



**SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA MSX1
GEN (SNP5) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

Serkan SEYRAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Serkan SEYRAN tarafından hazırlanan “SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA MSX1 GEN (SNP5) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Doç. Dr. Fatma Gökçe APAYDIN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serkan SEYRAN

17/07/2019

SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA MSX1 GEN
(SNP5) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Serkan SEYRAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Sendromsuz yarık dudak/damak (CL/P) malformasyonu en yaygın doğumsal defektlerden biridir. Hastalığın oluşumunda çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu literatürde mevcuttur. Daha önceki çalışmalar, MSX1 geni mutasyonlarının sendromsuz dudak ve/veya damak yarığının oluşumuna katkı sağladığını göstermektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, sendromsuz dudak damak yarığının ortaya çıkmasında aday gen olan MSX1 geninin SNP5 bölgesinin bazı mutasyon analizleri yapılarak, incelenen genin hastalığın oluşumu üzerindeki riskte etkili olup olmadığının ortaya konulması ve daha sonra yapılacak araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır. Bu araştırmada kullanılacak olan kan örnekleri, Ankara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi'ne başvuran sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastalardan elde edilmiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri, Fenol kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu yapılarak, PCR metodu uygulanmıştır. Elde edilen ürünlere RFLP metodu uygulanarak mutasyonlar belirlenmiş ve gen ürünlerinin kesimi gerçekleştirilmiştir. Enzim ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi yapılarak jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir. Sonuç olarak, MSX1 geninin SNP5 bölgesi belirlenmiştir. Bu bulgular, MSX1 geninin SNP5 polimorfizminin sendromsuz dudak damak yarığındaki rolünü Türk popülasyonunda desteklemektedir.

Bilim Kodu : 20315
Anahtar Kelimeler : Yarık dudak, yarık damak, sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı, MSX1 geni, mutasyon, polimorfizm, SNP5
Sayfa Adedi : 71
Danışman : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

MSX1 GENE (SNP5) POLIMORPHISM OF THE PATIENTS WITH NONSENDROMIC
CLEFT LIP AND PALATE IN TURKISH POPULATION

(M. Sc. Thesis)

Serkan SEYRAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Cleft lip and/or cleft palate is one of the most common congenital malformation. This abnormality arise both with the combination of genetic and environmental factors. Genetic factors are the genes like MSX1, which takes place during embryological development. In this study, we planned to evaluate the effect of the candidate gene and regions on the incidence of nonsyndromic cleft lip-palate by mutation analyses, therefore reveal the risks of the development of the nonsyndromic cleft lip-palate and contribute the oncoming studies. The blood samples used in our study, were obtained with signed voluntary consent forms from Turkish patients with nonsyndromic cleft lip/palate admitted to Ankara University Faculty of Dentistry. Genomic DNA was isolated with phenol-chloroform method from peripheral blood samples from the patients. Polymerase chain reaction method was used to determine SNP5 polymorphism on MSX1 gene. RFLP method was applied to the polymerase chain reaction products. Restriction Endonuclease enzymes were used to cut the gene into fragments to determine SNP5 mutation in the samples. These gene fragments were analyzed with 2% agarose gel electrophoresis and photos were taken in gel imaging device. In patients with nonsyndromic cleft lip/palate received the study group, SNP5 changes in MSX1 gene were revealed by molecular methods and the datas which were obtained were evaluated statistically. For statistical analysis, Pearson chi-square test and Hardy- Weinberg Equilibrium test were used. According to these tests, no significant difference was observed for SNP5 polymorphism in MSX1 gene.

Science Code : 20315

Key Words : Cleft lip,Cleft palate, non-syndromic cleftlip/palate,MSX1 gene,mutation,polymorphism,SNP5

Page Number : 71

Supervisor : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve bu tezin oluşturulmasında çok büyük emekleri olan, eğitimim süresince bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, titiz, disiplinli ve yenilikçi çalışmalarından dolayı yanında çalışmaktan onur duyduğum, hiç bir zaman sabır, özveri, destek ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, hayatım boyunca saygı ve sevgiyle anacağım, Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı hocalarından, değerli hocam, Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN'a, çalışmalarım sırasında bana destek olan ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve değerli çalışma arkadaşlarıma, her zaman olduğu gibi Yüksek Lisans eğitimim boyunca da yanımda olan, beni destekleyen ve yüreklendiren sevgili annem, Safure SEYRAN, sevgili eşim, Tuğba SEYRAN'a, sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. Dudak Damak Yarıkları	7
2.2. Dudak Damak Yarık Tipleri.....	8
2.3. CLP' yi Etkileyen Çevresel Faktörler.....	13
2.4. CLP'de Cleft Tipleri ve Aday Genler	14
2.5. Dudak ve Damagın Embriyolojik Gelişimi.....	18
2.6. Bazı Aday Genlerin Moleküler Patogenezi.....	20
2.6.1. IRF6 geninin patogenezi	21
2.6.2. MAFB geninin patogenezi	21
2.6.3. ABCA4 geninin patogenezi	22
2.6.4. WNT geninin patogenezi	22
3. MSX1 GENİ.....	25
3.1. Gen-Gen Etkileşimi.....	31
4. MATERYAL METOD	35
4.1. Materyal	35
4.2. Metod	35

	Sayfa
4.2.1. Fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu	35
4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PCR).....	37
4.2.3. Restriksiyon endonükleazla kesim.....	38
4.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	38
4.2.5. İstatiksel analiz.....	40
5. BULGULAR	43
6. TARTIŞMA.....	51
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	71

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. CLP’de cleft tipleri, sendrom ve aday genler.....	14
Çizelge 2.2. Dudak damak yarığını tetikleyen genler ve lokusları.....	16
Çizelge 2.3. Dudak-Damak yarıklarını etkileyen aday genler ve lokusları.....	17
Çizelge 2.4. Hastalığın bazı ülkelerde görülme oranları	18
Çizelge 2.5. Bas ve yüz gelişiminde rol oynayan faktörler	19
Çizelge 3.1. MSX1 geni üzerindeki önemli mutasyonlardan bir kısmı.....	30
Çizelge 3.2. MSX1 haploitinin oral yarıklar ile ilişkisi.....	31
Çizelge 4.1. MSX1 Geni SNP5 polimorfizmi istatistiksel analiz sonuçları.....	41
Çizelge 5.1. MSX1 Geni kontrol grubu alel analizi	43
Çizelge 5.2. MSX1 gen SNP5 bölgesi pcr ve enzim sonuçları	45
Çizelge 5.3. SNP4 ve SNP5 analizleri.....	49

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Friedmen ve arkadaşlarının geliştirdikleri sınıflandırma.....	9
Şekil 2.2. Dudak damak yarıkları sınıflandırmasında saat diyagramı yöntemi.....	10
Şekil 2.3. Çeşitli tiplerde dudak damak yarıklarının şematik çizimleri.....	11
Şekil 2.4. Cleft tipleri.....	12
Şekil 2.5. Dudak ve damak gelişimi	20
Şekil 3.1. Bazı sendromlu-sendromsuz yarıklanmaların ve MSX1 gen üzerindeki genetik mutasyonların çeşitleri ve yerleri.....	26
Şekil 3.2. MSX1 geni şemasal genel görünümü.....	27
Şekil 3.3. MSX1 geninin sitogenetik lokasyonu.....	27
Şekil 3.4. MSX1 geninin organizasyonu.	27
Şekil 3.5. MSX1 gen özellikleri.....	28
Şekil 3.6. MSX1 geni üzerinde baz çifti konumlarına göre SNP 'lerin yerleşimi.....	28
Şekil 3.7. MSX1 genindeki SNP' lerin yerleşim yerleri.....	29
Şekil 3.8. Bugüne kadar tanımlanmış Msx1 genotip-fenotip korelasyonları, etkileşimleri ve mutasyonları.....	32
Şekil 3.9. Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri tarafından yürütülen sinyalizasyon	33
Şekil 4.1. PCR zincir reaksiyon şemasal görünüm.	37
Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforezi şemasal görünüm.	39
Şekil 4.3. MSX1 hasta ve kontrol grupları arasında SNP5 polimorfizmleri	42
Şekil 4.4. Hasta ve kontrol frupları arasında G ve T oranları	42
Şekil 5.1. SNP5 mutant kesim ve baz çifti sayısı gösterir şema.	48

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Yarık damak dudak görüntüleri.....	7
Resim 4.1. İzole edilen DNA.....	36
Resim 4.2. Agaroz jel UV transillüminatör görünüm.....	40
Resim 5.1. MSX1 SNP5 PCR görüntüsü.	50
Resim 5.2. MSX1 SNP5 restriksiyon kesim.....	50



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
AHR	Aryl-hydrocarbon receptor
ASRNA	Anti-sense rubonükleikasit
ALK5	Activin receptor-like kinaz 5
BMP6	Bone morphogenic protein 6
BZD'S	Benzodiazepines
CL	Yarık dudak
CL/P	Yarık dudak ve/veya damak
CP	Yarık damak
CPI	Yarık damak izole
CPO	Sadece yarık damak
dNTP	Nükleotid karışımı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FOXE1	Forhead box E1
GABRB3	γ -ami-nobutyric acid receptor subunit β 3
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MSX1	Muscle segment homeobox 1
NSCLP	Nonsendromik (sendromsuz) dudak-damak yarığı
OFC	Yarık dudak-damak
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTC	Patched homolog 1
PVRL1	Paliovirüs receptor-releated1
RBC	Red blood cell (kırmızı kan hücresi)
RE	Restriksiyon enzim
RFLP	Restriksiyon enzim uzunluk polimorfizmleri
SATB2	SATB family member 2
SDS	Sodyum dodesil sülfat

Kısaltmalar	Açıklama
SNP	Tek nükleotit değişimi
SRNA	Sense-Rubonükleikasit
STE	Sodyum Chloride-Tris-EDTA buffer
TBE	Tris-borate-acid buffer
TBP	TATA bağlayıcı protein
TE	Tris- EDTA buffer
TBX22	T-box 22
TGFα	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü beta
VAX1	Ventral anterior homebox1
YD	Yarık dudak
YDA	Sadece yarık damak
YDD	Yarık dudak/damak

1. GİRİŞ

Canlı doğumların 1.2/1000'si gibi bir oranla CLP, ağız yüz gelişimindeki aksaklıklar arasında ilk sıralarda yer alır. CLP, üst çene kemiği ve ağız tavanını oluşturan yumuşak doku ve kemik dokuları oluşturan embriyonik uzantıların birleşmemesi veya yetersiz birleşmesi sonucu ortaya çıkar. CLP'ye sebebiyet veren gelişimsel anomaliler gebeliğin 4-12 haftalarında etkisini göstermektedirler [1-4]. Sendromik olmayan yarık damak dudak (NSCLP) kusurları da önemli ölçüde konjenital yani doğumsal yaygın bir anomali olarak tanımlanırlar. NSCLP olan bireylerde kromozomlar üzerinde ki gen lokasyonları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. NSCLP' ye etki eden genetik etmenler üzerinde yapılan çalışmalar NSCLP hakkında ki bir dolu soruya hala yeterli cevabı verememiştir. Birkaç aday gen ve bölgelerin haritalandırılması ile ilgili çalışmalar hastalık hakkında parametrik ve parametrik olmayan yaklaşımlar ortaya atmıştır [5].

Yarık damak ve/veya dudak (CLP) normal bir yüz yapısındaki gözle görülebilir kusurlardır. Gelişmiş ülkelerde CLP önemli bir ölüm sebebi değildir. CLP, çocuklarda psikolojik rahatsızlıklara sebep olduğu gibi ailelere de finansal bir yüküdür [6]. CLP 'li bireylerin konuşma, duyma, yeme ve toplumsal kaynaşmaları çeşitli tedaviler ile çözülebilir. Bu tedaviler ameliyatlara, diş tedavileri, konuşma terapileri ve psiko-sosyal tedaviler şeklinde çeşitlenebilir [7]. Duarte GA ve arkadaşları 2016 yılında yarık damak ve dudaklı çocuklarda beslenme metotları sistemik bir çalışma yaparak hastalığa bu açıdan ışık tutmaya çalışmıştır.

Ağız yüz yarıklarının oluşumunda çevresel faktörler ile özellikle etkili genlerin önemli faktörler olduğu gözlemlenmiştir. Klinik uzmanları ve bilim insanları ağız yüz bozukluklarının genetik ve genetik olmayan sebeplerini tespit etmeye çalıştıkları gibi genetik ve çevresel etmenlerin birbiri ile ilişkilerini, mekanizmalarını anlamaya çalışmışlardır. Bu mekanizmaların anlaşılmasıyla; ağız yüz yarıklanmaları bozukluğunun önlenmesi konusunda başarılı olunacağı açıktır. Bu bağlamda son çalışmalarda yapılan model sistemlerle ağız yüz yarıklanmalarına ışık tutmuşlar. Bu çalışmaları yapan literatür sahipleri Dixon ve arkadaşları 2011 de, Ghulb ve Chung 2014'te, Jarillof ve Harris 2008'de, Petryck ve arkadaşları 2015'te, Roessler ve arkadaşları 2010'da, Van Der Linde ve arkadaşları 2011'de, Wilde ve arkadaşları 2014'te. Örneğin Tang ve arkadaşları,

2015'te; Zeiger, Beaty, ve Liang, 2005'te ebeveyn sigara kullanımının özel gen bölgeleriyle ilişkisini irdemişlerdir. Hutter, Kingdom ve Jaeggi, 2010'da hipoksianın gen ile çevresel etmenlerin etkileşim açısından araştırmasını yapmışlardır.

Gilbert-Barness, 2010' da; Mead ve Sarkar, 2014' te alkol (etanol) bir insan teratojeni olarak tanımlandı. Downing, Balderrama-Durbin, Broncucia, Gilliam, ve Johnson, 2009' da; Hong ve Krauss, 2012' de; Lipinski, Godin, O'leary-Moore, Parnell, ve Sulik, 2010'da; O'Connor, Steeds, Wisemanb ve Pavlath, 2008'de Fetüs ebeveynlerinin madde kullanımı bebeğin davranışsal ve anatomik bozulmaların, doğumsal anormalliklerin ek olarak çeşitli ağız yüz defeklerinin ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu... Ayrıca yapılan çalışmalar bir teratojen ajanı olarak alkol doğumsal anomalilerin ortaya çıkmasında multifaktöriyal bir komponent olarak ortaya çıktığını fareler üzerinde yaptıkları araştırmalarda tespit etmişlerdir.

Folik asitin biyolojik aktif formu olan tetrahidrofolat vitamin, insan hücrelerinin bütünü için çok önemli bir vitamindir. Bu vitaminin ana fonksiyonu; pürinler, thimidilate biosentezleri ve S-adenosilmetionin sentezleri gibi önemli ana biyokimyasal süreçlerde etkin olup carbon ünitelerinin transferi için bileşiklerin parçalanmasıdır. Folatların günlük diyetle eksik alınması ya da düzensizlik metabolizmada doğumsal rahatsızlıkların oluşmasına sebep olabilir. Epidemiyolojik çalışmalar gösteriyor ki folik asidin tek ya da multivitaminler şeklinde hastalık daha oluşmadan alınması nöral tüpte gelişen rahatsızlıkları önemli ölçüde azaltacaktır. Kadınların özellikle gebe kaldıklarından itibaren günlük folik asit zengini diyetleri ile nöral tüp rahatsızlıkları ve buna bağlı doğumsal hastalıkları hakkında eğitim verilmesi "The National Primary Prevention Program of Neural Tube Defects" kapsamında Polanya' da uygulanmaya alınmıştır [8].

Son yıllarda gen çerçevesinde yapılan çalışmalarla CLP hakkında bilinmeyen bazı bilgilere ulaşılmış. Teknolojik ilerlemeler ve multidisipliner çalışmalar gen haritalandırma çalışmalarında kapsamlı sonuçların alınmasını sağlamıştır. Böylece yarılmalara sebep olduğu düşünülen gen adayları tanımlamaları mümkün olmaya başlamıştır. 2009'da Birnbaum ve arkadaşları ardından 2010'da Beaty ve arkadaşları yine 2010'da Mangold ve arkadaşları bu neviden çalışmalar yapmışlardır. D. Mehrotra 2015' te farklı genlerin farklı populasyonlarda SNP analizlerini yaparak bu hastalığın genler ile ilişkisini araştırmış ve bu alanda birçok çalışma yapılmasının gerekliliğini vurgulamıştır.

Son yıllarda farklı popülasyonlarda farklı aday genlerin etkisi kontrol grupları oluşturularak tespit edilmiş aynı zamanda genlerin sekans analizleri ve SNP'ler (single nükleotit proteinler) rapor edilmiştir. Bu aday genler arasında MSX1, TGF β , RUNX2, TGFA, BCL3, IRF6 gibi aday genler sayılabilir. Carinci ve arkadaşları 2000 yılında ardından Murray 2002 yılında bazı genlerin CLP ile ilişkilerini tespit edecek parametrik ve parametrik olmayan veriler kaydettikleri görülmüştür. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu karfkasya popülasyonu üzerinde yapılmıştır. Son zamanlarda farklı etnik gruplar üzerinde de birçok çalışma yapılmış bunlardan bazıları Wyszynski ve arkadaşları Meksika'da, Kanno ve arkadaşları Japonya'da, Marazita ve arkadaşları Çin'de, Schultz ve arkadaşları Filipinler'de, Moreno ve arkadaşları Kolombiya'da yaptıkları çalışmalardır. Akira Nakajima ve arkadaşları 2018'de yaptıkları çalışmada transforming büyüme faktör (TGF- β) ifadesi patogenezi içeren gelişmede önemli etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır. TGF- β ; β 1, β 2, β 3 olan 3 isoforma sahiptir. Bunların arasında TGF- β 3 orta uçurum epitel (MEE) oluşumunda güçlü sinyal yolağına sahiptir. Buna ek olarak kemik morfojenetik proteinlerini içeren gelişim düzenleme mekanizmalarında diğer moleküller; FGFs, Wnt, Ephrins and extra cellar matrix components diye adlandırılan moleküllerdir [9].

Victoria Tallón-Walton 2014'te Avrupa popülasyonu üzerinde PAX9 ve MSX1 geni üzerinde çalışmalar yapmıştır. 2017'de Nature Communication tarafından yayınlanan NSCLP hakkında bütün dünyada yapılan genetik çalışmalar ile bulunmuş 14 yeni lokus ve genetik heterojenliği irdelemiş ayrıca farklı etnik gruplarda bu hastalığı ağız yüz yarıklarının alt fenotipi olan NSCLP ile ilişkilendirerek genetik yapının etkilerine ışık tutmuştur. Alana Aylward ve arkadaşları 2016'da Kızılderili ırk üzerinde yaptıkları çalışmalar ile bütün exomlar ile NSCLP penetransını ilişkilendirerek geniş kapsamlı bir çalışma ortaya koymuşlar ve NSCLP ile ilişkili gen çalışmalarının devam etmesi gereğini dillendirmişlerdir. Kachin Wattanawong ve arkadaşları 2016 yılında IRF6 ve 8q24 polimorfizleri üzerinde sistemik meta analizleri yaparak bu gen lokusunun NSCLP hakkında farklı etkilerini ve olası genetik modellemeyi yaparak bu gen bölgesi ile NSCLP arasındaki ilişkiyi anlamaya çalışmışlardır. Bu çalışmalar ile NSCLP ile ilişkili gen bölgelerini, bugüne kadar açık bir şekilde belirleyen bir görüş öne sürülememiştir.

Son yıllarda fare ve insanların her ikisinde yapılan çalışmalarda kranio-fasyal gelişimde MSX1 geni güçlü bir aday gen olarak karşımıza çıkmaktadır. Satokata ve Maas 1994'te Kaartinen ve arkadaşlarının da 1995'te fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda MSX1

alellerinin ifadesizliği nazal, perietal, frontal kemiklerde anormalliklere sebebiyet verdiklerini gözlemlemişlerdir ve bu deneklerin diş eksiklikleri meydana gelmiştir. Bu bulgular MSX1 geninin kranio-fasyal gelişimde epitelyal ve mezenşimal hücrelerin etkileşiminde anahtar rol aldığını göstermiştir. 2018 de Jia Liang ve arkadaşları homeodomain (HD) DNA ilişkisi hatası olan MSX1 geninin yapısal parçasındaki mutasyonların diş kayıplarıyla ve sendromik ve sendromik olmayan fenotiplerin ortaya çıkmasıyla güçlü bir ilişkisi olduğunu gözlemlemişler. MSX1 mutasyonlarının ciddi diş kayıplarına çok ciddi ağız, yüz, diş bozuklukları olan fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olduğunu ortaya atarak bu genin bu araştırmada ne denli önemli olduğunu ve araştırılması gerekliliğini bize ihsas etmiştir.

MSX1 geni ile NSCLP arasındaki ilişkiyi tespit eden çalışmalardan Şili popülasyonu üzerinde J. Souza ve arkadaşlarının MSX1 gen çalışmaları bu genin NSCLP ile bağıntısını kayda değer bir frekansta ortaya koymuştur. MSX1 geni üzerinde SNP'lerin (single nükleotit poliformizm) NSCLP üzerindeki etkisini ortaya koyan Na Young Kim ve arkadaşlarının 2012 de nihayete ulaştıkları Kore popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmadır. Paradowska ve arkadaşları, Sylvia Alappat ve arkadaşları da Msx1 geni üzerinde çalışma yapmıştır. Venkatesh BabuGurramkonda ve arkadaşları 2015'te Güney Hindistan popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada MSX1 geni üzerinde SNP'nin NSCLP ile ilişkisini tespit etmeyi amaçlamıştır. Tao Song ve arkadaşları 2013'te IRF6, MSX1 ve PAX9 üzerindeki SNP analizlerini yaparak SNP polimorfizminin hastalık ile ilişkisini irdelemişlerdir.

Ülkemizde bu konu ile ilgili yapılan bazı yapılan çalışmalar da mevcuttur; Taştan ve arkadaşlarının NSCLP ve MSX1 gen üzerinde yaptığı çalışmalar yeni araştırmalar için bir öncü niteliği taşımaktadır. Ceyhan ve arkadaşları 2014'te Türk çocukları üzerinde non-sendromik diş kayıpları ve dişe ait anomalileri MSX1 geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar ile tanımlamayı amaçlamışlardır.

Yapılan literatür araştırmalarında görüldüğü gibi MSX1 gen mutasyonları ve özellikle MSX1 gen SNP5 poliformizm üzerine dünya çapında çok az sayıda araştırma yapılmış ve ülkemizde bu çalışma, bir ilk niteliğindedir. Buradan hareketle Türk popülasyonunda SNP5 poliformizminin dudak damak yarıklı hastalardaki insidansı belirlenerek, dudak damak yarıklığının genetik temelleri ile ilişkilendirilmesi tezin planlanış hedeflerindedir.

MSX1 geni SNP5 poliformizinin kalıtsal genetik hastalığının ortaya çıkışındaki rolü; çalışmanın tedavi boyutuna katkı sağlaması açısından örnek olduğu düşünülmektedir.





2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Dudak Damak Yarıkları

Yarık dudak damak, konjenital bir doğumsal anomali olan dudak ve damak yarıkları üst çene kemiği ve ağız tavanını oluşturan yumuşak doku ve kemik dokularını oluşturan embriyonik uzantıların yetersiz birleşmesiyle defekt meydana gelir. Dudak yarıklarına neden olan gelişimsel anomaliler gebeliğin 4-7. haftalarında, damak yarıklarına neden olan gelişimsel anomaliler ise gebeliğin 7-12 haftalarında belirtilerini göstermeye başlar [10].

Dudak damak yarıklarının etiolojisinde annenin hamileliğinin ilk üç ayında geçirdiği enfeksiyon, toksisite, kötü beslenme, hormonal düzensizlikler, tetratojenik ajanların kullanımı gibi genetik olmayan veya tek mutant genler ile ilişkili ve Trisomy 13 gibi bazı kromozomal sendromlarla ilişkili genetik faktörler etken olarak sayılabilir. Sendromik hasta grubunda sıklıkla yarık bölgesi dışında anatomik organ anomalileri ve mental retardasyon tabloya eşlik eder. Yarık dudak ve damak (CLP) hastalarının büyük bölümünde (%85) etioloji, sendromlarla bağlantılı değildir. Sendromsuz CLP konjenital (doğuştan) bozuklukların en yaygın sınıflarından birini temsil eder [11].



Resim 2.1. Yarık damak dudak görüntüleri.

2.2. Dudak Damak Yarık Tipleri

Anomalilerin embriyolojik kökenini temel alan sınıflandırmaya göre, CLP hastaları, 3 kategoriye ayrılır.

Yarık dudak ve alveol (primer damak)

Yarık sert ve yumuşak damak (sekonder damak)

1 ve 2'nin kombinasyonu (primer ve sekonder damak)

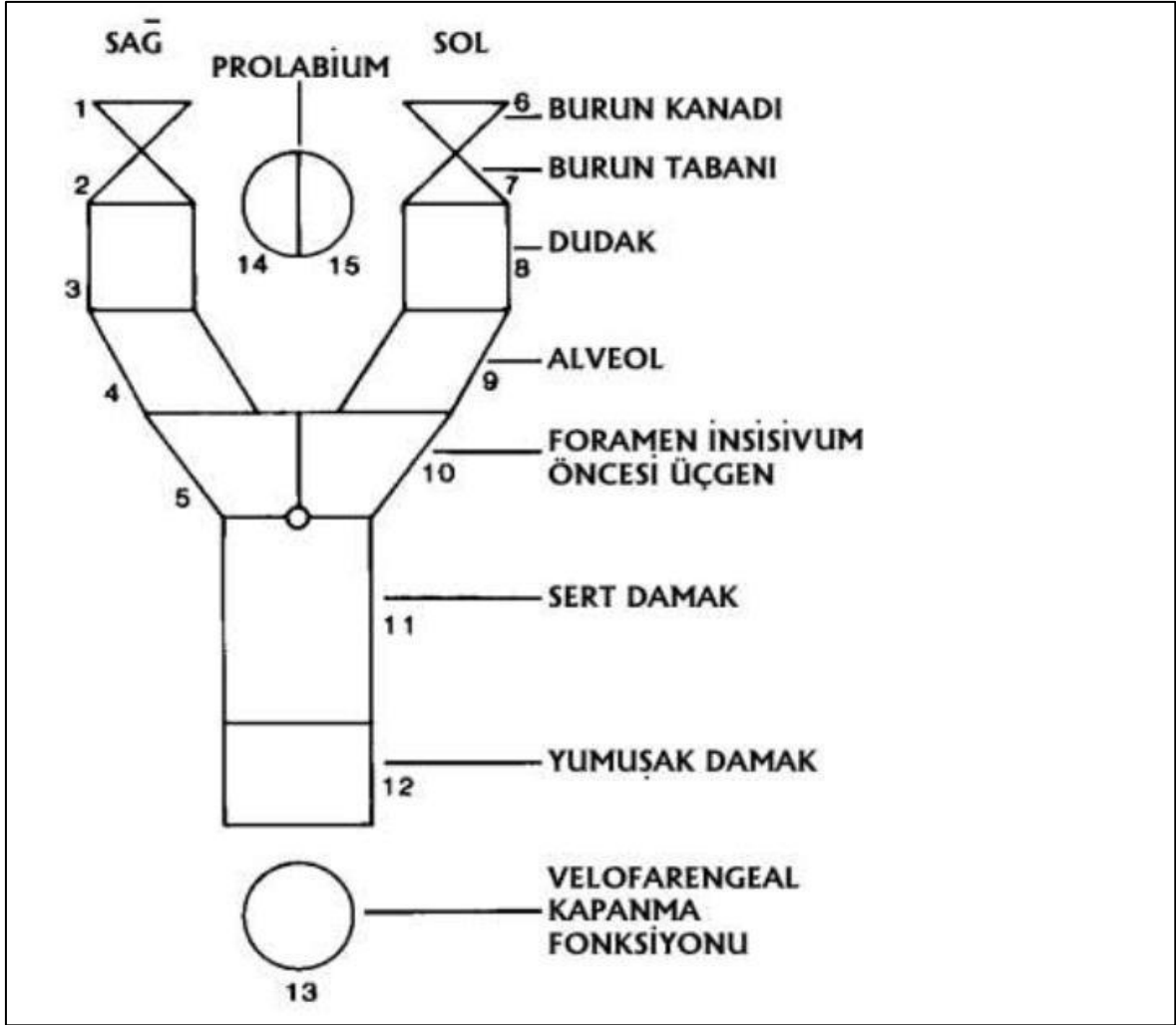
Buna ek olarak CLP, tek veya çift taraflı olarak da sınıflandırılabilir.

Orofasiyal yarık sınıflandırmalarından embriyolojik temele dayandırılmış olarak geliştirilmiş sınıflandırma olan Kernahan ve Stark (1958) sınıflandırma tipine göre yarık tipleri;

Sadece Primer damak yarıkları: damağın ön kısmı olan, primer damakta dolayısı ile dudak kısmında da mezenşim hücrelerinin kaynaşamamasından oluşan yarık tipidir.

Sadece sekonder damak yarıkları: damağın ön kısmı olan, sekonder damakta ki mezenşim hücrelerinin kendi aralarında ve nazal septumdaki mezenşim hücreleri ile kaynaşamamasından oluşan yarık tipidir [11].

Primer ve sekonder damak yarıkları: damağın hem primer hem de sekonder kısmında, dudağı da içine alarak nazal septum hücreleri ile kaynaşamamasından oluşan yarık tipidir [12].

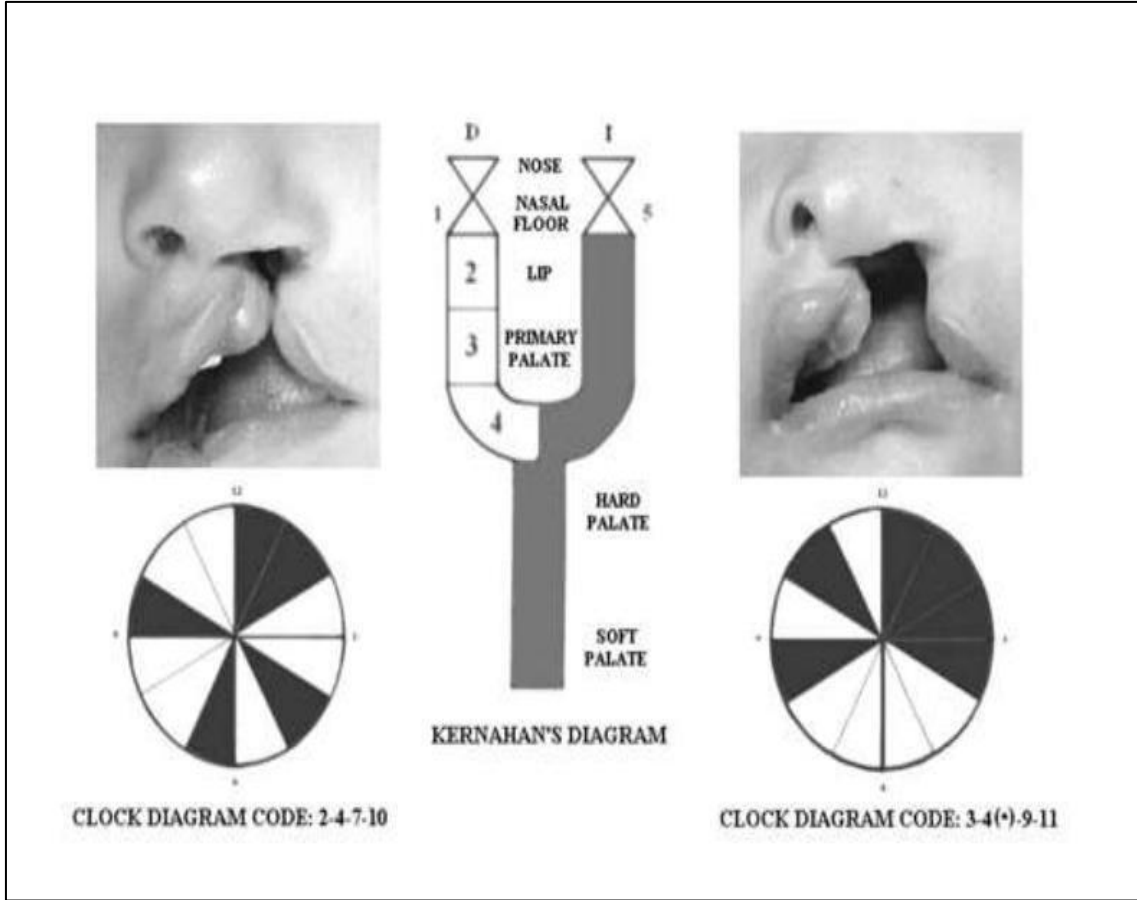


Şekil 2.1. Friedmen ve arkadaşlarının geliştirdikleri sınıflandırma [13,14]

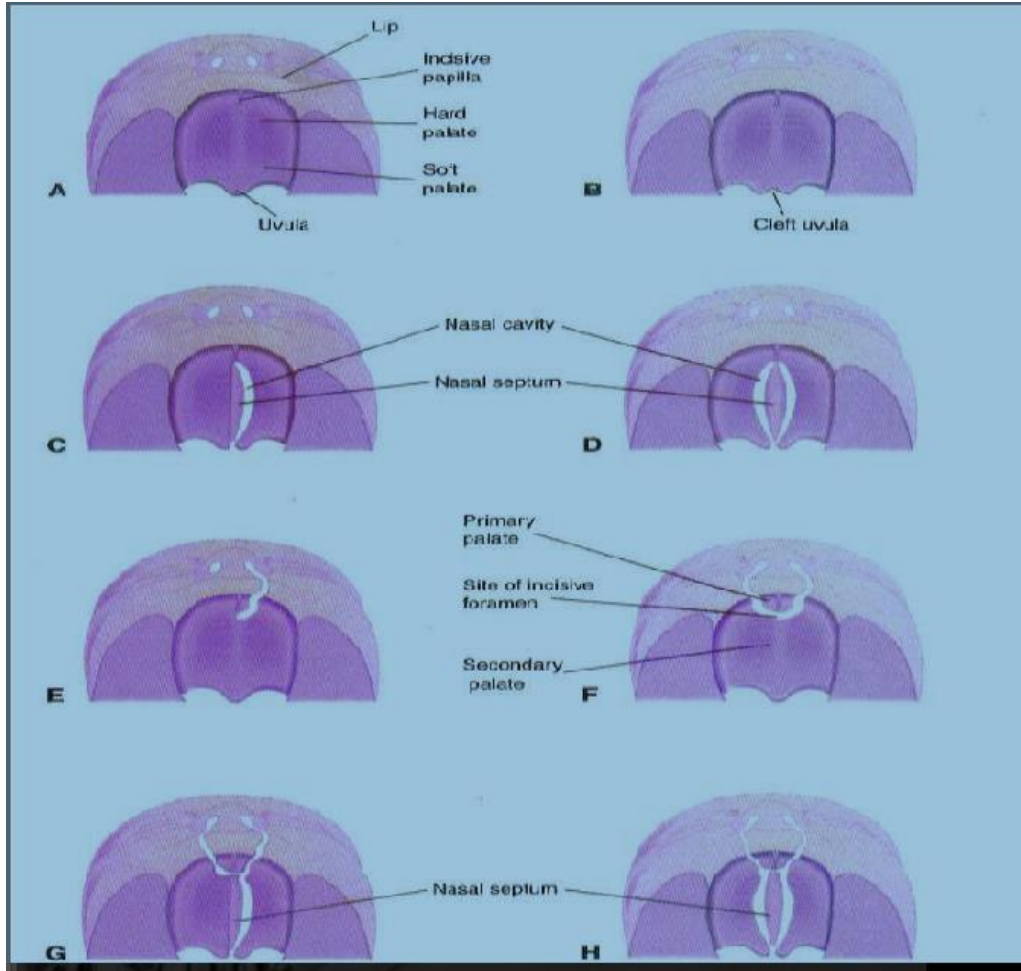
Düzensizliği, klinik olarak, doğuştan meydana gelen anomalilerin varlığını baz alarak yapılan sınıflandırmaya göre;

- Sendromsuz (nonsendromik, izole) dudak damak yarıkları
- Sendromik dudak damak yarıkları olarak da sınıflandırılabilir.

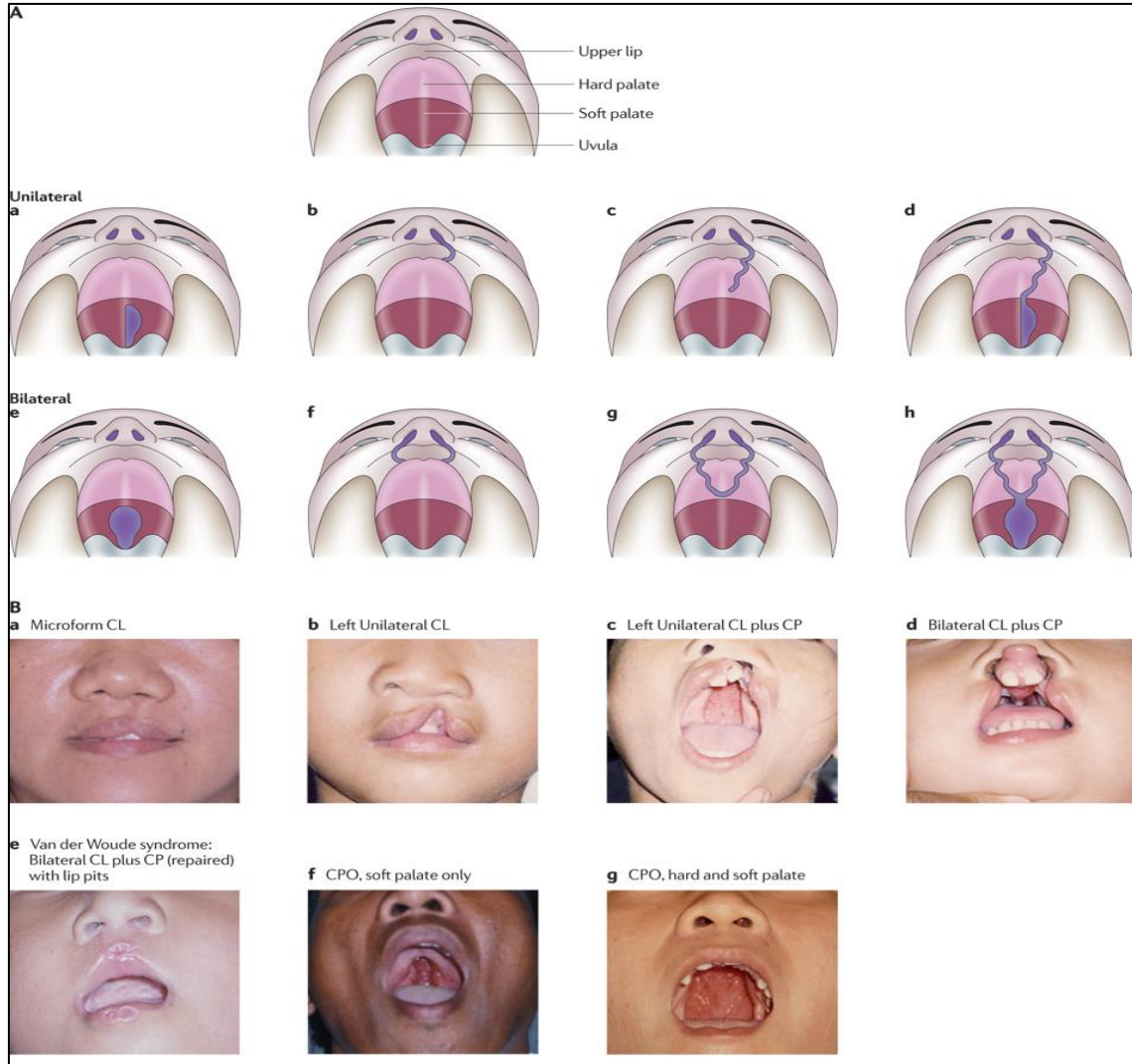
Sendromsuz ifadesi ise, dudak ve/veya damak yarıklarından etkilenmiş bireylerin fiziksel ve gelişimsel olarak başka bir anomaliye sahip olmaması ile ifade edilmektedir [13].



Şekil 2.2. Son yıllarda ise, Percy Rossell-Pery (2009), dudak damak yarıkları sınıflandırmasında saat diyagramı yöntemine göre sınıflandırma yapmıştır. Saat diyagramı ağız kısımlarının iz düşümü şeklinde planlanarak bu ağız kısımlarındaki yarıklanmalar koyu renkle gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Çeşitli tiplerde dudak damak yarıklarının şematik çizimleri görülmektedir. A, normal damak dudak . B, yarık uvula. C, tek taraflı posterior yu da sekonder damak yarığı. D, iki taraflı posterior damak yarığı. E, tam tek taraflı dudak yarığı ve anterior ya da primer damağın tek taraflı yarığı ile birlikte tam tek taraflı alveolar çıkıntıların yarığı. G, tam iki taraflı alveolar çıkıntı yarıkları [14].



Şekil 2.4. Cleft tipleri

a-c, Van der Woude sendromu

d, tek taraflı cleft

e, dudaya ulaşmamış lateral olmayan cleft

f, sendromlu yarıklanmalar(Smith-Lemli-Opitz sendrom)

g, holoprocencephaly orta hat cleft

h, bilateral CLP TGIF mutasyon durumu

2.3. CLP' yi Etkileyen Çevresel Faktörler

Çevresel komponentler cleftler üzerinde yapılan genetik çalışmalar ile çevre gen ilişkisinin yüksek oranlara ulaştığını göstermiştir. Bununla ilgili yapılan çalışmalara Danimarka, Norveç ve Yarık damak\dudak hastalığını önleme çalışmaları yapan Birleşmiş Milletlerde bulmak mümkündür [14-17]. Bununla birlikte bu çalışmaların çoğu araştırma aşamındadır. Çevresel faktörlerin kişisel genetik yapı ile ilişkisini tanımlamak ve kişinin bu çevresel etmenlere karşı toleransını belirlemek için bir multidisipliner bir çalışma gerektiği ortadadır [18].

Sigara kullanan annelerde hastalığın görülme oranı hastalığa yakalananlar arasında yaklaşık 1.3\100 gibi bir oran olduğu yapılan meta-analizler ile sigara kullanımının hastalıkla güçlü ilişkisini teyit eder derecededir [19-21]. Sigara kullanımı boyunca CLP gelişimi sırasında metabolik yollarda rol aldığı düşünülen olası genlerin yapısında bozunumlar meydana gelmesi risk faktörlerini artıracaktır. Sigara kullanımı, özellikle glutation S-transferaz teta (GSTT1) ya da nitrik oksit sentez 3 (NOS3) gibi CL/P'yi etkileyen genlerin markırlarına etkisi ortaya çıkmıştır [22,23-25]. GSTT1 markırları, bu duyarlılıkların altında yatan detoksifike yollarında eksiklikleri olan gen silme varyantlarıdır. Son olarak sigara içmenin IRF6 gen86 ve risk varyantlarının birleşme yeri ile ilişkilendirilmiş. Aynı çalışmalarla multivitaminler ve IRF6 varyantları arasında etkileşimler rapor edildi. Bu bulgular, gen-çevre etkileşiminin CL/P için önemli olduğu hususunda önemli kanıtlar sağlar. Buna ek olarak bazı spesifik tetratojenler örneğin valporik asitin CL/P ile ilişkili olduğu asite maruz kalanlarda sonuç olarak ortaya çıkmıştır [26].

Ebeveynlerin alkol tüketimine maruz kalması bir risk faktörü olarak önerilebilmektedir fakat tam olarak CLP'yi etkilediği kanıtıyla bağdaşmamaktadır [27]. Çalışmalar kısa zamanda yüksek dozda alkol kullanımının riski artırdığı önerilmiştir ve alkol dehidrojenaz gen (ADH1C) varyasyonları ile ilişkilendirilmesi ile bu durum desteklenir [28,29].

Folat eksikliği gibi besinsel faktörler CL/P risk faktörü olarak önerilmektedir. Gözlemsel çalışmalar ve tedaviler sırasında folat desteği kullanarak önleyici bir müdahale olarak önerilmiştir [30]. Bazı düzenli klinik müdahaleler gösteriyor ki folik asit kullanımı nöral tüp defektlerini (NTD) özellikle erken embriyolojik gelişimde önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir [31]. Bütün beslenme ve çevresel faktörler sendromik olmayan NL/P'yi

etkilediği ancak bu etmenlerin arasında en etkili olan ise folik asit olduğu görülmüştür [32]. Bununla birlikte besin güçlendirme programı kapsamında folik asit kullanımıyla farkedilebilir derecede yarıklanmalarda azalma olduğu görülmüştür [33-36]. Gelecekte folik asitin CL/P üzerine etkisi yapılacak çalışmalarla daha net şekilde aydınlanacaktır.

Olası etiyolojik faktörler arasında, A grubu ve B vitamin eksiklikleri gösterilmiştir. Deformitesi bulunan bebeklerin annelerinin %25'inde B grubu vitamin eksiklikleri gözlemlenmiştir. Bir başka etiyolojik faktör de oligohidramniyozdur. Oligohidramniyoz, bebeğin anne karnında yüzdüğü amniyon sıvısının miktarının normalin altında olduğu durumun adıdır. Steroid ilaçlar, antikonvülzan ilaçlar, diyazepam ve aminopterin de deney hayvanlarında YDD deformitesi meydana getirmiştir. Bazı ipuçları göstermektedir ki, fenitoin ve diyazepam insan embriolarında YDD meydana getirmektedir [37].

2.4. CLP'DE Cleft Tipleri , Sendrom ve Aday Genler

Çizelge 2.1. CLP'de cleft tipleri, sendrom ve aday genler [38-88].

cleft tipleri	Sendrom	Gen
Cleft lip +/- cleft palate	Otozomal dominant gelişim aksaklığı	<i>ACTB</i>
	Ailevi gastrit kanser ve CLP	<i>CDH1</i>
	Craniofrontasal	<i>EFNB1</i>
	Roberts	<i>ESCO2</i>
	Holoprosencephaly	<i>GLI2</i>
	Oro-facial-digital	<i>GLI3</i>
	Hidroletalus	<i>HYLS1</i>
	Van der Woude/ popliteal pterygium	<i>IRF6</i>
	X-zihinsel gerilemeye bağlı ve CLP	<i>PHF8</i>
	Gorlin	<i>PTCH1</i>
	CLP-ektodermal displazy	<i>PVRL1</i>
	Holoprosencephaly	<i>SHH</i>
	Holoprosencephaly	<i>SLX3</i>
	Branşiy-oculo-facial	<i>TFAP2A</i>
	Holoprosencephaly	<i>TGIF</i>
	Ektrodaktil-ektodermal displazy-yarıklanma	<i>TP73L</i>
	Ankyloblepharon-ektodermal displazy-clefting	<i>TP73L</i>
Tetra-amelia ile CLP	<i>WNT3</i>	
Sadece Cleft palate	Oculofaciocardiodental	<i>BCOR</i>
	CHARGE	<i>CHD7</i>
	Letal ve escobar multiple pterygium	<i>CHRNA</i>
	Stikler tipl	<i>COL2A1</i>

Çizelge 2.1. (devam) CLP'de cleft tipleri, sendrom ve aday genler [38-88]

	Stikler tip 2	<i>COL11A1</i>
	Stikler tip 3	<i>COL11A2</i>
	Dezmoterolzis	<i>DHCR24</i>
	Smith-lemli-opitz	<i>DHCR7</i>
	Miller	<i>DHODH</i>
	Craniofrontonasal	<i>EFNB1</i>
	Kallmann	<i>FGFR1</i>
	Crouzon	<i>FGFR2</i>
	Apert	<i>FGFR2</i>
	Otopalatodigital tip 1 ve 2	<i>FLNA</i>
	Larsen sendromu; atelosteogenez	<i>FLNB</i>
	Kalıtsal lemfodema-distikhiyasiz	<i>FOXC2</i>
	Bamforth-Lazarus	<i>FOXE1</i>
	Orofacial-digital	<i>GLI3</i>
	Van der Woude/ popliteal pterygium	<i>IRF6</i>
	Andersen	<i>KCNJ2</i>
	Kabuki	<i>MLL2</i>
	Cornelia de Lange	<i>NIPBL</i>
	X-zeka yavaşlamasına bağlı	<i>PQBP1</i>
	İzole olmuş cleft damak	<i>SATB2</i>
	Diastrofik displazya	<i>SLC26A2</i>
	Campomelik displazya	<i>SOX9</i>
	Pierre Robin	<i>SOX9</i>
	diGEorge	<i>TBX1</i>
	X-damak yarıklanmasına bağlı ve ankyloglossia	<i>TBX22</i>
	Teacher collins	<i>TCOF1</i>
	Loeys-dietz	<i>TGFBR1</i>
	Loeys-dietz	<i>TGFBR2</i>
	Seathre-chotzen	<i>TWIST1</i>
orta hat Cleft lip	Opitz G/BBB	<i>MIDI</i>
	Oro-facial-digital tip 1	<i>OFD1</i>

Çizelge 2.2. Dudak damak yarığını tetikleyen genler ve lokusları [89-91]

LOKUS	GENLER
19q13.2	BCL3
17q21.1	RARA
4p16	MSX1(OFC 5)
2p13	TGFA
14q24	TGFB3
1q32.3-q41	IRF6 (OFC 6)
1p36	MTHFR
11q23.3	PVRL1
1q41	TGFB2
15q11	GABRB3
2q33	SUMO1 (OFC 10)
3q28	TP73L (OFC 8)
6p24-p23	OFC 1
2p13	OFC 2
19q13	OFC 3
1q21-q31	OFC 4
13q33.1-q37	OFC 9
19q13	CLPTM1

Çizelge 2.3. Dudak-Damak yarıklarını etkileyen aday genler ve lokusları [89-91]

LOKUS	ADAY GENLER
9q22	FOXE1
2q14	GLI2
14q11.2	ISGF3G
14q32	JAG2
5q34-q35	MSX2
8p23.1-21.3	NAT1
8q22.2	OSR2
3q27-q29	P63
14q12-q13	PAX9
2q32-q33	SATB2
1p36.3	SKI
4q28.1	SPRY1
13q22.2	SPRY2
22q11.21	TBX1
11q13.1	TBX10
19q13.2	TGFB1
9q22	TGFBR1

Çizelge 2.4. Hastalığın bazı ülkelerde görülme oranları

Hastalığın bazı ülkelerde görülme oranları
Amerika yerlileri: 3.74/1000
Asya: 2.02/1000
Japonya: 0.82/1000-3.36/1000
Kore: 1.81/1000
Çin: 1.45/1000-4.04/1000
Kafkasya: 1.43/1000 -1.86/1000
Latin Amerika: 1.04/1000
Afrika: 0.18/1000-1.67/1000
Finlandiya: 1/1000
Kuzey-doğu Fransa: 0,41/1000
İtalya: 0.34/1000
Türkiye: 1/1000
ABD: 1/600-1000

2.5. Dudak ve Damagın Embriyolojik Gelişimi

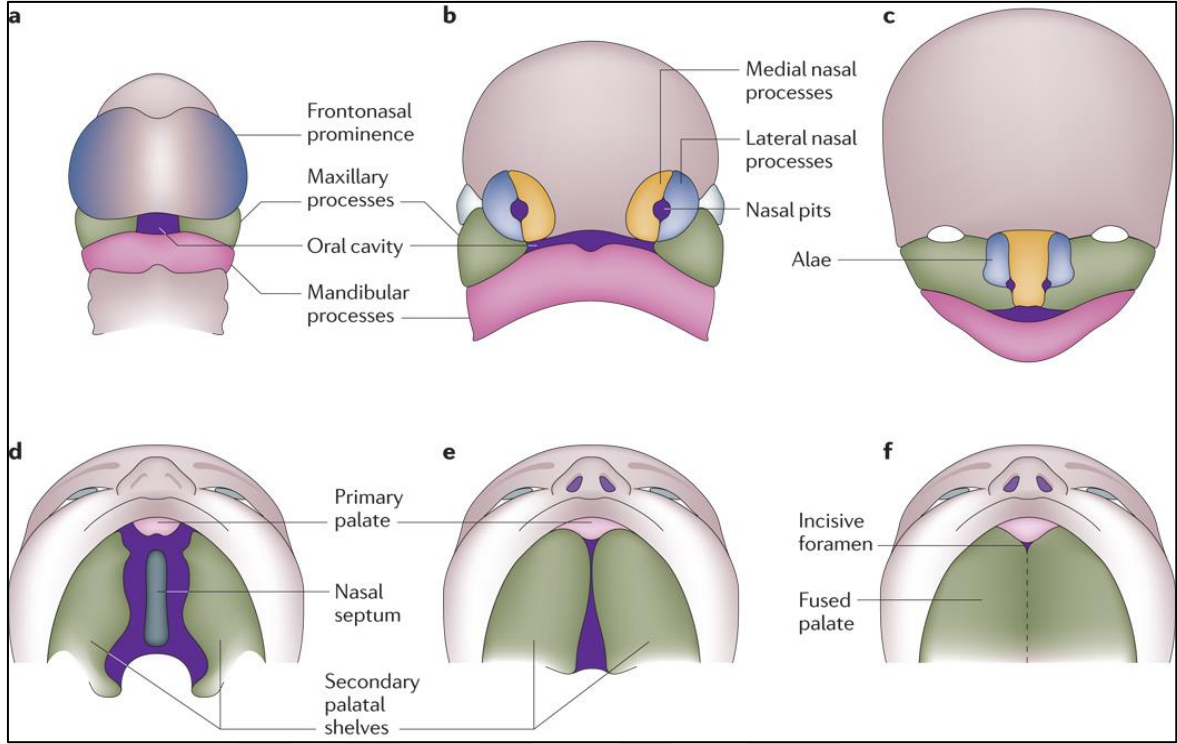
Bas ve yüz gelişimi, birçok sinyal iletim sistemini, büyüme faktörleri ve onların reseptörlerini, transkripsiyon faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks komponentlerini içine alan oldukça karmaşık bir metabolik gelişim sistemidir

Çizelge 2.5. Bas ve yüz gelişiminde rol oynayan faktörler (Stainer ve Moore 2004)

Sinyal Yolakları	Shh, Bmp2, Bmp4, Bmp7, Wnt5a, Smad2-4
Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri	Egf, Egfr, Tgf, Fgf2, Fgf8, Fgf1, Fgf1r, Fgf2r
Transkripsiyon Faktörleri Hücre Adezyon Molekülleri	Ap2, Dlx1-6, Gli2-3, Hoxa2, Irf6, Lhx8, Pax9, Pitx2, Prx1, Msx1, Tbx1, Tbx22 Pvr11, Conn43, E- Kadherin
Ekstrasellüler Matriks	Col2A1, Col11A1, Col11A2, Mmp2-3, Mmp9, Mmp13, Timp1-3, Fibronektin

Jirasek ve arkadaşlarının 2004'te yaptıkları çalışmada; embriyonik yaşamın ilk haftalarında anterior nöral tüpün dorsalinden köken alan nöral krest hücreleri mezensim hücreleri ile yüz taslağını (fasiyal primordia) oluşturmak üzere birleşirler. Fasiyal primordia oluşum safhasında, ön tarafta (anterior) nöropodun kapanmasından önce oral plaka çevresinde takip eden yapılar yer almaya baslar. Başın orta noktası, stomedium kapanırken, oral membrana rostral ve notokordal plakanın eklendiği bölgedir. Göz veziküllerinin çukurları belirgindir. Yanlardaki göz kadehleri, olfaktori hücreleri stomedium çevresine doğru, prosensefalonun ön bölgesinden göç eder ve oral membran tarafından kapatılır.

Erken embriyonik safhada anterior nöropod kapatılır, oral membran kaybolur ve olfaktori (koku alma ile ilgili) plakodlar belirgin değildir. Pentagonal stomedium göz kadehleri, maksillar ve mandibular merkezler, ilk farengial arklar ve ektodermle kaplı ön beyin şekillenir.



Şekil 2.5. Dudak ve damak gelişimi

İnsanda dudak ve damak gelişiminin şematik gösterimi. (a) embriyonun 4. Haftasına kadar ön nasal prominens, maksillar süreç, oral yolun belirmesi ve mandibular süreç. (b) 5. Haftasında nasal yapılar (yanal, orta kısım ve yollarının) gelişimi. (c) 6. Haftanın sonunda nasal yapıların üst dudak ve maksiler yapılarla birleşmesi (d). 6. Hafta boyunca embriyogenez sonucu sekonder olarak oluşan vertikal yönlü damak. (e) damak yapısının horizontal gelişimi. (f) damak yapısının tamamen oluşumu [92].

2.6. Bazı Aday Genlerin Moleküler Patogenezi

Genom çerçevesindeki çalışmalar CLP'de tanımlanmış bilgilerin sayısını artırırken, bu çalışmaların daha çok ilerlemesi ve hastalığa sebep olan çeşitli etkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Hayvan modelleri ve gen ifade verisi, karmaşık kişisel özellikler için aday genlerin tanımlanmasına yardımcı olacak güçlü bir araçtır; en önemlisi onlar, bizim normal yüz gelişiminin ve CLP'nin moleküler patogenezinin bilgilerini edinmemize katkıda bulunacaklar. Fare, insan craniofacial gelişimini yansıtan türlerin içinde en önemlisidir ve farelerde CLP yüksek oranda görülen bir durumdur. Fare, insanların CLP moleküler patogenezinin anlaşılmasında etkilidir [93,94].

2.6.1. IRF6 geninin patogenezi

İnterferon düzenleyici unsur 6(IRF6) üzerindeki mutasyonlar, CLPde sadece dişe ait anomaliler ve dudak hasarlarını içerebilen otozomal dominant Van der Woude sendromunda etiyolojik olarak tanımlanan mutasyonlardır. Yeni araştırmalar gösterdi ki IRF6 alelleri non-sendromik CLP ile de ilişkilidir [95]. Bu ilişki çoğu aday gen çalışmalarından bağımsız değildir. Son olarak sadece non-sendromik CLP için hayvan modelleri üzerinde bir enhancer bölgesinde konuşlanmış 10 kb uzunluğunda özel farklı bir sekans(rs642961) tanınmasını sonuç veren biyokimyasal analizler yapılmıştır. En önemlisi transkripsiyon unsuru AP-2 α için tutunma bölgesinde risk alelinin başladığı yer tespit edilmiştir ki otozomal dominant CLP düzensizliği olan bronşiyolo-ocula-facial sendrom mutasyonu önemlidir [96,97].

CLP'de IRF6'nın rolü hayvan modellerinin analizi ile daha fazla desteklenmelidir. Son araştırmalar gösterdiği farede IRF6 mutasyonu, ağız eğimini durdurabilen ve yarık damakla sonuçlanabilen multiple epitelyal adezyonu yönlendiren istenmeyen terminal farklılaşma hatası olan hiper-proliferative epidermisi gerçekleştirir [98,99]. Bu sonuçlar, IRF6'nın keratinosit proliferasyonu/farklılaşmasının nasıl olacağını veya olup olmayacağını belirleyen bir anahtar olduğunu gösterir ve daha sonra gelen araştırmalar IRF6'nın, uygun damak adezyonunun oluşmasında gerekli olan spatio-temporal düzenleyicisi olduğunu ve oral periderm şekillenmesinde anahtar rol oynadığını ortaya çıkarmaktadır. Son olarak fare genetiğinin bir bileşkesi, ifade analizleri, kromatin immünopresipitation ve luciferaz habercileri altın bir işaret olarak CLP içeren altında doğru şekillenmeyen ciddi sendromlar barındıran IRF6 p63'ün direk hedefidir. p63, sadece yarık dudaklılığa duyarlılığı artıran varyasyon olan bir enhancer yolu ile IRF6'yı etkinleştirir.

2.6.2. MAFB geninin patogenezi

MAFB geni ana lörin tutturucu transkripsiyon unsurunu kodlar. MAFB yakını markırlar, GENEVA cleft ortak çalışma içinde genom çerçevesinde tespit edilmiş ve asya kökenli insanların istatistiksel verileri önemli katkılar sağlamıştır. Bağımsız replikasyon deneklerinde Avrupa atasal üyelerin 1149 tanesinde SNP ile ilişki ve bağlantının kanıtları görüldü ki Asya aileleri arasında en güçlü sinyal ürünü snp 260 bp olarak lokalize olmuştur. MAFB'de anlamsız bir mutasyon olan H131Q Filipinlerde %3,5 kontrol

gruplarında %0,07 oranında gözlenmiştir. Bölgede bu farklı oluşumlar ve güçlü şekilde korunmuş bu sekans oranları MAFB'da nadir farklılıklar olabildiğini sunar ki MAFB GWAS sinyallerinin gözlemlenmesine büyük katkı sağlar. Damak gelişiminde rol alan transkripsiyon unsurları (MSX, IRF, SOX ve BACH gen ailesi) olarak bilinen MAFB içinde sayısız tutunma bölgelerinin her iki tarafındaki zayıf gen bölgeleri alışılmışın dışındadır. Farede MAFB ifadesi, damak hattının epitelyumunda kuvvetli olduğu ve damaksal fusion boyunca orta epitelyum cukurlanmasında etkili olduğu görülmüştür.

2.6.3 ABCA4 geninin patogenezi

ABCA4 ATP yumağı bandın taşıyıcısını kodlar. ABCA4 ve 3lü sonun multiple markırları, GENEVA cleft GWA çalışmasında genom çerçevesinde önemli seviyelere ulaşılmasında önemli imkanlar sağlamıştır, Asyalı grup arasında çok kuvvetli verileri bize sunmuştur. Bağımsız aile gruplarında güçlü sinyalleri ile SNP'lerden 2 tanesi replike edilmiş ve bu SNP'lerden biri (rs560426) asya aileleri (p=0.0003 331 denekte) Avrupa aileleri ile karşılaştırıldığında çok az tespit edilmiştir (p=0.005 1149 denekte). Bu farklılıklar ya yaygın alellerin 2 grupta farklı olması ile açıklanır ya da farklı haploit arka planda oluşan multiple risk alellerin varlığıyla açıklanır. ABCA4' ün, otozomal resesiv retinal dejeneratif hastalık olan Stargrad hastalığına sebep olduğu bilinir ve diğer oküler düzensizlikler ya da Stargrad hastalığında daha önce tespit edilen çoğu anlamsız 27 farklı mutasyon görülmüştür. Bu mutasyonlar 190 CLP'de ABCA4' ün 50 eksonunda sekans edilmiştir. ABCA4 diğer birçok genle çerçeveslendiğinden ABCA4' ün üst nokta sinyalleri yanındaki bir genin etiyolojik farklılıkları ile etkileşebilir. Dahası damak oluşumu boyunca faredeki damak tabakalarında hiç ABCA4 ifadesi görülmemiştir [100,101].

2.6.4. WNT geninin patogenezi

Genom çerçevesinde yapılan çalışmalara henüz girmemesine rağmen WNT genleri içindeki varyantların non-sendromik CLP ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir ve WNT3'teki mutasyonlar CLP ile birlikte otozomal çekinik özellikteki ekstremite yokluğuna (tetra-amelia) sebep verdiği görülmüştür [102,103]. WNT sinyalinin non-sendromik CLP'de etkisinin olduğu bilgisi güçlü değildir. Bu bulgular normal dudak-damak gelişimi için aday genler içine Wnt sinyal yolağının analizinin de ilave edilmesine sebebiyet vermiştir. Wnt9b işaretli mutasyonu farelerde CLP'ye sebep olmuştur ve A/WySn türü fare Wnt9b geninin

aşğı yönünde 6.6 kb'lık retrotranspozon eklentisine sahiptir ki bu kısım *clfl* lokusu olarak bilinir. Bu bulgular *Wnt9b* geninin dudak gelişiminde anahtar rol oynadığı bilgisini bize sunar. Bu hipotezi destekleyen başka bir gözlem de farede orta hat yüz morfogenezinde doğal Wnt sinyal yolağının aktive olmasıdır ve ayrıca Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bir ko-reseptörünün ve lipoprotein reseptör bağlantılı protein 6'nın (*Lrp6*) düşük yoğunlukta inaktivasyonu CLP'ye sebebiyet verir. Merak uyandırıcı bir şekilde *Msx1* ve *Msx2*, dudak şekillenmesinde ve dudak yapılarının birleşmesinde bu Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aşğı yönlü düzeylerde olduğunu göstermiştir [104-108].



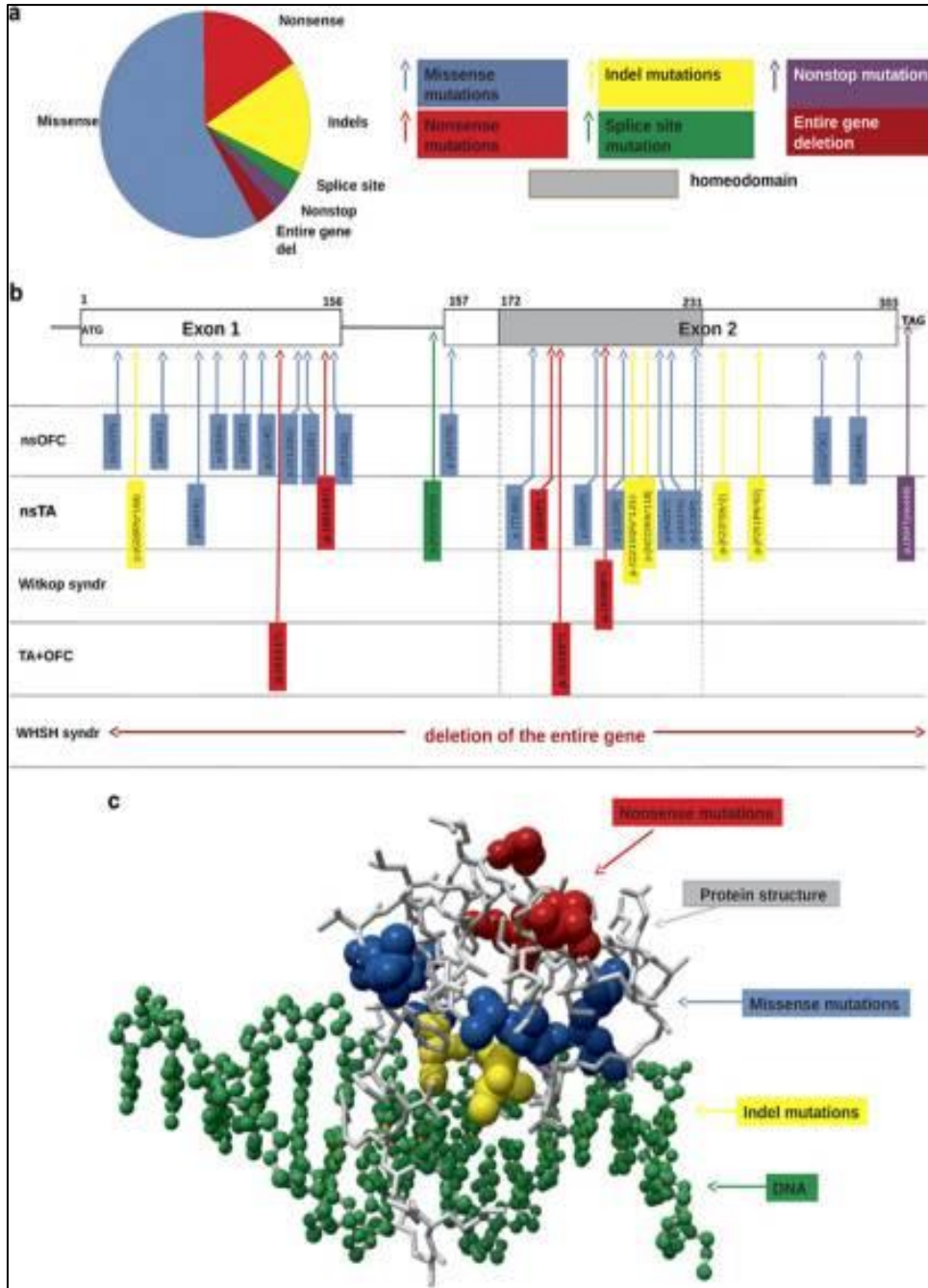


3. MSX1 Geni

MSX1 geninin literatürdeki adı 'msh homebox 1' olarak geçer. MSX1 geni diğer genlerin aktivitelerini kontrol eden bir protein ifadesi için bilgiler kodlar. MSX1 geni homebox genlerinin içinde büyük bir alanı işgal eder ki MSX1 geni çoğu vücut yapısının gelişimdeki şeklini kontrol eden bir homebox genidir. Özellikle diş ve diğer çene yapılarının gelişiminde önemli bir genidir. Aynı zamanda da parmak ve tırnak yapılarının gelişiminde de etkili olabilir olduğu tartışılmaktadır.

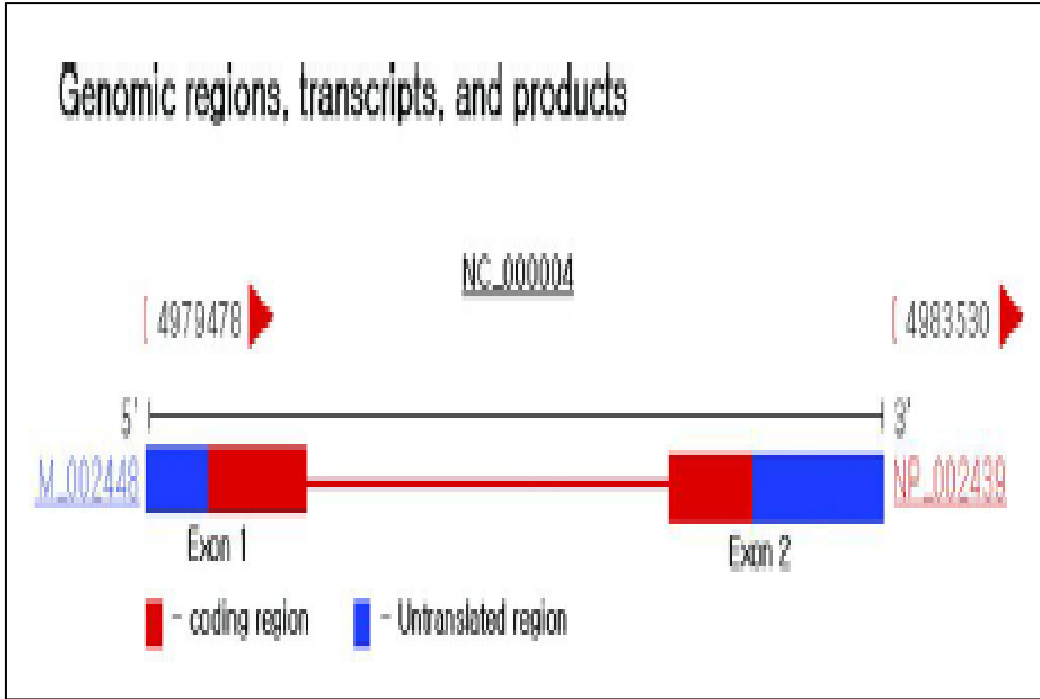
Wolf-Hirschhorn sendromu MSX1 geni ile ilişkilidir. Bu sendroma sahip insanlarda tipik olarak silinen kromozom 4 bölgesinin dışında yerleşmesine rağmen MSX1 geninin genelde silindiği görülür. MSX1 geninin kaybı özellikle ağız ve diş gelişiminde ifadesi olan diğer birkaç genin düzenleyici etkisini büyük olasılıkla engeller. Araştırmacılar MSX1 geninin silinmesinin diş kaybı ve diğer dental anormalliklerin oluşumuna etkisinin olduğuna, ağız yapılarının biçimlerinin gelişimini sekteye uğrattığına inanmaktadır. MSX1 geninin kaybı aynı zamanda Wolf-Hirschhorn sendromlu hastalarda ağız çatısında açılmaya (cleft palate) ve/veya üst dudak yarıklanmasına (cleft lip) sebep olur.

Omurgalı cranio-fasial yapıların gelişimini, epitel ve mesenşimal gelişimi içeren süreçleri multiple etkileşim yoluyla bir seri transkripsiyon faktörler etkiler [109]. Transkripsiyon faktörler arasında olan Msx homeobox gen ailesinin üyeleri Drosophila msh (muscle segment homeobox) ile ilişkilidir [110]. İnsanlarda MSX gen ailesi, kısmi model örtüşen embriyonik ağız-yüz bölgesini ifade eden MSX1 ve MSX2 olarak iki üyeden oluşur [111]. Bir transkripsiyonal resepsör olarak MSX1 damak ve diş embriyonik oluşumunda hayati öneme sahiptir [112]. Buna ek olarak tümör baskılayıcı olarak ve sinir sistemi gelişimine katılarak dudak şekillenmesinde rol oynar [113,114]. İnsanlarda MSX1 varyantları NSCLP (non_syndromic cleft lift palate) ve sendromik olmayan diş kayıpları şeklinde çok çeşitli fenotipler gösterir. Witkop sendromunda farelerde homozigot MSX 1 gen silinmesi yarı damak ve diş gelişim bozuklukları olarak görülür[115]. Çekirdek aile tabanlı ve kontrol grubu üzerinde yapılan çalışmalarda MSX1 insan yarıklanmalarında rol aldığı ve 10 dan fazla MSX1 varyantının CL/P ile ilişkisinde gösterilmiştir[116-119]. Ağız-yüz yarıklanmalarının etiolojisinde %2 oranında MSX1 varyantlarının etkili olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir[120,121].

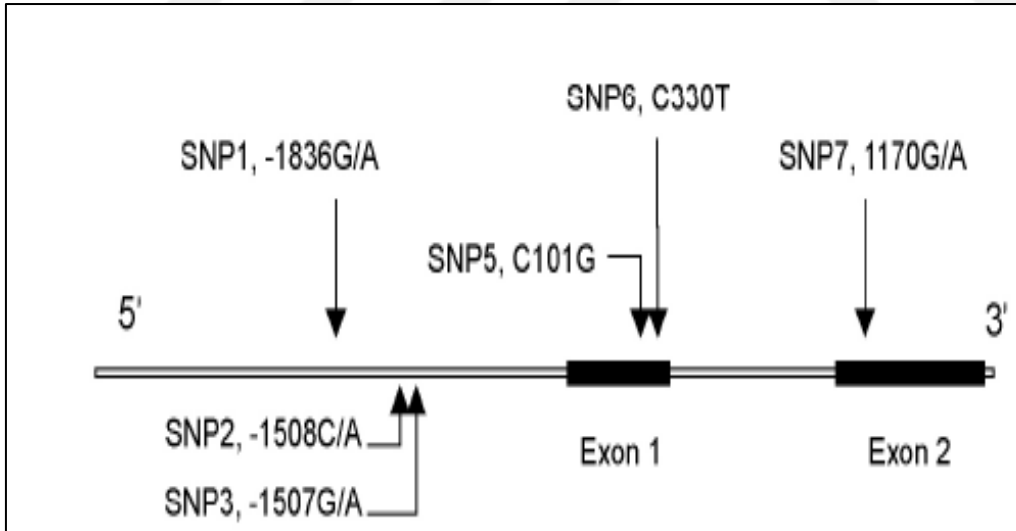


Şekil 3.1. Bazı sendromlu-sendromsuz yarıklanmaların ve MSX1 gen üzerindeki genetik mutasyonların çeşitleri ve yerleri tespit edilerek hastalıkla ilişkileri gösterilmektedir [122].

Bmp4 gibi büyüme faktörü düzenleyicisi yoluyla memelilerde primer damak gelişim embriyogenezinde MSX1 geninin etkisi olduğu gösterilmesine rağmen hala MSX1 geninin bu palatogeneze tam olarak rolü ve diğer düzenleyici faktörlerin palatogeneze etkisi geniş bir şekilde bilinmemektedir [123].

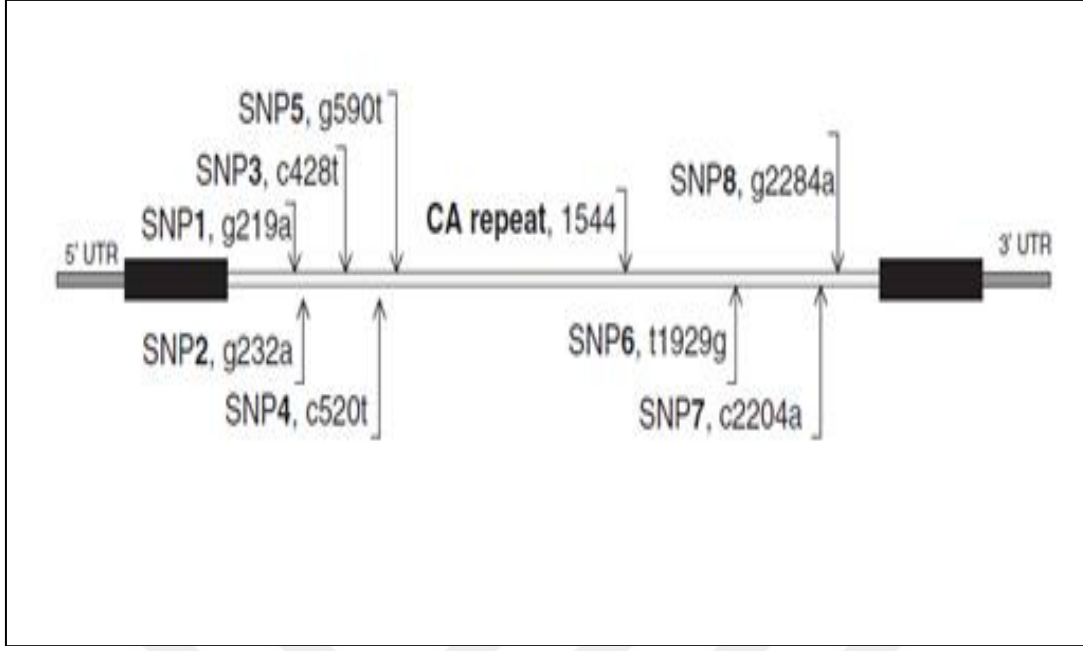


Şekil 3.5. MSX1 gen özellikleri; kırmızı kısım kodlanan bölge, mavi translate edilmeyen bölge 5`-3` yönünde ekzon 1 ve ekzon 2 kısımları şemada gösterilmiştir.



Şekil 3.6. MSX1 geni üzerinde baz çifti konumlarına göre SNP 'lerin yerleşimi

MSX1 üzerinde 8 tane SNP (single nücleotid polymorphism) tanımlanmıştır. SNP'lerin MSX1 geni üzerindeki yerleşimi şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 3.7. MSX1 genindeki SNP' lerin yerleşim yerleri. Yerleşim yeri baz çiftlerinin pozisyonuna, intronun başlangıcındaki ilk nükleotide göre etiketlenmiştir.

Çizelge 3.1. MSX1 geni üzerindeki önemli mutasyonlardan bir kısmı (O.D.: otozomal . dominant)

Amino Asit Değişimi	Nükleotit Değişimi	Mutasyon Tipi	Fenotip
G16D	G47A	Missense	Bilinen etkisi Yok
A30A	C90A	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi Yok
A34G	C101G	Missense	Bilinen etkisi yok
E78V	A233T	Missense	İzole DDY
V80V	G240A	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok
S105X	C314A	Nonsense	DDY/oligodonti
G110G	C330T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok
V114G	T341G	Missense	İzole DDY
G116E	G347A	Missense	İzole DDY
L118L	C354T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok
R151S	G453T	Missense	İzole DDY
P278S	C832T	Missense	İzole DDY
S202X	C605A	Nonsense	Witkop Sendromu
A275A	C825T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok
G267C	G799T	Missense	İzole DDY

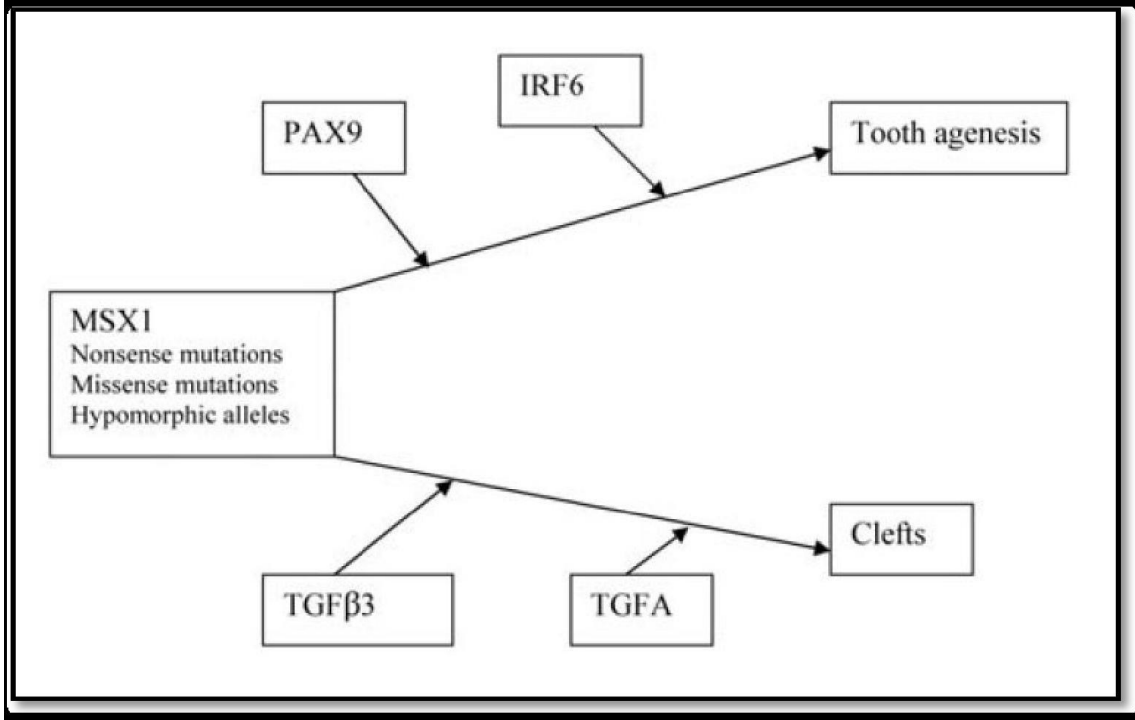
Çizelge 3.2. MSX1 haploitinin oral yarıklar ile ilişkisi. SNP alel frekansları ve ebebeynler arasında Hardy-Weinberg denge testi. Bu testle elde edilen verilerden yararlanılarak CLP’de MSX1 haploitinin etkisi gözlemlenmiştir

Marker	Allele	Frequency	No. of chromosomes	Heterozygosity	HWE P-value
SNP 1	G	0.813	588	0.300	0.785
SNP 2	T	0.356	584	0.418	0.128
SNP 3	T	0.044	566	0.081	0.528
SNP 4	T	0.042	568	0.085	0.457
SNP 5	G	0.625	562	0.438	0.264
STR	4	0.632	682	0.455	0.673
SNP 6	T	0.275	578	0.356	0.071
SNP 7	C	0.841	584	0.264	0.795
SNP 8	G	0.228	584	0.339	0.537

3.1. Gen-Gen Etkileşimi

Yarıklara yol açan gen-gen etkileşiminin istatistiksel kanıtları MSX1 (transkripsiyon represörü) ve TGFβ3 (hücre farklılaşmasında dahil) [127] için ve MSX1 ve TGFA (büyüme faktörü) (P=0,04) [128] için bildirilmiştir. Vieira ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; bir veya 169 baz çifti allellerinin birkaçına sahip olan probandların (ailede genetik olarak etkilenmiş ilk vaka) olduğu Güney Amerika popülasyonundaki ailelerde MSX1 ve TGFβ3 duyarlılık allelleri arasında bir etkileşim olabileceğini düşündüren, TGFβ3 (P=0,05) ile iletim bozulma sna kanıtlar bulunmaktadır [127]. Diş agenezisi ile ilgili çalışmalar, yarık dudak ve damak ile ilişkili olabilecek olası etkileşimleri önermiştir. Vieira ve arkadaşları öncelikli premolar agenezin FGFR1(Fibroblast büyüme faktörü1) (P=0,014) ve IRF6 (P=0,002) markerları ile olan ilişkisini göstermişlerdir. Aynı zamanda IRF6 ve MSX1 (P=0,001), IRF6 ve TGFA (P=0,03) arasındaki etkileşimlerin istatistiksel kanıtları da bildirilmiştir [129]. MSX1 ve PAX9 mutasyonları, insan diş agenezinin formlarında gösterilmiştir. Vieira ve arkadaşları etnik çeşitlilik gösteren bir insan popülasyonunda yapmış oldukları bir çalışmada, MSX1 ve PAX9 genlerindeki diş agenezisi ve DNA dizi varyasyonlarının arasındaki ilişkiyi belirleme amaçlanmıştır. Vieira ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmada MSX1 veya PAX9 kodlama bölgesinde mutasyon

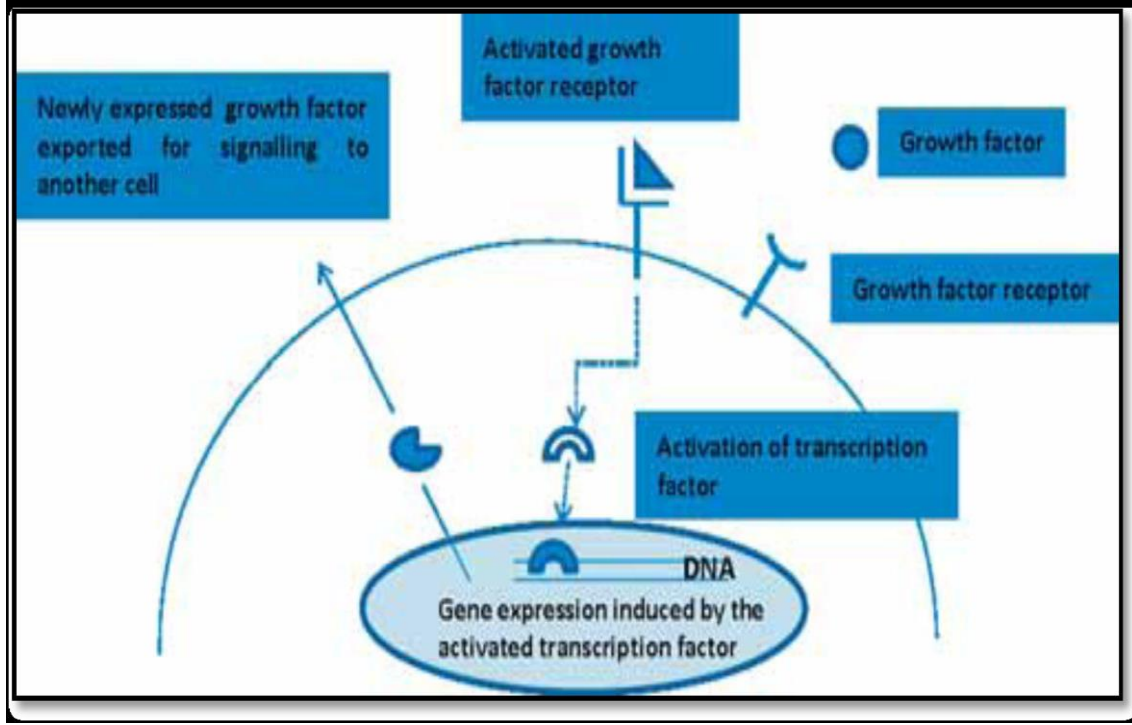
bulunmamıştır. Ancak MSX1' in PAX9 ile insanlarda diş agenezine neden olabilecek etkileşim kurabileceğini düşündürülen anlamlı veri bulunmuştur ($P=0,02$) [130]. Ogawa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, bir fare modelindeki ekspresyon analizi ve insan genetik çalışması birleştirildiğinde elde edilen biyokimyasal veriler, diş gelişimi sırasında PAX9 ve MSX1 arasında işlevsel bir ilişki olduğu gösterilmiştir [131]. Ogawa ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada MSX1' in düzenlenmesinde PAX9' un dahil olup olmadığını belirlemek için MSX1 ifadesi PAX9 eksikliği olan farelerin diş primordiasında analiz edilmiştir. Analizler sonucu elde edilen bulgular PAX9 ve MSX1 arasındaki ilişkiyi göstermektedir [132].



Şekil 3.8. Bugüne kadar tanımlanmış Msx1 genotip-fenotip korelasyonları, etkileşimleri ve mutasyonları [16]

Orofasiyal ve diş gelişimi ile ilgili olarak belirlenen önemli sinyal molekülleri (özellikle büyüme faktörleri) ve transkripsiyon faktörlerinin moleküler mekanizması Şekilde gösterilmektedir. Bu moleküler mekanizmaya göre; farklı büyüme faktörü-büyüme faktörü reseptörü kombinasyonları belirli bir transkripsiyon faktörünün (DNA' ya doğrudan bağlanan proteinler) aktivasyonuna veya inaktivasyonuna yol açar. Bu transkripsiyon faktörleri genomun düzenleyici bölgelerine bağlanır ve hücre göçü, hücre bölünmesi veya hücre ölümü gibi hücre davranışlarını kontrol eden genlerin belirli kümelerinin ifadesini veya baskılanmasını yönlendirir. Birçok durumda transkripsiyon faktörlerinin bir hücre-

hücre "diyalogu" oluşturulmasında, diğer hücrelerin sinyalizasyonu için hücre tarafından yeni büyüme faktörlerinin ifadesine yol açar [133]. Bu sinyal moleküllerinde ve transkripsiyon faktörlerinde meydana gelebilecek bir mutasyon moleküler mekanizmada aksaklıklara yol açabilir, sonuç olarak orofasiyal gelişimde ve diş gelişiminde anormalliklerin görülmesine neden olabilir.



Şekil 3.9. Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri tarafından yürütülen sinyalizasyon [112]



4. MATERİYAL METOD

4.1. Materyal

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, kullanılan olan 71 adet kan örneği Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne başvuran sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastalardan, gönüllü onam formları imzalatılarak 2016-233-1 nolu etik kurul kararı ile elde edilmiştir.

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden Fenol-kloroform yöntemiyle genomik DNA izolasyonu yapılarak, MSX1 geni üzerinde literatürde belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu şartlarına göre metod uygulanmıştır. Elde edilen polimeraz zincir reaksiyon ürünleri; RFLP ile analizleri yapılmıştır, RFLP metoduyla çalışılan örneklerde mutasyonu belirleyecek olan restriksiyon endonükleazlar kullanılarak gen ürünlerinin kesimi yapılmıştır. Bu enzim kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforezleri yapılarak jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

4.2. Metod

4.2.1. Fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu

1. Gün

1ml EDTA + 9ml Kan

1. Örneğin hacminin 2.5 katı kadar RBC (Red Blood Cell) Lysis solüsyonuna konur.
2. Hazırlanan karışım çalkalandıktan sonra 20 dk. buzda bekletilir.
3. 20 dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
4. Tüpte dipte beyaz çökelti görülmediği takdirde, süpernatantın bir kısmı dökülür, hacim RBC Lysis solüsyonu ilave edilerek dipte lökosit tabakası oluşana kadar işlem tekrarlanır.
5. Lökosit tabakası elde edilince süpernatant dökülür.
6. RBC Lysis solüsyonuyla 1-2 kez yıkama yapılır.
7. Örneğe 1000µl RBC Lysis solüsyonu ilave edilir.
8. Vorteksle homojen halde getirilir.
9. 200µl örnekle işleme devam edilir. Geri kalan stoklanır.

10. +500µl STE+ 30µl SDS (%10'luk) +20µl Proteinaz K ilave edilir.
11. Örnek 56°C su banyosunda 1 gece bekletilir.

2. Gün

1. Örneğe 1:1 oranında fenol ilave edilir.
2. 10 dk. çalkalandıktan sonra 20 dk. buza gömülür.
3. Örnek 20dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
4. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.
5. 1:1 oranında (750µl) kloroform ilave edilir.
6. 10 dk. çalkalandıktan sonra 20 dk. buza gömülür.
7. 20 dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
8. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.
9. + Hacim 1/10'u kadar NA asetat+toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etanol tüpe alınan süpernatanta ilave edilir.
10. DNA iplikçikleri beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye kadar tüp yavaşça alt-üst edilir.
11. Örnek -20°C'de 1 gece bekletilir.



Resim 4.1. İzole edilen DNA

3. Gün

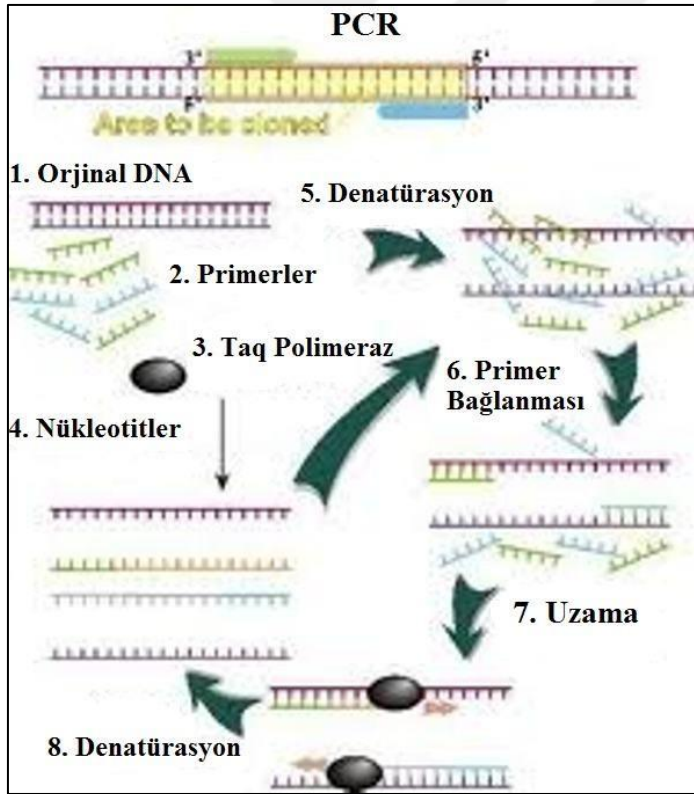
1. Örnek 20 dk. 4000 rpm 4°C'de santrifüj yapılır.
2. Tüpün dibinde çökmüş DNA yoğunluğuna bakılarak eklenecek olan TE (TrisEDTA) miktarı belirlenir.
3. Sıvı kısmı dökülür.
4. Örneğe +500µl %70'lik etanol ilave edilir.
5. 20 dk. 4000rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.

6. Alkol dikkatlice dökülerek kurumaya bırakılır.
7. Eppendorf tüpüne TE ilave edilir.
8. Tüp 37°C su banyosunda 1 gece bekletilir.

Belli miktarlarda sulandırılan DNA'ların milimetredeki miktarları Nanodrop kullanılarak tayin edilmiştir. İzolasyondan istenilen sonuç elde edilmediği takdirde diğer yöntemler denenmiştir.

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bir in vitro ve in vivo DNA amplifikasyon metodudur, reaksiyonlar farklı sıcaklıklardaki üç olayın sikluslar halinde tekrarına dayanmaktadır. PCR ile DNA fragmentleri çoğaltılabilir ve çok küçük örneklerden analizler için yeterli miktarlar elde edilebilir.



Şekil 4.1. PCR zincir reaksiyon şemasal görünüm.

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metod basitçe, tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır.

DNA örnekleri; analizi yapılacak olan genin belirli bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan in vitro DNA sentezi yöntemi olan şartları ayarlanmış PCR'a uygulanır. Yöntemin esası; yüksek ısı uygulamasıyla çift sarmallı DNA'nın denatüre olması (denatürasyon), spesifik oligonükleotid primerlerin komplementeri oldukları zincire bağlanmaları (annealing) ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi olan Taq DNA polimeraz ile uzamalarından oluşan DNA replikasyon mekanizmasına dayanmaktadır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94 °C 98 °C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37 °C-65 °C aralığında gerçekleştirilen primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarının belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.

Daha önce genomik DNA protokollere uygun bir şekilde, periferik kandan izole edilmiştir. Primerler kodlanmayan bölgelerde özellikle MSX1 geninin ekzon 2 kodlama bölgesini kapsayan fragmentleri çoğaltmak için kullanılmıştır. (ekzon 2 için primer 2F ve 2R; Çizelge 3.1)

Polimeraz zincir reaksiyonunda izole edilmiş olan 20µl yoğunluk içeren 50 ng genomik DNA, 1 x PCR tamponu, 1,9-2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM primerlerden biri, 0,5 U Taq polimeraz, şu parametrelerle: 40s 94°C'de, 40s bağlanma sıcaklığı ve 40s 72°C'de 34 döngü için kullanılmıştır(Çizelge 3.1).

4.2.3. Restriksiyon endonükleazla kesim

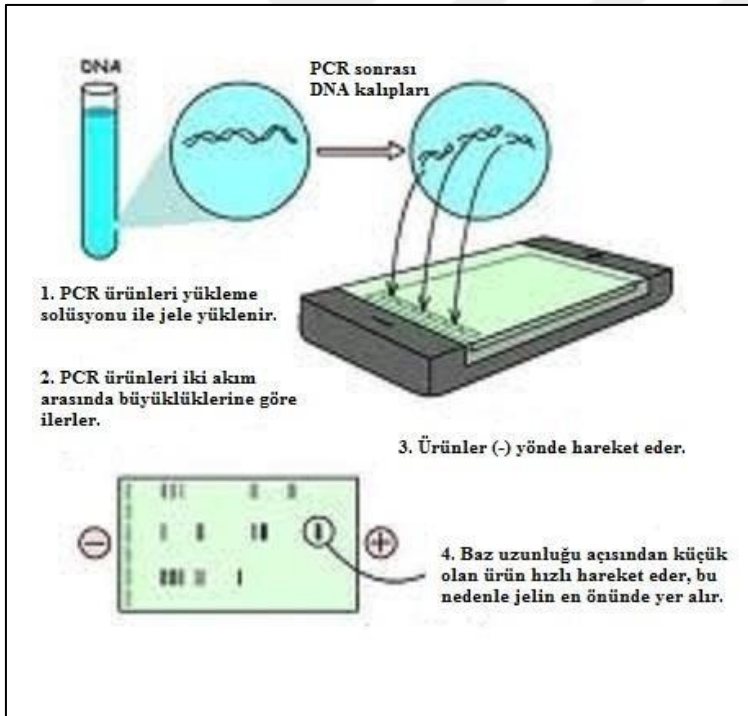
İnsan genomunda tek baz değişiklikleri çok sıktır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nükleotit değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır. DNA polimorfizmi (gen değişimi), DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi (RE) kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa; kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara —restriction fragment length polymorphisms (RFLP) —Restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmleri denilmektedir.

Çalışmamızda PCR' da gerekli çoğaltmalar yapıldıktan sonra, MSX1 genindeki nükleotidlerin değişimini tanıyan DdeI restriksiyon endonükleazı kullanılarak bu gendeki nokta değişimleri tespit edilmiştir.

4.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez; bir elektriksel alanda elektrik yüklü moleküllerin (nükleik asit, protein gibi) akımdan etkilenerek göç etmeleri olarak ifade edilir. Protein ve nükleik asitlerin belirli bir pH'da bir elektrik alanında ve iyonize ortamda molekül büyüklüğü ve/veya yük farklarına göre ayrılma prensibine dayanır. İyonize olabilen bileşiklerin kation (+) ve anyon (-) şeklindeki iyonların çözelti içerisindeki elektriksel alanda değişik şekilde göç etmesi elektroforezin prensibini oluşturur. DNA, elektroforezde anyondan (-), katyona (+)'a doğru hareket eder.

%2'lik agaroz jelde, elektroforezde yürütülerek DNA parçalarının ayrımı sağlanmıştır. TBE5X tamponu kullanılmıştır. Jel UV transilluminatörde görüntülenerek, sonrasında fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforezi şemasal görünüm.



Resim 4.2. Agaroz jel UV transillüminatör görünüm.

4.2.5. İstatiksel analiz

Pearson Ki-Kare testi, Hardy Weinberg equilibrium eşitliği ve Odds ratio testleri uygulanmıştır. Hardy Weinberg'in eşitliği ve Pearson Ki-Kare testi sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastaların genotip ve alel frekanslarının saptanmasında kullanılmıştır. Hardy Weinberg eşitliği kullanılarak, olası veriler ve elde edilen veriler arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı değerlendirilecek, bundan sonra kan örnekleri alınmış Türk hasta popülasyonunun genotip yapısının, Hardy-weinberg eşitliği ile uyum gösterip göstermediği tespit edilmiş olacaktır. Pearson Kikare testi kullanılarak hastalar ve kontrol grupları arasında gen değişimleri araştırılarak, bu ikisi arasında anlamlı farklılıkların oranına bakılıp, gen değişiminin hastalık üzerine etkisi değerlendirilecektir.

Odds ratio testi ilede hastalığa yakalanma olasılık oranları tespit edilmiştir.

Hastalar ve kontrol grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında genotipler ve alellerin dağılımı; hastalar ve kontrol grupları arasında hem genotipik($p=0.00$; $p<0.05$) hem de alellik ($p=0.00$; $p<0.05$) dağılımları farklılıkları bulundu.

Analizler, bize herbir genotipin hastalık-risk ilişkisi tahmini yapmamızı sağlamıştır. Odds ratio 28,235(%95 CI 11,728'den 67,978) testi ile GG sahibi CL/P hastaları ve kontrol grupları GT+TT genotipi ile karşılaştırıldığında ilişki tespit edildi.

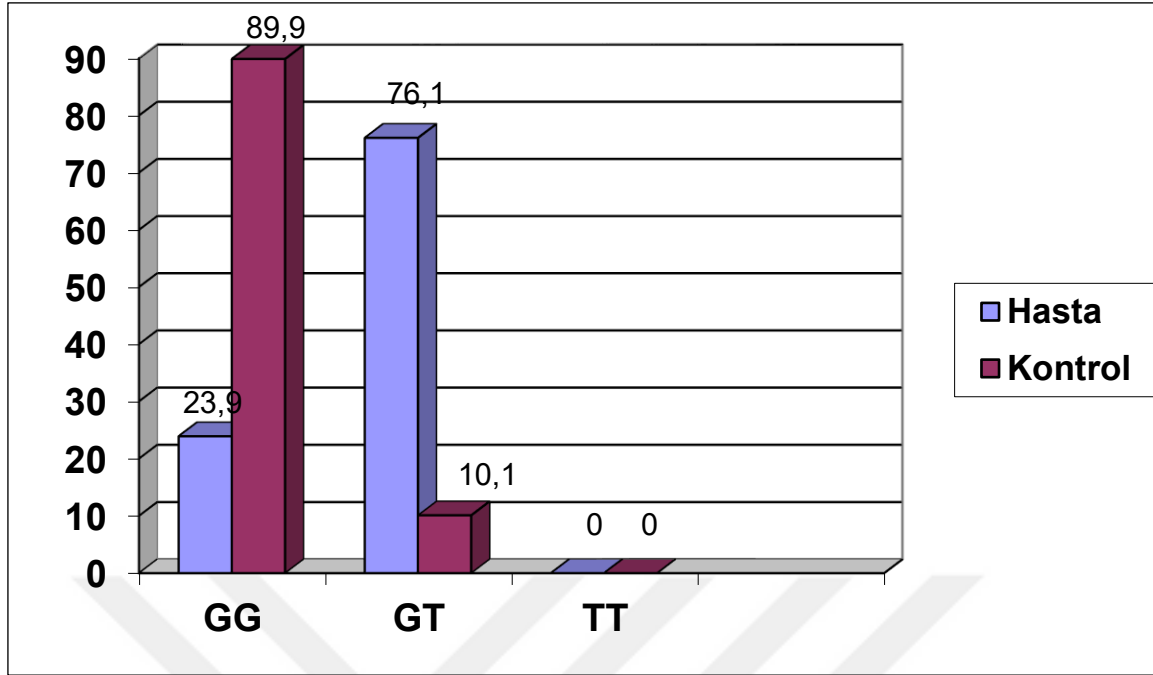
G alelleri ve A alelleri karşılaştırma sonuçları odds ratio ile hesaplandığı ve %95 CI, 11.523(95% CI, 5,436 to 24.424) olarak rapor edildi. Kontrol grupları ile

karşılaştırıldığında T alellerinin frekansları CL/P hastalarında önemli derecede artış göstermektedir.

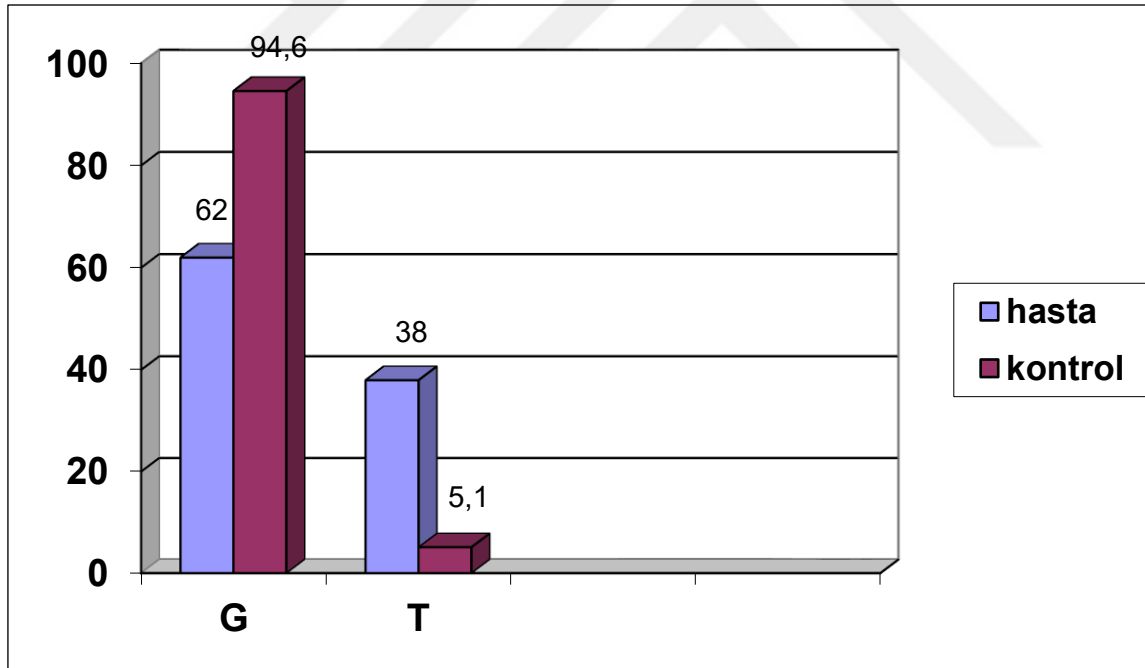
Hardy-Weinberg beklenti testine uygun olarak kontrol grupları arasında genotip dağılımında farklılık bulundu ($X^2= 26,167712$ $df=1$ $P=0.0000$).

Çizelge 4.1. MSX1 Geni SNP5 polimorfizmi istatistiksel analiz sonuçları

MSX1 SNP5	HASTA n=71	KONTROL n= 89
GENOTİP		
GG	17 (23,9)	80 (89,9)
GT	54 (76,1)	9 (10.1)
TT	0 (0)	0 (0)
$X^2=71,946.$, $df=1$, $P=0.000$ $p<0.05$ (fark var)		
ALLEL		
G	88 (62)	169 (94,9)
T	54 (38)	9 (5,1)
<ul style="list-style-type: none"> $X^2=54,309.$, $df=1$, $P=0.000$ $p<0.05$ (fark var) Kontrol ve hasta grupları arasında T alleleline maruz kalma: OR: 11.523 %95 CI (5,436-24.424) $X^2=71,946.$, $df=1$, $P=0.000$ $p<0.05$ (fark var) NSCLP ' de MSX1 SNP5 GT/ TT için hasta kontrol grubu karşılaştırılması. OR:28,235 %95 CI 11,728-67,978 NSCLP'de MSX1 SNP5 GT/ TT için hasta-kontrol grubu karşılaştırılması. 		



Şekil 4.3. MSX1 hasta ve kontrol grupları arasında SNP5 polimorfizmleri



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol frupları arasında G ve T oranları

5. BULGULAR

MSX1 geninin SNP5 bölgesinin, sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklığı hastalığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için, Türk hasta ve kontrollerden alınan örneklerle, kromozom 4p16'da yer alan MSX1 geninin SNP5 bölgesindeki polimorfizmlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu yüksek lisans tez çalışması ile, 71 hasta birey (21 kadın 50 erkek) ve 89 kontrol grubundan alınan örnekler incelenmiştir. İncelemeler MSX1 geninin ekzon 1 bölgesindeki SNP5 bölgesinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.1. MSX1 Geni kontrol grubu alel analizi

	MSX1 SNP5 Kontrol	
1.	GT	HETEROZİGOT
2.	GG	
3.	GG	
4.	GG	
5.	GG	
6.	GG	
7.	GG	
8.	GG	
9.	GT	HETEROZİGOT
10.	GG	
11.	GG	
12.	GG	
13.	GG	
14.	GG	
15.	GG	
16.	GG	
17.	GG	
18.	GG	
19.	GG	
20.	GG	
21.	GG	
22.	GT	HETEROZİGOT
23.	GG	
24.	GG	
25.	GG	
26.	GG	
27.	GG	
28.	GG	
29.	GG	
30.	GG	
31.	GG	
32.	GG	

Çizelge 5.1. (devam) MSX1 Geni kontrol grubu alel analizi

33	GG	
34	GG	
35	GT	HETEROZİGOT
36	GG	
37	GG	
38	GG	
39	GG	
40	GG	
41	GG	
42	GG	
43	GG	
44	GG	
45	GG	
46	GG	
47	GG	
48	GG	
49	GG	
50	GG	
51	GG	
52	GG	
53	GT	HETEROZİGOT
54	GG	
55	GG	
56	GG	
57	GG	
58	GG	
59	GG	
60	GG	
61	GG	
62	GG	
63	GG	
64	GG	
65	GT	HETEROZİGOT
66	GG	
67	GG	
68	GG	
69	GT	HETEROZİGOT
70	GG	
71	GG	
72	GG	
73	GG	
74	GT	HETEROZİGOT
75	GG	
76	GG	
77	GG	
78	GG	
79	GG	

Çizelge 5.1. (devam) MSX1 Geni kontrol grubu alel analizi

80	GG	
81	GG	
82	GG	
83	GG	
84	GG	
85	GG	
86	GG	
87	GT	HETEROZİGOT
88	GG	
89	GG	

Tabloda gösterildiği gibi 9 heterozigot 80 kişi normal olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 5.2. MSX1 gen SNP5 bölgesi pcr ve enzim sonuçları

1	Sevda TOY	GT	HETEROZİGOT
2	Satı ÜNAL	GT	
3	Sevcan YÜKSEL	GT	
4	Mehmet YILMAZ	GT	
5	Emre ÇAYIR	GT	
6	Ümit TOSUN	GT	HETEROZİGOT
7	Safiye YILDIRIM	GT	
8	Ahmet EKİNCİ	GT	
9	Ahmet KARAASLAN	GT	
10	Abdulkadir CİNBİR	GT	HETEROZİGOT
11	Haydar KOÇYİĞİT	GG	
12	Faik ATALAY	GG	
13	Burak KAYADELEN	GG	
14	Ömürcan KAYAALP	GT	HETEROZİGOT
15	Aslı SAYIM	GG	
16	İbrahim CİHAN	GG	
17	Abdulsamet CİHAN	GT	HETEROZİGOT
18	Hatice ALAGÖZ	GT	HETEROZİGOT
19	Emrah KÜÇÜKAKINCI	GT	
20	Sibel ÇEKİÇ	GG	HETEROZİGOT

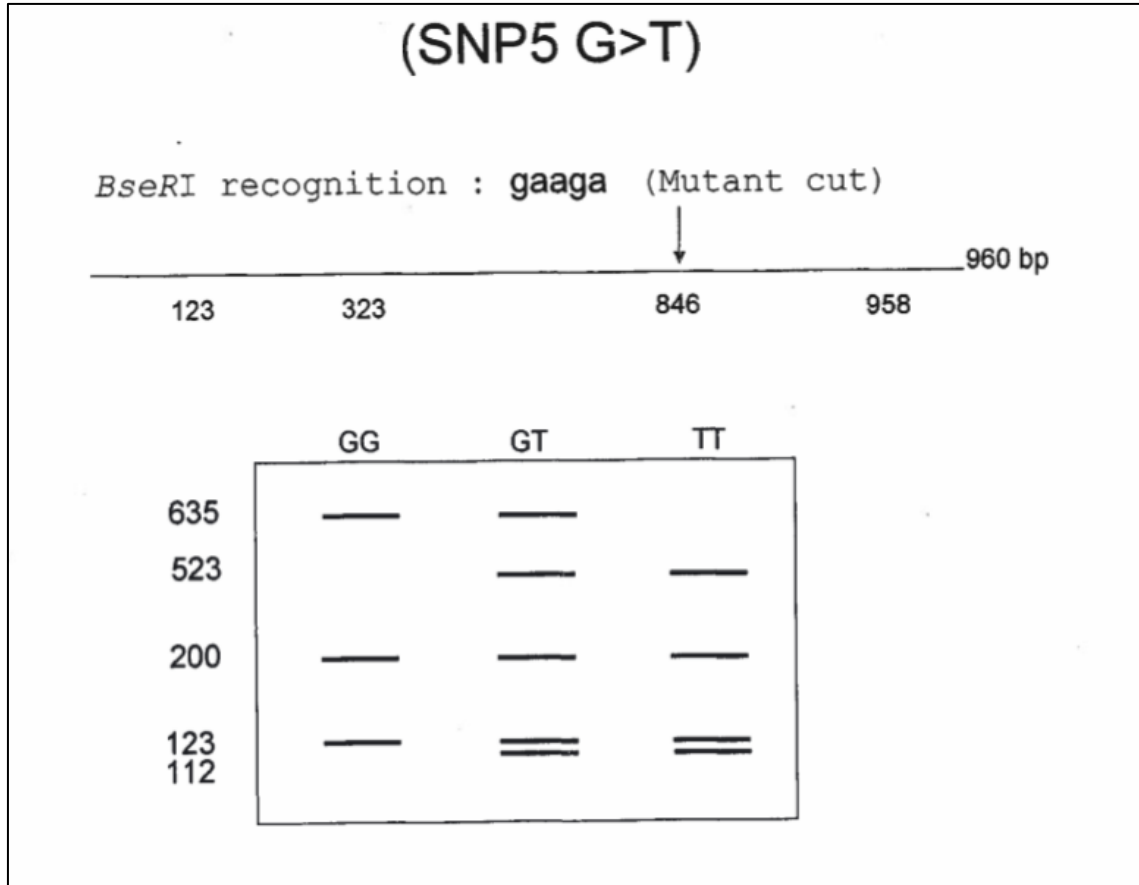
Çizelge 5.2. (devam) MSX1 gen SNP5 bölgesi pcr ve enzim sonuçları

21	İlknur SARAÇ	GT	
22	Ünal ERDEM	GT	
23	Merve EROĞLU	GT	
24	Abdullatif TÜRKOĞLU	GG	
25	Enes YILDIRIM	GG	
26	Göktuğ VAROL	GT	HETEROZİGOT
27	Yunus Emre TEKDEMİR	GG	
28	Mustafa BECER	GG	
29	Yasin KOYUNCU	GG	
30	Arzu ALKAN	GT	HETEROZİGOT
31	Yakup İYİOL	GG	
32	Sinem KÖYLÜ	GT	
33	Mehmet Can ÖZKAN	GT	
34	Medine GÜZEL	GT	HETEROZİGOT
35	Faruk İNAN	GT	
36	Esra UÇAR	GT	HETEROZİGOT
37	Furkan BİÇER	GT	
38	Bedriye ÇOBAN	GT	
39	Oğuzhan ERCAN	GT	
40	Sefa İYİOL	GT	
41	Mustafa ERKAN	GG	
42	Mustafa BOYRAZ	GT	
43	Mahmut SARAN	GT	
44	Zeynep SADIÇ	GT	
45	Hasan Ufuk AKESER	GG	
46	Mustafa KAÇANER	GT	HETEROZİGOT
47	Rabia KARATEPE	GT	
48	Buğrahan KESER	GT	
49	Batuhan Ekrem GÜLER	GT	
50	Zekeriya BAKİ	GT	HETEROZİGOT
51	Zeliha KABAĞTEPE	GT	

Çizelge 5.2. (devam) MSX1 gen SNP5 bölgesi pcr ve enzim sonuçları

52	Resul TÜRKOĞLU	GT	
53	Harun YAMAN	GT	
54	Büşra ÇEVİK	GG	
55	Tunahan AYDOĞAN	GT	
56	Baran KILIÇ	GT	
57	Damla GÜÇLÜCAN	GT	
58	Murat GÜÇLÜCAN	GG	
59	Hasan Ufuk AKARSU	GT	
60	Selin POLATTAŞ	GT	HETEROZİGOT
61	Mustafa KOÇPINAR	GT	
62	Murat DURSUN	GT	HETEROZİGOT
63	Ahmet ÇÖLGEÇEN	GT	
64	Samet KAYNARÇEŞME	GT	
65	Doğuhan ÇAM	GT	
66	Emre KURTULUŞ	GT	HETEROZİGOT
67	Melih KARADAĞ	GT	
68	Murat ÇELİK	GT	
69	Raif DURGUN	GT	
70	Reyhan KOÇYİĞİT	GG	
71	Mehmet KOÇPINAR	GT	HETEROZİGOT

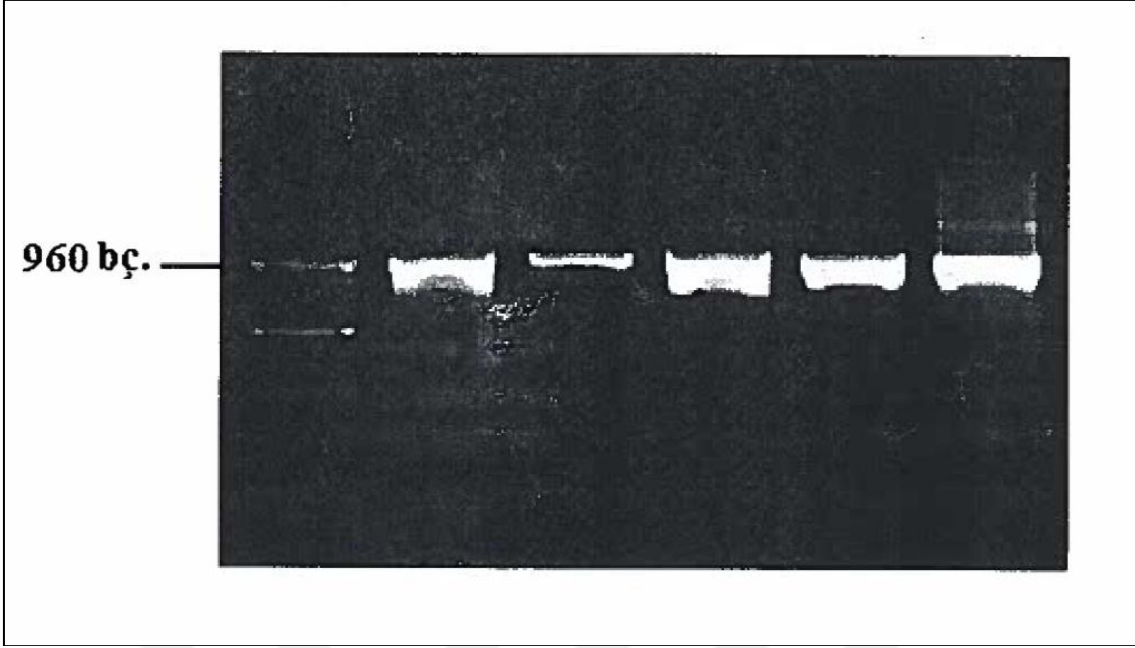
17 kişi heterozigot 54 kişi normal 0 kişi mutant (TT) olarak tabloda gösterilmiştir.



Şekil 5.1. SNP5 mutant kesim ve baz çifti sayısı gösterir şema.

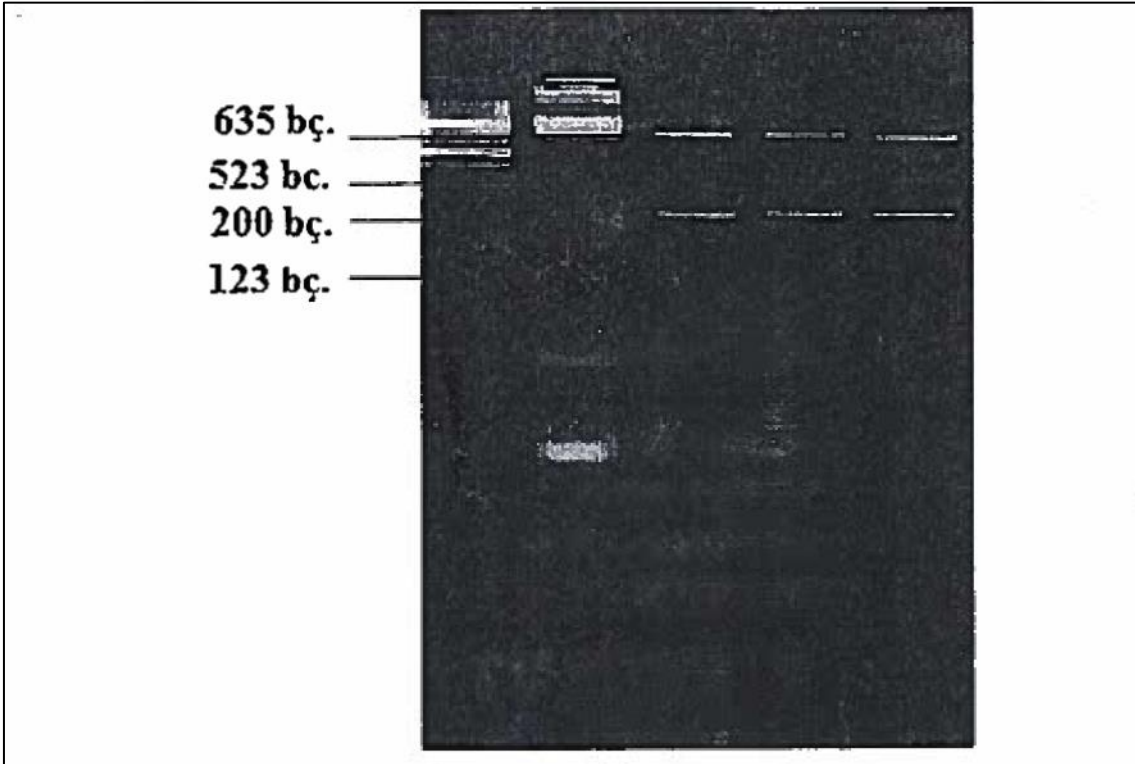
Çizelge 5.3. SNP4 ve SNP5 analizleri

1921	cgactcccg	gtggcctcca	gcaggaaga	agcgggtgt	taacagaga	ttcgtttga	
1981	ctcacatcct	ggtggtctga	aagtcctaaag	gatcgttgc	tttctttgt	tttgtttgt	Comment [A1]: SNP4/S-F
2041	ttttctgtt	tggttctgt	tggttttag	agaggttga	aaaaatgat	acttaggcaa	
2101	aaccgcgtg	gtgaacatc	ttcgattga	attcacttc	tgccggaaa	gctgctgat	
2161	aggcaaatg	tcctttcaa	cgcttaggc	cttggcccc	aagacccga	agtcaagcg	
2221	atcccgctg	tggtggata	attgttcca	cattttatc	ggggcagtc	cccagcagc	
2281	cccaccccc	acctgcacta	gtcctgcct	ctgatgttc	ttcactgtc	accctgagg	
2341	tttattttga	agccaaaaga	aaaagacagc	tggtcatgt	gatgtctgt	gactatgca	
2401	caggtgagg	ggagagcga	tctcaacct	ccccccgca	caacatcaac	acacacacac	
2461	acacacaaac	gtttgagtgg	ggccagaagg	ccctggccc	aggggtgac	gcgatccaac	
2521	agaggactga	gacaaatcaa	agaaaaagcc	cattagaata	aagcagccc	tcgttctcct	Comment [A2]: SNP4 T>G
2581	ctccagatga	cactttctgt	ttctaagag	gctggccaca	gtgcacctc	catgatggtc	
2641	tgctgtctc	catctctgt	ctgcgggac	tactcctaga	atcccgtagg	agcgaagtgt	
2701	tcgggggaaa	gtgtagaatt	tgatttggat	tctatgccac	aaaactgct	agccccacac	
2761	tgaagcactc	cgtggcact	gataaatgt	tgccaacgc	gtaaaactaa	atgtgcctt	
2821	ggctgggcg	cagggcctct	ttcttcagt	tcgtcaactg	tattaacatc	caccttctc	Comment [A3]: SNPs G>T
2881	ctgatggcc	ctggaggag	gcccgcctg	aagcccttc	taagccgcg	ggcagcacia	
2941	agtgatttc	acatcttccc	agctgttag	gcctaagatg	tgacatcga	gccttcaacg	Comment [A4]: SNP4/S-R



Resim 5.1. MSX1 SNP5 PCR görüntüsü.

DNA izolasyonunun fenolkloroform yöntemi uygulanması sonrasında, PCR yöntemi ile bahse konu gen bölgesi çoğaltılarak jelde görüntü elde edilmiştir.



Resim 5.2. MSX1 SNP5 restriksiyon kesim

6. TARTIŞMA

Dünya genelinde yüksek oranda yaygın, birden fazla genin etkisi olduğu bir doğumsal rahatsızlık olan sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı üzerinde multidisipliner araştırmalar yapılmasına rağmen, karmaşıklığından dolayı etiyojisi büyük oranda anlaşılmamıştır. Multidisipliner (Birçok genetik ve çevresel faktörler) etmenlerin sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığının gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Fakat bu multidisipliner etmenlerin niteliğinin tam olarak belirlenmesi için, kapsamlı çalışmalar hastalığın tanınması ve tedavisi için gereklidir. Yapılan genetik çalışmalar sonucu aday gen bölgelerin, hastalığa etkisi hususunda tutarlı olmayan veriler ortaya çıkmaktadır. Birbirinden farklı genler üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli veriler bulunması, çeşitli toplumlarda farklı yatkınlık yapıcı genlerin hastalık üzerinde etkisinin gözle görülür dercede değişken olabileceği geniş bir değerlendirmedir.

Sendromsuz dudak damak yarıklığına etkisi olan genlerin başında gelen genlerden biri MSX1 genidir. MSX1 geni bir transkripsiyon faktörüdür ve diğer homeobox proteinleri ile etkileşime girerek transkripsiyonun regülasyonunu sağlamaktadır, diğer transkripsiyon kompleks komponentleri ve çekirdek bileşenleri ile birlikte transkripsiyon baskılayıcı rolünü üstlenir. Bu yolakta ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda embriyonel süreçte çeşitli defektler meydana gelir, bunların en önemlilerinden biri sendromsuz dudak ve damak yarığıdır.

MSX1 geni ve dudak damak yarığı ile farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar genin hastalık üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Norveç'te 174 CL/P hastalarından 18'inde, 88 CPO hastasından 25'inde yarıklılığa neden olan TGFA, TGFB3 ve MSX1 genlerinin etkili olduğu gözlemlenmiş, bu genler arasında MSX1 geni istatistiksel analiz sonuçlarında bulunan değerlerin anlamlı olduğu ve hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır [10]. Kore'de 23 erkek ve 13 bayanla yapılan diğer bir araştırmada ise, ekzon 1 de 253 baz çifti bölgesindeki —G nükleotidinin "A" nükleotidinin yerine, 255 baz çifti bölgesine "G" nükleotidinin eklendiği gözlemlenmiş, ekzon 2'de 11 baz çifti bölgesindeki "C" nükleotidi yerine 351 baz çifti bölgesindeki "A, T, G" nükleotidlerin eklenmiş ya da 352 baz çifti bölgesine "T, A" nükleotidleri eklenmiştir. Protein analizlerinde, Thr85ala'da anlamsız mutasyon varlığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar MSX1 genindeki spesifik

mutasyonların Kore'deki sendromsuz dudak damak yarığının oluşmasında çok önemli bir rolü olduğunu göstermiştir [78]. Danimarka'da yapılan bir çalışmada ise, istatistiksel analiz sonuçları MSX1 geni için bulunan değerler anlamlı olduğu belirlenmiştir [79]. Na Young Kim ve arkadaşları 2013'te Kore popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada P147Q varyantı MSX1 gen üzerinde ki SNP'ler arasında olmadığını tespit etmişlerdir Hindistan Bengal'de yapılan bir çalışmada, genom tarama çalışmaları sonuçlarına göre, çoklu kromozomal bölgelerin dudak damak yarıklığı ile pozitif ilişkide olduğunu belirtmektedir, fakat Bengal popülasyonu ile genetik yatkınlık bakımından örtüşen Türk ve İngiliz popülasyonlarında hastalığın görülme oranının Shanghai Çin'deki sonuçlardan düşük olduğunu vurgulamaktadır [82]. Bir diğer çalışmada Kolombiya'da, 43 erkek ve 50 bayanla gerçekleştirilen incelemeler sonucunda bulgular MSX1 geni ile CL/P arasında pozitif bir ilişki olduğunu doğrulamıştır [84]. Letonya'daki bir çalışmada ise, 107 Letonyalı hasta DNA örneği ile 351 kontrol grubu karşılaştırılmış, sonuç olarak MSX1 geninin hastalığın oluşmasında etkili bir gen olduğu desteklenmiş ve Letonya'nın Avrupa'da hastalığın prevalansının en yüksek olduğunu ülkelerden biri olduğu belirtilmiştir [85].

Dudak-damak yarığının Hindistan Japonya ve Çin'de yüksek oranda görülmesinin rapor edilmesi, Afrika'da ise en düşük oranda görülmesinin sebebinin bu hastalığın orjininin Asya olabileceğini akla getirmektedir. Hastalık oranlarının Asya'da 1000'de 4.04'e kadar yükselip, Afrika'da 1000'de 0.18'e kadar düşmesi bu yorumu desteklemektedir. Kuzey Amerika yerlilerinde ve Asyalılarda oranın yaklaşık olarak 500'de 1 (en yüksek), Kafkas popülasyonunda 1000'de 1, Afrika kökenli popülasyonlarda ise 2500'de 1'dir. Asyalılar arasında en yüksek oranın Japonya'da olduğu sanılmaktadır. Latin Amerikalılarda yaygınlık oranı Kafkas ve yerli Amerikalılardan daha düşüktür ancak yine de yerli Afrikalılardan daha yüksektir [103]. Kuzey Avrupalı, Asyalı, Amerikan yerlileri ve Avusturalyalılarda daha çok yarık dudak ve damak bir arada bulunmaktadır. Aksine Afrikalılarda ise sadece yarık dudak daha sık görülmektedir [3].

MSX1 geninin diğer gen bölgeleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında; Filipin'de 1.098 hasta ile yapılan bir çalışmada, MSX1 geni ekzon 1'de yer alan P147Q bölgesinde missense mutasyonlar belirlenmiş, bu nokta mutasyonların %6 oranında CPI'ye sebep olduğu görülmüş, fenotipte çift taraflı dudak ve damak yarığı gözlemlenmiştir [86]. Tayland'da yapılan bir çalışmada, P147Q bölgesindeki patojenik mutasyonların Vietnam

(%2) ve Filipin (%0.15) populasyonlarında baskın olduğunu, Tayland populasyonunda bu bölgede patojenik mutasyonlara rastlanmadığını belirtmektedir. Aynı çalışmada ekzon 2'de yer alan P278S bölgesinin hastalıkla ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir ve böylece MSX1 geninin ekzon 2 bölgesinin ekzon 1 bölgesi karşılaştırıldığında ekzon 2 bölgesinin önemli ölçüde daha az varyasyon göstermesi nedeniyle daha korunmuş olduğu sonucuna varılmıştır. Tayland'daki bu çalışmada, MSX1 geninin G267C bölgesinin prevalansı oldukça yüksek bulunmuş, Pearson kare testine göre sonuç ($p=0.285$) anlamlı, Hardy Weinberg testleri kontrol grubunda ($p=0.93$), hasta grubunda ($p=0.96$) olarak bulunmuş ve Hardy Wienberg dengesinden sapma olmadığı sonucuna varılmıştır [81].

Ayrıca hastalığın siyah ırkta düşük oranda görülmesi, beyaz ırkta ise daha yüksek oranda görülmesi, Türkiye'nin de bir Asya ülkesi olması ve bu tez çalışması ile bulunan sonuçların anlamlı olması sonucu bu durumu desteklemektedir. Bu çalışma, MSX1 genindeki gen değişimlerinin %5.7 oranında hastalık etkeni olduğunu göstermektedir ve Tayland'da yapılan çalışma ile uyumludur. Jia Liang ve arkadaşlarının 2016'da yayınlanan makalalarında, MSX1 gen mutasyonlarının çeşitli fenotiplerde kendini ifade etmesi sonucuna erişmişlerdir. Varyantların homeodomeinleri etkilemesi ile diğer fenotiplerin birlikteliğinde veya bu sonuç olmaksızın ciddi diş kayıpları olduğunu varyantların homeodomeinleri etkilemeksizin sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklanmaları üzerinde etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklanmalarını etkileyen mutasyonların homeodomeinleri etkileyen; sendrom ilişkili mutasyonların hepsi homeodomeinleri etkileyen küt mutasyonlar olduğunu tespit etmişlerdir.

Sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı, birçok genin etkilediği ve ayrıca çevresel sebeplerin sebep olduğu, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler farklı şekillerde, farklı populasyonlarda CL/P hastalığına katkı sağlarlar. Türkiye'de ise, çok az sayıda istatistiksel çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Gazi Üniversitesi hastanesinde 1988 - 2005 yılları arasındaki 17.259 canlı doğumların 5/10.000'inde oral dudak-damak yarığı saptanmıştır. Hacettepe Tıp Fakültesinde yapılan başka araştırmada 1.229 yarık damak-dudak vakasının %19'unu izole dudak, %35,6'sını izole damak, %45'ini hem dudak hem damak yarığı oluşturmuştur.

Victoria Tallón-Walton ve arkadaşları 2014'te PAX9 ve MSX1 geninin etkilediği 6 ailede fenotip ve genotip analizlerinin sonucunda bu genlerin ciddi diş kayıpları dental anomaliler ve sistemik maddeler ile ilişkilendirmişler. PAX9 ve MSX1 geni üzerinde daha önce tanımladıkları mutasyonlar çok çeşitli fenotiplere sahiptir. Bu hastaların mutasyonların gösterilmesi, PAX9 ve MSX1 gen mutasyonlarının varlığıyla ortaya çıkarılmadı. Bu sonuçlarla diş kayıplarının etiyojisi için kompleks odontogenez sürecinde WNT10A gibi bir çok genin rol aldığını görmüşlerdir. Dahası epigenetik faktörlerde bu sürece etki edebilirler. Örneğin; aynı zamanda gen dozajının indirgenmesi, gen değişimlerinin etkileşimi ve post-transkripsiyonal modülasyon ajanların varlığı, dental anomalilerin sistemik anomalilerle ilişkili olup olmadığını ifade edebilir sonucuna ulaşmışlardır.

Kachin Wattanawong ve arkadaşları 2016'da IRF6 üzerinde rs2235371, rs2013162, ve rs642961, rs987525 polimorfizmleri önemli ölçüde NSCL/P ile ilişkilidir sonucuna ulaşmışlardır. Bununla birlikte NSCLP ile ilgili güçlü varyantların etkilerinin de tespit etmişlerdir.

Suazo ve arkadaşları buna ek olarak Santoz, Scapoli ve arkadaşları 2010 yılında MSX1 ve TGFB3 gen üzerinde ki SNP'lerin NSCL/P riskini artıracak sonucuna ulaştıkları çalışmalarıyla önemli bir kanıt ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu iki genin birbiri ile ilişkileri de gözden geçirilmiş ve multiple gen etkileşiminin varlığında göstermişlerdir.

Aurora Barra-Arce ve arkadaşları 2016 yılında Meksika popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada MSX1 geninin CL/P hastalığı bakımından önemli bir gen olduğunu ve bunların üzerindeki varyasyonlarda 4 SNP'nin değerlendirildiğini belirtmişlerdir. P147Q, SNP5 ya da P278S poliformizlerinin CL/P ile ilişkilerinin Meksika popülasyonu adına olmadığını kontrol grupları ile birlikte yaptıkları çalışmada gözlemlemişlerdir. Farklı popülasyonlar için SNP5 ve P278S poliformizlerinin CL/P ile ilişkili birkaç anlamlı frekans bildirimleri olmuştur. Bu çalışmayı yapan Viera ve arkadaşları bu poliformizmlerin CL/P oluşumunda etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Buna ek olarak Y. Suzuki ve arkadaşları 2004'te Vietnam popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında CL/P'yi etkileyen poliformizmler arasında sadece SNP5 poliformizmini tanımlamışlardır.

Baiba Lace ve arkadaşlarının 2016 yılında, Litvanya popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada CL/P hastalarında hem kodlanan bölge hem de kodlanmayan bölge içinde

MSX1 geni üzerinde 16 farklı varyasyonu tespit etmişlerdir. Kodlanan bölge içerisinde tanımlanan sekans varyasyonlarının amino asit değişimine sebep olmadığı; bununla birlikte bu durumun CL/P hastalarında bir mutasyon olarak düşünmemişlerdir. Bundan sonra da CL/P hastalığı olmayan Litvanya popülasyonu üzerinde bu varyasyonların karşılaştırılması çalışma yapacaklarını belirtmişlerdir. Birkaç SNP frekanslarının popülasyonlar arasında farklılıklar gösterdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada SNP frekansları %3.7 olmasına karşın bir önceki çalışmaları olan Kafkas popülasyonu üzerine yaptıkları çalışmada 0 sonucuna ulaşmışlardır. SNP C330T frekansı bu çalışma için %4.9 bulmalarına karşın bundan önce yaptıkları çalışmada Asya popülasyonu için %19 sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca Kafkas popülasyonunda SNP A2731G %24, Litvanya popülasyonunda %17 olmasına karşın Asya popülasyonunda %0.6 çıkması gözle görülebilir fark olarak karşılına çıkmıştır. Sonuç olarak; yaptıkları ölçümler ve profil örnekleri gösterdi ki MSX1 gen sekans varyasyonlarının etiyolojik bir rol aldığını söylemediklerini buna karşın tespit ettikleri SNP lerin farklı popülasyonlarda bulunan hem kontrol gruplarında hem de hastalar arasında gözle görülür farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir.



7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kontrol grubu ve hastalar arasında genotip ve alellik farklılıkları; hem genotip ($p=0.00$; $p<0.05$) ve hem alellik ($p=0.00$; $p<0.05$) bakımından anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

Herbir genotipin hastalık riski ile bağlantısı analiz edilmiştir. Odds ratio testi kullanılarak 28.235(%95 CI, 5.436 24.424) kontrol grupları ve CL/P hastaları içinde GG genotipi ve GT+TT genotipi karşılaştırıldığında ilişki tespit edildi.

A alelleri ile G alelleri karşılaştırma sonuçları Odds Ratio ile hesaplandı ve %95 CI, 11.523(95% CI, 5,436 to 24.424) olarak rapor edildi. CL/P hastaları ve kontrol grupları karşılaştırıldığında aleller ve genotipler arasında hem genotip ($p=0.00$; $p<0.05$) hemde alellik ($p=0.00$; $p<0.05$) bakımından farklılıklar bulundu.

Herbir genotip ile hastalık riski ilişkisi analizler yapılarak elde edilmiştir. GG aleline sahip kontrol grupları ve CL/P hastaları arasında Odds ratio testi ile 28.235 (95% CI 11,728 to 67,978) sonucu bulunarak GT+TT genotipinin hastalıkla ilişkisi bulundu.

G alelleri ve A alelleri karşılaştırma sonuçları Odds ratio testi (%95 CI) ile hesaplandığında 11.523 olarak rapor edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CL/P hastalarında T alelleri frekansı önemli derecede artmış olduğu gözlemlenmiştir.

Hardy-Weinberg uyumluluk testi ($X^2= 26,167712$ $df=1$ $P=0.0000$) yapılarak kontrol grubu ile yapılan değerlendirmede bulgular eşliğinde farkın olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında; Türk popülasyonunda hem genotip hemde alel frekansları p değeri 0.05 'ten küçük çıktığı için Msx1 geni SNP5 polimorfizminin dudak ve/veya damak yarığı oluşumunda belirleyici olduğundan bahsedebiliriz. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle, Türk popülasyonunda Msx1 geni üzerinde meydana gelen bu polimorfizmin sendromsuz dudak ve/veya damak yarıkları oluşumunda etkisinin olup olmadığını tespit etmiş olsakta Msx1 geninin bu değişiminin Türk popülasyonu için net bir şekilde anlaşılması için daha fazla moleküler temelli ve kontrol grubu ve hastas grubunun sayısının daha fazla olduğu araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Türk popülasyonunda Msx1 geni

SNP5 polimorfizminin daha önce yapılan çalışmalarda araştırılmadığını göz önüne alırsak bu çalışma genin yapısının ve hastalığa olan etkisinin anlaşılması bakımından bir öncü çalışma olarak tezin önemini artırmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasının, hastalığın anlaşılması için Msx1 geni üzerinde bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

1. Hoúnuter, M., Aktunç, E., Kargı, E., Ünalacak, M., Babuççu, O., Demircan, N., Işıkdemir, A. (2002). "Yarık damak dudak aile rehberi", *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(1), 9-13.
2. Coleman, J. R., Sykes, J. M. (2001). "The embryology, classification, epidemiology, and genetics of facial clefting" *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 9(1), 1-13.
3. Anastassov, G. E., Joos, U. (2001). "Comprehensive management of cleft lip and palate deformities", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 59(9), 1062-1075; discussion 1075-77.
4. Rajesh, P., Rajesh, R., Narayanan, V., Baig, M. F., Prabhu, V. R., Venkatesan, A. (2000). "A Clinical profile to assess the potential risk factors for cleft lip and palate", *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 18(4), 147-150.
5. Carinci, F., Pezzetti, F., Scapoli, L., Martinelli, M., Avantaggiato, A., Carinci, P. (2003). Recent developments in orofacial cleft genetics. *Journal Craniofacial Surgery*, 14, 130-143.
6. Wehby, G., Cassell, CH. (2010). The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Distrofy*, 16, 3-10.
7. Mangold, E., Ludwig, K. U., Birnbaum, S., Baluardo, C., Ferrian, M., Herms, S., Steffens, M. (2010). Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nature genetics*, 42(1), 24.
8. Wiśniewska, K. ve Wysocki, J. (2008). The importance of folic acid in the primary prevention of congenital malformations. *Archives of Perinatal Medicine*, 14(2), 32-40.
9. Nakajima, A., Tanaka, E., Ito, Y., Maeno, M., Iwata, K., Shimizu, N. ve Shuler, C. F. (2010). The expression of TGF-β3 for epithelial-mesenchyme transdifferentiated MEE in palatogenesis. *Journal of molecular histology*, 41(6), 343-355.
10. Gorlin, R. J., Cohen Jr, M. M. ve Hennekam, R. C. (2001). *Syndromes of the head and neck*. New York: Oxford University, 459.
11. Kernahan, D. A. ve Stark, R. B. (1958). A new classification for cleft lip and cleft palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 22(5), 435-441.
12. Kernahan, D. A. (1971). The striped Y—a symbolic classification for cleft lip and palate. *Plastic and reconstructive surgery*, 47(5), 469-470.
13. Schwartz, S., Kapala, J. T., Rajchgot, H. ve Roberts, G. L. (1993). Accurate and systematic numerical recording system for the identification of various types of lip and maxillary clefts (RPL system). *The Cleft palate-craniofacial journal*, 30(3), 330-332.
14. Harville, E. W., Wilcox, A. J., Lie, R. T., Vindenes, H. ve Åbyholm, F. (2005). Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects?. *American journal of epidemiology*, 162(5), 448-453.

15. Rahimov, F., Marazita, M. L., Visel, A., Cooper, M. E., Hitchler, M. J., Rubini, M., ve diğ., Melbye, M. (2008). Disruption of an AP-2 α binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nature genetics*, 40(11), 1341.
16. Weinberg, S. M., Brandon, C. A., McHenry, T. H., Neiswanger, K., Deleyiannis, F. W., De Salamanca, J. E., ve diğ., Marazita, M. L. (2008). Rethinking isolated cleft palate: evidence of occult lip defects in a subset of cases. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(13), 1670-1675.
17. Grosen, D., Chevrier, C., Skytthe, A., Bille, C., Mølsted, K., Sivertsen, Å., ve diğ., Christensen, K. (2010). A cohort study of recurrence patterns among more than 54 000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. *Journal of medical genetics*, 47(3), 162-168.
18. Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H. ve Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 167.
19. Little, J., Cardy, A. ve Munger, R. G. (2004). Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 82, 213-218.
20. Shi, M., Christensen, K., Weinberg, C. R., Romitti, P., Bathum, L., Lozada, A., ve diğ., Murray, J. C. (2007). Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *The American Journal of Human Genetics*, 80(1), 76-90.
21. Shi, M., Wehby, G. L. ve Murray, J. C. (2008). Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(1), 16-29.
22. Shi, M., Christensen, K., Weinberg, C. R., Romitti, P., Bathum, L., Lozada, A., ve diğ., Murray, J. C. (2007). Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *The American Journal of Human Genetics*, 80(1), 76-90.
23. Van Rooij, I. A., Wegerif, M. J., Roelofs, H. M., Peters, W. H., Kuijpers-Jagtman, A. M., Zielhuis, G. A., ve diğ., Steegers-Theunissen, R. P. (2001). Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*, 12(5), 502-507.
24. Lammer, E. J., Shaw, G. M., Iovannisci, D. M., Van Waes, J. ve Finnell, R. H. (2004). Maternal smoking and the risk of orofacial clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. *Epidemiology*, 15(2), 150-156.
25. Zhu, H., Kartiko, S. ve Finnell, R. H. (2009). Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clinical genetics*, 75(5), 409-423.
26. Jentink, J., Loane, M. A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J. K. ve de Jong-van den Berg, L. T. (2010). Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *New England Journal of Medicine*, 362(23), 2185-2193.
27. Mossey, P. ve Little, J. (2009). Addressing the challenges of cleft lip and palate research in India. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 42, 9.

28. DeRoo, L. A., Wilcox, A. J., Drevon, C. A. ve Lie, R. T. (2008). First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *American journal of epidemiology*, 168(6), 638-646.
29. Boyles, A. L., Wilcox, A. J., Taylor, J. A., Shi, M., Weinberg, C. R., Meyer, K., ve diğ., Jugessur, A. (2009). Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society*, 33(3), 247-255.
30. Wehby, G. L. ve Murray, J. C. (2010). Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral diseases*, 16(1), 11-19.
31. Lumley, J., Watson, L., Watson, M. ve Bower, C. (2001). Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane database of systematic reviews*, (3). Url: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001056>.
32. Wilcox, A. J., Lie, R. T., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D. R., Åbyholm, F., ve diğ., Drevon, C. A. (2007). Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *The Bmj*, 334(7591), 464.
33. Yazdy, M. M., Honein, M. A. ve Xing, J. (2007). Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the US grain supply. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 79(1), 16-23.
34. Johnson, C. Y. ve Little, J. (2008). Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *International journal of epidemiology*, 37(5), 1041-1058.
35. Ray, J. G., Meier, C., Vermeulen, M. J., Wyatt, P. R. ve Cole, D. E. (2003). Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *The Journal of pediatrics*, 143(6), 805-807.
36. López-Camelo, J. S., Castilla, E. E. ve Orioli, I. M. (2010). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152(10), 2444-2458.
37. Sadler, T.W. (1990). *Longman's Medical Embriology*. Paris: Lippincott, 115-138.
38. Procaccio, V. (2006). A mutation of beta -actin that alters depolymerization dynamics is associated with autosomal dominant developmental malformations, deafness, and dystonia. *American Human Genetic*. 78, 947-960.
39. Frebourg, T., Oliveira, C., Hochain, P., Karam, R., Manouvrier, S., Graziadio, C., ve diğ., Dumoulin, S. L. (2006). Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *Journal of medical genetics*, 43(2), 138-142.
40. Twigg, S. R., Kan, R., Babbs, C., Bochukova, E. G., Robertson, S. P., Wall, S. A., ve diğ., Wilkie, A. O. (2004). Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8652-8657.

41. Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., ve diğ., Jabs, E. W. (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nature genetics*, 37(5), 468.
42. Roessler, E., Du, Y. Z., Mullor, J. L., Casas, E., Allen, W. P., Gillessen-Kaesbach, G., ve diğ., Muenke, M. (2003). Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13424-13429.
43. Johnston, J. J., Sapp, J. C., Turner, J. T., Amor, D., Aftimos, S., Aleck, K. A., ve diğ., Day, R. (2010). Molecular analysis expands the spectrum of phenotypes associated with GLI3 mutations. *Human mutation*, 31(10), 1142-1154.
44. Mee, L., Honkala, H., Kopra, O., Vesa, J., Finnilä, S., Visapää, I., ve diğ., Peltonen, L. (2005). Hydroletharus syndrome is caused by a missense mutation in a novel gene HYLS1. *Human molecular genetics*, 14(11), 1475-1488.
45. Kondo, S., Schutte, B. C., Richardson, R. J., Bjork, B. C., Knight, A. S., Watanabe, Y., ve diğ., McDonald-McGinn, D. M. (2002). Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics*, 32(2), 285.
46. Laumonier, F., Holbert, S., Ronce, N., Faravelli, F., Lenzner, S., Schwartz, C. E., ve diğ., Tuy, F. P. D. (2005). Mutations in PHF8 are associated with X linked mental retardation and cleft lip/cleft palate. *Journal of medical genetics*, 42(10), 780-786.
47. Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., ve diğ., Negus, K. (1996). Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6), 841-851.
48. Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., ve diğ., Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, 272(5268), 1668-1671.
49. Suzuki, K., Hu, D., Bustos, T., Zlotogora, J., Richieri-Costa, A., Helms, J. A. ve Spritz, R. A. (2000). Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nature genetics*, 25(4), 427.
50. Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S. W., ve diğ., Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics*, 14(3), 357.
51. Wallis, D. E., Roessler, E., Hehr, U., Nanni, L., Wiltshire, T., Richieri-Costa, A., ve diğ., Muenke, M. (1999). Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics*, 22(2), 196.
52. Milunsky, J. M., Maher, T. A., Zhao, G., Roberts, A. E., Stalker, H. J., Zori, R. T., ve diğ., Lin, A. E. (2008). TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1171-1177.
53. Gripp, K. W., Wotton, D., Edwards, M. C., Roessler, E., Ades, L., Meinecke, P., ve diğ., Elledge, S. J. (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nature genetics*, 25(2), 205.

54. Celli, J., Duijf, P., Hamel, B. C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A. P., ve diğ., Woods, C. G. (1999). Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*, 99(2), 143-153.
55. McGrath, J. A., Duijf, P. H., Doetsch, V., Irvine, A. D., Waal, R. D., Vanmolkot, K. R., ve diğ., Orlow, S. J. (2001). Hay–Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Human molecular genetics*, 10(3), 221-230.
56. Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., ve diğ., Müller, U. (2004). Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *The American Journal of Human Genetics*, 74(3), 558-563.
57. Ng, D., Thakker, N., Corcoran, C. M., Donnai, D., Perveen, R., Schneider, A., ve diğ., Van Der Smagt, J. J. (2004). Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nature genetics*, 36(4), 411.
58. Vissers, L. E., van Ravenswaaij, C. M., Admiraal, R., Hurst, J. A., de Vries, B. B., Janssen, I. M., ve diğ., Schoenmakers, E. F. (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature genetics*, 36(9), 955.
59. Morgan, N. V., Brueton, L. A., Cox, P., Grealley, M. T., Tolmie, J., Pasha, S., ve diğ., Morton, J. E. (2006). Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNG) cause lethal and Escobar variants of multiple pterygium syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 79(2), 390-395.
60. Snead, M. P. ve Yates, J. R. (1999). Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome. *Journal of medical genetics*, 36(5), 353-359.
61. Waterham, H.R. (2001). Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Human Genetic*. 69, 685–694.
62. Wassif, C. A., Maslen, C., Kachilele-Linjewile, S., Lin, D., Linck, L. M., Connor, W. E., ve diğ., Porter, F. D. (1998). Mutations in the human sterol Δ 7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 63(1), 55-62.
63. Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., ve diğ., Shendure, J. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature genetics*, 42(1), 30.
64. Dodé, C., Levilliers, J., Dupont, J. M., De Paepe, A., Le Dû, N., Soussi-Yanicostas, N., ve diğ., Pêcheux, C. (2003). Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature genetics*, 33(4), 463.
65. Reardon, W., Winter, R. M., Rutland, P., Pulleyn, L. J., Jones, B. M. ve Malcolm, S. (1994). Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nature genetics*, 8(1), 98.
66. Wilkie, A. O., Slaney, S. F., Oldridge, M., Poole, M. D., Ashworth, G. J., Hockley, A. D., ve diğ., Malcolm, S. (1995). Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature genetics*, 9(2), 165.

67. Robertson, S. P., Twigg, S. R., Sutherland-Smith, A. J., Biancalana, V., Gorlin, R. J., Horn, D., ve diğ., Ørstavik, K. H. (2003). Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature genetics*, 33(4), 487.
68. Krakow, D., Robertson, S. P., King, L. M., Morgan, T., Sebald, E. T., Bertolotto, C., ve diğ., Aftimos, S. (2004). Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nature genetics*, 36(4), 405.
69. Fang, J., Dagenais, S. L., Erickson, R. P., Arlt, M. F., Glynn, M. W., Gorski, J. L., ve diğ., Glover, T. W. (2000). Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1382-1388.
70. Clifton-Bligh, R. J., Wentworth, J. M., Heinz, P., Crisp, M. S., John, R., Lazarus, J. H., ve diğ., Chatterjee, V. K. (1998). Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nature genetics*, 19(4), 399.
71. Andelfinger, G., Tapper, A. R., Welch, R. C., Vanoye, C. G., George, A. L. ve Benson, D. W. (2002). KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), 663-668.
72. Ng, S. B., Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Hannibal, M. C., McMillin, M. J., Gildersleeve, H. I., ve diğ., Lee, C. (2010). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nature genetics*, 42(9), 790.
73. Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L. A., Yaeger, D., ve diğ., Nowaczyk, M. J. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature genetics*, 36(6), 631.
74. Tonkin, E. T., Wang, T. J., Lisgo, S., Bamshad, M. J. ve Strachan, T. (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nature genetics*, 36(6), 636.
75. Kalscheuer, V. M., Freude, K., Musante, L., Jensen, L. R., Yntema, H. G., Géczy, J., ve diğ., Gurok, U. (2003). Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nature genetics*, 35(4), 313.
76. FitzPatrick, D. R., Carr, I. M., McLaren, L., Leek, J. P., Wightman, P., Williamson, K., ve diğ., Markham, A. F. (2003). Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. *Human molecular genetics*, 12(19), 2491-2501.
77. Hästbacka, J., de la Chapelle, A., Mahtani, M. M., Clines, G., Reeve-Daly, M. P., Daly, M., ve diğ., Coloma, A. (1994). The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell*, 78(6), 1073-1087.
78. Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanović, M., ve diğ., Brook, J. D. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 372(6506), 525.
79. Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., ve diğ., Wolf, U. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, 79(6), 1111-1120.

80. Benko, S., Fantès, J. A., Amiel, J., Kleinjan, D. J., Thomas, S., Ramsay, J., ve diğ., McBride, D. (2009). Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nature genetics*, 41(3), 359.
81. Packham, E. A. ve Brook, J. D. (2003). T-box genes in human disorders. *Human molecular genetics*, 12, R37-R44.
82. Braybrook, C., Doudney, K., Marçano, A. C. B., Arnason, A., Bjornsson, A., Patton, M. A., ve diğ., Stanier, P. (2001). The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nature genetics*, 29(2), 179.
83. Group, T. T. C. S. C., Dixon, J., Edwards, S. J., Gladwin, A. J., Dixon, M. J., Loftus, S. K., ve diğ., Wasmuth, J. J. (1996). Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nature Genetics*, 12(2), 130.
84. Loeys, B. L., Chen, J., Neptune, E. R., Judge, D. P., Podowski, M., Holm, T., ve diğ., Xu, F. L. (2005). A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nature genetics*, 37(3), 275.
85. Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., De Luna, R. I. O., ve diğ., Jabs, E. W. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature genetics*, 15(1), 36.
86. El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., ve diğ., Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzene syndrome. *Nature genetics*, 15(1), 42.
87. Quaderi, N. A., Schweiger, S., Gaudenz, K., Franco, B., Rugarli, E. I., Berger, W., ve diğ., Marion, R. W. (1997). Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nature genetics*, 17(3), 285.
88. Ferrante, M. I., Feather, S. A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., ve diğ., Malcolm, S. (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 68(3), 569-576.
89. Carinci, F., Scapoli, L., Palmieri, A., Zollino, I. ve Pezzetti, F. (2007). Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 71(10), 1509-1519.
90. Vieira, A. R., Avila, J. R., Daack-Hirsch, S., Dragan, E., Félix, T. M., Rahimov, F., ve diğ., Fang, J. (2005). Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS genetics*, 1(6), e64.
91. Jagomägi, T., Nikopensius, T., Krjutškov, K., Tammekivi, V., Viltrop, T., Saag, M. ve Metspalu, A. (2010). MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *European journal of oral sciences*, 118(3), 213-220.
92. Muenke, M. (2002). The pit, the cleft and the web. *Nature Genetics*, 32(2), 219.
93. Jiang, R., Bush, J. O. ve Lidral, A. C. (2006). Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(5), 1152-1166.

94. Gritli-Linde, A. (2007). Molecular control of secondary palate development. *Developmental biology*, 301(2), 309-326.
95. Kondo, S., Schutte, B. C., Richardson, R. J., Bjork, B. C., Knight, A. S., Watanabe, Y., ve diğ., McDonald-McGinn, D. M. (2002). Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics*, 32(2), 285.
96. Blanton, S. H., Burt, A., Garcia, E., Mulliken, J. B., Stal, S. ve Hecht, J. T. (2010). Ethnic heterogeneity of IRF6 AP-2a binding site promoter SNP association with nonsyndromic cleft lip and palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 47(6), 574-577.
97. Milunsky, J. M., Maher, T. A., Zhao, G., Roberts, A. E., Stalker, H. J., Zori, R. T., ve diğ., Lin, A. E. (2008). TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1171-1177.
98. Richardson, R. J., Dixon, J., Malhotra, S., Hardman, M. J., Knowles, L., Boot-Handford, R. P., ve diğ., Dixon, M. J. (2006). Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nature genetics*, 38(11), 1329.
99. Ingraham, C. R., Kinoshita, A., Kondo, S., Yang, B., Sajan, S., Trout, K. J., ve diğ., Murray, J. C. (2006). Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nature genetics*, 38(11), 1335.
100. Richardson, R. J., Dixon, J., Jiang, R. ve Dixon, M. J. (2009). Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Human molecular genetics*, 18(14), 2632-2642.
101. Thomason, H. ve Dixon, M. (2008). *Encyclopaedia of Life Sciences*, 321, 273-282.
102. Chiquet, B. T., Blanton, S. H., Burt, A., Ma, D., Stal, S., Mulliken, J. B. ve Hecht, J. T. (2008). Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human molecular genetics*, 17(14), 2212-2218.
103. Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., ve diğ., Müller, U. (2004). Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *The American Journal of Human Genetics*, 74(3), 558-563.
104. Juriloff, D. M., Harris, M. J., McMahon, A. P., Carroll, T. J. ve Lidral, A. C. (2006). Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 76(8), 574-579.
105. Carroll, T. J., Park, J. S., Hayashi, S., Majumdar, A. ve McMahon, A. P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental cell*, 9(2), 283-292.
106. Juriloff, D. M., Harris, M. J., Dewell, S. L., Brown, C. J., Mager, D. L., Gagnier, L. ve Mah, D. G. (2005). Investigations of the genomic region that contains the clf1 mutation, a causal gene in multifactorial cleft lip and palate in mice. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(2), 103-113.

107. Lan, Y., Ryan, R. C., Zhang, Z., Bullard, S. A., Bush, J. O., Maltby, K. M., ve diğ., Jiang, R. (2006). Expression of Wnt9b and activation of canonical Wnt signaling during midfacial morphogenesis in mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(5), 1448-1454.
108. Song, L., Li, Y., Wang, K., Wang, Y. Z., Molotkov, A., Gao, L., ve diğ., Pleasure, D. E. (2009). Lrp6-mediated canonical Wnt signaling is required for lip formation and fusion. *Development*, 136(18), 3161-3171.
109. Francis-West, P. H., Robson, L. ve Evans, D. J. (2012). *Craniofacial development the tissue and molecular interactions that control development of the head* (Vol. 169). Springer Science ve Business Media.
110. Hill, R. E., Jones, P. F., Rees, A. R., Sime, C. M., Justice, M. J., Copeland, N. G., ve diğ., Davidson, D. R. (1989). A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes ve Development*, 3(1), 26-37.
111. Jowett, A. K., Vainio, S., Ferguson, M. W., Sharpe, P. T. ve Thesleff, I. (1993). Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. *Development*, 117(2), 461-470.
112. Alappat, S., Zhang, Z. Y. ve Chen, Y. P. (2003). Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell research*, 13(6), 429.
113. Catron, K. M., Wang, H., Hu, G., Shen, M. M. ve Abate-Shen, C. (1996). Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mechanisms of development*, 55(2), 185-199.
114. Bendall, A. J. ve Abate-Shen, C. (2000). Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*, 247(1-2), 17-31.
115. Satokata, I. ve Maas, R. (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature genetics*, 6(4), 348.
116. Vieira, A. R., Castillo, S. T., Aravena, T., Astete, C., Sanz, P., Tastets, M. E., ve diğ., Murray, J. C. (2004). Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate. *Revista médica de Chile*, 132(7), 816-822.
117. Suzuki, Y., Jezewski, P. A., Machida, J., Watanabe, Y., Shi, M., Cooper, M. E., ve diğ., Marazita, M. L. (2004). In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genetics in medicine*, 6(3), 117.
118. Tongkobpetch, S., Siriwan, P. ve Shotelersuk, V. (2006). MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *Journal of human genetics*, 51(8), 671.
119. Jezewski, P. A., Vieira, A. R., Nishimura, C., Ludwig, B., Johnson, M., O'brien, S. E., ve diğ., Romitti, P. A. (2003). Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of medical genetics*, 40(6), 399-407.

120. Suzuki, Y., Jezewski, P. A., Machida, J., Watanabe, Y., Shi, M., Cooper, M. E., ve diğ., Marazita, M. L. (2004). In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genetics in medicine*, 6(3), 117.
121. Liang, J., Von den Hoff, J., Lange, J., Ren, Y., Bian, Z. ve Carels, C. E. (2016). MSX1 mutations and associated disease phenotypes: genotype-phenotype relations. *European Journal of Human Genetics*, 24(12), 1663.
122. Lange, J., Wyrwicz, L. S. ve Vriend, G. (2015). KMAD: knowledge-based multiple sequence alignment for intrinsically disordered proteins. *Bioinformatics*, 32(6), 932-936.
123. Coudert, A. E., Pibouin, L., Vi-Fane, B., Thomas, B. L., Macdougall, M., Choudhury, A., ve diğ., Lezot, F. (2005). Expression and regulation of the Msx1 natural antisense transcript during development. *Nucleic acids research*, 33(16), 5208-5218.
124. MacKenzie, A., Purdie, L., Davidson, D., Collinson, M. ve Hill, R. E. (1997). Two enhancer domains control early aspects of the complex expression pattern of Msx1. *Mechanisms of development*, 62(1), 29-40.
125. Ibarra-Arce, A., Albavera-Giles, T., Zavaleta-Villa, B., de Zárata-Alarcón, G. O., Flores-Peña, L., del Carmen Sierra-Romero, M., ve diğ., Olivo-Díaz, A. (2016). MSX1 gene polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip/palate. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 90, 119-124.
126. Salahshourifar, I., Halim, A. S., Sulaiman, W. A. W. ve Zilfalil, B. A. (2011). Contribution of MSX1 variants to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in a Malay population. *Journal of human genetics*, 56(11), 755.
127. Vieira, A. R., Orioli, I. M., Castilla, E. E., Cooper, M. E., Marazita, M. L. ve Murray, J. C. (2003). MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *Journal of dental research*, 82(4), 289-292.
128. Jugessur, A., Lie, R. T., Wilcox, A. J., Murray, J. C., Taylor, J. A., Saugstad, O. D., ve diğ., Åbyholm, F. (2003). Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: A case-parent triad analysis. *Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society*, 24(3), 230-239.
129. Vieira, A. R., Modesto, A., Meira, R., Barbosa, A. R. S., Lidral, A. C. ve Murray, J. C. (2007). Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143(6), 538-545.
130. Vieira, A. R., Meira, R., Modesto, A. ve Murray, J. C. (2004). MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *Journal of dental research*, 83(9), 723-727.
131. Ogawa, T., Kapadia, H., Wang, B. ve D'Souza, R. N. (2005). Studies on Pax9–Msx1 protein interactions. *Archives of oral biology*, 50(2), 141-145.
132. Ogawa, T., Kapadia, H., Feng, J. Q., Raghov, R., Peters, H. ve D'Souza, R. N. (2006). Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18363-18369.

133. Kouskoura, T., Fragou, N., Alexiou, M., John, N., Sommer, L., Graf, D., ve diğ., Mitsiadis, T. A. (2011). The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweizerische Monatsschrift für Zahnmedizin*, 121(7-8), 636-646.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :SEYRAN, Serkan
 Uyuđu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01/06/1985, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 553 259 09 85
 e-mail : ubeydullah06@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Bahçelievler Deneme Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-Halen	Emniyet Genel Müdürlüğü	Polis

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Yüzme, Kitap okuma, Taekwondo.



GAZİ GELECEKTİR..