

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PRADER-WİLLİ SENDROMU BULGULARINI TAŞIYAN  
NORMAL KARYOTİPE SAHİP OLGULARDA  
METİLASYON VE UNİPARENTAL DİZOMİ (UPD)  
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pınar BAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**PRADER-WİLLİ SENDROMU BULGULARINI TAŞIYAN**  
**NORMAL KARYOTİPE SAHİP OLGULARDA**  
**METİLASYON VE UNİPARENTAL DİZOMİ (UPD)**  
**PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pınar BAHŞI

YÜKSEK LİSANS

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2815 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;**

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 27/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER  
Akdeniz niversitesi



ye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM  
Akdeniz niversitesi



ye : Dr. Öğr. Üyesi iğdem AYDIN ACAR  
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan edirim.

Pınar BAHŞI



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER





## TEŐEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca baőladıęım günden itibaren bilimsel desteği, tecrübesi, pozitif enerjisi ve güler yüzü ile bana her alanda yol gösterip, sabır ve ilgiyle yardımlarını esirgemeyen, bana güvenen değerli danışman hocam Doç. Dr. SEZİN YAKUT UZUNER'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaőan ve yol gösteren Anabilim Dalı baőkanımız Pof. Dr. İBRAHİM KESER'e;

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca sahip oldukları bilgileri ve deneyimlerini aktaran ve yol gösteren tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ğretim yesi hocalarıma;

Tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, bir telefonumla elinden gelen her őeyi yapan ve bana inanan değerli dostum MERVE SULTAN EMBEL'e;

Tez çalışmam boyunca laboratuvar kapılarını bana açan, bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan hocam Prof. Dr. SALİH őANLIOęLU'na ve ekibine;

Tez çalışmam süresince deneylerimi yaparken güler yüzlü destekleri ve her türlü yardımları için Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü alıőanlarına;

Tez çalışmam süresince destek ve yardımları için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistanlarına ve sekreterine;

Hayatımın her alanında maddi ve manevi bana emek veren, arkamda duran, eğitim hayatımı ve beni her zaman destekleyen, aldığım karar ne olursa olsun hep yanımda olan, ayaklarımın üzerinde güçlü durabilmeyi öğreten, sevgilerini her koőulda dile getiren ve benimle gurur duyan, benim de gurur duyduğum babam AHMET BAHŞI, annem AYTEN BAHŞI ve kız kardeőim MERVE BAHŞI' ye tüm sevgi ve saygılarımla sonsuz teőekkür ederim.

## ÖZET

**Amaç:** Prader-Willi Sendromu (PWS) klinik olarak fenotipik abnormaliteler, bilişsel yetersizlik ve nörometabolik değişimlerle karakterize multisistemik bir hastalıktır. Genetik açıdan ise 15. kromozomun q11-q13 bölgesinde lokalize olan genlerin defekti ile ilişkilidir. Sağlıklı bireylerde bu bölgenin paternal alelleri aktifken, maternal alelleri damgalanmıştır. Paternal genlerin ekspresyon mekanizmasının bozulması ise PWS' ye sebep olmaktadır. PWS' nin klinik bulgularına farklı kromozomlardaki değişimler de sebep olabilmektedir. Dolayısıyla bu durum hastalığın doğru tanısının konulmasını etkilemekte, klinisyenlerin hangi moleküler testi ne zaman isteyeceğini belirlemede sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmada PWS' nin klinik bulgularını taşıyan olgularda MS-MLPA analizi yaparak genotip-fenotip korelasyonunun sağlanması; böylece PWS ile Prader-Willi Benzeri Sendrom' un moleküler açıdan ayrımı, doğru tanı, doğru genetik danışmanlık ve uygun tedavi sağlanabilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Klinik olarak PWS' nin fenotipik özelliklerini taşıyan, kromozomal olarak normal karyotipe sahip, FISH yöntemi ile 15q11.2-q13 bölgesinde delesyon taşımadığı belirlenmiş 12 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. MS-MLPA yöntemi ile 15q11.2-q13 bölgesinin metilasyon analizi gerçekleştirilmiş; anormal metilasyon paterni gösteren olgulara UPD değerlendirmesi mikrosatellit analizi ile yapılmıştır. Elde edilen veriler mevcut veri tabanları ve literatürle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** 12 olgunun 1 tanesinde anormal metilasyon paterni gözlenmiş ve mekanizmanın aydınlatılabilmesi için mikrosatellit analizi yapılmıştır. Bu olguda anormal metilasyon paterninin UPD' ye bağlı olduğu tespit edilmiştir. 11 olguda ise 15q11.2-q13 bölgesinde herhangi bir değişim saptanmamıştır.

**Sonuç:** 11 olguda herhangi bir değişimin gözlenmemesi bu olguların Prader-Willi Benzeri Sendrom içerisinde yer aldığını göstermiştir. Hastalığın etiyolojisini anlamak, doğru tanı ve genetik danışmanlık verebilmek için daha geniş hasta grubuna sahip çalışmalar yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** prader-willi sendromu, ms-mlpa, 15q11.2-13 metilasyon profili, prader-willi benzeri sendrom, upd

## ABSTRACT

**Objective:** Prader-Willi Syndrome (PWS) is a multisystemic disease characterized by clinical phenotypic abnormalities, cognitive impairment, and neurometabolic changes. Genetically, it is associated with the defect of genes localized in the q11-q13 region of chromosome 15. While paternal chromosome of this region is active in healthy individuals, maternal chromosome is imprinted. Disruption of the expression mechanism of the paternal genes causes PWS. Chromosomal changes in different chromosomes can also cause clinical signs of PWS. Therefore, this situation affects the correct diagnosis of the disease and it is a problem in determining when and which molecular test will be wanted by the clinicians. In this study, we aimed to provide the genotype-phenotype correlation by performing MS-MLPA in cases having clinical signs of PWS; to differentiate between PWS and Prader-Willi-Like Syndrome on a molecular basis; to provide accurate diagnosis, proper genetic counseling and appropriate treatment.

**Method:** 12 cases having clinical signs of PWS, normal karyotype and no deletion on 15q11-q13 region confirmed by FISH, were included in the study. Methylation analysis of 15q11.2-q13 was performed by MS-MLPA method; microsatellite analysis for evaluating UPD was performed in cases having abnormal methylation pattern. The results were evaluated by comparing current literature and databases.

**Results:** Abnormal methylation pattern was observed in 1 of 12 cases and microsatellite analysis was performed to understand the mechanism of abnormal methylation. In this case, abnormal methylation pattern was determined to be related to UPD. In 11 cases, no genetic changes were observed on 15q11.2-q13 region

**Conclusion:** No chromosomal and genetic changes in 11 cases showed that these cases were included in Prader-Willi-Like Syndrome. To understand the etiology of the disease, to provide accurate diagnosis and genetic counseling studies with a larger group of patients are required.

**Key words:** prader-willi syndrome, ms-mlpa, methylation profile of 15q11.2-q13, prader-willi like syndrome, upd

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Prader-Willi Sendromu (PWS)' nin tarihçesi	3
2.2. PWS' nin epidemiyolojisi	3
2.3. Tanı kriterleri	4
2.3.1. Majör kriterler	4
2.3.2. Minör kriterler	4
2.3.3. Destekleyici kriterler	5
2.4. PWS' nin klinik bulguları	5
2.4.1. Prenatal karakteristik özellikler	5
2.4.2. Hipotoni	6
2.4.3. Hipogonadizm	6
2.4.4. Hiperfaji ve obezite	7

2.4.5. Dismorfik özellikler	8
2.4.6. Davranışsal ve psikiyatrik bozukluklar	8
2.4.7. Gelişimsel ve bilişsel gecikmeler	8
2.4.8. Kısa boy ve büyüme hormonu eksikliği	9
2.4.9. Hipotiroidizm	9
2.4.10. Uyku bozuklukları	10
2.5. PWS' nin genetiği ve oluşum mekanizmaları	10
2.5.1. Kromozom 15q11-q13 bölgesinin mikrolelesyonu (paternal delesyon-del(15)(q11-q13)	11
2.5.2. Maternal uniparental dizomi (mat UPD 15)	13
2.5.3. Genomik damgalama hataları	15
2.6. 15q11-q13 bölgesinde eksprese olan aday genler	17
2.7. Genetik tanı testleri	19
2.7.1. MS-MLPA Çalışma Prensipli	24
2.8. Genetik danışma	25
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>28</b>
3.1. Hastaların seçimi	28
3.2. gDNA izolasyonu	29
3.3. DNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi	30
3.4. MS-MLPA	30

3.5. MS-MLPA sonuçlarının analizi	34
3.6. Mikrosatellit analizi	34
<b>4. BULGULAR</b>	<b>38</b>
4.1. Hastaların değerlendirilmesi	38
4.2. Normal metilasyon profili tespit edilen olgular	39
4.3. Anormal metilasyon profili tespit edilen olgular	39
4.3.1. Olgu 2	39
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>49</b>
<b>EKLER</b>	
Ek 1. Aydınlatılmış Onam Formu	59
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>65</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> PWS’ de gözlenen beslenmenin klinik evreleri	7
<b>Tablo 2.2.</b> PWS’ nin tanısında kullanılan genetik testler	24
<b>Tablo 3.1.</b> Kopya sayısı ve metilasyon oranı sonuçlarının değerlendirilmesi	34
<b>Tablo 3.2.</b> Olgu, anne ve babanın PZR ürünlerinin mikrosatellit analizi için jele yükleme sırası. Olgu: A, Anne: A, Baba: B, Markır: M, Negatif Kontrol: NK.	37
<b>Tablo 4.1.</b> Hasta grubunun majör ve minör bulguları	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> PWS' nin genel oluşum mekanizmaları ve görülme sıklıkları	11
<b>Şekil 2.2.</b> <i>HERC2</i> içeren BP1, BP2 ve BP3 kırık noktalarının konumu ile BP1 ve BP2 kırık noktaları arasında imprint olmayan genlerin pozisyonunu gösteren yüksek çözünürlüklü ideogram	12
<b>Şekil 2.3.</b> Trizomiden kaçış mekanizması	14
<b>Şekil 2.4.</b> Maternal UPD' ye sebep olan mekanizmaların şematik gösterimi	15
<b>Şekil 2.5.</b> Sitozin bazının 5. karbonuna metil grubunun takılması	16
<b>Şekil 2.6.</b> 15q11-q13 bölgesinde lokalize olan genlerin şematik gösterimi	18
<b>Şekil 2.7.</b> PWS tanısında uygulanacak genetik testlerin algoritması	21
<b>Şekil 2.8.</b> PWS tanısında MS-MLPA Analizi' nin algoritması	23
<b>Şekil 2.9.</b> MS-MLPA Çalışma Prensibi	25
<b>Şekil 4.1.</b> Olgu 2' nin şişkin, kısa ve küçük parmaklar gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf	39
<b>Şekil 4.2.</b> Olgu 2' nin küçük el-ayak, hiperfaji ve obezite, badem göz gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf	40
<b>Şekil 4.3.</b> Olgu 2' nin küçük ve kısa ayak parmaklar gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf	40
<b>Şekil 4.4.</b> Kesim yapılmamış kontrol DNA' nın kopya sayısı değişimini gösteren kapiller elektroforez paterni	41



<b>Şekil 4.5.</b> Kesim yapılmamış kontrol DNA' nın kopya sayısı değişimini gösteren Coffalyser.net Ratio Chart çıktısı	41
<b>Şekil 4.6.</b> Olgu 2' nin kopya sayısı değişimini gösteren kesim yapılmamış DNA Kapiller elektroforez paterni	42
<b>Şekil 4.7.</b> Olgu 2' nin kopya sayısı değişimini gösteren kesim yapılmamış DNA örneğinin Coffalyser.net Ratio Chart çıktısı	42
<b>Şekil 4.8.</b> Olgu 2' nin anormal metilasyon patni gösteren Coffalyser.net Ratio Chart çıktıları	43
<b>Şekil 4.9.</b> D15S811, D15S817 ve D15S822 primerleri kullanılarak kurulan Touch-Down PZR sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin %3' lük agaroz jel görüntüsü	44

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ART</b>	: Yardımcı Üreme Teknolojileri
<b>AS</b>	: Angelman Sendromu
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>BMI</b>	: Vücut Kitle İndeksi
<b>BP</b>	: Kırık Noktası
<b>CMA</b>	: Kromozomal Mikrodizin
<b>Del</b>	: Delesyon
<b>DNMT</b>	: DNA Metil Transferaz
<b>FISH</b>	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>gDNA</b>	: Genomik DNA
<b>GIFT</b>	: Gamet Intrafallopian Transferi
<b>IC</b>	: Damgalama Merkezi
<b>ICSI</b>	: Intrasiytoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>ID</b>	: Damgalama hataları
<b>IVF</b>	: In Vitro Fertilizasyon
<b>Mat</b>	: Maternal
<b>Mb</b>	: Megabaz
<b>MLPA</b>	: Çoklu Ligasyon Prob Amplifikasyonu
<b>MS-MLPA</b>	: Metilasyon-Spesifik Çoklu Ligasyon Prob Amplifikasyonu

<b><i>NDN</i></b>	: Nekdin geni
<b>ORF</b>	: Açık okuma çerçevesi
<b>Pat</b>	: Paternal
<b>PWS</b>	: Prader-Willi Sendromu
<b>PWLS</b>	: Prader-Willi Benzeri Sendrom
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b><i>SNRPN</i></b>	: Küçük ribonükleoprotein geni
<b>STR</b>	: Kısa Tekrar Dizileri
<b>TRH</b>	: Tiroid Salgılayan Hormon
<b>TSH</b>	: Tiroid Uyarıcı Hormon
<b>UPD</b>	: Uniparental Dizomi
<b>UTR</b>	: Translasyona uğramayan bölge
<b>ZIFT</b>	: Zigot Intrafallopian Transferi

## 1. GİRİŞ

Prader-Willi Sendromu (PWS); fenotipik abnormaliteler, bilişsel yetersizlik ve nörometabolik değişimlerle karakterize olup; çoğu organ sistemini etkileyen multisistemik bir hastalıktır. Prevalansı 1/10,000-1/30,000 olan bu hastalık klinik olarak; emmede zayıflık ve gelişme geriliği ile gözlenen infantil hipotoni, genital hipoplaziye ve pubertal yetmezliğe sebep olan hipogonadizm, karakteristik yüz özellikleri, erken çocukluk dönemi başlangıçlı obezite ve hiperfaji, gelişimsel gecikme ya da hafif bilişsel yetersizlik, kısa boy ve kendine özgü davranışsal bir fenotip ile karakterizedir (Holm ve ark., 1993; Cassidy ve Driscoll, 2009; Cassidy ve ark., 2012). 1887 yılında Langdon-Down tarafından PWS' nin bir takım klinik bulguları saptanmış, bundan 70 yıl sonra medikal literatürde ilk olarak 1956 yılında Prader ve arkadaşları tarafından benzer fenotipe sahip hastalar rapor edilmiştir. 1981 yılında ise Ledbetter ve arkadaşları tarafından bu hastalığın 15 numaralı kromozomlardan birinin uzun kolundaki ara delesyonla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Ledbetter ve ark., 1981). Daha sonra ise bu hastalığın genomik damgalama (genomik imprinting) ve Uniparental Dizomi (UPD) ile ortaya çıktığı gösterilmiştir (Cassidy ve Driscoll, 2009). Genomik damgalama bozukluğu olarak da bilinen bu hastalık, ebeveynlerden kalıtılan alellerdeki genlerin farklı ifade edilmesine bağlı olarak ortaya çıkar. PWS ile ilişkili genler kromozom 15q11.2-q13 bölgesinde lokalize olup, bu genlerden PWS oluşumunda en aktif rol alan gen ise küçük ribonükleoprotein geni (small ribonucleoprotein, *SNRPN* geni) dir. Bu genler sağlıklı bireylerde paternal (baba kaynaklı) 15 numaralı kromozomda eksprese olurken; maternal (anne kaynaklı) 15 numaralı kromozomda epigenetik faktörler tarafından susturulmuş olup eksprese edilmezler (Ledbetter ve ark., 1981; Holm ve ark., 1993; Abdilla ve ark., 2017). Gen ekspresyonu veya regülasyonunun “açık ya da kapalı” aktivitesi genellikle spesifik bazlarda (örn., sitozin) DNA metilasyonu ile gerçekleşir. İnsanda yaklaşık 150 genin damgalanmış olduğu ve metillenmiş CpG' ce zengin DNA bölgeleri içerdiği düşünülmektedir ki bunların bazıları da kromozom 15 üzerinde lokalizedir (M. G. Butler, 2009). Dolayısıyla gametogenez sırasında meydana gelen genomik damgalama hataları; normalde aktif olan ve paternal kalıtılan genlerin ekspresyon mekanizmasının bozulması sonucu PWS oluşumuna sebep olmaktadır

(Varela ve ark., 2005). Bu bozulmalar, ilgili gen bölgesinde delesyon ya da UPD sonucu ortaya çıkar. Bir kromozomun tamamının ya da bir parçasının iki kopyasının tek bir ebeveynden alınması ve diğer ebeveyne ait herhangi bir kopyanın bulunmaması UPD ile sonuçlanır. Yumurta veya sperm oluşumu sırasında ya da erken fetal gelişimde rastgele ortaya çıkabilir (Robinson, 2000; Bittel ve Butler, 2005; M. G. Butler, 2006; Cassidy ve ark., 2012). Yukarıda bahsedilen bu mekanizmalar arasında, paternal 15q11-q13 bölgesinin delesyonu en sık karşılaşılan mekanizma olup, olguların %70' inde gözlenirken; maternal 15 numaralı kromozomun UPD' si ise olguların yaklaşık %25' inde karşımıza çıkmaktadır. Bir diğer mekanizma ise kalıtsal damgalama merkezindeki (IC) hatalardır ve olgularda yaklaşık %2,5 oranında gözlenir. Bu hatalar IC' de bir mikrodelsiyonun olması ya da bu bölgenin metillenmesi ile oluşmaktadır. Diğer üç mekanizmaya göre daha nadir gözlenen mekanizma ise ebeveynlerdeki dengeli translokasyonlardır ve olguların <%1' inden azında gözlenir (Goldstone, 2004; Rocha ve Paiva, 2014; M. G. Butler ve ark., 2016). PWS' nin klinik bulgularına sadece 15q11-q13 bölgesinde gözlenen genetik değişimler değil; farklı kromozomların belli bölgelerindeki değişimler de sebep olmaktadır ve bu grup olgular Prader-Willi Benzeri Sendrom içerisinde yer almaktadırlar (Docherty ve ark., 2014; Rocha ve Paiva, 2014; M. G. Butler ve ark., 2016). Dolayısıyla klasik PWS' nin diğer kromozomal anomaliler sonucu oluşan hastalıklarla örtüşmesi, hastalığın doğru tanısını etkilemekte ve klinisyenlerin hangi moleküler testi ne zaman isteyeceğini belirlemede sorun oluşturmaktadır. Ayrıca, doğru genetik danışmanlık ve tedavi sağlamak için klasik PWS' nin, Prader-Willi Benzeri Sendrom' dan genetik açıklamalar ile doğru bir şekilde ayrılması gerekmektedir.

Bu çalışmada PWS' nin klinik bulgularını taşıyan olgularda metilasyon analizi yaparak genotip-fenotip arasında bir korelasyon sağlanması; böylece PWS ile Prader-Willi Benzeri Sendrom' un moleküler açıdan ayrımı ve böylece doğru tanı, doğru genetik danışmanlık ve uygun tedavi sağlanabilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Prader-Willi Sendromu (PWS)' nun Tarihçesi

PWS' nin klinik özelliği ilk olarak 1887 yılında J. Langdon Down tarafından bildirilmiştir ve bu klinik özelliği vücutta artan yağ dokusunun artması yani şişmanlık olarak tanımlamıştır. Fakat bu sendromu Prader, Labhart ve Willi medikal literatürde ilk olarak 1956 yılında bilişsel yetersizlik, obezite, hipogonadizm ve hipomani bulgularını taşıyan dokuz olguda tanımlamışlardır. PWS de adını bu üç hekimden almaktadır (Prader, Labhart ve Willi) (Mahgoub, 2007; M. G. Butler, 2011). 1981 yılında ise Ledbetter ve arkadaşları paternal 15 numaralı koromozomun proksimal kolunda bazı genlerin delesyonunu tanımlamış ve bu delesyonun PWS' ye neden olduğunu rapor etmişlerdir (Ledbetter ve ark., 1981). Maternal 15 numaralı kromozomun delesyonu ise Angelman Sendromuna sebep olmaktadır. Bu sendrom kız kardeş sendromu olarak adlandırılır. Bu kalıtım paterni yani anneden veya babadan aktarılmasına bağlı olarak genlerin farklı ifade edilmesi genomik damgalama (genomic imprinting) olarak adlandırılmaktadır. (Mahgoub, 2007; Abdilla ve ark., 2017). Ayrıca PWS, genomik damgalama ile ilişkili ve bu sendromun ortaya çıkmasında UPD' nin etkili olduğu gösterilen ilk hastalıktır (Cassidy ve Driscoll, 2009).

### 2.2. PWS' nin Epidemiyolojisi

PWS, obezitenin en sık gözlenen sendromik formu olup, prevalansı 1/10.000–30.000' dir ve her iki cinsiyette eşit oranda gözlenmektedir (M. G. Butler, 2006; Tuysuz ve ark., 2014). Tüm ırklarda görülmekle beraber; Kafkaslarda daha yaygındır (M. G. Butler, 2009). Bu hastalığın mortalitesi yılda yaklaşık olarak %3' tür (Cassidy ve ark., 2012).

Yardımcı Üreme Teknolojileri (Asisted Reproductive Technologies; ART); Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (The Center for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından tek başına yumurta veya spermin değil, hem yumurtaların hem de spermlerin birlikte kullanımını içeren doğurganlık tedavileri olarak tanımlanmaktadır. Bu prosedürler; in vitro fertilizasyon (IVF), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamet intrafallopian transferi (GIFT) ve zigot intrafallopian transferini (ZIFT) içerir (Maher, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, damgalama bozukluklarına bağlı ortaya çıkan hastalıklar ile ART arasında bir ilişkinin olup olmadığına yönelik kanıtlar ortaya sunmuştur. Bu çalışmalara göre; ART ile doğan çocuklar içinde damgalama bozukluğu ile ortaya çıkan hastalıklara örnek olarak Angelman ve Beckwith-Wiedemann Sendromları gösterilmiştir (G. F. Cox ve ark., 2002; Sutcliffe ve ark., 2006; Amor ve Halliday, 2008; Gold ve ark., 2014). Gold ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada ise PWS ile ART arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (Gold ve ark., 2014).

### **2.3. Tanı Kriterleri**

1993 yılında Holm ve arkadaşları 113 hastayı değerlendirerek PWS'nin tanısı için gerekli olan kriterleri belirlemiş ve bu kriterleri üç grupta toplamışlardır (Holm ve ark., 1993). PWS'nin majör, minör ve desteleyici kriterleri sırasıyla aşağıdaki gibidir.

#### **2.3.1. Majör Kriterler**

- Neonatal ve infantil dönemde emme güçlüğü ile karakterize santral hipotoni
- İnfantil dönemde beslenme problemleri
- 1-12 yaş arasında aşırı ve hızlı kilo alımı
- Dolikosefali, dar yüz, badem göz, ince-üst dudaklı küçük ağız ile karakterize yüz bulguları
- Hipogonadizm
- 6 yaşından küçüklerde gelişme geriliği, 6 yaşından büyüklerde ise hafif-orta bilişsel yetersizlik ve öğrenme güçlüğü
- Hiperfaji
- 15q11-13 bölgesinde delesyon, maternal dizomi ya da bu bölgede moleküler düzeyde değişimler

#### **2.3.2. Minör Kriterler**

- İnfantil dönemde azalmış fetal hareketler, infantil letarji, zayıf ağlama
- Öfke nöbetleri, obsesif/kompulsif davranışlar, inatçı olma, sürekli aynı kelimeyi tekrarlama-takılıp kalma, çalmak, yalan söylemek, karşıt görüşlü olmak gibi karakteristik davranış problemleri (5 ya da daha fazlası gerekli)
- Uyku bozukluğu ya da uyku apnesi
- Hipopigmentasyon

- Küçük el ve/veya ayak
- Ezotropi, miyop gibi göz abnormaliteleri
- Konuşma kusurları
- Ağız köşelerinde kabuklanma ile birlikte kalın viskoz tükürük

### 2.3.3. Destekleyici Kriterler

- Yüksek acı eşik değeri
- Azalmış kusma refleksi
- İnfantil dönemde vücut sıcaklığında dengesizlik veya daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde değişen vücut sıcaklığına karşı artan duyarlılık
- Skolyoz ve/veya kifoz
- Erken adrenarş
- Osteoporoz

**Skorlama:** Majör kriterlere 1 puan ve minör kriterlere 0,5 puan verilmektedir. Yenidoğan-3 yaş arasında, dördü majör kriter olmak üzere 5 puan ve üzeri; 3 yaş-adölesan dönem arasında, beşi majör kriterlerden olmak üzere 8 puan ve üzerindeki skorlar değerlendirmeye alınır ve PWS tanısı koyduran skorlar olarak kabul edilir.

### 2.4. PWS' nin Klinik Bulguları

PWS iki ana klinik evreden oluşmaktadır. Birinci evre neonatal ile infantal dönem arasını kapsamaktadır. Bu evre farklı hipotoni derecesi, zayıf ağlama, dar yüz, gelişimsel gecikme, emmede zayıflık, beslenme problemleri ve hipogonadizm ile karakterizedir. İkinci evre ise genellikle 2 yaşında başlar. Gelişimsel ve psikomotor gecikme ile birlikte hiperfaji ve obezite ile karakterizedir.

#### 2.4.1. Prenatal Karakteristik Özellikler

PWS' li bebeklerin doğum ağırlığı, boyları ve vücut kitle indeksi (Body Mass Index; BMI) etkilenmeyen kardeşlerine göre %15-20 oranında daha azdır; bu da büyümenin prenatal olarak anormal olduğunu göstermektedir. Prenatal hipotoni genellikle azalmış fetal harekete, doğumda anormal fetal pozisyona ve yardımlı doğum veya sezaryen oranının artmasına neden olmaktadır (M. G. Butler ve ark., 2011; Cassidy ve ark., 2012).



### 2.4.2. Hipotoni

İnfantil hipotoni azalmış spontan uyarılma, zayıf ağlama, uyuşukluk ve emme güçlüğü ile karakterizedir. Emme güçlüğü ve uyuşukluk erken bebeklik döneminde gelişmemeye neden olur ve ağızdan besleme veya biberon kullanımı genellikle haftalar veya aylar alabilir (McCandless ve Committee on, 2011; Cassidy ve ark., 2012). Hipotoni santral kökenlidir ve hafif-orta şiddette ömür boyu devam eder ve o kadar karakteristiktir ki açıklanamayan kalıcı hipotonisi olan tüm yenidoğanlarda PWS için test yapılmalıdır (Cassidy ve Driscoll, 2009).

### 2.4.3. Hipogonadizm

“Konjenital hipogonadizm” terimi, hipotalamik kökenli olup; Lüteinleştirici Hormon’ un, Folikül Uyarıcı Hormon’ un ve gonadal steroidlerin yetersiz salgılanmasından dolayı tam veya kısmi pubertal yetmezliği ifade eder. Hipogonadizm, PWS' yaygın bir klinik özelliktir (Macedo ve ark., 2014; Angulo ve ark., 2015). Her iki cinsiyette de, hipogonadizm yaşam boyunca genital hipoplazi, eksik pubertal gelişim ve büyük çoğunlukta infertilite olarak kendini gösterir (Crino ve ark., 2003).

Erkeklerde penisin küçük olabilmemesinin yanı sıra en karakteristik özelliği küçük, olması gerekenden daha az sert ve zayıf pigmentli hipoplazik skrotumdur, yani testisler torbaya inmemiştir ve yassı görünümündedir. Tek taraflı veya iki taraflı kriptorşidizm PWS’ li erkek olguların %80–90’ ında görülmektedir. Ayrıca ses değişimi, yetersiz sakal ve vücut kılı vardır (Cassidy ve Driscoll, 2009; Cassidy ve ark., 2012).

Kadınlarda, genital hipoplazi genellikle göz ardı edilmesine rağmen; klitoris ve labia, özellikle labia minora genellikle küçüktür. Hipogonadizm tamamlanmamış, gecikmiş ve bazen de düzensiz pubertal gelişime sebep olur.

Erken dönemde adrenarş, her iki cinsiyette yaklaşık %15-20 oranında görülür. Primer amenore veya oligomenore kadınlarda bulunur. Kısırlık, her iki cinsiyette de gözlenir, ancak bazı dişi olgularda üreme teknikleri kullanılarak fertilizasyonun sağlandığı rapor edilmiştir (Akefeldt ve ark., 1999; Schulze ve ark., 2001; Crino ve ark., 2003).

#### 2.4.4. Hiperfaji ve Obezite

Hiperfaji, hipotalamik fonksiyonların bozulması sonucu gözlenen tokluk hissi eksikliğidir (M. G. Butler, Theodoro, Bittel, ve ark., 2007). Yiyecek aramak, yiyecek almak için para çalmak vb. aktiviteler ve horlama oldukça yaygındır. Eğer alınan besinler kontrol edilmezse, düşük metabolik hız ve azalmış aktivite sonucu merkezi obezite ile sonuçlanır. Obezitenin komplikasyonları, morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleridir. Kardiyorespiratuar yetmezlik, obstrüktif uyku apnesi, tromboflebit ve kronik bacak ödemi bu komplikasyonlara örnek verilebilir (J. V. Butler ve ark., 2002).

Klasik olarak PWS' de beslenmenin iki temel evresi tanımlanmıştır. 1. Evre; bireyin genellikle zayıf beslenme ve hipotoni sonucu gelişiminde yavaşlamanın görülmesi. 2. Evre ise obeziteye yol açan hiperfajinin görülmesi (M. G. Butler, 2006; Aycan ve Bas, 2014). Ancak son zamanlarda yapılan bir çalışmada, PWS' li bireylerde hiperfajiden obeziteye geçişin tipik olarak ilerlediği yedi farklı evrenin olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.1). İştahtaki artış 4.5-8 yaşlarında Evre 2b' de görülürken, Evre 3 sırasında klasik hiperfaji belirginleşir (Miller ve ark., 2011; Angulo ve ark., 2015).

**Tablo 2.1.:** PWS' de gözlenen beslenmenin klinik evreleri (Angulo ve ark., 2015).

Evreler	Yaş aralığı	Klinik Belirtiler
0	Doğum öncesi 0-9 ay	Azalan fetal hareketler normalden daha düşük ağırlık
1a	Doğum sonrası 0-9 ay	Beslenme güçlüğü ve iştah azalması ile hipotoni
1b	9-25 ay	Gelişmiş beslenme ve iştah ile normal büyüme
2a	2.1-4.5 yaş	İştah veya aşırı kalori alımı artışı olmadan ağırlık artışı
2b	4.5-8 yaş	Artan iştah ve kalori
3	8 yaş-ergenlik dönemi	Hiperfajik, nadiren doymuş hisseder
4	Ergenlik dönemi sonrası	Kontrol altına alınamayan iştah

Son yirmi yılda iştah açıcı davranışların, vücut kompozisyonunun ve enerji harcamasını kontrol eden mekanizmaların aydınlatılması için yapılan çalışmalarda ciddi bir artış gözlenmektedir. Merkezi sinir sistemi boyunca birçok bölge bu süreçlerde kritik rol oynamaktadır, ancak özellikle hipotalamus enerji dengesini sağlamak için çeşitli

sinyaller alır ve düzenler (Angulo ve ark., 2015). Girelin hormonu midede üretilen 28 amino asitlik bir peptid olup, tokluk sinyalini ileten tek periferik hormondur. Birey, yeterli gıda alımını sağladığında kandaki girelin seviyesi düşmektedir. Ancak obez PWS bireylerinde plazma girelin seviyesi diğer obezite formlarından daha yüksektir ve bu olgularda obeziteye sebep olan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Whitman ve Accardo, 1987; Bilgin, 2006; Cassidy ve Driscoll, 2009).

#### **2.4.5. Dismorfik Özellikler**

Karakteristik yüz özellikleri arasında dar bifrontal çap, badem şeklinde palpebral fissürler, dar burun köprüsü bulunur. Bu özellikler doğumda belirgin olabileceği gibi olmaya da bilir ve zamanla gelişebilir. Ellerde, hipoplazik ulnar şişkinlik gözlenir ve küçük çocuklarda avuç içi ve parmaklar kabarık olabilir, parmaklar sivri görünebilir. Ayrıca bu dismorfik özellikleri gösteren olgularda *OCA2* geninin de bir kopyasının kaybedilmesi saç, göz ve cilt hipopigmentasyonu ile sonuçlanır (*OCA2* geninin homozigot kaybı, tirozinaz pozitif albinodizme neden olmaktadır) (Cassidy ve ark., 2012). Bunlara ek olarak olguların %60-70' inde şaşılık gözlenirken; %40-80' inde skolyoz mevcuttur (West ve Ballock, 2004).

#### **2.4.6. Davranış Bozuklukları**

Öfke nöbetleri, inatçılık, manipülatif davranışlar, rutinini değiştirme zorluğu olan karakteristik bir davranış profili, PWS' li bireylerin %70-90' ında erken çocuklukta belirginleşir (Dykens ve ark., 1999). Bu davranışsal özelliklerin bazıları otizm kriterlerine de uymakta olup, semptomların yaş ve vücut kitle indeksi arttıkça kötüleştiği düşünülmektedir. Psikoz, etkilenen bireylerin %10-20' sinde genç erişkinlikte belirgindir. Davranışsal ve psikiyatrik problemler en çok ergenlik ve yetişkinlikte yaşam kalitesini etkilemektedir (Clarke ve ark., 2002; Vogels ve ark., 2004).

#### **2.4.7. Gelişimsel ve Bilişsel Gecikmeler**

PWS' li olguların kaba motor ve konuşma becerilerinin gelişimi gecikmiştir ve olgular on iki ayda oturabilmekte, yirmi dört ayda yürüyebilmekte ve iki yılda kelimeleri yeni yeni çıkarabilmektedir. Bilişsel yetersizlik okul çağında belirgindir. PWS' li olguların çoğunun hafif zihinsel yetersizliği (ortalama IQ: 60-70) olup; yaklaşık %40' ında sınırdan,

yaklaşık %20' sinde ise orta derecede bilişsel gecikme vardır (Dykens ve ark., 1992; Malich ve ark., 2000).

#### **2.4.8. Kısa Boy ve Büyüme Hormonu Eksikliği**

Kısa boy, PWS' li olguların temel özelliğidir. PWS' li çocuklar genellikle ergenlikte görülen büyüme ivmesini gösterememekle beraber; boy değerleri erkekler için ortalama 155 cm, kadınlar için 148 cm'dir (Angulo ve ark., 2007; Cassidy ve ark., 2012). Eller ve ayaklar yavaşça büyür; yetişkin kadın ayak büyüklüğü 20.3 cm ve yetişkin erkek ayak büyüklüğü 22.3 cm'dir (M. G. Butler ve ark., 2011; M. G. Butler ve ark., 2015).

Çocukluk döneminde büyüme hormonu replasman tedavisi alan PWS' li çocuklar, normal yetişkin boylarına ulaşabilirler (Eiholzer ve l'Allemand, 2000). Büyüme hormonu replasman tedavisi; büyüme hızını, vücut kompozisyonunu (artan yağsız vücut kütlesi, düşük yağ kütlesi), kas fonksiyonunu ve aktivite seviyesini iyileştirir. Bu tedavinin aynı zamanda solunum yolu fonksiyonunu iyileştirdiğine dair kanıtlar mevcuttur. Eğer tedavi bebeklik döneminde başlarsa, iyi bir diyet yardımıyla da yüz görünümü ve vücut formasyonu normalleşir. İnsan büyüme hormonu replasman tedavisinin nadir görülen yan etkileri arasında; pedal ödem, artan skolyoz, kaymış femur epifizi ve abeyin omurilik sıvısının artmasına bağlı olarak ortaya çıkan yalancı tümör sendromu (psödötumor serebri) riski vardır. Ayrıca erken adrenarşin da daha sık meydana geldiği bildirilmiştir (Angulo ve ark., 2007; Cassidy ve Driscoll, 2009).

#### **2.4.9. Hipotiroidizm**

PWS' deki diğer endokrinopatilere benzer şekilde, hipotiroidizm etiolojisinin santral kökenli olduğu düşünülmektedir.

PWS' de hipotiroidizm prevalansı ile ilgili çeşitli raporlar vardır. Bazı çalışmalarda PWS' de hipotiroidizm prevalansının %20-30 olduğu bildirilmiştir. (Tauber ve ark., 2000). 2010 yılında, 2 yaşından küçük PWS' li çocuklarda %72.2 oranında santral hipotiroidi olduğu gösterilmiştir (Vaiani ve ark., 2010). Bazı çalışmalarda ise hipotiroidizmin PWS popülasyonunun sadece %2-4' ünde bulunduğu ve sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde bir fark olmadığı bildirilmiştir. 2013 yılında, 23 PWS' li yenidoğanda konjenital hipotiroidizm taraması gerçekleştirilmiş ve sonuç normal

bulunmuştur. Aynı çalışmada, doğumdan ergenliğe kadar 21 çocukta tiroid uyarıcı hormonun (TSH), tiroid salgılayan hormona (TRH), T4'e ve FT4'e yanıtının normal paternler gösterdiği belirtilmiştir (M. G. Butler, Theodoro, & Skouse, 2007; Sharkia ve ark., 2013).

Gelişimsel gecikmeler ve zayıf büyüme riski olan bir hasta popülasyonunda hipotiroidizm için artmış bir prevalans olabileceğinden dolayı uzmanlar; eğer olgular büyüme hormonu replasman tedavisi alıyorsa, olgulara doğumdan sonraki ilk üç ayda ve daha sonra da yıllık olarak hipotiroidizm taraması yapılması gerektiğini savunmaktadır. Eğer hipotiroidizm belirtileri gözleniyorsa, yaş ve ağırlığa göre tipik replasman dozlarında levotiroksin tedavisi kullanılmalıdır (Heksch ve ark., 2017).

#### **2.4.10. Uyku Bozuklukları**

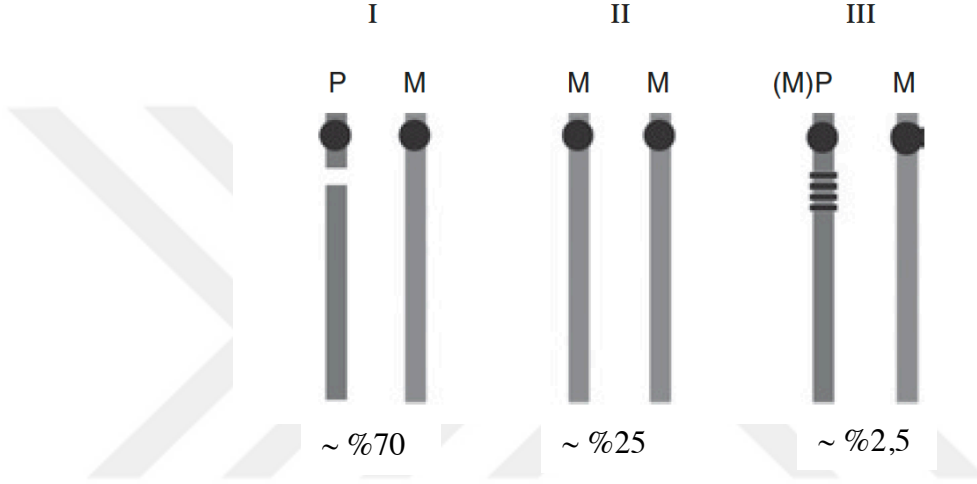
PWS' li çocuklarda uyku bozuklukları gözlenmektedir. Göz hareketlerinde azalma, uyku düzeninin değişmesi, gündüz aşırı uyku hali, oksijen desatürasyonu ve hem merkezi hem de obstrüktif apnesi sık rastlanılan bulgular arasında yer almaktadır (Festen ve ark., 2006; Priano ve ark., 2006).

#### **2.5. PWS' nin Genetiği ve Oluşum Mekanizmaları**

Genomik damgalama bozukluğu olarak da bilinen PWS, genomik ve epigenetik değişimler sonucunda ebeveynlerden kalıtılan alellerdeki genlerin farklı ifade edilmesine bağlı olarak ortaya çıkar. PWS ile ilişkili genler kromozom 15q11.2-q13 bölgesinde 5-6 Mb' lık alanda lokalizedir. Bu genler sağlıklı bireylerde paternal kromozomda eksprese edilirken; maternal kromozomda epigenetik faktörler tarafından susturulmuştur ve eksprese edilmezler (Cassidy ve ark., 2012; Abdilla ve ark., 2017). Dolayısıyla paternal kromozomdaki genlerin eksprese edilemediği durumlarda PWS ortaya çıkar.

PWS' ye sebep olan üç temel mekanizma vardır. Bunlardan birincisi, paternal kromozom 15q11-q13 bölgesinde meydana gelen delesyondur ve PWS olgularının yaklaşık %70' inde görülmektedir. İkincisi, maternal kromozom 15' in dizomisidir (mat UPD 15) ve PWS' li olguların yaklaşık %25' inde görülmektedir. Üçüncüsü ise, imprint merkezinde (IC) meydana gelen hatalardır ve kalan olguların %2,5' unu oluşturmaktadır. Dengeli translokasyonlar ise diğer üç mekanizmaya göre daha nadir ve

olguların <math>\leq 1\%</math> inden daha azında görülen bir mekanizmadır (Bittel ve Butler, 2005; Rocha ve Paiva, 2014; M. G. Butler ve ark., 2016). Olguların çoğu sporadik olup tekrarlama riski %1'den azdır. Bununla birlikte paternal kromozom 15q11-q13 bölgesinde yer alan IC bölgesinde bir delesyon var ise, tekrarlama riski yaklaşık %50'dir (Bittel ve Butler, 2005). PWS' nin genel oluşum mekanizmaları Şekil 2.1' de gösterilmiştir (Cassidy ve ark., 2012).



**Şekil 2.1:** PWS' nin genel oluşum mekanizmaları ve görülme sıklıkları. I: paternal delesyon; II: maternal UPD 15; III: damgalama hataları. P, Paternal kromozom 15; M, Maternal kromozom 15' i ifade eder (Cassidy ve ark., 2012).

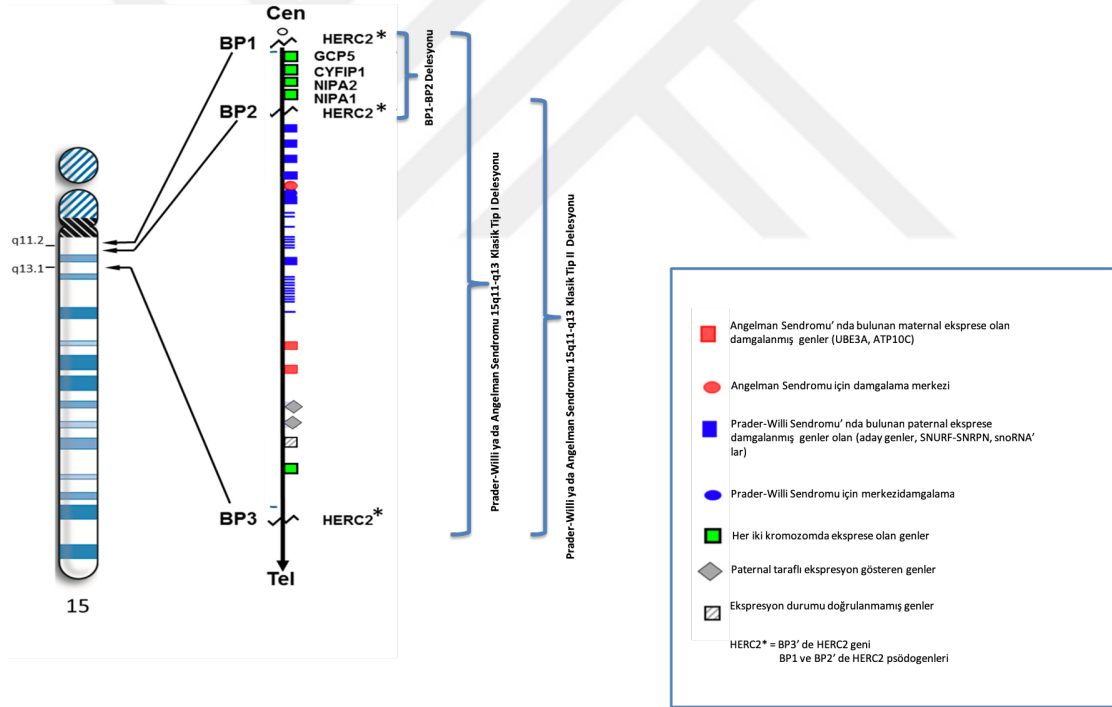
### 2.5.1. Kromozom 15q11-q13 bölgesinin Mikrodelesyonu [Paternal Delesyon-del(15)(q11-13)]

PWS olgularının çoğu, paternal kalıtılan kromozom 15q11-q13 bölgesindeki bir ara mikrodelesyonundan kaynaklanmaktadır. Delesyonlar PWS'li bireylerin yaklaşık %70' ini oluşturmaktadır (Glenn ve ark., 1997).

Kromozom 15, akrosentrik bir kromozomdur. Kromozomun proksimal uzun kolunda (15q11-q13) bulunan ve BP1 (Break Point 1) -BP5 olarak adlandırılan beş kırık noktası bulunur (Christian ve ark., 1995; Chai ve ark., 2003). BP1 ve BP2, 15q11-q13 bölgesinin proksimalinde yer alırken; BP3, BP4 ve BP5 ise diğer kırık noktalara göre bu bölgenin distalinde yer alır. Bu bölge içerisinde düşük kopya DNA tekrar kümeleri bulunur ve mayoz sırasında homolog 15 numaralı kromozomun yanlış eşleşmesine

olanak sağlayarak; kardeş olmayan kromatidler arasında eşit olmayan kross-over' a sebep olur. (Pujana ve ark., 2002; Locke ve ark., 2004; M. G. Butler, 2017b). Bu düşük kopya DNA tekrar dizileri duplikonlar olarak adlandırılır ve psödogenler içerir (Eichler, 1998). BP3 kırık noktasında *HERC2* geni ve BP1 ve BP2' de *HERC2*' nin psödogenleri yer almaktadır (Pujana ve ark., 2002; D. M. Cox ve Butler, 2015).

PWS tipik olarak, distal kırık noktası BP3 ve proksimal kırık noktaları BP1 veya BP2' yi içeren bir delesyondan kaynaklanır. Bu kromozom 15q11-q13 bölgesindeki delesyonlar klasik tip I (BP1 ve BP3 içeren), klasik tip II (BP2 ve BP3 içeren) ve BP1-BP2 delesyonu olarak sınıflandırılır (Şekil 2.2) (D. M. Cox ve Butler, 2015).



**Şekil 2.2:** *HERC2* içeren BP1, BP2 (15q11.2) ve BP3 (15q13.1) kırık noktalarının konumu ile BP1 ve BP2 kırık noktaları arasında damgalanmamış genlerin pozisyonunu gösteren yüksek çözünürlüklü ideogram. 15q11 – q13 bölgesini içeren üç delesyon tipi [1. BP1 – BP2 aralığındaki delesyon; 2. klasik tip I (BP1-BP3 aralığındaki delesyon) delesyonu; 3. klasik tip II (BP2-BP3 aralığındaki delesyon) delesyonu] şekilde belirtilmiştir (D. M. Cox ve Butler, 2015).

Tip I delesyonunun ortalama genomik uzunluğu 6.58 Mb iken, tip II delesyonunun ortalama uzunluğu 5.33 Mb'dir (M. G. Butler ve ark., 2008). Yapılan bazı araştırmalar Prader-Willi ve Angelman sendromlarında tip I delesyonu olan olguların, klasik tip II' ye sahip olgulara kıyasla daha ciddi nörogelişimsel semptomlara sahip olduğunu

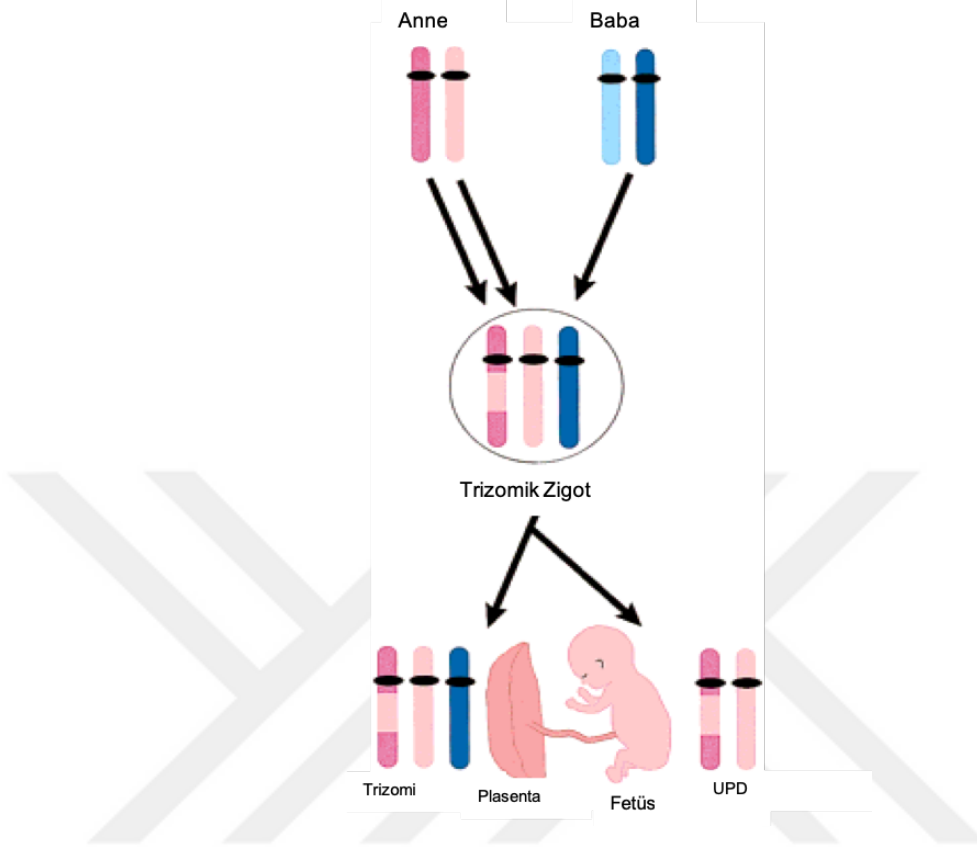
bildirmiştir (M. G. Butler ve ark., 2004; Milner ve ark., 2005; Varela ve ark., 2005; Bittel ve ark., 2006). Başlangıçta, Butler ve ark. (M. G. Butler ve ark., 2004) bazı davranışsal ve bilişsel ölçütlerde iki PWS delesyon tipi arasında (tip I ve tip II) istatistiksel olarak fark olduğunu bulmuşlardır. Buna göre tip I delesyonu olan PWS bireylerinin, tip II delesyonu olanlara göre daha düşük zekaya, kendine zarar verici davranışlara ve görsel algı bozukluğuna sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Bittel ve ark. (Bittel ve ark., 2006) PWS' li olgular ve normal bireylerden elde edilen lenfoblastik hücre hattında BP1-BP2 bölgesinde bulunan dört gen (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIPI1*, *TUBGCP5*) için mRNA seviyelerini değerlendirmiş ve bu genlerin PWS' li olgularda davranışsal ve akademik kriterlerde normallere kıyasla farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

### **2.5.2. Maternal Uniparental Dizomi 15 (mat UPD 15)**

PWS' de en sık görülen ikinci genetik mekanizma maternal UPD 15' dir ve PWS'li olgularda ilk kez 1989 yılında Nicholas ve ark. tarafından rapor edilmiştir (Nicholls ve ark., 1989).

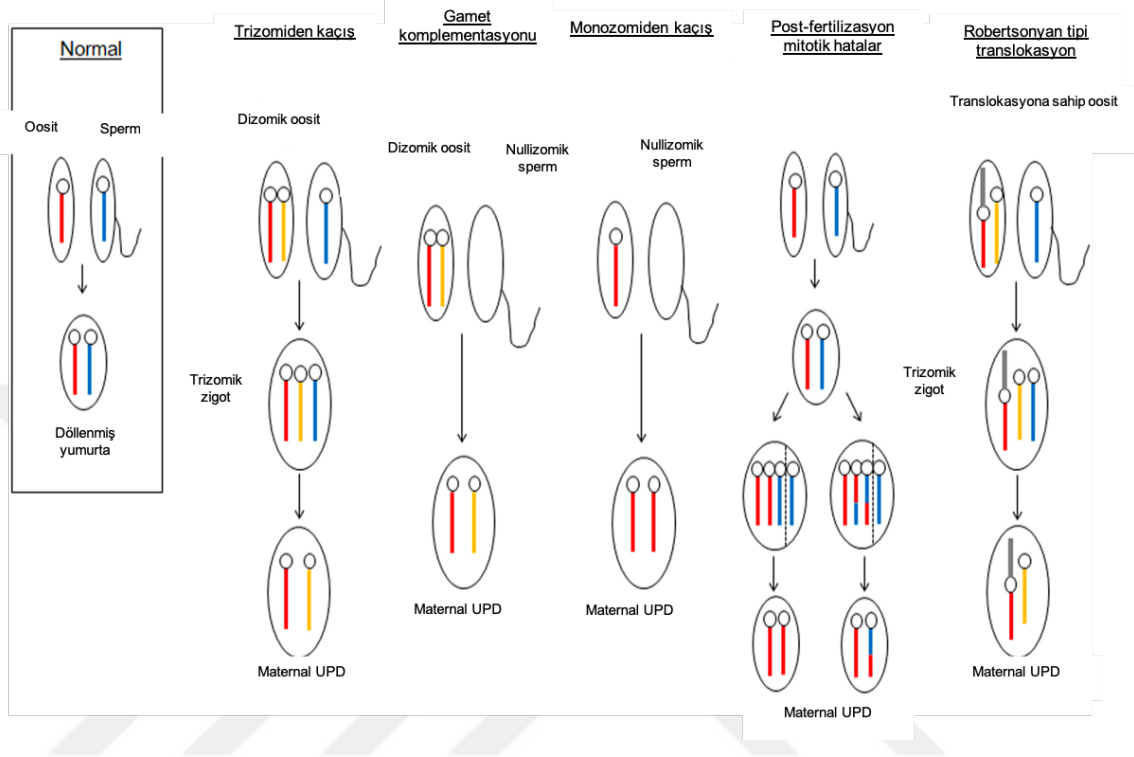
UPD' nin oluşum mekanizmalarından en yaygın olanı, mayoz bölünmedeki hatadan kaynaklanır. Maternal kromozomların ayrılmaması sonucu (maternal non-disjunction) iki maternal kromozomun yumurtaya katılması ve normal bir sperm tarafından döllenmesi durumunda görülür. Bu durum fetüste 15 numaralı kromozomun üç adet bulunmasına (trizomi 15) ve toplam kromozom sayısının 47 olmasına neden olur. Trizomi 15, kendiliğinden düşüklerin yaygın nedenlerinden biridir. Eğer Trizomi 15' den kaçış mekanizması gerçekleşirse, kromozom 15' lerden biri trizomik hücreden kaybedilir ve hamileliğin devam etmesi ile normal 46 kromozom meydana gelir. Eğer paternal kromozom 15 kaybedilirse, hücreler iki maternal kromozom 15' e sahip olurlar. Böylelikle fetüs sitogenetik bulgular açısından normal ancak PWS' nin klinik bulgularına sahip olur (Şekil 2.3) (Cassidy ve ark., 1992; Angulo ve ark., 2015).





**Şekil 2.3:** Trizomiden kaçış mekanizması. Dizomik bir oositin normal bir sperm ile döllenmesi sonucu trizomik zigot oluşur. Postzigotik mitotik bölünme hatalarından kaynaklanan paternal kromozomun kaybı (trizomiden kaçış) ile maternal UPD ortaya çıkar (Robinson, 2000).

UPD' ye sebep olan başka mekanizmalar da vardır ancak PWS' de çok daha az yaygın görülmektedir. Bu mekanizmalardan bir tanesi ise monozomiden kaçış mekanizmasıdır. Mayoz I' de homolog kromozom 15' in ayrılmaması sonucu fetüsün maternal 15 numaralı kromozomun her ikisine de sahip olması (heterodizomi) ya da Mayoz II' de ayrılmama sonucu sadece maternal kromozom 15' in iki kopyasının olması (izodizomi) sonucu ortaya çıkar (Cassidy ve ark., 2012; Angulo ve ark., 2015). Somatik rekombinasyon veya gen konversiyonu sonucu ortaya çıkan post-fertilizasyon hataları; dizomik oositin ve nullizomik bir sperm birleşmesi sonucu ortaya çıkan gametik komplementasyon da UPD' ye sebep olan muhtemel mekanizmalar arasındadır. Robertsonyan tipi translokasyonlarla ilişkili trizomi de aynı zamanda bir kromozom kaybıyla dağılabilir ve vakaların %50' sinde UPD ile sonuçlanabilir (Cassidy ve ark., 2012; Matsubara ve ark., 2018). Maternal UPD 15' e sebep olan mekanizmalar Şekil 2.4' de özetlenmiştir.

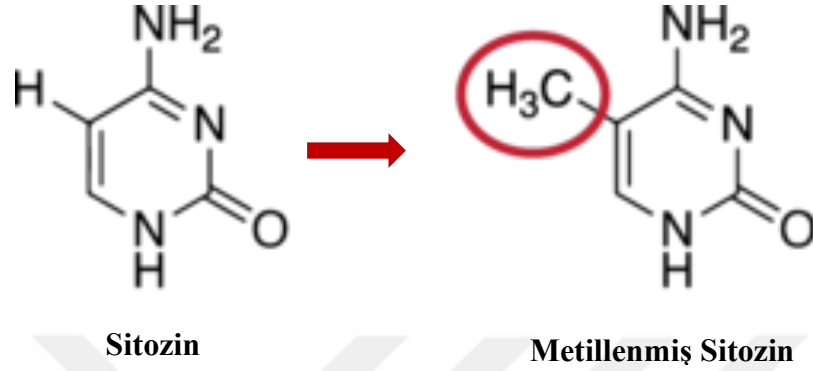


**Şekil 2.4:** Maternal UPD' ye sebep olan mekanizmaların şematik gösterimi. Mavi renk paternal kromozomu; kırmızı ve sarı renk maternal homolog kromozomları, gri renk ise translokasyona uğramış maternal kromozomu ifade etmektedir (Matsubara ve ark., 2018).

### 2.5.3. Genomik Damgalama Hataları

Genomik damgalama, genlerin DNA metilasyonu yoluyla susturulması işlemidir. Baskılanmış alel metillenmiş, aktif alel ise metilenmemiştir. Genomik damgalama, küçük moleküller olan metil gruplarının DNA'nın belirli bölgelerine bağlanması sonucu gerçekleşen kimyasal bir reaksiyondur (Sadakierska-Chudy ve ark., 2015; Bajrami ve Spiroski, 2016). DNA metilasyonu, yüksek organizmalarda normal gelişim için çok önemli biyokimyasal bir mekanizma olup; en iyi çalışılmış epigenetik belirteçtir. Metilasyon, DNA üzerindeki CpG bölgelerinde gerçekleşir. Bu bölgelerde yer alan sitozin rezidülerin 5. pozisyonundaki karbonuna DNA Metil Transferaz (DNMT) enzimi aracılığıyla bir metil (CH<sub>3</sub>) grubunun kovalent bağla bağlanması sonucu 5-metilsitozin (5-mC) oluşur (Şekil 2.5) (Bajrami ve Spiroski, 2016). Şu anda tanımlanmış 25' ten fazla damgalanmış gen olmakla beraber, fare modelleri ile yapılan çalışmalar temel

alındığında tahminler bu genlerin sayısının 100 ila 200 kadar olabileceği yönündedir (Falls ve ark., 1999; Bajrami ve Spiroski, 2016).



**Şekil 2.5:** Sitozin bazının 5. karbonuna metil grubunun takılması.

Bu damgalanmış genlerde, DNA metilasyonunun artması (hipermetilasyon) ya da azalması (hipometilasyon) genlerin ekspresyon profilini değiştirebilir ve buna bağlı olarak hastalıklar ortaya çıkabilir. Damgalanmış genler, maternal ve paternal alele özgü olmak üzere farklı metilasyon paternlerine sahiptir. Bu farklılığın gametogenezde ya da zigotta çekirdek birleşmesinden önce kazanıldığı öngörülmektedir. Metilasyona uğramış paternal alel hücre bölünmesi ve farklılaşmasında korunmakta ve böylece monoalelik ifade sağlanmaktadır. Damgalanmış genlerin çoğunluğu büyüme ve davranışlarla ilişkili olup, genellikle beyinde ifade edilirler. Bu genlerin metilasyon profilinde herhangi bir değişiklik meydana gelecek olursa, bu durum fenotipe sıklıkla zihinsel yetersizlik olarak yansımaktadır (Walter ve Paulsen, 2003; Bora ve Yurter, 2007).

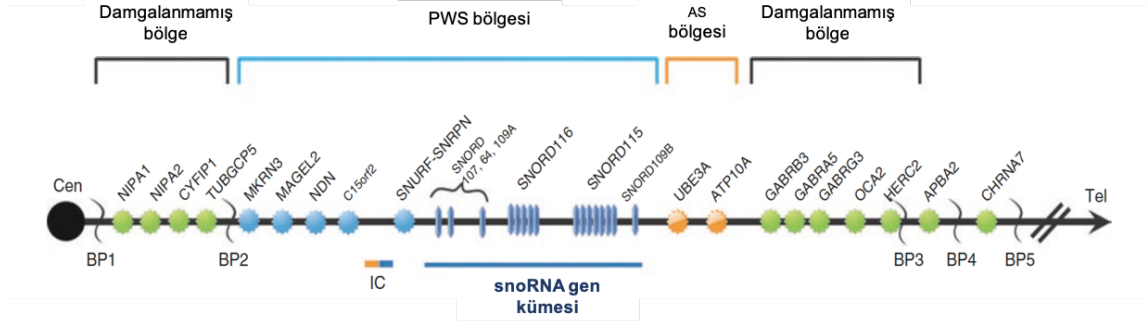
CpG metilasyonu, damgalama mekanizmasında rol oynayan en önemli faktördür. Damgalanmış genler genellikle kümeler halinde bulunur ve birlikte kontrol edilirler. Bu kontrol de damgalama merkezleri (imprinting center; IC) ile sağlanmaktadır (Ben-Porath ve Cedar, 2000; Sleutels ve ark., 2000).

PWS' de en sık karşımıza çıkan üçüncü mekanizma ise damgalama merkezinde meydana gelen hatalardır (imprinting defect, ID). Bu hatalar sporadik nedenlerden kaynaklanmaktadır ve paternal olarak kalıtılan kromozom 15'i etkilemektedir. Bu gruba dahil olan PWS' li bireyler, hasta popülasyonunun %1-3' ünü oluşturmaktadır.

Damgalama hatalarının çoğu epigenetik nedenlerden kaynaklanır ve biparental kalıtım gösterilmesine rağmen (yani olgu hem anneden hem de babadan kalıtılan alele sahiptir), sadece DNA üzerinde metilasyonun varlığı kendini göstermektedir. Bu durum damgalama merkezindeki hata sonucu paternal kalıtılan alelde de bir metilasyon olayının gerçekleştiğini işaret eder. Dolayısıyla hem anneden hem de babadan kalıtılan alel metile haldedir. Meydana gelen bu hatalar, spermatogenez ya da erken embriyogenez sırasındaki damgalama sürecinde rastgele oluşan hatalardır (Buiting, 2010). Bununla birlikte, damgalama hatasına sahip olan olguların yaklaşık %15 inde, *SNRPN* geninin bir kısmının ve promotörünün 5' ucunda yer alan PWS damgalama merkezi (imprinting center, IC) bölgesinde çok küçük delesyonun (7.5- >100 kb) var olduğu gösterilmiştir. Bu olguların yaklaşık yarısını; babasından, IC delesyonuna sahip 15 numaralı kromozomu almış (ki bu kromozom babaya annesinden delete olarak aktarılmış) ve annesinden, 15 numaralı kromozomu almış (normalde metile durumda) olgular oluşturmaktadır. Olguların diğer yarısını ise fertilizasyondan sonra ya da babada spermatogenez sırasında kromozom 15 de meydana gelen *de novo* IC delesyonlara sahip olgular oluşturmaktadır (Buiting, 2010; Cassidy ve ark., 2012; Angulo ve ark., 2015).

## 2.6. 15q11-q13 Bölgesinde Eksprese Olan Aday Genler

Bu bölgede yer alan genler üç kırık noktası ile sınırlandırılmış segmental duplikasyonlar içinde yer alır ve kabaca dört gruba ayrılır (Şekil 2.6). Grup 1; BP1 ve BP2 kırık noktaları arasında bulunan ve biparental olarak eksprese edilen (non-imprinted) *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* ve *GCP5* genlerini içerir. Grup 2; PWS gen bölgesidir. BP2 kırık noktası ile bunun distalinde yer alan küçük nükleolar RNA gen kümesi (*snoRNA* gen kümesi) arasında lokalize olan ve sadece paternal olarak eksprese edilen *MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, bisistronik *SNURF-SNRPN*, *snoRNA*'lar, *C15orf2* ve birkaç antisense transkriptleri (*UBE3A* ya kadar olan antisense transkriptler dahil) içerir. Grup 3; Angelman Sendromu (AS) gen Bölgesi'dir. *snoRNA* gen kümesi ile BP2 distal imprint olmayan gen bölgesi arasında lokalize olan sadece maternal olarak eksprese edilen genleri *UBE3A* ve *ATP10A* içerir. Grup 4 ise distal imprint olmayan gen bölgesidir ve üç *GABA* reseptör gen kümesini, okülokütanöz albinizm tip 2 ile ilişkili *OCA2* genini ile *HERC2* genini içerir (Cassidy ve ark., 2012).



**Şekil 2.6:** 15q11-q13 bölgesinde lokalize olan genlerin şematik gösterimi (Cassidy ve ark., 2012).

PWS bölgesinin merkezinde *SNURF-SNRPN* gen kompleksi bulunmakta ve 10 ekzondan oluşmaktadır. Bu gen bisitronik bir gen olup; iki farklı proteini kodlamaktadır. Genin 4. ve 10. ekzonları arasındaki bölgeden mRNA kırılmasında (mRNA splicing) rol oynayan SmN ailesine ait, küçük nüklear ribonükleoprotein polipeptid N (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N, SNRPN) proteini kodlanmaktadır (Glenn ve ark., 1996). SNRNP'lerin RNA-RNA baz eşleşmesi yoluyla spesifik nükleik asit dizilerini tanıdığı düşünülse de, bu aile üyesinin spesifik rolü bilinmemektedir.

Genin 1. ve 3. ekzonları arasındaki bölge ise *SNURF* genini içermektedir ve bu gen nükleusta lokalize olan bir proteini kodlamaktadır. Evrimsel olarak korunmuş açık okuma çerçevesi (ORF), SNRPN'yi kodlayan aşağı yönlü ORF'ye sahip bisitronik bir transkript üzerinde bulunur. Çok sayıda transkripsiyon başlatma bölgesi tanımlanmış olup, 5' translasyona uğramayan bölgede (untranslated region, UTR) alternatif kırılma gerçekleşmektedir. Fakat bu transkriptlerin tam olarak yapısı ve fonksiyonu henüz tanımlanmamıştır. Bu genin 5' UTR ya da kodlayıcı bölgesinde bir translokasyon sonucu alternatif kırılma ya da delesyon olayının gerçekleşmesi, paternal veya maternal imprint değişiminde başarısızlığa sebep olarak PWS ya da Angelman Sendromu'na neden olur (Cassidy ve ark., 2012; "*Snurf* gene, genecards human gene database," 2019; "Entrez gene: Snrpn small nuclear ribonucleoprotein polypeptide n," 2019).

15q11-q13 bölgesinde *SNRPN-SNURF* gen kompleksi lokusundaki damgalama merkezinin proksimalinde lokalize olan ve protein kodlayan diğer genler ise *MKRN3*,

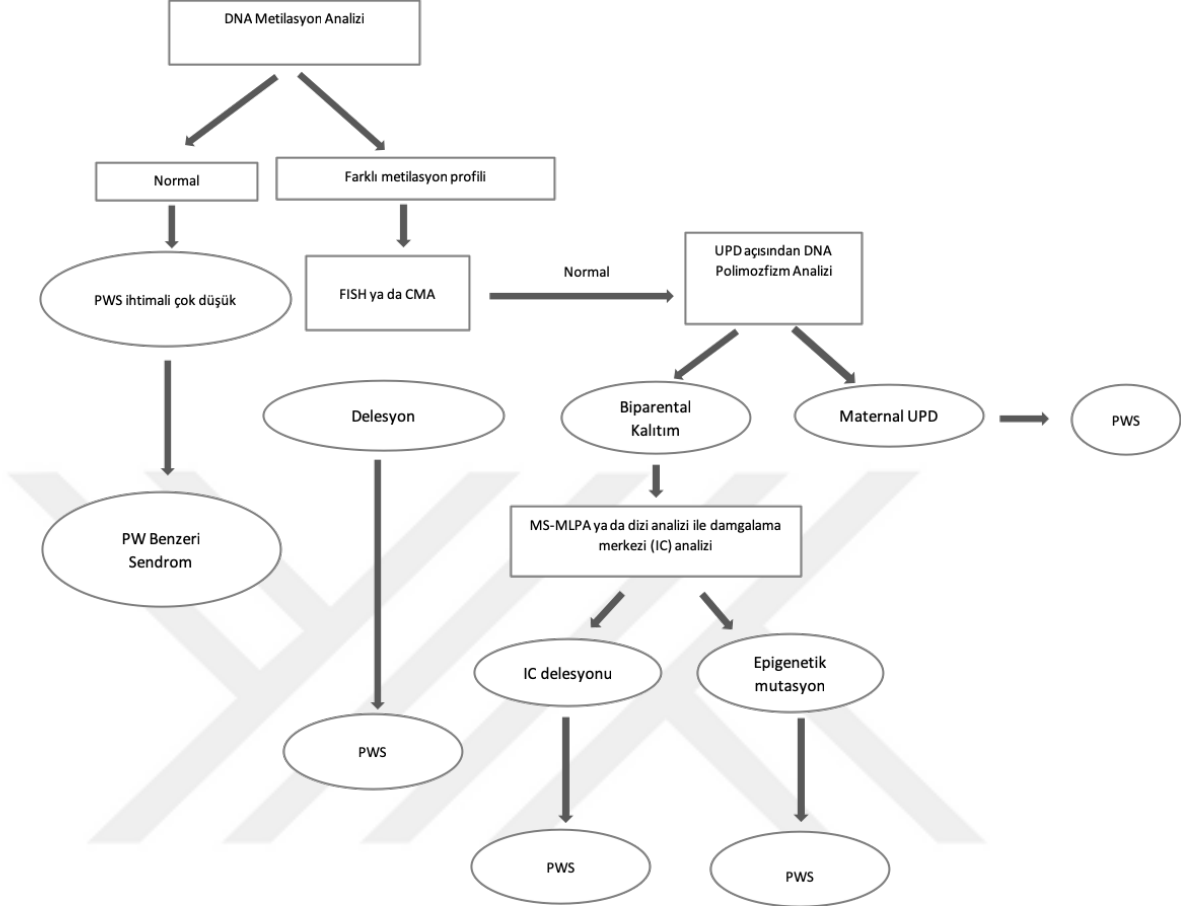
*MAGEL2* ve *NECDIN (NDN)* genleridir. Bu genler damgalanmıştır ve sadece paternal alelde ekspresyon gösterirler (M. G. Butler, 2011; Angulo ve ark., 2015). *MKRN3* geninden kodlanan MKRN3 proteini, bir çinko-parmak (zinc-finger) proteini olup; son zamanlarda yapılan çalışmalar paternal kalıtılan *MKRN3* varyantlarında meydana gelen fonksiyon kaybının, olgularda erken ergenliğe sebep olduğunu göstermiştir (Macedo ve ark., 2014). *NDN* geni ise, DNA'ya bağlanan bir protein kodlar. *Ndn* knockout farelerde yapılan çalışmalar, NDN' nin nörit büyümesi için gerekli mekanizmalarda rol aldığını ve nekudin proteininin kaybının aksonal büyümeye etki ettiğini göstermiştir (Lee ve ark., 2005). PWS' li bireylerin sahip olduğu genetik mekanizmalara benzer hatalara sahip *NDN* knockout fare modeli ile yapılan başka bir çalışmada ise nekudinün sinir sisteminin erken gelişiminde antiapoptotik ya da hayatta kalma faktörü olduğu gösterilmiştir (Andrieu ve ark., 2006). *MAGEL2* geni ise intronsuz bir genidir ve *NDN* gen lokusuna yakındır. Sadece paternal olarak aktif olan bu gen, çoğunlukla beyinde ifade edilir *MAGEL2*' nin paternal alelinde patojenik varyantlara sahip dört birey ile yapılan çalışmada, bu bireylerin PWS ile örtüşen klinik ve davranışsal özellikleri olduğunu göstermiştir (Schaaf ve ark., 2013). *Magel2*-null fareler ile yapılan çalışmalarda; bu genin yokluğunda neonatal büyüme geriliği, zayıf emme, süttten kesildikten sonra aşırı kilo alımı ve değişen metabolizma ile artan adipozite gibi bazı bulgular gözlenmiş ve bu bulguların PWS' de gözlenen bulgular olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2005; Bischof ve ark., 2007). PWS bölgesinde lokalize olan bir başka gen ise *SNORD116* (snoRNA HBII-85) gen kümesidir. 29 gen kopyasından oluşan snoRNA *SNORD116* gen kümesinin PWS' nin klinik özellikleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada, PWS' nin pek çok özelliğine sahip dört bireyin *SNORD116* gen kümesinde bir mikrodelyasyon taşıdığı rapor edilmiştir (Sahoo ve ark., 2008; Buiting, 2010; Duker ve ark., 2010; Bieth ve ark., 2015).

## **2.7. Genetik Tanı Testleri**

Eğer klinik olarak olguda PWS' den şüpheleniliyorsa, DNA metilasyon analizi genetik çalışmayı başlatmanın en etkili yoludur. 15q11.2-13 bölgesindeki bazı maternal ve paternal damgalama lokusundaki DNA metilasyon paterni, paternal, maternal ya da normal (biparental) kalıtımın değerlendirilmesinde güçlü bir araçtır. DNA metilasyon analizi, PWS' ye sebep olan üç moleküler mekanizmayı tespit edebilecek ve aynı

zamanda delesyon vakalarında PWS' yi Angelman Sendromu (AS)' ndan ayırabilecek bir tekniktir. Ayrıca, olgunun PWS' ye sahip olduğunu belirleyen DNA Metilasyon Analizi genetik danışma için yeterli olmasa da klinikte tanı koymak için yeterlidir (Glenn ve ark., 1997). 1992' den itibaren PWS bölgesinde yer alan üç farklı lokus ayrı ayrı ele alınarak DNA Metilasyon Analizi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda günümüzde en yaygın kullanılan lokusun *SNURF-SNRPN* lokusunun 5' CpG adacığı olduğu ve olguların %99'undan fazlasına doğru tanı koydurabildiği tespit edilmiştir (Driscoll ve ark., 1992; Dittrich ve ark., 1993; Glenn ve ark., 1996). *SNRPN* geninin 5' ucunda bulunan bu CpG adacığı; genin promotörünü, ekzon 1 ve intron 1 bölgelerini kapsamaktadır. Bu bölge farklı metilasyon profili gösteren bir bölgedir. Normal bireylerde; paternal alel metillenmemiş ve eksprese olurken, maternal alel metillenmiş ve eksprese olmamaktadır. *SNRPN* geninin promotör ve ekzon 1 bölgesi, paternal PWS IC bölgesi ile çakışmaktadır. Dolayısıyla paternal kromozom 15'in bu bölgesinde meydana gelecek bir değişim (epigenetik mutasyon ya da delesyon) kromozomun metilasyon profilini değiştirir ve paternal kromozom normalde aktifken baskılanmış hale gelir. Dolayısıyla olgunun hem maternal hem de paternal kromozomu metile halde olduğundan, olguda PWS gözlenir (Cassidy ve ark., 2012).

PWS' nin genetik tanısı için yapılması gereken birinci aşama DNA Metilasyon Analizi' dir. Bu yöntem ile PWS tanısı almış olgularda yapılması gereken bir sonraki aşama ise moleküler sınıf ayrımının yapılmasıdır. Çünkü bu durum doğru genetik danışma ve genotip-fenotip korelasyonunun doğru yapılması için oldukça önemlidir. PWS' ye sebep olan genetik mekanizmalar arasında en sık karşılaşılanı paternal kromozom 15q11.2-q13 bölgesinin delesyonu olduğu için ilk olarak bu mekanizmaya bakılması moleküler sınıf ayrımının yapılmasında en etkili yoldur (Şekil 2.7) (Cassidy ve ark., 2012). Bu bölgedeki delesyonlar *SNRPN* probu kullanılarak Floresan In-Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile teşhis edilmektedir. Klinik genetikte Kromozomal Mikrodizin (Chromosomal Microarray; CMA) yönteminin kullanımının artmasıyla beraber PWS' ye sebep olan delesyonların tespit edilmesinde CMA' nın FISH' in yerini alabileceği düşünülmektedir. (Cassidy ve Driscoll, 2009; Cassidy ve ark., 2012).



Şekil 2.7: PWS için genetik tanı testleri algoritması (Cassidy ve ark., 2012).

Bazen PWS' li bir olgu için istenen ilk test DNA Metilasyonu' undan ziyade FISH veya CMA ile kromozomal analizdir. Bu tekniklerden herhangi birinin PWS bölgesinde bir delesyon tespit etmesi ve olgunun 2 yaşından küçük olması halinde; PWS ve AS' deki delesyonlar tipik olarak birbirinden ayırt edilemediği ve neonatal dönemde AS' nin klinik bulguları PWS ile örtüştüğü için DNA Metilasyon Analizi uygulanması gerekmektedir. (Williams ve ark., 2010). Eğer DNA Metilasyonu PWS için pozitif sonuç verirse ve delesyon tespit edilmemişse, bir sonraki aşama maternal UPD ile ID arasındaki ayrımı yapmaktır. Bunun için olgunun ve ebeveynlerinin DNA'sı kullanılarak kromozom 15' in ilgili lokusunun DNA Polimorfizm Analizi gerçekleştirilir (Shaffer ve ark., 2001). Bu analiz sonucunda olgunun maternal UPD yerine biparental kalıtıma sahip olduğu gösterilirse, olguda PWS' ye sebep olan mekanizmanın ID olduğu kabul edilir. Daha sonra ID' nin herhangi bir epigenetik mutasyondan mı (tekrarlama riski düşük)

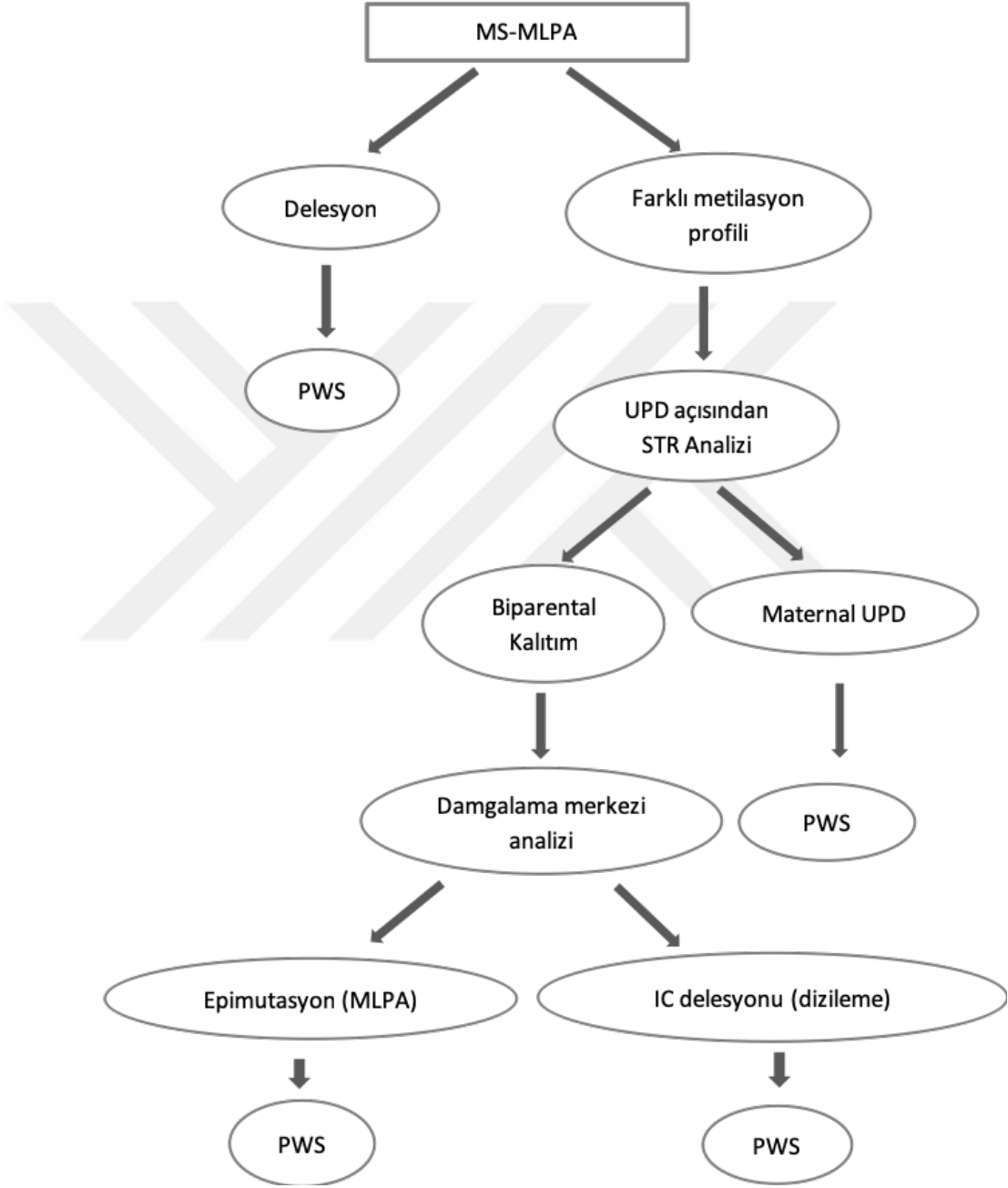


yoksa IC' de bulunan küçük bir delesyondan mı kaynaklandığını tespit etmek oldukça önemlidir. Çünkü eğer olgunun babasında da bir IC delesyonu varsa tekrarlama riski %50' ye yükselmektedir. ID ilişkili PWS olgularının yaklaşık %15' i IC delesyonuna sahiptir ve bunların da yaklaşık %50' si ailesel mutasyonlardır. Bu da PWS' nin damgalama merkezi ile örtüşen küçük bir kısmın dizi analizi ile (Horsthemke ve Buiting, 2008) ya da son zamanlarda geliştirilen MS-MLPA testi ile yapılabilir.

MRC-Holand (Amsterdam, Hollanda) firması tarafından ticari olarak temin edilebilen Metilasyon-Spesifik-Multipleks-Ligasyon-Prob-Amlifikasyon (MS-MLPA) Kiti, PWS bölgesinde hem DNA metilasyon analizi hem de dozaj analizini aynı anda gerçekleştirmektedir (Procter ve ark., 2006). Bu kitin son versiyonu (ME028-C1) 47 prob içermektedir. Bunlardan 6 tanesi HhaI enzimi için tanıma bölgesi içermekte olup, 15q11.2-q13 bölgesinin metilasyon paterni için bilgi vermektedir. Ayrıca tüm problemler kopya sayısı değişimleri hakkında da bilgi vermektedir. Ek olarak, 15q11 bölgesinin dışındaki genleri tespit etmek için 11 referans prob bulunmaktadır ("Mrc holland- mlpa product description version c1-03,"). CMA gibi MS-MLPA tekniği de translokasyonlar ve inversiyonlar gibi kromozomal düzenlemeleri tespit edemez.

Özellikle Avrupa'daki bazı laboratuvarlar, PWS tanısı için 5' *SNRPN*' deki tek lokusun DNA Metilasyon Analizi yerine MS-MLPA tekniğini kullanmaya başlamışlardır. Bu yöntemin klasik DNA Metilasyon Analizi'ne göre en büyük avantajı tek bir lokus yerine farklı metillenmiş beş ayrı bölgeyi araştırması ve bu bölgedeki kopya sayısı hakkında bilgi vermesidir. Ayrıca MS-MLPA kiti ile PWS ve AS' deki IC delesyonlarını ve *SNORD116* gen kümesindeki küçük delesyonları da kapsamaktadır. Dolayısıyla PWS' nin tanısında kullanılacak genetik teste DNA Metilasyon Analizi yerine MS-MLPA ile başlanıldığında delesyon ve metilasyon durumları aynı anda değerlendirilmiş olacaktır (Şekil 2.8.). Tüm bunlara karşın ne DNA Metilasyon Analizi ne de MS-MLPA yöntemi UPD ve ID arasındaki farkı belirleyememektedir. Eğer olguda herhangi bir delesyon yoksa ve DNA metilasyonu PWS için pozitif ise, hem olgunun hem de ebeveynlerinin DNA' larına, STR markırları kullanılarak mikrosatellit analizi ile, UPD değerlendirmesi yapılmalıdır. Tek nükleotid polimorfizm dizileri bazı olgularda UPD' yi tespit edebilse de bu durum tüm olgular için geçerli değildir. Ancak UPD' nin tespit edilmesinde DNA

Polimorfizm Analizi hala altın standart olarak kullanılan bir testtir. PWS' nin tanısında kullanılan genetik testler Tablo 2.2' de özetlenmiştir (Cassidy ve ark., 2012).



Şekil 2.8.: PWS tanısında MS-MLPA Analizi' nin algoritması.

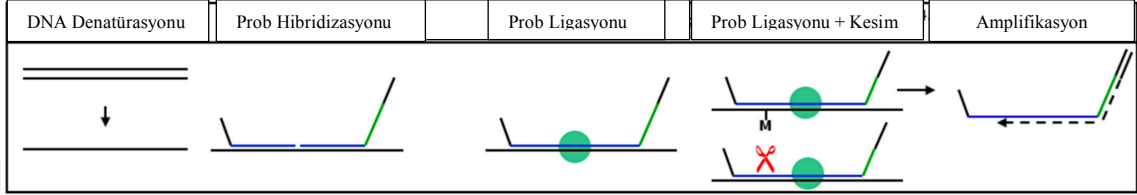
**Tablo 2.2:** PWS' nin tanısında kullanılan genetik testler (Cassidy ve ark., 2012).

Metod	Tespit ettiği PWS mekanizma(lar)	Kullanımları ve limitasyonları
DNA Metilasyonu	Delesyon, UPD ve ID	%99 PWS tanısı koyar ancak sebep olan moleküler mekanizmayı tespit edemez.
MS-MLPA	Delesyon, UPD ve ID	%99 PWS tanısı koyar ve delesyon ile UPD yi tespit edebilir ancak UPD ile ID ayrımını yapamaz.
FISH	Neredeyse tüm delesyonlar	%65-75 oranında PWS tanısı koyar. Tüm bölgeyi kapsamadığı için küçük delesyonları kaçırabilir. Kromozomun diğer kısımları hakkında bilgi vermez ve normal, UPD ve ID ayrımı yapamaz.
DNA Polimorfizm Analizi	UPD ve ID	İlk basamak testi değildir. DNA metilasyon analizi sonucunda PWS ortaya çıkarsa kullanılır.
CMA	Delesyonlar	FISH ile benzerdir. Bir oligo dizisi kullanılarak delesyon boyutu hakkında; ayrıca genomun geri kalanındaki delesyonlar ve duplikasyonlar hakkında da bilgi verir. Daha pahalıdır.
CMA-SNP	Delesyonlar bazı UPD'ler	Kullanımı CMA ile aynı olmakla beraber, ek olarak UPD tespitine de olanak sağlar.
DNA Dizileme	IC delesyonları	IC delesyonlarını epigenetik mutasyonlardan ayırt etmek için ID tespitinde önemli bir rolü vardır. PWS IC bölgesinde <5kb'lik bölge ile sınırlıdır.

### 2.7.1. MS-MLPA Çalışma Prensipleri

MS-MLPA' nın çalışma prensibi, her biri yaklaşık 60 nt uzunluğunda spesifik bir DNA dizisini tanımlayan ve sayısı 60'ı bulabilen problemlerin amplifikasyonuna dayanmaktadır. MS-MLPA reaksiyonu, yaklaşık 64-500 nt uzunluğunda olan ve kapiler elektroforez ile ayrılan bir dizi spesifik PZR ampliconları ile sonuçlanır (Şekil 2.9.). Bu yöntemi basamak basamak inceleyecek olursak; ilk olarak çalışılacak DNA örneğinin denatürasyonu gerçekleştirilir ve daha sonra MS-MLPA prob karışımı eklenir. Genel

olarak, her bir MS-MLPA probu, iki oligonükleotitten oluşmaktadır. Bu problemler hedef DNA dizilerine bağlanarak tek bir prob haline dönüşürler. Takip eden PZR yöntemi ile, hedef diziyeye bağlanmış tüm problemler aynı PZR primer çifti kullanılarak çoğaltılırlar. PZR primerlerinden biri floresan işaretlidir ve amplifikasyon ürünlerinin fragment ayrılması sırasında kapiller elektroforez sistemi ile gözlemlenmesini sağlamaktadır.



Şekil 2.9.: MS-MLPA çalışma prensibi. M: Metil Grubu.

MS-MLPA prob karışımları, hedef DNA' nın hem kopya sayısını hem de metilasyon durumunu belirlemek için metilasyona özgü birkaç prob içermektedir. Bu problemler, metilasyon-duyarlı restriksiyon enzimi olan HhaI için tanıma bölgesi içeren DNA dizilerini tanımak için tasarlanmıştır. Problemlerin hibridizasyonundan sonra, MS-MLPA reaksiyonu iki ayrı tüpe ayrılır (Şekil 2.9.). Birinci tüpte devam eden reaksiyon normal MLPA reaksiyonudur ve hedef DNA' nın kopya sayısı hakkında bilgi verir. İkinci tüpte devam eden reaksiyon ise restriksiyon enzimi olan HhaI ile muamele edilir ve hedef DNA' nın metilasyon profili hakkında bilgi verir. Metillenmemiş DNA dizisi ile prob hibridizasyonu gerçekleştiğinde, metilasyon-spesifik problemler ligasyona uğrar ve HhaI enzimi ile ilgili bölgenin kesimi gerçekleşir. Bu yüzden kesime uğramış MS-MLPA probu herhangi bir sinyal oluşturamaz çünkü problemlerin amplifikasyonu kesimden dolayı gerçekleşmez. Aksine hedef DNA metile halde ise, metil grubu HhaI enzim kesimini önler. Böylece prob kesime uğramadığı için, ilgili bölgenin amplifikasyonu gerçekleşir ve normal bir sinyal verir ("Mrc holland- mlpa product description version c1-03,").

## 2.8. Genetik Danışma

PWS' li olguların genetik etiolojisinin bilinmesi; etkilenmiş ailelere genetik danışma verirken oldukça önemlidir. Çoğu ailelerde tekrarlama riski <math><1\%</math> dir. Ancak belli durumlarda, tekrarlama riski %50' lere kadar varmaktadır.

Neredeyse tüm 15q11.2-q13 delesyonları *de novo* ara delesyonlardır ve tekrarlama riski <math><1\%</math> dir. FISH analizi ile olguların değerlendirilmesi gerekmektedir. Diğer taraftan

delesyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler sonucu da olabilir. Bu durum ya olgunun babasının gametlerinde *de novo* olarak meydana gelir ya da baba dengeli translokasyon veya inversiyon taşıyıcısı olabilir. Bu olgularda teorik olarak tekrarlama riski yaklaşık %25-50' dir.

Olası paternal kromozomal yeniden düzenlenme sadece olgunun kromozom veya FISH analizi yapılarak belirlenemez. Örneğin, babada 15q11.2-q13 bölgesinde veya bu bölgeyi içine alan paternal parasentrik inversiyon var ise bu durum oğul döllerde bu bölgenin delesyonu ile sonuçlanır. Bu yüzden delesyonlu olgularda mutlaka olgunun babasının 15q11.2-q13 bölgesi sitogenetik ve FISH analizleri ile değerlendirilmelidir.

Maternal UPD 15, genellikle *de novo*' dur ve tekrarlama riski <%1' dir. Eğer ebeveynlerden birinde Robertsonyan tipi translokasyon var ise durum farklıdır ve bu yüzden olguya sitogenetik analiz yapılmalıdır. Eğer olguda sitogenetik analiz normal ise, bu sefer olgunun babasına mutlaka olası Robertsonyan tipi translokasyon taşıyıcısı olup olmadığını gösterebilmek için sitogenetik analiz yapılmalıdır. Çünkü; eğer olgunun babası 15 numaralı kromozomu içeren Robertsonyan tipi translokasyon taşıyıcısı ise, spermatogenezis sırasında mayoz 1' de kromozomların hatalı dağılımından dolayı nullizomik bir sperm oluşabilir ve monozomiden kaçış mekanizması ile maternal UPD ortaya çıkabilir. Anneye sitogenetik analiz yapılmayabilir. Çünkü; probandta iki normal 15 numaralı kromozom olmasından dolayı annenin Robertsonyan tipi translokasyon taşıyıcısı olma ihtimali yoktur.

Nadiren de olsa olgunun sitogenetik analizinde belirlenen markır kromozom, maternal UPD 15 ile sonuçlanabilir. Bu durumda mutlaka her iki ebeveyn de sitogenetik olarak değerlendirilmelidir. Çünkü bireylerdeki markır kromozomların varlığı ayrılmama mekanizması ve UPD riskini arttıran bir durumdur.

Damgalama hataları sonucu PWS olan olgular, mutlaka damgalama merkezi delesyonu için değerlendirilmelidir. Bu olguların çoğunda (%85) *de novo* epigenetik mutasyonlar bulunur ve tekrarlama riski <%1' dir. Ancak %15'i ise, damgalama merkezinde küçük delesyon taşıyor olabilir. Delesyon taşıyan bu olguların yaklaşık yarısında damgalama merkezindeki delesyon aileseldir ve bu ailelerde tekrarlama riski %50' dir. Bu yüzden,

damgalama merkezinde delesyonu bulunan olguların babalarının mutlaka damgalama merkezinde delesyon taşıyıp taşımadıklarını belirlemek gerekmektedir (Kubota ve ark., 1996; Cassidy ve Driscoll, 2009).

Bu çalışmada PWS' nin klinik bulgularını taşıyan olgularda metilasyon analizi yaparak genotip-fenotip arasında bir korelasyon sağlanması; böylece PWS ile Prader-Willi Benzeri Sendrom' un moleküler açıdan ayrımı ve böylece doğru tanı, doğru genetik danışmanlık ve uygun tedavi sağlanabilmesi amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi' ne yönlendirilen ve hasta seçim kriterlerine uyan hastalar Metilasyon Spesifik Çoklu Ligasyon-Bağımlı Prob Amplifikasyonu (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MS-MLPA) yöntemi ile metilasyon ve UPD profilleri araştırılmak üzere değerlendirildi. Projemiz 31.05.2017 tarih 320 karar no ile Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Çalışmaya gönüllülük esasına göre dahil edilen hastalar proje hakkında bilgilendirildi ve aydınlatılmış onam formu (Ek 1) açıklanarak imzalatıldı. Çalışmaya 25 hasta dahil edilmesi planlandı ancak belirlenen hastaların mevki değiştirmesi, aranılan kriterlere uygun hasta bulunamaması ve ayrıca kısıtlı bütçe sebebiyle çalışmamızda 12 hasta değerlendirildi. Çalışmada izlenen iş akışı ise şu şekilde belirlendi:

- Hastaların belirlenmesi ve bilgilendirilmesi
- Periferik kandan genomik DNA (gDNA) izolasyonunun gerçekleştirilmesi
- MS-MLPA yöntemi ile hastaların metilasyon profillerinin çıkarılması
- Anormal metilasyon paterni gösteren hastaların ebeveynlerine ulaşılması ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmesi
- UPD analizinin yapılması
- Analiz ve yorumlama

#### 3.1. Hastaların Seçimi

Klinik olarak PWS'nin fenotipik özelliklerini taşıyan, kromozomal olarak normal karyotipe sahip olan, FISH yöntemi ile 15q11-q13 bölgesinde delesyon taşımadığı belirlenmiş ve 0-18 yaş aralığındaki olgular projeye dahil edildi. Fenotipik tanı kriterlerinde ise şunlara dikkat edildi:

- Hipotoni
- Hiperfaji-Obezite
- Hipogonadizm

- Badem göz
- Küçük el-ayak
- Gelişme geriliği ve öğrenme güçlüğü
- Emme güçlüğü

### 3.2. gDNA İzolasyonu

Hastaların gDNA' larını elde etmek amacıyla periferik kandan Invitrogen PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (K1820-01) kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 200 µl kan örneği 1.5 ml steril santrifüj tüpüne eklendi. Üzerine 20 µl kitin sağladığı Proteaz K eklendi.
2. 20 µl kitin sağladığı RNaz A da eklenerek vortekslendi ve 2 dakika (dk.) oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Üzerine 200 µl PureLink Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu (Genomic Lysis/Binding Buffer) eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar vorteksle iyice karıştırıldı.
4. Protein degradasyonu için 55°C' de 10 dk. inkübe edildi.
5. Lizata 200 µl %96-100 Etanol eklendi ve homojen bir solüsyon elde etmek için 5 saniye vortekslendi.
6. Lizat (~640 µl) spin-kolona aktarıldı. 10,000g x 1 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi.
7. Spin-kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. 500 µl Yıkama Tamponu 1 (Wash Buffer 1) eklendi ve 10,000g x 1 dk. santrifüj edildi.
9. Spin-kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. 500 µl Yıkama Tamponu 2 (Wash buffer 2) eklendi ve maksimum hızda oda sıcaklığında 3 dk. santrifüj edildi.
11. Spin-kolon sterile 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 50 µl PureLink Genomik Elüsyon Tamponu (Genomic Elution Buffer) eklendi. 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, maksimum hızda 1 dk. santirifüj edildi.
12. Elde edilen DNA' lar uygun şekilde etiketlenerek -20°C ye kaldırıldı.



### 3.3. DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi

İzolasyon sonrası elde edilen gDNA örnekleri Nanodrop 1000 (V.3.7) cihazında 2 µl örnek kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu DNA örnekleri MS-MLPA için 10 ng/ µl olacak şekilde sulandırıldı.

### 3.4. MS-MLPA

Metilasyon Analizi için MRC-Holland Firmasının SALSA MLPA ME028 Prader-Willi / Angelman Probemix (C1-0118) kiti kullanıldı ve üretici firmanın protokolü uygulandı.

#### **Denatürasyon / Hibridizasyon (1. Gün)**

1. Tek seferde 6 hasta, 3 normal (referans) ve 1 negatif kontrol olacak şekilde toplam 10 örnek ile çalışıldı.
2. MLPA Buffer ve MLPA Prob Miks vortekslenip kısaca santrifüj yapıldı.
3. Her bir tüpe 5 µl (50-200 ng) gDNA eklendi. Negatif kontrol için gDNA yerine 5 µl dH<sub>2</sub>O eklendi.
4. Denatürasyon PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) başlatıldı.

<b>Denatürasyon PZR</b>	98°C	5 dk.
	25 °C	2 dk. / durdur

5. Denatürasyon PZR devam ederken “Prob Miks” aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

<b>Prob Miks</b>	<b>X1</b>
Salsa Prob Miks	1.5 µl
MLPA Tamponu	1.5 µl
<b>Toplam</b>	<b>3 µl</b>

- Denatürasyon PZR devam ederken 25°C de 1 dakikadan sonra durdurulur. 25 °C’ de beklerken cihazın kapağı açılır ve her bir tüpe hızlı bir şekilde 3 µl hazırlanan prob miks dağıtılır.
- Cihazın kapağı kapatılır ve kalan 1 dk. devam ettirildikten sonra hibridizasyon PZR programı çalıştırılır. 17.5 saat sonra ligasyon reaksiyonu ile devam edilir.

<b>Hibridizasyon PZR</b>	95°C	1 dk.
	60 °C	16-20 saat (17.5 saat ideal)

### **Ligasyon Reaksiyonu (2. Gün)**

- Ligasyon Tamponları vortekslenir ve kısa bir santrifüj yapılır.
- 17.5 saat sonunda sıcaklık 20°C’ ye indirilir ve “Miks-1” hazırlanana kadar bekletilir. Bu arada Miks-1 hazırlanır. Enzim kesimi için her bir örneğe karşılık ikinci bir PZR tüpü hazırlanır.

<b>Miks-1</b>	<b>X1</b>
Ligaz-65 Tampon (Ligase-65 Buffer A)	3 µl
Su	10 µl
<b>Toplam</b>	<b>13 µl</b>

- PZR ürünleri oda sıcaklığına alınır ve hızlıca her bir tüpe 13 µl Miks-1 eklenir. Toplam hacim (21 µl) pipetaj yapılarak homojenize edildikten sonra 10 µl’ si ikinci tüplere aktarılır.
- Her örneğe ait 2 tüp PZR cihazına yerleştirilerek Ligasyon PZR başlatılır.

<b>Ligasyon PZR</b>	48°C	2 dk. / durdur
	48°C	30 dk.
	98°C	5 dk.
	20°C	durdur

5. PZR 48°C’ deyken 30 sn. kala durdurulup program bekletilirken 1. Tüpe 10 µl “Ligaz-65 Master Miks”, 2. tüpe ise 10 µl “Ligaz-Sindirir Miks (Ligase-Digestion Mix)” hızlıca pipetaj ile homojenize edilerek eklenir.

<b>Ligaz 65-Miks</b>		<b>X1</b>
	Ligaz-65 Tampon B	1,5 µl
	dH <sub>2</sub> O	8,25 µl
	Ligaz-65 enzim	0,25 µl
	<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

<b>Ligaz-Sindirir Miks</b>		<b>X1</b>
	Ligaz-65 Tampon B	1,5 µl
	dH <sub>2</sub> O	7,25 µl
	Ligaz-65 enzim	0,25 µl
	10 U/ µl, HhaI Restriksiyon Enzimi	0,5 µl
	<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

## **PZR (2. Gün)**

1. Salsa PZR Primer Miks vortekslenir ve kısa santrifüj yapılır.
2. Polimeraz Master Miks hazırlanır ancak vorteks yapılmaz. Pipetaj yapılır ve buz üzerinde bekletilir.

<b>Polimeraz Master Miks</b>		<b>X1</b>
	Salsa PZR Primer Miks	1 µl
	dH <sub>2</sub> O	3,75 µl
	Salsa Polimeraz Enzimi	0,25 µl
	<b>Toplam</b>	<b>5 µl</b>

3. 20°C de (oda sıcaklığında) her bir örneğe 5 µl Polimeraz Master Miks dağıtılır ve PZR protokolü başlatılır.

<b>PZR Protokol</b>	35 Döngü	95 °C	30 saniye (sn.)
		60 °C	30 sn.
		72 °C	60 sn.
		72 °C	20 dk.
		15 °C	durdur

## **Örnek Yükleme**

PZR ürünleri, aşağıdaki tablo baz alınarak hazırlanır ve cihaza yükleme yapılır. Ayrıca bu ürünler 1 hafta +4 °C de, daha uzun süre için -20 °C de, karanlıkta saklanabilir.

Cihaz	MLPA Primer Boya	Kapiller	Yükleme Reaksiyonu	Ayarlar
ABI-Prism 3100 (Avant)	FAM	36,50 cm	1 µl PZR ürünü 0.3 µl LIZ size standart 9 µl HiDi formamit  96 well-plate' e yükleme yapılır. 3 dk. 86 °C' de; 3 dk. 4 °C' de inkübe edilir.	-Yürütme modülü: Fragment Analizi -Enjeksiyon (iğne) Voltajı: 1.6 kV -Enjeksiyon zamanlaması: 15 sn -Yürütme voltajı: 15 kV -Yürütme zamanı: 1800 sn. -Fırın sıcaklığı: 60°C

### 3.5. MS-MLPA Sonuçlarının Analizi

Elde edilen verilerin “.fsa” uzantılı dosyaları “CRM Coffalyser.Net Versiyon 04 - © KASIM 2018” programı kullanılarak; ayrıca Kopya sayısı ve metilasyon oranı sonuç paterni SALSA MLPA Probemix ME028-C1 PWS/AS (C1—0118) klavuzuna göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.1.).

**Tablo 3.1.:** Kopya sayısı ve metilasyon oranı sonuçlarının değerlendirilmesi [SALSA MLPA Probemix ME028-C1 PWS/AS (C1—0118) Product Description]. Bu kit damgalama merkezindeki değişimleri göstermemektedir. Dolayısıyla olgunun UPD sonucu mu yoksa ID sonucu mu PWS olduğunu anlamak için STR Analizi yapılması gerekmektedir.

	Delesyon sonucu gözlenen PWS	Dizomi sonucu gözlenen PWS	Referans	Dizomi sonucu gözlenen AS	Delesyon sonucu gözlenen AS	Duplikasyon
15q11 bölgesinin genomik pozisyonu	M_	MM	PM	PP	P_	PMM
Kopya sayısı	1	2	2	2	1	3
Kopya sayısı oranı	0.5	1	1	1	0.5	1.5
Metilasyon yüzdesi	%100	%100	%50	%0	%0	%70
Kesim sonrası oran	1	1	0.5	0	0	0.7

### 3.6. Mikrosatellit Analizi

Analiz sonucu anormal metilasyon paterni gösteren olguya, bu durumun kaynağını göstermek amacıyla STR markırları kullanılarak mikrosatellit analizi gerçekleştirildi. Bunun için hastanın ebeveynlerinden de bölüm 3.2.' deki protokole göre gDNA izolasyonu yapıldı.

Kromozom 15q11-q13 bölgesindeki lokuslara spesifik 3 primer çifti [İleri (F) ve Geri (R)] yayınlanan makaleler baz alınarak sipariş verildi.

Primer Lokusu	Primer Dizisi	Uzunluk (bp)
D15S811-F	AGGCATAACTGCATAGTAAATG	233
D15S811-R	CAGGCATCCATTTTGAATAGAG	
D15S817-F	GTATAGAACCGTTCATACTAC	296
D15S817-R	CTGATGGCATTTCAGCCTTA	296
D15S822-F	AACTGTATCCAGCATGAATC	340
D15S822-R	CATAAAGTTAGGTTGATTGAG	

### **PZR ve koşulları**

- D15S811, D15S817 ve D15S822 primerleri için kurulan reaksiyon ve döngü koşulları aşağıdaki gibidir. PZR Miks; anne, baba ve olgu 2' nin DNA' sı ayrı tüplerde olacak şekilde hazırlanmıştır.

<b><u>PZR MİKS</u></b>	<b><u>X1</u></b>
10X Taq reaksiyon tamponu	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTP Miks (20 µM)	1 µl
F- Primer (her bir lokus için)	1 µl
R- Primer (her bir lokus için)	1 µl
Taq DNA Polimeraz (500 u)	0.2 µl
DNA (50 ng)	4 µl
dH <sub>2</sub> O	12,8 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

<b>Touch-Down PZR Koşulları</b>	95 °C	5 dk.	
	95 °C	45 sn.	25 Döngü
	60 °C	1 dk. (-1°C)	
	72 °C	1 dk.	
	95 °C	30 sn.	30 Döngü
	50 °C	45 sn.	
	72 °C	30 sn.	
	72 °C	10 dk.	
	+4 °C	∞	

### **PZR örneklerinin yüklenmesi, yürütülmesi ve görüntülenmesi**

- PZR ürünlerinin varlığının kontrolü için %1' lik agaroz jel döküldü. Jel hazırlanırken 8 µl EtBr eklendi ve donmaya bırakıldı.
- Örnekler olgu, anne ve baba sırasında olacak şekilde 4 µl 6X yükleme tamponu 4 µl PZR ürünü ile karıştırıldıktan sonra toplamda 8 µl örnek kuyucuklara yüklendi. Örnek boyutlarının kıyaslanması için 50 bp DNA Markır (DNA Ladder) kullanıldı.
- Yüklenen örnekler 120 V/ 20 dk. yürütüldü.
- Jel, OmniDOC Jel Dokümantasyon Sistemi ile görüntüledi. Ürün varlığı doğrulandıktan sonra, mikrosatellit analizine geçildi.

### **Mikrosatellit analizi**

- %3' lük agaroz jel, 12 µl EtBr kullanılarak kasete döküldü ve yaklaşık 1 saat donması beklenildi.

- Her bir 5 µl PZR örneği için 5 µl 6X yükleme tamponu kullanılarak aşağıdaki sırayla örnekler kuyucuklara yüklendi.
- Örnekler önce 60 V/ 1 saat yürütüldü. Daha sonra güç kaynağı 120 V/3 saat yürütüldü. Bu sırada tamponun ısınması ve jeli eritmesi ihtimalini önlemek amacıyla buz aküleri kullanıldı.
- Jel, OmniDOC Jel Dokümantasyon Sistemi ile görüntüledi.

**Tablo 3.2.:** Olgu, anne ve babanın PZR ürünlerinin mikrosatellit analizi için jele yükleme sırası. Olgu: A, Anne: A, Baba: B, Markır: M, Negatif Kontrol: NK.

50 bp Markır (M)	Primer 1 (D15S811)			50 bp Markır (M)	Primer 2 (D15S817)			50 bp Markır (M)	Primer 3 (D15S822)			50 bp Markır (M)	Negatif Kontrol (NK)	50 bp Markır (M)
M	O	A	B	M	O	A	B	M	O	A	B	M	NK	M



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların değerlendirilmesi

Çalışmaya 12 hasta dahil edilmiştir. Sitogenetik olarak normal karyotipe sahip ve FISH ile herhangi bir delesyon taşımadığı belirlenmiş hasta grupları çalışmada yer almıştır. Hastalar Holm ve ark. tarafından belirlenen kriterlere göre değerlendirilmiştir (Holm ve ark., 1993). Olguların klinik bulguları Tablo 4.1.' de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.:** Hasta grubunun majör ve minör bulguları

Olgu	Yaş/Cinsiyet	Klinik Bulgular	PWS Tam Skorlaması
1	15 /E	Hipotoni, bilişsel yetersizlik, küçük el-ayak, şaşılık-miyop, öğrenme güçlüğü	4
2	14 ay /K	Hipotoni, hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, badem göz, küçük el-ayak, hipogonadizm, öfke-inat, şaşılık-miyop	6,5
3	3 yaş 9 ay /K	Hipotoni, hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, anormal yüz şekli, şaşılık-miyop	4,5
4	17 yaş/E	Hipotoni, bilişsel yetersizlik, öfke-inat, öğrenme güçlüğü	3,5
5	4 yaş /E	Hipotoni, badem göz, küçük el-ayak, beslenme problemleri	3,5
6	4 yaş /E	Hipotoni, hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, badem göz, hipogonadizm	5
7	13 yaş /E	Hiperfaji-obezite, uyku bozukluğu, öfke-inat, öğrenme güçlüğü	3
8	15 yaş /K	Hipotoni, hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, badem göz, öfke-inat	4,5
9	2 yaş 9 ay /E	Hiperfaji-obezite, şaşılık-miyop, hipopigmentasyon	2
10	6 yaş /E	Hafif şiddette hipotoni, hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, şaşılık-miyop	3,5
11	2 yaş 9 ay /E	Hipotoni, hiperfaji-obezite, şaşılık-miyop, hipopigmentasyon	3
12	9 yaş /E	Hiperfaji-obezite, bilişsel yetersizlik, badem göz, küçük el-ayak, hipogonadizm, uyku bozukluğu	5

## 4.2. Normal metilasyon profili tespit edilen olgular

Tablo 3 ve CRM Coffalyser.Net Versiyon 04 programı kullanılarak yapılan analiz sonucunda; Olgu 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12' de normal metilasyon paterni gözlenmiştir.

## 4.3. Anormal metilasyon profili tespit edilen olgu

### 4.3.1. Olgu 2

#### Anamnezi

- Olgu 32 haftalık iken sezaryen ile doğmuştur.
- Olgu 1 yaş 2 aylık (14 aylık) tır.
- Anne ve baba arasında herhangi bir akrabalık yoktur.
- Küçük ve şişkin el-ayak, hipotoni, hiperfaji, obezite, badem göz, mental yetersizlik, inatçı bir kişiliğin olması, şaşılık gibi klinik bulgular bulunmaktadır (Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).
- Sitogenetik olarak normal karyotipe sahiptir.
- FISH yöntemi ile yapılan analizde herhangi bir mikrodelyasyon gözlenmemiştir.



Şekil 4.1.: Olgunun şişkin, kısa ve küçük parmaklar gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf.



**Şekil 4.2.:** Olgunun küçük el-ayak, hiperfaji ve obezite, badem göz gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf.



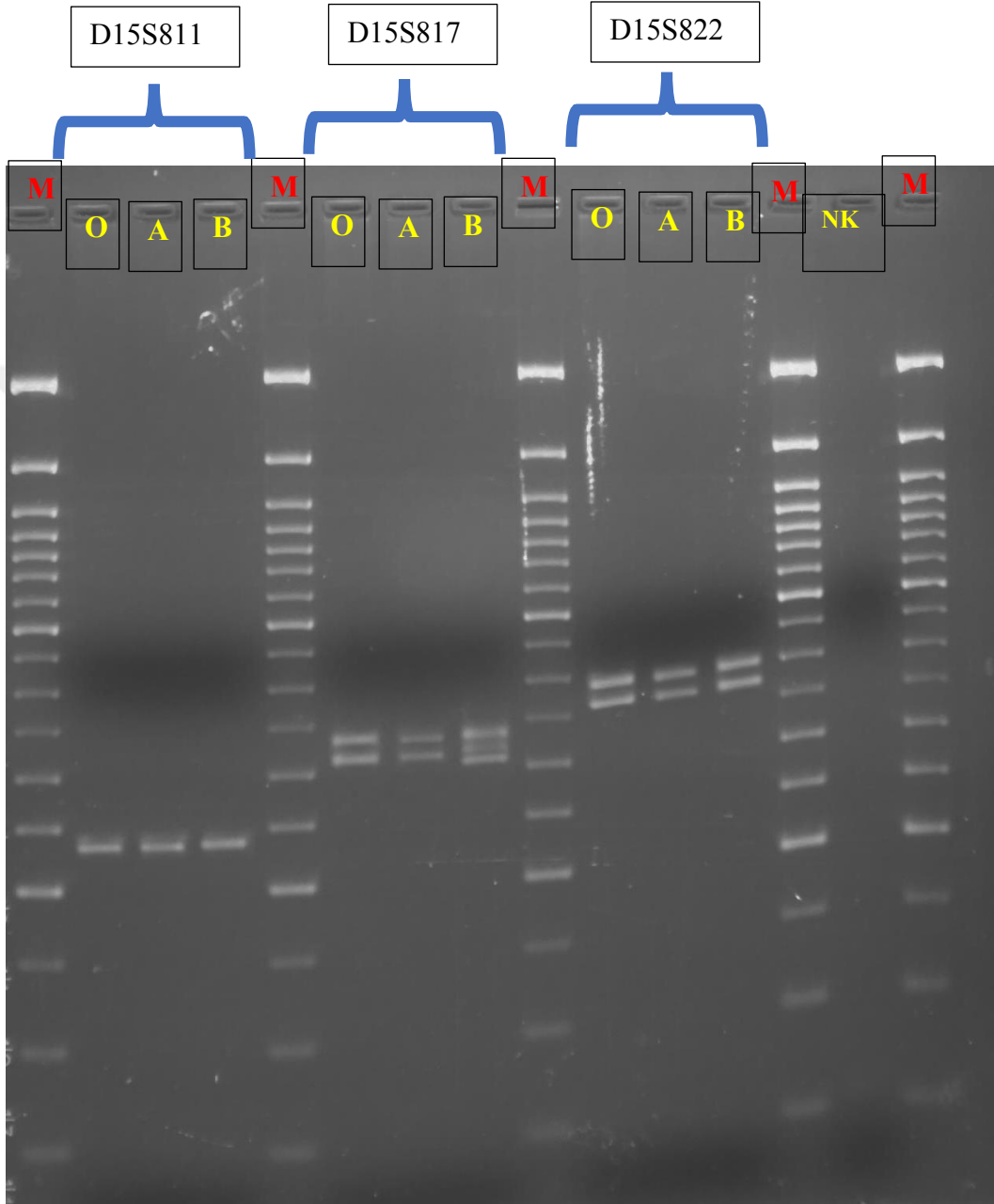
**Şekil 4.3.:** Olgunun küçük ve kısa ayak parmaklar gibi PWS' nin klinik bulgularını gösteren fotoğraf.











**Şekil 4.9.:** D15S811, D15S817 ve D15S822 primerleri kullanılarak kurulan Touch-Down PZR sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin %3' lük agaroz jel görüntüsü. M: 50 bp Markır; O: Olgu; A: Anne; B: Baba. D15S817 primerini olgu, anne ve baba açısından kıyasladığımızda; olgunun her iki 15 numaralı kromozomlarını anneden aldığı gözlenmektedir (mat UPD 15). D15S811 ve D15S822 lokusları ise olgu, anne ve babada aynı bant paternini gösterdiği için informatif değildir.

## 5. TARTIŞMA

PWS, prevalansı 1/10,000-1/30,000 olup; klinik olarak karakteristik el ve yüz özellikleri, erken bebeklik döneminde hipotoni, zayıf emme ve beslenme bozuklukları, daha sonraki dönemde ise hiperfaji ve davranış bozuklukları ile karakterize multisistemik bir hastalıktır (Cassidy ve ark., 2012). PWS' den sorumlu bölge ise 15 numaralı kromozomun proksimal kolunda, 15q11.2-q13 bölgesinde 5-6 megabazlık (Mb) bir alanda lokalizedir. Bu bölgedeki genler sağlıklı bireylerde paternal kromozomda eksprese edilirken, maternal kromozomda ise damgalanarak susturulmuştur. Damgalama işlemi ise o bölgenin metillenmesi yoluyla susturulmasıdır. Dolayısıyla bu bölgedeki genlerin ekspresyonlarında meydana gelen farklılıklar PWS' nin fenotipine sebep olmaktadır (Abdilla ve ark., 2017). PWS' ye sebep olan üç temel mekanizma olup, bunlardan birincisi ve en sık gözlenen paternal kromozom 15q11.2-q13 bölgesinde meydana gelen delesyondur ve PWS' li olguların %70' ini oluşturmaktadır. İkinci mekanizma ise mat UPD 15' dir ve olguların yaklaşık %25' ini oluşturmaktadır. Diğerlerine göre daha az gözlenen üçüncü mekanizma ise damgalama merkezinde meydana gelen hatalardır ve bu grup, PWS' li olguların yaklaşık %2,5' unu oluşturmaktadır. Dengeli translokasyonlar ise çok daha nadir gözlenmektedir ve olguların %1' inden daha azını oluşturmaktadır (Bittel ve Butler, 2005; Cassidy ve ark., 2012).

PWS' nin tanısı farklı genetik testler ile konulabilmektedir. Bunlar arasında ilk olarak tercih edilecek yöntem DNA Metilasyon Analizi' dir. Klinik olarak PWS tanısı koyduran bu test, ne yazık ki PWS' ye sebep olan genetik mekanizmaların ayrımını yapamamakta ve genetik danışmanlık için yeterli bilgiyi vermemektedir (Glenn ve ark., 1997). Bu nedenle olguda anormal metilasyon paterni gözleendiğinde yapılacak ilk basamak, PWS' ye sebep olan genetik mekanizmayı belirlemektir. Delesyon, PWS' li olgular arasında en sık gözlenen mekanizma olduğu için ilk olarak delesyon tespiti yapılır. Kromozom 15q11.2-q13 bölgesindeki bu delesyonun boyutundan ve bantlar arasındaki kalınlıktan ötürü ışık mikroskobu ile gözlenmesi hiç kolay değildir. Bu yüzden G-bantlama PWS' nin tanısını koymada yetersizdir. Dolayısıyla doğru tanı için FISH ve CMA gibi moleküler testlerin yapılması gerekir. CMA ile pek çok delesyonun boyutu belirlenebilirken; CMA, FISH ile yapılan analize göre daha pahalıdır. Ayrıca



nadir de olsa kromozom 15'in proksimalini de kapsayan translokasyon ve inversiyonları belirleyemediği için; eş zamanlı karyotip ve FISH analizi daha çok tercih edilmektedir (Cassidy ve Driscoll, 2009; Rocha ve Paiva, 2014). Eğer olguda anormal metilasyon paterni tespit edilmiş ve delesyon tespit edilmemiş ise, bir sonraki aşama olguda UPD'nin mi yoksa damgalama merkezinde meydana gelen değişimlerin mi var olduğu tespit edilmektedir. Bu da STR Analizi ile yapılmaktadır (Cassidy ve ark., 2012).

Son zamanlarda PWS'nin tanısı için daha avantajlı bir yöntem olan MS-MLPA yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan kümülatif çalışmalar MS-MLPA yönteminin delesyonu ve anormal metilasyon paternini tespit edebildiğini ve aynı zamanda bu bölgedeki kopya sayısı değişimi hakkında bilgi verdiğini göstermektedir (Procter ve ark., 2006; Henkhaus ve ark., 2012; Mahmoud ve ark., 2019) Ayrıca DNA Metilasyon Analizi'ne kıyasla tek bir gen lokusunu değil, metillenmiş ve birbirinden farklı beş bölgeyi incelemektedir. Dolayısıyla MS-MLPA ile delesyon ve metilasyon durumları aynı anda değerlendirilebilmektedir. Tüm bunlara karşın MS-MLPA Analizi'nin DNA Metilasyon Analizi'nde olduğu gibi en büyük dezavantajı UPD ve ID arasındaki ayrımı yapamamasıdır. Dolayısıyla, UPD'nin tespit edilmesinde STR Analizi hala altın standart olarak kabul edilen ve kullanılan bir testtir (Cassidy ve ark., 2012; M. G. Butler, 2017a).

Bu çalışmada MS-MLPA yöntemi ile 12 olgu değerlendirilmiş ve 1 tanesinde anormal metilasyon paterni tespit edilmiştir. Bu anormal metilasyon paterninin ortaya çıkmasına sebep olan mekanizmanın UPD olduğu tespit edilmiş ve olguya PWS tanısı konulmuştur. Diğer 11 olguda ise herhangi bir delesyon olmaması ve normal metilasyon paterni gözlenmesine rağmen klinik bulguları PWS'nin majör ve minör klinik bulgularıyla örtüşmektedir. Bu da bize farklı kromozomların belli bölgelerindeki değişimlerin PWS'nin klinik bulgularının ortaya çıkmasına sebep olabileceğini düşündürmüştür ve yapılan literatür taramasına göre bu olgular Prader-Willi Benzeri Sendrom (PWLS) içerisinde yer almaktadır (Rocha ve Paiva, 2014). PWLS fenotipi gösteren olgularda, daha önce yapılan çalışmalarda kromozom 1p, 2p, 3p, 6q, 9q ilişkili kromozom abnormaliteleri; maternal UPD 14 ve frajil X tespit edilmiştir (Gillissen-Kaesbach ve Horsthemke, 1994; Eugster ve ark., 1997; Berends ve ark., 1999; Faivre ve

ark., 2002; Cormier-Daire ve ark., 2003). Yapılan sistematik değerlendirmeye göre PWLS' de en yaygın görülen klinik bulgular; obezite (%84), hiperfaji (%72.7), bilişsel yetersizlik (%54.5), psikomotor gecikme (%50) ve hipotonidir (%43.18) (Rocha ve Paiva, 2014).

Literatüre göre PWLS' li 35 olguda 6q16 delesyonu tanımlanmış ve bu bulgunun PWLS fenotipinde gözlenen en yaygın genetik abnormalite olduğu gösterilmiştir; bu 35 etkilenmiş olgunun 22' si erkektir (Bonaglia ve ark., 2008; Izumi ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da her ne kadar 6q16 delesyon bölgesi taranmamış olsa da PWLS grubu içerisinde değerlendirdiğimiz 11 olgunun 9' unun erkek olması nedeniyle, belki de bu sendromun daha çok erkeklerde gözlenen bir sendrom olabileceği hipotezi öne sürülebilir.

Literatürdeki son yayınlarda, 6q16 bölgesinde yer alan özellikle *SIMI* (single-minded 1) geninin fonksiyon kaybına neden olan genomik varyantın obezite ve PWLS' de görülen klinik bulgular ile ilişkili olduğu savunulmaktadır (Holder ve ark., 2000; Bonnefond ve ark., 2013). *SIMI* genindeki fonksiyon kaybı, PWLS klinik bulgularına sahip ve sahip olmayan olgularda hiperfajik obeziteye neden olabilmektedir (Bonnefond ve ark., 2013). Yine El Khattabi ve arkadaşları 2015 yılında PWLS' li 15 olgu ile yaptığı bir çalışmada 6q16.2-q16.3 bölgesindeki delesyonun PWLS fenotipi ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiş; bu bölgedeki delesyonun PWLS fenotipini gösteren olgularda en sık karşılaşılan genetik abnormalite olduğunu ifade etmişlerdir (El Khattabi ve ark., 2015). Çalışmamızda PWLS grubuna dahil ettiğimiz 11 olgunun çoğunda (%72.7) hiperfajik obezitenin gözlenmesi, bu olgularda ilk olarak *SIMI* geninin değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Bundan dolayı, bir sonraki çalışmamız PWLS grubuna dahil ettiğimiz 11 olguda bu bölgenin analizi yönünde olacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmaya dahil edilen 12 olgunun 1 tanesinde anormal metilasyon paterni, kalan 11 olguda ise normal metilasyon paterni tespit edilmiştir. Anormal metilasyon profili gösteren olguya daha sonra bu değişimin UPD' den mi yoksa damgalama merkezinde bir hatadan mı kaynaklandığını öğrenmek için STR markırları kullanılarak mikrosatellit analizi yapılmıştır. Elde edilen deney sonucuna göre, olguda PWS' ye sebep olan mekanizmanın UPD olduğu tespit edilmiştir. Normal metilasyon profili gösteren ve klinik bulgularından dolayı PWLS grubu içerisinde değerlendirdiğimiz 11 olguya ise bir sonraki aşamada, PWLS için kritik olduğu düşünülen 6q16.2-q16.3 bölgesinin değerlendirilmesinin yapılması planlanmaktadır.

Aranılan kriterlerin bulunamaması ve kısıtlı bütçe sebebiyle çalışmaya dahil edilen olgu sayısı planlanan sayının altında kalmıştır.

## KAYNAKLAR

Abdilla, Y., Andria Barbara, M., & Calleja-Agius, J. Prader-willi syndrome: Background and management. *Neonatal Netw.* 2017; 36 (3): 134-141.

Akefeldt, A., Tornhage, C. J., & Gillberg, C. 'A woman with prader-willi syndrome gives birth to a healthy baby girl'. *Dev Med Child Neurol.* 1999; 41 (11): 789-790.

Amor, D. J., & Halliday, J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod.* 2008; 23 (12): 2826-2834.

Andrieu, D., Meziane, H., Marly, F., Angelats, C., Fernandez, P. A., & Muscatelli, F. Sensory defects in *necdin* deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol.* 2006; 6: 56.

Angulo, M. A., Butler, M. G., & Cataletto, M. E. Prader-willi syndrome: A review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest.* 2015; 38 (12): 1249-1263.

Angulo, M. A., Castro-Magana, M., Lamerson, M., Arguello, R., Accacha, S., & Khan, A. Final adult height in children with prader-willi syndrome with and without human growth hormone treatment. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A (13): 1456-1461.

Aycan, Z., & Bas, V. N. Prader-willi syndrome and growth hormone deficiency. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014; 6 (2): 62-67.

Bajrami, E., & Spiroski, M. Genomic imprinting. *Open Access Maced J Med Sci.* 2016; 4 (1): 181-184.

Ben-Porath, I., & Cedar, H. Imprinting: Focusing on the center. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10 (5): 550-554.

Berends, M. J., Hordijk, R., Scheffer, H., Oosterwijk, J. C., Halley, D. J., & Sorgedrager, N. Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the prader-willi phenotype. *Am J Med Genet.* 1999; 84 (1): 76-79.

Bieth, E., Eddiry, S., Gaston, V., Lorenzini, F., Buffet, A., Conte Auriol, F., . . . Tauber, M. Highly restricted deletion of the *snord116* region is implicated in prader-willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23 (2): 252-255.

Bilgin, H. M. Ghrelin; gündemdeki hormon. *Dicle Tıp Dergisi.* 2006; 33 (4): 268-272.

Bischof, J. M., Stewart, C. L., & Wevrick, R. Inactivation of the mouse magel2 gene results in growth abnormalities similar to prader-willi syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007; 16 (22): 2713-2719.

Bittel, D. C., & Butler, M. G. Prader-willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7 (14): 1-20.

Bittel, D. C., Kibiryeve, N., & Butler, M. G. Expression of 4 genes between chromosome 15 breakpoints 1 and 2 and behavioral outcomes in prader-willi syndrome. *Pediatrics.* 2006; 118 (4): e1276-1283.

Bonaglia, M. C., Ciccone, R., Gimelli, G., Gimelli, S., Marelli, S., Verheij, J., . . . Zuffardi, O. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: Narrowing the critical region for prader-willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16 (12): 1443-1449.

Bonnefond, A., Raimondo, A., Stutzmann, F., Ghossaini, M., Ramachandrapa, S., Bersten, D. C., . . . Froguel, P. Loss-of-function mutations in sim1 contribute to obesity and prader-willi-like features. *J Clin Invest.* 2013; 123 (7): 3037-3041.

Bora, G., & Yurter, H. E. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp derdisi.* 2007; 38: 48-54.

Buiting, K. Prader-willi syndrome and angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010; 154C (3): 365-376.

Butler, J. V., Whittington, J. E., Holland, A. J., Boer, H., Clarke, D., & Webb, T. Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with prader-willi syndrome: A population-based study. *Dev Med Child Neurol.* 2002; 44 (4): 248-255.

Butler, M. G. Management of obesity in prader-willi syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2 (11): 592-593.

Butler, M. G. Genomic imprinting disorders in humans: A mini-review. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26 (9-10): 477-486.

Butler, M. G. Prader-willi syndrome: Obesity due to genomic imprinting. *Curr Genomics.* 2011; 12 (3): 204-215.

Butler, M. G. Benefits and limitations of prenatal screening for prader-willi syndrome. *Prenat Diagn.* 2017a; 37 (1): 81-94.

Butler, M. G. Clinical and genetic aspects of the 15q11.2 bp1-bp2 microdeletion disorder. *J Intellect Disabil Res.* 2017b; 61 (6): 568-579.

Butler, M. G., Bittel, D. C., Kibiryeva, N., Talebizadeh, Z., & Thompson, T. Behavioral differences among subjects with prader-willi syndrome and type i or type ii deletion and maternal disomy. *Pediatrics*. 2004; 113 (3 Pt 1): 565-573.

Butler, M. G., Fischer, W., Kibiryeva, N., & Bittel, D. C. Array comparative genomic hybridization (acgh) analysis in prader-willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A (7): 854-860.

Butler, M. G., Lee, J., Manzardo, A. M., Gold, J. A., Miller, J. L., Kimonis, V., & Driscoll, D. J. Growth charts for non-growth hormone treated prader-willi syndrome. *Pediatrics*. 2015; 135 (1): e126-135.

Butler, M. G., Manzardo, A. M., & Forster, J. L. Prader-willi syndrome: Clinical genetics and diagnostic aspects with treatment approaches. *Curr Pediatr Rev*. 2016; 12 (2): 136-166.

Butler, M. G., Sturich, J., Lee, J., Myers, S. E., Whitman, B. Y., Gold, J. A., . . . Driscoll, D. J. Growth standards of infants with prader-willi syndrome. *Pediatrics*. 2011; 127 (4): 687-695.

Butler, M. G., Theodoro, M., & Skouse, J. D. Thyroid function studies in prader-willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A (5): 488-492.

Butler, M. G., Theodoro, M. F., Bittel, D. C., & Donnelly, J. E. Energy expenditure and physical activity in prader-willi syndrome: Comparison with obese subjects. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A (5): 449-459.

Cassidy, S. B., & Driscoll, D. J. Prader-willi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17 (1): 3-13.

Cassidy, S. B., Lai, L. W., Erickson, R. P., Magnuson, L., Thomas, E., Gendron, R., & Herrmann, J. Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of prader-willi syndrome due to maternal disomy. *Am J Hum Genet*. 1992; 51 (4): 701-708.

Cassidy, S. B., Schwartz, S., Miller, J. L., & Driscoll, D. J. Prader-willi syndrome. *Genet Med*. 2012; 14 (1): 10-26.

Chai, J. H., Locke, D. P., Greally, J. M., Knoll, J. H., Ohta, T., Dunai, J., . . . Nicholls, R. D. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots bp1 and bp2 of the prader-willi/angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet*. 2003; 73 (4): 898-925.

Christian, S. L., Robinson, W. P., Huang, B., Mutirangura, A., Line, M. R., Nakao, M., . . . Ledbetter, D. H. Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint

regions in both prader-willi and angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet.* 1995; 57 (1): 40-48.

Clarke, D. J., Boer, H., Whittington, J., Holland, A., Butler, J., & Webb, T. Prader-willi syndrome, compulsive and ritualistic behaviours: The first population-based survey. *Br J Psychiatry.* 2002; 180: 358-362.

Cormier-Daire, V., Molinari, F., Rio, M., Raoul, O., de Blois, M. C., Romana, S., . . . Colleaux, L. Cryptic terminal deletion of chromosome 9q34: A novel cause of syndromic obesity in childhood? *J Med Genet.* 2003; 40 (4): 300-303.

Cox, D. M., & Butler, M. G. The 15q11.2 bp1-bp2 microdeletion syndrome: A review. *Int J Mol Sci.* 2015; 16 (2): 4068-4082.

Cox, G. F., Burger, J., Lip, V., Mau, U. A., Sperling, K., Wu, B. L., & Horsthemke, B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet.* 2002; 71 (1): 162-164.

Crino, A., Schiaffini, R., Ciampalini, P., Spera, S., Beccaria, L., Benzi, F., . . . diabetology. Hypogonadism and pubertal development in prader-willi syndrome. *Eur J Pediatr.* 2003; 162 (5): 327-333.

Dittrich, B., Buiting, K., Gross, S., & Horsthemke, B. Characterization of a methylation imprint in the prader-willi syndrome chromosome region. *Hum Mol Genet.* 1993; 2 (12): 1995-1999.

Docherty, L. E., Rezwan, F. I., Poole, R. L., Jagoe, H., Lake, H., Lockett, G. A., . . . Mackay, D. J. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. *J Med Genet.* 2014; 51 (4): 229-238.

Driscoll, D. J., Waters, M. F., Williams, C. A., Zori, R. T., Glenn, C. C., Avidano, K. M., & Nicholls, R. D. A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent, distinguishes the angelman and prader-willi syndromes. *Genomics.* 1992; 13 (4): 917-924.

Duker, A. L., Ballif, B. C., Bawle, E. V., Person, R. E., Mahadevan, S., Alliman, S., . . . Sahoo, T. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the snord116 c/d box snorna cluster in prader-willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18 (11): 1196-1201.

Dykens, E. M., Cassidy, S. B., & King, B. H. Maladaptive behavior differences in prader-willi syndrome due to paternal deletion versus maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard.* 1999; 104 (1): 67-77.

Dykens, E. M., Hodapp, R. M., Walsh, K., & Nash, L. J. Profiles, correlates, and trajectories of intelligence in prader-willi syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1992; 31 (6): 1125-1130.

Eichler, E. E. Masquerading repeats: Paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res.* 1998; 8 (8): 758-762.

Eiholzer, U., & l'Allemand, D. Growth hormone normalises height, prediction of final height and hand length in children with prader-willi syndrome after 4 years of therapy. *Horm Res.* 2000; 53 (4): 185-192.

El Khattabi, L., Guimiot, F., Pipiras, E., Andrieux, J., Baumann, C., Bouquillon, S., . . . Delahaye, A. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including sim1. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23 (8): 1010-1018.

Entrez gene: Snrpn small nuclear ribonucleoprotein polypeptide n. (2019). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6638>

Eugster, E. A., Berry, S. A., & Hirsch, B. Mosaicism for deletion 1p36.33 in a patient with obesity and hyperphagia. *Am J Med Genet.* 1997; 70 (4): 409-412.

Faivre, L., Cormier-Daire, V., Lapierre, J. M., Colleaux, L., Jacquemont, S., Genevieve, D., . . . Vekemans, M. Deletion of the sim1 gene (6q16.2) in a patient with a prader-willi-like phenotype. *J Med Genet.* 2002; 39 (8): 594-596.

Falls, J. G., Pulford, D. J., Wylie, A. A., & Jirtle, R. L. Genomic imprinting: Implications for human disease. *Am J Pathol.* 1999; 154 (3): 635-647.

Festen, D. A., de Weerd, A. W., van den Bossche, R. A., Joosten, K., Hoeve, H., & Hokken-Koelega, A. C. Sleep-related breathing disorders in prepubertal children with prader-willi syndrome and effects of growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (12): 4911-4915.

Gillessen-Kaesbach, G., & Horsthemke, B. Clinical and molecular studies in fragile x patients with a prader-willi-like phenotype. *J Med Genet.* 1994; 31 (3): 260-261.

Glenn, C. C., Driscoll, D. J., Yang, T. P., & Nicholls, R. D. Genomic imprinting: Potential function and mechanisms revealed by the prader-willi and angelman syndromes. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3 (4): 321-332.



Glenn, C. C., Saitoh, S., Jong, M. T., Filbrandt, M. M., Surti, U., Driscoll, D. J., & Nicholls, R. D. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human snrpn gene. *Am J Hum Genet.* 1996; 58 (2): 335-346.

Gold, J. A., Ruth, C., Osann, K., Flodman, P., McManus, B., Lee, H. S., . . . Kimonis, V. E. Frequency of prader-willi syndrome in births conceived via assisted reproductive technology. *Genet Med.* 2014; 16 (2): 164-169.

Goldstone, A. P. Prader-willi syndrome: Advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15 (1): 12-20.

Heksch, R., Kamboj, M., Anglin, K., & Obrynba, K. Review of prader-willi syndrome: The endocrine approach. *Transl Pediatr.* 2017; 6 (4): 274-285.

Henkhaus, R. S., Kim, S. J., Kimonis, V. E., Gold, J. A., Dykens, E. M., Driscoll, D. J., & Butler, M. G. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification and identification of deletion genetic subtypes in prader-willi syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012; 16 (3): 178-186.

Holder, J. L., Jr., Butte, N. F., & Zinn, A. R. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the sim1 gene. *Hum Mol Genet.* 2000; 9 (1): 101-108.

Holm, V. A., Cassidy, S. B., Butler, M. G., Hanchett, J. M., Greenswag, L. R., Whitman, B. Y., & Greenberg, F. Prader-willi syndrome: Consensus diagnostic criteria. *Pediatrics.* 1993; 91 (2): 398-402.

Horsthemke, B., & Buiting, K. Genomic imprinting and imprinting defects in humans. *Adv Genet.* 2008; 61: 225-246.

Izumi, K., Housam, R., Kapadia, C., Stallings, V. A., Medne, L., Shaikh, T. H., . . . Grimberg, A. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving sim1 and prader-willi syndrome-like features. *Am J Med Genet A.* 2013; 161A (12): 3137-3143.

Kubota, T., Aradhya, S., Macha, M., Smith, A. C., Surh, L. C., Satish, J., . . . Ledbetter, D. H. Analysis of parent of origin specific DNA methylation at snrpn and pw71 in tissues: Implication for prenatal diagnosis. *J Med Genet.* 1996; 33 (12): 1011-1014.

Ledbetter, D. H., Riccardi, V. M., Airhart, S. D., Strobel, R. J., Keenan, B. S., & Crawford, J. D. Deletions of chromosome 15 as a cause of the prader-willi syndrome. *N Engl J Med.* 1981; 304 (6): 325-329.

Lee, S., Walker, C. L., Karten, B., Kuny, S. L., Tennesse, A. A., O'Neill, M. A., & Wevrick, R. Essential role for the prader-willi syndrome protein necdin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 (5): 627-637.

Locke, D. P., Seagraves, R., Nicholls, R. D., Schwartz, S., Pinkel, D., Albertson, D. G., & Eichler, E. E. Bac microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J Med Genet.* 2004; 41 (3): 175-182.

Macedo, D. B., Abreu, A. P., Reis, A. C., Montenegro, L. R., Dauber, A., Beneduzzi, D., . . . Latronico, A. C. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99 (6): E1097-1103.

Maher, E. R. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 Spec No 1: R133-138.

Mahgoub, N. A. Prader-willi syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2007; 19 (2): 203-204.

Mahmoud, R., Singh, P., Weiss, L., Lakatos, A., Oakes, M., Hossain, W., . . . Kimonis, V. Newborn screening for prader-willi syndrome is feasible: Early diagnosis for better outcomes. *Am J Med Genet A.* 2019; 179 (1): 29-36.

Malich, S., Largo, R. H., Schinzel, A., Molinari, L., & Eiholzer, U. Phenotypic heterogeneity of growth and psychometric intelligence in prader-willi syndrome: Variable expression of a contiguous gene syndrome or parent-child resemblance? *Am J Med Genet.* 2000; 91 (4): 298-304.

Matsubara, K., Kagami, M., & Fukami, M. Uniparental disomy as a cause of pediatric endocrine disorders. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2018; 27 (3): 113-121.

McCandless, S. E., & Committee on, G. Clinical report-health supervision for children with prader-willi syndrome. *Pediatrics.* 2011; 127 (1): 195-204.

Miller, J. L., Lynn, C. H., Driscoll, D. C., Goldstone, A. P., Gold, J. A., Kimonis, V., . . . Driscoll, D. J. Nutritional phases in prader-willi syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A (5): 1040-1049.

Milner, K. M., Craig, E. E., Thompson, R. J., Veltman, M. W., Thomas, N. S., Roberts, S., . . . Bolton, P. F. Prader-willi syndrome: Intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype. *J Child Psychol Psychiatry.* 2005; 46 (10): 1089-1096.

Mrc holland- mlpa *product description version c1-03.* (24-January-2019). Retrieved from <https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKy MjaDF-E-t9bmuxqlhe Lggfk8Hkjuss.&ProductOID= HukvIkjzRho>.

Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Butler, M. G., Karam, S., & Lalande, M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion prader-willi syndrome. *Nature*. 1989; 342 (6247): 281-285.

Priano, L., Grugni, G., Miscio, G., Guastamacchia, G., Toffolet, L., Sartorio, A., & Mauro, A. Sleep cycling alternating pattern (cap) expression is associated with hypersomnia and gh secretory pattern in prader-willi syndrome. *Sleep Med*. 2006; 7 (8): 627-633.

Procter, M., Chou, L. S., Tang, W., Jama, M., & Mao, R. Molecular diagnosis of prader-willi and angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem*. 2006; 52 (7): 1276-1283.

Pujana, M. A., Nadal, M., Guitart, M., Armengol, L., Gratacos, M., & Estivill, X. Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of lcr15 duplicons. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10 (1): 26-35.

Robinson, W. P. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays*. 2000; 22 (5): 452-459.

Rocha, C. F., & Paiva, C. L. Prader-willi-like phenotypes: A systematic review of their chromosomal abnormalities. *Genet Mol Res*. 2014; 13 (1): 2290-2298.

Sadakerska-Chudy, A., Kostrzewa, R. M., & Filip, M. A comprehensive view of the epigenetic landscape part i: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. *Neurotox Res*. 2015; 27 (1): 84-97.

Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J. R., Shinawi, M., Peters, S. U., Person, R. E., . . . Beaudet, A. L. Prader-willi phenotype caused by paternal deficiency for the hbii-85 c/d box small nucleolar rna cluster. *Nat Genet*. 2008; 40 (6): 719-721.

Schaaf, C. P., Gonzalez-Garay, M. L., Xia, F., Potocki, L., Gripp, K. W., Zhang, B., . . . Yang, Y. Truncating mutations of magel2 cause prader-willi phenotypes and autism. *Nat Genet*. 2013; 45 (11): 1405-1408.

Schulze, A., Mogensen, H., Hamborg-Petersen, B., Graem, N., Ostergaard, J. R., & Brondum-Nielsen, K. Fertility in prader-willi syndrome: A case report with angelman syndrome in the offspring. *Acta Paediatr*. 2001; 90 (4): 455-459.

Shaffer, L. G., Agan, N., Goldberg, J. D., Ledbetter, D. H., Longshore, J. W., & Cassidy, S. B. American college of medical genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med*. 2001; 3 (3): 206-211.

Sharkia, M., Michaud, S., Berthier, M. T., Giguere, Y., Stewart, L., Deladoey, J., . . . Chanoine, J. P. Thyroid function from birth to adolescence in prader-willi syndrome. *J Pediatr*. 2013; 163 (3): 800-805.

Sleutels, F., Barlow, D. P., & Lyle, R. The uniqueness of the imprinting mechanism. *Curr Opin Genet Dev*. 2000; 10 (2): 229-233.

*Snurf* gene, genecards human gene database. (2019). Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SNURF>

Sutcliffe, A. G., Peters, C. J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., . . . Maher, E. R. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary british survey. *Hum Reprod*. 2006; 21 (4): 1009-1011.

Tauber, M., Barbeau, C., Jouret, B., Pienkowski, C., Malzac, P., Moncla, A., & Rochiccioli, P. Auxological and endocrine evolution of 28 children with prader-willi syndrome: Effect of gh therapy in 14 children. *Horm Res*. 2000; 53 (6): 279-287.

Tuysuz, B., Kartal, N., Erener-Ercan, T., Guclu-Geyik, F., Vural, M., Perk, Y., . . . Erginel-Unaltuna, N. Prevalence of prader-willi syndrome among infants with hypotonia. *J Pediatr*. 2014; 164 (5): 1064-1067.

Vaiani, E., Herzovich, V., Chaler, E., Chertkoff, L., Rivarola, M. A., Torrado, M., & Belgorosky, A. Thyroid axis dysfunction in patients with prader-willi syndrome during the first 2 years of life. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010; 73 (4): 546-550.

Varela, M. C., Kok, F., Setian, N., Kim, C. A., & Koiffmann, C. P. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on prader-willi syndrome phenotype: Study of 75 patients. *Clin Genet*. 2005; 67 (1): 47-52.

Vogels, A., De Hert, M., Descheemaeker, M. J., Govers, V., Devriendt, K., Legius, E., . . . Fryns, J. P. Psychotic disorders in prader-willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004; 127A (3): 238-243.

Walter, J., & Paulsen, M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2003; 14 (1): 101-110.

West, L. A., & Ballock, R. T. High incidence of hip dysplasia but not slipped capital femoral epiphysis in patients with prader-willi syndrome. *J Pediatr Orthop*. 2004; 24 (5): 565-567.

Whitman, B. Y., & Accardo, P. Emotional symptoms in prader-willi syndrome adolescents. *Am J Med Genet*. 1987; 28 (4): 897-905.

Williams, C. A., Driscoll, D. J., & Dagli, A. I. Clinical and genetic aspects of angelman syndrome. *Genet Med.* 2010; 12 (7): 385-395.



## EKLER

EK 1

### AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

#### Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

#### 1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

##### a. Araştırmanın Adı:

Prader-Willi Sendromu Bulgularını Taşıyan Normal Karyotipe Sahip Olgularda Metilasyon ve UPD Profillerinin Araştırılması

##### b. Araştırmanın İçeriği:

Canlıların dış yapısındaki bozukluklarla ve mental retardasyonla ilişkili obezite, sendromik obezite olarak kabul edilmektedir. Sendromik obezitenin en yaygın formu yaklaşık 15000 doğumda bir görülen Prader-Willi sendromudur (PWS). PWS'nin klasik bulguları yenidoğan hipotonisi (kasın harekete karşı gösterdiği direncin düşük olması durumu, kas güçsüzlüğü), zayıf emme, doğum sonrası dönemde gelişme geriliği, psikomotor gelişimde gecikme, erken çocukluk döneminde obezite ile sonuçlanan doymama durumu, ergenlik döneminde kısa boy, küçük el ve ayaklar, hipogonodizm, hafiften orta dereceye kadar zekâ geriliği ve davranış bozukluklarıdır.

Bazı olgular klasik PWS' nin klinik bulgularına sahip olmalarına rağmen PWS' ye neden olan genetik bozuklukları taşımazlar ve Prader-Willi Benzeri Sendrom içerisinde yer alırlar. Dolayısıyla PW Benzeri Sendrom' un klasik PWS ile benzer özellikler göstermesi, hastalığın tanısını ve buna bağlı olarak tedavisini; aynı zamanda genetik danışmanlığını etkilemektedir.

Bu yüzden bu çalışmada; sitogenetik olarak normal olduğu, ayrıca FISH yöntemi ile 15q11-q13 bölgesinde herhangi bir mikrolelesyon taşımadığı tespit edilmiş 25 olguda Metilasyon Spesifik Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MS-MLPA) yöntemi ile bu bölgede metilasyon analizi yapılacaktır. Metilasyon profili anormal olan

olgulara ise, mikrosatellit analizi yapılarak UPD mekanizması değerlendirilecektir. Böylelikle PWS ile PW benzeri sendromun moleküler açıdan ayrımı yapılacak, doğru tanı sayesinde doğru genetik danışmanlık ve tedavi sağlanabilecektir. Metilasyon profili normal olan hastalarda ise PW benzeri sendromun klasik PWS fenotipi göstermesine sebep olabileceği düşünülen bölgeler arasında genotip-fenotip korelasyonları yapılabilecektir. Bu olguların oluşum mekanizmasını da belirleyebilmek bir sonraki araştırma konumuz olacaktır.

**c. Araştırmanın Amacı:**

Bu çalışmanın amacı, FISH yöntemi ile 15q11-q13 bölgesinde delesyon taşımadığı belirlenmiş, kromozomal olarak normal karyotipe sahip ancak PWS benzeri bulgular gösteren 25 olguda MS-MLPA (metylation specific-multiplex ligation-dependent probe amplification) yöntemi ile bu bölgedeki metilasyon profilini araştırıp, metilasyon profili anormal olan olgularda ise mikrosatellit analizi ile UPD mekanizması değerlendirilecektir.

Klasik sitogenetik yöntemlerle 15q11-q13 bölgesinde herhangi bir delesyon taşımadığı belirlenmiş hastalarda, MS-MLPA yöntemi uygulanarak bu bölgenin metilasyon profilinin çıkarılması, elde edilen veriler göre mikrosatellit analizi ile UPD mekanizmasının değerlendirilmesi sayesinde klasik PWS' nin PW Benzeri Sendrom'dan moleküler olarak ayrımı yapılabilecek, böylece doğru tanı sayesinde doğru genetik danışmanlık ve tedavi sağlanabilecektir.

**d. Araştırmanın Nedeni:**

( ) Bilimsel araştırma

( X ) Tez çalışması

**e. Araştırmanın Öngörülen Süresi:**

Satın alma işlemleri tamamlandıktan sonra 1 yıl.

**f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı:**

25 Olgu

**g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:**

Olgulara ait DNA materyalleri bireylerden alınacak kan örneklerinden Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda elde edilecektir. Elde edilen DNA örneklerinde MS-MLPA (methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification) yöntemi ile 15q11-q13 bölgesinde metilasyon analizi yapılacaktır. Metilasyon profili normal olan olgularda ise ebeveynlerinden de alınacak DNA örnekleri 15q11-q13 bölgesine spesifik STR markörleri kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılacaktır. Daha sonra %8 veya %10 Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile PZR ürünleri yürütülecektir. Elde edilen sonuçlara göre UPD mekanizması değerlendirilecektir.

## **2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:**

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Diğer kan alma işlemlerinde olduğu gibi, kan alınan yerde kızarma, şişme ve ağrı oluşabilir. Bunun dışında bu işlemin katılımcıya herhangi bir zararı olmayacaktır.

## **3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:**

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ile Klasik sitogenetik yöntemlerle kromozom karyotipi normal olan ancak Prader-Willi sendromu klinik özellikleri taşıyan olgularda hastalığın ortaya çıkmasına sebep olan epigenetik mekanizmanın aydınlatılmasıdır. Böylece doğru tanı ile doğru tedavi uygulanabilmesi sağlanacaktır.

## **4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:**

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

**Adı- Soyadı: Doç.Dr.Sezin YAKUT UZUNER**

**Telefon:2496970**

**Arş.Gör.Pınar BAŞŞİ**

**Telefon:2496970**

## **5. Zararların Karşılanması:**



Bu çalışmada uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek ve tazmin edilecek bir zarar ön görülmemektedir. Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımın .....tarafından karşılanacağı bana bildirildi.

#### **6. Araştırma Giderleri:**

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

#### **7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:**

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

#### **8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.**

#### **9. Gizlilik:**

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde, .....firması ve yöneticilerine ulaştırılacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, verilere gereksinimi olan öteki ülkelerin hükümetlerine ve ilgili birimlerine iletilebilir. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

#### **10. Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularımın doyurucu

cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

**Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:**

**Yaş ve Cinsiyeti:**

**İmzası:**

**Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):**

.....

.....

**Tarih:**

**Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;**

**Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:**

**İmzası:**

**Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):**

.....

.....

**Tarih:**

**Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: Doç. Dr. Sezin YAKUT  
UZUNER**

**Arş.Gör.Pınar BAHŞİ**

**İmzası:**

**Tarih:**

**Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin**

**Adı- Soyadı:**

**İmzası:**

**Görevi:**

**Tarih:**



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	PINAR	<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Soyadı</b>	BAHŞİ	<b>Tel no</b>	+90 (537) 811 1457
<b>Doğum tarihi</b>	16.04.1993	<b>e-posta</b>	pınarbahsi@hotmail.com

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Tepecik Hüsnü Özyeğin Lisesi	2011
<b>Lisans</b>	İnönü Üniversitesi	2016
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi	2019
<b>Doktora</b>		

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
Arş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2017-Devam Ediyor

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
İNGİLİZCE	YDS	70
İNGİLİZCE	YÖK DİL	90

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Battalgazi Belediyesi 4007 TÜBİTAK Bilim Şenliği	BATTALGAZİ BELEDİYESİ	2016-2016
Prader-Willi Sendromu Bulgularını Taşıyan Normal Karyotipe Sahip Olgularda Metilasyon ve Uniparental Dizomi (UPD) Profillerinin Araştırılması	BAP	2017-2019
Fasiyal sinir hasarı sonrası rejenerasyon süresince ultrason terapinin VEGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	BAP	2018-2020

Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Yeri ve Önemi	BAP	2019-2020
---	-----	-----------

**Burslar-Ödüller:**

**Yayımlar ve Bildiriler:**

- Ailesel amiloidozis polinöropatisi oduğu düşünölen olgularda *TTR* gen mutasyonlarının araştırılması, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Poster Sunumu, 2017.