

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

**OTOZOMAL RESESİF GEÇİŞ GÖSTEREN MİKROFTALMİLİ BİR AİLEDE
MİKRODİZİN VE EKZOM SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE YENİ GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

SEZEN GÜNTEKİN ERGÜN

KASIM

2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

**OTOZOMAL RESESİF GEÇİŞ GÖSTEREN MİKROFTALMİLİ BİR AİLEDE
MİKRODİZİN VE EKZOM SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE YENİ GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

SEZEN GÜNTEKİN ERGÜN

Danışman

DOÇ. DR. GÜVEM GÜMÜŞ AKAY

Eş Danışman

PROF. DR. E. FERDA PERÇİN

KASIM

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmamın; akademik kural ve etik ilkelere baēlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sezen Güntekin Ergün

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay ve Prof. Dr. E. Ferda Perçin danışmanlığında Sezen Güntekin Ergün tarafından hazırlanan bu çalışma 05/11/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ayşe Nurten Akarsu

İmza: 


Üye: Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ

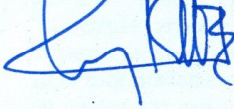
İmza: 

Üye: Doç. Dr. Yeşim Aydın Son

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Enstitü Müdürü



ÖZET

Doktora Tezi

OTOZOMAL RESESİF GEÇİŞ GÖSTEREN MİKROFTALMİLİ BİR AİLEDE MİKRODİZİN VE EKZOM SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE YENİ GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Sezen Güntekin Ergün

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç.Dr.Güvem Gümüş Akay

Eş Danışman: Prof.Dr.E.Ferda Perçin

Mikroftalmi, göz küresinin total aksiyal uzunluğunun yaşa göre ortalama en az iki standart sapma altında olması ile tanımlanmaktadır. Mikroftalmiler, ailesel veya sporadik, izole veya bir sendromun parçası, kromozomal ya da tek gene bağlı, unilateral veya bilateral olabilmektedir. Mikroftalmi'nin 1/3 oranında malformasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kalıtsal, maternal kaynaklı ve nedeni bilinmeyen mikroftalmiler olarak sınıflanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda mikroftalminin görülme sıklığının 1/7000 canlı doğumda olduğu bildirilmiştir.

Bugüne kadar mikroftalmi ile ilişkili genler tanımlanmış olmakla birlikte, hastalıkta gözlenen genetik heterojenite nedeni ile hastalığın genetik etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasına; anne baba arasında 3. derece akrabalık bulunan ve 3 etkilenmiş bireyden oluşan bir aile dahil edilmiştir. Ailenin etkilenmiş 3, sağlıklı 2 bireyinden 250K mikrodizin analizi yapılarak bugüne kadar mikroftalmi ile ilişkili olarak bildirilen genler elenmiştir. Ailenin etkilenmiş bireylerindeki homozigot bloklar belirlenerek, aranılacak kromozomlar daraltılmıştır. Proband olarak seçilen hastada ekzom dizileme yapılarak genomda bulunan genlerin kodlanan ekzonları dizilenmiştir. Mikrodizin ve ekzom dizileme verileri beraber değerlendirildiğinde mikroftalmiye neden olabileceği düşünülen göz gelişiminden sorumlu olduğu ve Wnt sinyal yolağında önemli bir reseptör görevi olduğu bildirilen *LRP5* geninde c.2827+1G>A splice-site mutasyonu bulunmuştur. Bu tez çalışması ile genetik heterojenite gösteren mikroftalmiye neden olabileceği düşünülen yeni bir aday gen tanımlanmıştır. *LRP5* geninin mikroftalmi patogenezindeki rolünün aydınlatılabilmesi için ileri seviyede hücrel ve hayvan modeli çalışmalarına ihtiyaç vardır. Mikroftalmiye neden olan ilave genlerin tanımlanması ile, bu hastalığın daha hızlı taranabilmesi, tanı koyulabilmesi ve doğru bir genetik danışma verilebilmesi olanağının artacağı ümit edilmektedir.

2015, 100 sayfa

Anahtar kelimeler: Mikroftalmi, *LRP5*, mikrodizin, ekzom dizileme

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF NEW GENES IN A FAMILY WITH MICROPHTHALMIA BY MICROARRAY AND EXOME SEQUENCING METHODS

Sezen Güntekin Ergün

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc.Prof. Güvem Gümüş Akay

Co-supervisor: Prof.E.Ferda Perçin

Microphthalmia has been defined as the measurement of the total axial length of eyeball to be below average of the two standard deviation according to the age. The origin of microphthalmia may be familial or sporadic, isolated or a part of syndrome, chromosomal or single gene related, unilateral or bilateral. One third of the microphthalmia has been reported to be associated with malformations. The etiology may be related to hereditary, maternal or idiopathic. As a result of the studies in the recent years the incidence of microphthalmia has been reported to be 1/7000 live births.

While several genes have been identified so far associated with microphthalmia, the genetic etiology of the disease has not been fully understood because of with genetic heterogeneity observed in this disease. In this doctorate thesis, we included a family who has three affected individuals and also having a third degree of consanguinity between the parents. Microarray analysis has been performed in 3 affected and 2 healthy individuals in order to exclude the genes that had been found to date. In order to narrow the chromosome all regions, blocks of homozygosity have been determined in the affected individuals. Exome sequencing was also performed in the proband in order to sequence the exons encoded throughout the genome. When the results of exome and microarray data were considered together as a splice-site mutation in *LRP5* gene [c.2827 + 1G>A], which is known to be important for eye development and Wnt receptor signaling pathway, was found to be the cause of microphthalmia in this family.

In this doctorate thesis a new candidate gene has been identified for the etiology of microphthalmia that is a genetically heterogeneous disease. Further cellular and animal model studies are warranted to clarify the role of *LRP5* gene in microphthalmia pathogenesis. With the identification of additional genes for microphthalmia, it is expected that the more rapid screening, diagnosis and a more accurate genetic counseling methodology would be available.

2015, 100 pages

Keywords: Microphthalmia, *LRP5*, microarray, exome sequencing

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tanıdığım sevgili hocalarım Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e, Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e ve Doç. Dr. Esra Tuğ'a benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşırken gösterdikleri hoşgörü ve sabırları için çok teşekkür ederim.

Doktora sürecimin ve tez çalışmamın başlamasına büyük emeği geçen, bu yolculukta beni yalnız bırakmayan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, beni sevmekten hiç vazgeçmeyen manevi annem Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e çok teşekkür ederim.

Bölüme ilk başladığım gün beni sevgiyle karşılayan, desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, öğrenirken tartışabildiğim, beni sabırla dinleyen bilim insanı Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e, bana ona abla diyebilecek kadar yakınlık gösteren sevgili Doç. Dr. Esra Tuğ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında tanıdığım ve çok sevdiğim, bana bilgisiyle her zaman destek olan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay'a çok teşekkür ederim.

Doktoraya başlamama destek olan ilk danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Ajlan Tükün'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana vaktini ayırıp, bulgularımı benimle değerlendiren, sohbetiyle beni her zaman neşelendiren sayın hocam Prof. Dr. A. Nurten Akarsu'ya çok teşekkür ederim.

Enstitüde tanıdığım ve onlardan ders almaktan büyük keyif aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Hilal Özdağ ve Yrd. Doç Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na, dönem arkadaşlarım Duru Aras ve Nazlı Sözmen'e dostlukları için, enstitümüzün gülen yüzü sevgili Asuman Erzincan'a bana gösterdiği sabır ve yakınlık için çok teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Benim bu günlere gelmemi sağlayan, beni sadece ben olduğum için karşılıksız seven, benim de canımdan çok sevdiğim sevgili aileme, ama içlerinden birisi var ki şu an benden çok uzakta olan sevgisini her zaman yanımda hissettiğim, bir gün görüşebileceğimizi bilmenin inancıyla sabırla beklediğim, canımın diğer yarısı biricik anneme beni böyle yetiştirdiği için sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Zor zamanlarımda yanımda olan, beni yalnız bırakmayan başta canım anneannem ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

Benimle bu zor hayatımı paylaşan, bana her zaman destek olan, sen olmasaydın yapamazdım dediğim hayat arkadaşım, can yoldaşım sevgili eşim Mehmet Ali Ergün'e ve ailesine beni hiç yalnız bırakmadıkları ve destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Ve hayatıma yeni bir anlam katan, evimizin neşe, huzur ve mutluluk kaynağı, yaşam sebebim canım oğluma benimle bu zor günleri paylaştığı için sonsuz teşekkür ederim.

Burada adlarını yazamadığım hayatıma girmiş olan gerçek dostlarıma, bana kattıkları herşey için çok teşekkür ederim.

Saygı ve sevgilerimle
Sezen Güntekin Ergün

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. GÖZÜN OLUŞUMU	2
2.2. MİKROFTALMİNİN TANIMI	4
2.3. MİKROFTALMİNİN ETİYOLOJİSİ.....	4
2.4. MİKROFTALMİNİN PREVALANSI.....	5
2.5. MİKROFTALMİNİN ANATOMİK SINIFLANDIRILMASI	5
2.6. MİKROFTALMİLERİN ETİYOLOJİLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI	70
2.6.1 İZOLE MİKROFTALMİLER.....	15
2.7. MİKROFTALMİNİN DEĞERLENDİRME STRATEJİLERİ	16
2.8. ÇALIŞMADA KULLANILAN MOLEKÜLER TEKNİKLER	17
2.8.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	17
2.8.2. KESİLMİŞ PARÇALARIN UZUNLUK POLİMORFİZMİ	18
2.8.3. BAĞLANTI ANALİZİ	19
2.8.4. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİ	21
2.8.5. DNA DİZİ ANALİZİ	22
2.8.6. EKZOM DİZİLEME.....	23
3. GEREKÇE VE AMAÇ	26
4. MATERYAL VE YÖNTEM	27

4.1. ÇALIŞMA GRUBU	27
4.2. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	30
4.2.1. GTG-BAN TLAMA YÖNTEMİ İLE KROMOZOM ANALİZİ	31
4.2.2. GTG BAN TLAMA.....	33
4.2.3. DNA İZOLASYONU	34
4.2.4. DNA'NİN BÜTÜNLÜĞÜNÜN, SAFLIĞININ VE MİKTARININ BELİRLENMESİ	36
4.2.5. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASI	38
4.2.6. EKZOM DİZİLEME.....	47
4.2.6.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİN YAPILMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ	48
4.2.6.2. <i>LRP5</i> GENİNİN İLGİLİ EKZON-İNTRON DİZİSİNE ERİŞİLMESİ.....	49
4.2.6.3. MUTASYONUN GEN DİZİSİ ÜZERİNDE GÖSTERİMİ.....	49
4.2.6.4. <i>LRP5</i> GENİNİN 12.EKZON VE 12.İNTRON DİZİSİNİ BELİRLEMELİK İÇİN PRİMER TASARIMI.....	50
4.2.6.5. PRİMERLERİN GEN DİZİSİ ÜZERİNDE GÖSTERİMİ.....	51
4.2.6.6. TASARLANAN PRİMERLERİN BLAST SONUÇLARI	51
4.2.6.7. <i>LRP5</i> GENİ 12.EKZON VE 12.İNTRON DİZİSİ İÇİN PCR REAKSİYON KOŞULLARI.....	52
4.2.7. DNA DİZİ ANALİZİ.....	53
4.2.7.1. DNA DİZİ ANALİZİ BASAMAKLARI.....	54
4.2.8. KESİLEN PARÇANIN UZUNLUK POLİMORFİZMİ	56
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>58</u>
5.1. GTG-BAN TLAMA YÖNTEMİ İLE KROMOZOM ANALİZİ SONUÇLARI	58
5.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZDE DNA'LARIN GÖRÜNTÜLENMESİ.....	58
5.3. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASI SONUÇLARI.....	59
5.4. EKZOM DİZİLEME ANALİZİ SONUÇLARI	60
5.4.1. EKZOM DİZİLEME ANALİZİNDE KULLANILAN ALGORİTMA	61
5.5. <i>LRP5</i> GENİ 12.EKZON-12.İNTRON PRİMERLERİNİN PCR GÖRÜNTÜLERİ	66
5.6. DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI	67
5.7. RFLP SONUÇLARI.....	68
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>70</u>

KAYNAKLAR	82
EKLER	98
EK1:ETİK KURUL BELGESİ	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. GÖZÜN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ.....	3
ŞEKİL 2.2. GÖZÜN YAPISI.	4
ŞEKİL 4.1. MİKROFTALMİ AİLESİNE AİT PEDİGRİ ÖRNEĞİ.	28
ŞEKİL 4.2. HASTA BİREYLERE AİT DNA ÖRNEKLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ GÖRÜNTÜSÜ... 38	
ŞEKİL 4.3. HASTA BİREYLERE AİT PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ.	43
ŞEKİL 4.4. FRAGMENTASYON BASAMAĞI SONRASI III-2, IV-1, IV-2, IV-4 VE IV-5 NUMARALI ÖRNEKLERE AİT AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ	44
ŞEKİL 4.5. <i>LRP5</i> GENİNİN 12. EKZON VE 12. İNTRON DİZİSİ.	49
ŞEKİL 4.6. <i>LRP5</i> GENİ 12. EKZON VE 12. İNTRON DİZİSİNİ ÇOĞALTMAK İÇİN KULLANILAN PRİMERLERİN PRİMER 3 PROGRAMI EKLAN GÖRÜNTÜSÜ.	50
ŞEKİL 4.7. <i>LRP5</i> GENİ 12. EKZON VE 12. İNTRON DİZİSİNİ ÇOĞALTMAK İÇİN KULLANILAN PRİMERLERİN DİZİ ÜZERİNDEKİ YERLERİ.	51
ŞEKİL 4.8. ÇALIŞMADA KULLANILAN <i>BceAI</i> ENZİMİNİN KESİM NOKTASI.	56
ŞEKİL 5.1. HASTA BİREYE AİT (IV-2) KARYOTİP GÖRÜNTÜSÜ.	58
ŞEKİL 5.2. ÇALIŞILAN BİREYLERE (III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5) AİT MERLİN PARAMETRİK ANALİZ SONUÇLARINA GÖRE BELİRLENEN LOD SKOR ANALİZİ GÖRÜNTÜSÜ.	59
ŞEKİL 5.3. <i>LRP5</i> GENİNDE BULUNAN c. 2827+1G>A MUTASYONUN PROTEİN ÜZERİNDE YERLEŞİMİ... 61	
ŞEKİL 5.4. HASTAYA AİT SNP VERİLERİNİN ALGORİTMAYA GÖRE AZALTILMASI.....	62
ŞEKİL 5.5. HASTAYA AİT INDEL VERİLERİNİN ALGORİTMAYA GÖRE AZALTILMASI.....	64
ŞEKİL 5.6. SAĞLIKLI, HASTA BİREYLERE VE KONTROL DNA'SINA AİT PCR SONRASI ÇOĞALTILMIŞ ÜRÜNLERİN AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ.	67
ŞEKİL 5.7. HASTA BİREYE (IV-2) AİT HOMOZİGOT MUTANT DNA DİZİ ANALİZİ GÖRÜNTÜSÜ.	67
ŞEKİL 5.8. HASTANIN SAĞLIKLI ANNESİNE (III-2) AİT HETEROZİGOT TAŞIYICI DNA DİZİ ANALİZİ GÖRÜNTÜSÜ.	68
ŞEKİL 5.9. KONTROL OLARAK KULLANILAN SAĞLIKLI BİREYE AİT YABANIL TİP DNA DİZİ ANALİZİ GÖRÜNTÜSÜ.	68
ŞEKİL 5.10. RFLP YAPILAN MİKROFTALMİ AİLESİ VE KONTROLLERDEN ÖRNEKLER.	69
ŞEKİL 6.1. OSTEOPOROZ PSÖDOGLİOMA SENDROMUNA VE FAMILİYAL EKSDATİFVİTREORETİNOPATİYE NEDEN OLAN MUTASYONLARIN <i>LRP5</i> PROTEİNİNİN ÜZERİNDE GÖSTERİLMESİ.	77
ŞEKİL 6.2. WNT SİNYAL YOLAĞI.	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2.1. MİKROFTALMİNİN EŞLİK ETTİĞİ SENDROMLARIN İLİŞKİLİ OLDUĞU GENLER VE KLİNİK BULGULARI.	9
ÇİZELGE 2.2. SENDROMİK MİKROFTALMİLER İLİŞKİLİ OLDUĞU GENLER VE KLİNİK BULGULARI.	11
ÇİZELGE 2.3. KROMOZOMAL ANOMALİLER İLE BİRLİKTE GÖRÜLEN MİKROFTALMİLERİN İLİŞKİLİ OLDUĞU GENLER VE KLİNİK BULGULARI.	13
ÇİZELGE 2.4. İZOLE MİKROFTALMİLER İLE KOLOBOMUN BİRLİKTE GÖRÜLDÜĞÜ SENDROMLARIN İLİŞKİLİ OLDUĞU GENLER VE KLİNİK BULGULARI.	14
ÇİZELGE 2.5. İZOLE MİKROFTALMİLERİN İLİŞKİLİ OLDUĞU GENLER VE KLİNİK BULGULARI.	16
ÇİZELGE 2.6. YENİ NESİL DİZİLEMEDE KULLANILAN PLATFORMLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	25
ÇİZELGE 4.1. MİKROFTALMİ AİLESİ BİREYLERİNİN 1998 YILINA AİT GÖZ BULGULARI.	30
ÇİZELGE 4.2. ÇALIŞMAYA DÂHİL EDİLEN AİLE BİREYLERİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER.	31
ÇİZELGE 4.3. ÇALIŞMAYA DÂHİL EDİLEN III-1, III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5 VE IV-9 NUMARALI BİREYLERE AİT DNA ÖRNEKLERİNİN SPEKTROFOTOMETRE ÖLÇÜMLERİ.	38
ÇİZELGE 4.4. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA YAPILAN RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ PROTOKOLÜ.	41
ÇİZELGE 4.5. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA YAPILAN LİGASYON PROTOKOLÜ.	41
ÇİZELGE 4.6. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA YAPILAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İÇİN GEREKLİ REAKTİFLERİN MİKTARLARI.	42
ÇİZELGE 4.7. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA FRAGMENTASYON İŞLEMİ İÇİN KULLANILAN REAKTİFLER VE MİKTARLARI.	43
ÇİZELGE 4.8. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA İŞARETLEME İÇİN KULLANILAN REAKTİFLER VE MİKTARLARI.	44
ÇİZELGE 4.9. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA HİBRİDİZASYON İÇİN KULLANILAN REAKTİFLER VE MİKTARLARI.	45
ÇİZELGE 4.10. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA YIKAMA BASAMAĞINDA KULLANILAN YIKAMA A BUFFERİN REAKTİFLERİ VE MİKTARLARI.	45
ÇİZELGE 4.11. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA YIKAMA BASAMAĞINDA KULLANILAN YIKAMA B BUFFERİN REAKTİFLERİ VE MİKTARLARI.	46
ÇİZELGE 4.12. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA BOYAMA BASAMAĞINDA KULLANILAN STAIN BUFFERİN REAKTİFLERİ VE MİKTARLARI.	46
ÇİZELGE 4.13. AFFYMETRIX 250K MİKRODİZİN ÇALIŞMASINDA TARAMA BASAMAĞINDA KULLANILAN ARRAY HOLDING BUFFERİN REAKTİFLERİ VE MİKTARLARI.	46
ÇİZELGE 4.14. <i>LRP5</i> GENİ İÇİN PCR OPTİMİZASYONUNDA KULLANILAN REAKTİFLER VE TERMAL DÖNGÜ CİHAZI KOŞULLARI.	52
ÇİZELGE 4.15. DNA DİZİ ANALİZİNDE KULLANILAN REAKTİFLER VE TERMAL DÖNGÜ CİHAZI KOŞULLARI.	55
ÇİZELGE 4.16. ÇALIŞMADA KULLANILAN <i>BceAI</i> ENZİMİNİN ÇALIŞMA PROTOKOLÜ.	57
ÇİZELGE 5.1. VİGENOS ANALİZİNDEN ELDE EDİLEN HOMOZİGOT BLOKLARIN YER ALDIĞI KROMOZOMLARA AİT BİLGİLER.	60
ÇİZELGE 5.2. MİKROFTALMİYE NEDEN OLDUĞU BİLİNER BAZI GENLER VE BU GENLERİN LOKALİZE OLDUĞU KROMOZOMLAR.	60
ÇİZELGE 5.3. ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN 11 GENİN BULUNDUĞU KROMOZOM, POLYPHEN2, DBSNP135 VERİLERİ.	62
ÇİZELGE 5.4. ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN 11 GENE AİT AMİNOASİT DEĞİŞİMLERİ VE 1000 GENOM PROJESİ VERİLERİ.	63
ÇİZELGE 5.5. ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN 29 GENİN BULUNDUĞU KROMOZOM, MUTASYONUN TİPİ VE AMİNOASİT DEĞİŞİMİ VERİLERİ.	64
ÇİZELGE 5.6. ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN 29 GENE AİT DBSNP135 VERİLERİ.	65
ÇİZELGE 6.1. MİKROFTALMİYE NEDEN OLDUĞU BİLİNER GENLERDE BULUNAN MUTASYONLAR.	70
ÇİZELGE 6.2. <i>LRP5</i> GENİ İLE İLİŞKİLİ OLAN HASTALIKLAR.	72
ÇİZELGE 6.3. EKSUDATIF VITREORETİNOPATİNİN BİLDİRİLMİŞ ALT TİPLERİ.	73
ÇİZELGE 6.4. <i>LRP5</i> GENİNDE EVR4'E NEDEN OLDUĞU BİLDİRİLMİŞ MUTASYONLAR.	74
ÇİZELGE 6.5. OSTEOPOROZ-PSEUDOGİOMA SENDROMU.	75
ÇİZELGE 6.6. OPPG SENDROMUNA NEDEN OLDUĞU BİLİNER <i>LRP5</i> MUTASYONLARI.	76

SİMGELER DİZİNİ

A	: Adenin bazı
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozintrifosfat
Bç	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dCTP	: Deoksitozintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanintrifosfat
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
dH ₂ O	: Deiyonize su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Fs	: Çerçeve kayması
G	: Gram
g	: Dakikadaki dönüş sayısı
G	: Guanin bazı
HCl	: Hidroklorik asit
K ⁺	: Potasyum iyonu
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
M	: Molar
Mb	: Megabaz
Mg	: Miligram
Mg ⁺⁺	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikromol
³² P	: Fosfor 32
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Asitlik-Bazlık Derecesi
pmol	: Pikomol
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
Taq	: Thermus aquaticus
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
X	: Dur kodonu
V	: Volt

Canım anneme,

1. GİRİŞ

Göz gelişimi, gebeliğin dördüncü haftasında başlar, embriyonun kraniyal ucundaki nöral katlantılarda optik yarıklar görünmeye başlayınca belirginleşir (1). Mikroftalmi, göz küresinin total aksiyal uzunluğunun yaşa göre ortalama en az iki standart sapma altında olması ile tanımlanmaktadır. Mikroftalmik bir gözde, posteriyor segment uzunluğu iki standart sapmanın altında iken, anterior segment uzunluğunun normal sınırların içinde veya altında olduğu belirtilmektedir (2, 3).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda mikroftalminin görülme sıklığının 7000 canlı doğumda 1 olduğu bildirilmiştir (2). Mikroftalmiler, ailesel veya sporadik, izole veya bir sendromun parçası, kromozomal ya da tek gene bağlı, unilateral veya bilateral olabilmektedir. Mikroftalminin 1/3 oranında malformasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Mikroftalmi, kalıtsal veya teratojenik nedenlerden kaynaklanabildiği gibi olguların büyük bir çoğunluğunun nedeni bilinmemektedir (2,3).

Bugüne kadar izole mikroftalmi ile ilişkili yaklaşık 7 gen tanımlanmış olmakla birlikte, hastalıkta gözlenen genetik heterojenite nedeni ile hastalığın genetik temeli tam olarak aydınlatılamamıştır (2-5). Bu açıdan bakıldığında yeni aday genlerin tanımlanması, mikroftalminin moleküler mekanizmasını aydınlatmak açısından son derece önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında otozomal resesif kalıtım gösteren izole mikroftalmili bir ailede mikrodizin ve ekzom dizileme yöntemi ile yeni aday gen(ler)in belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Gözün Oluşumu

Göz gelişimi, gebeliğin dördüncü haftasında başlamaktadır. Gözler, embriyonun kraniyal ucundaki nöral katlantılarda optik yarıklar görünmeye başlayınca belirginleşmektedir. Nöral katlantılar, optik vezikülleri oluşturmaktadır. Optik veziküllerin oluşumu, gelişmekte olan beyine komşu mezenşim tarafından indüklenmektedir. Optik veziküller büyüdükçe, içi boş optik sapları oluşturmakta ve optik veziküllere komşu yüzey ektodermi, lens plaklarını oluşturmak için kalınlaşmaktadır. Optik vezikülden çıkan indükleyici sinyal, lens taslağını oluşturmak üzere ektoderm hücrelerini uyarmakta ve bu plaklar lens çukurlarını meydana getirmektedir. Lens çukurunun kenarları küre şeklindeki lens veziküllerini oluşturmak için kaynaşmakta ve takiben optik veziküllerin optik çanakları oluşturmasıyla birlikte lens içeri alınmaktadır (1, 5).

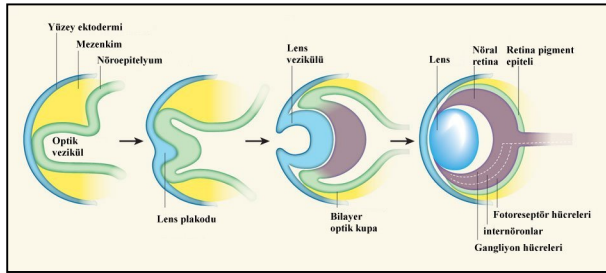
Retina, optik çanakların duvarından gelişmektedir. Optik çanağın içteki kalın tabakası nöral retinaya farklılaşırken, dıştaki ince tabaka ise retina pigment epitelini oluşturmaktadır. Bu iki retina tabakası intraretinal aralık ile birbirinden ayrılmaktadır. Doğumdan önce, bu aralık retinanın iki tabakası kaynaştıkça giderek kaybolmaktadır. Pigmente retina en yakın iç tabaka hücreleri, nöral retinaya farklılaşmaktadır. Optik sinir liflerinin miyelinizasyonu geç fetal dönemde başlamakta ve doğumdan 10 hafta sonra tamamlanmaktadır (1, 6, 7).

Siliyer cisim, koroidin kama şeklinde bir uzantısıdır ve mediyal yüzeyi lense doğru uzanarak siliyer uzantıları oluşturmaktadır. Siliyer yapı, optik çukurun dış tabakasından gelişmekte ve retina pigment epiteliyle devamlılık göstermektedir. Siliyer kas, anterior skleral yoğunlaşma ve siliyer pigment epiteli arasındaki optik çukurun kenarında bulunan mezenşimden kaynaklanmaktadır (1, 7).

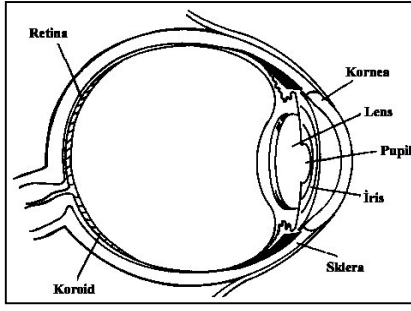
İris, optik çanağın içe doğru büyüyen ve lensi kısmen örten dış kenarından gelişmektedir (7). İris epiteli optik çanağın her iki tabakasını temsil etmektedir. İrisin bağ dokusu ise irise göç eden nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. İrisin dilatatör pupilla ve sfinkter pupilla kasları, optik çanağın nöroektoderminden köken almakta ve bu düz kaslar, epitel hücrelerinin düz kas hücrelerine dönüşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (1).

Lens, yüzey ektoderminden köken alan lens vezikülünden gelişmektedir. Lensin oluşumu, lens plağı ve lens vezikülünde L-Maf ve diğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu gerektirmektedir. Lens vezikülünün posteriyor duvarını oluşturan yüksek prizmatik hücrelerin çekirdekleri kaybolmaktadır. Bu hücreler, saydam epitel hücrelerine dönüşerek, primer lens liflerini oluşturmaktadır. Ekvatoryal bölgedeki hücreler kübiktir, boyları uzadıkça çekirdeklerini kaybetmekte ve sekonder lens liflerini oluşturmaktadırlar. Gözün ön kamarası, gelişmekte olan lens ve kornea arasındaki mezenşimde bulunan yarık benzeri alandan gelişmektedir. Gözün arka kamarası, gelişmekte olan iris posteriyorunda ve gelişmekte olan lensin posteriorunda bulunan mezenşimde oluşan alandan oluşmaktadır. Lens oluşuktan sonra, kornea epiteli ve konjunktivayı geliştirmek üzere yüzey ektodermi indüklemektedir. Pupilla membranı kaybolup pupil oluştuğunda, gözün anterior ve posteriyor kamaraları skleral venöz sinüs yolu ile aralarında bağlantı kurulmaktadır. Bu sinüs ön kamaranın etrafını çevrelemekte ve aköz humörün ön kamaradan gözün venöz sistemine geçmesini sağlamaktadır (1,7).

Kornea, yüzey ektodermi, mezoderm ve nöral krest hücrelerinden gelişmektedir (6). Dış kornea, yüzey ektoderminden, mezenşim tabakası mezoderminden ve kornea endoteli ise nöral krest hücrelerinden gelişmektedir. Optik çanağı çevreleyen mezenşim içte koroid adı verilen vasküler tabakaya ve dışta sklera adı verilen fibröz tabakaya farklılaşmaktadır (1). Şekil 2.1’de gözün embriyolojik gelişimi ve Şekil 2.2’de ise gözün yapısı verilmektedir.



Şekil 2.1. Gözün embriyolojik gelişimi. Ali RR, Sowden JC. Regenerative medicine: DIY eye. Nature. 2011;472(7341):42-3’den değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 2.2. Gözün yapısı. <http://online.sfsu.edu/psych200/unit6/63.htm>'den değiştirilerek alınmıştır.

2.2. Mikroftalminin Tanımı

Mikroftalmi, göz küresinin total aksiyal uzunluğunun yaşa göre ortalama en az iki standart sapmanın altında ve anterior segment uzunluğunun ise normal sınırların içinde veya altında olması olarak tanımlanmaktadır (2,3). Anoftalmi ise, göz küresinin olmaması olarak tanımlanmaktadır. Gözün yapısına bakıldığında, total aksiyal uzunluğu yeni doğanda 17 mm, erişkinlerde ise 23 mm, anterior segment uzunluğu yeni doğanda 6,8 mm, erişkinlerde ise 7,3 mm ve posterior segment uzunluğu yeni doğanda 10,2 mm, erişkinlerde ise 16,5 mm olarak belirtilmektedir. Total aksiyal uzunluğu, korneal apeksden göz küresinin arkasına kadar olan aksiyal mesafe; anterior segment uzunluğu, korneadan lensin arkasına kadar olan aksiyal mesafe ve posterior aksiyal uzunluğu ise lensin arkasından göz küresinin arkasına kadar olan aksiyal mesafe olarak tanımlanmaktadır (2,8,9).

Gözün postnatal gelişimi, belirgin olarak birinci yılda olsa da, ilk üç yıl devam etmektedir. Prenatal dönemde posterior segmentin büyümesi yaklaşık olarak %60 oranında olurken, total aksiyal uzunluk artışının %90'ından daha fazlası postnatal dönemde olmaktadır. Doğumda total aksiyal uzunluk azaldığı halde, postnatal dönemde mikroftalmik bir gözde, altta yatan malformasyonun derecesine bağlı olarak değişen miktarlarda büyüme olabilmektedir (2).

2.3. Mikroftalminin Etiyolojisi

Anoftalmi ve mikroftalmi unilaterale veya bilateral görülmekte, izole olabileceği gibi bir sendromun parçası da olabilmektedir. Anoftalmi ve mikroftalminin 1/3 oranında malformasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Nedenleri; kalıtsal, teratojenik nedenlerden kaynaklı ve nedeni bilinmeyenler olarak 3 gruba ayrılmıştır (2,4,10,11). Kalıtsal nedenler

arasında kromozom anomalileri ve tek gen hastalıkları yer almaktadır (2,4). Teratojenik nedenler arasında, annenin prenatal dönemde bazı virüslere, talidomide ve retinoik asite maruz kalması ve yine bu dönemde annenin alkol alması, hidantoin ve lizerjik asit dietilamidi (LSD) kullanımı gibi çeşitli nedenler bulunmaktadır (2,4,12). Nedeni bilinmeyen grup içinde ise izole, unilateral veya bilateral anoftalmi ve mikroftalmiler yer almakta ve çoğu vakada nedenin bilinmediği bildirilmektedir (2,4,11).

2.4. Mikroftalminin Prevalansı

Anoftalmi/mikroftalminin prevalansı, farklı yıllarda ve farklı ülkelerde yapılan araştırma sonuçlarına göre değişiklik göstermektedir. Doğu Fransa'da 1978-1993 yılları arasında toplam 1,42 milyon canlı doğum, İsveç'de 1973-1993 yılları arasında toplam 2,19 milyon canlı doğum ve Kaliforniya'da 1985-1992 yılları arasında toplam 2,05 milyon canlı doğum üzerinde yapılan çalışmalar birleştirilmiş ve anoftalmi/mikroftalminin prevalansının 1,5/10.000 olduğu bildirilmiştir (13). İngiltere'de 1984-1998 yılları arasında yapılan bir çalışmada anoftalmi/mikroftalminin prevalansı 10.000 canlı doğumda 1 (14), İskoçya'da yapılmış olan 16 yıllık bir çalışmanın sonucunda anoftalmi/mikroftalmi prevalansının tüm canlı doğumlarda 100.000'de 19 (15), 1989-1997 yılları arasında Kaliforniya'da yapılan bir başka çalışmada anoftalmi/bilateral mikroftalminin prevalansının 10.000'de 0,4 olduğu bildirilmiştir (16). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda mikroftalminin görülme sıklığının 7000 canlı doğumda 1 olduğu bildirilmiştir (2).

2.5. Mikroftalminin Anatomik Sınıflandırılması

Bu sınıflandırma, göz küresinin anatomik görünüşüne ve aksiyal uzunluğun kısalığının şiddetine göre yapılmaktadır (2,4).

Ağır (şiddetli) mikroftalmi; göz küresinin kornea çapının 4 mm'den daha az ve total aksiyal uzunluğun yeni doğanda 10 mm'den az veya doğduktan bir yıl sonra 12 mm'den daha az olmasıyla tanımlanmaktadır. Klinik muayenede göz küresi fark edilmezken bilgisayarlı tomografi (CT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI)'de oküler doku kalıntıları, optik sinirler ve ekstra oküler kaslar görülebilmektedir. Orbital görüntüleme çalışmaları yapılmadan ağır mikroftalmi, anoftalmi ile karışabilmekte ve bu yüzden de sıklıkla yanlış olarak "klinik mikroftalmi" terimi ağır mikroftalmi yerine kullanılmaktadır (2,4).

Basit mikroftalmide, kısa total aksiyal uzunluğun dışında göz anatomik olarak normal görülmektedir. Total aksiyal uzunluktaki kısalıklar basit mikroftalmide genellikle hafif seyretmektedir. Basit mikroftalmide, etkilenen bireylerin yaklaşık %15'inde yüksek hiperopia veya mikrokornea varlığından şüphelenilmektedir. Etkilenmiş bireylerin bazılarında, papillomaküler kıvrımları, maküler hipoplaziyi, sistoid maküler ödemi ve uveal efüzyonu içeren posterior segment anormalliklerinin sonucu olarak görme kaybı olabilmektedir (2,8,9).

Nanoftalmos, yüksek hiperopia, total aksiyal uzunluğun 18 mm'den daha az olması ve mikrokornea ile karakterize olan basit mikroftalminin bir alt tipi olarak belirtilmiştir (2).

Kompleks mikroftalmide, gözün anterior ve/veya posterior segmentinin disgenezisinden bahsedilmektedir. Bu mikroftalmi tipinde total aksiyal uzunluktaki kısalık hafif, orta veya şiddetli olabilmektedir (2).

Anoftalmi ve mikroftalminin tanısı klinik muayene ve görüntüleme ile konulmaktadır. Klinik muayenede değerlendirme, göz küresinin büyüklüğü ve kornea çapının ölçülmesi ile yapılmaktadır. Kornea çapı, normal bir yeni doğanda 9-10,5 mm, erişkinlerde ise 10,5-12 mm arasında olmaktadır. Görüntüleme ile değerlendirme ise A mod, B mod ultrasonografi, CT veya MRI ile yapılmaktadır (2, 4).

A mod ultrasonografi, total aksiyal uzunluğu, anterior ve posterior segment uzunluğunu ölçerken, B mod ultrasonografi ise göz küresinin iç yapısına bakmaya imkân tanımaktadır. CT veya MRI ile beyinin anatomisine, optik sinirlerin ve ekstra oküler kasların varlığına, göz küresinin iç yapısına ve boyutuna bakılmaktadır (2, 10).

Ayırıcı tanı olarak; mikroftalmide göz küresinin normal boyutlarda olması ile beraber hafif mikrokornea, anoftalmide ise ağır mikroftalmi, kriptotalmos, kistik göz olması gerekmektedir (2).

2.6. Mikroftalmilerin Etiyolojilerine Göre Sınıflandırılması

Mikroftalmi, ailesel veya sporadik, izole veya bir sendromun parçası; kromozomal ya da tek gene bağlı olabilmektedir. Mikroftalmilerin sınıflandırılması genel olarak 8 başlık altında incelenmektedir (3).

1- *İzole mikroftalmiler*

Otozomal dominant (OD) kolobomatöz mikroftalmi

Kistle beraber görülen mikroftalmi

2- *Oküler anomaliler ile birlikte görülen mikroftalmiler*

OD veya OR kalıtılan kataraktla ile birlikte görülen mikroftalmi

OD miyopi ve korektopi ile birlikte görülen mikroftalmi

Ektopia lentis ile birlikte görülen mikroftalmi

OR konjenital retinal dekolman ile birlikte görülen mikroftalmi

Sporadik olarak görülen persistan hiperplastik primer vitreus

X'e bağlı kalıtılan Aicardi Sendromu

3- *Mental retardasyon (MR) ile birlikte görülen mikroftalmi*

OD, OR ve X'e bağlı resesif kalıtılan MR ile birlikte görülen mikroftalmi

MR ve Konjenital spastik dipleji ile birlikte görülen mikroftalmi (Sjogren-Larsson Sendromu)

4- *Kraniyofasiyel malformasyonlar ile birlikte görülen mikroftalmiler*

Goldenhar Sendromu

Hallermann-Streiff Sendromu

Amniyotik band Sendromu

Transvers fasiyal yarık

Yarık damak/dudak ile birlikte görülen mikroftalmi

Mikrosefali ile birlikte görülen mikroftalmi

X' bağlı resesif veya OR kalıtılan mikrosefali ve retinal katlantı ile birlikte görülen mikroftalmi

Warburg sendromu

Schimmelpenning-Feuerstein-Mims Sendromu

5- *El ve ayak malformasyonları ile birlikte görülen Mikroftalmiler*

Polidaktili ile birlikte görülen mikroftalmi

OR kalıtılan Waardenburg anoftalmi Sendromu

CHARGE Sendromu

6-Multipl Konjenital Anomalilerle birlikte görülen Mikroftalmiler

CHARGE Sendromu

Lenz Mikroftalmi Sendromu (X'e bağlı)

Okulo-Dento-Dijital Displazi (OD, OR)

Frasier Sendromu (OR)

Serebro-okülo-fasiyal Sendromu (COFS1)(OR)

Goltz Sendromu (X'e bağlı)

Lowe Sendromu (X'e bağlı)

MIDAS Sendromu (X'e bağlı)

Meckel-Grubel Sendromu tip 3 (OR)

Gorlin-Goltz Sendromu (OD)

Beals Sendromu (OD)

Rubistein Taybi Sendromu (OD)

Cross Sendromu (OR)

Fankoni Sendromu (OR)

Diamond-Blackfan Sendromu (OR)

Schimmelpenning-Feuerstein-MIMS Sendromu

Branşiyokülo-fasiyal Sendrom (OD)

SOX2 ile ilişkili göz bozuklukları

7-Kromozomal anomaliler ile birlikte görülen Mikroftalmi

Patau Sendromu

Wolf-Hirschhorn Sendromu

Edwards Sendromu

Cat-eye Sendromu

Sayısal diğer kromozom anomalileri

8-İntrauterin olaylara bağlı Mikroftalmiler

Maternal ilaç kullanımı (Talidomid, alkol, izoretinoin)

Maternal A vitamini eksikliği

Maternal ateş veya radyasyon maruziyeti

Maternal fenilketonüri

İntrauterin enfeksiyonlar (CMV, EBV, Varicella, HSV, Rubella)

Amniyotik Band Sendromu

Toksoplazmozis

Mikroftalmilerin eşlik ettiği sendromların sık görülen klinik bulguları ve genleri (Çizelge 2.1), sendromik mikroftalmilere ait klinik bulgular ve genler (Çizelge 2.2), kromozomal anomaliler ile beraber görülen mikroftalmilerin klinik bulguları ve genler (Çizelge 2.3), izole mikroftalmilerle beraber görülen kolobomların klinik bulguları ve genlerini içeren (Çizelge 2.4) bilgiler aşağıdaki çizelgelerde özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Mikroftalminin eşlik ettiği sendromların ilişkili olduğu genler ve klinik bulguları

Sendromun Adı	MIM numarası	Kromozomal Lokalizasyon	Genin Sembolü	Genin adı	Klinik bulgular	Kaynak
Beals sendromu	121050	5q23.3	<i>FBN2</i>	Fibrillin 2	Araknodaktili, skolyoz, buruşuk kulaklar	17
Branşiyal-okülo-fasiyal sendrom	113620	6p24.3	<i>TFAP2A</i>	Transcription factor AP-2 alpha	Branşiyal kleft sinüs defektleri, oküler anomaliler (mikroftalmi), dismorfik yüz özellikleri, yarı dudak/damak, nadir olarak sensorinöral işitme kaybı	18
CHARGE sendromu	214800	7q21.11	<i>SEMA3E</i>	Semaphorin 3E	Kolobom, kalp anomalisi, koanal atrezi, MR, kulak anomalisi ve/veya sağırılık	19
Cross sendromu	257800	Bilinmiyor	Bilinmiyor		Kutenöz hipopigmentasy oncididi oküler anomaliler, nörolojik bulgular	20,21
Diamond-blackfan sendromu	105650	19q13.2	<i>RPS19</i>	Ribosomal protein S19	Normokrom makrositik anemi, retikülositpeni, büyüme geriliği	22
Frasier sendromu	136680	11p13	<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	Steroide dirençli nefrotik sendrom, gonadal tümör, male psödohermafroditizm	23
Goltz sendromu	305600	Xp11.23	<i>PORCN</i>	Porcupine homolog	Ektodermal ve mezodermal defektler, aplaziya küti, dermal hipoplazi, diş ve iskelet anomalileri	24

Gorlin-Goltz sendromu	109400	1p34.1	<i>PTCH2</i>	Patched 2	Nevoid bazal-hücre epiteloma, çene kistleri, bifid kaburga	25
	109400	9q22.32	<i>PTCH1</i>	Patched 1	Nevoid bazal-hücre epiteloma, çene kistleri, bifid kaburga	25
	109400	10q24.32	<i>SUFU</i>	Suppressor of fused homolog	Nevoid bazal-hücre epiteloma, çene kistleri, bifid kaburga	25
Lenz mikroftalmi sendromu (MCOPS1)	309800	Xq27-q28	<i>NAA10</i>	N(alpha)-acetyltransferase 10	Unilateral/bilateral mikroftalmi/anofthalmi, iskelet ve genitüriner sistem anomalileri	26
Lowe sendromu	309000	Xq25-q26	<i>OCRL</i>	Oculocerebrorenal syndrome of Lowe	Konjenital katarakt, mental retardasyon, proksimal renal tubulopati	27
Meckel-Gruber sendromu tip 3	607361	8q22.1	<i>TMEM67</i>	Transmembrane protein 67	Renal kistik displazi, santral sinir sistemi anomalileri, posaksiyal polidaktili	28
MIDAS sendromu (MCOPS7)	309801	Xp22.2	<i>HCCS</i>	Holocystochrome c synthase	Unilateral veya bilateral mikroftalmi, yüz ve boyunla sınırlı cilt defektleri	29
Mikroftalmi ve özefageal atrezi sendromu (MCOPS3)	206900	3q26.33	<i>SOX2</i>	SRY box 2	Anoftalmi ya da mikroftalmi, beyin anomalileri, nöbet, motor yetersizlik, sensorinöral işitme kaybı, özefagus atrezisi	30
Okülo-dento-dijital displazi	164200	6q22.31	<i>GJA1</i>	Gap junction protein, alpha 1	Çürük ve küçük dişler, mikroftalmi, mikrokornea, 4. ve 5. parmakta sindaktili	31
Okülo-dento-dijital displazi (OR)	257850	6q22.31	<i>GJA1</i>	Gap junction protein, alpha 1	Karakteristik yüz bulguları, mikroftalmi, mikrokornea	32

Rubinstein-Taybi sendromu	180849	16p13.3	<i>CREBBP</i>	CREB binding protein	Mental retardasyon, postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, geniş el ve ayak başparmakları, dismorfik yüz özellikleri	33
Schimmelpennin-Feuerstein-MIMS sendromu	163200	1p13.2	<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog	Santral sinir sistemi, oküler anomalileri, iskelet defektleri	34
	163200	11p15.5	<i>HRAS</i>	Harvey rat sarcoma viral homolog	Santral sinir sistemi, oküler anomalileri, iskelet defektleri	34
	163200	12p12.1	<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Santral sinir sistemi, oküler anomalileri, iskelet defektleri	34
Serebro-okülo-fasiyel iskelet sendrom (COFS1)	214150	10q11.23	<i>ERCC6</i>	Excision repair cross-complementation group 6	Mikrosefali, konjenital katarakt, ağır MR, fasiyal dismorfizm, artrogripozis	35

Çizelge 2.2. Sendromik mikroftalmiler ilişkili olduğu genler ve klinik bulguları

Sendromun Adı	MIM numarası	Kromozomal Lokalizasyon	Genin Sembolü	Genin adı	Klinik bulgular	Kaynak
Sendromik mikroftalmi 1	309800	Xq28	<i>NAA10</i>	N(alpha)-acetyltransferase 10	Unilateral/bilateral mikroftalmi/anoftalmi, iskelet ve genitouriner sistem defektleri, parmak, diş ve kulak anomalileri	26
Sendromik mikroftalmi 2	300166	Xp11	<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	Uzun dar yüz, konjenital katarakt, mikroftalmi, kısa burun, uzun filtrum, oligodonti	36

Sendromik mikroftalmi 3	206900	3q26.33	<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	Beyin anomalileri, nöbet, sensorinöral işitme kaybı, özofagiyal atrezi ve optik sinir defektleri	37,38
Sendromik mikroftalmi 4	301590	Xq27-q28	geni bilinmiy or		Göz kapağının yapışması, MR	39
Sendromik mikroftalmi 5	610125	14q22.3	<i>OTX2</i>	Orthodenticle homeobox 2	Retinal distrofi, erken başlangıçlı ve hipofiz bezinde fonksiyon bozukluğu	40
Sendromik mikroftalmi 6	607932	14q22.23	<i>BMP4</i>	Bone morphogenetic protein 4	Hipofiz bezi anomalileri, mikroftalmi, beyin ve parmak gelişim anomalileri	41
Sendromik mikroftalmi 7	309801	Xp22.2	<i>HCCS</i>	Holocytochrome c synthase	Unilateral/bilateral mikroftalmi, yüz ve boyun ile sınırlı lineer cilt bozuklukları	42
Sendromik mikroftalmi 8	601349	6q21	Bilinmiy or		Mikrosefali, mikroftalmi, elektrodaktili ve prognatizm	43
Sendromik mikroftalmi 9	601186	15q24.1	<i>STRA6</i>	Stimulated by retinoic acid 6	Anoftalmi/mikroftalmi, akciğer hipoplazisi, kalp ve diyafram malformasyonları	44,45
Sendromik mikroftalmi 10	611222	Bilinmiyor	Bilinmiy or		Mikroftalmi ve beyin atrofisi	46
Sendromik mikroftalmi 11	614402	10q26.1	<i>VAX1</i>	Ventral anterior homeobox 1	Yarı damak ve dudak, korpus kallozum agenezisi	47

Sendromik mikroftalmi 12	615524	3p24.2	<i>RARB</i>	Retinoic acid receptor, beta	Diyafraam hernisi ve/veya kalp defektleri, akciğer hipoplazisi, mikroftalmi	48
Sendromik mikroftalmi 13	300915	Xq28	<i>HMGB3</i>	High mobility group box 3	Kısa boy, psikomotor gerilik, mikrosefali ile birlikte görülen kolobomatöz mikroftalmi	49
Sendromik mikroftalmi 14	615877	4q31	<i>MAB21L 2</i>	Mab-21-like 2	Rizomelik iskelet displazisinin eşlik ettiği veya etmediği mikroftalmi ve kolobom	50

Çizelge 2.3. Kromozomal anomaliler ile birlikte görülen mikroftalmilerin ilişkili olduğu genler ve klinik bulguları

Sendromun adı	MIM numarası	Kromozomal lokalizasyon	Genin sembolü	Genin adı	Klinik bulgular	Kaynak
46,XX,inv(2)(p21q31)			<i>SIX3</i>	SIX homeobox 3	Katarakt, nistagmus	51
46,XX,t(1;2)(p31.2;q23)					Optik sinir kolobomu	2
46,XY,t(2;6)(q31;q24)					MR, serebral palsi	52
Cat-eye sendromu		22q11				53
Edward sendromu						54
Mozaik trizomi 9					Büyüme gelişme geriliği, düşük yerleşimli kulaklar, mikrognati MR	55
Patau sendromu (trizomi 13)					Yarık damak dudak, polidaktili, böbrek anomalileri kolobom, holoproens efali, MR	2,56

Wolf-Hirschhorn	194190	4p16.3			Hipertelori zm, strabismus, glokom, MR	57
Xp22.3 delesyonu			<i>HCSS</i>	Holocytoc hrome c- type synthase	Yüz ve boyunda görülen cilt bozuklukla rı, gelişme geriliği, aritmisi, kısa yapı, işitme kayı	58

Çizelge 2.4. İzole mikroftalmiler ile kolobomun birlikte görüldüğü sendromların ilişkili olduğu genler ve klinik bulguları

Sendromun adı	MIM numarası	Kromozomal lokalizasyon	Genin sembolü	Genin adı	Klinik bulgular	Kaynak
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 1 (MCOPCB1)	300345	X kromozomu	geni bilinmiyor		Mikroftalmi, oküler kolobom, mikrokornea, göz içi basınçta artış	59
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 2 (MCOPCB2)	605738	15q12-q15	geni bilinmiyor			60
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 3 (MCOPCB3)	610092	14q24.3	<i>CHX10 (VSX2)</i>	Visual system homeobox 2	Mikroftalmi, katarakt, kolobom	61
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 4 (MCOPCB4)	251505	bilinmiyor	geni bilinmiyor			62
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 5 (MCOPCB5)	611638	7q36	<i>SHH</i>	Sonic hedgehog	Mikroftalmi, kolobom	63
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 6 (MCOPCB6)	613703	12p13.1	<i>GDF3</i>	Growth differentiat ion factor 3	Mikroftalmi, kolobom	64
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 6 (MCOPCB6) (digenik)	613703	8q22.1	<i>GDF6</i>	Growth differentiat ion factor 6	Mikroftalmi, kolobom	65
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 7 (MCOPCB7)	614497	2q36	<i>ABC6</i>	ATP-binding cassette, subfamily B	Mikroftalmi, kolobom	66
İzole Mikroftalmiler ve Kolobom 9 (MCOPCB9)	615145	4q35.1	<i>TENM3 (ODZ3)</i>	Teneurin transmembrane protein 3	Mikroftalmi, kolobom, mikrokornea	67

2.6.1 İzole Mikroftalmiler

Mikroftalmi, göz küresi büyüklüğünün azalmasıyla karakterize oküler malformasyonların heterojen bir grubudur (2).

İzole mikroftalmi 1 (MCOP1), aralarında akrabalık bulunan ve izole doğuştan mikroftalmisi olan 5 jenerasyonlu Pakistanlı bir ailenin yaşayan 6 üyesinde yapılan bağlantı analizinde 14q32 bölgesine haritalanmıştır (68).

İzole mikroftalmi 2 (MCOP2), yapılan çalışmalarda 14q24.3'de lokalize *CHX10* (*VSX2*) genindeki homozigot mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır (69, 70)

İzole mikroftalmi 3 (MCOP3), yapılan çalışmalarda 18q21.32'de lokalize *RAX* genindeki bileşik heterozigot mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır (71, 72).

İzole mikroftalmi 4 (MCOP4), yapılan bir çalışmada 8q22.1'de lokalize *GDF6* genindeki mutasyonla ortaya çıkmaktadır (65).

İzole mikroftalmi 5 (MCOP5), retinitis pigmentosa, foveoşizis, optik disk drusen ile birlikte görülmektedir. Bu sendroma 11q23'de lokalize *MFRP* genindeki homozigot mutasyonlar neden olmaktadır (73).

İzole mikroftalmi 6 (MCOP6), yapılan çalışmalarda 2q37.1'de lokalize *PRSS56* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır (74, 75).

İzole mikroftalmi 7 (MCOP7), yapılan bir çalışmada 12p13.1'de lokalize *GDF3* genindeki heterozigot mutasyonla ortaya çıkmaktadır (64).

İzole mikroftalmi 8 (MCOP8), yapılan çalışmalarda 15q26.3'de lokalize *ALDH1A3* genindeki homozigot mutasyonla ortaya çıkmaktadır (76, 77). Çizelge 2.5'de izole mikroftalmilere ait genel bilgiler özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. İzole mikroftalmilerin ilişkili olduğu genler ve klinik bulguları.

Sendromun adı	MIM numarası	Kromozomal lokalizasyon	Genin sembolü	Genin adı	Klinik bulgular	Kaynak
İzole mikroftalmi 1 (MCOP1)	251600	14q32		Bilinmiyor	Yüksek hipermetropi, kısa aksiyal uzunluk	78
İzole mikroftalmi 2 (MCOP2)	610093	14q24.3	<i>CHX10 (VSX2)</i>	Visual system homeobox 2	Hidronefroz, bilateral mikroftalmi, normal zeka	79
İzole mikroftalmi 3 (MCOP3)	611038	18q21.32	<i>RAX</i>	Retina and anterior neural fold homeobox	Ankilobilefaron anoftalmi/mikroftalmi, sklerokornea	71
İzole mikroftalmi 4 (MCOP4)	613094	8q22.1	<i>GDF6</i>	Growth differentiation factor 6	Kolobom, preaksiyal polidaktili, mikroftalmi	65
İzole mikroftalmi 5 (MCOP5)	611040	11q23	<i>MFRP</i>	Membrane frizzled-related protein	Mikroftalmi, retinitis pigmentoza, foveoskizis, optik disk drusenleri	80, 81
İzole mikroftalmi 6 (MCOP6)	613517	2q37.1	<i>PRSS56</i>	Protease, serine, 56	Dar palpebral fissürler, anizometropik ya da strabismik ambliyopi, papillomaküler katlantılar	74
İzole mikroftalmi 7 (MCOP7)	613704	12p13.1	<i>GDF3</i>	Growth differentiation factor 3	Mikroftalmi	64
İzole mikroftalmi 8 (MCOP8)	615113	15q26.	<i>ALDH1A3</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	Mikroftalmi	76,77

2.7. Mikroftalminin Değerlendirme Stratejileri

Mikroftalmi veya anoftalmiyi değerlendirmek için bireyin tıbbi geçmişi, aile öyküsü, fizik muayenesi, gerekli görülen görüntüleme tetkikleri ve karyotip analizi dikkate alınmaktadır (2).

Aile öyküsü alınırken özellikle mikroftalmi, anoftalmi ve kolobomu içeren göz bulguları sorgulanmaktadır. Üç kuşaklı pedigriler çizilmekte ve ailenin tüm bireyleri göz anomalileri açısından incelenmektedir (2).

Fizik muayenede, probandın mikroftalmi veya anoftalmisinin herhangi bir sendromla ilişkili olup olmadığına bakılmakta, eğer spesifik bir sendroma eşlik etmiyorsa, 4-5 yıl sonra bir genetik uzmanı tarafından ilerleyen yaşlarda farklı sendromların da çıkabileceği ihtimaline karşı yeniden muayene edilmektedir (2).

2.8. Çalışmada Kullanılan Moleküler Teknikler

2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu 1980'lerin ortalarında Kary Mullis tarafından bulunan ve iki primer arasındaki hedef DNA'nın bir enzim varlığında *in vitro* olarak klonlanmasına imkân tanıyan bir tekniktir. Bu buluşuyla 1993 yılında Kary Mullis'e Kimya Nobel ödülü verilmiştir. PCR, çok duyarlı, güçlü ve hızlı bir teknik olmasıyla bilim dünyasında hızlı bir yer edinmiştir. Duyarlı olması nedeniyle, çok az miktardaki, hatta tek hücreden elde edilen, DNA örneğiyle bile yöntem uygulanabilmektedir. Güçlü olması nedeniyle, degrade olmuş hücre veya dokulardan elde edilen DNA ile yöntem çalışmaktadır. Hızlı olması nedeniyle ise, birkaç saat içinde istenilen bölgenin birkaç milyon kez çoğaltılmasına imkân sağlamaktadır (82, 85).

PCR temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak, DNA çift zincirinin yüksek sıcaklık ile tek zincirli hale geldiği denatürasyon basamağıdır. Denatürasyon genel olarak 90-98 °C ve 10 sn ile 1 dk arasında gerçekleşmektedir. İkinci basamak, tek zincirli hale gelen kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması olarak adlandırılan "annealing" basamağıdır. "Annealing" 55-70°C ve 30 sn ile 1 dk arasında gerçekleşmektedir. Bu basamakta sentetik oligonükleotit primerler kullanılmaktadır. Primerlerin uzunluğu 18-28 bp arasında olup, erime sıcaklıkları ise birbirine yakın olmalıdır. Son basamak olan uzama (extension) basamağı ise *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen *Taq* DNA polimeraz enziminin varlığında ortamdaki deoksinükleotittrifosfatların (dNTP) zincire eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Bu basamak 72-74°C arasında genel olarak 1 dk içinde gerçekleşmektedir. PCR'da bu 3 basamağa bir siklus (döngü) denilmekte ve ortalama 20 ile

40 döngü olmaktadır. Bir PCR sonucunda 2^n kadar ürün oluşmaktadır. Buradaki n sayısı PCR'daki siklus sayısını ifade etmektedir. Bu işlem ısı döngüsü sağlayan cihazlarda gerçekleşmektedir (82,85,93).

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi bir takım kimyasallar gerekmektedir. Bunlardan, tampon solüsyonlar (KCl, Tris-HCl gibi) PCR sırasında pH'ı sabit tutmaktadır. Magnezyum en kritik olan kimyasallardan biri olup PCR'ın spesifikliğini ve verimini etkilemekte, *Taq* DNA polimerazın çalışması için kofaktör görevi yapmaktadır. Uzama basamağında kullanılan serbest dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hedef DNA'ya bağlanarak yeni zincirin oluşmasını yani DNA sentezini sağlamaktadır. Bir diğer kimyasal *Taq* DNA polimeraz ise, primerlerin 3' OH grubuna serbest dNTP'lerin bağlanmasında görev almaktadır. *Taq* DNA polimerazın 72°C'deki sentez hızı 35-100 nükleotid/sn'dir. Reaksiyonda forward (ileri) ve reverse (geri) olarak adlandırılan bir çift primer kullanılmaktadır. Primerler kalıp DNA'ya bağlanarak hedef bölgenin çoğalmasını sağlamaktadır. İyi bir primer, 18-28 bç uzunluğunda olmalı, erime sıcaklıkları birbirine yakın olmalı, dimer ve saç tokası yapısı oluşturmamalı ve uygun konsantrasyonlarda kullanılmalıdır. PCR reaksiyonunda kullanılan her kimyasalın tüpe belli bir oranda eklenmesi gerekmektedir. Fazla veya az kullanmak non-spesifik bağlanmaya, ürünün az olmasına veya hiç olmamasına neden olabilmektedir (93,94).

İyi bir PCR reaksiyonu için primerlerin kalıp DNA'ya spesifik ve özgün olarak seçilmesi, doğru bağlanma ısısının bulunması, kullanılan DNA örneğinin ve reaktiflerin kontamine olmaması gerekmektedir. Kullanılan malzemelerin kontamine olup olmadığını anlayabilmek için negatif kontrol adı verilen, içinde DNA hariç diğer reaktiflerin bulunduğu, bir tüpün çalışmaya eklenmesi gerekmektedir (82,93).

2.8.2. Kesilmiş Parçaların Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)

Restriksiyon endonükleazlar (RE) 1970'lerin başında keşfedilmiştir ve bakteriler tarafından virüslere karşı bir savunma mekanizması olarak üretilmektedir. RE'ler DNA'ya bağlanırlar ve özel tanıma dizisinden çift iplikli DNA'yı keserler. Bu diziler genellikle her iki DNA zincirinde de 5'-3' yönünde okunurlar, yani palindromik dizilerdir. Bugüne kadar yaklaşık olarak 1500'den fazla RE tespit edilmiştir (82,83,95).

RFLP tekniğinin mantığı ise, nokta mutasyonlarının bir RE ile kesim bölgesi oluşturması veya yok etmesi temeline dayanmaktadır. Kesimden sonra oluşan farklı boyutlardaki DNA parçalarının agaroz jel elektroforezde yürütülmesiyle genotipleme yapılmaktadır. Genellikle tip II RE'ler bu çalışma için kullanılmaktadır. Bunlar 4-8 bç uzunluğunda tanıma bölgesine sahiptirler (95).

2.8.3. Bağlantı Analizi

Genetik bilimine büyük katkı sağlayan Gregor Johann Mendel, 1866 yılında kalıtımın temellerini ortaya koyan Mendel kanunlarını yayınlamıştır. Mendel, bağımsız dağılım prensibini (2.yasası) “gamet oluşumu sırasında, birim faktörlerin birbirinden ayrılan çiftleri birbirlerinden bağımsız olarak dağılırlar” şeklinde ifade etmiştir. Ancak bu ifade Mendel'in seçtiği özelliklerin tesadüf eseri farklı homolog kromozom çiftleri üzerinde bulunmasından kaynaklanmıştır. Bu durumu, 1911 yılında Thomas H. Morgan ve öğrencisi Alfred H. Sturtevant *Drosophila*'da yaptıkları genetik çalışmalar ile aydınlatmıştır. Çalışmaları sonucunda, birbirine yakın genlerin, birbirine daha uzak olan genlere göre aralarında crossing-over oluşturma olasılıklarının daha düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Bu önermeden yola çıkan Sturtevant, ilk kez haritalamanın temelini atan kişi olmuştur (82).

Kromozomların, gen haritalarının oluşturulmasında sitogenetik, fiziksel ve genetik haritalama olmak üzere üç farklı strateji kullanılmaktadır. Sitogenetik haritalama, bilinen bir DNA probunun, tüm kromozomlar içinde nerede lokalize olduğunu bulmak şeklinde uygulanmaktadır. Proba hibridizasyon sonrası elde edilen sinyal ile DNA dizisinin lokalizasyonun tanımlanması yapılmaktadır. Fiziksel haritalama, genler arasındaki fiziksel uzaklıktan faydalanarak genleri kromozom üzerine yerleştirme esasına dayanırken, genetik haritalama ise, genlerin lokalizasyonunu bulmak için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Genetik haritalamanın temelinde, rekombinasyon, kromozom üzerinde birbirine yakın genlerin beraber aktarılması ve hastalığın aranılan gene yakın bulunan genetik belirteçle birbirine yakın olması ilkesi yatmaktadır. Genetik haritalamada parametrik bir yöntem olan bağlantı analizi kullanılmaktadır (83,84).

Bağlantı (linkage), aynı kromozom üzerindeki birbirine yakın olan allellerinin beraber kalıtılma durumu olarak ifade edilmektedir. Aynı kromozom üzerinde bulunan genlere, bağlı gen (linked gene) bu genlerin oluşturmuş olduğu gruba ise bağlantı grubu (linked group) adı

verilmektedir. Aynı kromozom üzerindeki genler birbirine fiziksel olarak bağılırlar ve bu nedenle mayoz bölünme sırasında beraber hareket etme eğilimi gösterirler. Aynı kromozom üzerinde bulunan alleller, mayoz bölünme sırasında görülen crossing-over nedeniyle farklı gamet hücrelerine gidebilirler. Birbirine çok yakın olan genler arasında crossing-over olma olasılığının düşük olması sebebiyle, bu genlerin beraber kalıtılma ihtimali yüksek olacaktır. Kromozomlar arasında gerçekleşen crossing-over nedeniyle ebeveyne benzemeyen yeni tip recombinant gametler oluşacaktır. Oluşan bu yeni gametlere rekombinant gamet, bu olaya ise rekombinasyon denilmektedir. Kardeş olmayan iki kromatit arasında teorik olarak tek bir crossing-over gerçekleşmişse oluşacak tetradların yüzdesi oluşan rekombinant gametlerin yüzdesinin iki katı olacaktır. Bağlantılı iki gen arasındaki crossing-overlerin çalışılması, iki gen arasındaki uzaklığın hesaplanmasında bir temel oluşturacaktır (83,84).

Bağlantı analizinin temelini, lokalizasyonu aranan gen ile, lokalizasyonu bilinen bir belirtecin nesiller boyu beraber kalıtılmasının moleküler yöntemlerle incelenmesi ve istatistiksel olarak bu bağlantının hesaplanması oluşturmaktadır. Bu hesaplamaların temelinde ise rekombinasyon olayı yer almaktadır. Bu amaçla, iki genin birbirine yakınlığını ölçmek için rekombinasyon sıklığı kullanılmaktadır. İki lokus için rekombinant bir gametin ortaya çıkma olasılığı rekombinasyon frekansı olarak adlandırılmakta ve θ (teta) ile gösterilmektedir. Rekombinasyon frekansının % 0-50 arasında olması durumunda iki genin birbirine bağlantılı olduğu, % 50'den büyük olması durumunda ise iki genin bağımsız olduğu düşünülmektedir. İki gen arasındaki % 1'lik rekombinasyona bir harita birimi adı verilmekte ve Thomas H. Morgan'ın anısına Morgan (M) olarak isimlendirilmektedir. Morgan'ın 1/100 birimine ise 1 centiMorgan (cM) adı verilmekte ve 1 cM yaklaşık 1 milyon baz çiftini ifade etmektedir (83,84).

Bağlantı analizi yapılırken, lokalizasyonu bulunmak istenen genin, herhangi bir kromozomda bulunması olasılığının, o kromozomda bulunmaması olasılığına oranının logaritması "Logarithm of Odds ratio" (LOD Score) adı verilen bir olasılık hesabı yapılarak bulunmaktadır. LOD skor değerinin 3 veya daha fazla olması ise iki lokusun bağlı olduğunun kanıtı sayılmaktadır (83-86).

Bağlantı analizinin başarısı, çalışılan hastalığın kalıtım kalıbının bilinmesine ve belirteç alleli ile hastalık allelinin, beraber kalıtılıp kalıtılmadığının izlenebileceği üç veya daha fazla kuşaklı ailelerin incelenmesine ve doğru belirteçlerin seçilmesine bağlıdır. Doğru belirteç

kullanılması, kromozomda nerede lokalize olduğu kesin olarak bilinen polimorfik özellik gösteren belirteçler, olarak ifade edilmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan belirteçler arasında Short Tandem Repeat Polymorphism (STRP), Variable Number Tandem Repeats (VNTR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Single Nucleotide Polymorphism (SNP)'ler yer almaktadır (87,88).

Bağlantı analizi sonucunda, incelenen hastalığa neden olduğu düşünülen genin kromozomun neresinde lokalize olduğunun olasılığı elde edilecektir. Bölgenin saptanmasının ardından haplotip analizi ile bölgenin daraltılması gerekmektedir. Haplotip, kromozom üzerindeki birbirine yakın lokuslardaki allel gruplarına denilmektedir. Haplotip analizi yapılırken Single Nucleotide Polymorphism (SNP-tek nükleotid polimorfizmi) belirteçleri kullanılmakta ve birkaç kuşaklı ailelerin incelenmesi de analizde büyük avantaj sağlamaktadır. Haplotip analizi incelenen hastalığın kalıtım kalıbı dikkate alınarak yapılmaktadır (83,84,88).

Otozomal resesif kalıtım kalıbına sahip hastalıklarda, bireyin hasta olması için, hastalığa sebep olan gendeki mutasyonu homozigot olarak taşıması gereklidir. Bu durumda etkilenmiş bireyin ebeveynlerinin, hastalığa neden olan gendeki mutasyonu heterozigot olarak taşıması beklenmektedir. Aday genin lokalize olduğu kromozom segmenti crossing over ile rekombinasyona uğramayacağı için bu bölgedeki SNP'lerin ortak atadan kalıtıldığı ve homozigot bloklar halinde bulunduğu bilinmektedir (89). Homozigot haritalama ile ortak kalıtılan genomik bölgeler belirlenmeye çalışılır. Böylece aranılan gen belli bir kromozom bölgesine sınırlandırılır (90).

2.8.4. Mikrodizin Teknolojisi

Temel olarak mikrodizin teknolojisi, binlerce gen veya transkript ifadesini aynı anda belirleyebilen yüksek işlem kapasiteli bir teknoloji olarak tanımlanmaktadır (91). Bu teknik DNA/RNA çipleri, bioçip veya gen çipleri olarak da bilinmektedir (92). Yüksek işlem kapasiteli analiz, mikrodizin yüzeyine bağlanmış olan binlerce probun komplementer hedefi ile direkt bir karşılaştırma sağlamaktadır. Mikrodizin tekniği, temel olarak nükleik asit hibridizasyonuna dayanmakta ve DNA'nın komplementer dizisine spesifik ve hızlı olarak bağlanmasını esas almaktadır (91,92). Temel olarak cDNA ve oligonükleotit olmak üzere 2 tip mikrodizin bulunmaktadır. cDNA mikrodizinlerde, cam veya silikon gibi katı yüzeylere

yüksek hızlı robotlar tarafından uzun DNA molekülleri immobilize edilmektedir. Örnek DNA polimeraz zincir reaksiyonu ile yaklaşık 100 nükleotit uzunluğunda çoğaltılır. Bu tip mikrodizinler daha sıklıkla uzun ölçekli taramalarda ve ekspresyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Oligonükleotit mikrodizinlerde ise DNA, cam yüzeyler üzerine kimyasal veya konvansiyonel yöntemlerle immobilize edilmektedir. Yaklaşık 25 nükleotit uzunluğunda kullanılan oligonükleotitler ile haritalama, yeni genlerin keşfi ve mutasyon taraması yapılmaktadır. Çalışma, kullanılacak mikrodizinin dizaynı ile başlamakta sırasıyla, örneklerin hazırlanması, hibridizasyon, yıkama, görüntüleme ve verilerin değerlendirilmesi olarak devam etmektedir (92). Bu teknolojinin rutin tanıda kullanılmasıyla ilgili bazı kısıtlamalar bulunmakta ve bunlar doğruluk ve tekrarlanabilirlik eksikliği olarak ifade edilmektedir. Mikrodizin çalışmasının kalitesini etkileyen durumlardan bazıları, örnek hazırlama ve etiketleme aşaması, hibridizasyon ve post hibridizasyon yıkama aşaması ve görüntü eldesi aşamasında yaşanan bir takım problemler olarak özetlenmektedir. Örnek hazırlama ve etiketleme aşamasında, örneğin kalitesi ve kantitesi büyük önem taşımaktadır. Örneğin degradasyonu çalışmanın sonucunu negatif yönde etkilemektedir. Hibridizasyon ve post hibridizasyon yıkama aşamasında, problemler ve komplementer hedefleri arasındaki spesifik bağlanma, temel olarak yıkama tamponları ve sıcaklığa bağlıdır. Bu basamakta oluşabilecek küçük değişiklikler non-spesifik etkileşimlere yol açmaktadır. Görüntü eldesi aşaması, duyarlılığı artırmak ve gürültüyü azaltmak için kullanılan yoğunluk ve sinyal rezolüsyonu gibi tarama parametrelerince etkilenebilir. Sonuç olarak elde edilen görüntüde kalite değerlendirmesi yapılmaktadır (91). Bu tez çalışmasında Affymetrix GeneChip 250K (NspI) SNP mikrodizin platformu (Affymetrix, Inc, Santa Clara, California, USA) kullanılmıştır. Bu platform üzerinde toplam 262.264 adet SNP'yi temsil eden 25-mer uzunluğunda oligonükleotitler bulunmaktadır (92).

2.8.5. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi yöntemi, insan ve diğer canlıların genomlarının dizilenmesi için kullanılan moleküler bir tekniktir. Birinci nesil DNA dizi analizi için geliştirilmiş 2 yöntem bulunmaktadır. Bunlar, 1973'de Maxam ve Gilbert tarafından keşfedilen kimyasal ayrılma yöntemi ve 1975'de Frederick Sanger tarafından keşfedilen enzimatik reaksiyonlara dayalı dizi analizi yöntemi olarak bilinmektedir (85,95).

Maxam-Gilbert tarafından keşfedilen yöntem, DNA molekülünün bazlara özgü spesifik kimyasal ajanlarla kırılması esasına dayanmaktadır. Yöntemde DNA çift zinciri tek zincirli hale getirilmekte ve sentez için zincirlerden biri kullanılmaktadır. Dizisi belirlenecek olan zincir radyoaktif ³²P ile işaretlenmektedir. Diziye özgü bazların her birinin farklı kimyasallar tarafından işaretlenmesiyle belli noktalarda kırıklar oluşturulmaktadır. Sonraki aşamada ise farklı boylarda ortaya çıkan fragmanların jel elektroforezde görüntülenmesiyle analiz yapılmaktadır. Bu yöntem kimyasal ajanlar kullanılması, maliyetin çok olması, çok hassas olmaması ve işlem basamaklarının çok olması nedeniyle tercih edilmemektedir (85, 95,96).

Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından keşfedilen zincir sonlandırma yöntemi ise, enzimatik DNA sentezine dayalı bir tekniktir. Bu buluşuyla Frederick Sanger'e 1975'de Nobel ödülü verilmiştir. Bu yöntemde öncelikle klasik bir PCR reaksiyonuyla dizilenmesi istenen bölge amplifiye edilmektedir. Amplifiye edilen PCR ürününe dideoksinükleotid trifosfatların (ddNTP) eklenmesiyle farklı uzunlukta fragmanlar elde edilmektedir. ddNTP'ler farklı renkte ışımaya yapan floresan boylarla işaretlenmiş ve 3'OH grubu bulunmayan dinükleotid trifosfatlardır. DNA polimeraz ile zincir uzaması gerçekleşirken uygun bir ddNTP'in zincire eklenmesiyle sentez durmaktadır. Çünkü ddNTP'lerdeki 3'OH grubunun bulunmaması nedeniyle yeni bir dNTP zincire eklenememektedir. Böylece farklı boylarda fragmanlar oluşacaktır. Bu reaksiyon tek bir tüpte gerçekleşmektedir. Elde edilen diziler otomatik bir cihaz tarafından jelde yürütülerek floresan dedektör önünden geçmektedir. Bu esnada elde edilen pikler bilgisayar programında değerlendirilerek analiz yapılmaktadır. İlk kez paired-end dizileme yaklaşımı kullanılarak dizilenen gen *HPRT* (hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz) genidir (82, 85, 97).

2.8.6. Ekzom Dizileme

İnsan genomunun enzimatik dizileme işlemi Sanger tarafından 1975'de bulunmuş ve hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Genlerin birçoğunun birden fazla ekzonlu olduğu ve bazı ekzonların ise çok büyük olduğu düşünüldüğünde Sanger ile dizileme çok maliyetli ve zaman alıcı bir yöntem haline gelmektedir. Sanger dizileme yönteminde, 96 örneğin 3-4 saatlik elektroforezi sonucunda ancak 30-60 kb'lik bir bilgi elde edilmektedir. 1990'lı yıllarda ise DNA'nın floresan işaretlenmesi ile birlikte otomatik DNA dizileme cihazları geliştirilmiştir. Yeni nesil dizileme ile ilgili ilk teknolojiler, birbirine paralel milyarlarca dizileme reaksiyonlarını içerecek şekilde 2007 yılında geliştirilmeye başlanmıştır. Bu

teknoloji ile Sanger dizileme yöntemine göre bir seferde 10 bin kat daha fazla veri elde edilmektedir (85).

İlk insan genomunun taslağının tamamlanmasından sonra, yüksek çıktılı DNA dizileme (yüksek çıktılı yeni nesil dizileme (High-throughput Next Generation Sequencing, HT-NGS) de denilen) adı verilen yeni stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu geliştirilen HT-NGS stratejileri ile genomik araştırmaların daha etkin ve ucuz olarak yapılacağı düşünülmektedir (98).

Büyük ölçekli paralel dizileme yöntemi, heterojen hastalıklarda aynı anda yüzlerce mutasyonu taramak için, hastalığa neden olan patojenlerin dizi tabanlı tespiti ve yeni mutasyonların bulunması için kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin giderek fiyatı düşmekte ve küçük ölçekli laboratuvarlarda da tercih edilmektedir (99) Mendeliyen tip kalıtılan hastalıklarda, hastalığa neden olan mutasyonların çoğunlukla ekzonlarda veya splice site bölgelerde olduğu bilinmektedir. Bu bölgelerin de genomun yaklaşık olarak %1,5'luk bir kısmını oluşturduğu düşünülürse hastalığa neden olabilecek aday gen/genlerin bulunabilmesi için etkilenmiş bireye ekzom dizileme yapmak, maliyet, zaman ve verilerin değerlendirilebilmesi açısından etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır (100).

Tüm ekzom analizi ile ortalama 20.000 gen ve 180.000 ekzon olmak üzere tüm insan genomunun %1'i analiz edilebilmektedir. Tüm ekzom, kalıtsal hastalıklara ait mutasyonları %85 oranında içermektedir. Bu tekniğin başarı oranı tek gen hastalılarında %50 olarak kabul edilmektedir (101).

Tüm ekzom analizi, DNA dizi analizine göre daha kısa sürede daha büyük DNA bölgesi hakkında bilgi vermektedir. Ancak, bu teknik ile DNA'daki kodlanmayan bölgelerdeki varyantlar, büyük delesyon, duplikasyon, yeniden düzenlenimler, nükleotid tekrarları ve epigenetik değişiklikler tanımlanamaz. Ayrıca, elde edilecek sonuçlar, mutlaka DNA dizi analizi ile doğrulanmalıdır (102).

Bugüne kadar birçok yeni nesil dizileme platformu keşfedilmiştir. İlk defa ticari olarak 2005 yılında piyasaya çıkarılan platform, 454 Life Sciences firması tarafından yapılan GS 20 olarak bilinmektedir. Bu cihazla *Mycoplasma genitalia*'nın genomu %96 coverage (kapsama) ve %99,96'lık bir doğrulukla dizilenmiştir. Bunu takip eden yıllarda farklı

platformlar ortaya çıkmıştır (98). Bu platformların genel özellikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir (98, 103).

Çizelge 2.6. Yeni nesil dizilemede kullanılan platformların genel özellikleri

Firma adı	Roche FLX	GS	Illumina	Life Technologies
Platform	GS Titanium, Junior	FLX GS	Hiseq 2000	ABI SOLID
Kalıp hazırlama	Emülsiyon PCR		Köprü amplifikasyon	Emülsiyon PCR
Örnek miktarı	5 µg		1µg	5-20 µg
Saptama metodu				
Kütüphane hazırlama (gün)	3-4		2	2-4,5
Yöntem				
Örnek sayısı				
Doğruluk	%99,5		>%98,5	%99,94
Dizileme metodu	pirodizileme		Polimeraz temelli dizileme	Ligasyon temelli dizileme
Okuma uzunluğu	400 bç		75-100 bç	~50 bç
Zaman	10 saat		2-5 gün	6 gün

Genom dizilemedeki yenilikler ile genomun bir bölgesinin hedef dizileme ile dizilenmesine odaklanılmıştır. Bu amaçla, tüm kanser genlerine ait genlerin ekzonları, ekzon-intron kavşakları ile düzenleyici bölgeleri dizilenmiştir (104).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Mikroftalmi, göz küresinin total aksiyal uzunluğunun yaşa göre ortalama en az iki standart sapmanın altında ve anteriyor segment uzunluğunun ise normal sınırların içinde veya altında olması olarak tanımlanmaktadır. Mikroftalmi izole veya bir sendromun parçası olarak görülebilmektedir. Bugüne kadar izole mikroftalmi ile ilişkili 7 gen, bir sendroma eşlik eden mikroftalmiler ile ilişkili 22'den fazla gen tanımlanmıştır. İzole mikroftalmiler açısından bakıldığında, hastalıkta gözlenen genetik heterojenite nedeni ile hastalığın genetik etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu açıdan bakıldığında yeni aday gen veya genlerin tanımlanması ile ilgili birçok araştırma yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında aralarında 3. derece akrabalık bulunan bir ailede yeni aday gen veya genlerin araştırılması planlanmaktadır. Ailenin yaşayan 5 çocuğundan 3'ü etkilenmiş, 2'si sağlıklı bireydir. Otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıklarda etkilenmiş olan bireylerin mutasyonu homozigot taşıması prensibinden yola çıkarak mikrodizin yöntemi ile homozigot blokların tespiti ile aranılan bölgenin daraltılması, hem de bugüne kadar mikroftalmi ile ilişkilendirilmiş genlerin dışlanması planlanmıştır.

Buradan elde edilecek homozigot bloklardaki genlerin birden fazla olacağı düşünüldüğünde, bu genlerin doğrulama çalışmaları hem maliyet hem de zaman açısından kayıp olacaktır. Bu sebeple, ailedeki etkilenmiş bireylerden birine ekzom dizileme yapılarak bu bölgelerin daha da daraltılması ve doğrulanacak olan genlerin sayısının azaltılması planlanmaktadır.

Son olarak da bulunan değişiklik veya değişikliklerin validasyonu için DNA dizileme yöntemi ve toplum taraması yapılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada mikrodizin ve ekzom dizileme yöntemi kullanılarak mikroftalmiye neden olabilecek aday gen veya genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

İzole mikroftalmiden sorumlu genlerin birden fazla olduğunu ve bu genlerin de çok sayıda ekzondan oluştuğunu düşündüğümüzde, çalışacağımız ailede izole mikroftalmiden sorumlu aday gen(ler)in bulunması vakit, emek ve maliyet açısından çok zor olacaktır. Ancak çalışacağımız ailenin aralarında akrabalık bulunması ve otozomal resesif kalıtım kalıbına uyması sebebiyle bağlantı analizi ve homozigot haritalama yönteminin kullanılması izole mikroftalmiden sorumlu olabilecek aday gen(ler)in hangi lokusta olduğunu belirlememizi mümkün kılmıştır. Bu anlamda kullanılacak olan mikrodizin yöntemiyle hem bilinen genlerin dışlanması, hem de izole mikroftalmiden sorumlu olabilecek aday gen(ler)in hangi lokuslara bağlantı gösterdiğinin bulunması planlanmıştır.

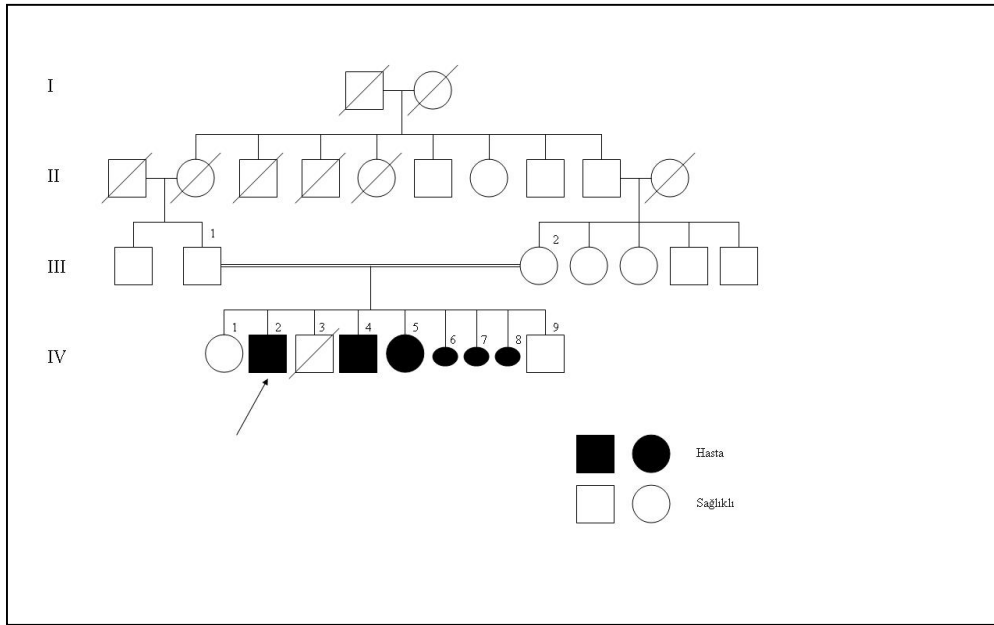
Homozigot haritalama sonucu elde edilecek haplotip bloklarının da büyüklüğüne göre çok sayıda geni barındırdığını düşünürsek bu verinin tek başına değerlendirilmesi ve olası aday gen(ler)in DNA dizi analizi ile doğrulanması hem maliyet hem de zaman açısından çalışmayı zorlaştıracaktır. Aynı anda tüm ekzonların incelenmesine olanak veren ekzom dizileme yöntemiyle bu sorun çözülmüştür. İzole mikroftalmiden sorumlu olabilecek aday gen(ler)in bulunması amacıyla ekzom dizileme yönteminden elde edilen veriyi değerlendirirken, ilk önce haplotip bloklardaki genler esas alınmıştır.

4.1. Çalışma Grubu

Bu tez çalışmasına, 1998 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na mikroftalmi nedeni ile başvuran ve Prof. Dr. E. Ferda Perçin tarafından değerlendirilen aile dâhil edilmiştir. Spesifik bir sendromla ilişkilendirilemeyen ailenin bireylerine ait DNA örnekleri Hacettepe Üniversitesi bünyesinde bulunan TÜBİTAK-DNA/Hücre Bankası ve Gen Araştırmaları Laboratuvarında izole edilmiş ve Prof. Dr. E. Ferda Perçin tarafından 15 Eylül 1998 - 15 Mart 1999 tarihleri arasında; University of Connecticut Health Center' da "Otozomal Resesif Mikroftalmi Geninin Pozisyonel Haritalanması ve Mutasyon Taraması" isimli TÜBİTAK (NATO-B2) projesi kapsamında araştırılmıştır. Bu proje kapsamında mikroftalmi ile ilişkilendirilmiş aday genler (*CHX10*, *SOX2*, *OTX2*, *PAX6*, *STRA6*, *RAX*, *FOXE3*) için bağlantı analizi yapılmış ve söz konusu genlere bağlantı saptanmamıştır. Mikroftalmiden sorumlu yeni genlerin bulunmuş olması ve yeni teknikler ile bağlantı analizi için tek başına gücü olmayan tek bir aile/hasta da bile

sorumlu mutasyonun saptanabilmesinin mümkün olması nedeni ile bu araştırma için ekzom dizilemenin iyi bir yöntem olduğu düşünülmüştür. Bu tez çalışması Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından görüşülmüş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik açıdan sakınca bulunmadığı kararına (karar # 4.06.68.49) varılmıştır.

Çalışılan mikroftalmi ailesi 4 kuşak ve toplam 26 bireyden oluşmaktadır. Ailenin ilk 2 kuşaktan 8 bireyi, 4. kuşaktan ise 1 bireyi hayatını kaybetmiştir. Aileye ait pedigrisi Şekil 4.1'de verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mikroftalmi ailesine ait pedigrisi örneği

Anne (III-2) 49, baba (III-1) 51 yaşında sağlıklı bireylerdir. Ailenin toplam 9 gebeliği olmuş, bunlardan 3.'sü ateşli hastalıktan ölmüş, 6, 7 ve 8. gebelikleri abortusla sonuçlanmıştır. Yaşayan çocuklarından, 3'ü hasta, 2'si ise sağlıklı bireylerdir.

Ailenin ilk çocuğu (IV-1), 29 yaşında sağlıklı kız bireydir. Bu bireye ait 1998 yılında alınmış olan DNA örneğinden mikrodizin çalışması, dizi analizi ve RFLP yapılmıştır. Hasta daha sonra özel nedenlerinden dolayı kan vermeye gelemediği için hastanın sitogenetik analizi yapılamamıştır. Ailenin ikinci çocuğu (IV-2), 27 yaşında hasta erkek bireydir. Bu hastanın fizik muayenesinde, mikroftalmiye ek olarak derin yerleşimli gözler, mikrosefali, brakisefali, brakidaktili, sağ elde simian ve sol elde tek transvers çizgi saptanmıştır. Büyüme-gelişme geriliği bulunan hasta işitme cihazı kullanmaktadır.

Bu hasta, proband olarak belirlenmiştir. Hastanın göz muayenesi uzman göz hekimi tarafından yapılmış ve hastada bilateral pupiller aralık kapalı olarak saptanmıştır. USG incelemesinde aksiyel uzunluğun sağda 12mm, solda 10 mm olduğu ve bilateral koroid kalınlaşması saptanmıştır.

Ailenin üçüncü çocuğu (IV-4), 25 yaşında hasta erkek bireydir. Bu hastada mikroftalmiye ek olarak derin yerleşimli gözler, sol elde tek transvers çizgi ve baş sallama şeklinde sterotipi saptanmıştır. Hastada bu dismorfik bulgulara büyüme-gelişme geriliği ve mental retardasyon eşlik etmektedir. Hastanın göz muayenesi uzman göz hekimi tarafından yapılmış ve hastada bilateral korneada total opaklık saptanmıştır. Hasta koopere olmadığı için USG yapılamamış ve yeni kan örneği alınamamıştır. Hastanın 1998 yılında alınan DNA örneğinden çalışma yapılmıştır.

Ailenin dördüncü çocuğu (IV-5), 18 yaşında hasta kız bireydir. Bu hastada mikroftalmiye ek olarak mikrosefali, brakisefali, sağ elde simian ve sol elde tek transvers çizgi saptanmıştır. Hastanın göz muayenesi uzman göz hekimi tarafından yapılmış ve hastada bilateral santral korneal skar saptanmıştır. USG incelemesinde aksiyel uzunluk sağda 12 mm, solda ise 16-17 mm ölçülmüş olup bilateral koroid kalınlaşması saptanmıştır.

Ailenin beşinci çocuğu (IV-9), 10 yaşında sağlıklı erkek bireydir. Hastanın göz muayenesi uzman göz hekimi tarafından yapılmış ve göz muayenesi normal olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mikroftalmi ailesi bireylerinin 1998 yılına ait göz bulguları

Olgu/yaş/ cinsiyet	Görsel aktivite	Lens gücü	Kornea çapı	Ön kamarada derinliği	Aksiyel uzunluk	Korneal bulutlanma	Klinik bulgular
IV-1/12 K	Sağ 0,1 Sol 0,1	N N	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	-	-
IV-2/10 E (Proband)	Işığa karşı minimal cevap	Uygulanabilir değil	Sağ 10 mm Sol 10 mm	Ön kamaralar oldukça sığ	Sağ 16.64 mm Sol 16.61 mm	Her gözde iki de löküm	Büyüme gelişme geriliği Mikrosefali, brakisefali Brakidaktili Sağ elde simian-line Sol elde tek transvers çizgi İşitme cihazı kullanıyor
IV-4/9 E	Işık algısı yok	Uygulanabilir değil	Sağ 9 mm Sol 7 mm	Ön kamaralar oldukça sığ	Sağ 16.61 Sol 3 veya 5 mm	Sağda tam Solda hafif	Büyüme gelişme geriliği Mental retardasyon Sol elde tek transvers çizgi Baş sallama şeklinde sterotipi
IV-5/2 K	Işığa karşı minimal cevap	Uygulanabilir değil	Sağ 10 mm Sol 10 mm	Ön kamaralar oldukça sığ	Sağ 16.41 Sol 16.41	Sağda tam Solda hafif	Mikrosefali, brakisefali Sağ elde simian-line Sol elde tek transvers çizgi
IV-9/ 2004 doğumlu	N	N	N	N	N	N	-

N: Normal

4.2. Uygulanan Yöntemler

Çalışmamız sırasında hangi bireye hangi yöntemlerin uygulandığı Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen aile bireylerinde uygulanan yöntemler

Hasta numarası	Mikrodizin	Ekzom dizileme	Sitogenetik analiz	Dizi analizi	RFLP
III-1	-	-	+	+	+
III-2	+	-	+	+	+
IV-1	+	-	-	+	+
IV-2	+	+	+	+	+
IV-4	+	-	-	+	+
IV-5	+	-	+	+	+
IV-9	-	-	+	+	+

(+): Yöntem uygulandı (-):Yöntem uygulanmadı

4.2.1. GTG-Bantlama Yöntemi ile Kromozom Analizi

Çalışmaya dâhil edilen yedi bireyin beşinden 5'er ml heparinli tüplere kan alınmış ve GTG-bantlama yöntemi ile kromozom analizi yapılmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

RPMI 1640 (Biological Industries, 01-100-1)
Penisilin (Biological Industries, 03-031-1)
L-glutamin (Biological Industries, 41-218-25)
Fitohemaglütinin (Biochron, M5030)
Fetal dana serum (Biochrom, S0113)
Kolsemid (Biological Industries, 12-004-1D1)
Potasyum klorür (KCl) (Merck, 7447-40-7)
Distile su (Biochrom, L 0015)
Asetik asit (Merck, 64-19-7)
Metanol (Merck, 106009)
12 ml'lik hücre kültür tüpü (Greiner Bio-one, 163160)
Pastör pipeti (Greiner Bio-one, 700370)
2 ml'lik enjektör (Hayat, 8696569000135)
Lam (ISOTERM, CLDR000003)
Etüv (Sanyo Incubator, MIR 162)

Santrifüj cihazı (Universal 320, Hettich, 1401)

Vortex (V1 plus, Boeco, BOE 8055000)

Hassas terazi (Boeco, BAS 32)

Manyetik karıştırıcı (Boeco, BOE 8057000)

Pastör fırını (Memmert, UF 55)

Buzdolabı (Regal, CDR 2102)

Besi Yeri Hazırlanması

Çalışmada RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine 10000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisinden 1 ml, 200 mM L-glutaminden 2 ml, 100 ml fetal dana serumundan 20 ml ve 5 ml liyofilize fitohemaglutinininden 2 ml ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Hipotonik Çözeltilisinin (0,075 M KCl) Hazırlanması

1,397 g KCl, 250 ml distile suda çözüldükten ve manyetik karıştırıcıda 15 dk karıştırıldıktan sonra kullanılmak üzere 37 °C'lik etüvde saklanmıştır.

Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması

Metanol ve asetik asit karışımı 3:1 oranında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

Periferik Kandan Kromozom Eldesi (72 saatlik kültür)

- 1- Hazırlanan besi yeri 12 ml'lik steril tüplere, 5'er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Kan örnekleri birkaç kez alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra içinde besi yeri bulunan tüplere 12'şer damla olacak şekilde eklenmiş, alt üst edilerek karıştırılmış ve 37°C'lik etüve konulmuştur.
- 2- Ertesi gün ve bir sonraki gün kanlar alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- 3- Ekimden sonraki 68. saatte 2 damla kolsemid eklenerek karıştırılan tüpler 75 dk 37°C'lik etüvde bekletilmiştir.
- 4- Etüvden alınan tüpler 1400 rpm'de 10 dk çevrilmiştir. Çevirme işleminden sonra kanların üzeri dikkatli bir şekilde atılmıştır.

- 5- Üzerine yavaş bir şekilde 6 ml hipotonik çözeltisi eklenirken tüpler vortekslenmiş ve 37°C'lik etüve kaldırılmıştır.
- 6- Etüvde 1 saat bekleyen tüpler alt üst edilerek çalkalandıktan sonra üzerine prefiksasyon yapmak için yaklaşık 10-12 damla fiksatif solüsyonu eklenmiş, alt üst edilen tüpler 1400 rpm'de 10 dk çevrilmiştir.
- 7- Dikkatli bir şekilde pellete zarar vermeden süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır.
- 8- Pellet üzerine 6 ml fiksatif solüsyonundan yavaş bir şekilde eklenirken tüpler vortekslenmiştir.
- 9- Bu işlem pelletin kalitesine göre 3 veya 4 kere tekrarlanmış ve son tekrardan sonra tüpler 1 gün beklemek üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.
- 10- Ertesi gün tüpler, 1400 rpm'de 10 dk çevrilmiş, pellet oluşturulmuş ve pellet üzerinde çok az bir miktar fiksatif solüsyonu kalıncaya kadar fiksatif solüsyonu uzaklaştırılmıştır.
- 11- Kalan kısım pastör pipeti yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra soğuk ıslak lam üzerine yayılmıştır.
- 12- Preparat mikroskop altında kontrol edildikten sonra bantlama işlemine hazırlık için bir gece pastör fırınında eskitilmiştir.

4.2.2. GTG Bantlama

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Sarf Malzemeler

Tripsin (Biological Industries, 03-052-1B)

Giemsa (Merck, 1092040100)

PBS (Gibco, 10010-023)

A solüsyonu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, 7558-79-4)

B solüsyonu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, 13472-35-0)

Distile su (Biochrom, L 0015)

Şale (Maryfield, DC-73.1.1)

Kurutma kâğıdı (Whatman, 1600-001)

A Solüsyonunun Hazırlanması

6,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 500 ml distile su ile çözülmüştür.

B Solüsyonunun Hazırlanması

6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 500 ml distile su ile çözülmüştür.

Preparatların Boyanması

Preparatların boyanması için 4 tane şale hazırlanmıştır. Birinci şaleye 0,04 g tripsin (80 ml PBS ile sulandırılmış), ikinci şaleye 80 ml 1XPBS, üçüncü şaleye ise kurutma kâğıdı üzerine 12 ml giemsa boyası süzülmesi için konulmuştur. Süzülen giemsa üzerine önceden hazırlanmış 35 ml A ve 35 ml B solüsyonu ilave edilmiştir. Dördüncü şaleye ise preparatlardaki fazla boyayı almak için su konulmuştur. Boyama işlemi için, preparatlar ilk şalede 25 sn bekletilmiş, ikinci şaleye tripsinin etkisini sonlandırmak için hızlıca batırılıp çıkarılmış ve üçüncü şalede ise 4 dk boyanması için bekletilmiştir. Boyanın fazlasını almak için ise preparatlar, son şalede yaklaşık 1 dk bekletilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

4.2.3. DNA İzolasyonu

Çalışmaya daha sonra dâhil edilen III-1 ve IV-9 numaralı bireylerden alınan kan örneklerinden, yüksek konsantrasyonlu tuzla çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır (105). DNA'lar çalışmaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ saklanmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Otoklavlanmış bidistile su

Lizis tamponu (AppliChem, A4150)

Proteinaz K (AppliChem, A3830)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, 822050)

Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (AppliChem, A4716)

%99,5'lük absolut etanol (Merck, 107017)

Tris-EDTA tamponu (TE) (AppliChem, A0973)

NaCl (AppliChem, A1149)

Na_2EDTA (AppliChem, A1104)

TrisHCl (AppliChem, A3452)

15 ml'lik steril tüp (Greiner Bio-one, 82050-276)
Pastör pipeti (Greiner Bio-one, 89094-394)
100'lük steril pipet ucu (Axygen Scientific, CS4800)
1000'lik steril pipet ucu (Axygen Scientific, PK1000)
1,5'luk mikrosantrifüj tüpü (Greiner Bio-one, 616 201)
Santrifüj cihazı (Hettich Micro 22R, C1110)
Etüv (Sanyo Incubator, MIR 162)
Buzdolabı + 4 °C (Uğur, UŞS 300 DTK/GD)
Buzdolabı (Regal, CDR 2102)

Lysis Buffer'm Hazırlanışı

10 M TrisCl'den 1,576 g, 400 M NaCl'den 23,4 g, 2 M Na₂EDTA'dan 0,7 g tartılmış 1 litre steril distile suda çözülmüş ve buzdolabında saklanmıştır.

Proteinaz K'nın Hazırlanışı

10 mg/ml stok proteinaz K 10 ml distile suda çözülmüş ve buzdolabında saklanmıştır.

SDS'in Hazırlanışı (% 10'luk)

10 g SDS tartılıp 100 ml distile suda çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Amonyum Asetatın Hazırlanışı

5M amonyum asetatdan 148 g tartılıp 200 ml distile suda çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

TE Buffer'm Hazırlanışı

10 M TrisHCl'den 0,394 g, 1M Na₂EDTA'dan 0,093 g tartılmış 250 ml distile suda çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

DNA İzolasyonunun Yapılışı

- 1- EDTA'lı tüpler içinde bulunan kanlar birkaç kez aşağı yukarı çevrildikten sonra 2 ml'si 15'lik steril tüpe boşaltılmış ve üzerine yaklaşık olarak 10 ml otoklavlanmış

- soğuk bidistile su konulmuştur. Hızlıca 2-3 dk çalkalandıktan sonra 2000 rpm’de 10 dk çevrilmiştir.
- 2- Çevirme işleminden sonra pelleti atmayacak şekilde süpernatant boşaltılmış ve yeniden soğuk bidistile su ilave edilerek 2000 rpm’de 10 dk çevrilmiştir. Bu işlem 5 defa tekrarlanmıştır.
 - 3- Son tekrardan sonra süpernatant dökülmüş ve tüpler kâğıt bir havlunun üzerine ters çevrilerek süzölmeye bırakılmıştır.
 - 4- Süzöldükten sonra tekrar çevrilen tüpler üzerine 750 µl lysis buffer, 40 µl proteinaz K ve 50 µl SDS koyularak hafifçe karıştırılmıştır. Tüpler 37 °C’lik etüvde bir gece bekletilmiştir.
 - 5- Ertesi sabah tüpler üzerine 500 µl amonyum asetat eklenmiş, aşağı yukarı yaklaşık 20 kere hızlı bir şekilde karıştırılmış ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
 - 6- Oda sıcaklığında bekletilen tüpler 3500 rpm’de 20 dk çevrilmiş ve üzerindeki süpernatant temiz bir 15 ml’lik steril tüpe aktarılmıştır.
 - 7- Tüplere içindekinin yaklaşık iki katı olacak şekilde soğuk saf etanol konulmuş, hafifçe karıştırılarak içindeki DNA’nın belirginleşmesi sağlanmıştır.
 - 8- DNA’lar, önceden içine 200 µl TE buffer konulmuş olan 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün içine steril pipet ucuyla aktarılmıştır.

4.2.4. DNA’nın Bütünlüğünün, Saflığının ve Miktarının Belirlenmesi

Kullanılan Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Agaroz (Prona, 9012-36-6)

10XTBE buffer (tris-borik asit-EDTA) (AppliChem, A0972)

Yükleme boyası (6X) (Orange Loading dye) (New England Biolabs, B7022S)

Etidyum bromür (EtBr) (AppliChem, A115)

Distile su (Biochrom, L 0015)

10’luk steril pipet ucu (Axygene Scientific, CS4800)

1000’lik mezür (Borucam, L290125)

Mikrodalga fırın (MD 554, Arçelik)

Yatay elektroforez tankı (Apollo,75, 1214)

Güç Kaynağı (Labnet, Power Station 3000)

Jel görüntüleme cihazı (Syngene, Ingenius LHR)

Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000)

1XTBE Buffer Hazırlanması

1000'lik mezüre 100 ml 10XTBE konulmuş üzerine 900 ml distile su ilave edilerek 1XTBE hazırlanmıştır.

Agaroz Jelin Hazırlanması (%1'lik)

1 g agaroz tartılmış ve üzerine 100 ml 1XTBE buffer eklendikten sonra mikrodalga fırında 300 derecede 3 dk kaynatılmıştır. Kaynamış olan jel biraz soğutulduktan sonra üzerine 10 µl EtBr eklenerek iyice karıştırılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan jel traye kabarcık oluşturmayacak şekilde dökülmüştür. Polimerizasyon için yaklaşık olarak 15-20 dk beklendikten sonra jel yatay jel elektroforez tankına alınmış, üzerine jeli kapatacak kadar 1XTBE buffer ilave edilmiştir. DNA örneğinden 1 µl alınıp üzerine 3 µl yükleme boyası ilave edilmiş ve jeldeki kuyulara yüklenmiştir. Jel, 120 voltta 1 saat yürütüldükten sonra ultraviyole ışığı altında görüntülenerek değerlendirilmiştir.

DNA Miktarının ve Saflığının Tayini

DNA'nın saflığını ve miktarını ölçmek için spektrofotometre kullanılmıştır. Cihaz kullanılmaya başlamadan önce distile su ile temizlenmiş, sonra DNA'nın saklandığı TE buffer cihaza tanıtılmıştır. Ölçüm işlemi için 1 µl DNA örneği kullanılmıştır. Ölçüm sonucunda 260/280 değeri (1,70-1,90 aralığında olmalı) ve optik dansitesi belirlenmiş olan genomik DNA çalışmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Şekil 4.2'de çalışmada kullanılan DNA örnekleri gösterilmiştir. Çizelge 4.3'de spektrofotometre ölçüm sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.2. B: 1 Kb'lik belirteç, 2.-8. kuyular III-1, III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5, IV-9 numaralı bireylere ait DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.3. Çalışmaya dâhil edilen III-1, III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5 ve IV-9 numaralı bireylere ait DNA örneklerinin spektrofotometre ölçümleri

Örnek numarası	260/280	Optik dansite (OD) (ng/µl)
III-1	1,87	469,7
III-2	1,83	456,9
IV-1	1,85	387,8
IV-2	1,85	562,7
IV-4	1,87	654,6
IV-5	1,82	459,8
IV-9	1,88	588,8

4.2.5. Affymetrix 250K Mikrodizin Çalışması

Bu çalışma için 2 sağlıklı (III-2 ve IV-1) ve 3 hasta (IV-2, IV-4 ve IV-5) birey kullanılmıştır. Bu çalışma AY-KA Özel Sağlık Tesisleri Ltd.Şti. laboratuvarında (Ankara) yapılmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

GeneChip® Human Mapping 250K *NspI* Mikrodizin (Affymetrix, 900767)

Nsp I enzimi (New England Biolabs, R0602S)

NE buffer 2 (10X) (New England Biolabs, R0602S)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, A3675)

Distile su (Biochrom, L-0015)

Adaptor, NspI (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

T4 DNA ligaz (New England Biolabs, M0202S)

T4 Ligaz Buffer (New England Biolabs, M0202S)

Adaptor NspI (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

PCR Primer, 002 (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

Titanyum Taq PCR Kit (G-C Melt, dNTP, Clontech TITANIUM™vTaq DNA Polymerase ve Buffer (Clontech, 639210)

Agaroz (Prona, 9012-36-6)

MinElute 96 UF PCR Pürifikasyon Kit (Qiagen, 28051)

Fragmantasyon Reagent (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

10X Fragmentasyon Buffer (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

DNA Labeling Reagent (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

5X Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Buffer (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

DNA Labeling Reagent (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

MES Hidrat (Sigma-Aldrich, M8250)

MES Sodyum tuz (Sigma-Aldrich, M3885)

Denhardt Çözeltilisi (Sigma-Aldrich, D2532)

Etilendiamintetraasidik asit (EDTA) (Appllichem, A1104)

Herring Sperm DNA (10mg/ml) (Promega, D1811)

Oligo Control Reagent (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp Assay Kit, 900767)

Human Cot-1 (1mg/ml) (Sigma-Aldrich, 05480647001)

Tween 20 (%10) (Sigma-Aldrich, P1379)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, D9170)

5M Tetrametil Amonyum Klorid (TMACL) (Sigma-Aldrich, 86614)

Streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate 1 mg/ml (Thermo, S866)

Anti-streptavidin antibody (goat), biotnylated (Vector, BA-0500)

20X Saline–Sodium Phosphate–EDTA (SSPE) (Sigma-Aldrich, S2015)

Steril pipet uçları (1-10'luk, 10-100'lük, 100-1000'lik) (Axygene Scientific, CS4800)

Steril mikrosantrifüj tüpü (Axygene Scientific, MCT-060)

Mikropipet seti (Gilson, Pipetman Classic)

Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, B30134)
Vorteks (IKA, 0003340000)
Vorteks plate başlığı (IKA, 0004496200)
Termal döngü cihazı (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700).
Elektroforez (ThermoScientific, B1)
Nanofotometre (Implen, C40)
Vakum regülâtör (Qiagen, 19530)
Hibridizasyon fırını (GeneChip[®], 640)
Fluidics Station 450 (GeneChip[®])
Scanner 3000 7G (GeneChip[®])

250K Nsp I ile yapılan mikrodizin çalışması 10 temel basamaktan oluşmaktadır. Belirtilen tüm bu basamaklar, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. Genomik DNA'nın hazırlanması
2. Restriksiyon enzim kesimi
3. Ligasyon
4. PCR
5. PCR ürünlerinin pürifikasyonu
6. PCR ürünlerinin ölçümü
7. Fragmantasyon
8. İşaretleme
9. Hedef hibridizasyonu
10. Yıkama-Boyama-Tarama

Çalışmaya başlamadan önce her bir DNA örneği final konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde dilüe edilmiştir. Her bir örnekten 5 µl alınarak toplamda 250 ng başlangıç materyali ile çalışmaya başlanmıştır. Çalışma için kullanılacak DNA örnekleri tekrar agaroz jelde yürütülerek bütünlükleri kontrol edilmiştir. Çalışmanın ikinci basamağı olan restriksiyon enzim kesimi protokolü Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında yapılan restriksiyon enzim kesimi protokolü

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
Distile su	11,55
NE tampon 2 (10X)	2
BSA (100X; 10 mg/ml)	0,2
Nsp I (10 u/ µl)	1
DNA	5
Toplam	19,75

Çizelge 4.4’de belirtilmiş olan reaktifler her bir örnek için buz üstünde karıştırıldıktan sonra termal döngü cihazında önce 37 ° C’de 2 saat (enzim aktivasyonu), sonra 65 ° C’de 20 dakika (enzim inaktivasyonu) bekletilmiştir.

Üçüncü basamak olan ligasyon protokolü çizelge 4.5’da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında yapılan ligasyon protokolü

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
Adaptör Nsp I (50 µM)	0,75
T4 Ligaz tamponu (10X)	2,5
T4 DNA Ligaz (400 U/ µl)	2
Toplam	5,25

Çizelge 4.5’de belirtilmiş olan reaktifler buz üstünde karıştırıldıktan sonra restriksiyon kesimi tamamlanan örneklerin üzerine eklenmiş ve termal döngü cihazında 16 °C’de 3 saat, 70 °C’de 20 dakika ligasyon reaksiyonu için bekletilmiştir. Ligasyon reaksiyonu sonunda örneklerin üzerine 75 µl distile su ilave edilerek dilüe edilmiştir.

Dördüncü basamak olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için gerekli reaktifler ve miktarları çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında yapılan polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli reaktiflerin miktarları

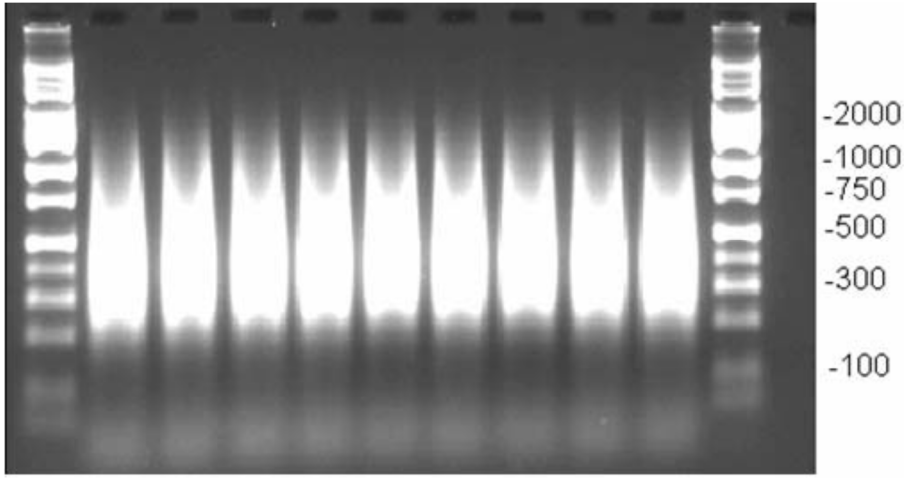
Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
AccuGENE® su	39,5
TITANIUM <i>Taq</i> PCR tamponu (10X)	10
GC-Melt (5M)	20
dNTP (her birinden 2,5 mM)	14
PCR primer 002 (100 µM)	4,5
TITANIUM <i>Taq</i> DNA Polimeraz (50X)	2
Toplam	90

Çizelge 4.6'da 1 reaksiyon için gerekli miktarlar verilmiştir. Tüm çalışma buz üstünde yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonundan sonra her bir örnek için 3 PCR reaksiyonu kurulmuş ve bunun için 3 yeni 0,2 µl'lik tüp hazırlanmıştır. Tüplerin içine dilüe edilmiş ligasyon ürününden 10 µl koyulmuştur. Üzerine hazırlanmış olan PCR karışımı (90 µl) eklenmiştir. Termal döngü cihazında aşağıda belirtilen programda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

94 °C 3 dakika
94 °C 30 saniye
60 °C 45 saniye
72 °C 15 saniye
68 °C 7 dakika
12 °C ∞

} 30 döngü

PCR işleminden sonra örnekler % 2'lik agaroz jelde uygun markerlar ile yürütülerek miktar ve boyutları kontrol edilmiştir. Ürünlerin 200-1100 bp aralığında olması beklenmektedir. Şekil 4.3'de hasta bireylere (IV-2, IV-4 ve IV-5) ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.3. Hasta bireylere ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. (B:Belirteç (100-5000 bç'lik), 1-3. kuyular IV-2 numaralı bireye ait, 4-6. kuyular IV-4 numaralı bireye ait, 7-9. kuyular ise IV-5 numaralı bireye ait)

Beşinci basamak olan pürifikasyon işlemi için pürifikasyon plateleri kullanılmıştır. Her bir örneğe ait 3 PCR ürünü tek bir kuyuya yüklenmiş ve kolondan geçirilerek pürifikasyon işlemi yapılmıştır. Saflaştırılan örneklerin 48 µl su ile elüsyonu yapılmış ve kuyucuklardan toplanmıştır.

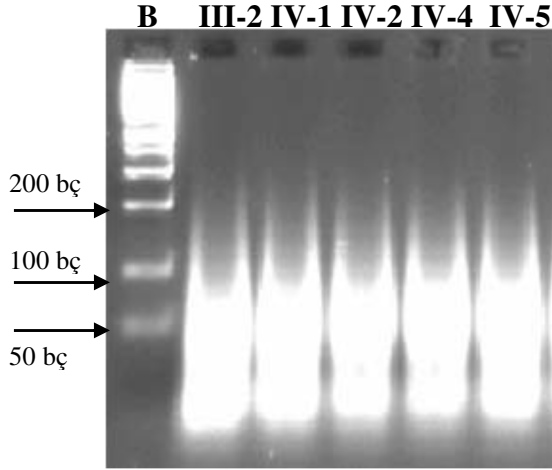
Altıncı basamak olan PCR ürünlerinin ölçümü için nanofotometre kullanılmıştır.

Yedinci basamak olan fragmantasyon için öncelikle kit içerisinde bulunan stok fragmantasyon solüsyonu bu basamakta kullanılmak üzere son konsantrasyonu 0.05 U/µl olacak şekilde dilüe edilmiştir. Fragmantasyon reaksiyonunda 45 µl örnek kullanılmıştır. Fragmantasyon için gerekli olan reaktifler ve miktarları çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında fragmantasyon işlemi için kullanılan reaktifler ve miktarları

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
Fragmantasyon tamponu	5
Fragmantasyon solüsyonu (0.05 U/µl)	5
DNA	45
Toplam	55

Tüm çalışma buz üstünde yapılmıştır. Reaksiyon termal döngü cihazında 37°C’de 35 dakika ve 95°C’de 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Fragmentasyon sonrası ürünler %4’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Şekil 4.4’de çalışılan 5 bireye (III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5) ait jel görüntüsü gösterilmiştir. Ürünlerin yaklaşık 180 bç’den daha küçük olması beklenmiştir. Bu aşamadan sonra hemen işaretlemeye geçilmiştir.



Şekil 4.4. Fragmentasyon basamağı sonrası III-2, IV-1, IV-2, IV-4 ve IV-5 numaralı örneklere ait agaroz jel görüntüsü

Sekizinci basamak olan işaretleme işlemi de buz üstünde gerçekleştirilmiştir. İşaretleme için gerekli olan reaktifler ve miktarları (1 örnek için) çizelge 4.8’de verilmiştir

Çizelge 4.8. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında işaretleme için kullanılan reaktifler ve miktarları

Kullanılan reaktifler	Miktar (μ l)
TdT tamponu (5X)	14
GeneChip [®] DNA Labeling reagent (30mM)	2
TdT enzimi (30 u/ μ l)	3,5
Fragmente olmuş ürün	50,5
Toplam	70

Örnekler işaretleme için termal döngü cihazında 37°C’de 4 saat ve inaktivasyon için 95°C’de 15 dakika bekletilmiştir.

Dokuzuncu basamak olan hibridizasyon için gerekli solüsyonlar ve tamponlar daha önceden hazırlanmıştır. Hibridizasyon için gerekli olan reaktifler ve miktarları çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında hibridizasyon için kullanılan reaktifler ve miktarları

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
MES (12X; 1,25 M)	12
Denhardt's solüsyonu (50X)	13
EDTA (0,5 M)	3
HS DNA (10 mg/ml)	3
OCR, 0100	2
Human Cot-1 DNA® (1mg/ml)	3
Tween 20 (%3)	1
DMSO (%100)	13
TMACL (5M)	140
İşaretlenmiş DNA	70
Toplam	260

Hazırlanan karışım 95°C'de 10 dk ve 49°C'de 1 dk bekletilmiştir. Uygun miktardaki örnek mikrodizin çipine yüklenene kadar örnekler 49°C'de bekletilmiştir. Bu işlem sırasında hibridizasyon fırını 49°C ve 60 rpm'e ayarlanmış ve yükleme yapılır yapılmaz örnekler hemen fırına koyulmuştur ve 16-18 saat arasında bekletilmiştir.

Son basamak olan yıkama, boyama ve tarama işlemi için gerekli solüsyonlar ve tamponlar önceden hazırlanmıştır. Yıkama solüsyonları Wash A ve Wash B, boyama solüsyonu Stain Buffer ve tarama solüsyonu Array Holding Buffer bileşenleri ve miktarları sırasıyla Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.10. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında yıkama basamağında kullanılan yıkama A bufferın reaktifleri ve miktarları

Wash A Buffer (1000 mL)	Miktar (mL)
20X SSPE	300
%10 Tween-20	1
Su	699

Çizelge 4.11. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında yıkama basamağında kullanılan yıkama B bufferın reaktifleri ve miktarları

Wash B Buffer (1000 mL)	Miktar (mL)
20X SSPE	30
%10 Tween-20	1
Su	969

Çizelge 4.12. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında boyama basamağında kullanılan stain bufferın reaktifleri ve miktarları

Stain Buffer (1X)	Miktar (µL)
Su	800.4
20X SSPE	360
%3 Tween 20	3.96
50X Denhardt's	24
Toplam	1188

Çizelge 4.13. Affymetrix 250K mikrodizin çalışmasında tarama basamağında kullanılan array holding bufferın reaktifleri ve miktarları

Array Holding Buffer (Stok)	Miktar (mL)
Su	73.1
MES Stock Buffer 12X	8.3
5M NaCl	18.5
%10 Tween 20	0.1
Toplam	100

Hazırlanan stain buffer her bir mikrodizin için iki adet 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 594 µl olacak şekilde bölünmüş, ilk tüpe 6 µl SAPE, ikinci tüpe ise 6 µl anti-SAPE eklenmiştir. Üçüncü mikrosantrifüj tüpüne ise hazırlanan array holding buffer stoğundan 820 µl eklenerek boyama işlemi için yıkama istasyonuna yerleştirilmiştir.

Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de belirtilen Wash A ve B yıkama solüsyonları şişelerine konularak istasyondaki yerlerine yerleştirilmiştir.

Bu aşamada örneklerle ilgili bilgiler ve mikrodizin barkodları sistem bilgisayarına girilmiştir. Hibridizasyon sonrası çipteki sıvı mikropipet ile geri çekilmiş ve yerine uygun miktarda yıkama tamponu eklenmiştir. Gerekli solüsyonlar, boyalar ve çip yıkama istasyonuna yerleştirilmiştir. Çalışma için uygun protokol seçildikten sonra cihaz çalıştırılmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tarama işlemi sonucu örneklerle ait görüntüler, kalite kontrol raporları ve genotip bilgilerini içeren dosyalar otomatik olarak bilgisayara kaydedilmiştir.

4.2.6. Ekzom Dizileme

Bu çalışma, sadece 1 hasta (IV-2) için uygulanmıştır. Hastanın stok DNA'sından 100 ng/µl bölünerek Elips Sağlık Ürünleri İthalat ve İhracat Limited Şirketi desteğiyle ekzom dizileme yapılmak üzere Beijing Genomics Institute'a (BGI) (Pekin, Çin) gönderilmiştir. Çalışma Illumina Hiseq 2000 platformunda gerçekleştirilmiştir. Çalışma prensibi, genel olarak aşağıdaki basamakları kapsamaktadır.

- 1- Öncelikle genomik DNA örneği sonikasyon işlemi ile randomize olarak 150-200 bç 'lik fragmanlara bölünmüş ve adaptörler bu fragmanların her iki ucuna da bağlanmıştır.
- 2- Daha sonra bu adaptörler 200 bç olacak şekilde bağlı parçalar halinde AgencourtAMPure SPRI boncukları ile saflaştırılmıştır.
- 3- Elde edilen DNA, ligasyon aracılı PCR (LM-PCR) yöntemi ile çoğaltılmış, saflaştırılmış ve SureSelectBiotinylated RNA kütüphanesine (BAITS) hibridize edilerek zenginleştirilmiştir.
- 4- Hibridize olan fragmanlar streptavidin boncuklarına bağlanırken hibridize olmayan fragmanlar ise 24 saat sonra yıkanarak atılmıştır.
- 5- Elde edilen LM-PCR ürünleri Agilent 2100 Bioanalyzer yardımıyla ölçülerek zenginleştirilme oranı belirlenmiştir.
- 6- Elde edilen her kütüphane Hiseq2000 platformuna yüklenerek ayrı ayrı yüksek çıktılı veri elde edilmiştir.
- 7- Ham veriler, Illumina base calling yazılımı 1,7 ile işlenmiştir ve diziler 90 bç'lik paired end okumalar halinde oluşturulmuştur.

4.2.6.1. Biyoinformatik Analizlerin Yapılması ve Değerlendirilmesi

Cihazdan elde edilen ham verilere biyoinformatik analiz yapılmıştır. Ham okumalar; 1-adaptör dizi, 2-yüksek miktarda bilinmeyen bazlar ve 3-düşük kalitede okumalar içermektedir. Veri analizi öncesi, bu okumaların ve adaptörlerin mutlaka ayıklanmaları gerekmektedir. Öncelikle, ham veriden, adaptör diziler ve düşük kalitede okumalar çıkarılmıştır. Adaptör okumalarının ve düşük kalitede okumaların ayıklanması için ham **FASTQ** verisinden yararlanılmıştır. Bilinmeyen bazların %10'un üzerinde olduğu okumaların da ayıklanmasıyla filtreleme işlemi bitmiş ve "temiz veri" oluşturulmuştur. Bu veri biyoinformatik analiz için kullanılmıştır.

Hizalama için **Burrows-Wheeler Aligner (BWA)** programı kullanılmıştır. **BWA** programı, kısa nükleotid dizilerinin doğru ve hızlı şekilde, düşük hata oranları ile hizalanmasında kullanılmaktadır. **BWA** sonuçları, **BAM** format dosyası halinde alınabilmektedir. **BAM** dosya formatı hizalama, okuma bilgisi ve PCR sonucu oluşan duplike okumaların işlenmesi için gereklidir. Bu işlemler sonucu, son **BAM** dosyaları elde edilen varyantlar için kullanılmaktadır. **BWA** ayrıca, hizalamaların **SAM (Sequence Alignment/Map)** formatında da sunulmasına yaramaktadır.

Tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) değerlendirmek için **SOAPSnp** kullanılmıştır. Bu program ile bir lokustaki genotip en yüksek olasılıkla belirlenmekte ve **CNS** formatı ile kayıt edilmektedir. Konsensus dizi ile belirlenen lokus ve referans arasındaki polimorfik lokus filtre edilmektedir. Veri seti metin dosyası formatında tab ile ayrılmış şekilde kayıt edilmektedir. SNP'ler belirlendikten sonra **ANNOVAR** ile anotasyon yapılmış ve sınıflandırılmıştır.

Küçük insersiyon ya da delesyonlar (InDels) **Samtools/GATK** programı ile hizalanmıştır. İnsersiyonlar ve delesyonlar belirlendikten sonra **ANNOVAR** ile anotasyon yapılmış ve sınıflandırılmıştır. Tek nükleotid Varyantlar (SNVs) **Varscan** ile, somatik insersiyon ya da delesyonlar **GATK** ile ve kopya sayısı değişiklikleri (CNV) ise **ExomeCNV/Varscan** ile yapılmıştır.

Daha güvenilir varyant sonuçları almak için bazı filtreler kullanılmıştır. **ANNOVAR** ile güvenilir varyant sonuçları değerlendirilmiştir.

Referans genom için "human genome build37 (hg19)" kullanılmıştır. h19 için tüm genom boyutu 3,137,161,264 iken, etkin olan boyutu 2,861,327,131 olarak belirlenmiştir.

4.2.6.2. *LRP5* (Low density lipoprotein receptor-related protein 5) Geninin İlgili Ekzon-İntron Dizisine Erişilmesi

Ekzom dizileme ve mikrodizin sonucu aday gen olarak belirlenen *LRP5* geninin 12. ekzon-intron splice site bölgesinde tespit edilen mutasyon için genin dizilenmesi amacıyla <http://www.ncbi.nlm.nih/> ve <http://www.ensembl.org/> adreslerinden yararlanılmıştır. Genin dizisi ve tüm transkriptleri her iki siteden de kontrol edilmiş, çalışma için <http://www.ncbi.nlm.nih/> adresi referans olarak kabul edilmiştir. Genin 12. ekzon ve intron dizisi aşağıda verilmiştir.

LRP5 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5) [Homo sapiens (human)]
NC_000011.9 (68080077..68216743)

Gene ID: 4041, son güncellenme tarihi 27.Eylül.2015

4.2.6.3. Mutasyonun Gen Dizisi Üzerinde Gösterimi

LRP5 geninde bulunan mutasyonun gen dizisi üzerindeki yeri Şekil 4.5'de (NM_002335:exon12:c.2827+1G>A) gösterilmiştir.

```
GTCAGGAGCGGGTCGTGATTGCCGACGATCTCCCGCACCCGTTCCGGTCTGACGCAGTACAGCGA
TTATATCTACTGGACAGACTGGAATCTGCACAGCATTGAGCGGGCCGACAAGACTAGCGGCCG
GAACCGCACCCCTCATCCAGGGCCACCTGGACTTCGTGATGGACATCTGGTGTTCCTCCTCC
CGCCAGGATGGCCTCAATGACTGTATGCACAACAACGGGCAGTGTGGGCAGCTGTGCCTTGCCA
TCCCCGGCGGCCACCGCTGCGGCTGCGCCTCACACTACACCCTGGACCCAGCAGCCGCAACTG
CAGCCGTAAGTGCCTCATGGTCCCCCGCACCTCACTCCCTCGTTAGATCAGGCTGGTTCTGGGA
GCTGACGCTGAAAGGAGCTTCTCATCTGGGGTTCCTGGGTGTACATAGATGGTTGGGTAGGTTG
TGCACTGCACAAGCTGCATGATGCTACCTGGGGGTCCAGGTCCAGGCTGGATGGACTTGTTGCT
TCATCAGGACATAGATAAATGGCCAAAACCTCCTCAGCTGGAAGGTCCTGGGCAGGATCTTTGGG
TGTGAAAACAGTCACAGACTAAAAATACAAAAAATGAGCCAGGCGTGGTGACGGGCGCCTGT
AGTCCCA
```

Şekil 4.5. *LRP5* geninin 12. ekzon ve 12. intron dizisi (Kırmızı boyalı olan dizi ekzon 12'yi, mor olan splice site mutasyonunun olduğu bazı, mavi ise intron 12'yi göstermektedir.)

4.2.6.5. Primerlerin Gen Dizisi Üzerinde Gösterimi

LRP5 geni 12. ekzon ve 12. intron dizisini çoğaltmak için kullanılan primerlerin gen dizisi üzerindeki yeri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

```
GTCAGGAGCGGGTCGTGATTGCCGACGATCTCCCGCACCCGTTCCGGTCTGACGCAGTACAGCGA
TTATATCTACTGGACAGACTGGAATCTGCACAGCATTGAGCGGGCCGACAAGACTAGCGGCCG
GAACCGCACCCCTCATCCAGGGCCACCTGGACTTCGTGATGGACATCCTGGTGTTCCACTCCTCC
CGCCAGGATGGCCTCAATGACTGTATGCACAACAACGGGCAGTGTGGGCAGCTGTGCCTTGCCA
TCCCGGGCGGCCACCGCTGCGGCTGCGCCTCACACTACACCCTGGACCCAGCAGCCGCAACTG
CAGCCGTAAGTGCCTCATGGTCCCCCGCACCTACTCCCTCGTTAGATCAGGCTGGTTCTGGGA
GCTGACGCTGAAAGGAGCTTCTCATCTGGGGTTCCTGGGTGTACATAGATGGTTGGGTAGGTTG
TGCACTGCACAAGCTGCATGATGCTACCTGGGGGTCCAGGTCCAGGCTGGATGGACTTGTTGCT
TCATCAGGACATAGATAAATGGCCAAAACCTCCTCAGCTGGAAGGTCCTGGGCAGGATCTTTGGG
TGTGAAAACCAGTCACAGACTAAAAATACAAAAAATGAGCCAGGCGTGGTGACGGGCGCCTGT
AGTCCCA
```

Şekil 4.7. *LRP5* geni 12. ekzon ve 12. intron dizisini çoğaltmak için kullanılan primerlerin dizi üzerindeki yerleri (Yeşil renkle gösterilen dizi forward (ileri primer) primeri, siyah renkle gösterilen dizi ise reverse (geri primeri) primeri göstermektedir.)

Forward: GACATCCTGGTGTTCCTCACTCCT

Reverse: AGTGCACAACCTACCCAACCA

PCR ürün uzunluğu, 286 bp olarak belirlenmiştir.

4.2.6.6. Tasarlanan Primerlerin BLAST Sonuçları

Seçilen primer dizisinin özgüllüğü BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak kontrol edilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>).

4.2.6.7. *LRP5* Geni 12.ekzon ve 12.intron dizisi için PCR Reaksiyon Koşulları

Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Steril distile su (Qiagen 201207)

10XBuffer (Qiagen 201207)

MgCl₂ (25 mM) (Qiagen 201207)

dNTP (10mM) (Qiagen 201207)

Primer çifti (10 pmol) (Alpha DNA)

Taq DNA polimeraz (5u/μl) (HotStartTaq, Qiagen 201207)

50 bp DNA Ladder (Promega, G4521)

Mikrofüj (Boeco, FVL-2400N)

Otomatik pipet seti (Gilson, Pipetman Classic)

0,2 ml'lik PCR tüpleri (Axygen Scientific, 10011-816)

Vorteks (Combi-Spin Boeco, FVL-2400)

Termal döngü cihazı (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700)

PCR Optimizasyonu

Hasta DNA'ları ile çalışmaya başlamadan önce, daha önceden çalıştığı bilinen bir kontrol DNA'sı ile primerlerin doğru bağlanma sıcaklığı optimize edilmiş ve kullanılan kimyasal reaktiflerin çalıştığı belirlenmiştir. Bu basamaktan sonra çalışmaya dâhil edilen 7 DNA örneği, 1 sağlıklı kontrol ve 1 negatif kontrol ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.14'de PCR'da kullanılan reaktifler ve termal döngü cihazı koşulları verilmiştir.

Çizelge 4.14. *LRP5* geni için PCR optimizasyonunda kullanılan reaktifler ve termal döngü cihazı koşulları

Kullanılan reaktifler	Miktar (μl)
Steril distile su	17,7
10Xbuffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP miks (her biri için 10 Mm)	0,5
Forward primer (10 pmol)	0,5
Reverse primer (10 pmol)	0,5
<i>Taq DNA polimeraz</i> (5u/μl) (HotStartTaq)	0,3
DNA (100 ng/μl)	1
Toplam hacim	25

96 °C 10 dakika
96 °C 30 saniye }
62 °C 30 saniye } 35 döngü
72 °C 30 saniye }
72 °C 5 dakika
12 °C ∞

Amplifikasyon Sonrası Çoğaltılmış Ürünlerin Kontrolü

PCR reaksiyonunun sonucunda elde edilmesi beklenen 286 bç'lik ürünlerin kontrolü, %2'lik agaroz jel dökülerek yapılmıştır.

Agaroz Jelin Hazırlanışı (%2'lik)

Agaroz jel için, 2 g agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1XTBE buffer (hazırlanışı daha önce belirtilmiştir (Bkz. sayfa 36) eklenerek mikrodalga fırında 300 derecede 3 dk tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Jel biraz soğutulduktan sonra üzerine 10 µl EtBr eklenerek iyice karıştırılmış ve daha önceden hazırlanmış olan jel traye kabarcık oluşturmayacak şekilde dökülmüştür. Polimerizasyon için yaklaşık olarak 15-20 dk beklendikten sonra jel yatay jel elektroforez tankına alınmış, üzerine jeli kapatacak kadar 1XTBE buffer ilave edilmiştir. PCR sonucu oluşan ürünlerden 5 µl alınıp, 3 µl yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jeli yüklenmiştir. Birinci kuyuya moleküler 50 bç'lik ağırlık belirteci de yüklenmiştir. Jel, 120 voltta 30 dk yürütüldükten sonra ultraviyole altında görüntülenerek değerlendirilmiştir (Şekil 5.23).

4.2.7. DNA Dizi Analizi

Çalışmaya dâhil edilen 7 bireyin (III-1, III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5, IV-9) ve 1 sağlıklı kontrolün DNA dizi analizi, 51.sayfada belirtilen primerlerle yapılmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler ve Cihazlar

ExoSAP (USB, 78250)

BigDye® Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems, 4337455)

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, 4337455)
Forward primer (10 pmol) (Alpha DNA)
Reverse primer (10 pmol) (Alpha DNA)
Sephadex,12 gram (Sigma, G2580)
310 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 6 (POP-6TM) (Applied Biosystems, 4393712)
Otomatik pipetler (Gilson, Pipetman Classic)
0,2 µl'lik mikrosantrifüj tüpü (Axygen Scientific, 10011-816)
Spin Purification column (GML, 28104)
310 Genetic Analyzer Capilleries 47cm*50µm (Applied Biosystems, 402839)
10 µl'lik steril pipet ucu (Axygene Scientific, CS4800)
1000 µl'lik steril pipet ucu (Axygene Scientific, CS5000)
Sekans tüpleri (GML)
Santrifüj (Hettich Micro 22R)
Vorteks (Combi-Spin Boeco, FVL-2400)
Termal döngü cihazı (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700)
DNA Dizi Analizi Cihazı (Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer)

4.2.7.1. DNA Dizi Analizi Basamakları

PCR Ürününün Temizlenmesi

PCR ürünlerinden dNTP artıklarını ve primer dimerlerini uzaklaştırmak için ExoSAP ile pürifikasyon yapılmıştır. Pürifikasyon için, 2 µl ExoSAP ve 5 µl PCR ürünü yeni bir 0,2 lik mikrosantrifüj tüpünde vortekslenerek karıştırılmıştır. Reaksiyon 37°C 30 dk (enzim aktivasyonu), 80°C 15 dk (enzim inaktivasyonu) ve 4°C ∞'lik programda gerçekleştirilmiştir.

DNA Dizi Analizi Reaksiyonunun Hazırlanması

ExoSap yapılan örnekler bu basamakta kalıp olarak kullanılmıştır. Burada amaç dizileme reaksiyonu için gerekli olan ddNTP'leri eklemek ve okuma reaksiyonunu gerçekleştirmektir. Çizelge 4.15'de DNA dizi analizinde kullanılan reaktifler ve termal döngü cihazı koşulları verilmiştir.

Çizelge 4.15. DNA dizi analizinde kullanılan reaktifler ve termal döngü cihazı koşulları

Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
Steril distile su	2
5Xbuffer	2
BigDye	2
Forward veya reverse primer	2
ExoSap	2
Toplam	10

96 °C 1 dakika

96 °C 10 saniye

50 °C 5 saniye

60 °C 4 dakika

12 °C ∞

} 25 döngü

Sephadex Pürifikasyonu

Dizileme için yapılan PCR sonrası fazla ddNTP'lerin uzaklaştırılması için sephadex pürifikasyonu yapılmıştır.

Sephadex Solüsyonunun Hazırlanması

1 g sephadex 14 ml distile su ile çözülmüştür. Hazırlanan bu solüsyon yaklaşık olarak 20 dk vortekslenmiştir.

Hazırlanan sephadex solüsyonu her örnek için özel filtreli tüplere 700 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve 5200 rpm'de 2 dk çevrilmiştir. Toplama tüplerine biriken su dökülmüş ve yeniden filtreli tüplere takılmıştır. Filtreli tüplerde çevirme sonrası bir kolon oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kolona değmeyecek şekilde, dizileme için yapılan PCR'dan elde edilen 10 µl'lik ürün otomatik pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde kolon üzerine transfer edilmiş ve tekrar 5200 rpm'de 2 dk çevrilmiştir. Çevirme sonrası toplama tüpünde kalan örnek, DNA dizi analizi cihazına yüklenmek üzere yükleme tüplerine konulmuştur. Örnekler yükleme için hazır hale getirilmiştir.

Cihaza Yükleme ve Değerlendirme

Cihaza yükleme yapılmadan önce cihazın genel temizliği ve hazırlığı yapılmıştır. Cihazın uygun okuma yapabilmesi için, ayarları Applied Biosystem Genetic Analyzer with Data Collection Software v2.0'a göre yapılmıştır. Elde edilen veriler SeqScape programında analiz edilmiştir.

4.2.8. Kesilen Parçanın Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

Çalışma sonucu bulunan mutasyon için, toplum taraması yapılmak üzere RFLP yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

BceAI (250 units, 2000 units/ml) enzimi (NEB, R0623L)

NEB 3.1 Buffer (10X) (NEB, R0623L)

Distile su (Biochrom, L 0015)

0,2'lik mikrosantrifüj tüpü (Axygene Scientific, PCR-02-C)

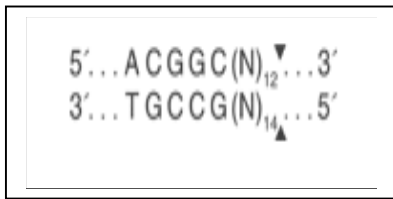
10'luk ve 100'lük pipet ucu (Axygene Scientific, CS4800)

Otomatik pipet (Gilson, Pipetman Classic)

Etüv (Sanyo Incubator, MIR 162)

Pastör fırını (Memmert, UN55)

Çalışma kapsamında 100 sağlıklı kadın, 100 sağlıklı erkek kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan enzim <https://www.neb.com/> sitesinden seçilmiştir. Şekil 4.10'da enzimin kesim noktası ve Çizelge 4.16'da enzimin çalışma protokolü verilmiştir.



Şekil 4.8. Çalışmada kullanılan BceAI enziminin kesim noktası

Çizelge 4.16. Çalışmada kullanılan BceAI enziminin çalışma protokolü

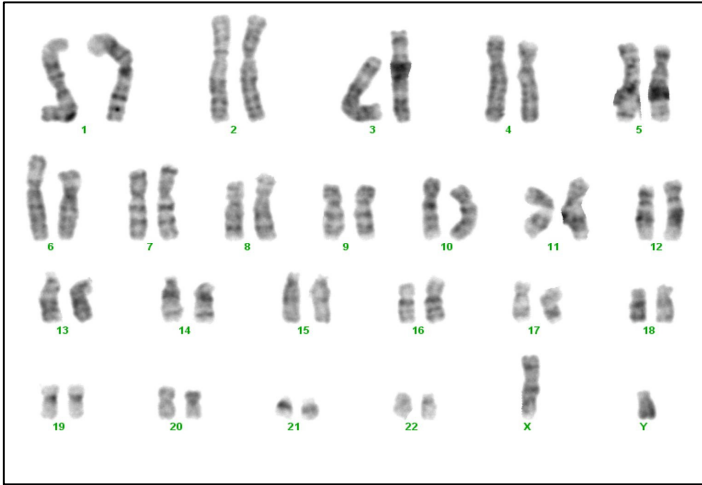
Kullanılan reaktifler	Miktar (µl)
BceAI (250 units, 2000 units/ml)	2,5
NEB 3.1 Buffer	2,5
PCR ürünü	15
Toplam	20

Enzim 37°C’de 1 saatte kesim işlemini gerçekleştirmektedir. Örnekler bu işlem için 37°C’lik etüve konulmuştur. Örnekler enzim inaktivasyonu için 65°C’de 20 dk bekletilmiştir. Değerlendirme yabancı tip örnekler için 146 ve 140 bç, mutant örnekler için 286 bç ve heterozigot örnekler için de 286, 146 ve 140 bç olacak şekilde yapılmıştır. Bu işlem için pastör fırını kullanılmıştır. Sonuçlar %2,5’luk jelde kontrol edilmiştir. Şekil 5.27’de mutant, heterozigot ve yabancı örnekler için ait agaroz jel görüntüsü verilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. GTG-Bantlama Yöntemi ile Kromozom Analizi Sonuçları

Çalışmaya dâhil edilen 5 bireyden (III-2, IV-1, IV-2, IV-5, IV-9) heparinli tüplere 5'er ml kan alınmış ve GTG-bantlama yöntemi ile kromozom analizi yapılmıştır. Sitogenetik analiz yapılan bireylerde sayısal ya da yapısal herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 5.1).



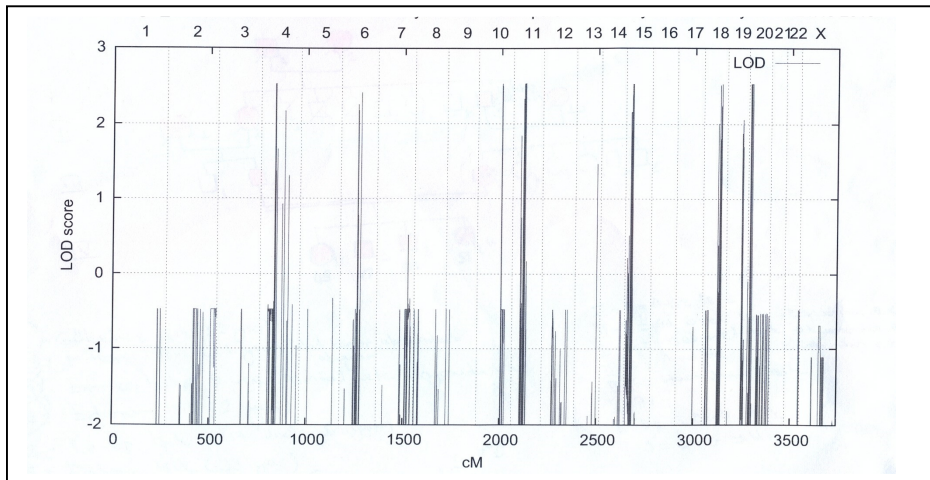
Şekil 5.1. Hasta bireye ait (IV-2) karyotip görüntüsü.

5.2. Agaroz Jel Elektroforezde DNA'ların Görüntülenmesi

Çalışmaya dâhil edilen 7 bireyin, 5 tanesinin DNA örneği 1998 yılında yüksek konsantrasyonlu tuzla çöktürme yöntemi ile elde edilmiş ve çalışmaya kadar -80°C'de (Hacettepe Üniversitesi bünyesinde kurulmuş olan TÜBİTAK DNA ve Doku Bankası) saklanmıştır. Diğer iki bireyden (III-1 ve IV-9) çalışmaya başlamadan önce kan alınmış ve yüksek konsantrasyonlu tuzla çöktürme yöntemi ile DNA'ları elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri çalışmaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen yeni DNA'lar ve daha önceden elde edilmiş olan DNA'lar agaroz jel elektroforezde yürütülmüş ve spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

5.3. Affymetrix 250K Mikrodizin Çalışması Sonuçları

Mikrodizin çalışması için 2 sağlıklı (III-2 ve IV-1) ve 3 hasta (IV-2, IV-4 ve IV-5) birey kullanılmıştır. Elde edilen veriler ile yapılan Merlin parametrik analiz sonuçlarına göre en yüksek LOD skor gösteren kromozomlar 4, 6, 10, 11, 15, 18 ve 20 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.2). Daha sonra aynı verilerin, .CHP uzantılı olan dosyaları, Prof. Dr. A. Nurten Akarsu ile birlikte VIGENOS programı ile analiz edilmiştir (Çizelge 5.1). Yüksek LOD skor gösteren kromozomlarda yer alan genlerin UCSC veritabanına (GRCh37/hg19) göre genomik lokalizasyonları belirlenmiştir. Detaylı analize başlamadan önce, SNP'ler yardımıyla elde edilen genotip verileri kullanılarak ilk önce gözle analiz yapılmıştır. Burada, etkilenmiş bireylerde aynı homozigot blokların ve etkilenmemiş bireylerde ise heterozigot veya hastalığa neden olmayan diğer allelin homozigot olarak yer alması prensibine dayanılarak analiz yapılmıştır. VIGENOS programından elde edilen sonuçlar, Merlin parametrik analiz sonuçlarıyla büyük oranda benzerlik göstermesine rağmen bazı kromozomlar açısından (6.,10 ve 18. kromozoma ait veriler VIGENOS programında saptanmazken, MERLİN programında saptanmayan 19. kromozoma ait veriler ise VIGENOS programında tespit edilmiştir) farklılık göstermiştir. VIGENOS analizinin detaylı incelenmesi sonucu, aday genlerin yer alabileceği her kromozom için belli bir baz aralığı tespit edilmiş ve bu aralıkta yer alan tüm genler detaylı olarak taranmıştır. Bu çalışma sonucu bugüne kadar mikroftalmi ile ilişkilendirilmiş genlerin bir çoğu lokalize olduğu kromozomların LOD skor oranının düşük olması nedeniyle, diğer genler ise LOD skor oranı yüksek olan kromozomlarda yer almasına rağmen homozigot blokların bulunduğu aralıkta olmaması nedeniyle dışlanmıştır (Çizelge 5.2). Elde edilen bu veriler, yeni aday genlerin olabileceği fikrini aklımıza getirmiştir.



Şekil 5.2. Çalışılan bireylere (III-2, IV-1, IV-2, IV-4, IV-5) ait Merlin parametrik analiz sonuçlarına göre belirlenen LOD skor analizi görüntüsü

Çizelge 5.1. VIGENOS analizinden elde edilen homozigot blokların yer aldığı kromozomlara ait bilgiler

İlgili kromozom	VIGENOS verisi	SNP	Bulunduğu aralık (bç)	Bu aralıkta yer alan genlerden örnekler
4	SNP_A-1953687 SNP_A-4219901	rs7663355 rs35358661	58,015,591 65,424,472	<i>LPHN3</i>
11	SNP_A- 2249979 SNP_A-2241153	rs1011340 rs10896444	42,217,564 68,967,247	<i>KLC2, RIN1, PPP6R3, NUDT8, CHKA, LRP5</i>
15	SNP_A-1828188 SNP_A-2004100	rs4924200 rs4923807	35,054,002 39,193,242	<i>ACTC1, MEIS2, ATPBD4, SPRED1, RASGRP1</i>
19	SNP_A-1781030 SNP_A-2312359	rs16981832 rs15459891	48,735,450 51,279,882	<i>SPHK2, TMEM143, LMTK3, BAX, TRPM4, IRF3</i>
20	SNP_A-1946552 SNP_A-4204293	Rs1161237 Rs6077089	2,863,980 6,893,194	<i>ADAM33, CENPB, CRLS1, FERMT1</i>

Çizelge 5.2. Mikroftalmiye neden olduğu bilinen bazı genler ve bu genlerin lokalize olduğu kromozomlar

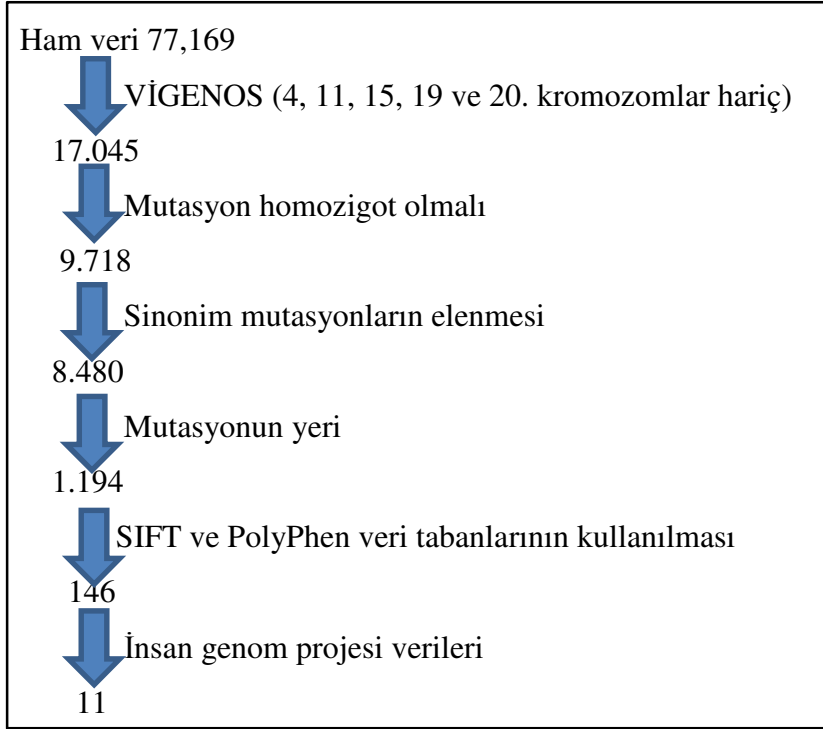
Mikroftalmiye neden olan bazı genler	Bulunduğu kromozom
GDF6	8q22.1
FOXE3	1p32
OTX2	14q22.3
SOX2	3q26.3-q27

5.4. Ekzom Dizileme Analizi Sonuçları

Ekzom dizileme için seçilmiş olan hasta bireyden (IV-2) elde edilen veriler önce bağımsız olarak değerlendirilmiş, 250K mikrodizin yönteminden elde edilen verilerle birlikte tekrar yorumlanmıştır. Her iki verinin de ortak sonucu olarak, *LRP5* geninin mikroftalmiye neden olan aday gen olabilceğine ve bu aday genin de dizilenerek doğrulanmasına karar verilmiştir. *LRP5* geninde bulunan c.2827+1G>A mutasyonun protein üzerindeki yerleşimi Şekil 5.3'de gösterilmiştir.

240 veriye indirilmiştir. Daha sonra Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) veritabanı kullanılarak >0,85 değerine göre veriler filtre edilerek 146 veriye kadar azaltılmıştır.

Son olarak 1000 Genom Projesi verilerine göre <0,01 değeri dikkate alınarak çalışmanın tüm verisi 11 gene kadar indirilmiştir (Şekil 5.4). Analiz sonucunda elde edilen 11 gene ait bilgiler Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4’de verilmiştir.



Şekil 5.4. Hastaya ait SNP verilerinin algoritmaya göre azaltılması.

Çizelge 5.3. Analiz sonucunda elde edilen 11 genin bulunduğu kromozom, PolyPhen2, dbSNP135 verileri (kr=kromozom;ref=referans genom; göz=gözlenen)

Gen adı	PolyPhen2	dbSNP135	Kr.	Başlama	Bitiş	Ref.	Göz.	GT:AD:DP:GQ:PL
<i>C19orf81</i>		rs117025012	19	51159502	51159502	G	C	1/1:1,63:64:99:2044,120,0
<i>ZNF471</i>	1	rs117330176	19	57036725	57036725	C	G	1/1:2,34:36:96.31:1285,96,0
<i>OR56A5</i>		rs7114672	11	5989415	5989415	C	A	1/1:0,52:101:99:1685,126,0
<i>B3GNT6</i>		rs34153015	11	76751587	76751587	G	A	1/1:0,33:35:62.87:520,63,0
<i>ZNF234</i>		rs11668974	19	44660791	44660791	G	A	1/1:0,70:70:99:2570,190,0
<i>FUT2</i>	0.954	rs602662	19	49206985	49206985	G	A	1/1:0,97:97:99:3418,262,0
<i>CCPG1</i>	0.903		15	55653126	55653126	A	G	1/1:0,21:21:57.15:721,57,0
<i>LRP5</i>			11	68181481	68181481	G	A	1/1:0,22:22:12.04:162,12,0
<i>NAT10</i>	0.914	rs143567201	11	34129833	34129833	C	T	1/1:0,45:45:99:1409,111,0
<i>HERC1</i>			15	64021518	64021518	G	A	1/1:0,52:52:99:1818,138,0
<i>CYP2F1</i>	0.998	rs146029724	19	41633841	41633841	A	C	1/1:0,7:7:15.03:166,15,0

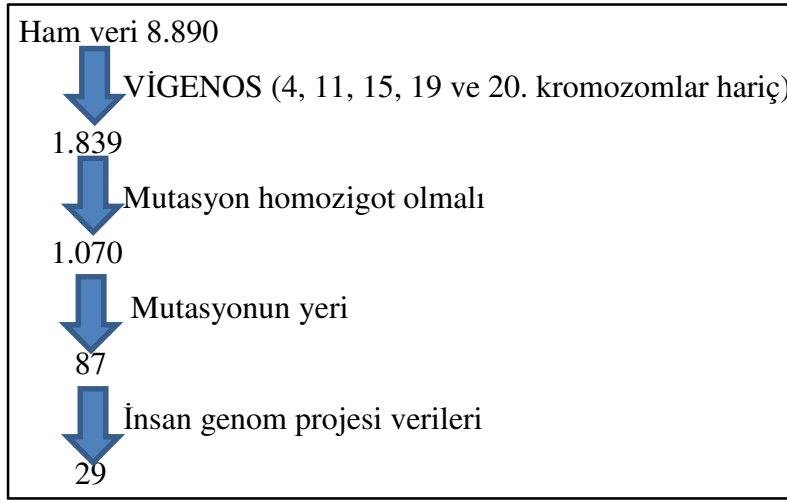
Çizelge 5.4. Analiz sonucunda elde edilen 11 gene ait aminoasit değişimleri ve 1000 genom projesi verileri (kr=kromozom)

Fonksiyon	Genin adı	Kr.	Fonksiyon	Aminoasit değişimi	1000 Genom
eksonik	<i>C19orf81</i>	19	sinonim olmayan SNV	NM_001195076:c.G160C:p.V54L	0.005
eksonik	<i>ZNF471</i>	19	sinonim olmayan SNV	NM_020813:c.C1289G:p.P430R	0.006
eksonik	<i>OR56A5</i>	11	sinonim olmayan SNV	NM_001146033:c.G310T:p.V104L	
eksonik	<i>B3GNT6</i>	11	sinonim olmayan SNV	NM_138706:c.G992A:p.G331D	
eksonik	<i>ZNF234</i>	19	sinonim olmayan SNV	NM_001144824:c.G622A:p.V208M	0.006
eksonik	<i>FUT2</i>	19	sinonim olmayan SNV	NM_000511:c.G772A:p.G258S	
eksonik	<i>CCPG1</i>	15	sinonim olmayan SNV	NM_001204450:c.T845C:p.L282P	
splicing	<i>LRP5</i>	11		NM_002335:exon12:c.2827+1G>A	
eksonik	<i>NAT10</i>	11	sinonim olmayan SNV	NM_024662:c.C61T:p.R21W	
eksonik	<i>HERC1</i>	15	sinonim olmayan SNV	NM_003922:c.C3071T:p.P1024L	
eksonik	<i>CYP2F1</i>	19	sinonim olmayan SNV	NM_000774:c.A1330C:p.M444L	

Elde edilen bu 11 gen mikroftalmi ve genel olarak da göz gelişimi açısından çeşitli veritabanları kullanılarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. Öncelikle tüm genler için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> veri tabanı kullanılarak fonksiyonları hakkında genel bir bilgi elde edilmiştir (Şekil 5.10). Bir sonraki aşamada, bu genlerin hangi biyolojik süreçte rol aldığı ve hangi genlerle etkileşim içinde olduğunu anlamak için <http://imp.princeton.edu/> veritabanı kullanılmıştır. Üçüncü aşamada, bulunan genlerin hangi yolakta rol aldığını anlamak için <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> veritabanı kullanılmıştır.

INDEL analizi için izlediğimiz yol haritasında, önce VIGENOS programı ile yapılan analiz sonucu belirlenmiş olan 4, 11, 15, 19 ve 20. kromozomlar filtre edilmiş ve veri sayısı 8.890'dan 1.839 veriye indirilmiştir.

Otozomal resesif kalıtım kalıbına sahip hastalıklarda etkilenmiş bireyin mutasyonu homozigot olarak taşınması gerektiği esassından yola çıkarak GT:AD:DP:GQ:PL verisi 1/1 olarak kabul edilmiş ve veriler 1.839'dan 1.070 veriye azaltılmıştır. Mutasyonun bulunduğu bölge dikkate alınarak (exonic, exonic+splicing veya splicing) veri sayısı 1.070'den 87'ye indirilmiş ve son olarak 1000 Genom Projesi verilerine göre <0,01 değeri dikkate alınarak çalışmanın tüm verisi 29 gene kadar indirilmiştir (Şekil 5.5). Analiz sonucunda elde edilen 29 gene ait bilgiler Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.5. Hastaya ait INDEL verilerinin algoritmaya göre azaltılması.

Çizelge 5.5. Analiz sonucunda elde edilen 29 genin bulunduğu kromozom, mutasyonun tipi ve aminoasit değişimi verileri (kr=kromozom)

Fonksiyon	Genin adı	Kr.	Mutasyon	Aminoasit değişimi
eksonik	<i>ZNF595</i>	4	frameshift insersiyon	NM_182524:c.600_601insA:p.Y200fs
eksonik	<i>HRC</i>	19	nonframeshift delesyon	NM_002152:c.782_784del:p.261_262del
eksonik	<i>OR7C2</i>	19	nonframeshift insersiyon	NM_012377:c.683_684insATC:p.V228delinsVS
eksonik	<i>DCHS2</i>	4	frameshift delesyon	NM_001142552:c.4095_4098del:p.1365_1366del
eksonik	<i>UNC93B1</i>	11	frameshift insersiyon	NM_030930:c.888_889insC:p.A296fs
eksonik	<i>NR1H2</i>	19	nonframeshift insersiyon	NM_007121:c.516_517insCAG:p.K172delinsKQ
splicing	<i>CREB3L1</i>	11		NM_052854:exon12:c.1524-1->G
eksonik	<i>ZNF595</i>	4	frameshift delesyon	NM_182524:c.637delA:p.N213fs
eksonik	<i>KRTAP5-2</i>	11	nonframeshift delesyon	NM_001004325:c.279_308del:p.93_103del
eksonik	<i>ZNF595</i>	4	frameshift insersiyon	NM_182524:c.621_622insC:p.K207fs
eksonik	<i>LTBP4</i>	19	frameshift insersiyon	NM_001042545:c.3032_3033insG:p.Q1011fs
splicing	<i>IGF1R</i>	15		
eksonik	<i>MESP2</i>	15	nonframeshift delesyon	NM_001039958:c.547_558del:p.183_186del
eksonik	<i>MMP12</i>	11	frameshift insersiyon	NM_002426:c.632_633insA:p.T211fs
eksonik	<i>RALY</i>	20	nonframeshift insersiyon	NM_007367:c.641_642insCAG:p.A214delinsAS
eksonik	<i>ZNF274</i>	19	frameshift insersiyon	NM_016324:c.215_216insG:p.E72fs
eksonik	<i>VPS11</i>	11	frameshift insersiyon	NM_021729:c.220_221insC:p.S74fs

eksonik	<i>ART5</i>	11	nonframeshift insersiyon	NM_053017:c.74_75insCCA:p.I25delinsTI
eksonik	<i>DMKN</i>	19	nonframeshift delesyon	NM_001126057:c.819_821del;p.273_274del
eksonik	<i>SPON1</i>	11	frameshift insersiyon	NM_006108:c.601_602insC:p.A201fs
eksonik	<i>ALDH3B1</i>	11	frameshift insersiyon	NM_001030010:c.1266_1267insC:p.R422fs
eksonik	<i>MAML3</i>	4	nonframeshift delesyon	NM_018717:c.2302_2304del;p.768_768del
eksonik	<i>DIXDC1</i>	11	frameshift insersiyon	NM_033425:c.179_180insC:p.S60fs
eksonik	<i>HRC</i>	19	nonframeshift insersiyon	NM_002152:c.606_607insGGA:p.E202delinsEE
eksonik	<i>NR2E3</i>	15	frameshift delesyon	NM_014249:c.948delC:p.D316fs
eksonik	<i>ZNF595</i>	4	frameshift delesyon	NM_182524:c.640delC:p.P214fs
eksonik	<i>ALDH3B1</i>	11	frameshift insersiyon	NM_001030010:c.791_792insC:p.G264fs
eksonik	<i>DSPP</i>	4	nonframeshift insersiyon	NM_014208:c.2643_2644insAGTAGTGAC:p.D881delinsDSSD
eksonik	<i>CORO1B</i>	11	frameshift delesyon	NM_020441:c.953delG:p.G318fs

Çizelge 5.6. Analiz sonucunda elde edilen 29 gene ait dbSNP135 verileri (ref=referans genom; göz=gözlenen)

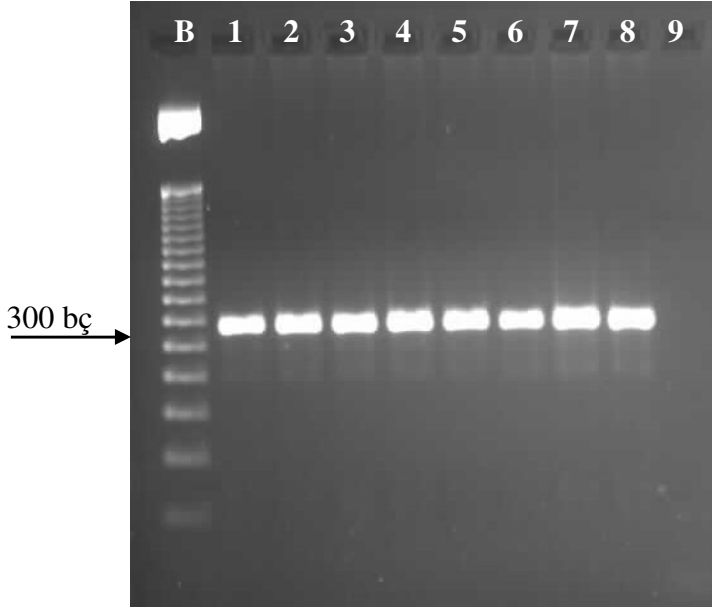
Genin adı	dbSNP135	Başlama	Bitiş	Ref.	Göz.
<i>ZNF595</i>		85995	85995	-	A
<i>HRC</i>	rs66501117	49657711	49657713	CAT	-
<i>OR7C2</i>		15052983	15052983	-	ATC
<i>DCHS2</i>	rs140019361	155244402	155244405	TTTG	-
<i>UNC93B1</i>	rs5792426	67765163	67765163	-	G
<i>NR1H2</i>	rs112359270	50881822	50881822	-	CAG
<i>CREB3L1</i>	rs79068197	46342259	46342259	-	G
<i>ZNF595</i>		86032	86032	A	-
<i>KRTAP5-2</i>		1619173	1619202	CCCCACAGGAGCCA CAGCCCCCCTTGGAG	-
<i>ZNF595</i>		86016	86016	-	C
<i>LTBP4</i>		41123093	41123093	-	G
<i>IGF1R</i>		99192755	99192763	TTTTTTTTT	-
<i>MESP2</i>		90320135	90320146	GGGCAGGGGCAG	-
<i>MMP12</i>	rs5794199	102738793	102738793	-	T
<i>RALY</i>	rs10649600	32664864	32664864	-	CAG
<i>ZNF274</i>	rs78144540	58718360	58718360	-	G
<i>VPS11</i>	rs5795166	118939939	118939939	-	C
<i>ART5</i>	rs3062849	3661585	3661585	-	TGG
<i>DMKN</i>	rs111543270	36002410	36002412	CTG	-
<i>SPON1</i>	rs5789820	14101493	14101493	-	C
<i>ALDH3B1</i>	rs11436139	67795378	67795378	-	C
<i>MAML3</i>	rs5862430	140651585	140651587	CTG	-

<i>DIXDC1</i>	rs139455912	111853106	111853106	-	C
<i>HRC</i>		49657889	49657889	-	TCC
<i>NR2E3</i>	rs11351249	72105929	72105929	C	-
<i>ZNF595</i>	rs57594632	86035	86035	C	-
<i>ALDH3B1</i>	rs78732492	67789293	67789293	-	C
<i>DSPP</i>		88536457	88536457	-	AGTAG TGAC
<i>CORO1B</i>		67207643	67207643	C	-

INDEL verilerinden elde edilen 29 gen mikroftalmi ve genel olarak da göz gelişimi açısından, SNP verilerinden elde edilen genlerin araştırıldığı aynı veritabanları kullanılarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. İnceleme sonucu herhangi bir INDEL mutasyonunun mikroftalmiye neden olmadığı bulunmuştur.

5.5. *LRP5* Geni 12.ekzon-12.intron Primerlerinin PCR Görüntüleri

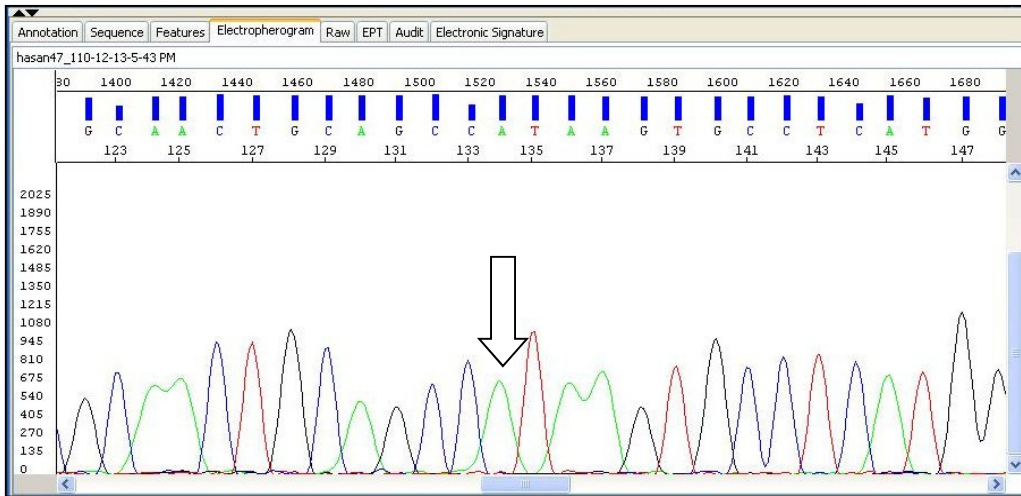
Mikrodizin ve tüm ekzom dizileme analizi sonucunda *LRP5* genindeki c.2827+1G>A splice site mutasyonun ailedeki mikroftalmiye neden olabileceğine karar verilmiş ve sadece ilgili bölgenin çoğaltılması için özgün primerler seçilmiştir. Seçilen primerlerle yapılan PCR sonrasında 286 bp'lik elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür (Şekil 5.4). Çalışmaya tüm sağlıklı (III-1, III-2, IV-1 ve IV-9) ve hasta bireylerin (IV-2, IV-4 ve IV-5) dışında, 1 tane de kontrol DNA'sı dâhil edilmiştir. Kontrol DNA'sı, ailesinde ve kendisinde mikroftalmi bulunmadığı bilinen sağlıklı kadın bireyden alınmıştır.



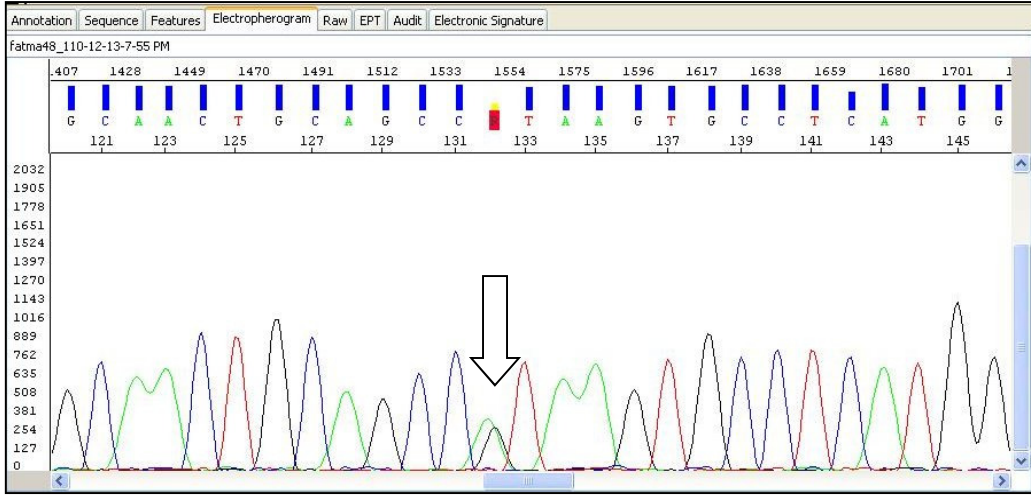
Şekil 5.6. Sağlıklı, hasta bireylere ve kontrol DNA'sına ait PCR sonrası çoğaltılmış ürünlerin agaroz jel görüntüsü. (İlk kuyu B (belirteç): 50 bç PCR görüntüsü, 2 ve 5. kuyular sağlıklı bireyler (III-1, III-2, IV-1 ve IV-9), 6 ve 8. kuyular hasta bireyler (IV-2, IV-4 ve IV-5), 9. kuyu kontrol DNA'sı, 10. kuyu negatif kontrol)

5.6. DNA Dizi Analizi Sonuçları

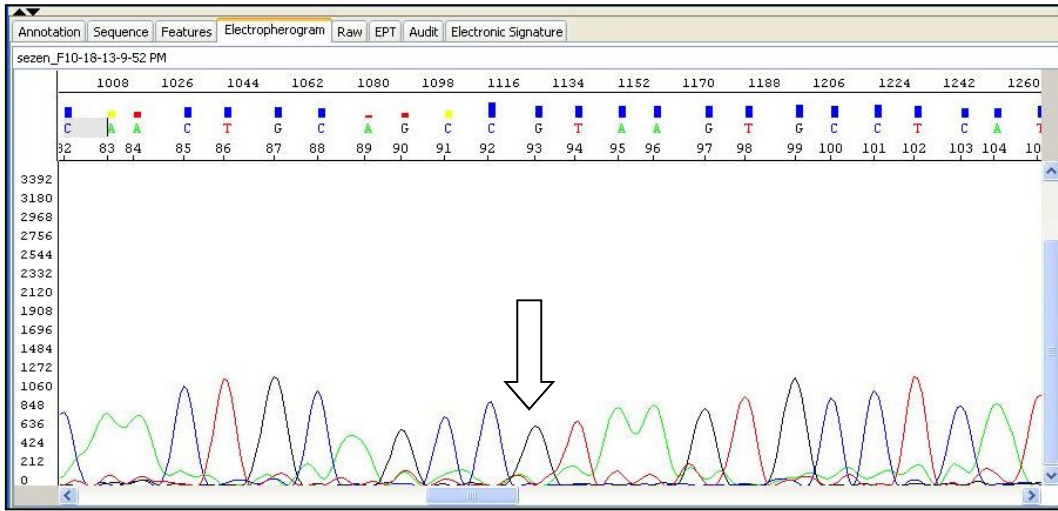
Çoğaltılan PCR ürünlerinden *LRP5* genindeki c.2827+1G>A splice-site mutasyonunun doğrulanması amacıyla çalışmaya dahil edilen tüm bireylere ve kontrol DNA'sına DNA dizi analizi yapılmıştır. Hasta bireylerde (IV-2, IV-4 ve IV-5) c.2827+1G>A splice-site mutasyonu homozigot olarak, hastaların sağlıklı anne, baba ve kardeşlerinde bu mutasyon heterozigot olarak bulunmuş, kontrol olarak kullanılan sağlıklı bireyde ise bu mutasyon bulunmamıştır (Şekil 5.5, Şekil 5.6 ve Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Hasta bireye (IV-2) ait homozigot mutant DNA dizi analizi görüntüsü



Şekil 5.8. Hastanın sağlıklı annesine (III-2) ait heterozigot taşıyıcı DNA dizi analizi görüntüsü

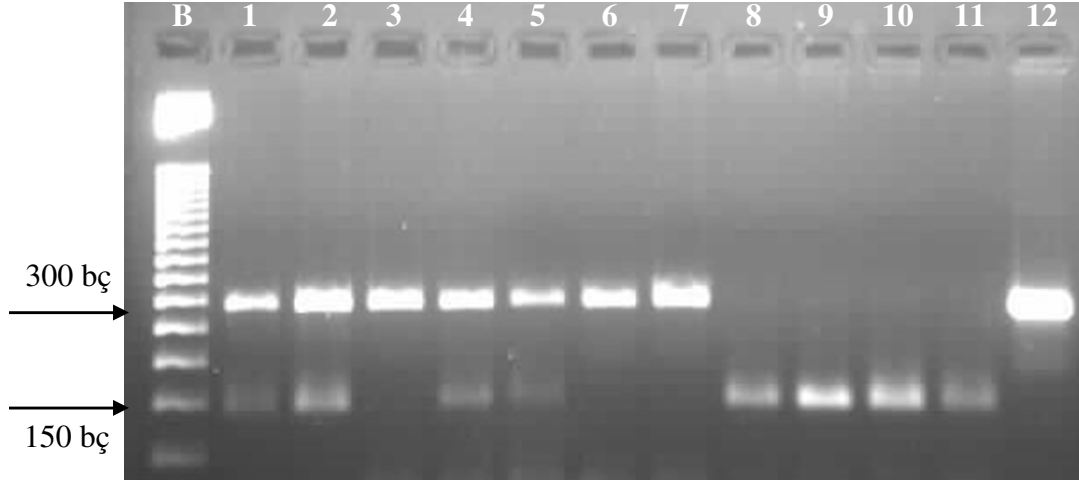


Şekil 5.9. Kontrol olarak kullanılan sağlıklı bireye ait yabancıl tip DNA dizi analizi görüntüsü

5.7. RFLP Sonuçları

LRP5 geninde bulunan c.2827+1G>A splice-site mutasyonu ilk kez bu tez çalışmasında bulunmuştur. Dolayısıyla bu mutasyonun patojenik bir mutasyon mu ya da polimorfizm mi olduğunu anlamak için 100 sağlıklı kadın ve 100 sağlıklı erkek kontrolde saptanmış olan mutasyonun taraması yapılmıştır. Bu mutasyon taraması BceAI restriksiyon enzimi kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile yapılmıştır. Tarama sırasında kadın kontrollerden birinde *LRP5* genindeki mutasyonu heterozigot taşıyıcı olarak bulunmuştur. Heterozigot mutasyon tespit edilen kadın kontrolün dosyasına bakıldığında evli olduğu ve eşiyle aralarında akrabalık bulunmadığı tespit edilmiştir. Buna rağmen eşi de çalışmaya dâhil edilmiş ve mutasyon saptanmamıştır. Çalışılan erkek kontrollerde ilgili mutasyon tespit

edilmemiştir. Şekil 5.8’de çalışmada kullanılan mikroftalmi ailesine ve kontrollerden bazılarına ait RFLP sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.10. RFLP yapılan mikroftalmi ailesi ve kontrollerden örnekler (B: 50 bç’lik belirteç; 1,2,4 ve 5. kuyular:heterozigot taşıyıcı; 3,6 ve 7. kuyular: homozigot mutant, 8-11. kuyular: yabancı tip; 12:uncut)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anoftalmi/mikroftalmi gözle ilgili doğum defektlerinin ve doğuştan körlüğün en sık nedenlerinden biridir. Yapısal bir göz bozukluğu olan mikroftalmi 7000 canlı doğumda 1 oranında görülmektedir (2). Anoftalmi/mikroftalminin etiyojisi, hastaların %50'sinden daha fazlasında bilinmemekle beraber, birden fazla gendeki farklı mutasyonlar bu fenotiplere yol açabilmektedir (106).

İnsanda; *SOX2*, *PAX2*, *PAX6*, *OTX2*, *STRA6*, *BCOR*, *HCSS*, *BMP4*, *BMP7*, *SMOC1*, *GDF3*, *GDF6*, *VXS2 (CHX10)*, *RAX*, *PITX3*, *CHD7*, *SHH*, *SIX6*, *ALDH1A3*, *RARB*, *FOXE3*, *ABCB6*, *ATOH7*, *C12orf57*, *TENM3 (ODZ3)*, *VAX1*, *SALL2* ve *YAP1* genlerinin gözün gelişimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (3, 106, 107, 108). Bu genlerin bir kısmı sendromik mikroftalmiye, bir kısmı mikroftalminin de eşlik ettiği bir sendroma sebep olurken bazıları ise izole mikroftalmiye neden olmaktadır. Bu genlerden *SOX2*, *OTX2*, *PAX6*, *STRA6*, *ALDH1A3*, *RARB*, *VXS2 (CHX10)*, *RAX* ve *FOXE3* genlerindeki mutasyonların (Çizelge 6.1) mikroftalmiye neden olduğu, *BMP4*, *BMP7*, *GDF3*, *GDF6*, *ABCB6*, *ATOH7*, *C12orf57*, *TENM3*, *VAX*, *SALL2* ve *YAP1* genlerindeki mutasyonların, mikroftalmiye neden olabileceği bildirilmiştir (107,109).

Çizelge 6.1. Mikroftalmiye neden olduğu bilinen genlerde bulunan mutasyonlar

Genin sembolü	Mutasyonun adı	Göz bulguları	Ek bulgular	Kaynak
<i>SOX2</i>	c.310G>T, c.549delC, c.557G>A, c.469C>A	Unilateral mikroftalmi	Beyin anomalileri, hafif hidrosefali, büyüme ve tiroid hormonu eksikliği, gelişme geriliği ve ataksik yürüme	110
		Anoftalmi, kolobom, glokom, katarakt	Hafif gelişme geriliği, küçük kulaklar, beslenme bozukluğu, ağır mikrognati	111
	c.70del120	Anoftalmi		112
	c.368A>G	Unilateral anoftalmi, unilateral mikroftalmi, mikrokornea	Gecikmiş motor gelişimi,	113
	c.479_480dupAC	Unilateral mikroftalmi, mikrokornea, sklerokornea	Ağır derecede konuşma ve motor gelişim bozukluğu	113
	c.277G>T	Unilateral mikroftalmi, mikrokornea, sklerokornea		113
	3q26.33 bölgesinde delesyon	Bilateral anoftalmi/ağır mikroftalmi	Mental retardasyon, gelişme ve büyüme geriliği	114

<i>PAX6</i>	11p13'de 877kb'lik duplikasyon	Mikroftalmi, konjenital katarakt, glokom, optik sinir hipoplazisi, retina dekolmanı		114
		Bilateral mikroftalmi, sklerokornea		109
<i>OTX2</i>	c.265C>T	Bilateral anoftalmi		112
	c.276_294del19	Unilateral mikroftalmi	Yürümede ve konuşmada gecikme, uyku bozukluğu	113
<i>CHX10</i>	c.679C>T	Mikroftalmi	İşitme kaybı, ağır öğrenme güçlüğü	115
	c.668G>C	Bilateral mikroftalmi		116
<i>BMP4</i>	c.751C>T	Bilateral mikroftalmi, unilateral katarakt		117
<i>FOXE3</i>	c.244A>G, c.705delC	Bilateral mikroftalmi, sklerokornea		111
	c.557delT	Bilateral mikroftalmi, afaki, sklerokornea ile birlikte anormal anterior segment, displastik iris		111
	c.720C>A	Bilateral asimetrik mikroftalmi (sol gözde daha ağır), afaki, glokom, korneal opasite	Otizm, gelişme geriliği	111
	c.292T>C	Sklerokornea, afaki, mikroftalmi, optik disk kolobomu		118,119
<i>ALDH1A3</i>	c.265C>T, c.1477G>C, c.475+1G>T	Bilateral mikroftalmi		120
	c.1105A>T, c.434C>T	Bilateral mikroftalmi		121
	c.568A>G, c.1165A>T	Unilateral ağır mikroftalmi, anoftalmi		122
	c.521G>A	Bilateral mikroftalmi	Ağır psikomotor gelişim geriliği	123
	c.666G>A	Mikroftalmi		124
<i>RARB</i>	c.1159C>T	Bilateral ağır mikroftalmi, unilateral kolobom	Yarı damak, sol diyafram hernisi	125
<i>STRA6</i>	c.1774C>A	Bilateral mikroftalmi	Böbrek anomalileri	126
	c.1120T>C, c.1343_1841+51delinsT	Bilateral mikroftalmi,	Kardiyak anomali, böbrek yetmezliği, konuşmada gecikme	127
	c.52delT, c.1684+1G>A	Bilateral mikroftalmi		125
	c.1223G>A	Bilateral mikroftalmi, kolobom, unilateral retinal ayrılma	Mental retardasyon	125

Bu tez çalışmasında, mikrodizin yöntemi kullanılarak bugüne kadar hem mikroftalmiye neden olduğu bilinen genler dışlanmış, hem de yeni aday gen yaklaşımı için aranılacak bölgeler daraltılmıştır. Bu yöntem ek olarak tek bir hastada yapılan ekzom dizileme yöntemi ile 77.169 SNP verisi ile birlikte 8890 INDEL verisi bulunmuştur. İki yöntemin sonucu elde edilen ortak veriler incelendiğinde, izole mikroftalmi tanısı ile izlenen ailede *LRP5* (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5, gen numarası 603506)

genindeki c.2827+1G>A splice-site mutasyonunun ağır mikroftalmiden sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

LRP5, 23 ekzonlu, 5128 bç'den oluşan ve 1615 aa'lık bir protein kodlayan, 11q13.2 bölgesine lokalize bir gendir. *LRP5*, reseptör aracılı endositoz işlemi sırasında ligandlara bağlanarak, bu ligandların hücre içine alınmalarını sağlayan düşük yoğunluklu bir transmembran lipoprotein reseptörünü kodlamaktadır (128). *LRP5* geni ayrıca *BMND1*, *EVR1*, *EVR4*, *HBM*, *LR3*, *LRP7*, *OPPG*, *OPS*, *OPTA1*, *VBCH2* geni olarak da isimlendirilmektedir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4041>).

LRP5, Wnt/ β katenin sinyal yolağında ko-reseptör olarak görev yapan hücre yüzey reseptörüdür (128). Wnt/ β katenin yolağı ilk kez 1982'de farelerde *int-1* proto-onkogeninin keşfi ile ortaya çıkmıştır (129). *Wnt* geni ilk kez farenin tümörlü meme dokusundan *int-1* adı ile klonlanmıştır. *Drosophila*'da bulunan *wingless* geninin farede bulunan *int-1* geni ile dizi ve fonksiyon açısından büyük benzerlik göstermesi üzerine 1991 yılında bu isimler birleştirilmiş ve literatüre *Wnt* geni olarak girmiştir. İnsanda bugüne kadar 19 adet *WNT* geni tanımlanmıştır (130,131).

Yapılan çalışmalar *LRP5* geninin göz gelişimi ve hastalıklarında önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (128). Göz ve kemik anomalileri ile giden bir grup hastalık *LRP5* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Çizelge 6.2). *LRP5*'in göz anomalileri ile ilişkili olduğu hastalık Familyal eksudatif vitreoretinopati (FEVR) olarak tanımlanmıştır. *LRP5* mutasyonları ayrıca 2 grup kemik anomalisi ile karakterizedir. İlk grupta, osteoporoz psödoglioma (OPPG) (MIM 259770) sendromu yer almaktadır. İkinci grupta ise, endosteal hiperostozis (MIM 144750), osteosklerozis (MIM 144750), osteopetrozis (MIM 607634), van Buchem tip 2 hastalığı (MIM 607636) ve yüksek kemik kütlesi (high bone-mass (HBM)) (MIM 601884) (Çizelge 6.2) yer almaktadır (132).

Çizelge 6.2. *LRP5* geni ile ilişkili olan hastalıklar

Fenotip	MIM numarası
Eksudatif vitreoretinopati 4	601813
Endosteal hiperostozis	144750
Otozomal dominant osteopetrozis 1	607634
Osteoporoz-pseudoglioma sendromu	259770
Osteoskleroz	144750
van Buchem hastalığı tip 2	607636
Kemik mineral yoğunluğu değişkenliği 1	601884
Osteoporoz	166710

FEVR, ilk kez 1969 yılında Criswick ve Schepens tarafından tanımlanmıştır (133). FEVR, periferik retinada vasküler olmayan alanlar, periferik retinal neovaskularizasyon, damarlarda kıvrım artışı ve dilatasyon, subretinal eksudasyon ve vitreoretinal fibrozis ile karakterize nadir görülen bir hastalıktır. FEVR'in yüksek penetrans ve değişken ifadelenme gösterdiği bildirilmekte ve aynı ailede bile bireyler arasında farklı klinik özellikler görülebilmektedir. Az etkilenmiş bireylerde görme ile ilgili herhangi bir semptom görülmemektedir. FEVR yavaş ilerlemekte ve retinal ayrılma genellikle yaşamın ilk on yılında görülmemektedir. FEVR'ye *LRP5* mutasyonlarının neden olduğu ise ilk kez 2004 yılında tanımlanmıştır (134, 135). Genetik heterojenite göstermekte olan FEVR için en sık otozomal dominant (OD-MIM 133780) kalıtım modelinden söz edilmekle birlikte, X'e bağlı (XR-MIM 305390) ve otozomal resesif (OR-MIM 601813) kalıtım modeli de bildirilmiştir (134, 135). Otozomal dominant ve otozomal resesif FEVR'ye *LRP5* genindeki mutasyonlar neden olurken, X'e bağlı FEVR'ye Norrie hastalığına da neden olan Xp11.3'de lokalize *NDP* genindeki mutasyonlar neden olmaktadır (132). Literatürde X'e bağlı FEVR'de nadir olarak mikroftalmi görüldüğü bildirilmiştir (www.omim.org). FEVR'nin tanımlanmış 6 alt tipi bulunmakta bunlardan *LRP5* mutasyonları (Çizelge 6.3) ile sadece tip 4 ilişkilendirilmektedir. *LRP5* genindeki mutasyonlarla ortaya EVR4 (Eksudatif vitreoretinopati 4-MIM 601813) sendromunun klinik bulgularına bakıldığında mikroftalmi yer almamakla beraber literatürde mikroftalminin eşlik ettiği 2 olgu bildirilmektedir (136,137). Bu olgulardan birinde moleküler herhangi bir çalışma yapılmamış ve EVR'nin hangi alt tipi olduğuna dair bir bilgi verilmemiştir (136). Diğerinde ise yine EVR'nin hangi alt tipi olduğu bildirilmemiş ve 5. kromozomda bir translokasyon tanımlanmıştır (137)Çizelge 6.4).

Çizelge 6.3. Eksudatif vitreoretinopatinin bildirilmiş alt tipleri.

Kromozomal Lokalizasyon	Fenotip	MIM numarası	Gen/lokus	Gen/lokus MIM numarası
7q31.31	Eksudatif vitreoretinopati 5	613310	<i>TSPAN12,NET2,EVR5</i>	613138
11p13-p12	Eksudatif vitreoretinopati 3	605750	<i>EVR3</i>	605750
11p11.2	Eksudatif vitreoretinopati 6	616468	<i>ZNF408,EVR6,RP72</i>	616454
11q13.2	Eksudatif vitreoretinopati 4	601813	<i>LRP5,BMND1,LRP7,LR3,OPPG,VBCH2,OPTA1,EVR4</i>	603506
11q14.2	Prematüre retinopatisi	133780	<i>FZD4,EVR1</i>	604579

11q14.2	Eksudatif vitreoretinopati 1	133780	<i>FZD4,EVR1</i>	604579
Xp11.3	Eksudatif vitreoretinopati 2, X linked	305390	<i>NDP,ND,EVR2</i>	300658

Çizelge 6.4. *LRP5* geninde EVR4' e neden olduğu bildirilmiş mutasyonlar

Mutasyonun adı	Göz bulguları	Kaynak
c.1757G>A, 2302C>G, c.4147G>A	Belirtilmemiş	134
c.4488+2T>G, c.4119-4120insC, c.3804delA	Belirtilmemiş	135
c.518T>C	Anomal retinal damarlanma, retinal katlanmalar	135
c.3502T>C	Retinal ayrılma, retinoşizis	135
c.4081T>G	Zayıf görme	135
c.433C>T	Bilateral retrorenal fibroplazi, retinal ayrılma	138
c.1330C>T	Sağ gözde ciddi falsiform retinal katlanma, sol gözde körlük	138
c.1564G>A	Sağ gözde retina yırtığı, sol gözde ciddi maküler ektopi	138
c.2392A>G	Periferik retinal dejenerasyon ve yırtıklar ile birlikte bilateral periferik avasküler retina yapısı	138
c.3361A>G	Bilateral retinal avaskularizasyon ile birlikte unilateral falsiform retinal katlanma	138
c.1828G>A, 803_812del	Bilateral maküla dejenerasyonu	138
c.1604C>T, c.1850T>G	Retinal ayrılma ile birlikte retinal katlanma	138
p.E441K, p.W993X, c.4489-1G>A, p.C1253F, p.G610R	Belirtilmemiş	132

LRP5 genindeki fonksiyon kaybı yapan mutasyonlarla ilişkilendirilmiş diğer bir hastalık ise, otozomal resesif kalıtıma sahip Osteoporoz-Psödoglioma sendromudur (osteoporosis-pseudoglioma syndrome-OPPG - OMIM 259770). OPPG sendromu, doğuştan veya erken başlangıçlı körlük, ağır ve erken başlangıçlı osteoporoz, iskelet yapısında kırılabilirlik ve bazen de öğrenme güçlüğü ile karakterizedir (Çizelge 6.5) (128). OPPG sendromunda doğuştan veya erken başlangıçlı göz bulguları, vitreoretinal dokunun dejenerasyonu, mikroftalmi, falsiform katlanmalar, retinal ayrılma ve fitizis bulbi gibi farklı problemleri içermektedir. Bunlara ek olarak ağır bilateral retinal displazi, korneal opasite, katarakt da görülmektedir (128,139, 140, 141,142). Sendromun en sık görülen kemik bulgusu, azalmış kemik mineral yoğunluğu sebebiyle kemiklerde deformiteler ve kırıklara yatkınlık olarak bilinmektedir (142). Ayrıca OPPG'li hastalarda, hipotoni, gelişme geriliği, kısa boy ve bazı olgularda mental retardasyon tanımlanmaktadır (128,139,140). Hastalığın fenotipik özellikleri kardeşler arasında bile çeşitlilik gösterebilmektedir (143). Heterozigot bireylerin, genellikle kemik kütlelerinde azalma görülürken görmeleri normal olarak değerlendirilmiştir (128).

Çizelge 6.5. Osteoporoz-Pseudoglioma Sendromu; OPPG [#259770]

Kategori	Alt Kategori	Özellikler
Kalıtım	-	<u>Otozomal resesif</u>
Büyüme	Boy	Kısa boy
Baş ve Boyun	Kafa Gözler	<u>Mikrosefali</u> Pseudoglioma Körlük (çocukluk çağı başlangıçlı) <u>Mikroftalmi</u> Vitreoretinal anomaliler Katarakt Fitizis bulbi Ön kamara yokluğu İris atrofisi
Kardiovasküler	Kalp	Ventriküler septal defekt
Göğüs	Dış özellikler	Fıçı göğüs
İskelet	- Kafatası Omurga Uzuvlar	Spontan kırık Osteoporoz (çocukluk çağı başlangıçlı) İntraoküler kalsifikasyon Kifoskolyoz Platispondili Eklemlerde hiperekstensibilite Dar diyafizler Geniş metafizler Uzun kemik deformiteleri
Nörolojik	Santral Sinir Sistemi	Çoğu vakada normal zeka <u>Orta derecede mental retardasyon</u> Hipotoni
Diğer	-	Çocukluk çağı başlangıçlı kemik kırıkları
Moleküler Temel	-	<i>LRP5</i> genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar

İnsanlarda kemik kütlesi büyüme esnasında artmakta ve yaşamın yaklaşık 3. dekadında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Sonrasında katabolizmanın artarak anabolizmanın yerini almasıyla kemik yoğunluğunda azalma ve osteoporoz görülmektedir. Kemik yoğunluğunda azalma osteoporozun en belirgin özelliklerinden biridir (139). Ayrıca erken çocukluk döneminde görülen osteoporoz, genellikle tekrarlayan uzun kemik kırıkları, vertebral kompresyon kırıkları ve azalmış kemik mineral yoğunluğu ile de ortaya çıkmaktadır (143). Doğuştan körlükle beraber osteoporoz ilk kez 1931 yılında tanımlanmıştır (144).

Literatüre bakıldığında *LRP5* genindeki mutasyonlarla (Çizelge 6.6) ilişkilendirilmiş OPPG sendromlu hastaların hemen hepsinde, göz bulgularına eşlik eden, özellikle erken çocukluk çağına birden fazla kırıkla ortaya çıkan ağır osteoporoza bağlı kemik bulguları görülmektedir (141-143,145-148). Literatürde OPPG sendromu olduğu bilinen yaklaşık 70 olgu bildirilmiştir (142,148).

Çizelge 6.6. OPPG sendromuna neden olduğu bilinen *LRP5* mutasyonları

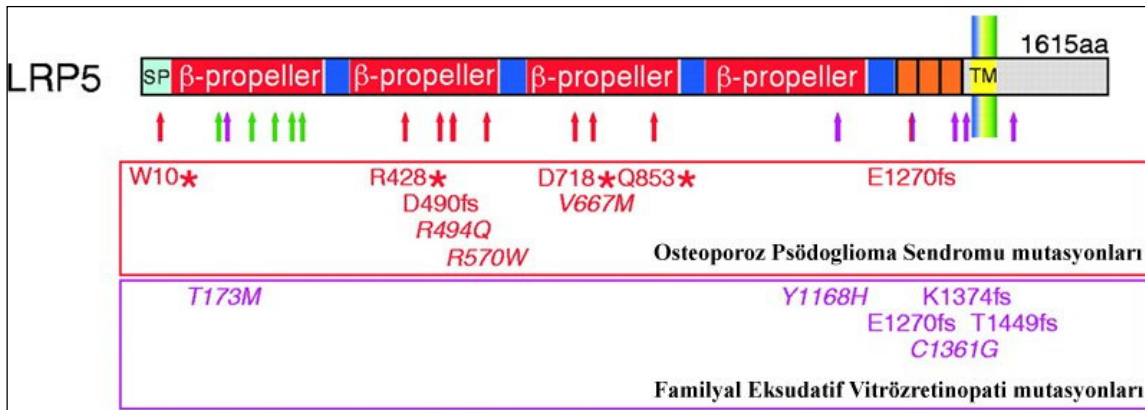
Mutasyonun adı	Göz bulguları	Kemik bulguları	Ek bulgular	Kaynak
p.N531I	Konjenital körlük	Düşük kemik kütlesi, hafif düşmelere bağlı kırıklar	—	145
c.43_60del ve g.ex14_16del	Konjenital körlük	Ağır kas hipotonisi	Büyüme geriliği, mikrosefali, hafif MR	146
p.L145F, p.Y244M, p.P382L, p.T552M, p.R1534X, c.1584+1G>A	Mikroftalmi, katarakt, retina dekolmanı, nistagmus, lökokori	Hafif düşmelere bağlı kırıklar, osteopeni, kas hipotonisi, platispondili, kısa yapı	Orta derecede MR	5
p.R334fsX51	Göz tembelliğine bağlı sol gözde körlük, mikroftalmi,	Dorsal kifoz, femur ve tibiada mediyale kavislenme, nanism	—	147
c.4112-2A>G, p.S356L, c.1015+1G>T, c.1584+4A>T,	Retrolental fibroplaziye bağlı konjenital körlük, mikroftalmi, bilateral katarakt, retinal kalsifikasyonlar	Ağır osteoporoz, çoklu kırıklar, skolyoz, dorsal kifoz, desteksiz yürüyememe, tekerlikli sandalyeye bağımlılık	—	143
p.R1002X, p.V336M, p.G507S	Mikroftalmi, korneal lökom, afaki, katarakt, strabismus	Kifoz, lomber lordoz, skolyoz, platispondili, spinal deformiteler, ince kemik yapısı, ağır osteoporoz	—	142
p.T297NfsX3, 2827+1G>A	Bilateral mikroftalmi, retina dekolmanı	Ağır osteopeni, kemik kırıkları, çoklu vertebral kırıklar	—	148

Çalışmamıza dâhil edilen ailenin hasta bireylerinin klinik özelliklerine bakıldığında ağır mikroftalmi dışında kemiklerin etkilendiğini düşündürecek herhangi bir bulgu bulunmamaktadır. Çalışmaya dahil edilen IV-2 ve IV-4 numaralı hastalarda, *LRP5* geninde mutasyon bulunması üzerine Dual-enerji x-ray absorpsiyometresi (DXA) yöntemi ile kemik mineral yoğunluğu ölçülmüş ancak IV-3 numaralı hastada mental retardasyon nedeni ile kooperasyon kurulamadığı için kemik mineral yoğunluğu ölçülemedi. IV-2 ve IV-4 numaralı hastaların L1-L4 vertebral kemik mineral yoğunluğu Z skoru sırasıyla -3.1 ve -4.7 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, hastaların kendi yaş grubuna göre kemik mineral yoğunluğu değerlerinde azalma olduğunu göstermektedir. Welinder ve ark. (2015) olgularımızda *LRP5* geninde homozigot olarak bulduğumuz c.2827+1G>A splice site mutasyonunu bizim çalışmamızla eş zamanlı bileşik heterozigot olarak bulmuştur. Bilateral mikroftalmi, retina dekolmanı, ağır osteopeni, kemik kırıkları ve çoklu vertebral kırıkları olan OPPG sendromlu 2 kız kardeşte, paternal orijinli c.899dupA (p.T297NfsX3) mutasyonu ve maternal orijinli c.2827+1G>A splice site mutasyonu bileşik heterozigot olarak bulunmuştur (148).

Ailenin çalışmaya dahil edilen hasta bireylerinde, OPPG sendromunun önemli klinik bulgularından olan kemik kırıkları ve çocukluk çağı osteoporoz şikayetleri olmadığı ve mikroftalmi ve lökom dışında da başka göz bulguları olmadığı için hastalar bugüne kadar izole mikroftalmi olarak değerlendirilmiştir. Buradan yola çıkarak ilk defa bizim çalışmamızda homozigot olarak bulunan c.2827+1G>A splice site mutasyonunun kemikten daha çok gözde bir anomaliye özellikle de mikroftalmiye neden olabileceğini düşündürmektedir. Yine Welinder ve ark.'nın 2015 yılında yayınlanan çalışmalarında bizimle eş zamanlı buldukları bileşik heterozigot mutasyonlardan maternal orijinli c.2827+1G>A splice site mutasyonunun bilateral mikroftalmi ve retina dekolmanına, paternal orijinli olan c.899dupA mutasyonunun ise ağır osteopeni, kemik kırıkları ve çoklu vertebral kırıklara, sebep olabileceği ihtimal dahilindedir.

LRP5, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (low-density lipoprotein receptor-LDLR) ailesinin bir üyesi olup 4 adet epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor-EGF) öncül spacer domainine sahiptir. Her bir domain 5 adet YWTD tekrarı ve 1 adet EGF tekrarını birlikte içerecek bir β propeller yapısı oluşturmakta ve bu yapı 3 adet LDLR ligand bağlayan domain motifi, tek bir transmembran domaini ve bir sitoplazmik kuyruk ile takip edilmektedir (Şekil 6.1) (134).

OPPG sendromuyla ilişkili bulunan *LRP5* mutasyonlarının proteinin 2. ve 3. β propeller domaininde yer aldığı bilinmektedir (143,149)(Şekil 6.1). *LRP5* geninde bulunan c.2827+1G>A splice site mutasyonu ise *LRP5* proteininin 4. β propeller domaininde yer almaktadır. Bu durum bize yine bu mutasyonun gözle özellikle de mikroftalmi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 6.1. Osteoporoz Psödoglioma Sendromuna ve Familial Eksudatif Vitreoretinopatiye neden olan mutasyonların *LRP5* proteininin üzerinde gösterilmesi. *=anlamsız mutasyon; fs= çerçeve kaydırma mutasyonu.

Wnt proteini yaklaşık 350 aminoasitten oluşmakta ve 40 kDa ağırlığındadır. Wnt proteini 23-25 sistein rezidüsüne sahiptir ve bu rezidüer türler arasında iyi korunmuşlardır. Bu sisteinlerden bazıları disülfid bağlarının içinde ve arasında yer alarak Wnt katlanması ve multimerizasyonuna katılmaktadır. Olgunlaşmamış Wnt, endoplazmik retikulumda (ER) çeşitli post translasyonel modifikasyonlar (glikolizasyon ve lipit modifikasyonları) geçirerek Wnt sinyal yolunda görev alacak şeklini almaktadır. Wnt, ER'a N terminalinde bulunan hidrofobik sinyal dizileri ile ilerlemektedir. Glikolizasyon, ER zarında bulunan oligosakkaril-transferaz kompleksi (OST) tarafından, Wnt peptid omurgasında yer alan N bağı oligosakkaritlerin zincirlere bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Lipit modifikasyonları ise, ER zarında bulunan porcupine proteininin sistein rezidülerine palmitat adlı lipid grubunu eklemesiyle gerçekleşmektedir. Wnt proteini heat-shock protein (Hsp70) ailesinin bir üyesi olan immunoglobulin-heavy-chain-binding protein (BIP) ile birleşmektedir. Bu sayede, Wnt proteinini doğru katlanmakta ve üç boyutlu hale gelmektedir (150,151).

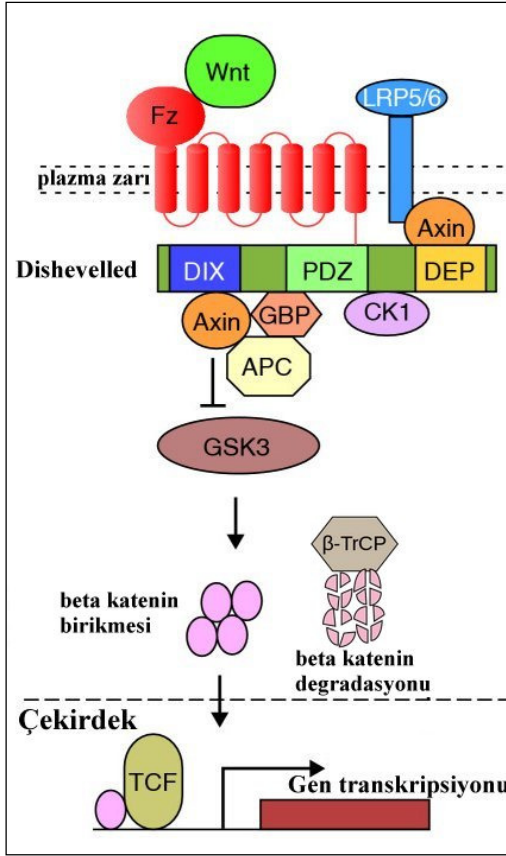
Wnt proteininin temel reseptör molekülü olarak bilinen Frizzled (Fz) molekülü, G protein ailesinin bir üyesidir. Fz reseptörü, cystein-rich domain (CRD- sisteinden zengin domain) adı verilen uzun amino-terminal uzantıları olan bir transmembran proteindir (131, 151). Wnt proteinleri Fz'nin CRD kısmına doğrudan bağlanmaktadır. Wnt sinyalinde fonksiyonel Fz molekülünün dışında LRP sınıfının üyeleri olan LRP5 ve LRP6 reseptörleri de görev almaktadır (131). LRP5/6 Fz'nin ko-reseptörü olarak görev yapmaktadır (151).

WNT sinyal yolağı, hücre kaderinin belirlenmesine neden olan kanonikal ve hücrenin hareket ve doku polaritesinin kontrolünde rol oynayan non-kanonikal olmak üzere 2 şekilde görev yapmaktadır (150,152).

Wnt/ β katenin olarak da bilinen kanonikal yolak, kök hücre biyolojisi, gelişimsel biyoloji ve erişkin organ sistemleri gibi birçok biyolojik sistemde görev almaktadır. Bu yolakta, Wnt proteini ile Fz reseptörünün eşleşmesi sonucu, β -katenin'in yıkılması engellenmektedir. Bu şekilde β -kateninin hücre sitoplazmasında miktarı artmakta ve sitoplazmadan çekirdek içine geçmektedir. β -katenin, çekirdekte transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturarak, birçok hedef genin transkripsiyonunu etkilemektedir (129). β katenin sitozolik proteini *CTNNB1* geni tarafından kodlanmaktadır. β katenin, E-kaderin ile α -aktin arasında köprü görevi yapmaktadır.

β katenin N-terminal domain, C-terminal domain ve 12 armadillo tekrarından oluşan armadillo domaininden oluşmaktadır (129, 151, 153,154). Wnt'nin sentezlenip ekzositozla intersüllüler boşluklara verilmesi ve hücre zarında bulunan Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanmasıyla Wnt/ β katenin sinyal mekanizması başlamış olmaktadır (151,153).

Wnt sinyal mekanizmasının aktif olduğu durumda, Wnt hedef hücre zarında bulunan reseptörlere bağlanarak fosforillenme reaksiyonunu uyarmaktadır. Fosforillenme reaksiyonu 2 şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki, LRP5/6'nın sitozol içinde kalan kısmının, glikojen sentaz kinaz (GSK3 β) ve kazein kinaz I γ (CKI γ) enzimleri tarafından fosforillenmesidir. Bu durumdan sitozol içinde bulunan yıkıcı kompleks etkilenecektir. Yıkıcı kompleks, aksin (axin), GSK3 β ve adenomatöz polipozis koli (APC)'den oluşmaktadır. Fosforillenme sonucu, aksin ve GSK3 β bu kompleksden ayrılarak LRP5/6'nın sitozol içindeki fosforillenmiş kısmına bağlanacaktır. Diğer fosforillenme ise, Dishevelled (Dsh/Dvl) proteininin fosforillenmesidir. Dvl bir ucu ile Fz'nin hücre içi kısmına, diğer ucu ile LRP5/6'ya bağlı olan aksine bağlanır. Bu sayede aksin proteininde konformasyonel bir değişim gerçekleşecek, GSK3 β aksinden ayrılacak ve hücrede bulunan bir inhibitör protein tarafından inhibe edilecektir. Böylece GSK3 β 'nin β katenini fosforilleme etkisi ortadan kaldırılmış olacaktır. Fosforillenmeyen β katenin, sitozolde birikecektir. Biriken β kateninin bir kısmı çekirdeğe gitmekte ve buradaki transkripsiyon faktörlerini aktive ederek Wnt sinyal yolağının hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatmaktadır (Şekil 6.2). Diğer kısmı ise E-kadherinin sitozoldeki kısmına bağlanmaktadır (151).



Şekil 6.2. Wnt sinyal yolağı. Fz=Frizzle; DIX, PDZ,DEP= Dishevelled (Dsh) proteininin alt üniteleri; GSK3=glikojen senthaz kinaz 3; CK1=kazein kinaz 1; β -TrCP= beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase.

İnaktif Wnt sinyal yolağında ise, Wnt Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanamayacak ve fosforillenme gerçekleşemeyecektir. Fosforillenme gerçekleşmediği için yıkıcı kompleks aktif durumda olacaktır. β katenin yıkıcı komplekse bağlanmakta ve GSK3 β tarafından fosforillenmektedir. Fosforillenme sayesinde β -TrCP enzimi, β katenini tanımış olacak ve onu yıkıcı kompleksden ayırarak proteozomlara yıkmak üzere götürecektir. β katenin burada parçalanarak çekirdeğe gidemeyecek ve dolayısıyla hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşmeyecektir (151).

Wnt sinyal yolağı, göz gelişiminin her aşamasının regülasyonunda rol almakta ve yüksek derecede kompleks bir yapı göstermektedir. Wnt/ β katenin sinyal yolağının, lens ve retinanın rejenerasyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir (155). Bu nedenle, bu yolda rol alan *LRP5* geninin yolağın çalışması açısından önemi düşünüldüğünde *LPR5* geninin mikroftalmiden sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmaya dahil edilen aileye, mevcut bulgular ışığında ayrıntılı bir genetik danışma verilmiş ve kemik kırıklarına yatkınlık ve kemik mineral yoğunluğunda azalmaya bağlı olarak gelişebilecek osteoporoz açısından takip önerilmiştir.

Bu çalışmanın yapıldığı ailede, mikroftalmi ile ilgili literatürde bildirilmiş olan genler klasik yöntemlerle incelenmiş olsaydı; maliyet ve zaman açısından kayıp olacağı gibi, bir sonuca ulaşmakta mümkün olmayacaktı. Bu ailede kullanılan ekzom dizileme hem klasik yöntemlere göre kısa sürede sonuç alınmasını, hem de hastalığın doğru tanısının konulmasını sağlamıştır. Ekzom dizileme yönteminin hassasiyeti düşünüldüğünde ve maliyetinin de giderek düşmesiyle birlikte bu çalışmaların ilerleyen yıllarda rutine gireceği ve incelemeleri çok kolaylaştıracağı ümit edilmektedir.

Bu bilgiler ışığında, yaşadığımız deneyim genetik heterojenite gösteren mikroftalmilerin etiolojisinin araştırılmasında izlenecek yol açısından yeni bir bakış açısı getirecektir. Bu ve benzer diğer çalışmalar sayesinde hastalara doğru bir genetik danışma verilebilecek, ilerleyen yıllarda mikroftalmiye neden olduğu bilinen genleri kapsayan bir kit ile bu hastalığın taraması yapılabilecektir.

Sonuç olarak; mikroftalmi bulunan hastalarda *LRP5* geninin dizilenmesi ve bulgu vermeyen kemik etkilenimi olabileceği bilgisiyle hastalarda kemik mineral yoğunluk ölçümü yapılması hastaların ileride daha ağır şikâyetlere neden olmadan önlem almalarını sağlamak açısından doğru bir yaklaşım olacaktır.

Bu tez çalışmasının devamında, ekzom sekanslama sonucunda bulunan genin doğruluğunu daha da güvenilir kılmak hem de sonuçta bulunan varyasyonların sayısının azaltılması açısından ailenin diğer etkilenmiş bireylerinden de ekzom sekanslama yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1-Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri, Before We Are Born, Keith L. Moore, T.V.N Persaud, (Çeviri kitap) Güneş Kitabevi. Ankara, 7. Baskı, Bölüm 17, 279-287 2009
- 2- GeneReviews® Edited by Roberta A Pagon, Editor-in-chief, Margaret P Adam, Holly H Ardinger, Stephanie E Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D Bird, Cynthia R Dolan, Chin-To Fong, Richard JH Smith, and Karen Stephens. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. ISSN: 2372-0697 Anophthalmia/Microphthalmia Overview. Bardakjian T, Weiss A, Schneider AS,
- 3-Genetic Disease of the Eye. Colobomatous Microphthalmia, Anophthalmia and Associated Malformation Syndromes, Traboulsi EI, Second Edition.2011.
- 4- Warburg M. Classification of microphthalmos and coloboma. J Med Genet. 1993 Aug;**30**(8):664-9.
- 5- Barishak YR. Embryology of the eye and its adnexae.Dev Ophthalmol. 1992;**24**:1-142.
- 6- Graw J. Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates.Dev Genet. 1996;**18**(3):181-97.
- 7- Graw J. Eye development. Curr Top Dev Biol. 2010;**90**:343-86
- 8- Khairallah M, Messaoud R, Zaouali S, Ben Yahia S, Ladjimi A, Jenzri S. Posterior segment changes associated with posterior microphthalmos. Ophthalmology. 2002;**109**:569–74
- 9- Weiss AH, Kousseff BG, Ross EA, Longbottom J. Simple microphthalmos. Arch Ophthalmol. 1989;**107**:1625–30.
- 10- Lee JS, Lee JE, Shin YG, Choi HY, Oum BS, Kim HJ.Five cases of microphthalmia with other ocular malformations.Korean J Ophthalmol. 2001 Jun;**15**(1):41-7.
- 11- Bardakjian TM, Schneider A. Association of anophthalmia and esophageal atresia: four new cases identified by the anophthalmia/microphthalmia clinical registry. Am J Med Genet A. 2005 Jan 1;**132A**(1):54-6.
- 12- Källén B, Robert E, Harris J. The descriptive epidemiology of anophthalmia and microphthalmia.Int J Epidemiol. 1996 Oct;**25**(5):1009-16.
- 13- Shah SP, Taylor AE, Sowden JC, Ragge N, Russell-Eggitt I, Rahi JS, Gilbert CE; Surveillance of Eye Anomalies Special Interest Group. Anophthalmos, microphthalmos, and Coloboma in the United kingdom: clinical features, results of investigations, and early management. Ophthalmology. 2012 Feb;**119**(2):362-8.

- 14- Dolk H, Busby A, Armstrong BG, Walls PH. Geographical variation in anophthalmia and microphthalmia in England, 1988-94. *BMJ*. 1998 Oct 3; **317**(7163):905-9
- 15- Morrison D, FitzPatrick D, Hanson I, Williamson K, van Heyningen V, Fleck B, Jones I, Chalmers J, Campbell H. National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J Med Genet*. 2002 Jan; **39**(1):16-22.
- 16- Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Harris JA, Finnell RH, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of anophthalmia and bilateral microphthalmia among 2.5 million births in California, 1989-1997. *Am J Med Genet A*. 2005 Aug 15; **137**(1):36-40.
- 17- Hecht F, Beals RK. "New" syndrome of congenital contractural arachnodactyly originally described by Marfan in 1896. *Pediatrics*. 1972 Apr; **49**(4):574-9.
- 18- Tekin M, Sirmaci A, Yüksel-Konuk B, Fitoz S, Sennaroğlu L. A complex TFAP2A allele is associated with branchio-oculo-facial syndrome and inner ear malformation in a deaf child. *Am J Med Genet A*. 2009 Mar; **149A**(3):427-30.
- 19- Pagon RA, Graham JM Jr, Zonana J, Yong SL. Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *J Pediatr*. 1981 Aug; **99**(2):223-7.
- 20- Tezcan I, Demir E, Aşan E, Kale G, Müftüoğlu SF, Kotiloğlu E. A new case of oculocerebral hypopigmentation syndrome (Cross syndrome) with additional findings. *Clin Genet*. 1997 Feb; **51**(2):118-21.
- 21- Cross HE, McKusick VA, Breen W. A new oculocerebral syndrome with hypopigmentation. *J Pediatr*. 1967 Mar; **70**(3):398-406.
- 22- Landowski M, O'Donohue MF, Buros C, Ghazvinian R, Montel-Lehry N, Vlachos A, Sieff CA, Newburger PE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Atsidaftos E, Lipton JM, Beggs AH, Gleizes PE, Gazda HT. Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet*. 2013 Nov; **132**(11):1265-74.
- 23- Ezaki J, Hashimoto K, Asano T, Kanda S, Akioka Y, Hattori M, Yamamoto T, Shibata N. Gonadal Tumor in Frasier Syndrome: A Review and Classification. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 Apr; **8**(4):271-276.
- 24- Stevenson DA, Chirpich M, Contreras Y, Hanson H, Dent K. Goltz syndrome and PORCN mosaicism. *Int J Dermatol*. 2014 Dec; **53**(12):1481-4.
- 25- Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*. 1960 May 5; **262**:908-12.

- 26- Esmailpour T, Riazifar H, Liu L, Donkervoort S, Huang VH, Madaan S, Shoucri BM, Busch A, Wu J, Towbin A, Chadwick RB, Sequeira A, Vawter MP, Sun G, Johnston JJ, Biesecker LG, Kawaguchi R, Sun H, Kimonis V, Huang T. A splice donor mutation in NAA10 results in the dysregulation of the retinoic acid signalling pathway and causes Lenz microphthalmia syndrome. *J Med Genet.* 2014 Mar;**51**(3):185-96.
- 27-Oltrabella F, Pietka G, Ramirez IB, Mironov A, Starborg T, Drummond IA, Hinchliffe KA, Lowe M. The Lowe syndrome protein OCRL1 is required for endocytosis in the zebrafish pronephric tubule. *PLoS Genet.* 2015 Apr 2;**11**(4):e1005058.
- 28-Smith UM, Consugar M, Tee LJ, McKee BM, Maina EN, Whelan S, Morgan NV, Goranson E, Gissen P, Lillquist S, Aligianis IA, Ward CJ, Pasha S, Punyashthiti R, Malik Sharif S, Batman PA, Bennett CP, Woods CG, McKeown C, Bucourt M, Miller CA, Cox P, Algazali L, Trembath RC, Torres VE, Attie-Bitach T, Kelly DA, Maher ER, Gattone VH 2nd, Harris PC, Johnson CA. The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet.* 2006 Feb;**38**(2):191-6.
- 29-Wimplinger I, Morleo M, Rosenberger G, Iaconis D, Orth U, Meinecke P, Lerer I, Ballabio A, Gal A, Franco B, Kutsche K. Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006 Nov;**79**(5):878-89.
- 30-Numakura C, Kitanaka S, Kato M, Ishikawa S, Hamamoto Y, Katsushima Y, Kimura T, Hayasaka K. Supernumerary impacted teeth in a patient with SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010 Sep;**152A**(9):2355-9.
- 31-Judisch GF, Martin-Casals A, Hanson JW, Olin WH. Oculodentodigital dysplasia. Four new reports and a literature review. *Arch Ophthalmol.* 1979 May;**97**(5):878-84.
- 32-Traboulsi EI, Faris BM, Der Kaloustian VM. Persistent hyperplastic primary vitreous and recessive oculo-dento-osseous dysplasia. *Am J Med Genet.* 1986 May;**24**(1):95-100.
- 33- Hennekam RC. Rubinstein-Taybi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2006 Sep;**14**(9):981-5
- 34-Ernst LM, Quinn PD, Alawi F. Novel oral findings in Schimmelpenning syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007 Apr 15;**143A**(8):881-3
- 35-Jaakkola E, Mustonen A, Olsen P, Miettinen S, Savuoja T, Raams A, Jaspers NG, Shao H, Wu BL, Ignatius J. ERCC6 founder mutation identified in Finnish patients with COFS syndrome. *Clin Genet.* 2010 Dec;**78**(6):541-7.
- 36-Horn D, Chyrek M, Kleier S, Lüttgen S, Bolz H, Hinkel GK, Korenke GC, Riess A, Schell-Apacik C, Tinschert S, Wiczorek D, Gillessen-Kaesbach G, Kutsche K. Novel mutations in BCOR in three patients with oculo-facio-cardio-dental syndrome, but none in

- Lenz microphthalmia syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005 May;13(5):563-9.59-Meuwissen ME1, Mancini GM. Neurological findings in incontinentia pigmenti; a review. *Eur J Med Genet.* 2012;55(5):323-31.
- 37- Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL, Thompson P, Williamson KA, Sisodiya SM, van Heyningen V, Fitzpatrick DR. SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005 May 15;135(1):1-7
- 38- Zenteno JC, Perez-Cano HJ, Aguinaga M. Anophthalmia-esophageal atresia syndrome caused by an SOX2 gene deletion in monozygotic twin brothers with markedly discordant phenotypes. *Am J Med Genet A.* 2006 Sep 15;140(18):1899-903.
- 39- Graham CA, Redmond RM, Nevin NC. X-linked clinical anophthalmos. Localization of the gene to Xq27-Xq28. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1991 Mar;12(1):43-8.
- 40- Wyatt A, Bakrania P, Bunyan DJ, Osborne RJ, Crolla JA, Salt A, Ayuso C, Newbury-Ecob R, Abou-Rayyah Y, Collin JR, Robinson D, Ragge N. Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Hum Mutat.* 2008;29(11):E278-83.
- 41- Bakrania P, Efthymiou M, Klein JC, Salt A, Bunyan DJ, Wyatt A, Ponting CP, Martin A, Williams S, Lindley V, Gilmore J, Restori M, Robson AG, Neveu MM, Holder GE, Collin JR, Robinson DO, Farndon P, Johansen-Berg H, Gerrelli D, Ragge NK. Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):304-19.
- 42- Prakash SK, Cormier TA, McCall AE, Garcia JJ, Sierra R, Haupt B, Zoghbi HY, Van Den Veyver IB. Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 1;11(25):3237-48.
- 43- Vervoort VS, Viljoen D, Smart R, Suthers G, DuPont BR, Abbott A, Schwartz CE. Sorting nexin 3 (SNX3) is disrupted in a patient with a translocation t(6;13)(q21;q12) and microcephaly, microphthalmia, ectrodactyly, prognathism (MMEP) phenotype. *J Med Genet.* 2002 Dec;39(12):893-9.
- 44- Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillissen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nürnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, Houge G, Fernández-Martínez L, Keating S, Mortier G, Hennekam RC, von der Wense A, Slavotinek A, Meinecke P, Bitoun P, Becker C, Nürnberg P, Reis A, Rauch A. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic

hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007 Mar;**80**(3):550-60.

45- Casey J, Kawaguchi R, Morrissey M, Sun H, McGettigan P, Nielsen JE, Conroy J, Regan R, Kenny E, Cormican P, Morris DW, Tormey P, Chróinín MN, Kennedy BN, Lynch S, Green A, Ennis S. First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: a new dimension to the STRA6 phenotype. *Hum Mutat.* 2011 Dec;**32**(12):1417-26.

46- Kanavin ØJ1, Haakonsen M, Server A, Bajwa TJ, van der Knaap MS, Strømme P. Microphthalmia and brain atrophy: a novel neurodegenerative disease. *Ann Neurol.* 2006 Apr;**59**(4):719-23.

47- Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, Schneider A, Shaw G, Sherr EH, Lemke G, Youssef M, Schorderet DF. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: the first description of a VAX1 phenotype in humans. *Hum Mutat.* 2012 Feb;**33**(2):364-8.

48- Srouf M, Chitayat D, Caron V, Chassaing N, Bitoun P, Patry L, Cordier MP, Capochichi JM, Francannet C, Calvas P, Ragge N, Dobrzeniecka S, Hamdan FF, Rouleau GA, Tremblay A, Michaud JL. Recessive and dominant mutations in retinoic acid receptor beta in cases with microphthalmia and diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet.* 2013 Oct 3;**93**(4):765-72.

49- Scott AF, Mohr DW, Kasch LM, Barton JA, Pittiglio R, Ingersoll R, Craig B, Marosy BA, Doheny KF, Bromley WC, Roderick TH, Chassaing N, Calvas P, Prabhu SS, Jabs EW. Identification of an HMGB3 frameshift mutation in a family with an X-linked colobomatous microphthalmia syndrome using whole-genome and X-exome sequencing. *JAMA Ophthalmol.* 2014 Oct;**132**(10):1215-20.

50- Rainger J, Pehlivan D, Johansson S, Bengani H, Sanchez-Pulido L, Williamson KA, Ture M, Barker H, Rosendahl K, Spranger J, Horn D, Meynert A, Floyd JA, Prescott T, Anderson CA, Rainger JK, Karaca E, Gonzaga-Jauregui C, Jhangiani S, Muzny DM, Seawright A, Soares DC, Kharbanda M, Murday V, Finch A; UK10K; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Gibbs RA, van Heyningen V, Taylor MS, Yakut T, Knappskog PM, Hurles ME, Ponting CP, Lupski JR, Houge G, FitzPatrick DR. Monoallelic and biallelic mutations in MAB21L2 cause a spectrum of major eye malformations. *Am J Hum Genet.* 2014 Jun 5;**94**(6):915-23.

51- Weaver RG, Rao N, Thomas IT, Pettenati MJ. De novo inv(2)(p21q31) associated with isolated bilateral microphthalmia and cataracts. *Am J Med Genet.* 1991 Sep 15;**40**(4):509-12.

- 52- Hirayama T, Kobayashi T, Fujino O. Congenital bilateral severe microphthalmia with mental retardation and cerebral palsy: chromosome aberration, 46, XY, t (2;6)(q31;q24). *J Nippon Med Sch.* 2005 Aug;**72**(4):242-4.
- 53- Berends MJ, Tan-Sindhunata G, Leegte B, van Essen AJ. Phenotypic variability of Cat-Eye syndrome. *Genet Couns.* 2001;**12**(1):23-34.
- 54- Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Oct 23;**7**:81
- 55- Tarani L, Colloridi F, Raguso G, Rizzuti A, Bruni L, Tozzi MC, Palermo D, Panero A, Vignetti P. Trisomy 9 mosaicism syndrome. A case report and review of the literature. *Ann Genet.* 1994;**37**(1):14-20.
- 56- Caba L, Rusu C, Butnariu L, Panzaru M, Braha E, Volosciuc M, Popescu R, Gramescu M, Bujoran C, Martiniuc V, Covic M, Gorduza EV. Phenotypic variability in Patau syndrome. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2013 Apr-Jun;**117**(2):321-7.
- 57- Dickmann A, Parrilla R, Salerni A, Savino G, Vasta I, Zollino M, Petroni S, Zampino G. Ocular manifestations in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J AAPOS.* 2009 Jun;**13**(3):264-7.
- 58- Temple IK, Hurst JA, Hing S, Butler L, Baraitser M. De novo deletion of Xp22.2-pter in a female with linear skin lesions of the face and neck, microphthalmia, and anterior chamber eye anomalies. *J Med Genet.* 1990 Jan;**27**(1):56-8.
- 59- Lehman DM, Sponsel WE, Stratton RF, Mensah J, Macdonald JC, Johnson-Pais TL, Coon H, Reveles XT, Cody JD, Leach RJ. Genetic mapping of a novel X-linked recessive colobomatous microphthalmia. *Am J Med Genet.* 2001 Jun 15;**101**(2):114-9.
- 60- Michon L, Morlé L, Bozon M, Duret L, Zech JC, Godet J, Plauchu H, Edery P. Physical and transcript map of the autosomal dominant colobomatous microphthalmia locus on chromosome 15q12-q15 and refinement to a 4.4 Mb region. *Eur J Hum Genet.* 2004 Jul;**12**(7):574-8.
- 61- Percin EF, Ploder LA, Yu JJ, Arici K, Horsford DJ, Rutherford A, Bapat B, Cox DW, Duncan AMV, Kalnins VI, Kocak-Altintas A, Sowden JC, Traboulsi E, Sarfarazi M, McInnes RR. Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Gen* 2000;**25**:397-401.
- 62- Hornby SJ, Adolph S, Gilbert CE, Dandona L, Foster A. Visual acuity in children with coloboma: clinical features and a new phenotypic classification system. *Ophthalmology.* 2000 Mar;**107**(3):511-20.
- 63- Schimmenti LA, de la Cruz J, Lewis RA, Karkera JD, Manligas GS, Roessler E, Muenke M. Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. *Am J Med Genet A.* 2003 Jan 30;**116A**(3):215-21.

- 64- Ye M, Berry-Wynne KM, Asai-Coakwell M, Sundaresan P, Footz T, French CR, Abitbol M, Fleisch VC, Corbett N, Allison WT, Drummond G, Walter MA, Underhill TM, Waskiewicz AJ, Lehmann OJ. Mutation of the bone morphogenetic protein GDF3 causes ocular and skeletal anomalies. *Hum Mol Genet.* 2010 Jan 15; **19**(2):287-98.
- 65- Asai-Coakwell M, French CR, Ye M, Garcha K, Bigot K, Perera AG, Staehling-Hampton K, Mema SC, Chanda B, Mushegian A, Bamforth S, Doschak MR, Li G, Dobbs MB, Giampietro PF, Brooks BP, Vijayalakshmi P, Sauv e Y, Abitbol M, Sundaresan P, van Heyningen V, Pourqui e O, Underhill TM, Waskiewicz AJ, Lehmann OJ. Incomplete penetrance and phenotypic variability characterize Gdf6-attributable oculo-skeletal phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 15; **18**(6):1110-21.
- 66- Wang L, He F, Bu J, Zhen Y, Liu X, Du W, Dong J, Cooney JD, Dubey SK, Shi Y, Gong B, Li J, McBride PF, Jia Y, Lu F, Soltis KA, Lin Y, Namburi P, Liang C, Sundaresan P, Paw BH, Li W, Li DY, Phillips JD, Yang Z. ABCB6 mutations cause ocular coloboma. *Am J Hum Genet.* 2012 Jan 13; **90**(1):40-8.
- 67- Aldahmesh MA, Mohammed JY, Al-Hazzaa S, Alkuraya FS. Homozygous null mutation in ODZ3 causes microphthalmia in humans. *Genet Med.* 2012 Nov; **14**(11):900-4.
- 68- Bessant DA, Anwar K, Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Payne AM, Mehdi SQ, Bhattacharya SS. Phenotype of autosomal recessive congenital microphthalmia mapping to chromosome 14q32. *Br J Ophthalmol.* 1999 Aug; **83**(8):919-22.
- 69- Bar-Yosef U, Abuelaish I, Harel T, Hendler N, Ofir R, Birk OS. CHX10 mutations cause non-syndromic microphthalmia/ anophthalmia in Arab and Jewish kindreds. *Hum Genet.* 2004 Sep; **115**(4):302-9.
- 70- Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, Al-Mureikhi MS, Peltekova I, Tsui LC, Teebi AS. Mutations in the CHX10 gene in non-syndromic microphthalmia/anophthalmia patients from Qatar. *Clin Genet.* 2007 Aug; **72**(2):164-6.
- 71- Voronina VA, Kozhemyakina EA, O'Kernick CM, Kahn ND, Wenger SL, Linberg JV, Schneider AS, Mathers PH. Mutations in the human RAX homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum Mol Genet.* 2004 Feb 1; **13**(3):315-22.
- 72- Lequeux L, Rio M, Vigouroux A, Titeux M, Etchevers H, Malecaze F, Chassaing N, Calvas P. Confirmation of RAX gene involvement in human anophthalmia. *Clin Genet.* 2008 Oct; **74**(4):392-5.
- 73- Ayala-Ramirez R, Graue-Wiechers F, Robredo V, Amato-Almanza M, Horta-Diez I, Zenteno JC. A new autosomal recessive syndrome consisting of posterior microphthalmos,

retinitis pigmentosa, foveoschisis, and optic disc drusen is caused by a MFRP gene mutation. *Mol Vis.* 2006 Dec 4;**12**:1483-9.

74- Gal A, Rau I, El Matri L, Kreienkamp HJ, Fehr S, Baklouti K, Chouchane I, Li Y, Rehbein M, Fuchs J, Fledelius HC, Vilhelmsen K, Schorderet DF, Munier FL, Ostergaard E, Thompson DA, Rosenberg T. Autosomal-recessive posterior microphthalmos is caused by mutations in PRSS56, a gene encoding a trypsin-like serine protease. *Am J Hum Genet.* 2011 Mar 11;**88**(3):382-90.

75- Hmani-Aifa M, Ben Salem S, Benzina Z, Bouassida W, Messaoud R, Turki K, Khairallah M, Rebaï A, Fakhfekh F, Söderkvist P, Ayadi H. A genome-wide linkage scan in Tunisian families identifies a novel locus for non-syndromic posterior microphthalmia to chromosome 2q37.1. *Hum Genet.* 2009 Oct;**126**(4):575-87.

76- Mory A, Ruiz FX, Dagan E, Yakovtseva EA, Kurolap A, Parés X, Farrés J, Gershoni-Baruch R. A missense mutation in ALDH1A3 causes isolated microphthalmia/anophthalmia in nine individuals from an inbred Muslim kindred. *Eur J Hum Genet.* 2014 Mar;**22**(3):419-22.

77- Abouzeid H, Favez T, Schmid A, Agosti C, Youssef M, Marzouk I, El Shakankiry N, Bayoumi N, Munier FL, Schorderet DF. Mutations in ALDH1A3 represent a frequent cause of microphthalmia/anophthalmia in consanguineous families. *Hum Mutat.* 2014 Aug;**35**(8):949-53

78- Morini F, Pacilli M, Spitz L. Bilateral anophthalmia and esophageal atresia: report of a new patient and review of the literature. (Letter) *Am. J. Med. Genet.* **132A**: 60-62, 2005.

79- Kohn G, el Shawwa R, el Rayyes E. Isolated "clinical anophthalmia" in an extensively affected Arab kindred. *Clin Genet.* 1988 May;**33**(5):321-4.

80- Crespí J, Buil JA, Bassaganyas F, Vela-Segarra JI, Díaz-Cascajosa J, Ayala-Ramírez R, Zenteno JC. A novel mutation confirms MFRP as the gene causing the syndrome of nanophthalmos-retinitis pigmentosa-foveoschisis-optic disk drusen. *Am J Ophthalmol.* 2008 Aug;**146**(2):323-328.

81- Zenteno JC, Buentello-Volante B, Quiroz-González MA, Quiroz-Reyes MA. Compound heterozygosity for a novel and a recurrent MFRP gene mutation in a family with the nanophthalmos-retinitis pigmentosa complex. *Mol Vis.* 2009 Sep 5;**15**:1794-8

82- Genetik Kavramlar, William S. Klug , Michael R. Cummings, Palme Yayıncılık, Prof. Dr. Cihan Öner 2011-01-01 Orjinal Adı Concepts of Genetics ISBN 6055829261 2. Baskı

83- Thompson and Thompson, (Çeviri Kurulu) Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi (2005) Thompson&Thompson Tıbbi Genetik (Thompson&Thompson Genetics in Medicine)

Robert L. NUSSBAUM, Roderick R. MCINNES, Huntington F. WILLARD ISBN 975-277-031-2

84-. Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger JI Jr, Craddock N, DePaulo JR, Baron M, Gershon ES, Ekholm J, Cichon S, Turecki G, Claes S, Kelsoe JR, Schofield PR, Badenhop RF, Morissette J, Coon H, Blackwood D, McInnes LA, Foroud T, Edenberg HJ, Reich T, Rice JP, Goate A, McInnis MG, McMahon FJ, Badner JA, Goldin LR, Bennett P, Willour VL, Zandi PP, Liu J, Gilliam C, Juo SH, Berrettini WH, Yoshikawa T, Peltonen L, Lönngqvist J, Nöthen MM, Schumacher J, Windemuth C, Rietschel M, Propping P, Maier W, Alda M, Grof P, Rouleau GA, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J, Adolfsson R, Spence MA, Luebbert H, Adams LJ, Donald JA, Mitchell PB, Barden N, Shink E, Byerley W, Muir W, Visscher PM, Macgregor S, Gurling H, Kalsi G, McQuillin A, Escamilla MA, Reus VI, Leon P, Freimer NB, Ewald H, Kruse TA, Mors O, Radhakrishna U, Blouin JL, Antonarakis SE, Akarsu N. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder *Am J Hum Genet.* 2003 Jul;**73**(1):49-62.

85- Human Molecular genetics 3. Tom Strachan and Andrew P. Read. Garland Science, UK 2004.

86- Lewin B, Krebs J, Kilpatrick ST, Goldstein ES. Lewin's Genes X, Volume 10. Jones & Bartlett Publishers, Kanada, 2011.

87- Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları Munis Dünder, Haydar Bağış, Erciyes Üniversitesi Yayınları, Yayın Yeri: Kayseri 2010.

88-Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res.* 2003 May 15;**526**(1-2):53-61.

89-Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science.* 1987 Jun 19;**236**(4808):1567-70.

90- Johnson ML, Summerfield DT. Parameters of LRP5 from a structural and molecular perspective. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2005;**15**(3):229-42.

91- Guarnaccia M, Gentile G, Alessi E, Schneider C, Petralia S, Cavallaro S. Is this the real time for genomics? *Genomics.* 2014 February - March;**103**(2-3):177-182.

92- Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits AP, de Leeuw N. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet.* 2010 Sep;**47**(9):586-94.

- 93- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, London 1990.
- 94- McPherson MJ, Moller SG PCR (The Basics) Taylor and Francis Group, New York 2nd edition 2006.
- 95-Lüleyap HÜ Moleküler Genetiğin Esasları, Adana Nobel Kitabevi, Adana, 2000.
- 96- Renkli Genetik Atlası, Eberhard Passarge, Çev. Ed.'leri: Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. Gözden geçirilmiş ve güncelleştirilmiş 3. baskı, 2009 (Color Atlas of Genetics, 3rd edition, revised and updated, 2006, E.Passarge).
- 97- Tobias ES, Connor M, Ferguson-Smith M. Tıbbi Genetiğin Esasları, (Çeviri Editörü Uğur Özbek) İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2014.
- 98- Lyon GJ Wang K. Identifying disease mutations in genomic medicine settings: current challenges and how to accelerate progress. *Genome Med* **4**:58, 2010.
- 99- Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine *Am J Hum Genet.* 2009 Aug 14; **85**(2): 142–154.
- 100- Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol.* 2013 Aug; **133**(8):e11.
- 101- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S and Lifton RP: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:19096-19101, 2009.
- 102- McDonald KK, Stajich J, Blach C, Ashley-Koch AE and Hauser MA: Exome analysis of two limb-girdle muscular dystrophy families: mutations identified and challenges encountered. *PLoS One* **7**:e48864, 2012.
- 103- Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, Luu TV, Servetas SL, Mateczun AJ, Mokashi VP, Bishop-Lilly KA. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics.* 2014 Feb 4; **15**:96.
- 104- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; **16**(3):1215.
- 105- Skalicky SE, White AJ, Grigg JR, Martin F, Smith J, Jones M, Donaldson C, Smith JE, Flaherty M, Jamieson RV. Microphthalmia, anophthalmia, and coloboma and associated ocular and systemic features: understanding the spectrum. *JAMA Ophthalmol.* 2013 Dec; **131**(12):1517-24

- 106-Slavotinek AM. Eye development genes and known syndromes. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;**104**(4):448-56.
- 107-Williamson KA, FitzPatrick DR. The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *Eur J Med Genet.* 2014 Aug;**57**(8):369-80.
- 108- Macchiaroli A, Kelberman D, Auriemma RS, Drury S, Islam L, Giangioffe S, Ironi G, Lench N, Sowden JC, Colao A, Pivonello R, Cavallo L, Gasperi M, Faienza MF. A novel heterozygous SOX2 mutation causing congenital bilateral anophthalmia, hypogonadotropic hypogonadism and growth hormone deficiency. *Gene.* 2014 Jan 25;**534**(2):282-5.
- 109-Chassaing N, Causse A, Vigouroux A, Delahaye A, Alessandri JL, Boespflug-Tanguy O, Boute-Benejean O, Dollfus H, Duban-Bedu B, Gilbert-Dussardier B, Giuliano F, Gonzales M, Holder-Espinasse M, Isidor B, Jacquemont ML, Lacombe D, Martin-Coignard D, Mathieu-Dramard M, Odent S, Picone O, Pinson L, Quelin C, Sigaudy S, Toutain A, Thauvin-Robinet C, Kaplan J, Calvas P. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clin Genet.* 2014 Oct;**86**(4):326-34.
- 110-Zhou J, Kherani F, Bardakjian TM, Katowitz J, Hughes N, Schimmenti LA, Schneider A, Young TL. Identification of novel mutations and sequence variants in the SOX2 and CHX10 genes in patients with anophthalmia/microphthalmia. *Mol Vis.* 2008 Mar 24;**14**:583-92
- 111-Schneider A, Bardakjian T, Reis LM, Tyler RC, Semina EV. Novel SOX2 mutations and genotype-phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *Am J Med Genet A.* 2009 Dec;**149A**(12):2706-15
- 112-Gonzalez-Rodriguez J1, Pelcastre EL, Tovilla-Canales JL, Garcia-Ortiz JE, Amato-Almanza M, Villanueva-Mendoza C, Espinosa-Mattar Z, Zenteno JC. Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases. *Br J Ophthalmol.* 2010 Aug;**94**(8):1100-4.
- 113-Gerth-Kahlert C, Williamson K, Ansari M, Rainger JK, Hingst V, Zimmermann T, Tech S, Guthoff RF, van Heyningen V, Fitzpatrick DR. Clinical and mutation analysis of 51 probands with anophthalmia and/or severe microphthalmia from a single center. *Mol Genet Genomic Med.* 2013 May;**1**(1):15-31.
- 114-Schilter KF, Reis LM, Schneider A, Bardakjian TM, Abdul-Rahman O, Kozel BA, Zimmerman HH, Broeckel U, Semina EV. Whole-genome copy number variation analysis in anophthalmia and microphthalmia. *Clin Genet.* 2013 Nov;**84**(5):473-81.

- 115-Bakrania P, Ugur Iseri SA, Wyatt AW, Bunyan DJ, Lam WW, Salt A, Ramsay J, Robinson DO, Ragge NK. Sonic hedgehog mutations are an uncommon cause of developmental eye anomalies. *Am J Med Genet A*. 2010 May; **152A**(5):1310-3.
- 116-Reis LM, Khan A, Kariminejad A, Ebadi F, Tyler RC, Semina EV. VSX2 mutations in autosomal recessive microphthalmia. *Mol Vis*. 2011; **17**:2527-32.
- 117-Zhang X, Li S, Xiao X, Jia X, Wang P, Shen H, Guo X, Zhang Q. Mutational screening of 10 genes in Chinese patients with microphthalmia and/or coloboma. *Mol Vis*. 2009 Dec 27; **15**:2911-8.
- 118-Ali M, Buentello-Volante B, McKibbin M, Rocha-Medina JA, Fernandez-Fuentes N, Koga-Nakamura W, Ashiq A, Khan K, Booth AP, Williams G, Raashid Y, Jafri H, Rice A, Inglehearn CF, Zenteno JC. Homozygous FOXE3 mutations cause non-syndromic, bilateral, total sclerocornea, aphakia, microphthalmia and optic disc coloboma. *Mol Vis*. 2010 Jun 23; **16**:1162-8.
- 119-Pantoja-Melendez C1, Ali M, Zenteno JC. An epidemiological investigation of a Forkhead box protein E3 founder mutation underlying the high frequency of sclerocornea, aphakia, and microphthalmia in a Mexican village. *Mol Vis*. 2013 Aug 27; **19**:1866-70.
- 120-Fares-Taie L, Gerber S, Chassaing N, Clayton-Smith J, Hanein S, Silva E, Serey M, Serre V, Gérard X, Baumann C, Plessis G, Demeer B, Brétilon L, Bole C, Nitschke P, Munnich A, Lyonnet S, Calvas P, Kaplan J, Ragge N, Rozet JM. ALDH1A3 mutations cause recessive anophthalmia and microphthalmia. *Am J Hum Genet*. 2013 Feb 7; **92**(2):265-70.
- 121-Aldahmesh MA, Khan AO, Hijazi H, Alkuraya FS. Mutations in ALDH1A3 cause microphthalmia. *Clin Genet*. 2013 Aug; **84**(2):128-31
- 122-Yahyavi M, Abouzeid H, Gawdat G, de Preux AS, Xiao T, Bardakjian T, Schneider A, Choi A, Jorgenson E, Baier H, El Sada M, Schorderet DF, Slavotinek AM. ALDH1A3 loss of function causes bilateral anophthalmia/microphthalmia and hypoplasia of the optic nerve and optic chiasm. *Hum Mol Genet*. 2013 Aug 15; **22**(16):3250-8.
- 123-Curry CJ, Rosenfeld JA, Grant E, Gripp KW, Anderson C, Aylsworth AS, Saad TB, Chizhikov VV, Dybose G, Fagerberg C, Falco M, Fels C, Fichera M, Graakjaer J, Greco D, Hair J, Hopkins E, Huggins M, Ladda R, Li C, Moeschler J, Nowaczyk MJ, Ozmore JR, Reitano S, Romano C, Roos L, Schnur RE, Sell S, Suwannarat P, Svaneby D, Szybowska M, Tarnopolsky M, Tervo R, Tsai AC, Tucker M, Vallee S, Wheeler FC, Zand DJ, Barkovich AJ, Aradhya S, Shaffer LG, Dobyns WB. The duplication 17p13.3 phenotype: analysis of 21 families delineates developmental, behavioral and brain abnormalities, and rare variant phenotypes. *Am J Med Genet A*. 2013 Aug; **161A**(8):1833-52.

- 124-Semerci CN, Kalay E, Yıldırım C, Dinçer T, Olmez A, Toraman B, Koçyiğit A, Bulgu Y, Okur V, Satrioğlu-Tufan L, Akarsu NA. Novel splice-site and missense mutations in the ALDH1A3 gene underlying autosomal recessive anophthalmia/microphthalmia. *Br J Ophthalmol*. 2014 Jun;**98**(6):832-40.
- 125-Slavotinek AM, Garcia ST, Chandratillake G, Bardakjian T, Ullah E, Wu D, Umeda K, Lao R, Tang PL, Wan E, Madireddy L, Lyalina S, Mendelsohn BA, Dugan S, Tirch J, Tischler R, Harris J, Clark MJ, Chervitz S, Patwardhan A, West JM, Ursell P, de Alba Campomanes A, Schneider A, Kwok P, Baranzini S, Chen RO. Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects. *Clin Genet*. 2014 Dec 2. doi: 10.1111/cge.12543.
- 126-White T, Lu T, Metlapally R, Katowitz J, Kherani F, Wang TY, Tran-Viet KN, Young TL. Identification of STRA6 and SKI sequence variants in patients with anophthalmia/microphthalmia. *Mol Vis*. 2008;**14**:2458-65
- 127-Chassaing N, Ragge N, Kariminejad A, Buffet A, Ghaderi-Sohi S, Martinovic J, Calvas P. Mutation analysis of the STRA6 gene in isolated and non-isolated anophthalmia/microphthalmia. *Clin Genet*. 2013 Mar;**83**(3):244-50.
- 128-Alonso N, Soares DC, V McCloskey E, Summers GD, Ralston SH, Gregson CL. Atypical femoral fracture in osteoporosis pseudoglioma syndrome associated with two novel compound heterozygous mutations in LRP5. *J Bone Miner Res*. 2015 Apr;**30**(4):615-20.
- 129-Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2013;**19**(4):634-64.
- 130-Nusse, R., Varmus, H.E. 1992. Wnt genes. *Cell*. **69**(7) ;1073-87.
- 131-Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005 Jan;**15**(1):28-32.
- 132-Nikopoulos K, Venselaar H, Collin RW, Riveiro-Alvarez R, Boonstra FN, Hooymans JM, Mukhopadhyay A, Shears D, van Bers M, de Wijs IJ, van Essen AJ, Sijmons RH, Tilanus MA, van Nouhuys CE, Ayuso C, Hoefsloot LH, Cremers FP. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum Mutat*. 2010 Jun;**31**(6):656-66.
- 133-Benson WE. Familial exudative vitreoretinopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1995;**93**:473-521.
- 134-Jiao X, Ventruto V, Trese MT, Shastry BS, Hejtmancik JF. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am J Hum Genet*. 2004 Nov;**75**(5):878-84.

- 135-Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, Craig JE, Jiang L, Yang Z, Trembath R, Woodruff G, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K, Parker MJ, Black GC, Downey LM, Zhang K, Inglehearn CF. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet.* 2004 Apr;**74**(4):721-30.
- 136- Lavezzo MM1, Barreira Jr AK, Zacharias LC, Takahashi WY. Familial exudative vitreoretinopathy simulating Coats disease: case report. *Arq Bras Oftalmol.* 2011 Jul-Aug;**74**(4):292-5.
- 137- Chang-Godinich A1, Paysse EA, Coats DK, Holz ER. Familial exudative vitreoretinopathy mimicking persistent hyperplastic primary vitreous. *Am J Ophthalmol.* 1999 Apr;**127**(4):469-71.
- 138-Qin M, Hayashi H, Oshima K, Tahira T, Hayashi K, Kondo H. Complexity of the genotype-phenotype correlation in familial exudative vitreoretinopathy with mutations in the LRP5 and/or FZD4 genes. *Hum Mutat.* 2005 Aug;**26**(2):104-12.
- 139-Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001 Nov 16;**107**(4):513-23.
- 140-Gilmour DF1. Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies. *Eye (Lond).* 2015 Jan;**29**(1):1-14.
- 141-Narumi S, Numakura C, Shiihara T, Seiwa C, Nozaki Y, Yamagata T, Momoi MY, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Nishi E, Kawame H, Akahane T, Nishimura G, Emi M, Hasegawa T. Various types of LRP5 mutations in four patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome: identification of a 7.2-kb microdeletion using oligonucleotide tiling microarray. *Am J Med Genet A.* 2010 Jan;**152A**(1):133-40.

- 142-Tüysüz B, Bursalı A, Alp Z, Suyugül N, Laine CM, Mäkitie O. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: three novel mutations in the LRP5 gene and response to bisphosphonate treatment. *Horm Res Paediatr.* 2012;**77**(2):115-20.
- 143-Laine CM, Chung BD, Susic M, Prescott T, Semler O, Fiskerstrand T, D'Eufemia P, Castori M, Pekkinen M, Sochett E, Cole WG, Netzer C, Mäkitie O. Novel mutations affecting LRP5 splicing in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG). *Eur J Hum Genet.* 2011 Aug;**19**(8):875-81.
- 144-Levasseur R, Lacombe D, de Vernejoul MC. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint Bone Spine.* 2005 May;**72**(3):207-14.
- 145-Barros ER, Dias da Silva MR, Kunii IS, Hauache OM, Lazaretti-Castro M. A novel mutation in the LRP5 gene is associated with osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Osteoporos Int.* 2007 Jul;**18**(7):1017-8.
- 146-Chung BD, Kayserili H, Ai M, Freudenberg J, Uzümcü A, Uyguner O, Bartels CF, Höning S, Ramirez A, Hanisch FG, Nürnberg G, Nürnberg P, Warman ML, Wollnik B, Kubisch C, Netzer C. A mutation in the signal sequence of LRP5 in a family with an osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG)-like phenotype indicates a novel disease mechanism for trinucleotide repeats. *Hum Mutat.* 2009 Apr;**30**(4):641-8.
- 147-Marques-Pinheiro A, Levasseur R, Cormier C, Bonneau J, Boileau C, Varret M, Abifadel M, Allanore Y. Novel LRP5 gene mutation in a patient with osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Joint Bone Spine.* 2010 Mar;**77**(2):151-3.
- 148-Welinder LG, Robitaille JM, Rupps R, Boerkoel CF, Lyons CJ. Congenital Bilateral Retinal Detachment in Two Siblings with Osteoporosis-pseudoglioma Syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2015 Sep;**36**(3):276-80.
- 149-He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004 Apr;**131**(8):1663-77.
- 150-Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development.* 2007 Jan;**134**(1):3-12.
- 151-Tanır HG, Demirezen Ş. Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;**29**(5):1292-7
- 152-Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 15;**13**(14):4042-5.
- 153-Dönmez HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011; **25**(3):189-199.

154-Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol.* 2005 Jan; **205**(2):130-44.

155-Fuhrmann S Wnt signaling in eye organogenesis. *Organogenesis.* 2008 Apr; **4**(2):60-7.

EKLER

EK1:ETİK KURUL BELGESİ



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : B.10.4.İSM.4.06.68.49/

26.03.2014

Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Etik Kurul Kararı

KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURULU

“Otozomal Resesif Mikroftalmisi Olan Bir Ailede Mikrodizin ve Ekzon Sekanslama Yöntemi ile Yeni Genlerin Araştırılması” adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Doç.Dr. K.Okhan AKIN
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

ASLI GİBİDİR

Zelha ÇETİNE
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Sekreteri

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.
Ardahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA
Web: www.akeah.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sezen Güntekin Ergün

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 08.01.1981

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Kılıçarslan Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji

İş Tecrübesi

Kurumu: Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD 31.07.2006- halen

Görevi: Biyolog

Yayımlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1-Albayrak M, Konysova U, Kaya Z, Gursel T, Güntekin S, Percin EF, Kocak U. Thiopurine methyltransferase polymorphisms and mercaptopurine tolerance in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Nov;68(5):1155-9.

2-Sucak GT, Yaşar DG, Yegin ZA, Ergün MA, Ozkurt ZN, Aki ŞZ, Güntekin S. The prognostic role of hemochromatosis H63D allele in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Ann Hematol. 2012 Aug;91(8):1281-7.

3-Tug E, Kayhan G, Kan D, Güntekin S, Ergun MA. The evaluation of long-term effects of ionizing radiation through measurement of current sister chromatid exchange (SCE) rates in radiology technologists, compared with previous SCE values. Mutat Res. 2013 Sep 18;757(1):28-30.

- 4-Karabulut R, Turkyilmaz Z, Sonmez K, Kumas G, Ergun S, Ergun M, Basaklar A. Twenty-Four Genes are Upregulated in Patients with Hypospadias. *Balkan J Med Genet.* 2013 Dec;16(2):39-44.
- 5-Guney E, Iseri E, Ergun SG, Percin EF, Ergun MA, Yalcin O, Sener S. The Correlation of Attention Deficit Hyperactivity Disorder with DRD4 Gene Polymorphism in Turkey. *International Journal of Human Genetics* 2013; 13 (3): 145-152
- 6-Guney E, Iseri E, Ergun SG, Percin EF, Ergun MA, Yalcin O, Sener S. T102C and 1438 G/A Polymorphisms of the Serotonin 2A Receptor Gene in Etiology and Course of ADHD. *International Journal of Human Genetics* 2014; 14(2):59-66
- 7-Taner HA, Sener S, Ergun SG, Ergun MA, Guney E. Analysis of GNAL polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *International Journal of Human Genetics.* 2014; 14 (3-4):149-153
- 8-Aytekin E, Ergun SG, Ergun MA, Percin FE. Evaluation of GenoFlow Thrombophilia Array Test Kit in its detection of mutations in Factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and A1298C in blood samples from 113 Turkish female patients. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014 Nov;18(11):717-21.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Guntekin S, Bakır A, Ergun MA, Percin EF, JAK2 V617F mutation in hematological disorders in Turkish population.