaktivasyonu için bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir. Gerçekten, 5-azaC ile hipometilasyona uğratıldığında, inaktif X kromozomunun da aktif X ve diğer kromozomlarla aynı zamanda replikasyon yapmaya başladığı görülmüştür. Bu zaman değişikliği, aktif kromatin konformasyonunun bir özelliği olduğu düşünülen DNAse I'e duyarlılığın artması ile ilişkilidir. Bununla birlikte, 5-aza-C medyumdan uzaklaştırıldığında, inaktif X kromozomunun yeniden geç replike olmaya başladığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar morfolojik olarak farklı X kromozomları taşıyan kemirici türlerinin doku kültürlerinde yapılmıştır. Fakat normal kadınlarda ve Klinefelter Sendromlu erkeklerde yapılan çalışmalar, 5-aza-C'nin inaktif X kromozomlarının replikasyon patterninde değişiklikler yaptığını göstermektedir (23). Fakat görüldüğü gibi burada Riggs ve Holliday'ın metilasyon modelinin tam

tersi bir durum söz konusudur. Riggs ve Holliday metile olan X'in aktif kaldığını ileri sürerken, burada metillenmiş DNA'nın bir demetilasyon ajanı ile reaktive olması yani metillenmiş durumun inaktivasyonu doğurması söz konusudur (45). Ayrıca 5-azacytidine ile muamele edilen ve HPRT geni reaktive olan bütün klonlarda G6PD ve PGK genlerinin de reaktive olması da X kro.inaktivasyonunun birbirinden ayrı üniteler halinde olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmada değerlendirilen üç X markeri olan G6PD, PGK ve HPRT, farklı olarak düzenlenen segmentler üzerinde bulunabilirler. Bu durum, hiç inaktive olmayan bazı X kro. bölgelerinin varlığına da uygundur (45).

Gerçekten, bazı genler aktif X'in yanısıra X kromozomu tarafından da eksprese edilirler ve inaktivasyondan kaçan genler olarak adlandırılırlar. Fazla sayıda X kromozomu içeren hücrelerde bu gen ürünlerinin miktarı da artmış bulunur (21).

İnaktivasyondan kaçan genlerden MIC2 ile yapılan çalışmalarda, bu genin promoter bölgesinin yakınında bulunan Hpa II tiny fragment (HTF) bölgesinin hem aktif, hem inaktif X kromozomlarında ve Y kromozomunda metillenmemiş durumda olduğu bulunmuştur. Oysa inaktivasyona uğrayan genlerin yakınındaki HTF bölgeleri yüksek derecede metillenmiş durumdadır. MIC 2 geninin inaktivasyona uğramaması ve genin 5' ucundaki HTF bölgesinin metillenmemiş durumda olması, metilasyonun X

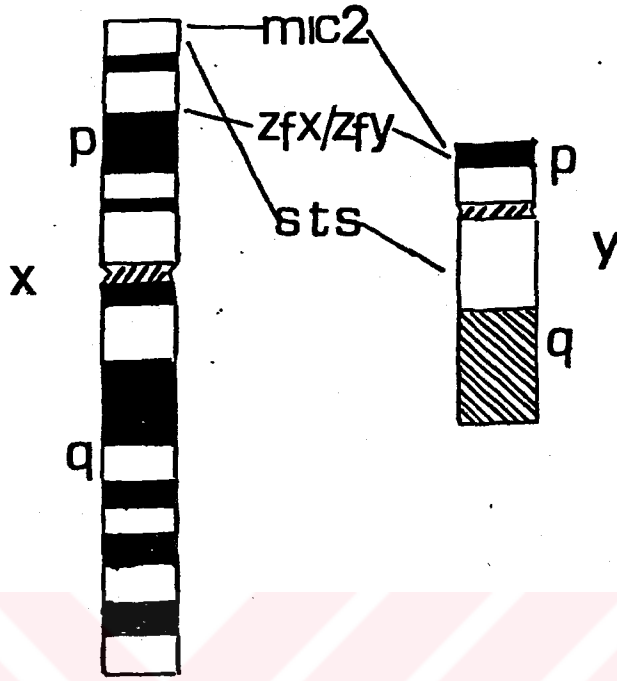
inaktivasyonunda önemli rol oynadığı kanısını güçlendiren bir bulgudur (20).

İnaktivasyondan kaçtığı bilinen lokuslar 12E7 hücre yüzey antijenini kodlayan MIC2, eritrositlerdeki Xg yüzey antijenini kodlayan XG, steroid sülfataz enzimini kodlayan STS ve zinc fingers proteinini kodlayan ZFX genleri grup halinde X kromozomunun kısa kolunun Xp 22.3-Xpter bölgesine yerleştirilmişlerdir (21, 54, 12, 8). Bu bölgede, Xp 22.13 ve Xp 22.3 bantlarını kapsayan iki segmentin S fazında erken replike olması da, buradaki genlerin inaktive olmadığına işaret eden sitolojik bir bulgudur. Dahası, bu bölgelerin replikasyonu Y kromozomunun Yp 11.2 ve Yp 11.32 bantlarını kapsayan bölgesinin replikasyonu ile aynı zamanda meydana gelir ve mayoz sırasında X ve Y kromozomlarının bu bölgeleri arasında eşleşmeve krossingover olur. Bu durum, X ve Y kromozomlarının bu bölgelerde aynı genleri taşıdıklarını düşündürmüştür. Gerçekten de, inaktivasyondan kaçan genlerin Y kromozomunun kısa kolunda homologları bulunduğu moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak gösterilmiştir (21,54).

#### Şekil 9 (54)

Bu bölgede inaktivasyona uğrayan hiç bir gen olmadığından, ilk önce bu lokusların bu bölgede buldukları için inaktivasyon sinyallerine cevap vermedikleri düşünülmüştür. Yani X inaktivasyonunun tamamen bölgesel bir fenomen olduğu, bu bölgelerdeki genlerin içeriği ile ilgisi bulunmadığı öne sürülmüştür (8).





şekil 9.

Alternatif bir görüş de, her lokusun inaktivasyonunun ayrı olarak düzenlendiği, bir genin inaktive olup olmayacağına-genin bulunduğu yer önemli olmaksızın-her lokus için tek tek karar verildiği görüşüdür (8). Bu görüşte , X kromozom inaktivasyonunun özel diziler ile meydana geldiği, STS gibi inaktivasyondan kaçan lokusların bu dizileri içermedikleri, dolayısıyla inaktive olmadıkları ileri sürülür. Ya da başlangıçta bu lokuslar da inaktifleştiği halde, gerekli sinyallerin yokluğu yüzünden inaktif durumun sürdürülemediği düşünülebilir (44).

ALS9T geni, tsALS9 fare hücre soyundaki ısıya duyarlı DNA sentez mutasyonuna komplementer olan ve insan X kromozomu üzerinde bulunan bir gendir (8). ALS9T gen ürününün ne olduğu tam olarak bilinmemesine rağmen, bu genin inaktivasyondan kaçtığı bilinmektedir (39), Çünkü tsALS9/insan somatik hücre hibritleri aktif insan X'ini de, inaktif insan X'ini de taşıyabilirler, mutasyonun duyarlı olduğu 39°C'de yaşayabilmektedir. Ve inaktivasyondan kaçan bu gen, X kromozomunun kısa kolunun proksimalinde Xp 11.3-Xp11.1 bölgesine yerleştirilmiştir. Bu bulgu, inaktivasyonun tamamen bölgesel olduğu görüşünü çürütmektedir. Çünkü, bu bölge ile pter'deki inaktivasyondan kaçan gen grubu arasında inaktivasyona uğrayan bir grup gen bulunmaktadır. Yani, inaktivasyon süreci proksimal kısa koldaki bazı genleri atlayabilmektedir (8).

Ayrıca, diğer inaktivasyondan kaçan genlerin aksine, ALS9T'nin Y kromozomunda homoloğu bulunamamıştır (8).

ZFX geninin de MLC2, XG ve STS grubundan fiziksel olarak ayrı olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir fakat ZFX ile diğer grup arasında inaktivasyona uğrayan genler olup olmadığı henüz bilinmemektedir (8).

Fakat, inaktif X kromozomu üzerindeki ekspresyon yapan genlerin, aktif X kromozomundaki homologlarına göre daha az miktarda ürün verdikleri saptanmıştır. İnaktif X'in karakteristik özellikleri olan geç replikasyon, yoğun kromatinizasyon ve farklı DNA metilasyon patterninin bu durumda etkili olduğu düşünülmektedir. Eğer inaktif X'in üzerindeki aktif bir

gen S fazının son zamanlarına kadar replike olmuyorsa, erken replike olan homologuna göre çok kısa bir zaman için hücrede iki kopya halinde bulunacak, dolayısıyla daha az ürün verecektir. Ya da, transkripsiyon yoğun kromatin yapısının mikro çevresel özellikleri veya DNA kalıbının anormal metilasyon patterni yüzünden yavaşlayabilir (41).

### X Kromozomunun Reaktivasyonu :

Kesin zamanı bilinmemekle birlikte, inaktif X oositlerde mayozdan önce reaktive olur. Her iki X kromozomu da transkribe olur ve hiçbiri heteropiknotik davranış göstermez. Mayozda iki X kromozomu normal olarak eşleşir ve bivalentleri otozomal bivalentlerden farklılık göstermez (57).

Ohno ve arkadaşları, profazda oogoniumlarda bütün X kromozomlarının isopiknotik olduğunu, oositlerin X kromatin (-) olduğunu bildirmişlerdir (22). Buna karşılık Jagiello ve grubu tarafından gelişimin 17. haftasındaki bir 46,XX ve bir 46, XX/47, XXX kromozom yapısındaki iki fetusun oogoniumlarında seks kromatin (+) bulunduğu, ve immüno-sitokimyasal yöntemlerle inaktif X kromozomunun metillenmiş durumda olduğunun anlaşıldığı bildirilmiştir (28). Bu zamanda da aşağı yukarı 1.mayozun başlangıcına denk gelmektedir (66).

Erkeklerde ise tam tersi bir durum söz konusudur. Mayozun zigoten ve diploten evreleri arasında hem X hem de Y kromozomları heteropiknotik hale gelir vespermatogenez sırasında transkribe olmazlar (57).

X K r o m o z o m A n o m a l i l e r i V e E t k i -  
l e r i :

Sayısal Anomaliler

45, XO (Turner Sendromu) :

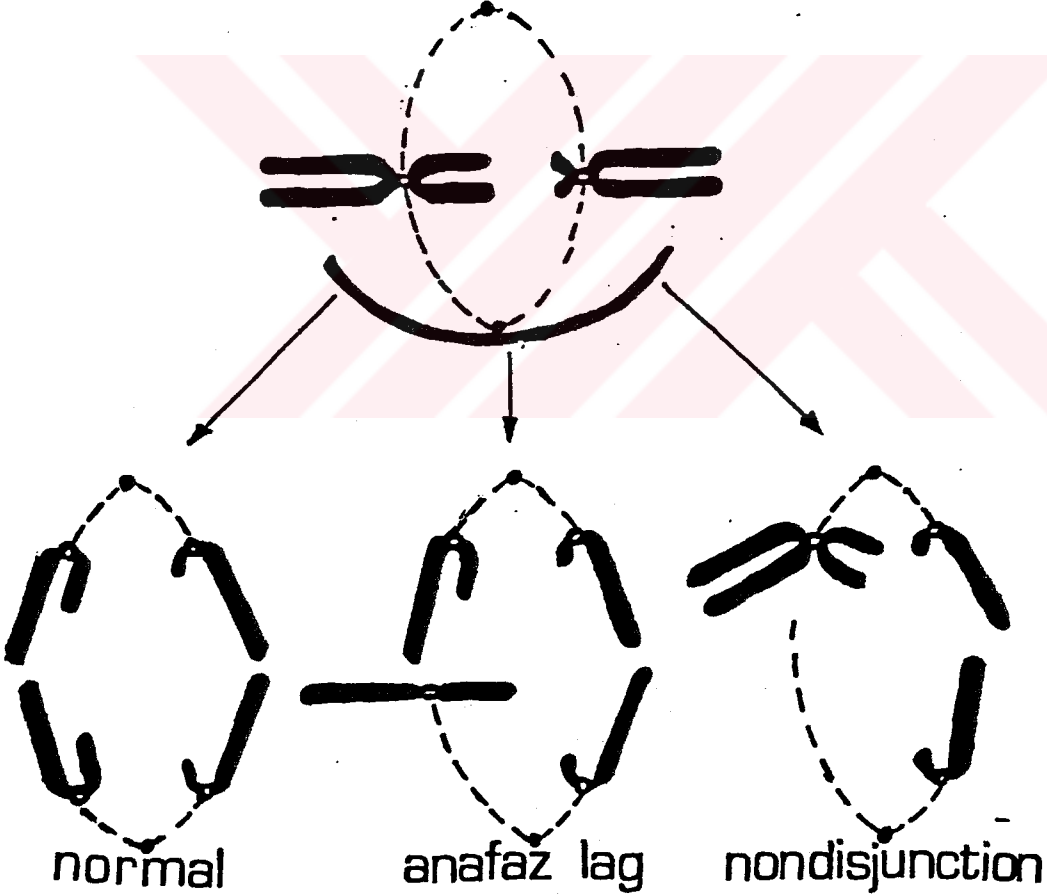
Hastalık ilk kez 1938 yılında Turner tarafından tanımlanmıştır. 1954'te Polani ve ayrıca Wilkins böyle olgularda X kromatini olmadığını göstermişler, 1959'da ise Ford sendromun kromozom kuruluşunun 45, XO biçiminde olduğunu bulmuştur (3).

Tablo 3'de bu sendromda görülen başlıca bulgular ve sıklıkları görülmektedir.

TABLO 3 :

B U L G U	%
Kısa boy	100
Gonadal disgenesis	91
Kısa boyun	77
Cubitus valgus	77
Açıklığı artmış meme uçları	74
Nevus pigmentosus	64
Gecikmiş kemik yaşı	64
Kısa 4. metakarp	55
Pterygium colli	42

45, X0 kromozom yapısı, ebeveynlerden birinde mayoz bölünmede meydana gelen bir non-disjunction ya da anafaz lag olayı ile oluşan ve X kromozomu taşımayan bir gametin normal bir gametle birleşmesi sonucunda meydana gelir. Anöploidilerin temel oluş mekanizması olan non-disjunction (kromozom ayrılamaması) ve anafaz lag (anafazda geri kalma) Şekil 10'da görülmektedir (3). Bölünmeye hazırlık döneminde iki



Şekil 10.

katına çıkan kromozomlar metafaz evresinde ekvatoriyal düzlemde toplanırlar, sentromerlerinden uzunlamasına ikiye bölünerek her yarım ayrı bir kutba gider ve bölünme tamamlanır. Kromozom ayrılammaması (non-disjunction) durumunda kromozomlar birbirlerinden ayrılammazlar ve bir kutba iki yarım birden giderken, diğerk kutba kromozom gitmez (3). Anafazda geri kalma (anafaz lag) olayında ise, normal olarak uzunlamasına bölünerek kutuplara çekilmekte olan kromozomlardan biri hareket etmekte gecikir ve ya homologunun bulunduğu kromozom grubuna katılır, ya da bölünme sırasında kaybolur. Eğer homologunun bulunduğu hücrede kalacak olursa, bir hücrede aynı kromozomdan bir yerine iki tane bulunurken diğerk hücrede hiç bulunmayacak, sonuç kromozom ayrılammamasına benzeyecektir. Fakat sitoplazma bölünmesi sırasında kaybolursa, hücrelerden biri normal kromozom sayısına sahipken, diğerkinde bir kromozom eksik olacaktır (3).

Bu olaylar mitoz bölünme sırasında da görülebilir, fakat bölünme türüne göre ortaya çıkan sonuç da değışik olur. Örneğın mitoz bölünmedeki kromozom ayrılammaması, döllenenmeden sonraki evrelerde ortaya çıkarsa, kusurun ortaya çıktığı zamana bağılı olarak, kişinin hücrelerinin bir kısmında kromozom sayısı normalden fazla, bir kısmında normalden az olacaktır. Yani mozaik bir yapı görülecektir (3). İki normal gametin birleşmesiyle meydana gelen bir zigotta, fertilizasyondan sonraki bölünmelerde bimon disjunction sonucu 45, X0/46, XXX, ve lag sonucu 45,X0/46,XX yapısındaki mozaik Turner Sendromlu

hastalar meydana gelebilir. Bu hastalarda hastalığın klinik bulguları 45,X0 ve 46, XX hücrelerin oranına göre tipik Turner Sendromu bulguları ile normal arasında değişiklik göstermektedir.

Anne yaşı arttıkça gamet oluşumu sırasında non-disjunctiona eğilim arttığından, anöploidilerde sıklıkla anne yaşı artmış bulunur. Fakat Turner Sendromunda anne yaşının etkili olduğu görülmemiştir (3)..

#### 47,XXX (Triple - X Sendromu) :

İlk kez Jacobs tarafından 1959'da tanımlanmıştır. Kar, yotipte iki yerine üç X kromozomu ve dolayısıyla total olarak 47 kromozom bulunmaktadır : 47, XXX. X kromatin sayısı iki tanedir.

Bu hastalarda görülen başlıca bulgular; önikoid yapı, az gelişmiş meme, erkek tipi kıl lanma, primer ya da sekonder amenore, prematür menapoz ve sterilite, mental problemler.

Ortalama maternal yaş 32,8'dir. Genel toplumdaki sıklığı her 1000 kız doğumda 0,8 dir (3)

Ayrıca 48, XXXX ve 49, XXXXX kromozom yapısındaki olgulara da rastlanmıştır (3).

Yapısal Anomaliler :

46, Xi (Xq) :

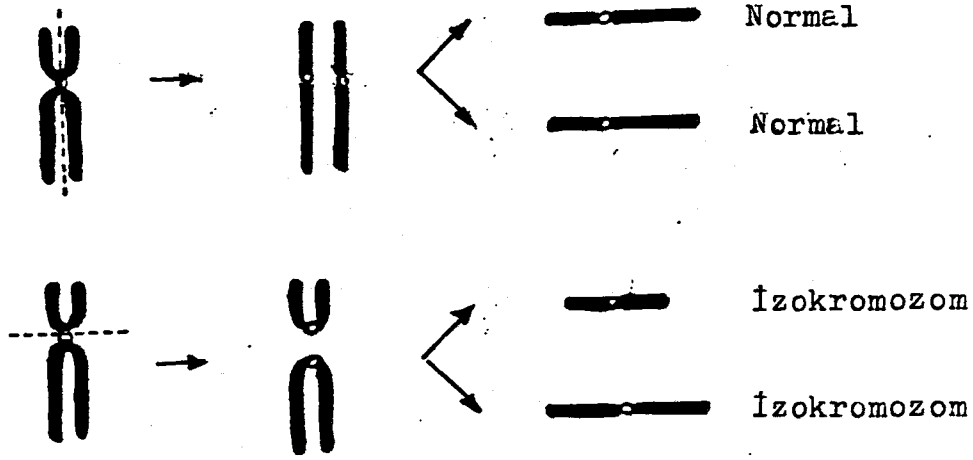
45,X0 fenotipine en yakın fenotipi veren yapısal anomalidir. Sitogenetik inceleme yapılmadan 45,X0 Turner hastalarından ayırd edilemezler (16). Ayrıca en sık görülen yapısal cinsiyet kromozomu anomalisidir (14). Bütün yenidoğanların yaklaşık % 0,002'si mozaik ya da saf halde izokromozom Xq içerirler. Turner Sendromu hastalarının ise %15'i izo Xq taşırlar (26).

Solid boyamada izo Xq şekil ve büyüklük olarak 3 numaralı kromozoma benzer (14).

İzokromozomlar anne ya da baba kaynaklı olabilirler (26) ve bir bölünme hatası sonucu meydana gelirler. Metafazda iğ ipliklerine sentromerleriyle tutunan kromozomlar normal olarak uzunlamasına bölünerek ikiye ayrılırlar. Böylece ayrı ayrı kutuplara giderek yeni hücreyi oluşturacak iki kromozom yarımı, hem özgün kromozomun, hem de birbirinin özdeşidir. Ancak sentromer enlemesine bölünecek olursa, yavru hücrelerden birinde kromozomun yalnızca kısa kolları bulunurken, diğerinde yalnızca uzun kollar bulunacaktır. Buna karşılık, hücrelerin birinde kısa koldaki, diğerinde uzun koldaki genler hiç bulunmaz ve oluşacak yeni kromozomun iki kolunda da aynı genler bulunur. Yani aynı anda bir kolun duplikasyonu, diğerinin ise deficianti sözkonusudur. Median görünümlü bu



kromozomlara izokromozom adı verilir. Şekil 11 (3). Fakat



Şekil 11.

bunların yanısıra iki sentrom içeren (dicentric) izokromozomlar vardır ki, bunların genellikle Xp11 bölgesinde izokromatid kırıkları ve yeniden birleşmesi sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Ayrıca asimetrik X:X translokasyonları, bir parasentrik inversiyon bölgesindeki bir crossing over, iki X kromozomunun bir quadri radial oluşturması ve parça değişimi yapması gibi oluşum mekanizmaları da bildirilmektedir (26).

Çok sayıdaki X'e bağlı RFLP'den yararlanarak izokromozomun iki kolunun da aynı mı olduğu, yoksa bazı lokuslar için heterozigot mu olduğu anlaşılabilir. Bu da izokromozomun oluşum mekanizması konusunda fikir verir (26).

Uzun kol izokromozomu taşıyan olgularda Barr cisimciği normalden daha büyük olarak gözlenir. Parental yaşın etkili olmadığı bildirilmiştir (9).

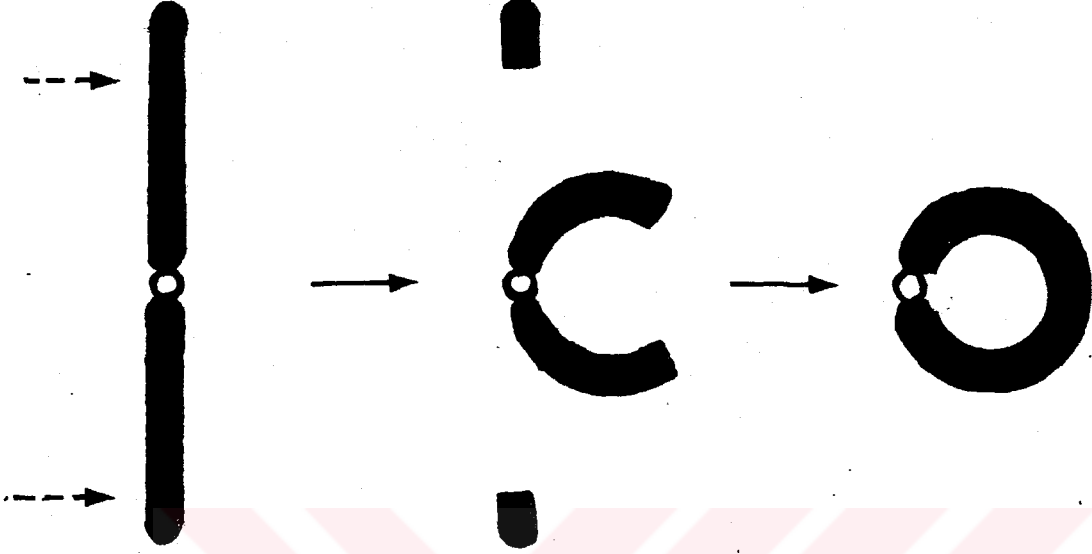
46, Xi (Xp) :

İnsanda Xpi pek sık görülmemektedir (61). Bunun nedeni olarak Therman uzun kolun proksimalinde X inaktivasyon merkezinin bulunduğunu, bu bölgeyi içermeyen kromozomların inaktive olamayacağı, dolayısıyla tel (Xp) ya da i(Xp) taşıyan hücrelerin iki ya da üç aktif X kısa kolu içereceklerini ve yaşayamayacaklarını ileri sürmektedir (60). Ayrıca Xpi'yi Xq'den sitogenetik olarak ayırd etmek oldukça zordur (10).

46, Xr (X) :

Turner Sendromu hastalarının yaklaşık %5'ini oluşturan halka (ring) X kromozomu taşıyan bireyler genellikle mozaiktirler. Hastaların çoğu 45,X0/46,Xr (X) kromozom yapısında (4). %100 oranında kısa boy görülürken, diğer klasik Turner bulguları daha hafiftir (4). Normal seksüel gelişme ve fertilitate görülebilir (4).

Halka kromozom, kromozomun iki ucunda iki kırık oluşumu ve bu kırık uçların birbiriyle birleşmesi sonucunda meydana gelir. Şekil 12 (3). Uçlardan kopup kaybolan parçaların büyüklüğüne ve mozaisizm oranına göre, fenotipe etkisi değişkenlik gösterir. Örneğin, X kromozomunun uzun ve kısa kollarının distal uçlarının kaybı fertilitateyi etkilememektedir (4).



şekil 12.

Yine kaybolan parçaların büyüklüğüne göre, halka kromozomunun büyüklüğü de değişkenlik gösterir. Barr cisimciği normalden küçük olarak gözlenir (14).

46, X (Xq-) :

Uzun kol delesyonunda fenotip hastadan hastaya çok farklılık gösterir. Turner Sendromu bulgularının çoğunu taşıyan hastaların yanısıra, normal boyda, somatik anomali-leri taşımayan, sadece gonadal disgenезisi bulunan hastalar da tanımlanmıştır. Delesyona uğrayan parçanın büyüklüğüne ve kırılma noktasının yerine göre fenotipte farklılıklar görülmektedir (14).

46, X (Xp-) :

Yine kaybolan parçanın büyüklüğüne göre değişen özellikler görülür. Kısa boy, gonadal disgenesis, ve somatik özellikler görülebilir (14). tel (Xq) taşıyan hastaların yaklaşık yarısında primer amenore görülürken, kısa kolun yarısının kaybında amenore görülmez (58).

Yayınlanan iki interstisyel Xp delesyonunda birinde Xp21 bölgesinin delesyonu vardır ve Turner özellikleri taşıyan hasta normal gonadal fonksiyona sahiptir. Diğer olguda ise, delesyon Xp21'in küçük bir parçasını, (Xp21.2-p21.4), içermektedir ve fenotip mental retardasyon dışında bir anomali göstermemektedir (67). Xp- ve Xq - olgularında semptomlar aşağı yukarı benzerdir (58).

X'in kısa kolunun, özellikle Xcen-Xpll bölgesinin eksikliği, tam bir Turner Sendromuna sebep olabilir. Bununla birlikte, Turner semptomları çeşitli Xp ve Xq delesyonlarına bağlı olarak tek tek de ortaya çıkarlar. Xp- taşıyıcıları %65, Xq- taşıyıcıları %93 oranında gonadal disgenezi gösterirler. Buna karşılık, bütün idic (Xp-) ve idic (Xq-) kromozomlar primer ya da sekonder amenoreye yol açarlar. Xq delesyonları Xp delesyonlarından farklı spesifik semptomlara yol açmaz. Bu durumu açıklamak üzere Therman ve Susman 1989' da bir hipotez ileri sürdüler. Tam olarak inaktive olan bölgelerin delesyonları herhangi bir semptoma yol açar görünmemektedir. Bu yüzden bu araştırmacılar xcen-pll bölgesinin

normal bir inaktif X'de daima aktif kaldığını fakat delesyona uğramış X kromozomlarında, özellikle de Xq-kromozomlarda inaktifleştğini düşünmüşlerdir. Bazı durumlarda inaktivasyon kısa kolun ucuna kadar yayılabilir. Bu da Xg ve STS genlerinin farklı davranışını ve bazı Xq- taşıyıcılarındaki kısa boyu açıklar (65). Anormal yapılı X kromozomlarında Xg lokusunun inaktive olduğu yolunda bulgular vardır (49). Oositlerin yaşayabilmesi için tam bir kromozom eşleşmesi olması gerekli görünmektedir. Delesyona uğramış X kromozomları normal X'te bir bölgenin eşleşmemesine ve isodisentrik kromozomlar da çiftleşmede bazı karışıklıklara sebep olarak oositlerin atrezisine yol açarlar.

Sentrik Fragmentler: genellikle 45X/46(xf) mozaik yapı-sındadırlar. Sentrik fragmentler X (ya da Y) kromozomunun her iki kolunun delesyonu sonucunda meydana gelirler. Hücreler de Barr cisimciği şeklinde göze çarpmazlar (14).

Bu tür yapısal bozukluk gösteren bir X kromozomu taşıyan hücrelerde, daima anormal X'in inaktive olduğu ve Barr cisimciğini oluşturduğu bildirilmektedir (17). Uzun kol izokromozomu gibi kromozomun büyüklüğünü arttıran durumlarda Barr cisimciği normalden büyük, kromozomun boyunu küçülten delesyon ve halka kromozom durumlarında ise Barr cisimciği normalden küçük olarak gözlenmektedir.

Şekil 13'de, X kromozomunun değişik bölgelerinin monozomi, disomi ve trizomisi durumlarındaki inaktivasyon patternleri ve fenotipe etkileri görülmektedir (66).

X Kromozom Konstitüsyonu														
Xp	2	3	2	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3
Xq	2	3	2	1	2	3	3	3	3	2	3	3	3	
Genetik olarak aktif	bir X (rastgele)	Genellikle transl. X	Genellikle transl. X	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Turner Sendromu	Kısmi Turner Sendromu	Gonadal disgenezi	Diger Turner bulgulari ile gonadal disgenezi	

N O R M A L X

Şekil 13.

X - Otozom Translokasyonu :

Dengeli X- otozom translokasyonları iki gruba ayrılır : Bir kısmı normal kadınlardır, fakat eğer kırılma noktası Xq 13 ve Xq 27 arasında ise gonadal disgenezi görülür. (64,58). Mijin ve arkadaşlarınca 1981'de tanımlanan X:9(q24 q34) kromozom yapısındaki hastada ovarian disfonksiyon görülürken, Leisti ve ark. tarafından 1975'de, Jenkins ve ark. tarafından 1974'de tanımlanan, kırılma noktaları Xq11 ve Xq28 olan dengeli X-otozom translokasyonları taşıyan kadınlar fenotip olarak normal ve fertildirler (13). Kırıklarında gonadal disgenezi görülen bu bölge Sarto ve ark. tarafından tanımlanan kritik bölgedir ve normal seksüel gelişimin olabilmesi için hücrede iki sağlam kritik bölgenin bulunması gerektiği düşünülmektedir (64). Fakat Xq21-q24 bölgesindeki bir delesyonun normal fenotipe izin verdiği ve Xq22-q24 bölgesinden kısa bir parçanın aynı kromozomda Xp11 bandına insersiyon yapması durumunda gonadal disgenezi meydana geldiği bulgularına dayanarak Madan, normal gelişmeyi önleyen etkenin kritik bölgedeki bir kırık değil, bu bölgeden bir lokus (ya da lokuslar) ile kritik bölge dışından bir lokusun birleşmesi olduğunu ileri sürmüştür (38). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı'na 1979'da başvuran ve 45,X0/46, XXq-,t(Xq,Fq) kromozom konstitüsü tespit edilen bir olguda da primer amenore ve hafif bazı Turner Sendromu bulguları vardır.

Normal seksüel gelişmeyi önleyen etken konusundaki ikinci bir hipotez de, bütün hücrelerde aynı X'in inaktive olmasının gonadal gelişme ile ilgili olduğu görüşüdür.

Dengeli translokasyon taşıyıcısı erkek fareler sterildirler. İnsanda da, aynı translokasyonu taşıyan kızkardeşleri ve kız yeğenleri fertil oldukları halde, resiprokal bir X otozom translokasyonu taşıyan iki erkek kardeşin steril ya da semisteril olduğu görülmüştür. Burada X üzerindeki kırık noktası kritik bölgenin dışındadır (59).

Dengeli X-otozom translokasyonu taşıyan bütün kadınların lenfositlerinde normal X kromozomunun inaktive olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte, diğer dokularda da yapılan çalışmalarla, bir çok vakada translokasyon kromozomlarından birinin inaktifleştiği minor hücre grupları bulunduğu anlaşılmıştır (64). Hellkuhl ve ark. tarafından 1982'de sunulan örnek ilginçtir : Bütün lenfositlerinde normal X'in inaktive olduğu bulunan 46,X,t (X;3)(q28;q21) kromozom konstitüsyonlu bir kadının 117 fibroblastında normal X geç replike olurken, 61 hücrede Xq+ kromozomunun inaktive olduğu ve bu hücrelerde inaktivasyonun translokasyon kromozomundaki 3.kromozom parçasına yayılmadığı gözlenmiştir (64).

İneklerde de bir X-otozom translokasyonunda normal X'in geç replike olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, dengeli X-otozom translokasyonu taşıyan farelerde inaktivasyon az çok rastgeledir (59).



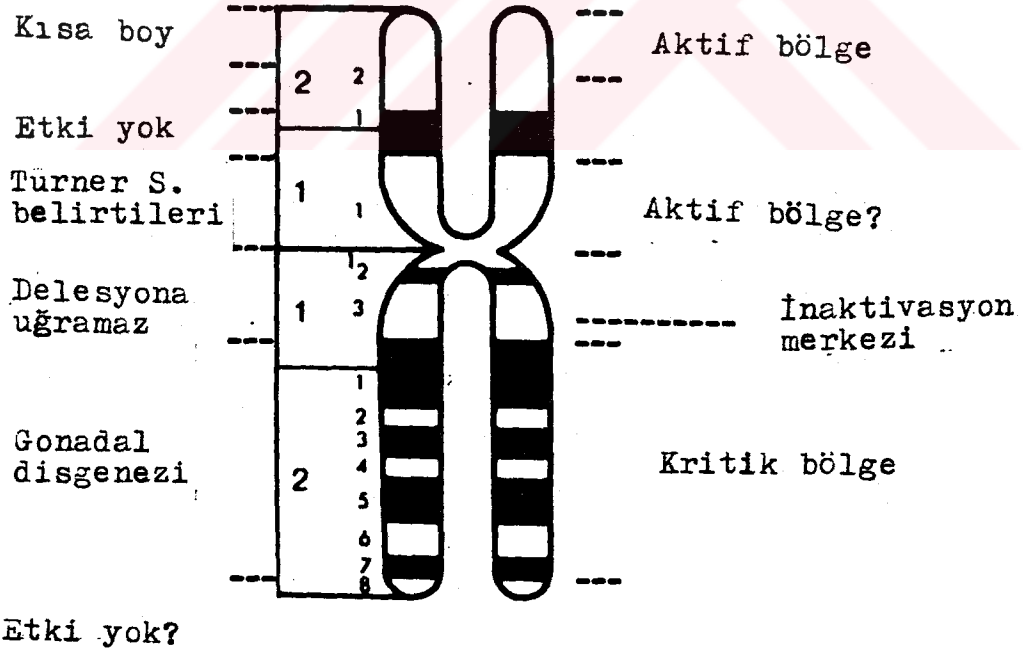
Dengesiz X-otozom translokasyonu taşıyan hastalarda ise, (genellikle multiple anomalilerle birlikte mental retardasyon gösterirler) semptomlarhangi otozomal segmentin trizomik olduğuna ve kromozomun inaktivasyon patternine göre değişir. Dengesiz X-otozom translokasyonu taşıyıcılarında hücreden hücreye değişik inaktivasyon patterni görülebilir (64). Bu tür olgularda genellikle anormal X kromozomu inaktive olur ve inaktivasyon otozomal parçaya yayılabilir ya da yayılmaz (64,61). Şekil 13'de, bilinen 46,X-otozom translokasyonu taşıyan olgular görülmektedir. Soldaki 3 olguda, otoradyografi çalışmaları ve hastaların bulguları inaktivasyonun otozomal segmente yayılmadan sonra erdiğini göstermektedir. Sağdaki 3 olguda ise, inaktivasyon otozomal segmente de yayılmıştır. Bu 6 olgudan çıkan sonuç, inaktivasyonun kısa kola transloke olan otozomal segmentlere yayılabildiği, buna karşılık uzun koldan otozom parçasına geçemediğidir (59).

Mashkova ve Verlinskaja 1976'da yayınladıkları X kromozomunun kısa kolunun parsiyel delesyonu ve 2. kromozomun parsiyel trizomisi olan  $46,X,t(X,2)(Xqter \rightarrow Xp11::2q36 \rightarrow 2qter)$  kromozom yapılı hastada anormal X inaktive olurken, dengeli X-otozom translokasyonu taşıyan ve anormal kromozomu hastaya veren  $46,t(X,2)(Xqter \rightarrow Xp11::2q36 \rightarrow 2qter; 2pter \rightarrow 2q36 : : Xp11 \rightarrow Xpter)$  kromozom yapılı annesinde normal X kromozomunun geç replike olduğunu bulmuşlardır (14).

X-X translokasyonlarında da yine kırılma noktasının pozisyonuna göre, bütün Turner Sendromu bulguları ya da sadece gonadal disgenezi gibi çeşitli fenotipler görülebilmektedir (67).

Ne tür olursa olsun, anormal yapılı bir X kromozomu içeren hücrede genetik açıdan en dengeli durumu verecek olan inaktivasyon patterni gözlenmektedir. Başlangıçta rastgele inaktivasyon olurken, daha dengeli olan hücrelerin yaşayıp, dengesizlerin elimine olması ile bu sonucun ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Şekil 14'te, defekti Turner Sendromu belirtilerine yol



Şekil 14.

açan X kromozom bölgeleri ve sebep oldukları bulgular görülmektedir (64).

Anormal X Kromozomunun Fenotipe Etki Mekanizmaları :

Anormal X kromozom yapılarının fenotipi nasıl etkilediğini açıklamak üzere çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Bunlardan başlıcaları şunlardır :

- 1 - X kromatini miktarı fenotipe etki yapar.
- 2 - Hücre siklüsünün süresinin değişmesi fenotipi etkiler.
- 3 - Hücrelerin çoğunda aynı X aktif olduğundan, bu X kromozomundaki resesif bir gen hemizigot durumda bulunur ve gonadal disgenezise neden olur.
- 4 - Fenotipteki kusur X inaktivasyonun meydana gelmesinden daha önce olur.
- 5 - Anormal X kromozom yapısı, inaktif X kromozomlarının oogoniumlarda reaktivasyondan sonra etkisini gösterir.
- 6 - İnaktif X kromozomundaki aktif bölgelerin sayısının değişmesi fenotipe etki eder.
- 7 - Normal seksüel gelişme için her iki X kromozomundaki Xq13-q27 bölgesinin sağlam olması gerekir.

Bu bölgedeki bozukluk gonadal disgenezise yol açar.

- 8 - Anormal X kromozomu, normal ve anormal X'in aktif olduğu hücreler arasındaki seleksiyon periyodunda etkisini gösterir.
- 9 - Orijinal X inaktivasyonu zannedildiği kadar rastgele değildir. Ya da birkaç X kromozomu taşıyan vakalarda biri hariç bütün X kromozomları inaktiftir, fakat inaktif X kromozomlarının asenkronik davranışı fenotipik anormalliklere yol açar (58,56).

Bu sayılan hipotezlerin hiçbiri tek başına yeterli değildir ve hiçbiri bir diğerini bertaraf edemez. Ayrıca, herhangi bir X kromozom anomalisi fenotipi birden fazla yoldan etkiliyor olabilir (58).

Tablo 4'te anormal X kromozom yapısının meydana getirdiği fenotipik etkiler ve olası açıklamalar görülmektedir (58).

TABLO 4 : Anormal X Kromozom Kuruluşunun Sebep Olduğu Fenotiplerin Açıklaması

X Kromozom Yapısı	Monozomi	Genetik Aktivite	Fenotip	Açıklama
XX	-	Tesadüfi seçilen bir X	Normal	--
XXX	-	Tesadüfi seçilen bir X	Normal; bazı şahıslar anormal	3 adet Xp deki aktif bölgeler; asenkronize X davranışı; Oositler üzerine etki.
Dengeli translokasyon (X:0-tozom)	-	Genellikle transloke X	Gonadal disgenезi	Position Effect; oositler üzerine etki
XO	X	Normal X	Turner Sendromu	Xp üzerindeki proksimal ve distal aktif bölgelerin kaybı, seleksiyon sırasında etki, oositler üzerine etki.
Xi(Xq)-Xtel (Xq)	Xp	Normal X	Turner Sendromu	Xp üzerindeki proksimal ve distal aktif bölgelerin kaybı, seleksiyon sırasında etki, oositler üzerine etki.
XXp-	Xp'nin bir kısmı	Normal X	Boy Kısallığı	Xp nin distal bölgesindeki aktif bölgenin kaybı, seleksiyon sırasında etki, oositler üzerine etki.
X idic (Xp-)	Xp'nin bir kısmı	Normal X	Genodal Disgenезi, bazı Turner Sendromu bulguları	Xp nin distal bölgesindeki aktif bölgenin kaybı, seleksiyon sırasında etki, oositler üzerine etki.

TABLO 4' ün devamı,

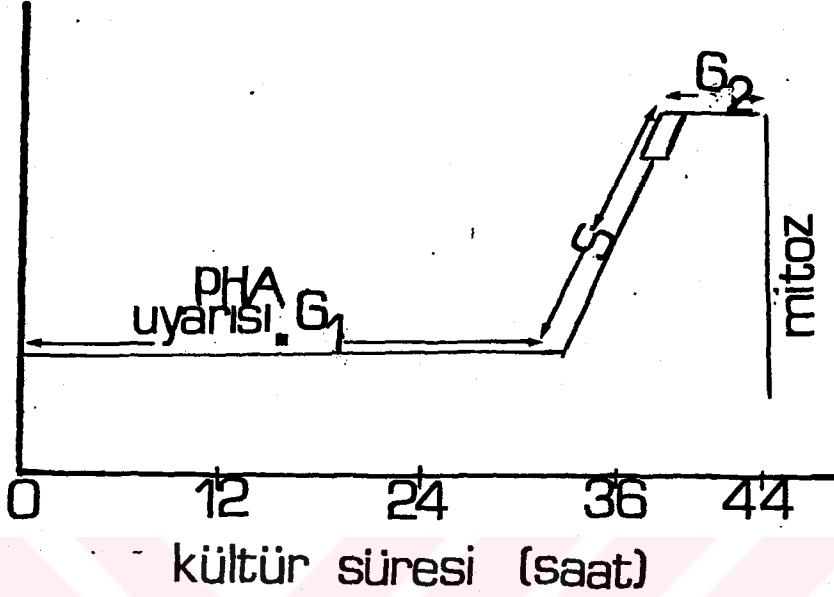
XXq -	Xq'nun bir kısmı	Normal X	Gonadal Dis- genezi, bazı Turner Send- romu bulgula- rı	Position Effect ? Seleksiyon sırasındaki etki, oositler ü- zerine etki.
X idic. (Xq-)	Xq'nun bir kısmı	Normal X	Gonadal Dis- genezi bazı Turner Send- romu bulgula- rı	Position Effect? Seleksiyon sırasındaki etki, oositler ü- zerine etki.

İ n a k t i f X K r o m o z o m u n u G ö s t e r -  
m e Y ö n t e m l e r i :

Bu yöntemlerin ilki, 1960'larda uygulanmaya başlanan otoradyografidir. Bu yöntemin temeli, hücre siklüsünün DNA replikasyonunun yer aldığı sentez fazında ortamda DNA yapısına girebilecek radyokatif bir maddenin bulundurulmasıdır. Radyoaktif madde izotopu olarak tritium ( $^3\text{H}$ ) ve DNA'ya özgü madde olarak da timin bazı kullanılmaktadır. Ancak timin tek başına değil, deoksiribonukleozid yani timidin (timin bazı + deoksiriboz) olarak kullanılır (3). Timidin, tritium ile işaretlenerek hem DNA'ya özgü, hem de radyoaktif olan  $^3\text{H}$ -timidin elde edilir. S fazının belirli dönemlerinde ortama  $^3\text{H}$ -timidin ilave edildiğinde, DNA'nın bundan sonra replike olan kısımlarında  $^3\text{H}$ -timidin DNA'ya inkorpore olacak ve daha sonra preparat bir fotoğraf filmi ile temas ettirildiğinde,  $^3\text{H}$ -timidinli bölgeler fotoğrafta parlak noktalar halinde görülecektir. Böylece, hangi DNA bölgelerinin  $^3\text{H}$ -timidin ilave zamanından önce, hangi bölgelerin sonra replike olduğunu anlamak mümkün olacaktır.

Bu çalışmalarda, S fazının son zamanlarında, örneğin kültürün sonlandırılmasından 6 saat önce, (ki bu zaman aşağı yukarı S fazının son bir saatine denk gelmektedir), Şekil 15

normal kadınlarda  $^3\text{H}$ -timidin ilave edildiğinde, diğer kromozomlara göre çok fazla işaretlenmiş bir C grubu kromozomu bulunduğu saptanmıştır. Daha sonra, anormal yapıllı



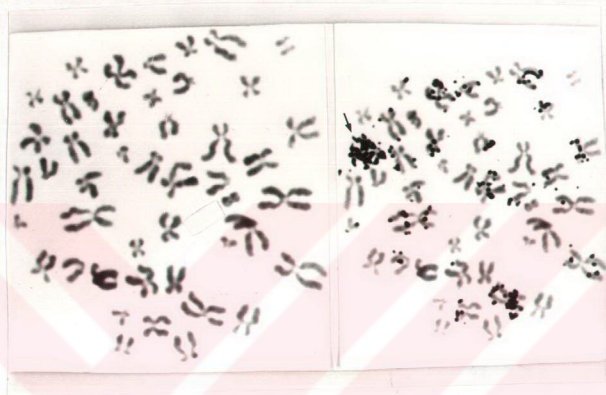
- :Kültür ortamındaki <sup>3</sup>H-timidin  
G<sub>1</sub> :İlk büyüme periyodu  
S :DNA sentezi  
G<sub>2</sub> :Pre-mitotik evre

Şekil 15.

X kromozomu taşıyan bireylerle yapılan çalışmalardan, bu fazla işaretli kromozomun X kromozomu olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (6,5), Resim 2

Bu yöntemi tersine çevirerek, S fazının başlarında <sup>3</sup>H-timidin uygulamak da olasıdır. 5-fluoro-2'deoksiuridin (FUdR) ile senkronize edildiklerinde, hücrelerin çoğu S fazının başında bloke edilir. Daha sonra FUdR'li medyum yıkılarak blokaj kaldırılır ve hücreler <sup>3</sup>H-timidinli meydana





Resim 2.

alınır. İşaretleme süresi sonunda radyoaktif medyum boşaltılıp, ortama normal timin konarak <sup>3</sup>H-timidin uygulaması sona erdirilir. Bu durumda da, iki X kromozomundan biri ya da daha fazla X kromozomu varsa birihariç hepsi soluk görünecektir. (51).

Otoradyografide, yanyana gelen radyoaktif tanecikler erken ve geç replike olan bölgelerin sınırlarının kesin olarak ayırd edilebilmesini önler. Örneğin parsiyel inaktifleşen bir translokasyon kromozomunda inaktivasyon sınırı kesin olarak ayırd edilemez(59).

Otoradyografinin sınırlı olan rezolüsyon gücüne karşılık, 1973'te Latt, DNA'ya BrdU inkorporasyonunu takiben fluoresan Hoechst 33258 boyası ile boyayarak yeni bir teknik geliştirmiştir (33).

DNA'ya timidin yerien 5-bromo-2'deoksiuridin (BrdU) girmesi kromatinin boyanma özelliklerini değiştirir. Bu durum, G,R ve T bantlarının, kardeş kromatid değişmelerinin ve dişi hücrelerinde geç replike olan X kromozomunun gösterilmesinde kullanılabilir.

Bir timidin analogu olan BrdU'nun inkorpore olduğu kromozomlar daha sonra A-T baz çiftlerinde DNA'ya bağlanan bir bisbenzimidazol türevi olan Hoechst 33258 (bis Benzimide (2'- [4-Hydroxyphenyl]-5- [4-methyl-1-piperaziny1] - 2,5' -bi-1H-benzimidazolâ) ile boyandığında boya normal poly (dA-dT)

bölgelere bağlandığında verdiği fluoresans etkiden daha az etki gösterir ve bu bölgeler daha soluk fluoresans verir. Burada temel olay Brom gibi polarize olabilen ağır metalin, organik boyanın fluoresansını değiştirmesidir (12, 32).

1974'te Kato, DNA'ya BrdU inkorporasyonunu takiben Hoechst 33258 yerine, akridin oranj kullanarak benzer sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir (31).

Daha sonra, boyama yöntemine Giemsa boyası da adapte edilerek, fluoresan boyanın zamanla solması gibi teknik güçlükler de giderilmiş ve kalıcı preparatlar elde edilebilmiştir. Yapısında BrdU bulunan DNA, Hoechst 33258 boyasına BrdU içermeyen DNA bölgelerinden daha sıkı bağlanmakta ve ışığa bırakıldığında boyayı kolay bırakmamaktadır. Bu nedenle, daha sonra preparat Giemsa ile boyandığında BrdU taşıyan DNA daha açık boyanmaktadır (43,12,32).

Bu yöntem, replikasyonun değişik dönemlerinin saptanmasına ya da tek bir hücre çevrimi içerisinde erken ya da geç replike olan bölge ve kromozomları ayırtmaya uygulanabilir. BrdU bir hücre devrinin son döneminde (B pulse) uygulandığında, erken replike olan kromozom bölgeleri parlak (Giemsa ile koyu) boyanacak ve elde edilen pattern R bandına benzeyecektir. Buna karşılık, BrdU hücre devrinin erken döneminde konulursa, (T pulse), geç replike olan kromozom bölgeleri parlak (Giemsa ile koyu) boyanacak ve pattern G bantlarına benzeyecektir. Homologlar genellikle benzer bant örnekleri

gösterirler, fakat X kromozomu buna istisna oluşturur (24).

Daha yeni olarak, DNA'ya BrdU inkorporasyonunu takiben BrdU monoklonal antikorları kullanarak immünokimyasal boyama yöntemleri de geliştirilmiştir (30).

## M A T E R Y A L - M E T O D

### A. Materyal :

Çalışma 1977-1990 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı'na başvuran ve Turner Sendromu tanısı konulan değişik kromozom yapısındaki 20 hasta üzerinde yapılmak üzere planlanmıştır. Bu yıllar arasında başvuran toplam 92 hastanın taranması ile uygun olduğu saptanan 30 hastaya mektup ile çağrıda bulunulmuş, bu çağrıya olumlu yanıt veren 10 hasta ile çalışılmıştır.

Ayrıca Turner sendromu şüphesi dışındaki nedenlerle başvuran ve normal kromozom konstitüsü tespit edilen 5 hasta ile de yöntemin işlerliği kontrol edilmiştir.

Hastaların kromozom konstitüsyonları ve genel olarak bulguları Tablo 5'de görülmektedir.

TABLO 5 :

Olgular	Kromozom Kons.	Bulgular
1- D.E.	46, X(Xp-)	Turner Sendromu bulguları
2- S.S	46,Xi (Xq)	Turner Sendromu bulguları
3- S.A.	45,X0/46,X(Xf)	Turner Sendromu bulguları
4- C.A.	46,X(Xm)	Sekonder amenore
5- A.S.	45,X0/46,Xi (Xq)	Turner Sendromu bulguları
7- N.A.	46,Xi (Xq)	Primer amenore, cubitus valgus
8- O-G	46,Xi (Xq)	Turner Sendromu bulguları
9- N.A.	45,X0	Turner Sendromu bulguları.
10- S.B.	46,XX	Primer amenore

B. Metod :

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genetik ve Teratoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (GETAM) Sitogenetik Laboratuarında yapılmıştır.

Bu çalışmada, inaktif X kromozomunu gösterebilmek için S fazının son zamanlarında DNA'ya BrdU inkorporasyonunu takiben, akridin oranj, alkali ortamda Giemsa ve Hoechst 33258+Giemsa boyama yöntemleri denenmiş ve hastalar üzerinde uygulanmak üzere BrdU inkorporasyonundan sonra Hoechst 33258+Giemsa (RBG) boya yöntemi uygun bulunmuştur.

Ayrıca, hastalardan alınan yanak mukozası epiteli örnekleri krezilviyole ile boyanarak X kromatini yönünden incelenmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar :

1 - Besi Ortamı :

Steril odada, steril koşullarda;

80 ml RPMI 1640 Medium (Gibco)

20 ml Fetal Calf Serum (Gibco)

0,2 ml (5000 Ü) Penisilin krist. (25000 Ü/ml)

0,2 ml (0,01 gr) Streptomisin (0,05) gr/ml

1,5 ml Phytohaemaglutinin (Difco)

100 ml'lik steril şişeye konarak stok besiyeri hazırlandı. Bu stok besiyerinden özel vidaalı kapaklı tüplere 5'er ml konarak, kapakları kapatıldıktan sonra ağızları flasterle sarılıp buzluğa kaldırıldı.

2 - BrdU Solüsyonu :

6,5 mg BrdU (Sigma) 12,5 ml RPMI 1640 medyumda çözüldü. Stok olarak hazırlanan bu solüsyon kapaklı bir tüpe konup siyah kılıfa sarılarak +4 derecede buzdolabında saklandı.

3 - Hoechst 33258 Stok Solüsyonu:

1mg Hoechst 33258, 10 ml bidistile suda çözüldü. Bu stok solüsyon ağzı kapaklı parafilmlelenmiş ve siyah kılıfa sarılmış bir tüpte +4 derecede buzdolabında saklandı.

4 - Hoechst Boyası :

100 ml 2XSSC içine pastör pipeti ile stok Hoechst solüsyonundan 2 damla, (0,05 ml) ilave edildi.

5 - 2XSSC Solüsyonu :

17,532 gr NaCl (Merck) ve 8,823 gr Na-sitrat (Merck) tartılıp karıştırıldı ve 1 litreye distile su ile tamamlanarak stok 20XSSC solüsyonu hazırlandı. Kullanılacağı zaman bu stoktan 10 ml alınarak 100 ml'ye distile su ile tamamlandı ve 2XSSC elde edildi.

6 - Giemsa Boyası :

5 ml Giemsa lösung (Merck) 95 ml pH = 6,8'lik Sörsansan tamponu içine ilave edildi.



7 - Söransan Tamponu :

9,94 gr/lt'lik  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 9,53 gr/lt'lik  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  stok solüsyonları hazırlandı. Her iki stok solüsyondan eşit miktarda karıştırıldıktan sonra  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ilave edilerek pH 6,8'e ayarlandı.

İ ş l e m l e r :

Kültürün Yapılışı :

Kültür vasatları buzluktan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında su içinde tutularak çözündürüldü. Hasta venasından heparinli steril enjektörle alınan 1-1,5 ml kandan 1 no' lu iğne ile 13'er damla (0,3 ml) besiyerlerine ekildi. Her hasta için en az dört tüp kullanıldı. Steril odada steril koşullarda gerçekleştirilen ekim işlemleri sırasında iğne ve tüpün ağzı alevden geçirildi. Ekim yapılan tüpler ağzıları kapatılıp flasterlendikten sonra hafifçe çalkalanarak 37 derecelik etüve kondu. Kültürün 65. saatinde stok BrdU solüsyonundan 1 ml'lik insülin enjektörü ile 0,05 ml tüplere ilave edildi ve yeniden etüve kaldırıldı. 70. saatte tüplere 0,1 ml Colcemid (CIBA 0,1 mg/ml olarak distile su ile sulundurulmuş) ilave edildi ve yine etüve kaldırıldı. 72 saatlik kültür süresi (iki hücre siklüsü) sona erdiğinde tüpler etüvden çıkarıldı, içerikleri 15 ml'lik temiz, kuru santrifüj tüplerine boşaltıldı ve 7 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi. Üstte

kalan sıvı (supernatan) aspiratörle çekilerek atıldı. Tüpler vorteks üzerinde karıştırılırken çökelti üzerine 0,075 M KCl (5,59 gr/lt KCl) eklenerek 7 ml'ye tamamlandı. Böylece hipotonik şok yapıldı. Hipotonik şok süresi 10 dakika ile sınırlandı. Yeniden 7 dakika 1100 rpm'de santrifüje edildi. Supernatan atıldı. Tüpler karıştırıcıda iken dipteki çökelti üzerine taze hazırlanmış fiksatif (3 kısım metanol+1 kısım aseptikasit) damlatılarak 7ml'ye tamamlandı. Ağızları parafilmle kapatılan tüpler buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün buzdolabından çıkarılan tüpler 7 dakika 1100 rpm'de santrifüj edildi, supernatan atıldı, karıştırıcı üzerinde 7ml taze fiksatif eklendi, yeniden 7 dakika 1100 rpm'de santrifüje edildi, aynı işlemler iki kez daha 5'er ml fiksatif ilave edilerek tekrarlandı. Supernatan atıldıktan sonra tübün dibindeki çökeltiye 2-3 damla fiksatif ilave edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı.

#### P r e p e r a t l a r ı n H a z ı r l a n m a s ı :

Lamlar iyice temizlendikten sonra distile su dolu şaleyeye kondu ve şaleyeye yayılmaya kadar buzdolabında bekletildi. Yayma yapılırken lamlar şaleden çıkartıldı, suyun fazlası filtre kağıdına akıtıldı. 45 derece eğimle tutulan ıslak lam üzerine 1-2 damla hücre süspansiyonu 45-50 cm yüksekten damlatıldı, üflenerek ve silkelenerek dağıtıldı. Ve kurumaya bırakıldı.

B o y a m a :

Taze preparatlar 10 dakika, bir şale içerisindeki Hoec-hst boyada bekletildi. Daha sonra içinde 2XSSC bulunan petri kabına aktarılıp oda sıcaklığında, 30 dakika, 25-30 cm mesafede UV lambası karşısında tutuldu. Süre sonunda preparatlar 2XSSC dolu şaleye konuldu ve 1,5 saat boyunca 60 derecelik su banyosunda bekletildi. Daha sonra taze hazırlanmış %5 lik Giemsa boyası içinde 15 dakika boyandı ve musluk suyunda çalkalanarak havada kurutuldu.

B u c c a l S m e a r Y ö n t e m i :

Ağzını çalkalayıp yutkunması istenilen hastanın yanak mukozası epiteli, bir spatül yardımı ile hafifçe kazınarak alındı. İlk alınan materyal atıldıktan sonra ikinci kez aynı bölgenin kazınmasıyla elde edilen epitel hücreleri temiz bir lam üzerine yayılarak hemen 1:1 oranında %96 alkol:eter karışımı içeren şaleye kondu. Burada 40 dakika bekletilen lamlar distile su ile çalkalanıp havada kurutulduktan sonra 30cc HCl, 80cc distile su içeren şalede 10 dakika bekletildi. Yeniden distile su ile çalkalanıp havada kurutuldu ve krezil viyole boyası ile 2-3 dakika boyandı. Distile su ile yıkanıp havada kurutulularak mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi. Krezil viyole boyası 0,5gr boya 100cc ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı.

### M i k r o s k o p t a İ n c e l e m e :

İncelemeler Leitz-Orthoplan mikroskopta X100 akromat objektifle yapılmış, fotoğraflar Leitz Orthomat otomatik kameralarda ILFORD PAN F (18 Din) film kullanılarak 15 Din ayarı ile çekilmiştir.

Her olgudan en az 30 metafaz olmak üzere toplam 377 metafaz incelenmiş ve olgularda X kromozomları inaktivasyon yönünden değerlendirilmiştir.

### İ s t a t i s t i k D e ğ e r l e n d i r m e :

Çalışmada elde edilen sonuçların normal ile karşılaştırılmasında  $X^2$  (ki kare) testinden yararlanılmıştır.

Normal bireylerde rastgele seçimle %50 maternal, %50 paternal X kromozomunun inaktifleşmesi beklenir. Defektif kromun inaktivasyon oranı normalde beklenen %50 oranı ile karşılaştırılmıştır.

## B U L G U L A R

10 olgudan toplam 377 metafazın incelenmesiyle elde edilen bulgular Tablo 5'de görülmektedir.

I. Olgu : 46,X (Xp-) kromozom yapısındaki bu hastanın incelenen 43 metafazından 33'ünde (%76) defektif X kromozomu soluk olarak görülmüş, kalan 8 sahada ise hiç soluk kromozoma rastlanmamıştır. Yapılan buccal smear incelemesinde %20 oranında X kromatini (+) bulunmuş, bunlardan 4 tanesinin normalden küçük olduğu görülmüştür.

II. Olgu : 46, Xi (Xq) kromozom yapısındaki bu olguda, sayılan 33 metafazın 27'sinde (%81) izokromozom soluk olarak saptanmıştır. Kalan 5 metafaza ise hiç soluk kromozoma rastlanmamıştır. Buccal smear incelemesi %27 X kromatin + sonuç vermiş, bunlardan dördünün normalden büyük olduğu gözlenmiştir.

III. Olgu : 45, X0/46, X (Xf) kromozom yapısındaki bu mozaik olgudan toplam 74 metafaz sayılmış, 45,X0 yapılı 24 metafaz değerlendirmeye alınmamıştır. 46, X (Xf) yapısındaki 25 sahanın 12'sinde (%48) sentrik fragment soluk iken, 13'ünde farklı boyanma görülmemiştir. Buccal smear incelemesinde Barr cisimciğine rastlanmamıştır.

IV. Olgu :46X(Xm) kromozom yapılı bu olguda 37 metafaz incelenmiş, 14'ünde (%37) marker kromozom soluk, 20'sinde diğerlerinden farksız görülmüştür. Bu olguda yeterli materyal elde edilemediğinden, Buccal Smear incelemesi yapılamamıştır.

V. Olgu : 45, X0/46,Xi (Xq) kromozom yapısındaki mozaik olguda toplam 31 metafaz incelenmiş, 45,X0 bulunan 10 saha değerlendirmeye alınmamıştır. 46,Xi (Xq) yapısındaki 21 metafazın 13'ünde (%61) izokromozom soluk, 8 tanesinde diğer kromozomlardan farksız bulunmuştur. Buccal Smear incelemesinde %18 X kromatin + görülmüş, 2 tanesi normalden büyük olarak saptanmıştır.

VI. Olgu : 46, Xi (Xq) yapısındaki bu hastada 32 sahaya bakılmış, 18'inde (%56) izokromozom soluk, 13'ünde farklı değildir. Buccal Smear inceleme sinde %15 X kromatin + görülmüş, 3 tanesi normalden büyük bulunmuştur.

VII. Olgu : 46, Xi (Xq) yapılı bu olguda 35 metafaz incelenmiş, 26 sahada (%77) izokromozom soluk olarak görülmüş, 9 sahada kromozomlar arasında renk farkı gözlenmemiştir. Yapılan Buccal Smear incelemesinde %5 oranında X kromatini + bulunmuş, normalden büyük X kromatini gözlenememiştir.

VIII. Olgu : 46,Xi (Xq) yapısındadır. 32 metafaz sayılmış, 27'sinde (%84) izokromozom soluk bulunmuştur. Kalan 5 sahada soluk kromozoma rastlanmamıştır. Buccal Smear incelemesinde %38 X kromatin + bulunmuş, bunlardan 6 tanesinin normalden büyük olduğu görülmüştür.

T A B L O 5

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
D.E.	S.S.	S.A.	C.A.	A.S.	A.U.	N.A.	O.G.	N.A.	S.B.
46,X(Xp-)	46,XI(X)	45,XO/46(XX)	46,X(Xm)	45,XO/46,XI(Xq)	46,XI(Xq)	46,XI(Xq)	46,XI,(Xq)	45,XO	46,XX

O L G U L A R

Anormal X'in Geç Repli-  
ke olduğu metafaz sayı-  
sı

Normal X'in Geç Repli-  
ke olduğu metafaz sayı-  
sı

Hiç Soluk Kromozom  
görülmeyen metafaz  
sayısı

Toplam incelenen  
metafaz sayısı

33	27	12	14	13	18	26	27	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
8	5	13	20	8	13	9	5	30	8
43	33	25*	37	21*	32	35	32	30	30

\* Mozaik olgularda sayılmametafazlardan 45,XO yapısında olanlar tabloya dahil edilmemiştir.

IX. Olgu : 45,X0 yapısındadır. Beklendiği gibi hiç solukromozom görülmemiş ve olgu istatistik değerlendirmeye alınmamıştır. Buccal smear incelemesinde X kromatini görülmemiştir.

X. Olgu : Primer amenore nedeniyle incelenen bu olguda 46, XX kromozom konstitüsüyonu saptanmıştır. Sayılan 30 metafazdan 22'sinde (%73) soluk boyalı bir X kromozomu görülürken 8 metafazda hiç soluk kromozom bulunmamıştır. Buccal smear incelemesinde %33 oranında X kromatin + bulunmuştur.

Toplam 10 olguya ait sayılan 377 metafazın defektif X kromozomu içeren 258 tanesinden 177 (%68)'sinde defektif kromozom soluk bulunmuş kalan 81 sahada hiç soluk kromozom görülmemiştir.

Elde edilen sonuçlar  $X^2$  (ki kare) testine tabi tutularak normal ile karşılaştırılmıştır.

$$X^2 = 31,55$$

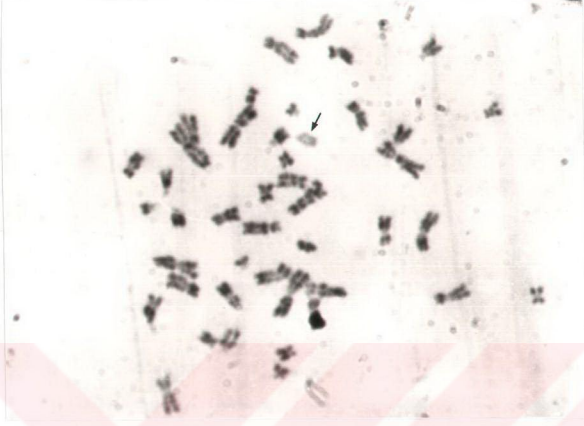
ve

$$p < 0,001$$

bulunarak sonuçların anlamlı olduğuna karar verilmiştir.

Resim 3,4 ve 5'te farklı kromozom yapılarındaki hastaların metafaz örnekleri görülmektedir.





RESİM 3 : I. Olgunun Metafaz Örneği (46,X(Xp-)).



RESİM 4 : II. Olgunun Metafaz Örneği (46,Xi(Xq)).



RESİM 5 : III. Olgunun Metafaz Örneği (46,X(Xf)).

## T A R T I Ő M A

Mary Lyon'un 1961'de ileri sürdüğü hipoteze göre, memelilerin dişi embriyolarında bulunan iki X kromozomundan biri, erken embriyonik gelişme sırasında fonksiyonel olarak inaktifleşir ve cinsiyet kromatinini oluşturur. Rastgele bir seçimle maternal ya da paternal kaynaklı X kromozomlarından biri inaktifleşmektedir. Bir hücrede hangi X inaktive olmuşsa, o hücreden meydana gelen bütün hücrelerde aynı X inaktif durumunu korur (10).

Bu hipotezin ileri sürülmesinden bu yana, X inaktivasyonunu inceleyen çeşitli araştırıcılar, zaman zaman inaktifleşecek olan X kromozomunun seçimindeki rastgeleliğin ortadan kalktığını gözlemişlerdir. X kromozomlarından birinde yapısal bir anomali görüldüğü durumlarda, hücrelerin çoğunda bu defektif kromozomun inaktive olduğu bildirilmektedir (42,46). Bu durumu açıklamak üzere iki hipotez ileri sürülmüştür: Gartler ve Sparks seleksiyon hipotezinde normal ve anormal X'lerden birinin tesadüfi olarak inaktifleştiğini, fakat normal X'in inaktive olduğu hücrelerin genetik açıdan dengesiz durumda bulduklarından, bölünme hızlarının düşük olduğunu ve zamanla normal X'in aktif kaldığı hücrelerin oranının arttığını belirtmişlerdir. İkinci hipotez ise, anormal X'in, bu yapısı

nedeniyle tercihli olarak inaktifleştiği fikridir (Ohno, 1967). Fakat X-otozom translokasyonları gibi kompleks X kromozom anomalilerini açıklamakta bu iki hipotez de yetersiz kalmaktadır (47). Örneğin, dengeli X-otozom translokasyonu taşıyan bütün kadınların lenfositlerinde genetik dengeyi sağlamak üzere normal X inaktif iken, fibroblastlarda az da olsa translokasyon kromozomunun inaktifleştiği minör hücre grupları bulunmaktadır (64).

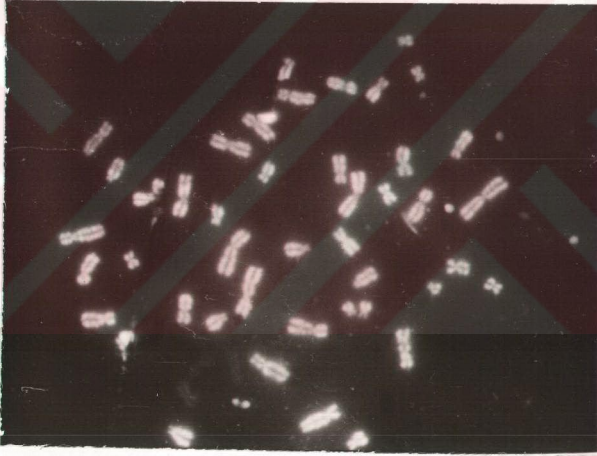
Patolojik X kromozomu taşıyan kişilerde yapılan buccal smear çalışmalarında da patolojik X'in yansıtıcılığı olan büyük veya küçük X kromatini yanı sıra, normal X'in inaktifleştiğini yansıtan normal boyutlardaki X kromatinleri de gözlenmektedir.

Inaktif X kromozomunu gösterebilmek için 1960'lerden bu yana çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden ilki olan otoradyografinin sınırlı olan rezolüsyon gücüne karşılık 1970'li yıllarda DNA'ya BrdU inkorporasyonundan sonra fluoresan bir boya ile boyayarak daha ayrıntılı preparatlar elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla, tekniğe Giemsa boyası da eklenmiş ve fluoresan boyanın solması gibi güçlükler de giderilerek kalıcı preparatlar yapmak mümkün olmuştur.

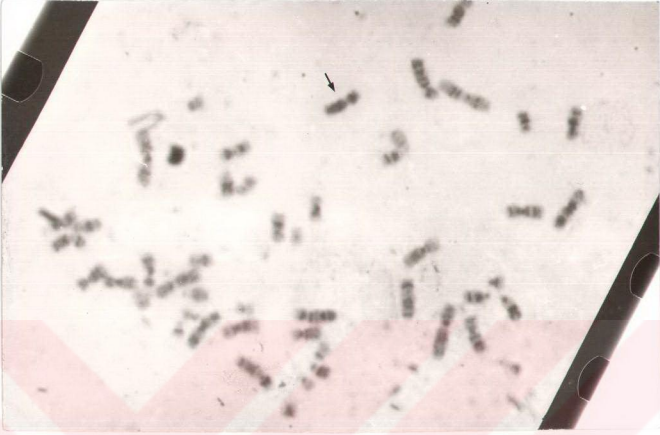
Çalışmamızda, karşılaştırmak üzere üç yöntem seçtik. Bunlardan birincisi DNA'ya S fazının sonlarında BrdU inkorporasyonunu takiben akridin oranj ile boyayarak R bandı elde etmek ve fluoresan mikroskopunda incelemek, bir diğeri BrdU

inkorporasyonunu ardından alkali ortamda Giemsa boyasının uygulandığı reverse harlequin boyama yöntemi ve üçüncüsü de BrdU inkorporasyonundan sonra Hoechst 33258 ve ardından Giemsa ile boyamanın yapıldığı RBG tekniğidir.

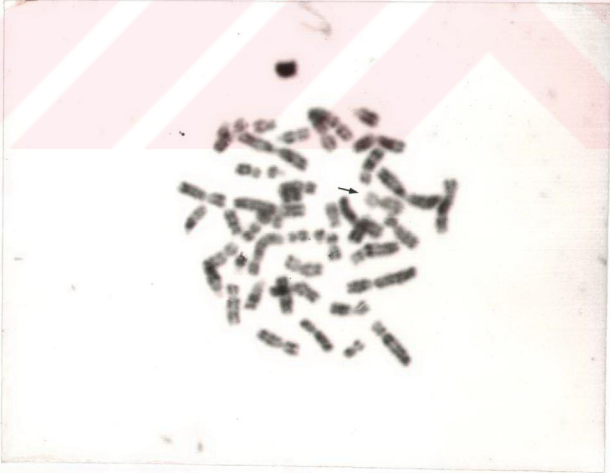
Akridin oranj ve Hoechst 33258 + Giemsa boyamasıyla R bant patternleri elde edilir ve inaktif X kromozomu soluk görünür. Reverse harlequin yönteminde ise, (R bandı için önerilen bir boyama yöntemi olmasına karşın), G bant patternleri elde edilmiş ve inaktif X kromozomu koyu boyanmıştır.



RESİM 6 : Akridin Oranj İle Boyanmış Metafaz Örneği,



RESİM 7 : Reverse Harlequin Yöntemi İle Boyanmış ve G Bant Patterni Elde Edilmiş Metafaz Örneği.



RESİM 8 : RBG Yöntemi İle Elde Edilmiş Metafaz Örneği.

Akridin oranj boyama yönteminin inaktif X'i göstermekte kullanılabileceği saptanmışsa da, fluoresan boyanın çabuk solması yüzünden inceleme ve fotoğraflama güçlükleri, arşivlenememesi ve fluoresan mikroskobu gibi özel ekipmana gerek duyulması gözönüne alınarak rutin hasta uygulaması için uygun olmadığına karar verilmiştir.

Denenen bir diğer yöntem olan Agamohammedi ve Savage'-in 1989'da yayınladıkları reverse harlequin boyama yönteminde geç replike olan X net olarak ayırd edilebilmesine rağmen, elde edilen bant patterninin G ve R bant pattenleri arasında değişkenlik gösterebilmesi nedeniyle uygulanmasından vazgeçilmiş, ancak bu yöntem kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olarak laboratuvar yöntemlerimiz arasında yerini almıştır.

Son olarak, hastalarımız üzerinde de uyguladığımız RBG yöntemi, saklanabilme kolaylığı ve tekrarlanabilme özelliğinden dolayı bu çalışma için en uygun yöntem olarak belirlenmiştir.

Normal kromozom konstitüsyonuna sahip kişilerde yöntemlerin işlerliği denenmiş ve inaktif X kromozomunun ayırd edilebildiği görülmüş, ve RBG tekniği araştırmaya katılan defektif X kromozomu taşıyıcısı hastalarda uygulanmak üzere seçilmiştir.

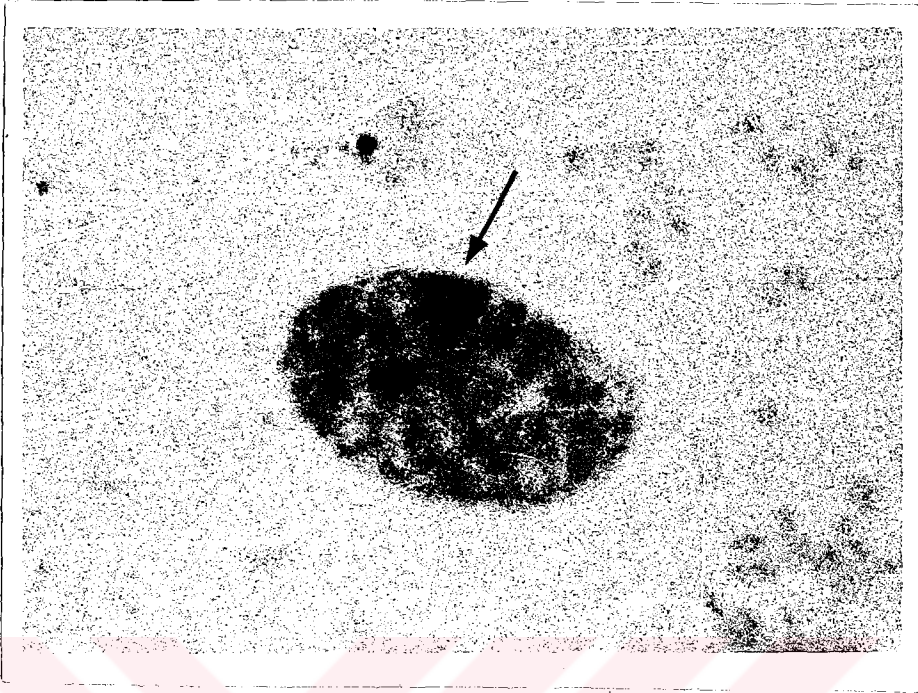
Çağrılan 30 hastadan çağrıya olumlu yanıt veren 10 hastada incelenen 377 metafazın anormal X kromozomu içeren

258 tanesinde, %68 oranında anormal X'in soluk boyandığı görülmüştür, bu da literatür bilgisiyle uygunluk göstermiştir (14,17). Ayrıca bu olgularda hiç normal X'in geç replike olduğu metafaza rastlanmamış olması da bulgularımızı indirekt yoldan desteklemektedir.

İncelenen metafazların %31'inde hiç soluk kromozom görülememiştir. Bunun sebebinin kültür sırasında hücreler senkronize edilmemiş olduklarından, BrdU uygulaması sırasında kültürde farklı siklus evrelerinde hücrelerin bulunması ve bunların BrdU inkorporasyonunun beklenenden farklılık göstermesi olduğu düşünülmektedir.

Olgularda yapılan Buccal Smear incelemelerinde, defektif Xkromozomunu yansıtan normalden büyük ya da küçük X kromatinlerinin yanısıra, normal boyda X kromatinlerine de rastlanmıştır. Bu da, değişik dokularda farklı inaktivesyon patternleri görüldüğünü bildiren literatür bilgisiyle uyumlu bir sonuçtur (64).





RESİM 9 : 46, Xi (Xq) Kromozomu Konstitüsyonlu Olguda  
X Kromatini Görünümü.

## Ö Z E T

Lyon hipotezine göre dişi memeli hücrelerinde bulunan iki X kromozomundan biri erken embriyonik dönemde rastgele bir seçimle inaktifleşmektedirler (35). İnaktivasyona uğrayan X kromozomu hücre siklusünün S fazında diğer kromozomlara oranla daha geç bir dönemde replikasyona uğrar (19).

Bu çalışmanın ilk aşamasında, geç replike olan X kromozomunu göstermek için geliştirilmiş olan boyama yöntemlerinde üçü (Akridin Oranj, Harlequin Reverse, RBG) denenip, karşılaştırılmış ve hastalarda rutin olarak uygulanmak üzere RBG yöntemi seçilmiştir.

Çalışmanın diğer bölümünde, anormal yapıları bir X kromozomuna sahip şahıslarda inaktivasyon olayının tesadüfi olmaktan çıkıp genellikle tercihli olarak defektif X kromozomunun inaktifleştiği (17) bulgusundan yola çıkarak çeşitli morfolojik bozukluklar gösteren X kromozomlarına sahip 10 Turner Sendromu hastası kromozom inaktivasyonu yönünden incelenmiştir.

46, X, i (Xq) kromozom konstitüsyonlu 4 hasta ve 45, X0/46, X, i (Xq) kromozom yapısına sahip 1 hastada incelenen metafazlarda %72 oranında izokromozom olan X'in soluk boyanıp inaktive olduğu gözlenmiştir.

46,X(Xp-) kro. konstitüsyonlu olguda %76 oranında defektif X soluk boyanırken, 46 X(Xm) kromozom yapısına sahip vakada Xm'in soluk olduğu sahaların oranı %37'dir. Ve 46, XX kromozom yapısına sahip olgularda ise %73 oranında soluk X görülmüştür. Hastalara ait hiçbir metafazda normal X kromozomu soluk olarak görülmemiştir. Elde edilen bulgular literatürle karşılaştırılmış ve uygunluk gösterdiği saptanmıştır.



## S U M M A R Y

According to the Lyon hypothesis, in female mammalian cells one of the two X chromosomes is inactivated during an early embryonic stage (35). In the S phase of the cell cycle the inactivated X chromosome replicates itself later than the other chromosomes (19).

In the first part of this study three of the staining methods (Acridin Orange, Alkali treated Giemsa, RBG) to show the late-replicating X have been compared and RBG is chosen the most suitable for routine patient analyses.

In the other part of the study; regarding to the finding that the structurally abnormal X within a cell is rather inactivated in a non-random fashion, the inactivation of the X chromosome have been analyzed in 10 Turner Syndrome patients having various types of structural abnormalities in their X chromosomes.

In the metaphases of four patients having chromosome constitution of 46,X,i (Xq) and one patients with a constitution of 45,X0/46 X,i (Xq) in 72% of the cells the iso-X is shown to be inactivated and stained differently without getting any bands. In the case

with 46, X (Xp-) the defective X is shown to be inactivated in 76% cells. Whereas in the case of 46, X (Xm), Xm stained in a uniform manner showing inactivation in 57% of the cells. In the cases with a karyotype 45, XO and 46, XX the percentage of unbanded X is found to be 73%. However, it is worth to note that in none of the cases the normal X is shown to be inactivated.

The findings of the study is compared with the previous work done in this field and found to be in great similarity.

## K A Y N A K L A R

- 1 - Aghamohammadi, S.Z., Savage, J.R.K. : Reverse harlequin staining for late replicating chromosome bands and regions. Clinical Cytogenetics Bulletin Vol. 2 No 3 Birmingham, 1989.
- 2 - Bader, S., Müller, O.J., Mukherjee, B.B.: Observations on chromosome duplication in cultured human leucocytes. Exp Cell Res 31:100-112, 1963.
- 3 - Başaran, N.: Tıbbi Genetik Ders Kitabı 3. baskı Bilim Teknik yayın evi Eskişehir 1985.
- 4 - Berkovitz, G., Stamberg, J., Platnick, L.P., Leres, R.: Turner Syndrome patients with a ring chromosome. Clin Genet 23:447-453, 1983.
- 5 - Bishop, A., Bishop, O.N.: Analysis of tritium-labelled Human chromosomes and sex chromatin . Nature 199: 930-932, 1963.
- 6 - Bishop, A., Leese, M., Blank, C.E.: The relative length and arm ratio of the human late replicating X chromosome J.Med.Genet 2:107-111, 1965.
- 7 - Boczkowski, K., Mikkelsen, M.: Fluorescence and autoradiographic studies in patients with Turner's Syndrome and 46, XXp- and 46, XXq- karyotypes : Journal of Medical Genetics. 10 : 350-355, 1973.

- 8 - Brown, C.J., Willard, H.F.: Localisation of a gene that escapes inactivation to the X chromosome proximal short arm Implications for X inactivation. Am. J. Hum. Genet 46:273-279, 1990.
- 9 - Caruthers, A.D., Delley, R., Deker, M., Boyd, E., Connor, M., Ellis, P.M., Stevensen, D.: An aetiological study of isochromosome -X Turner's Syndrome. Clin Genet. 36:53-58, 1989.
- 10 - Chapelle, A de la : 16. sex chromosome abnormalities. In: Every, A.E.N., Rimoin, D.L.: Principles and Practice of Medical Genetics. 1: Churchill Livingstone- 1983.
- 11 - Connor, J.M, Ferguson-Smith, M.A; Essential Medical Genetics Second Edition Blackwell Scientific Publications, 1987.
- 12 - Cooper, D.W.: Directed genetic change model for X chromosome inactivation in eutherian mammals . Nature 230: 292-4, 1974.
- 13 - Dar, H., Tal, J., Bar-el, H., Halpern, I., Sharf, M.: Paracentric inversion of Xq and ovarian dysfunction : Am.J.Med. Genet. 29: 167-170, 1988.
- 14 - Davidenkova, E.F., Verlinskaja, D.K., Mashkova, M.V.: Structural aberrations of the X chromosome in man. Hum Genet 41: 169-279, 1978.
- 15 - Davies, K.E., Mandel, J.L., Weissenbach, J., Fellows, M.: Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes, Cytogenet Cell Genet 46 : 277-325, 1987.

- 16 - Emery, A.E.H, Rimoin, D.L. Principles and Practice of Medical Genetics Vol. 1 Churchill Livingstone, 1983.
- 17 - Gartler, S.M., Sparkes, R.S.: The Lyon-Beutler hypothesis and isochromosome X patients with the Turner Syndrome . Lancet August 24, 1963.
- 18 - German, J.: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. Jour. Cell. Biol. 20:37-55, 1964.
- 19 - Gilbert, C.W., Muldal, S., Lajtha, L.G., Rowley J.: Time sequence of human chromosome duplication. Nature, 195: 869-873, 1962.
- 20 - Goodfellow, P.J., Mondello, C., Darling, S.M., Pym, B., Little, P., Goodfellow, P.N.: Absence of methylation of a CPG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85: 5605-5609, 1988.
- 21 - Goodfellow, P., Pym, B., Mohandas, T., Shapiro, L.J.: The cell surface antigen locus, MIC2 escapes X-inactivation. Am.J.Hum Genet 36:777-782, 1984.
- 22 - Gray, J.E.: Lyonisation of the X chromosome. Lancet, Nov 16, 1963.
- 23 - Haaf, T., Otto, G., Schmid, M.: Inhibition of condensation in the later replicating X chromosome induced by 5-azadeoxycytine in human lymphocyte cultures. Hum Genet 79:18-23, 1988.



- 24 - Hagemeyer, A., Hoovers, J., Hasper-Voogt, I., Von Ruhe-Zurcher, T., Bootsma, D.: Late-Replicating Ring X-Chromosomes identified by R-banding after BrdU pulse : Hum genet 34: 45-62, 1976.
- 25 - Hanefioğlu, S.: Bazı viral hastalıkların kromozomlara etkisinin çeşitli sitogenetik yöntemlerle incelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul, 1984.
- 26 - Harbison, M., Hassold, T., Koloryn, C., Jacobs, P.A.: Molecular studies of the parental origin and nature of human X isochromosomes. Cytogenet Cell Genet 47: 217-222 1988.
- 27 - Holliday, R.: A different kind of inheritance. Scientific American June 1989 P. 40,48.
- 28 - Jagiello, G.M., Tartravahi, U., Ducayer, M.B., Elanger, B.F.: Immunocytochemical evidence for methylation of the inactive X chromosome in human fetal oogonia. Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine 186: 223-228, 1987.
- 29 - Jones, K.L.: Smith's Recognizable Patterns of human malformation Fourth Edition. W.B. Saunders Company, 1988.
- 30 - Karube, T., Watanabe, S.: Analysis of the chromosomal DNA replication pattern using the Bromodeoxyuridine labelling method . Cancer Research 48: 219-222, 1988.
- 31 - Kato, H.: Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method . Nature 251:70-72, 1974.

- 32 - Kim, M.A., Johannsmann, R., Grzeschik, K.H.: Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosome . Cytogenet Cell Genet 15: 363-371, 1975.
- 33 - Latt, S.A.: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 (12) Part I :3395-3399,1973,
- 34 - Lüleci, G., Başaran, S., Bağcı, G., Keser, I.: Sitogenetik uygulama yöntemleri. Meteksan A.Ş. Ankara, 1990, sf 22-23.
- 35 - Lyon, M.F.: Gene action in the X-chromosome of the mouse Nature 190: 372-373, 1961.
- 36 - Lyon, M.F.: Possible mechanisms of X chromosome inactivation. Nature New Biol 232 : 229-232, 1971.
- 37 - Lyon, M.F., : The William Allen Memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. Am. J.Hum Genet 42: 008-016, 1988.
- 38 - Madan, K.: Balanced structural changes involving the human X : Effect on Sexual Phenotype . Hum Genet 63 : 216-221, 1983.
- 39 - Mandel, J.L., Willard, N.F., Nussbaum, R.L., Romeo, G., Puck, J.M., Davies, K.E.: Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome Cytogenet Cell Genet 51: 384-437, 1989.

- 40 - Mattei, M.G., Mattei J.F., Vidal, I., Graud, F.: Structural anomalies of the X chromosome and inactivation center. Hum Genet 56:401-408, 1981.
- 41 - Miller, O.J.; Dosage compensation in mammals : Why does a gene on the inactive X yield less product than one on the active X ? Hum Genet 69 : 97-101, 1985.
- 42 - Miller, O.R., Mukherjee, B.B., Bader, S., Christakos, A.C.: Autoradiographic studies of X-chromosome duplication in an XO/X-ïsochromosome X mosaic human female : Nature 200: 918-919, 1963.
- 43 - Miller, R.C., Aranson, M.M., Nichols, W.W.: Effects of treatment on differential staining of BrdU labelled metaphase chromosomes : three way differentiation of M3 chromosome. Chromosoma, 55: 1-11, 1976.
- 44 - Mohandas, T., Geller, R.L., Yer, P.H., Rosendorff, J., Bernstein, R., Yoshida A., Shapiro, L.J.: Cytogenetic and molecular studies on a recombinant human X chromosome : Implications for the spreading of X chromosome inactivation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 84: 4954-4958, 1987.
- 45 - Mohandas, T., Sparkes, R.S., Shapiro, L.J.: Reactivation of an inactive Human X chromosome : Evidence for X inactivation by DNA methylation. Science, 211: 393-396, 1981.
- 46 - Muldal, S., Gilbert, C.W., Lajtha, L.G., Lindsten, J., Rowley, J., Fraccaro, M.: Tritiated thymidine incorporation in an isochromosome for the long arm of the X chromosome in man The lancet, April 20: 861-865, 1963.

- 47 - Müller, U., Schempp, W.: Homologous early replication patterns of the distal short arms of prometaphasic X and Y chromosomes. Hum Genet, 60: 274-275, 1982.
- 48 - Ohno, S., Makino, S.: The single X nature of sex chromatin in man. Lancet 1:78-79, 1961.
- 49 - Polani, P.E., Angell, R., Gianelli, F., de la Chapelle, A., Race, R.R., Sanger, R.: Evidence that the Xq locus is inactivated in structurally abnormal X chromosomes: Nature Vol. 227 : 613-616, 1970.
- 50 - Polani, P.E.: Pairing of X and Y chromosomes, non-inactivation of X-linked genes and the maleness factor. Hum Genet 60 : 207-211, 1982.
- 51 - Priest, J.N., Heady, J.E., Priest, R.E.: Delayed onset of replication of human X chromosomes. J.Cell Biol. 35: 483-487, 1967.
- 52 - Riggs, A.D.: X Inactivation, differentiation, and DNA methylation. Cytogenet Cell Genet. 14: 9-25, 1975.
- 53 - Schempp, W., Meer, B.: Cytologic evidence for three human X-chromosomal segments escaping inactivation. Hum Genet 63: 171-174, 1983.
- 54 - Schneider-Gödicke, d., Beer-Romer, P., Brown, L.G., Nussbaum, R. Page D.C. ZFX has a gene structure similar to ZFY the putative human sex determinant and escapes X inactivation Cell, 57: 1247-58, 1989.
- 55 - Taft, P.D. Brooks, E.H.: Late labelling of iso -X chromosome : Lancet November 16 : 1069, 1963.

- 56 - Therman, E., Denniston, C., Sarto, G.E., Ulber, M.: X chromosome constitution and the human female phenotype. Hum Genet 54:133-143, 1980.
- 57 - Therman, E. XVIII, Human X chromosome. In : Therman E. Human chromosomes structure Behavior Effects. Springer-Verlag. New York 1986.
- 58 - Therman, E.: Mechanisms through which abnormal X-chromosome constitutions affect the phenotype. In : Cytogenetics of the mammalian X chromosome, Part B : X Chromosome anomalies and their clinical manifestations. pp 159-173. Alan R.Liss, Inc, New York 1983.
- 59 - Therman, E., Patau, K.: Abnormal X Chromosomes in man: origin, behavior and effects : Humangenetik 25: 1-16, 1974.
- 60 - Therman, E., Sarto, G.E., De Mars, R.I.: The Origin of telocentric chromosomes in man : a girl with tel (Xq). Hum Genet 57:104-107, 1981.
- 61 - Therman, E., Sarto, G.E.: Inactivation center on the Human X chromosome : Cytogenetics of the Mammalian X chromosome, Part A Basic Mechanisms of X chromosome behavior, pp. 315-325. Alan R.Lis. Inc., New York 1983.
- 62 - Therman, E., Sarto, G.E., Palmer, C.G., Kallio, H., Denniston, C.: Position of the Human X inactivation center on Xq. Hum. Genet. 50:59-64, 1979.

- 63 - Therman, E., Sarto, G., E., Patau, K.: Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq: A hypothesis. Chromosoma (Berl.) 44:361-366, 1974.
- 64 - Therman, E., XX. Structurally abnormal X chromosomes. In : Therman E. Human chromosomes structure, behavior, effects. Springer-Verlag. New York 1986, pp.182-193.
- 65 - Therman, E., Susman, B.: The similarity of phenotypic effects caused by Xp and Xq deletions in the human female : a hypothesis. Hum Genet 85:175-183, 1990.
- 66 - Vogel, F., Motulsky A.G., Human Genetics Problems and Approaches Second Ed. Springer-Verlag Berlin, 1986.
- 67 - Wyss, D., Delozier, C.D., Daniell, J., Engel, E.: Structural anomalies of the X chromosome : Personal observation and review of non-mosaic cases-Clinical Genetics. 21: 145-159, 1982.