

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**FRONTONASAL DİSPLAZİ TİP 3 AİLELERİNDE
MALFORMASYONDAN SORUMLU GENİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yavuz ŞAHİN

Tıbbi Genetik Programı

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**FRONTONASAL DİSPLAZİ TİP 3 AİLELERİNDE
MALFORMASYONDAN SORUMLU GENİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yavuz ŞAHİN

Tıbbi Genetik Programı

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nurten Akarsu

ANKARA

2015

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Programı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nurten AKARSU

(Danışman) Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞIYOĞLU

Üye: Prof. Dr. Ferda E. PERÇİN

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu kararlarıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent SİVRİ
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tıp Fakültesinden mezun olan her tıbbiyeli gibi bende büyük bir heyecanla uzmanlık eğitimime başladım. Tıbbi Genetik asistanlık eğitimim boyunca mesleğime olan heyecanımın daha fazla artmasını sağlayan, bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, insani ve ahlaki değerleriyle örnek aldığım başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet Alikışıfoğlu olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek Aktaş, Prof. Dr. Koray Boduroğlu, Doç. Dr. Eda Ütine'ye teşekkür ederim.

Hastalara tanı konulma sürecinde değerli katkılarını sunan Prof. Dr. Gökhan Tunçbilek'e ve Yard. Doç. Dr. Pelin Özlem Şimşek Kiper'e teşekkür ederim.

Tez danışmanlığımı üstlenen, tezimin her aşamasında çok değerli vaktini ayıran ve her konuda yardım ve imkanlarını esirgemeyen, hayatım boyunca bana hep yol gösterecek çok önemli değerleri söz ile değil yaşantısıyla öğreten, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Nurten Akarsu'ya teşekkür ederim.

Deneyler esnasında değerli desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr.Arda Çetinkaya'ya, Yard. Doç. Dr. Z. Ekim Taşkiran'a, Serkan Kabaçam'a, Can Koşukçu'ya ve Burak Öztürk'e teşekkür ederim.

Değerli asistan arkadaşlarım Bilgin Kütükçü, Yavuz Bayram, Ahmet Cevdet Ceylan, Mehmet Demirel'e, tüm hemşire, laboratuvar çalışanlarına ve sekreter arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Diğer branş rotasyon eğitimlerinde bana yardımcı olan hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, hemşire ve tüm çalışanlara teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

ÖZET

Şahin Y. Frontonasal displazi tip 3 ailelerinde malformasyondan sorumlu genin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Uzmanlık Tezi, Ankara 2014. Frontonazal displazi tip 3 (FND3, MIM 613456) ileri derecede mikroftalmi, iki taraflı yüz yarıkları, yarı damak, hipertelorizim, burun kanatlarının hipoplazisi ve geniş burun kökü bulgularının yanısıra kafada kemik defektleri ve kaudal eklenti bulguları ile seyirli otozomal resesif ağır bir yüz malformasyonudur. Kromozom 12q21 bölgesinde *ALX1* genini de kapsayacak şekilde mikrolelesyon ve *ALX1* geninde nokta mutasyonunun benzer fenotipleri oluşturarak FND3 malformasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada otozomal resesif geniş bir Türk FND3 ailesi yanısıra, ailede tek hasta bireyin yer aldığı Sri Lanka ve Mısır aileleri çalışılmıştır. Her üç ailede de *ALX1* geni kodlanan bölgesinde mutasyon tespit edilememiştir. *ALX1* geninde olası delesyon ve duplikasyonlar quantitative real time PCR (qPCR) and multiple ligation probe amplification (MLPA) analizleri kullanılarak dışlanmıştır. 250K SNP çip kullanılarak yapılan genotipleme ve homozigotluk haritalaması çalışılan üç ailenin ikisinde genomda tek homozigot bölgenin 12q21 bölgesinde *ALX1* genini de kapsayan 7Mb'lik alanda olduğunu göstermiştir. Üçüncü ailede FND3 malformasyonunda genetik heterojeniteyi destekler şekilde 12q21 bölgesi tamamen dışlanmıştır. Homozigotluk haritalamasının *ALX1* bölgesini işaret etmesi üzerine *ALX1* geninin kodlanmayan promoter ve regülatör bölgeler gibi alanlarında yer alan mutasyonların bu ailelerdeki FND3 malformasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bu olasılığı test etmek için intron bölgeleri dahil olmak üzere *ALX1* geni proksimal ve distal uçlarında yer alan yaklaşık 22.000 baz çifti Sanger dizileme yöntemi ile taranmış, hastalıktan sorumlu olabileceği düşünülen bir varyant tespit edilememiştir. Bunu takiben tüm ekzom ve tüm genom dizileme çalışması tamamlanmış, tespit edilen varyantların filtreleme çalışması sonucunda kritik bölgede 464 varyant tespit edilmiştir. UCSC genom veri bankası ara yüzü kullanılarak bölgeye özgü anotasyon çalışması yapılmış, 27 kritik variant pozisyonunun transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerine isabet ettiği görülmüştür. Çalışma *ALX1* geninin kodlanmayan/regülatör bölgelerindeki henüz saptanmamış mutasyonların otozomal resesif FND3 malformasyonu etyolojisinde rol aldığını gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: frontonazal displazi tip 3, *ALX1*, ileri nesil dizileme, homozigot haritalama

ABSTRACT

Şahin Y. Investigation of the gene responsible at frontonasal dysplasia type 3 families. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Thesis, Ankara, 2011. Frontonasal dysplasia type 3 (FND3, MIM 613456) is an autosomal recessive severe facial malformation characterized by bilateral extreme microphthalmia, bilateral oblique facial cleft, complete cleft palate, hypertelorism, wide nasal bridge with hypoplasia of the ala nasi, large cranial bone defects associated with caudal appendage. Both a microdeletion on chromosome 12q21 region containing *ALX1* and a point mutation in the *ALX1* produce similar phenotype. In this study, a large autosomal recessive Turkish FND3 family and two additional singleton families from Sri Lanka and Egypt were studied. DNA sequencing analysis of *ALX1* coding region failed to identify additional mutations in these three families. Putative deletions or duplications within *ALX1* gene were excluded using both quantitative real time PCR (qPCR) and multiple ligation probe amplification (MLPA) analyses. 250K SNP chip genotyping followed by homozygosity mapping revealed a single 7Mb homozygote region on chromosome 12q21 harboring *ALX1* in two out of three families. The 12q21 region was excluded in the third family providing evidence for genetic heterogeneity of FND3 malformation. Identification of homozygosity to *ALX1* region suggested that *ALX1* mutations might be located at non-coding segments such as promoter or other regulatory elements at least in some families. In order to explore this possibility approximately 22,000 base pairs from both proximal and distal parts of the *ALX1* as well as intronic regions were screened by Sanger sequencing. No causative variant was identified. Whole exome (WES) and Whole genome (WGS) sequencing followed by variant filtration analysis identified a total of 464 variants in the critical region. Region-based regulatory annotation using intuitive interface of UCSC genome browser revealed a total of 27 critical variants residing on putative transcription factor binding sites. This study clearly showed that as yet unidentified mutations lying in the non-coding/regulatory regions of *ALX1* gene contribute autosomal recessive FND3 malformation in some families.

Keywords: frontonasal dysplasia type 3, *ALX1*, next generation sequencing, homozygosity mapping

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yüz Gelişimi	3
2.1.1. Orta Yüz Gelişimi	7
2.1.2. Yüz Gelişiminden Sorumlu Moleküler Mekanizmalar	8
2.1.3. Homeobox Genleri	10
2.2. Frontonasal Displazi	12
2.2.1. Frontonasal Displazi Etiyoloji	15
2.2.2. Frontonasal Displazilere Klinik Yaklaşım ve Ayırıcı Tanı	15
2.2.3. ALX Gen Ailesi ve Frontonasal Displaziler	16
2.2.4. İleri Düzey Genetik Analiz Yöntemleri	18
2.2.4.1. Tek nükleotit polimorfizm Mikrodizin Analizi ile genotipleme	18
2.2.4.2. Homozigotluk Analizi	19
2.2.4.3. Yüksek Çözünürlüklü Genom Dizileme Yöntemleri	21
3. BİREYLER VE YÖNTEM	23
3.1. Aile Paneli ve Klinik İncelemeler	23
3.2. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi	23

	Sayfa
3.3. Sanger Yöntemi ile <i>ALX1</i> Geni DNA Dizi Analizi	24
3.4. SNP Microarray (Çip, Mikrodizin) Analizi	25
3.5. Homozigotluk Analizi	29
3.6. Genomik DNA Kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı qPZR	30
3.7. Multipl Ligasyon Prob Amplifikasyon (MLPA)	30
3.8. RNA Eldesi ve cDNA Dizi Analizi	31
3.9. <i>ALX1</i> Geni Kodlanmayan Önemli Bölgelerin PZR	31
3.10. Tüm Ekzom ve Genom Sekanslama	32
3.11. Bölgeye Özgü Anotasyon	32
4. BULGULAR	34
4.1. Klinik Bulgular	34
4.2. Laboratuvar Bulguları	38
4.2.1. <i>ALX1</i> Kodlayan Bölgelerin Dizilenmesi	38
4.2.2. DNA Çip Analizi	38
4.2.3. <i>ALX1</i> Gen Bölgesinde Kopya Sayısı Değişikliğinin Test Edilmesi	41
4.2.4. <i>ALX1</i> Geni Tüm Ekzonlarına Ait Kopya Sayısı Değişikliğinin Test Edilmesi	42
4.2.5. cDNA Dizi Analizi	42
4.2.6. 12q21.3 Kritik Bölgede Aday Gen Yaklaşımı ve <i>ALX1</i> Kodlanmayan Bölgelerin Taranması	43
4.2.7. Tüm Ekzom Dizileme(WES)	49
4.2.8 Tüm Genom Dizileme (WGS)	51
4.2.9. Kritik Bölgede Saptanan Değişikliklerin Fonksiyona Yönelik Anotasyonu	53
5.TARTIŞMA	57
6.SONUÇLAR	64
KAYNAKLAR	65

EKLER

Ek-1a Gerçek Zamanlı qPZR için Tasarlanan Primerler

Ek-1b *ALX1* Kodlanmayan Bölgelere Özgü Tasarlanan Primerler ve

Ek-2 .bed Dosyası Yapımı

Ek-3 Yazılan .bed Dosyaları

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALX1	<i>ALX homeobox 1</i>
ALX2	<i>ALX homeobox 2</i>
ALX3	<i>ALX homeobox 3</i>
ALX4	<i>ALX homeobox 4</i>
ANTP	<i>Antennapedia</i>
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
CNV	<i>Copy-Number variations</i> (Kopya Sayısı Değişikliği)
del	Delesyon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ENCODE	<i>The ENCYclopedia Of DNA Elements</i>
EDTA	Etilen-Diamin-Tetra-Asetik asit
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
GTTYPE	<i>Genotyping Analysis Software</i>
FND1	Frontonasal Displazi Tip 1
FND2	Frontonasal Displazi Tip 2
FND3	Frontonasal Displazi Tip 3
hg	<i>human genome</i>
İGBAM	İleri Genom Araştırmaları Merkezi
İGP	İnsan Genom Projesi
MAF	<i>Minimum Allele Frequency</i> (Minimal Alel Frekansı)
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
OD	Otozomal Dominant
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Çevrimiçi İnsanlardaki Mendelyan Kalıtım)
OR	Otozomal Resesif

Pax6	<i>Paired box 6</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
PRD	<i>Paired</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (dakikadaki döngü)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Tek nükleotid değişikliği)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimeraz
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz, Genome Browser</i>
USF-1	<i>Upstream stimulatory factor-1</i>
VIGENOS	<i>Visuel Genome Studio</i>
WES	<i>Whole exom sequencing</i> (Tüm ekzom dizileme)
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (Tüm genom dizileme)

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. A: 3. hafta ön nöropor ve maksiller tomurcuğun ventral görünümü, B: 4. hafta sonu frontonasal tomurcuğun oluşumu	6
2.2. A: 4.hafta frontonasal, mandibular ve maksiller tomurcuklar ile çevrelenmiş stomodeum ve orofaringeal membran B: 5.haftada orofaringeal membranın çökmesi	6
2.3. Yüz ve damak gelişim	8
2.4. Homeobox geni ve homeodomain proteini	11
2.5. <i>ALX1</i> , <i>ALX3</i> ve <i>ALX4</i> ile ilişkilendirilmiş FND klinik özellikleri	17
2.6. Homozigotluk analizlerinin tamamlandığı VIGENOS programı görüntüsü	21
3.1. DNA Çip Analizi Basamaklarının Gösterimi	26
4.1. Pedigri	35
4.2. Hastaların fotoğrafları	36
4.3. SNP çip analizi sonrası yapılan homozigotluk haritalaması	40
4.4 Gerçek zamanlı PZR görüntüsü	41
4.5. MLPA görüntüsü	42
4.6. 57 numaralı bireyin <i>ALX1</i> geni upstream bölgesinde bulunan değişiklikler	46
4.7. 57 numaralı bireyin <i>ALX1</i> geni intronik bölgesinde bulunan değişiklikler	46
4.8. 57 numaralı bireyin <i>ALX1</i> geni 'downstream' bölgesinde bulunan değişiklikler	47
4.9. 57 numaralı bireyin <i>ALX1</i> geni 'downstream' bölgesinde bulunan değişiklikler (Devam)	47
4.10. Sanger dizileme ile taranan bölgelerin gösterimi	48
4.11. Tüm ekzom ve tüm genom verisindeki değişikliklerin filtrelemeler kullanılarak eleme sonrası dağılımının gösterilmesi	52

4.12. Kritik bölgede bulunan $MAF < 0.01$ olan ve Türkiye popülasyonuna ait veri havuzunda bulunmayan değişikliklerin gösterimi	54
4.13. <i>LRR1Q1</i> geni intronik bölgesindeki USF-1 bağlanma bölgesinin sanger dizileme ile taranması	56
5.1. Genom bölgelerinin gösterimi	58
5.2. Transkripsiyon faktörü bağlanma, DNase I hassasiyeti ve türler arası korunmuşluk dikkate alınarak kritik değişikliklerin gösterilmesi	59

TABLULAR

	Sayfa
2.1. Gelişim haftalarına göre insan yüz gelişim tablosu	5
2.2. Yüz gelişiminde görev alan faktörler ve ilişkili yüz gelişim malformasyonları	9
2.3 FND ile ayırıcı tanıya giren malformasyonlar	13-14
3.1. <i>ALX1</i> geni kodlayan bölgelerinin PZR amplifikasyon koşulları	25
4.1. Tüm aile bireylerinin klinik muayene bulgular.	37
4.2. Tespit edilen homozigot blokta yerleşim gösteren genler ve fonksiyonlarını gösteren liste	43
4.3 ALX1 Kodlanan/Kodlanmayan Bölgelerinde DNA Dizileme Analizi Sonucu Bulunan Değişiklikler. (GRCh37/hg19'a göre)	45
4.4 Aile 1, 33 numaralı bireyin exom değişikliklerinin filtreleme basamakları ve sonuçları.	50
4.5. Aile 1, 32 numaralı bireyin genom değişikliklerinin filtreleme basamakları ve sonuçları.	51

1.GİRİŞ

İnsan yüz malformasyonlarının sınıflandırılması oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veri tabanında orta hat yüz yarıkları ile ilgili pek çok farklı antite tanımlanmıştır. Bunlar arasında orta hat yüz yarıkları (median cleft) olarak da adlandırılan frontonazal displazi (FND; OMIM 136760), fasial tomurcukların gelişiminde ve füzyonunda meydana gelen anormallikler sonucunda oluşan genetik olarak heterojen bir malformasyon spektrumudur. Hipertelorizm, geniş burun kökü, üst dudak/damak ve burnu etkileyen orta hat yüz yarığı, burun yapısının oluşum bozukluğu, ön beyin keseleşmesi ve V-şeklinde frontal saç çizgisi klinik bulgularından iki veya daha fazlasının bulunması ile klinik tanı konulmaktadır (1, 2).

Frontonazal displaziler çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıkmakla birlikte otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR) veya X'e bağlı kalıtılan formları da bildirilmiştir. Çeşitli çevresel etkilenmelerin orta hat yüz yarıklarına neden olabileceği de sıklıkla tartışılmaktadır (3). Son yıllarda özellikle otozomal resesif frontonazal displazilerde 'aristales like homeobox (ALX)' gen ailesini oluşturan genlerdeki mutasyonların ciddi FND fenotiplerine yol açtığı gösterilmiştir (4, 5, 6).

ALX gen ailesi *ALX1 (Cart1)*, *ALX3*, *ALX4* olmak üzere toplam üç üyeye sahiptir (7). Tüm ALX genleri birer transkripsiyon faktörleridirler ve erken embriyonik gelişim esnasında kritik genleri hedeflemektedirler. ALX genleri baş ve yüz bölgesinin normal gelişimi için gereklidir özellikle burun yapısının oluşumunda çok önemli görev üstlenmektedir fakat *ALX4* geni özellikle saç ve genital gelişimde de önemlidir (6).

Frontonazal displazi tip 1 (FND1; OMIM 137600) hafif yüz bulgularının gözlendiği ALX ilişkili frontonazal displazi spektrumu içindedir ve *ALX3* gen mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (5). Frontonazal displazi tip 2 (FND2; OMIM 613451) kranial bulgulara ek olarak genital bulguların, deri ve saç bulgularının gözlendiği *ALX4* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (6). Frontonazal

displazi tip 3 (FND3; OMIM 613456) *ALX1* ilişkili frontonazal displazi olarak adlandırılmaktadır ve *ALX1* genindeki çeşitli mutasyonlar sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (4). *ALX1* ilişkili FND fenotipi en ağır yüz malformasyonlarına yol açan gruptur ve bilateral anoftalmi yanısıra ciddi orta hat yüz yarıkları ile karakterlidir. Laboratuvarımızda benzer fenotipli çok sayıda vakada *ALX1* geni dizilenmiş herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Şu ana kadar başka bir grup tarafından da *ALX1* geninde yeni bir mutasyon vakası bildirilmemiştir. Bu durum bu malformasyona yol açan başka genlerin bulunduğunu düşündürmektedir.

Bu tezin amacı, ağır yüz maformasyonlarının genetik alt yapısının aydınlatılmasına katkıda bulunabilmek için frontonazal displazi tip 3 ile uyumlu kliniğe sahip otozomal resesif kalıtım kalıbına uygunluk gösteren ailelerde sorumlu genetik etiyolojinin araştırılması ve genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasıdır. Çalışmada *ALX1* geninde sanger DNA dizi analizi ile mutasyon saptanamayan ailelerde genom boyu DNA çip analizi, homozigotluk haritalaması, bölgeye özgü aday gen yaklaşımı, tüm genom ekzom analizi ve tüm genom dizi analizi kullanılarak fenotipe neden olan genetik değişiklik bulunmaya çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Yüz gelişimi

Yüz gelişimi embriyolojik yaşamın 4. ve 5. haftalarında başlayan kompleks süreçleri içermektedir (8, 9). Yüz gelişimi ve yüzdeki organların farklılaşması ileri düzeyde programlanmış bir süreçtir. Bu süreçte çeşitli genler, gen ürünü transkripsiyon faktörleri ve sinyal molekülleri rol oynamaktadır.

Üçüncü haftanın başında ektoderm germ yaprağı sefalik (kranial) bölgede geniş, kaudalde daha dar yassı bir disk şeklindedir. Notokord gelişirken, üstündeki ektodermi indükler. İndüklenen bölgedeki hücrelerin boyları uzar. Boyları uzamış olan hücrelerin oluşturduğu kalınlaşmış yapıya nöral plak adı verilir. Nöral plak ektodermine nöroektoderm denir. 3. haftanın sonlarına doğru nöral plağın lateral kenarları daha fazla büyüyüp yükselerek nöral katlantıları (neural fold) oluşturur. Nöral katlantılar daha sonra birbirlerine doğru yaklaşarak orta hatta birbirleri ile kaynaşır, kranial ve kaudal yönlerde devam ederek nöral tüpü oluşturur. Nöral tüpden santral sinir sistemi gelişir.

Nöral tüp başlangıçta anterior nöropor adı verilen açıklık aracılığı ile kranial uçtan ve posterior nöropor adı verilen açıklıkla da kaudal uçtan amnion boşluğu ile ilişkidir. Anterior nöropor 25. günde, posterior nöropor 27. günde kapanır. Nöroporların kapanması ile nöral tüp kapalı bir tüp halini alır ve nörolasyon tamamlanmış olur.

Her iki taraftaki nöral katlantılar birbirlerine doğru büyüyüp kaynaşırken her bir nöral katlantının en dış sınırında yer alan hücrelere nöral krest hücreleri (neural crest cell) denir. Bu hücreler epitel özelliklerini kaybederek, mezenkimal hücrelere dönüşür. Nöral krest hücreleri, nöroektodermi terkederek alttaki mezodermin içine göç eder ve yüz ile ağız boşluğunun şekillenmesine katkıda bulunurlar.

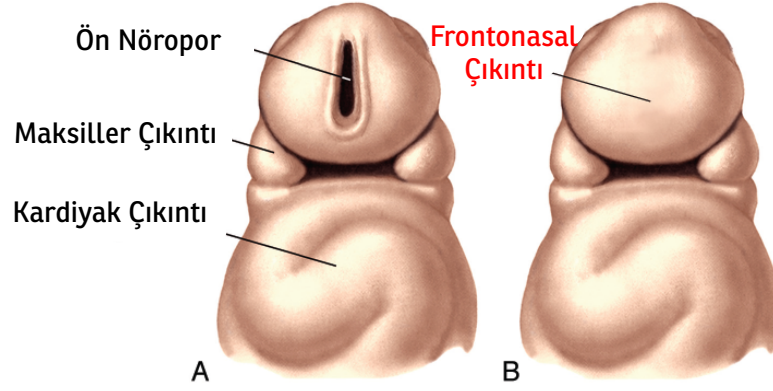
Nöral krest hücrelerinin çoğalması ve göçüyle birlikte yüz tomurcukları meydana gelir. Yüz tomurcuklarının gelişiminde epitel mezenkim etkileşimi çok önemlidir (10). Bu etkileşimin bozulduğu durumlarda frontonazal malformasyonlar ve fasial yarıklanmalar görülebilmektedir (6). Yüz tomurcukları; üst çene gelişiminin kaynak aldığı frontonazal tomurcuk, lateral nazal ve maksiller tomurcuk ve alt çene gelişiminin kaynak aldığı mandibular tomurcuktur. Gelişim sırasında bu tomurcukların programlı şekilde gelişimi ve birleşimi yüz anatomisini meydana getirecektir (11) (Tablo 2.1.).

Frontonazal tomurcuk	Alın, Burun Kökü
Lateral nazal tomurcuklar (2 adet)	Ala nasi
Medial nazal tomurcuklar (2 adet)	Nazal septum intermaksiller segment (filtrum ve üst çene premaksiller bölge)
Maksiller tomurcuk	Üst dudak yanak
Mandibular tomurcuk	Alt çene ve alt dudak

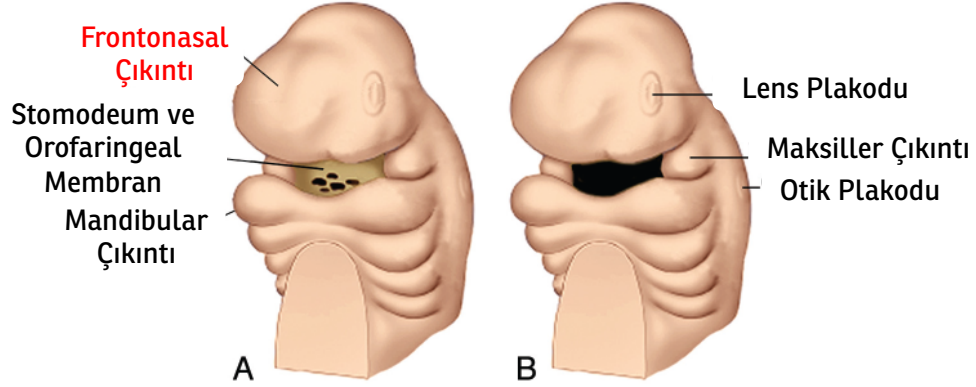
Embriyolojik yaşamın 3.haftasında ön nöropor kapandıktan sonra ön beyin genişler ve frontonazal tomurcuk oluşur (Şekil 2.1.). Dördüncü haftanın başlarında frontonazal tomurcuk ve beyin büyüdükçe ektoderm ile kaplı stomodeum adı verilen bir katlantı meydana gelir. Stomodeum ektodermi orofaringeal membranı şekillendirmek için gelişen foregut endodermine yaklaşır. Beşinci haftada, orofaringeal membran yarıklanır dolayısıyla foregut dış ortam ile etkileşebilir hale gelir (Şekil 2.2.). Aynı zamanda 1. brankiyal ark mezenkimal gelişimi 1. maksiller ve mandibular tomurcukları oluşturur. Mandibular tomurcuklar yüzün ortasına doğru hızlıca genişler, birleşir ve çeneyi oluşturur.

Tablo 2.1. Gelişim haftalarına göre insan yüz gelişim tablosu (12)

Hafta	Açıklama
3.hafta sonu	Ön nöropor kapanması
4.hafta başı	Orofaringeal membranın ortaya çıkışı
4.hafta başı	Frontonazal tomurcuğun belirmesi Stomodeum meydana gelmesi
4.hafta sonu	Orofaringeal membranın yarıklanması Nazal plakodların belirmesi
5.hafta başı	Lateral nazal tomurcuk ve medial nazal tomurcuğun belirmesi Mandibular tomurcuğun orta hatta buluşması
5.hafta sonu	Nazal kese şekillenmesi; nazal ve maksiller tomurcuk ile birleşmesi Primitif oral ve nazal kavitenin ayrılması Meckel kıkırdak formasyonunun oluşması
6.hafta başı	Oronazal membran şekillenmesi ve posterior coana'dan ayrılması Medial nazal tomurcuğun primitif nazal septumu ve primer damağı şekillendirmesi
6.hafta sonu	Lateral palatin tomurcuğun gelişimi Nazooptik çizginin ve nazolakrimal kanalın gelişimi Dış kulak gelişimi Dudaklar ve diş köklerinin ayrılması Göz kapaklarının şekillenmeye başlaması
7.hafta başı	Filtrum ve üst dudak gelişiminin tamamlanması Nazal septum gelişiminin devam etmesi
7.hafta sonu	Dış kulak gelişimi tamamlanması Nazal kıkırdak gelişimi Damağın yükselmesi ve birleşimi Gözlerin daha çok orta hatta yaklaşması Maksiller ve mandibular tomurcukların birleşmesi ile ağız boşluğunun daralması
8.hafta	Lateral nazal duvar gelişiminin tamamlanması Yüz kaslarının belirmesi
9-10.hafta	Nazal septumun damak ile birleşiminin başlaması



Şekil 2.1. (A) 3.hafta ön nöropor ve maksiller tomurcuğun ventral görünümü
 (B) 4.hafta sonu ön nöroporun kapanması ve frontonazal tomurcuğun oluşumu. *American Journal of Neuroradiology* 2013 (12): 2233-2240'den uyarlanmıştır (12).



Şekil 2.2. (A) 4. hafta frontonazal, mandibular ve maksiller tomurcuklar ile çevrelenmiş stomodeum ve orofaringeal membran.

(B) 5.haftada orofaringeal membranın çökmesi *American Journal of Neuroradiology* 2013 (12): 2233-2240'den uyarlanmıştır (12).

2.1.1 Orta Yüz Gelişimi

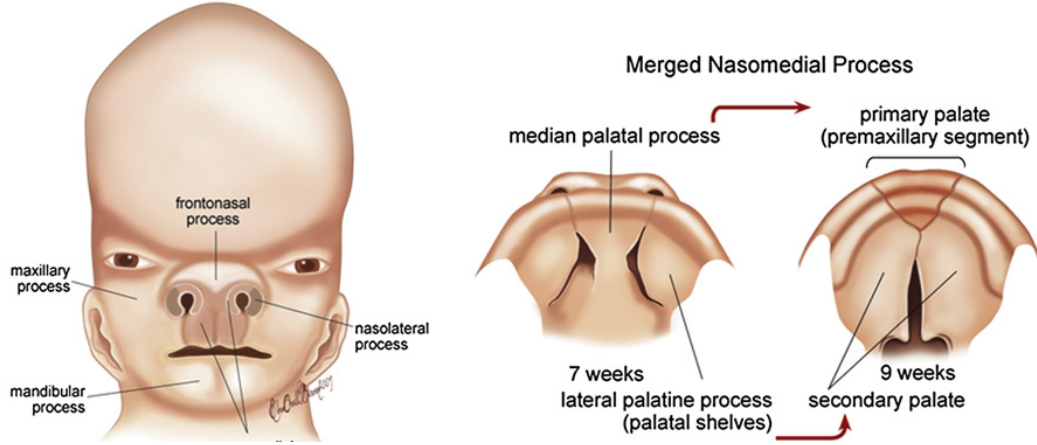
Beşinci haftada nazal kesecikler gelişirken maksiller tomurcuk orta hatta doğru ilerler. Aynı zamanda medial nazal tomurcukların genişlemesi her iki nazal kese açıklıklarının yarıklanmasına neden olur. Altıncı haftada her iki medial nazal tomurcukların orta kısmı, nazal keseciklerin altına ve yanına yerleşir.

Orta yüz gelişiminin en önemli aşaması burun gelişimidir. Burun gelişimi frontonazal, medial nazal ve lateral nazal tomurcukların orta hatta birleşmeleri sonucu oluşur. Medial nazal çıkıntı burun yanısıra filtrum, premaksiller bölge ve primer damağın oluşumuna da katkı yapmaktadır (Şekil 2.3). Altıncı haftada orofaringeal membranın yarıklanmasıyla nazal kesecikler burnu oluşturacak nazal kavitelere dönüşür. Yedinci haftanın başlarında nazal keseciklerin ön kısmı, primer damak ve orta palatal tomurcuk birleşerek ağız boşluğunun üst kısmını yapar. Sekizinci haftada primer koana ve primer nazal kavite arkaya doğru genişler ve koana yapısı oluşur. Daha sonra nazal septum primer koana dokusundan meydana gelir (13).

Ön yüzde, primer nazal kaviteler ile ağız boşluğu primer lateral palatal tomurcuklar tarafından ayrılır. Bu çıkıntılar arka yönde ağız boşluğuna doğru genişlemesiyle palatal raflar meydana gelir.

Sekizinci hafta sonunda dil alçalırken palatal raflar dilin üzerine doğru uyum göstererek yerleşir. Daha sonra palatal raflar yükselmeye başlar ve birbirlerine doğru büyür ve orta hatta birbirlerine ve nazal septuma temas ederler.

En sonunda, 9. haftada, palatal raflar ve nazal septum birleşir. Böylece ağız boşluğu ile nazal kavite birbirinden ayrılmış olur ve nazal septum ile sekonder damak meydana gelmiş olur (13).



Şekil 2.3. Yüz ve damak gelişimi. Frontonazal tomurcuk burun kökünü oluştururken burun ucu, filtrum ve primer damak (premaksilla) medial nazal tomurcuk tarafından oluşturulmaktadır. Burun kanatları lateral nazal tomurcuklar tarafından meydana getirilir. *The American Journal of Human Genetics 2010 (5):789-976'den alınmıştır (4).*

2.1.2 Yüz Gelişiminden Sorumlu Moleküler Mekanizmalar

Yüz gelişimi, nöral krest ve prekordal mezenkimal hücrelerinin oluşumu, göçünü ve epitel mezenkim etkileşimini içeren çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreç spesifik genler ve o genlerin ürünleri tarafından kontrol edilmektedir.

Santral sinir sistemi, nöral krest ve nöral plate ön kenarından gelişen plakodlar ortak öncü bir yapıya sahiptirler. Nöral krest ve ilişkili gen ürünleri normal bir kraniofasial gelişim için gereklidir. Bu nedenle nöral krest hücre göçü ve organizasyon bozuklukları fasial anomalilere de neden olmaktadır.

Erken gastrulasyon esnasında salgılanan pek çok nöral ve nöral yolak dışı sinyal molekülü plakodların farklılaşmasını sağlar. Plakod formasyonunda özellikle *Six* ve *Eya* nükleer faktör ailesi önemli rol oynar. Örneğin *Pax6*, *Six3* ve *Otx2* ön plakod hücrelerinde eksprese olurken, *Irx1/2/3* ve *Gbx2* arka plakod hücrelerinde ifade olur. *Pax6*, *Six3* ve *Otx2* genlerindeki mutasyonlar özellikle göz gelişim anomalilerine yol açmaktadır (14-16). Iraquase (*Irx*) homeodomain protein ailesinin bir üyesi *Irx5*'in hipertelorizim ve tipik yüz görünümü ile seyirli

gelişim anomalisine yol açtığı da gösterilmiştir (17).

Kraniyofasial gelişimde görev alan tomurcuklar, ektoderm tabakası ile kaplı mezenkim kaynaklı farklılaşmamış nöral krest içermektedir. Bunların gelişiminin kontrolünde epitel mezenkim etkileşimleri çok önemli olmaktadır. Yüz gelişimi, hücre çoğalması ve farklılaşması büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri tarafından düzenlenir. Şu ana kadar yüz gelişiminde önemli rol aldığı gösterilen faktörler; fibroblast büyüme faktörü (fgf), transforming büyüme faktörü- β (tgf- β), kemik morfojenik proteinler (bmp), sonic hedgehog (shh), Wnt ve endotelin-1 (ET-1) şeklindedir (18). Aynı zamanda bu sürece homeobox içeren genler, platelet kaynaklı büyüme faktörü (pdgf) ve jagged 1 ve 2 katkıda bulunmaktadır. Bu faktörlerin ve sinyal moleküllerinin bozukluklarından kaynaklanan yüz anormallikleri ile kliniğe yansıyan çeşitli hastalıklar ve genetik sendromlar da tanımlanmıştır (Tablo 2.2). Bu genlerden tez konusu ile ilgili olan homeobox genleri yapı ve fonksiyonları hakkında detaylı bilgi bölüm 2.1.3'de sunulmuştur.

Tablo 2.2. Yüz gelişiminde görev alan faktörler ve ilişkili yüz gelişim malformasyonları (19)

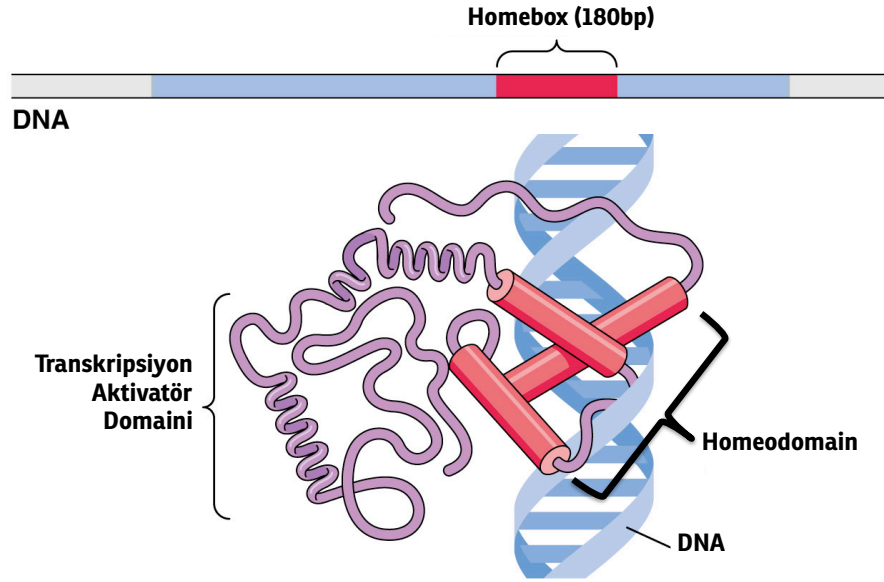
Faktör	İlişkili anomaliler ve sendromlar
fgf	Yüz gelişiminde, fasial çıkıntılarının gelişimini ve nöral krestin göçünü kontrol eder. Akondroplazi, Crouzon Sendromu, Apert Sendromu, Küçük yüz ve küçük kafatası, Kallmann Sendromu
tgf	Lateral palatal çıkıntılarının füzyonu için gereklidir. Eksikliğinde maksillar ve mandibular gelişim defektleri gözlenir.
bmp	Eksikliği frontal ve nazal kemiklerin kısa olmasına neden olur. Kısa boy, kulak anomalileri, odontogenik problemler, nöral tüp kapanma defektleri, kesici diş eksikliği
Shh Protein	Holoprosensefali, hipotelorizm, geniş alın kökü, frontonazal displazi, Gorlin sendromu, Grieg sefalopolidaktili, Smith-Lemli-Opitz sendromu
Wnts	Diş eksikliği, Çene anomalileri
ET-1	Maksilla defekti, yarık damak, Orta ve dış kulak anomalileri, 22q11.2 delesyon sendromu
Jagged 1-2	Alagille sendromu, palatal rafların yükselme ve füzyon kusuru
pdgf	Bazı yüz kemik anomalileri
Homeobox genleri	Yarık damak, kısa mandibula ve maxilla, molar diş eksikliği, frontonazal displazi

2.1.3 Homeobox Genleri

Homeobox genleri anatomik gelişim (morfogenezis) düzenlenmesinde görev alan büyük bir gen ailesidir. Bu genler homeobox adı verilen ortak bir DNA dizisine sahiptirler ve DNA üzerinde heliks-kıvrım-heliks yapısını tanıyıp bağlanabilen homeodomain adı verilen protein kodlamaktadırlar (20) (Şekil 2.4). Homeobox genleri sekans spesifik DNA üzerine bağlanan ve diğer genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Homeobox dizisi yaklaşık 180 nükleotid uzunluğundadır ve 60 amino asitlik homeodomain protein kodlamaktadır (21). Homeodomain protein hedef DNA üzerinde özgül dizinin tanınmasını ve bağlanmasını sağlayan türler arası oldukça korunmuş üç alfa heliks yapısı içermektedir (22). Günümüze kadar insanda yaklaşık 330 adet homeobox geni tanımlanmıştır (23).

Homeobox gen ailesi en büyük grubu Antennapedia (ANTP) ve Paired domain (PRD) gen aileleri olmak üzere toplam 11 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar; *ANTP*, *PRD*, *TALE*, *POU*, *CERS*, *PROS*, *ZF*, *LIM*, *HNF*, *CUT* ve *SINE* gen aileleridir (21). İnsanda tanımlanan pek çok homeobox geni *Drosophila* genomunda tanımlanan homeobox genleri ile benzerdir (24). Yapılan knockout çalışmaları homeobox genlerinin bir kısmının yüz gelişiminde görev aldığını göstermiştir. Örneğin Hoxa-2 nöral krest ve eklerinde eksprese olurken, diğer Hox sınıfı genler kraniofasial gelişimde rol alır (25).

Fasial promordia gelişiminde görev aldığı gösterilen diğer homeobox genleri de şu şekilde sıralanmaktadır: *Msx-1, -2, MHox, Dlx-1-6, Barx-1, -2, Otx-2, GH6, Gsc-1, Plx-1, Reig, Pax-3, -6, -7, Alx-1,3,4* (26-29).



Şekil 2.4. Homeobox geni ve homeodomain proteini (http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-23/23_28.jpg alınmıştır.)

Paired Related Genler (PRD)

Alx genlerinin de bir üyesi olduğu Paired box ailesi tanımlanan ikinci en büyük homeobox gen ailesidir. Bu gen ailesi ismini *Drosophila* bulunan *Paired* geninden almaktadır. PRD sınıfı homeobox genleri *PAX* ve *PAXL* genleri olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır (21). Bu proteinler 60 amino asit'lik korunmuş homeodomain (DNA'ya bağlanan domain) yapısı açısından diğer homeobox proteinlerine benzerlik gösterirler (27). *PAX* genleri homeodomain'e ilave olarak paired-box motif adı verilen ve proteinin C-terminalinde yer alan 128 amino asitlik PRD domaini içermektedir (30).

PRD sınıfı homeobox genleri aşağıda sıralanmıştır. Parantezlerin içindeki sayılar o gen ailesinde kaç üyenin bulunduğunu göstermektedir: *Alx(3)*, *Argfx(3)*, *Arx(1)*, *Dmbx(1)*, *Dprx(8)*, *Drgx(1)*, *Dux(36)*, *Esx(1)*, *Gsc(2)*, *Hesx(1)*, *Hopx(1)*, *Isx(1)*, *Leutx(1)*, *Mix(1)*, *Nobox(1)*, *Otp(1)*, *Otx(4)*, *Pax2/5/8(3)*, *Pax3/7(2)*, *Pax4/6(2)*, *Phox(2)*, *Pitx(3)*, *Prop(1)*, *Prrx(2)*, *Rax(2)*, *Rhox(3)*, *Sebox(1)*, *Shox(2)*, *Tprx(5)*, *Uncx(1)*, *Vsx(2)*.

Yüz gelişimi esnasında bu genlerin pek çok görevleri bulunmaktadır. Bunlardan *Pax-6* geni kraniofasial ve nöral krest gelişimi ile ilişkilirken, *Pax-3* nöral krest hücrelerinin göçünden sorumludur (31). *Alx* genlerinin her üç üyesinin (*Alx1, 3, 4*) de kranial ve yüz gelişimine katıldığı da gerek insan gerekse diğer türlerde (fare ve zebra balığı) gösterilmiştir (32-34).

2.2. Frontonazal Displazi

Frontonazal displazi (FND [MIM 136760]), baş ve yüz bölgesiyle sınırlı olan, hipertelorizm, burun kökü genişliği, üst dudak/burun ve damağı içine alan orta hat yüz yarığı, tek veya iki taraflı ala nasi yarıklanması, burun yapısının oluşamaması, gizli ön beyin keseleşmesi ve V şeklinde ön saç çizgisi klinik bulgularından iki tanesini içermesiyle tanımlanır (2). Yüz gelişimi sırasında tomurcukların birleşiminde meydana gelen bir orta hat defekti olduğu için bu malformasyona "orta hat yüz yarıklanması (median cleft)" da denir FND yüz bulguları hipertelorizm'den çok ağır orta hat yüz yarıklarına kadar varan geniş bir klinik spektrumda karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca FND'de ek organ veya sistem tutulumu da gözlenmektedir. Ek organ veya sistemi içeren klinik bulgular hem FND diğer hastalıklar ile olan ayırıcı tanısında hem de kendi içindeki alt tiplerinin ayırımında kullanılmaktadır. Belirgin bir sınıflandırma sistemi bulunmamaktadır. Literatürde FND grubuna giren pek çok farklı sendrom bulunmaktadır. Tablo 2.3.'de bu örtüşen fenotipler, kalıtım kalıpları ve malformasyondan sorumlu genler özetlenmiştir.

Tablo 2.3. FND ile ayırıcı tanıya giren malformasyonlar

Hastalık Adı	Frontonasal Displazi	Kraniofrontonasal Displazi	Serebrofrontofasiyal Sendrom	Akromelik Frontonasal Disostozis	Akrofrontofasiyonal Dizostozis	Oculoauriculofrontonasal Sendrom	Frontofasiyonal Displazi	Palpebral Lipoma Koloboma Sendromu	Hamamy Sendromu
OMIM Numarası	136760	304110	608578	603671	201180	601452	229400	145420	611174
Kalıtım Kalıbı	OR	X'e bağlı	-	OD	-	-	OR	OD	OR
Sorumlu Gen	<i>ALX1, ALX3, ALX4,</i>	<i>EFNB1</i>	-	<i>ZSWIM6</i>	-	-	-	-	<i>IRX5</i>
Klinik Özellikler									
Baş Boyun									
-Brakisefali	+	+	+	+	+	-	+	+	+
-Gizli ön beyin keseleşmesi	+	-	-	+	+	-	+	-	-
-Prefrontal lipoma	-	-	+	-	-	-	+	+	-
-Frontal kemik hipoplazisi	-	+	-	-	-	+	+	-	-
-V şeklinde saç çizgisi	+	+	+	-	-	-	-	-	-
-Düşük saç çizgisi	-	-	-	-	+	-	-	-	+
-Kıvrımlı frontal saç	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-Frontal bossing	+	+	-	+	+	+	-	-	-

Tablo 2.3. (Devam) FND ile ayırıcı tanıya giren malformasyonlar									1
-Hipertelorizm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-Mikroftalmi / Anoftalmi	+	-	-	+	-	-	-	-	-
-Koloboma	+	-	+	+	+	-	+	+	-
-Katarakt	+	-	-	-	+	-	+	-	-
-Telekantus/Epikantus	+	+	+	+	-	-	+	+	-
-Pitozis	+	-	-	+	+	-	+	-	-
-Aşağı eğimli göz aralıkları	-	+	+	-	+	+	+	+	-
-Nistagmus	-	+	-	-	-	-	+	-	-
-Progresif myopi	-	-	-	+	-	-	-	-	+
-Kolumella	+	+	+	+	+	+	-	-	-
-Uzun filtrum	-	-	+	-	-	+	-	-	+
-Lateral seyrek kaş	-	-	-	+	-	-	-	-	+
-Kulak anomalileri	+	-	-	+	+	+	-	-	+
-Kulakta pit	-	-	-	-	-	+	-	-	+
-Burun yarıklanması	+	+	-	+	-	-	+	-	+
-Burun yapısı oluşum kusuru	+	-	-	+	-	-	-	-	-
-Geniş burun köprüsü	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-Maksillar hipoplazi	+	-	-	-	-	-	-	+	-
-Orta hat dermoid kist	-	-	-	+	-	+	-	-	-
-Orta hat yüz yarığı	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-Yarık damak/dudak	+	+	+	+	+	+	+	-	-
-Diş anomalileri	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Ek Bulgular									
-Zeka Geriliği	-	-	+	+	+	+	+	-	+
-SSS Anomalisi	+	+	+	+	+	+	+	-	+
-Ekstremitte Anomalileri	-	-	-	+	+	-	-	-	+
-Genital Anomaliler	ALX4 +	+	+	+	-	-	+	-	+

2.2.1. Frontonazal Displazilerde Etiyoloji

Frontonazal displazilerin etiyolojik sebebi tam olarak aydınlatılamamıştır. Vakalar sporadik olarak gözlenmekle beraber çeşitli çevresel faktörlerle ve genetik nedenlerle meydana gelmektedir.

Frontonazal displaziler genetik ve fenotipik olarak heterojen bir durumdur. Şu ana kadar FND spektrumuna giren 6 farklı malformasyonda nitelikten sorumlu genetik etiyoloji saptanmıştır (Tablo 2.3.). Bu genlerden *EFNB1* X'e bağlı kalıtım gösterirken ALX gen ailesinin üç üyesi (*ALX1*, *ALX3*, *ALX4*), ve *IRX5* gen mutasyonları otozomal resesif frontonazal displazi fenotiplerine yol açmaktadır. *ZSWIM6* genindeki mutasyon ise ekstremit malformasyonlarının eşlik ettiği ve otozomal dominant olarak kalıtılan akromelik frontonazal disostozis fenotipine yol açar (35).

Bu genlerden *EFNB1*, nöranal, epitel ve vasküler gelişim esnasında hücre göçü ve adhezyonundan sorumlu transmembran yapıda tirozin kinaz reseptör ligandı kodlamaktadır (36). *ZSWIM6* ise retina, arka ve ön beyinde eksprese olmaktadır ve Hedgehog sinyal yolağında görevli alır (35).

2.2.2. Frontonazal Displazilere Klinik Yaklaşım ve Ayırıcı Tanı

Hastaların değerlendirilmesinde ilk basamak fizik muayenedir. Vakaların bir kısmı kalıtsal olduğu için sistematik pedigrî analizi uygulanmalıdır. Frontonazal displazi açısından dikkat edilecek özellikler; hipertelorizm, ciddi yüz yarıkları, göz ve damak gelişimde eksiklik olmasıdır. Frontonazal displazilerde her ne kadar klinik bulgular baş ve yüz bölgesiyle sınırlı olsada ek organ veya sistem tutulumu hem ayırıcı tanıda hemde FND alt tiplerinin belirlenmesinde faydalı olmaktadır.

Klinik örtüşme gösteren fenotipler için şu ana kadar bu spektruma yol açtığı bilinen genlerde DNA dizi analizi ile mutasyon taraması uygulanabilir. Kromozom kopya sayısı değişiklikleri de (özellikle *ALX1* bölgesini kapsayan 12q21

bölgesinde kromozom delesyonları) gösterildiği için MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) yöntemi ile *ALX* genlerinde kopya sayısı değişikliği olup olmadığı araştırılmalıdır. *ALX* gen ailesinin her üç üyesi için de MLPA kiti mevcuttur (SALSA MLPA P080 Craniofacial probemix, MRC, Holand).

2.2.3. *ALX* Gen Ailesi ve Frontonazaldisplaziler

ALX genlerinin isimlendirilmesi *Drosophila* türüne ait bir homeobox geni olan, *aristaleless* üzerinden yapılmıştır (37). *Aristaleless* like homeobox (*ALX*) gen ailesi, paired tipi homeodomain ve OAR veya *aristaleless* domain olarak da bilinen korunmuş C-terminal bir bölge ile karakterize paired sınıfı (PRD) homeobox genlerine dahildir (7). *ALX* gen ailesinin sahip olduğu homeodomain oldukça korunmuş heliks-kıvrım-heliks motif yapısında DNA üzerine bağlanan özel bir dizi domaini kodlamaktadır (38). Bu domain embriyo gelişiminde çok kritik görevler üstlenmektedir (25). OAR domainin ne etki yaptığı tam olarak bilinmemekle birlikte farklı *Alx* genlerinde gen ekspresyonunda düzenleyici etki yapan molekül içi kontrol mekanizması olduğu yönünde kanıtlar vardır (39).

Omurgalılarda *Alx* gen ailesinin *Alx1* (*Cart1*), *Alx3* ve *Alx4* olmak üzere üç üyesi bulunmaktadır. Şimdiye kadar *Alx2* omurgalılarda tanımlanmamıştır (32). Bütün *Alx* genleri yapısal olarak 4 exon içeren genlerdir ve farklı kromozomlarda yerleşim gösterirler. *ALX1* geni kromozom 12q21 bölgesine yerleşik olup koda dönüşen bölgesi 1445 baz çifti uzunluğundadır (ENST00000316824) ve 326 amino asit kodlar. İnsanlarda *ALX3* ve *ALX4* genleri sırasıyla kromozom 1p13 ve kromozom 11p11 bölgelerinde yerleşik durumdadır.

ALX genleri ile ilişkilendiren fenotiplerin tamamı otozomal resesif nitelik gösteren malformasyonlardır. *ALX4* gen mutasyonlarında heterozigot değişikliklerin parietal foramina (40) ve hafif şiddette frontonazal displazi (41) yaptığı da gösterilmişse de *ALX1* ile ilişkili olan fenotiplerde şu ana kadar sadece homozigot mutasyonlar hastalıkla ilişkilendirilmiştir (4). *ALX*-ilişkili fenotiplerin klinik özellikleri Şekil 2.5.'de tanımlanmıştır. Tez konusu olan *ALX1* ile ilişkili olan fenotip (FND3, MIM 613456) bu spektrumda en ağır kliniğin gözlendiği yüz gelişim anomalisidir.



ALX1 ilişkili FND
FND3, OMIM 613456

- Bilateral Mikroftalmi
- Hipertelorizm
- Geniş Burun Köprüsü
- Düşük Yerleşimli Kulaklar
- Şiddetli Oblük Yüz Yarığı
- Üst Dudak Yokluğu
- Tam Kat Damak Yarığı
- Kaudal Apendaj

ALX4 ilişkili FND
FND2, OMIM 605420

- Kafa kemik defektleri
- Korpus Kallosun Agenesisi
- Brakisefali
- Alopesi
- Blefarofimozis
- Hipertelorizm
- Arayıcı Nistagmus
- Bifid Basık Burun Yapısı
- İnmemiş Testis,
- Hipogonadizm

ALX3 ilişkili FND
FND1, OMIM 136760

- Ptozis
- Hipertelorizm
- İris Kolobomu
- Geniş Burun Köprüsü
- Bifid Burun Yapısı
- Geniş Kolumella
- Uzun Filtrum
- Orta hatta dermoid kist

Şekil 2.5. ALX1, ALX3 ve ALX4 genleri ile ilişkilendirilmiş FND klinik özellikleri. The American Journal of Human Genetics 2010 (5):789-976'den alınmıştır (1).

2.2.4. İleri Düzey Genetik Analiz Yöntemleri

İnsan Biyolojisi alanında ve teknolojide yaşanan baş döndürücü gelişmeler çok yakın bir zamanda genomun tamamının analiz edilmesine imkan sağlamıştır. Artık genomun sadece belirli bir bölgesinden düşük çözünürlükte veri elde etmek yerine genomun tamamından çok yüksek çözünürlükte veri elde edilmektedir. İleri genom teknolojileri genom boyu tek nükleotit polimorfizm (single nucleotide polymorphism; SNP) çiplerinin geliştirmesinden genom boyu tüm genlerin dizilenmesine (ekzom analizi, whole exome sequencing, WES) ya da tüm genomun dizilenmesine (whole genome sequencing, WGS) olanak sağlamaktadır. Bu durum özellikle hastalık genlerinin saptanmasında devrim niteliğinde gelişmelere neden olmuş hastalıklara neden olan çok sayıda gen bu yöntemlerin iç içe kullanılmasıyla hızla saptanır hale gelmiştir.

Tez içeriğinde de bu yöntemlerin tamamı kullanıldığı için genom boyu SNP çip analizi ile genotipleme, homozigotluk haritalaması, genom boyu dizileme yöntemleri hakkında bölüm içinde genel bilgi verilmiştir.

2.2.4.1. Tek nükleotit polimorfizm (SNP) Çip Mikrodizin Analizi ile genotipleme

Genomdaki tek nükleotit polimorfizimlerinin (SNP) analiz edilmesi amacı ile kullanılır. SNP microarray temel olarak, genomun enzimle kesilmesi, kesilen uçlara adaptörlerin bağlanması, adaptöre özgü primer ile tüm genomun amplifikasyonu, genomun 50-100 baz çiftlik parçalara ayrılması (fragmentasyonu), floresan işaretleme, cam yüzey (çip) üzerinde hibridizasyonu, ve bir tarayıcı yardımıyla çiplerin okunup program yardımıyla elde edilen ham verinin genotiplendirmeye çevrilmesine dayanır. Bu analiz sonucunda her bir bireye özgü ilgili tek nükleotit değişikliği için (örneğin Adenin bazının Guanin bazına değişmesi gibi; A>G değişikliği) üç farklı genotip (AA, AG veya GG) elde edilebilir. İki alelli bu sistemde toplumda yaygın olan alel (A) nadir olan ise (B) olacak şekilde ilgili değişiklikler AA, BB ve AB şeklinde ifade edilir. Farklı sayıda (10.000-2.700.000) SNP değişikliği içeren çipler vardır. Tespit edilen bu genotipler daha sonra uygulanacak analize göre genom boyu bağlantı (linkage), genom

boyu ilişki (association) ya da bağlantı analizinin özel bir alt türü olan homozigotluk analizi uygulaması için kullanılabilir. Farklı kalıtım kalıbı varsayımları altında haplotip analizi uygulanabilir.

Tez içeriğinde homozigotluk analizi kullanıldığı için bu yöntem hakkında detaylı bilgi bölüm 2.4.2'de sunulmuştur.

2.2.4.2. Homozigotluk Analizi

Otozomal resesif hastalıklara özgü olarak genomda paylaşılan bölgelerin ortaya konmasına yönelik bir gen haritalama yöntemidir (42). Akraba evliliği yapmış bir ebeveynin çocuklarında hem anneden hem de babadan kalıtılan ortak alelleri saptamaya yönelik bir analizdir. Bilindiği gibi eş kromozomlar mayozda karşı karşıya gelerek birbirleri ile parça değişimine uğrarlar (crossing over). Bu değişimler sonucunda oluşan yavru kromozomlar ana ve babanın kromozomlarına benzeyebileceği gibi tamamen farklı bir yapılanma da ortaya çıkarabilir (rekombinasyon olgusu). Bir kromozom üzerinde birbirine çok yakın yerleşimli genler parça değişimine uğramaz ve bir sonraki kuşağa birarada kalıtılırlar (bağlantılı kalıtım: Linkage). Bu sonraki kuşaklarda ortak haplotiplerin görülmesi ile sonlanacaktır.

Akraba evliliklerinde de hem anneden hem de babadan ortak kalıtılan homozigot haplotip blokları ortaya çıkacaktır. Otozomal resesif hastalıklarda anne-babanın heterozigot haplotipe sahip olması, hastalıktan etkilenmiş çocukların ise homozigot haplotipe sahip olması beklendiği için genomda tespit edilen homozigot blokların hastalık bilgileri ile karşılaştırılması sonucu gen lokalizasyonlarını bulabilmek mümkündür. Bu analizde anne-babanın heterozigot; hasta çocukların homozigot hasta; ve normal kardeşlerin ise homozigot normal aleli almış olması ya da heterozigot olmaları koşulu test edilmektedir (42).

Genomda homozigot blokları saptamaya yönelik farklı programlar mevcuttur. Tez içinde Hemosoft şirketi tarafından geliştirilmiş olan Visual

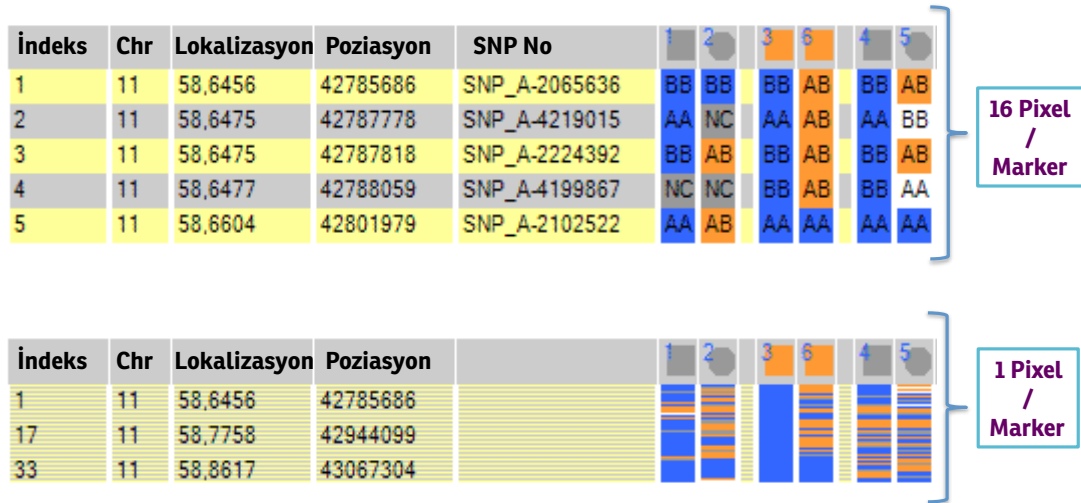
Genome Studio (VIGENOS) programı kullanılmıştır. Genom boyu çip verilerinden elde edilen genotip bilgileri bu programa aktarılır. SNP çipleri tek baz değişikliğine dayalı olduğu için iki alelli sistemlerdir, böylelikle bir birey ya AA, ya BB genotipine sahip olur ya da heterozigot olarak AB genotipini taşır. Tüm bireylerin aynı genotipi taşıdığı SNP belirteçleri informasyon vermeyen belirteçlerdir ve ilk aşamada bunlar filtrelenir. Kalan belirteçler genom pozisyonlarına göre sıraya dizilir. Anne-baba ve indeks hasta birey üzerinden haplotip oluşturulur (Şekil 2.6.). İndeks vakanın homozigot olarak anne ve babasından aynı alleli aldığı belirteçler "mavi renk ile" işaretlenir (AA, BB durumu), indeks vakanın heterozigot (AB) olduğu durumlarda belirteçler 'sarı renk' ile işaretlenir. Genotipleme yapılamayan alleller (No Call: NC) "gri renk ile" işaretlenmektedir. Daha sonra diğer kardeşer bu indeks vakanın genotipleri ile karşılaştırılır ve blokları görünür kılmak için farklı renk kodları kullanılır.

-İndeks vaka ile aynı homozigot genotipi içerenler mavi (indeks ve karşılaştırılan bireyin her ikisi de AA genotipi gibi)

-İndeks vaka ile farklı homozigot genotipi içerenler beyaz (indeks vaka AA iken karşılaştırılan birey BB olduğu durum)

-heterozigot aleller (AB durumu) turuncu ile işaretlenir.

Şekil 2.6.'da 16 pixel ve 1 pixel büyütmede renk kodları ile genotipler görülmektedir. İlgili program kullanılarak çok sayıda hastalığın homozigotluk haritalaması yapılmış ve hastalıktan sorumlu genlerin saptanması mümkün olmuştur (4, 6, 43-46).



Şekil 2.6. Genom boyu genotip bilgilerinin görselleştirildiği ve haplotip analizin tamamlandığı VIGENOS programı görüntüsü. Veriler 1 ve 16 pixel olmak üzere iki farklı çözünürlükte değerlendirilebilir.

16 pixel görüntü: Her SNP belirteci 16 pixel yüksekliğinde bir satırla gösterilir. İndeks vaka ile aynı homozigot genotipe sahip ise (AA) mavi, farklı homozigot haplotipe sahip ise (BB) beyaz, heterozigot genotipler ise (AB) turuncu gösterilir. Eğer anne baba çocuk hepsi heterozigot haplotipe sahipler ise sarı ile gösterilir. Sinyal alınamayan bölgelere NC (*No-call*) denir ve bunlar gri ile gösterilir,. Bu çözünürlükte, bütün belirteç detayları ve SNP numaraları görünür haldedir. SNP numaraları kullanılarak kritik bölgenin sınırları tam olarak ortaya çıkarılabilir.

1 pixel görüntü: Bu, sıkıştırılmış görüntüdür. Bu sayede geniş bloklar görülebilir.

2.2.4.3. Yüksek Çözünürlüklü Genom Dizileme Yöntemleri

Yeni nesil dizileme teknolojisi (next generation sequencing, NGS) ile büyük genom parçalarını hızlı ve yüksek doğruluk oranı ile dizilemek mümkündür. Milyonlarca bazın tek bir koşumda dizilenebilmesi birinci nesil (Sanger) dizilemeye kıyasla oldukça düşük bir maliyetle gerçekleşir. Bu teknoloji sayesinde son yıllarda tek gen hastalıklarından sorumlu genlerin keşfinde büyük

bir artış meydana gelmektedir. Yeni nesil dizileme kullanılarak insan genomunun tamamı (3.2 milyar baz çifti) dizilenebildiği gibi, sadece protein kodlayan bölgelerin (yani tüm ekzom) dizilenmesi de yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu yöntem sayesinde tüm genomu dizilemek yerine protein kodlayan ekzomlara odaklanması, dizileme maliyetinin önemli oranda (50 kata kadar) düşmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca, veri analizinde sadece ekzonların filtrelenmesi ile hızlı sonuç alınması sağlanmaktadır. Ekzom dizilemek için hedef ekzomlara özgül olarak tasarlanmış primer/prob setleri kullanılmaktadır. Buna karşın genomun kodlanmayan bölgelerinde yer alan varyantlar bu yöntemle saptanamaz. Bunun için tüm genom dizilemek gereklidir. Araştırmacılar farklı problemlerde değişik yaklaşımları seçebildiği gibi, kimi durumlarda her iki dizileme yöntemi de uygulanmaktadır.

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Aile Paneli ve Klinik İncelemeler

Hacettepe Üniversitesi Pediyatrik/Tıbbi Genetik ve Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dallarının ortaklaşa takip ettiği geniş bir FND3 malformasyonlu aile (Aile 1) yanı sıra Sri Lanka (Aile 2) ve Mısır'dan (Aile 3) gönderilen benzer fenotipli iki vaka bu tez incelemesine dahil edildi. Aile 1'den toplam 12 birey saha koşullarında muayene edildi, fotoğrafları çekildi ve toplum sağlığı merkezinde kanları alındı. Aile ağacı detaylandırıldı. Detaylı pedigr analizi otozomal resesif kalıtım kalıbını düşündürdü. Sri Lanka'dan gönderilen Pakistan kökenli ailede (Aile 2) ve Mısır ailesinde (Aile 3) tek vaka olmasına rağmen akraba evliliği bulunması ve FND3 fenotipine benzerlik göstermeleri nedeni ile çalışmaya dahil edildi.

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (12 Aralık 2012 tarih ve LUT 12/179-13 no'lu karar)

3.2. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi

Pedigr oluşturulduktan sonra araştırmaya katılacak normal ve etkilenmiş olan aile bireylerinden onayları alınarak EDTA'lı tüplere 5-10 cc periferik venöz kan alındı. DNA izolasyonu amonyum asetat tuzuyla çöktürme yöntemiyle yapıldı.

Genomik DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü için laboratuvarımızda bulunan NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanıldı. DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmektedir. DNA'nın temizliği için A260/280 ve A260/230 değerlerine bakılmaktadır. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230 nm dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır. Temiz bir DNA' da A260/280 oranı 1,8 ile 2,0 arasında; A260/230 oranı ise 2' den büyük olmalıdır. 1,8' in altında elde edilen A260/280 değeri protein

kontaminasyonunu, 2' nin üzerinde elde edilen A260/280değeri de RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir.

3.3. Sanger yöntemi ile *ALX1* geni DNA dizi analizi

ALX1 geni dört exonu, exon-intron birleşme noktaları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılarak çoğaltıldı. Amplifikasyon için internette Primer3 programı kullanılarak (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 4 set primer tasarlandı. PZR reaksiyonu için *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enzimi kullanıldı. Geneamp® PCR System 9700 termal *cycler* cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA) Tablo 3.1.'de gösterilen amplifikasyon koşulları altında PZR reaksiyonu tamamlandı. Sonuçlar %2'lik agaroz jelde kontrol edildi.

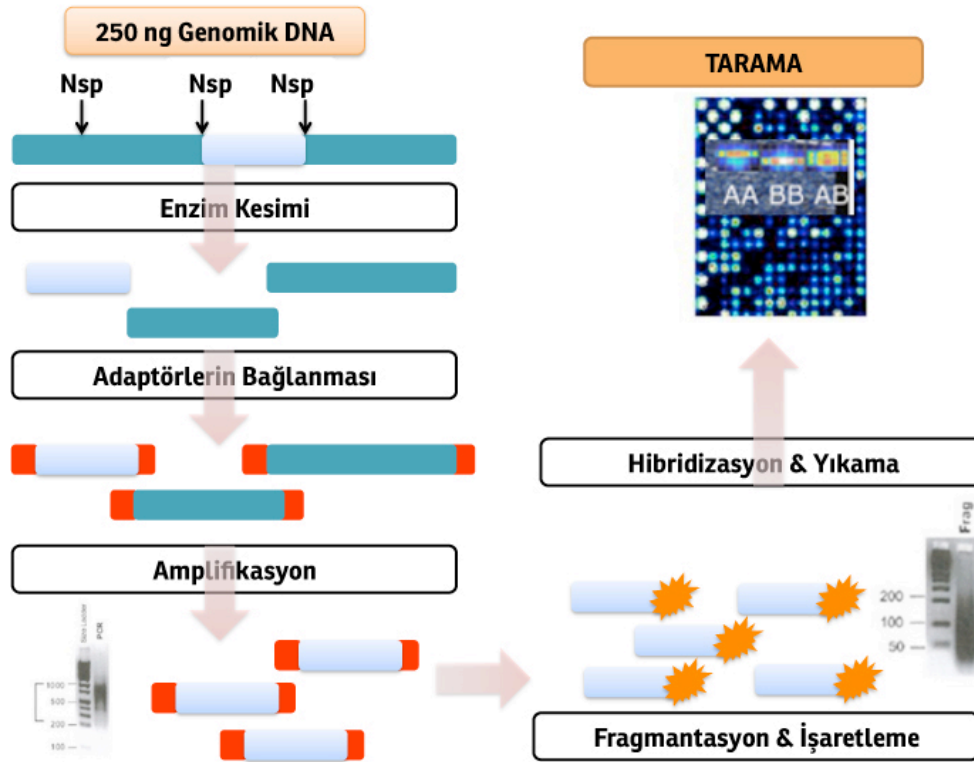
Amplifikasyonu takiben PZR ürünlerinin pürifikasyonu, QIAquick PZR pürifikasyon kitiyle (Qiagen, Valencia, CA, USA) üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. PZR ürünlerinin sekansı (dizileme) için 4 µL pürifiye DNA, 4 µL distile su, 4 µL *forward* primer ve 8 µL BigDye *terminator* karışımından oluşan 20 µL' lik sekans reaksiyonu hazırlandı ve termal *cycler*da 25 döngü 96°C' de 10 sn, 50°C' de 5 sn, 60°C' de 4 dk olacak şekilde bekletildi. PZR ürünlerinin dizileme reaksiyonu için dört exon da *forward* ve gerekli olduğunda *reverse* primerler kullanıldı. Son olarak Sephadex® G-50 ile sekans öncesi pürifikasyon yaptıktan sonra örnekler ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.1. *ALXI* geni kodlayan bölgelerinin PZR amplifikasyon koşulları

Exon	Primer Dizisi	Annealing °C	Bant Uzunluğu (bp)
Exon 1F	GCTGTCGTCTGTCTATCCT	58	728
Exon 1R	GAGGAAGGTAGTGGAAGGTG		
Exon 2F	GCAGTTGCATGAACACATTTT	59	597
Exon 2R	GTGCATTTTGCCACAAAGAA		
Exon 3F	TGATGTCTTTTAACATCACATTTGC	60	290
Exon 3R	AATGGTTAGCATAGGCTTTATTATATG		
Exon 4F	GAGTACGTTATGTGGCCAAG	56	644
Exon 4R	CAATAAGCTGCTGTGTGGG		

3.4. SNP Microarray (Çip, Mikrodizin) Analizi

Tüm genom tek nükleotid polimorfizimlerin genotiplenmesine yönelik olan DNA mikrodizin yöntemi Affymetrix (California, USA) teknolojisi kullanılarak tamamlandı. 250.000 tek nükleotid değişikliğini taramaya imkan veren 250K Nsp/ çipi (Affymetrix®) protokol doğrultusunda kullanıldı. Mikrodizin analizi basamakları Şekil 3.1.'de gösterilmiş, aşamalar aşağıda detaylandırılmıştır.



Şekil 3.1. DNA Çip Analizi Basamaklarının Gösterimi

a. DNA'nın Hazırlanması ve Kesimi

Periferik venöz kandan elde edilen genomik DNA, konsantrasyonu nanodrop kullanılarak ölçüldükten sonra EDTA TE tampon çözeltisi kullanılarak 50 ng/ μL ' ye seyreltilir. Bu basamaktan sonra buz üzerinde çalışılır. DNA örneğinden 5 μL alınır, ependorf tüpüne aktarılır. 9.75 μL deiyonize su, 2 μL NE tampon çözeltisi, 2 μL BSA ve 1 μL Nsp I içeren kesim solüsyonları karışımı toplamda 14,75 μL olarak ependorf tüpüne eklenir. Life Technologies PZR cihazında 37°C' de 120 dk, 65°C' de 20 dk durduktan sonra 4°C'de beklemeye bırakılır.

b. Ligasyon

Kesim işleminden hemen sonra ligasyona başlanır. 0,75 μL adaptor NspI, 2,5 μL T4 DNA ligaz tamponu ve 2 μL T4 DNA ligaz, 19,75 μL hacimdeki kesilmiş DNA örneğinin üzerine eklenir. PZR cihazında 16°C' de 180 dk, 70°C' de 20 dk

durduktan sonra 4°C' de beklemeye bırakılır.

c. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kesilmiş ve ligasyonu yapılmış DNA örnekleri deiyonize su ile 1/4 oranında seyreltilir. 10 µL ligasyon ürününün üzerine 39,5 µL su, 10 µL Taq PZR tamponu, 20 µL GC-Melt, 14 µL dNTP, 4,5 µL PZR primer ve 2 µL Taq polimerazdan oluşan PZR karışımı eklenir. Bu miktarlardan 3 tüp Nsp reaksiyonu için hazırlanır.

Geneamp® PCR System 9700 termal *cycler* cihazında 94°C' de 3 dk denatürasyon, sonrasında 30 döngü 94°C' de 30 sn, 60°C' de 45 sn ve 68°C' de 15 sn ve son olarak 68°C' de 7 dk uzama basamaklarından oluşan PZR reaksiyonu başlatılır. PZR sonrası elde edilen üründen 3 µL' lik kısım %2' lik TBE agaroz jelde 120 V' ta bir saat boyunca yürütülür. Jelde yaklaşık 200-1100 baz çifti arasında ürün yığılımının olması deneylerin sorunsuz ilerlediğini gösterir.

d. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Ölçülmesi

Qiagen MinElute® 96 UF Plate kullanılarak saflaştırma yapılır. Vakum Drier cihazı 800 mbar'a ayarlanır. Her kuyucuğa 32 µL PZR ürünü konur ve 800 mbar'da 15 dakika vakumlanır. Sonra 35 µL distile su eklenir ve tekrar 800 mbar'da 15 dakika vakumlanır. Her kuyucuğa 35 µL distile su koyulur ve pürifikasyon *plate* 5 dakika vortekslenir. Her örnek için 0.5 cc ependorf hazırlanır. Her ependorf tüpünde 9x35 µL PZR ürünü elde edilir. Saflaştırma sonrasında elde edilmiş olan ürünün ölçümü spektrofotometre ile yapılır. OD ölçümü 90 µg/µL'nin üzerinde ise bir sonraki aşamaya geçilir. Fragmentasyon basamağı için 45 µL ürün gereklidir, eğer elimizde daha fazla bulunuyorsa, suyunu uçurmak için Vakum cihazında 60°C' de beklettilir.

e. İşaretleme (*Labelling*)

Kit içinden çıkan fragmentasyon enziminin konsantrasyonu 2,5 U/µL olduğu için öncelikle 0,05 U/µL'ye seyreltilir. Dilüe edilmiş fragmentasyon enziminden 5 µL, 45 µL pürifiye PZR ürünüyle bir tüp içerisinde birleştirilir ve

termal *cycler*da 37°C' de 35 dk, 95°C' de 15 dk tutulur. Elde edilen ürün %4' lük TBE agaroz jelde 120 V' ta 30 dk-1 saat arasında yürütülür. Jelde ortalama 180 baz çifti'in altında ürün yığılımının olması beklenir.

f. Hibridizasyon

İşaretleme sonrasında elde edilen ürüne 12 µL MES, 13 µL DMSO, 13 µL Denhardt's solüsyonu, 3 µL EDTA, 3 µL HSDNA, 2 µL OCR, 3 µL Human Cot-1 DNA®, 1 µL Tween-20 (%3' lük) ve 140 µL TMACL' den oluşan hibridizasyon kokteyl karışımından 190 µL eklenir. Bu karışım 99°C' de 10 dk ve 49°C' de 1 dk tutulduktan sonra çipe yüklenir. Çipler 49°C' deki hibridizasyon fırınına yerleştirilir. Fırında 60 rpm dönme hızıyla 16-18 saat arası hibridizasyon sağlanır.

Streptavidin fikoeritrin (SAPE) boyama ve antikor çözeltisi hazırlamak için 800,04 µL su, 360 µL SSPE, 3,96 µL Tween-20 (%3' lük), 24 µL Denhardt's solüsyonu karıştırılıp 2 ayrı tüpe 594 µL ayrılır. SAPE tüpüne 6,0 µL SAPE, antikor tüpüne ise 6 µL biyotinlenmiş antikor eklenir. Başka bir tüpe ise *Array Holding Buffer* çözeltisinden 820 µL konularak yıkama istasyonuna (Affymetrix, Fluidics Station 450) yerleştirilir. Bu basamaktan sonra sırasıyla yıkama, boyama ve tarama aşamalarına geçilir.

h. Yıkama, Boyama, Tarama

Hibridizasyon fırınından çipler çıkarılır, içindeki hibridizasyon solüsyonu çıkarılıp atılır, 270 µL *array holding* tamponu yüklenir, yüklerken köpük oluşmamasına dikkat edilir. Yıkama işlemi, Affymetrix Fluidics Station 450' de GCOS (*GeneChip® Operating Software*) 1.4 yazılımı kullanılarak yapılır. Çipler Fluidics cihazına yerleştirilir. GCOS programında sırasıyla bir deneyin kaydı yapılır, yıkama ve boyama basamakları gerçekleştirilir. Çipler GeneChip Scanner 3000 7G tarayıcısına yerleştirilir. Sonuçlar ".CEL" formatında otomatik olarak dosyalanır. Veri dosyaları daha sonra genotip analiz yazılımı (Affymetrix , Genotyping Analysis Software (GTYPE)) yazılımına aktarılır ve ".CHP" dosyası haline çevrilir. Tarama sonucunda mikrodizinden elde edilen SNP sinyal alımı

yüzdesi hesaplanır. Okuma oranları (SNP *Call rate*) değerleri %90'in üstündeyse deneyin başarılı olduğu ve analizin başarılı bir sonuç vereceği düşünülür. Çalışmada %95'in üzerinde okuma değeri elde edilmiştir.

3.5. Homozigotluk Analizi

GTYPE programında oluşturulan genom boyu mikrodizin genotip verileri hastalığın kalıtım kalıbı otozomal resesif olduğu için Visuel Genome Studio (VIGENOS®) programı kullanılarak homozigotluk analizine alınarak haplotip blokları elde edilmiştir. Aile 1; 30 ve 31 numaralı bireyler (anne-baba) ve 57 numaralı birey (Şekil 4.1.) indeks vaka olarak kabul edilerek genom boyu haplotip oluşturulmuş, ailedeki diğer bireylerin haplotipleri (hasta ve normal) indeks vaka ile karşılaştırılmıştır. Otozomal resesif kalıtım kalıbından beklendiği şekilde hasta kardeşlerin indeks vaka ile aynı homozigot haplotipi kalıtımış olmaları normal kardeşlerin ise en az bir alelinde ebeveynlerinden farklı haplotipi kalıtımış olmaları koşulu genom boyu test edilmiştir.

Belirlenen homozigot bloğun büyüklüğünün ne oranda olması gerektiği her zaman önemli bir parametredir. SNP çipleri iki alel içeren sistemler olduğu için ardışık yerleşimli birkaç belirtecin şans eseri aynı homozigot kompozisyonu göstermesi olasıdır. Ancak genom düzeyinde ardışık belirteçlerde rekombinasyon yapma olasılığının 1 cM'dan büyük alanlarda arttığı bilinmektedir. 5 cM (yaklaşık 5 milyon baza karşılık gelen genetik uzaklık) ve daha üstü aralıklarda birden fazla rekombinasyon görülmesi olasılığı da giderek artar. Bu büyüklüklerde (1-5cM ve üstü) şans eseri çok sayıda belirtecin birbirleriyle hiç rekombinasyon yapmaksızın aynı homozigot haplotiple kalıtılma olasılığı ise çok düşüktür. Akrabalık dereceleri homozigot atasal bloğun büyüklüğünü etkiler. Uzak akrabalıklarda daha küçük bloklar görülmesi beklenirse de bir bireyde 5-10cM büyüklüğünde haplotiplerin hastalıkla ilişkilendirilmesi olasılığının daha yüksek olduğu önerilmiştir (43). Bu bulgular altında hasta bireylerde 5 Mb ve daha büyük homozigot haplotip blokları dikkate alınmış, bu bölgelerin aynı ailenin tüm hasta bireylerinde örtüşme göstermesine dikkat edilmiştir. Farklı ailelerde farklı

gen mutasyonları olabileceği göz önüne alındığı için indeks aile ile haplotip bütünlüğü beklenmese de genomda aynı bölgelerde homozigot haplotip görülüp görülmediğine dikkat edilmiştir (Bakınız Şekil 2.6.).

3.6. Genomik DNA Kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı qPZR

ALXI geninin yerleştiği genomik bölgenin bir kopya sayısı değişikliği içerip içermediğini test etmek amacıyla genomik DNA kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PZR yapıldı. Bu çalışmada kontrol genom bölgesi olarak *RPPH1* (RNaseP) geni içerisindeki SNV (tek nükleotit varyasyonu) içermeyen bir hedef bölge kullanıldı. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, *RPPH1* geninde herhangi bir genomik yeniden düzenlenme meydana gelmediğini göstermiş, bu nedenle kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) validasyonu çalışmalarında kontrol bölgesi olarak kullanılmıştır (Ek-1a).

Gerçek zamanlı-PZR reaksiyonu Rotor-Gene 6000 (Qiagen) cihazında gerçekleştirildi. Genomik DNA'da görece kopya sayısı ölçümü için ($\Delta\Delta C_t$ yöntemi) kantitasyon ile Rotor Gene 6000 Software kullanılarak hesaplandı. *RPPH1* kopya sayısı normalizatör olarak kullanıldı.

3.7. Multipleks Ligasyon Prob Amplifikasyon (MLPA)

Genomik DNA kullanılarak *ALXI* genine ait ekzonlarda bir kopya sayısı değişikliği olup olmadığını test etmek amacıyla multipleks ligasyon prob amplifikasyon (MLPA) işlemi yapıldı. Bu çalışmada kontrol olarak herhangi bir yüz malformasyonu olmayan sağlıklı bireylere ait genomik DNA kullanıldı.

MLPA işlemi, SALSA MLPA® probemix P080-C1 kiti kullanılarak (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) ve firmanın önerdiği protokole uyularak yapıldı (47). Daha sonra örnekler ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak analiz edildi.

3.8. RNA eldesi ve cDNA Dizi Analizi

ALX1 gen ifadesinin olup olmadığını görmek için 1 numaralı aile 57 numaralı bireyden operasyon esnasında kemik ve kıkırdak doku alınarak hücre kültürü oluşturuldu. Kültüre edilen hücrelerden RNA eldesi Trizol çözeltisi kullanılarak yapıldı. İzole edilmiş RNA örneklerinden cDNA elde etmek için "QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) kullanıldı. cDNA örneklerinde gen ifadesi konvansiyonel PZR tekniği kullanılarak test edildi.

3.9. ALX1 Geni Kodlanmayan Önemli Bölgelerin PZR'si

Homozigotluk haritalaması sonrasında saptanan bölgede *ALX1* geni bulunduğu için genin, 5' ucunda yaklaşık 20kb uzağa 3' ucunda ise yaklaşık 165kb uzaklığa kadar önemli olduğu düşünülen bölgeler ve gen içindeki intronik bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltıldı. Amplifikasyon için Primer3 programı kullanılarak (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 30 çift primer tasarlandı. Tasarlanan primerler ve bağlanma dereceleri sıcaklıkları **Ek-1b'**de gösterildi.

PZR reaksiyonu için *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enzimi kullanıldı. Geneamp® PCR System 9700 termal *cycler* cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA) PZR reaksiyonu tamamlandı. Sonuçlar %2'lik agaroz jelde kontrol edildi.

PZR ürünlerinin pürifikasyonu, QIAquick PZR pürifikasyon kitiyle (Qiagen, Valencia, CA, USA) üretici firmanın protokolüne göre pürifiye edildi.

PZR ürünlerinin dizilenmesi için 4 µL pürifiye DNA, 4 µL distile su, 4 µL *forward* primer ve 8 µL BigDye *terminator* karışımından oluşan 20 µL' lik sekans reaksiyonu hazırlandı ve termal *cycler*da 25 döngü 96°C' de 10 sn, 50°C' de 5 sn, 60°C' de 4 dk olacak şekilde bekletildi. PZR ürünlerinin dizileme reaksiyonu için dört ekzon da *forward* ve gerekli olduğunda *reverse* primerler kullanıldı. Son olarak Sephadex® G-50 ile sekans öncesi pürifikasyon yaptıktan sonra örnekler ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) kullanılarak analiz edildi.

3.10. Tüm Ekzom ve Genom Dizileme

Tüm ekzom/genom dizi analizi için TÜBİTAK-Bilişim Ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler Araştırma Merkezi (TÜBİTAK-BİLGEM) altında kurulmuş olan İleri Genom ve Biyoformatik Araştırma Grubu (İGBAM) üzerinden hizmet alınmıştır. Merkezde Illumina HiSeq 2000 alt yapısı kullanılarak genom boyu dizileme tamamlandı. İşlem sonrası elde edilen paired-end sekans verisi çeşitli bioinformatik yazılımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Bunlar; ham verinin human genome (hg19) üzerine haritalanması için BWA programı (48), PZR duplikasyonlarının ayıklanması için SAMtools (49), varyasyonların tespit edilmesi ve küçük kopya sayısı değişikliklerinin (indel) belirlenmesi için The Genome Analysis Toolkit (GATK) v1.6 (50) ve tespit edilen varyantların fonksiyonel analizlerinin yapılabilmesi için ANNOVAR (51) programıdır.

3.11. Bölgeye Özgü Anotasyon

Şimdiye kadar 3000 protein kodlayan gen bölgesi ile tek gen hastalıkları ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda protein kodlayan bölgelerde meydana gelen değişiklikler kadar, kodlanmayan bölgelerde bazı değişikliklerin genlerin regülasyonunu etkileyerek hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir (52, 53). Bu nedenle haritalama sonrasında saptanan homozigot bölgedeki tüm değişiklikler çeşitli genom veri bankaları kullanılarak yorumlandı. Bunun için;

-saptanan varyantların popülasyonda polimorfizm/mutasyon olarak temsil edilip edilmediği bilgisi için dbSNP veri bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), ensembl genome browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) ve TÜBİTAK-İGBAM tarafından yeni nesil dizileme teknolojisi ile elde edilen Türk popülasyonuna ait veri havuzu kullanıldı.

-değişikliklerin genom üzerinde denk geldikleri yerlerin transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olup olmadığı, *DNase I* hassasiyetinin bulunup bulunmadığı ve türler arası korunmuşluk açısından değerlendirilmesi için

University of California Santa Cruz (UCSC) genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) - ENCODE veri bankası (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) kullanıldı.

Bölgede bulunan varyantların regülatör faktörlerle ilişkisi kurularak bölgeye özgü varyant haritalaması (anotasyon) yapıldı. UCSC veri bankasında görselleştirmek için ".bed" file yapıldı (54) (.bed dosyasının yapımı için Ek-2).

4. BULGULAR

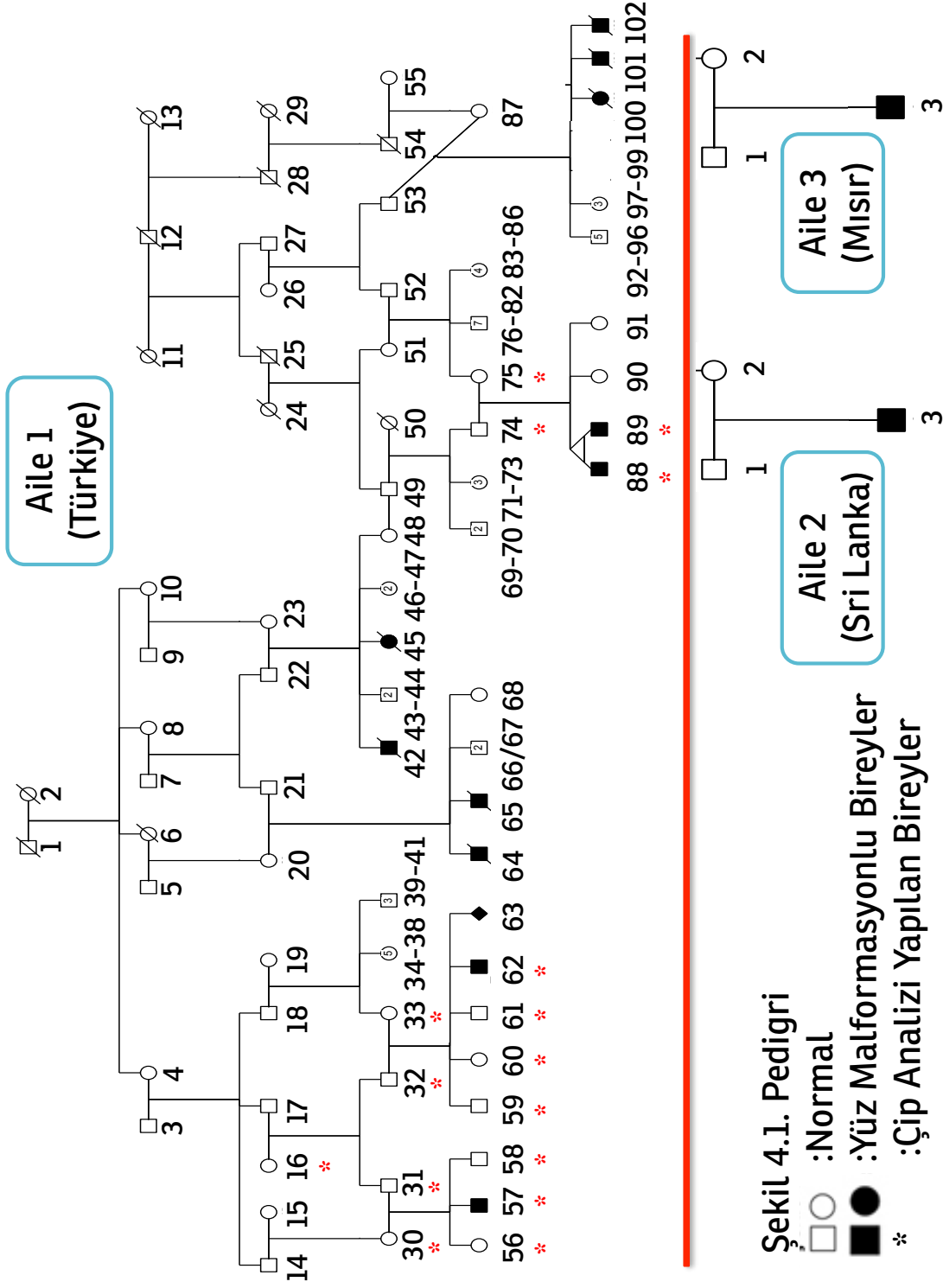
4.1. Klinik Bulgular

Şekil 4.1.'de tüm pedigrı yapısı sunulan Şekil 4.2.'de ise yüz bulguları gösterilen konjenital ağır yüz malformasyonu ailelerinden ilki (Aile 1), 5'i hayatta 7'si hayatını kaybetmiş olmak üzere 12 bireyde yüz malformasyonu olan ve toplam 102 bireyden oluşan Şanlıurfa ilinden bir ailedir. Diğer iki aile ise Sri Lanka ve Mısır'dan laboratuvarımıza gönderilmiştir. Klinik muayene bulguları Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.

Klinik muayeneler sonucunda olguların hepsinin anne-babası arasında akrabalık mevcuttu. Ailelerin ayrıca sağlıklı çocukları da bulunmaktaydı.

Ailede ağır yüz malformasyonu bulunan 5 birey mevcuttu. 1. aile 57 ve 62 numaralı bireyler saha şartlarında 88 ve 89 numaralı bireyler ise poliklinik şartlarında muayene edildi. 63 numaralı bireyin prenatal dönemde yapılan ultrasonografi ile etkilenmiş olduğu konusunda aile bilgilendirildi. Aile tıbbi terminasyonu kabul etmedi. Aile ile görüşüldü ilgili bireyden (63 numaralı birey) kan alındı. 57 numaralı birey Hacettepe Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalında tekrarlayan düzeltme operasyonlarına tabi tutuldu.

Etkilenmiş bireylerin fenotipik yüz bulguları daha önce grubumuz tarafından bildirilen ve gen haritalama çalışmaları sonucunda *ALXI* geninde mutasyonların tanımlandığı original FND3 ailelerine tam benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.2.). Ana bulgular ileri derecede mikroftalmi, bilateral yüz yarığı, yarık damak/dudak, geniş alın, ileri derecede burun gelişim anomalisi (Şekil 4.2) idi. Aile1, 88 ve 89 numaralı bireylerde yapılan ekokardiyografide patent duktus arteriozis (PDA) ve atrial septal defekt (ASD) rapor edildiği görüldü.

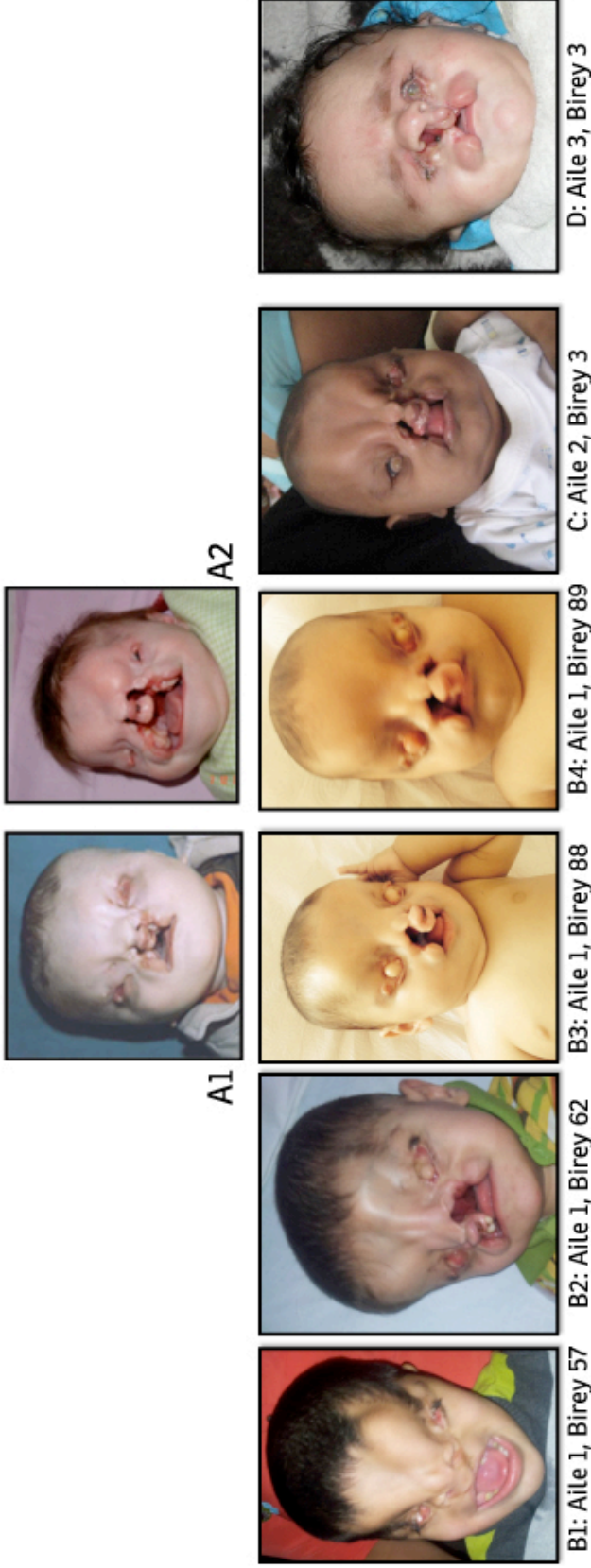


Şekil 4.1. Pedigri

□ : Normal

● : Yüz Malformasyonlu Bireyler

* : Çip Analizi Yapılan Bireyler



Şekil 4.2. Hastaların fotoğrafları

A: Literatürde bildirilen *ALXI* ile ilişkili FND tip 3 vakaları (A1: homozigot 12q21 delesyonu, A2: c.531+1G>A mutasyonu) (4)
 B1,B2,B3,B4: Aile 1, Şanlıurfa ilinden aile.

C: Aile 2, Pakistan kökenli aile; D: Aile 3, Mısır kökenli aile.

Tablo 4.1. Tüm aile bireylerinin klinik muayene bulgular. Mısır ailesi (Aile 3) ile ilgili klinik bilgi edinilemediği için tabloda yer almadı.

Aile Numarası	I	I	I	I	II
Hasta Numarası	57	62	88	89	3
Akrabalık	+	+	+	+	+
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
Yaş	12	6	1	1	4
Prenatal ve Natal Periyod					
Polihidramniz	-	-	-	-	-
Azalmış Fetal Hareketler	-	+	-	-	-
Doğum Ağırlığı	3200gr	3500gr	2400gr	1800gr	2995gr
Doğum Haftası	38hf	34hf	33hf	33hf	Miad
Kraniofasial					
Makrosefali	+	+	-	-	-
Brakisefali	-	-	+	+	-
Mikrosefali	-	-	+	+	-
Geniş Ön Fontanel	+	+	+	+	+
Gizli Ön Beyin Keseleşmesi	-	-	-	-	-
Düz Yüz	+	+	-	-	+
Dar Alın	-	-	+	+	+
Düşük Saç Çizgisi	+	+	+	+	+
V Şeklinde Saç Çizgisi	-	-	-	-	-
Sinorfizis	-	-	-	-	-
Hipertelorizm	+	+	+	+	+
Mikroftalmi / Anoftalmi	+	+	+	+	+
Geniş Burun Kökü	+	+	+	+	+
Burun Oluşumunda Gerilik	+	+	+	+	+
Orta Hat Yüz Yarığı	+	+	+	+	+
Mikrognati	-	-	+	+	+
Retrognati	-	-	+	+	+
Ek Bulgular					
İnguinal Herni	-	-	-	-	-
Böbrek Anomalisi	-	-	-	-	-
Kalp Anomlisi	-	-	+	+	-
Saç Anomalisi	-	-	-	-	-
Genital Anomali	-	-	-	-	-

* Kalp anomalisi ASD

Buna ek olarak Aile 2'deki (Sri Lanka) hasta çocuk da gerek original FND3 vakaları gerekse tez konusu olan Aile 1'deki vakalar ile tam benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.2). Mısır'dan laboratuvarımıza gönderilen ailede ise yüz bulguları bu aileler ile büyük oranda örtüşme göstermekteydi. Fakat premaksiller bölgenin ve göz yapısının kısmen oluşumu açılarından Mısır ailesinde farklılıkların mevcut olduğu sağlanan resimde görüldü ancak detaylı klinik bilgi tamamlanamadı (Şekil 4.2.).

Vakalar bu klinik özellikleri ile *ALX1* ilişkili frontonazal displazi (FND3) tanısını aldı ve *ALX1* geninde mutasyon taraması kapsamına alındı.

4.2. Laboratuvar Bulguları

4.2.1. *ALX1* Kodlayan Bölgelerin Dizilenmesi

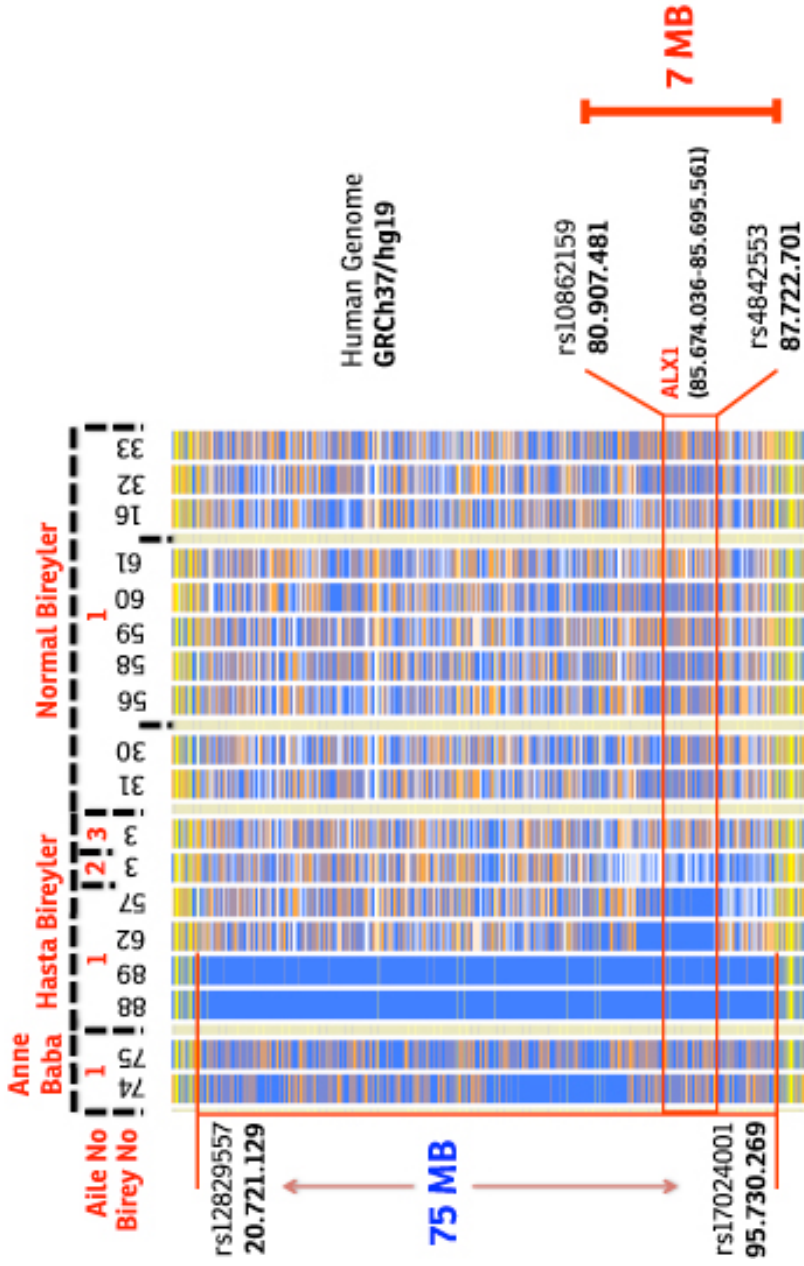
Aile 1; 30, 31, 32, 33, 57 ve 62 numaralı bireyler, Aile 2 ve Aile 3'deki hasta bireylerde *ALX1* geni dizilendi. Herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. Genetik heterojenite olabileceği düşünüldü ve genom boyu SNP genotipleme ve homozigotluk haritalaması ile yeni bir gen arayışına geçilmesine karar verildi.

4.2.2. DNA Çip Analizi

İlk etapta index aileden (Aile 1) 12 kişiye (16, 30, 31, 32, 33, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 bireyler) Affymetrix şirketinin protokolüne göre 250K SNP Nsp çiple genom boyu genotipleme yapıldı. Homozigotluk haritalaması sonucunda ailede kalıtılan ve otozomal resesif kalıtım kalıbına uygun olarak aile bireylerinde segregasyonun gözlemlendiği iki kromozom bölgesi (12q21.3 ve 19p13 bölgeleri) saptandı. Daha sonra kliniğimize başvuran benzer fenotipli bireylerin detaylı pedigrî analizinde indeks ailemizle uzaktan akraba olduğu görüldü ve pedigrî genişletildi. 4 yeni bireyin (74, 75, 88, 89 numaralı bireyler) çalışmaya dahil edilmesiyle homozigotluk analizinde daha önceden tespit edilen homozigot bölgelerden birisi (19p13 bölgesi) elendi (Şekil 4.3).

Aile 2 ve 3'teki hasta bireylere de Affymetrix SNP analizi uygulandı ve indeks vaka ile karşılaştırıldı. İkinci ailedeki 3 numaralı bireyin 12q21.3 bölgesinde homozigot bloğa sahip olduğu görüldü (Şekil 4.3.). Üçüncü ailede ise bu bölgede homozigot blok gözlenmedi. Her iki ailede genomda farklı bölgelerde homozigot bloklar bulunmaktaydı. Pakistan ailesinin de 12q21.3 bölgesine homozigotluk göstermesi sonraki analizlerde iki aile (Aile 1 ve 2) verilerinin birlikte değerlendirmesi gerektiğini düşündürdü. Mısır ailesi üzerindeki çalışmalara bölgeyi dışladığı için devam edilmedi.

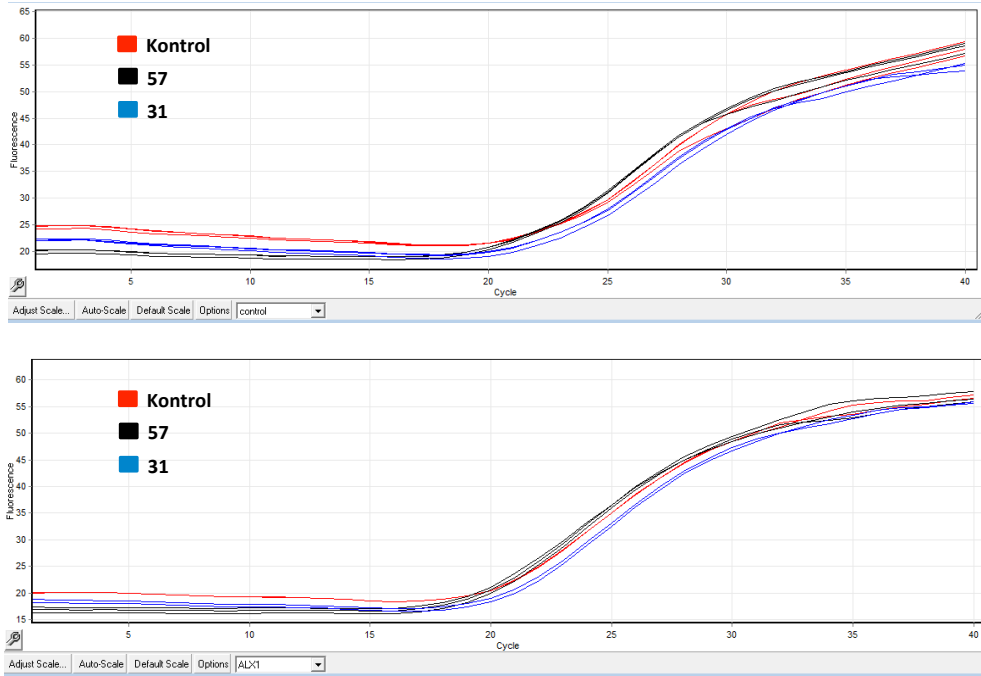
Aile 1 ve Aile 2 genotip verileri haplotip analizine alındı. Sentromerik ve telomerik rekombinasyonların oluştuğu bölgeler saptandı (Şekil 4.3) Kritik bölge insan genomu GRCh37/hg19 veri alt yapısına göre chr12:80,907,481-87,722,701 olarak tespit edildi. Bunun dışında genomda olası başka bir bölge saptanmadı. Böylelikle hastalıktan sorumlu değişikliğin tek bir bölgede, 12q21.3, yaklaşık 7MB büyüklükte olduğu görüldü. İlgili bölgede aday gen yaklaşımına geçildi.



Şekil 4.3. SNP çip analizi sonrası yapılan homozigotluk haritalaması. 1 numaralı ailede, 88 ve 89 numaralı bireyler ile elde edilen homozigotluk bölgenin 75Mb iken, 1 numaralı aileden 57, 62 numaralı bireylerin 2 numaralı aileden 3 numaralı bireylerin analize dahil edilmesiyle homozigot bloğun 7Mb'ye düşmüştür. 3 numaralı aile (Mısır) bölgeye homozigotluk vermemiştir.

4.2.3. *ALX1* Gen Bölgesinde Kopya Sayısı Değişikliğinin Test Edilmesi

ALX1 gen bölgesinde bir kopya sayısı değişikliği bulunup bulunmadığını test etmek için bir hasta, bir ebeveyn ve kontrol popülasyonundan sağlıklı bir bireyin genomik DNA'sı ile kantitatif PZR çalışması yapıldı. *ALX1* geninin 4. ekzonu ve 3'UTR bölgesine komplementer olan primer çifti kullanıldı. *RPPH1* kopya sayısının normalizatör olarak kullanıldığı analizde bireyler arasında *ALX1* genomik kopya sayısı açısından farklılık (delesyon veya duplikasyon) bulunmadığı gösterildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Şeklin üst kısmındaki grafik ile *RPPH1* genomik bölgesine kopya sayısının kantitatif PZR ile belirlenmesi gösterilmiştir. Altındaki grafik ise, *ALX1* gen bölgesine spesifik primerler ile yapılan kantitatif PZR sonucunu gösterir. İki farklı reaksiyondan alınan sonuçlar karşılaştırıldığında kopya sayısı değişikliği saptanmamıştır.

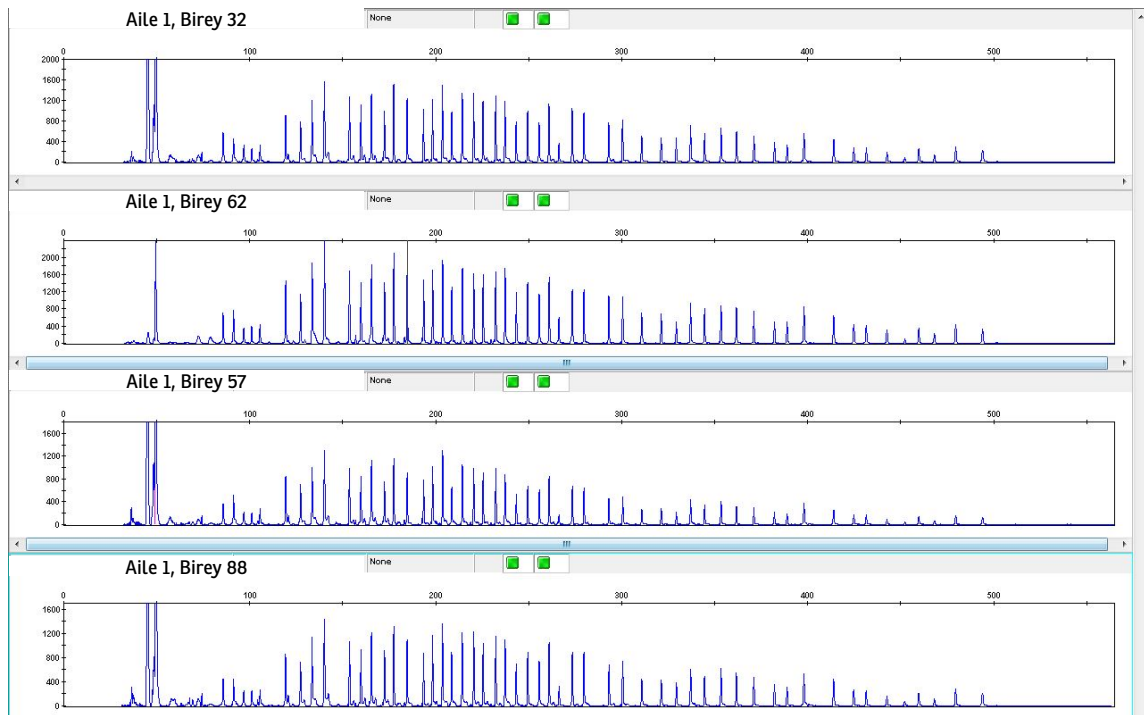
Siyah renk ile gösterilen: Aile 1, birey 57 (homozigot);

Mavi renk ile gösterilen: Aile 1, birey 31 (heterozigot);

Kırmızı renk ile gösterilen: Kontrol

4.2.4. *ALX1* Geni Tüm Ekzonlarına Ait Kopya Sayısı Değişikliğinin Test Edilmesi

ALX1 geni ekzonlarına ait bir kopya sayısı değişikliği bulunup bulunmadığını test etmek için üç hasta ve bir ebeveyn genomik DNA'sı ile MLPA çalışması yapıldı. *ALX1* geni ile birlikte kraniofasial gelişimde görev alan çeşitli genlere ait primer çiftlerini içeren SALSA MLPA® probemix P080-C1 Craniofacial probemix kullanıldı. Yapılan analizde bireyler arasında *ALX1* ekzonik kopya sayısı açısından farklılık (delesyon veya duplikasyon) bulunmadığı gösterildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *ALX1* geni ekzonlara ait spesifik primerler ile yapılan MLPA işlemi sonucu. Reaksiyon sonucunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında bireyler arasında kopya sayısı değişikliği saptanmamıştır.

4.2.5. cDNA Dizi Analizi

Hastaya uygulanan cerrah operasyon esnasında hastadan kıkırdak doku örneği alındı. Elde edilen örnek ile hücre kültürü yapıldı ve RNA izolasyonu sağlandı. Daha sonra yapılan cDNA dizi analizi sonucunda *ALX1* geni ile ilgili herhangi bir splice site değişikliği olmadığı intakt bir mRNA olduğu gözlemlendi.

4.2.6. 12q21.3 Kritik Bölgede Aday Gen Yaklaşımı ve ALX1 Kodlanmayan Bölgelerin Taranması

DNA çip analizi sonrası elde edilen aday bölgede yerleşim gösteren genler ve bu genlerin fonksiyonları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Tespit edilen homozigot blokta yerleşim gösteren genler ve fonksiyonlarını gösteren liste

Gen	Ekzon Sayısı	Fonksiyonu ve ilişkilendirilmiş hastalık
<i>OTOGL</i>	58	Embriyonik gelişim esnasında iç kulakta yüksek düzeyde eksprese olur. Erişkin yaşamda çok az ekspresyonu gösterilmiştir. Mutasyonları sensinöral sağırılık ile ilişkilendirilmiştir (55).
<i>PTPRQ</i>	45	Embriyonik dönemde böbrek glomerüllerinde ve iç kulakta fonksiyon görür. Mutasyonları sağırılık ve vestibular disfonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (56).
<i>MYF6</i>	3	İskelet kas dokusu farklılaşmasında görev alır (57).
<i>MYF5</i>	3	İskelet kas dokusu farklılaşmasında görev alır (57).
<i>LIN7A</i>	6	Beyinde hücre adhezyonunda sinaptik vezikül ekzositozunda görevli olduğu gösterilmiştir (58). Eksikliğinde zeka geriliği ve serebral korteks gelişim bozukluğu gösterilmiştir (59).
<i>MIR617</i>		miRNA
<i>MIR618</i>		miRNA
<i>ACSS3</i>	16	Lipid sentezi ve enerji metabolizmasında görev aldığı gösterilmiştir (60).
<i>MIR4699</i>		miRNA
<i>PPFIA2</i>	33	Axon gelişiminde ve meme bezi gelişimine görev aldığı gösterilmiştir (61).
<i>CCDC59</i>	4	Surfaktan ilişkili protein B'nin transkripsiyon kompleksinin komponentidir.
<i>METTL25</i>	12	Metil transferaz like 25 Literatürde bilgi bulunmamıştır.
<i>TMTC2</i>	12	Hücre içi kalsiyum dengesinde sorumludur (62).
<i>SLC6A15</i>	12	Sodyum ve klor bağımlı nörotransmitter madde taşınmasında görevlidir. Aynı zamanda nöronal sodyum bağımlı nötral amino asit transportunda görevlidir (63). Kodlayan bölge değişikliklerinin psikiatrik bozukluklara yol açabileceği gösterilmiştir (64).
<i>TSPAN19</i>	9	Tetraspanin 19 Literatürde bilgi bulunmamıştır.
<i>LRR1Q1</i>	4	Lösin zengin tekrar ve IQ motif içeren protein Literatürde bilgi bulunmamıştır.

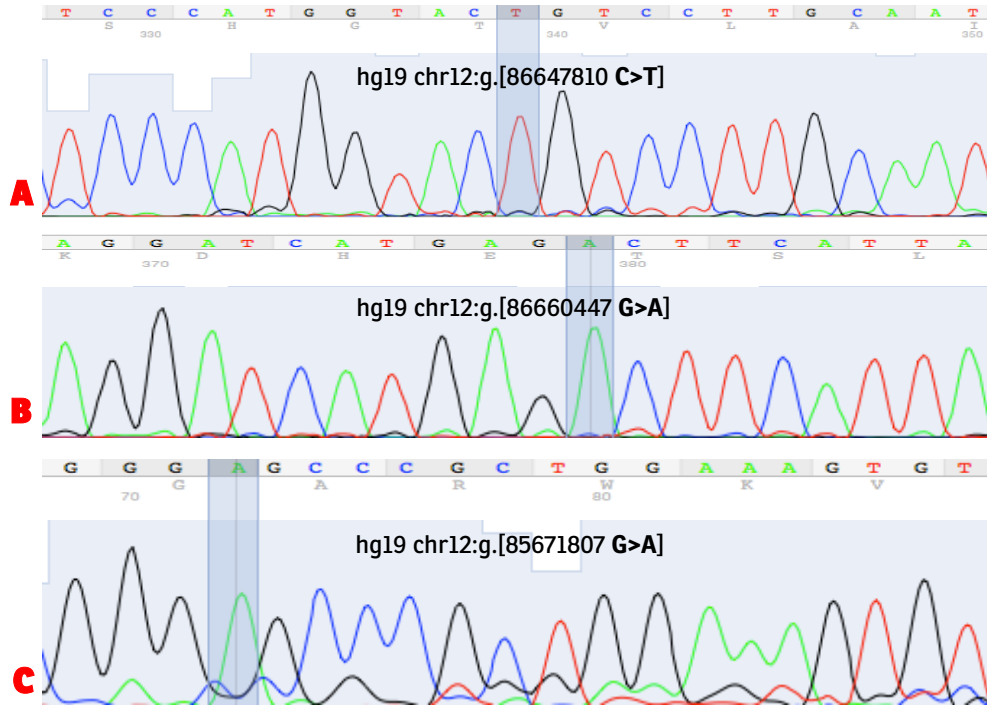
<i>ALX1</i>	4	Kranial nöral krest hücre gelişimi ve göçünde rol almaktadır (33). Önbeyin mezenkim gelişiminde önemli ve kondrosit farklılaşmasında görev alır. Defektinde FND tip 3'e neden olduğu gösterilmiştir (4).
<i>RASSF9</i>	2	Yapılan fare deneylerinde epidermal homeostazis ile ilişkili önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (67).
<i>NTS</i>	4	Santral sinir sisteminden salgılanan bir nöromodülatör olan nörotensin kodlar (66).
<i>MGAT4C</i>	4	Fetal hayatta sadece kalpte eksprese olurken fetal ve erişkin hayatta beyinde eksprese olduğu gösterilmiştir (67).
<i>MIR548AL</i>		miRNA

Gen listesi incelendiğinde daha önce FND3 ile ilişkilendirilmiş *ALX1* geninin bu bölgede bulunduğu görüldü. Daha önce bu gende mutasyon saptanamadığı için *ALX1* geni regülasyonunda rol alabilecek kodlanmayan bölgede yer alan bir varyasyonun malformasyondan sorumlu olduğu düşünüldü. UCSC veri bankası regülatör bölgelerin taranması amacıyla kullanıldı. 5'UTR, 3'UTR ve intron bölgelerinde transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı önemli bölgeler, türler arası korunmuşluk gösteren bölgeler, DNase I hassas bölgeler göz önüne alınarak primerler tasarlandı ve Aile 1, 57 numaralı birey kullanılarak bu bölgelere DNA dizi analizi yapıldı. 57 numaralı bireye ait DNA'dan yapılan sanger dizileme sonucunda saptanan varyasyonlar Tablo 4.3.'te gösterildi. MAF değeri minor alel frekansını (MAF) gösteren bir veridir. MAF değeri sayesinde bir değişikliğin toplumda yaygın bir değişiklik olup olmadığına karar verilebilir. Bulunan değişikliğin MAF değerine bakmak için dbSNP veri bankası kullanılmaktadır.

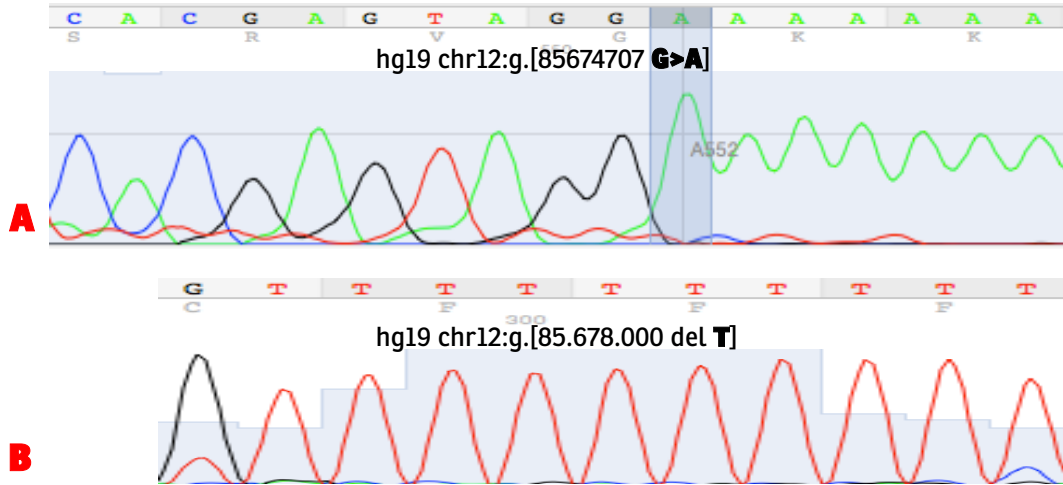
Tablo 4.3. ALXI Kodlanan/Kodlanmayan Bölgelerinde DNA Dizileme Analizi Sonucu Bulunan Değişiklikler (GRCh37/hg19'a göre)			
Bölge	Genomik Pozisyonu	Varyasyon	MAF Skoru
Upstream	86.647.810	C/T RS7488598	0.47
Upstream	85.660.447	G/A RS56166460	0.08
Upstream	85.671.807	G/A RS4076027	0.50
5' UTR	Değişiklik yok		
Ekzon 1	Değişiklik yok		
Intron 1-2	85.674.707	G/A RS12810608	0.44
Ekzon 2	Değişiklik yok		
Intron 2-3	85.678.000	T/- RS63339261	-
Ekzon 3	Değişiklik yok		
Intron 3-4	Bakılan Önemli Bölgelerde Değişiklik Yok		
Ekzon 4	Değişiklik yok		
3'UTR	Değişiklik yok		
Downstream	85.695.613	A/T RS1011728	0.26
	85.696.889	T/A RS1398445	0.02
	85.702.371	T/C RS1512734	0.20
	85.702.717	C/T RS4761131	0.28
	85.704.875	G/A RS11608773	0.20

Bu listede ifade edilen RS63339261 belirteçinde MAF değeri bildirilmemekteydi, RS1398445 belirteçinde ise MAF değeri düşüktü (0.02). Her iki belirteç için de dbSNP138 populasyon verilerine bakıldı. RS63339261 numaralı belirteç için homozigotluk verisi gözlenmemekle birlikte uzun bir T dizisi içindeki bir nükleotidlik T silinmesi olduğu ve insan genom projesi tekarlamalı verilerinde sıklıkla bildirildiği görüldü. RS1398445 numaralı belirtecin ise homozigot hali normal popülasyon verilerinde gözlemlendi. Tüm değişikliklerin sanger dizileme sonuçları Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9'da gösterilmiştir.

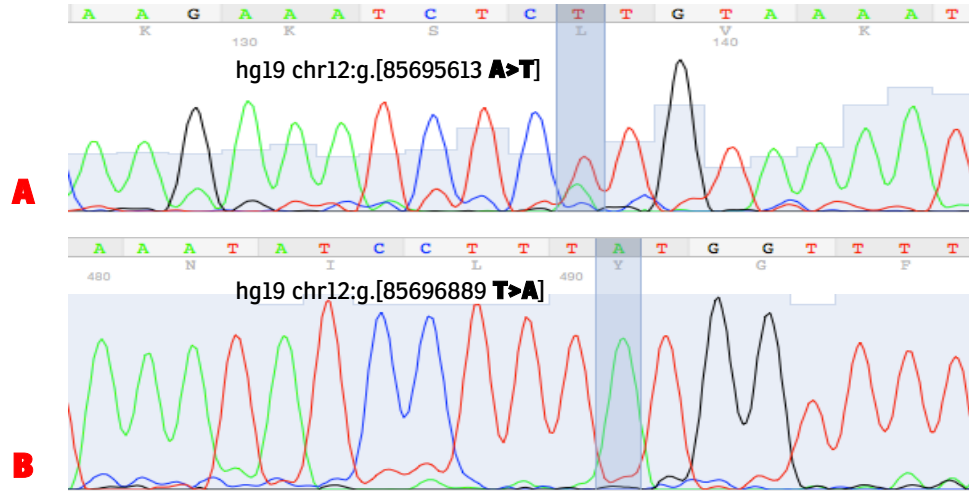
57 numaralı bireye ait DNA ile sanger sekans dizileme yapılan bölgelerin genom üzerine gösterimi için '.bed' dosyası (54) kod yazılarak yapıldı. Yazılan kod **Ek-3**'te sunuldu. Yazılan kod, ucsc genom browser 'manage tracks' sekmesi kullanılarak yüklendi. Böylelikle sanger sekans ile taraması yapılan genomik bölge görselleştirildi (Şekil 4.10)



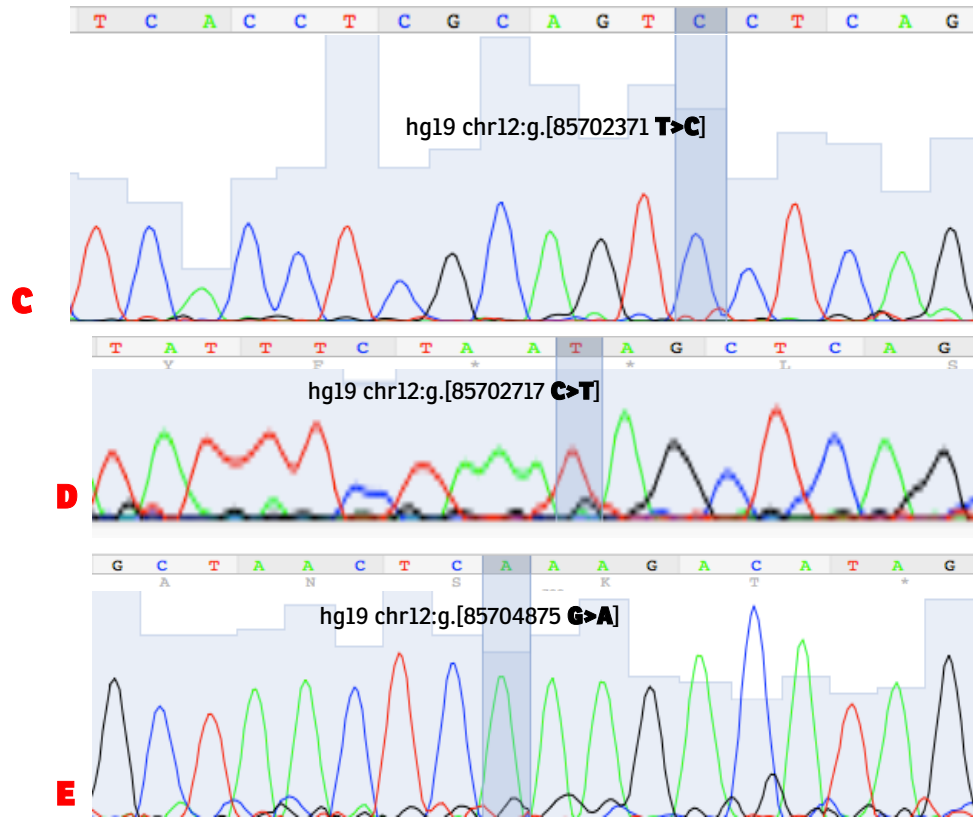
Şekil 4.6. 57 numaralı bireyin *ALX1* geni upstream bölgesinde bulunan değişiklikler. A: RS7488598 ile ifade edilen C>T homozigot değişikliği, B: RS56166460 ile ifade edilen homozigot G>A değişikliği, C: RS4076027 ile ifade edilen homozigot G>A değişikliği



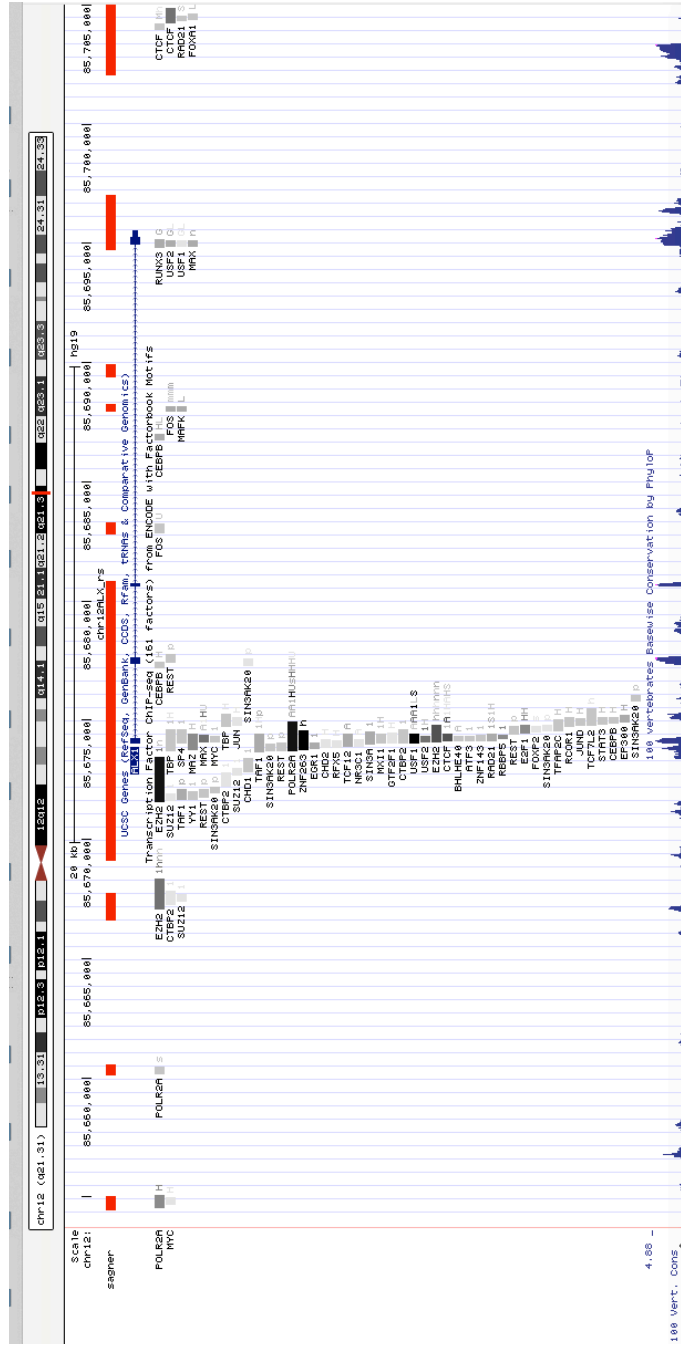
Şekil 4.7. 57 numaralı bireyin *ALX1* geni intronik bölgelerinde bulunan Değişiklikler. A: RS12810608 ile ifade edilen homozigot G>A değişikliği, B: RS63339261 ile ifade edilen homozigot del T değişikliği.



Şekil 4.8. 57 numaralı bireyin *ALX1* geni downstream bölgesinde bulunan Değişiklikler. A: RS1011728 ile ifade edilen homozigot A>T değişikliği, B: RS1398445 ile ifade edilen homozigot T>A değişikliği, C: RS1512734 ile ifade edilen T>C değişikliği,



Şekil 4.9. 57 numaralı bireyin *ALX1* geni downstream bölgesinde bulunan Değişiklikler. C: RS1512734 ile ifade edilen homozigot T>C değişikliği, D: RS4761131 ile ifade edilen homozigot C>T değişikliği, E: RS11608773 ile ifade edilen G>A değişikliği,



Şekil 4.10. Sanger dizileme ile taranmış bölgelerin gösterimi. Taranan genomik bölgeler kod yazılarak kırmızı ile gösterilmiştir. Kırmızı blokların altında *ALX1* geninin yapısı onun altındaki barda, TF bağlanma bölgeleri, en alttaki barda ise türler arası korunmuşluk düzeyi gösterilmiştir.

4.2.7. Tüm Ekzom Dizileme (WES)

Hastanın *ALXI* geni ve çevresindeki bölgelerde kliniği açıklayabilecek mutasyon bulunamaması üzerine tüm ekzom ve tüm genom dizileme aşamasına geçilmesi planlandı. Deney zamanı mevcut olan DNA'lardan ekzom analizine uygun kalitede olan DNA örneklerinin 32 ve 33 numaralı bireylere (heterozigot anne ve baba) ait olduğu görüldü. 32 numaralı birey ekzom, 33 numaralı birey tüm genom analizine alınarak heterozigot varyantların karşılaştırmalı olarak değerlendirilebileceği, saptanan kritik varyant/varyantların tüm ailede Sanger dizileme ile otozomal resesif kalıtım ile uyumlu segregasyonuna bakılabileceği düşünüldü.

Çeşitli bioinformatik yazılımlar (BWA, SAMtools, GATK ve ANNOVAR) kullanılarak ekzom analizinden elde edilen ham veri excel dosya formatına çevrildi ve aşağıdaki kriterler kullanılarak variant filtreleme uygulandı.

- Heterozigot tüm değişiklikler
- Okuma derinliği >4 ve genotip skoru >15 olan değişiklikler
- dbSNP 138 Veri Bankasında Bildirilmeyen ve GMAF Skoru 0.01'den küçük olan değişiklikler
- TÜBİTAK-BİLGEM-İGBAM yeni nesil dizileme (WES; 366 birey, WGS; 19 birey) verilerinde bildirilmeyen değişiklikler
- Kritik Bölgede Bulunan değişiklikler

Bu kriterlere uyularak yapılan filtreleme sonucunda 33 numaralı bireye ait DNA'dan yapılan tüm ekzom verisinde bulunan değişiklikler Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Aile 1, 33 numaralı bireyin ekzom değişikliklerinin filtreleme basamakları ve sonuçları.

Tüm Ekzomda Gözlenen Değişiklik Sayısı	482843
Tüm Ekzomda Gözlenen Heterozigot Değişiklik Sayısı	174424
Okuma Derinliği 4'ten büyük olan ve Genotip Skoru 15'ten büyük olan değişiklik sayısı	159045
dbSNP 138 Veri Bankasında Bildirilmeyen ve GMAF Skoru 0.01'den küçük olan değişiklik sayısı	52899
Türkiye Popülasyon Veri Bankasında Bildirilmeyen değişiklik sayısı	9075
Kritik Bölgede Bulunan Değişiklik Sayısı	4

Bulunan 4 değişiklikten 1 tanesi *SLC6A15* geni 3'UTR bölgesine denk düşmektedir. Diğer 3 tanesi ise *LRR1Q1* geninin ekzom kitinin kapsadığı intronik bölgelerdedir.

Yeni nesil tüm ekzom dizileme işlemi sonrasında özellikle GC nükleotidlerinden zengin genlerin 1. ekzonlarına ait veri elde edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle yeni nesil dizileme sonrası elde edilen veri manuel taranmasında fayda bulunmaktadır. İleri nesil tüm ekzom dizileme sonrası farklı formatlarda dosyalar elde edilmektedir. Bunlardan .bam uzantılı olan dosya formatı IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute, MA, USA)(68) programı kullanılarak manuel incelenebilmektedir. Aile 1, 32 numaralı bireye ait tüm ekzom verisi IGV programı kullanılarak incelendi. Kritik bölgedeki *OTOGL* geni hariç tüm genlerin ekzonlarının okunduğu gözlemlendi.

4.2.8. Tüm Genom Dizileme (WGS)

TÜBİTAK İGBAM yeni nesil genom dizileme alt yapısı kullanılarak 32 numaralı bireyde tüm genom dizi analizi tamamlandı. Heterozigot değişiklikler açısından yukarıdaki kriterler kullanılarak varyant filtreleme uygulandı. Varyant filtreleme sonuçları Tablo 4.5'te sunulmuştur.

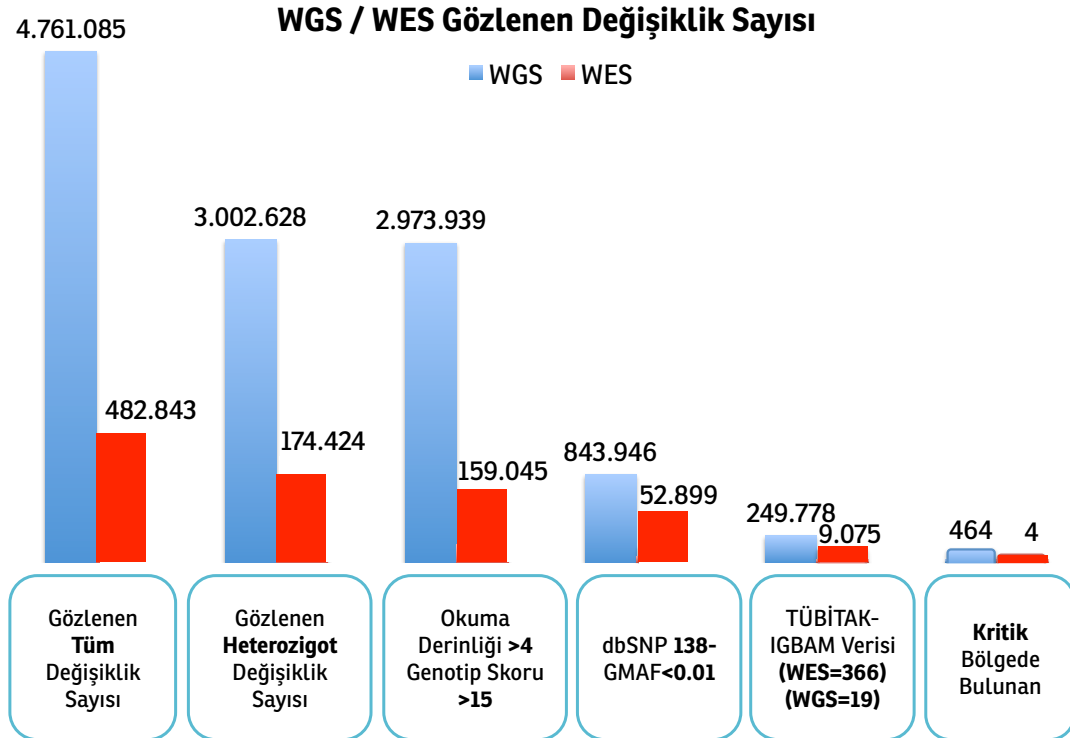
Tablo 4.5. Aile 1, 32 numaralı bireyin genom değişikliklerinin filtreleme basamakları ve sonuçları.

Tüm Genomda Gözlenen Değişiklik Sayısı	4761085
Tüm Genomda Gözlenen Heterozigot Değişiklik Sayısı	3002628
Okuma Derinliği 4'ten büyük olan ve Genotip Skoru 15'ten büyük olan değişiklik sayısı	2973939
dbSNP 138 Veri Bankasında Bildirilmeyen ve GMAF Skoru 0.01'den küçük olan değişiklik sayısı	843946
Türkiye Popülasyon Veri Bankasında Bildirilmeyen değişiklik sayısı	249778
Kritik Bölgede Bulunan Değişiklik Sayısı	464

Tüm genom verisinin değerlendirmesinde öncelikle ekzom verisinde okunamayan *OTOGL* genine ait verinin olup olmadığı kontrol edildi. Tüm ekzonlarının okunduğu ve bu gende delesyon olmadığı saptandı.

Tüm ekzom ve tüm genom verilerinden elde edilen varyant sayısının grafik olarak gösterimi Şekil 4.11.'de sunulmuştur. Tüm genom ve ekzom analizi sonrası çok yüksek miktarda değişiklik bulunmaktadır. Bunlardan hastalıktan sorumlu değişikliği bulmak için ilk yapılması gereken hastalığın kalıtım kalıbına uygun değişikliğin filtrelenmesidir. Daha sonra okuma derinliği dikkate alınır. Genom üzerindeki her hangi bir nükleotidin okunma sayısına 'okuma derinliği' denir ve bu 'phred quality score' ile gösterilir (69). Okuma derinliği sonrasında elimizdeki

değişiklik sayısının tüm genom için 3 milyondan 2.97 milyona, tüm ekzom için ise 174 binden 159 bine düşmesi kaliteli bir ekzom/genom deneyinin yapıldığını gösterdi. Çok önemli diğer bir adım 'in house' olarak tabir edilen ve bu çalışma özelinde Türk popülasyon verilerini yansıtması açısından TÜBİTAK-İGBAM'da bulunan veriler kullanılarak yapılan filtreleme sonrasında tüm genom için değişikliğin 843 binden 249 bine, tüm ekzom için ise 52 binden 9 bine indirilmesiydi. Son olarak en önemli adım, bu bulgularla, homozigotluk haritalaması sonrasında kritik bölge belirlenmesiyle yapılan filtrelemenin değişiklik sayısını bir kaç değişikliğe indirecek güçte olmasıdır. Bu durum tüm genom için 249 bin değişiklikten 464 değişikliğe, tüm ekzom için 9 bin değişiklikten 4 değişikliğe yaklaşık %99 oranında azalma göstererek çarpıcı şekilde karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.11. Tüm ekzom ve tüm genom verisindeki değişikliklerin filtrelemeler kullanılarak eleme sonrası dağılımının gösterilmesi.

4.2.9. Kritik Bölgede Saptanan Değişikliklerin Fonksiyona Yönelik Anotasyonu

Bulunan değişiklikler kodlanmayan genomik bölgeye denk geldiği için değişikliğin önemine karar vermek için bazı kriterler kullanıldı. Bunlar;

- Türler arası korunmuşluk
- TF (Transkripsiyon Faktörü) bağlanma bölgesi
- DNase I hassasiyeti

Bu değişikliklerin genomda denk geldikleri yerleri tespit edebilmek için kod yazılarak '.bed' dosyası yapıldı (Ek-3). Varyantların bulunduğu pozisyona göre farklı renklendirme ile ifade edilen değişiklikler Şekil 4.10 'da gösterilmiştir.

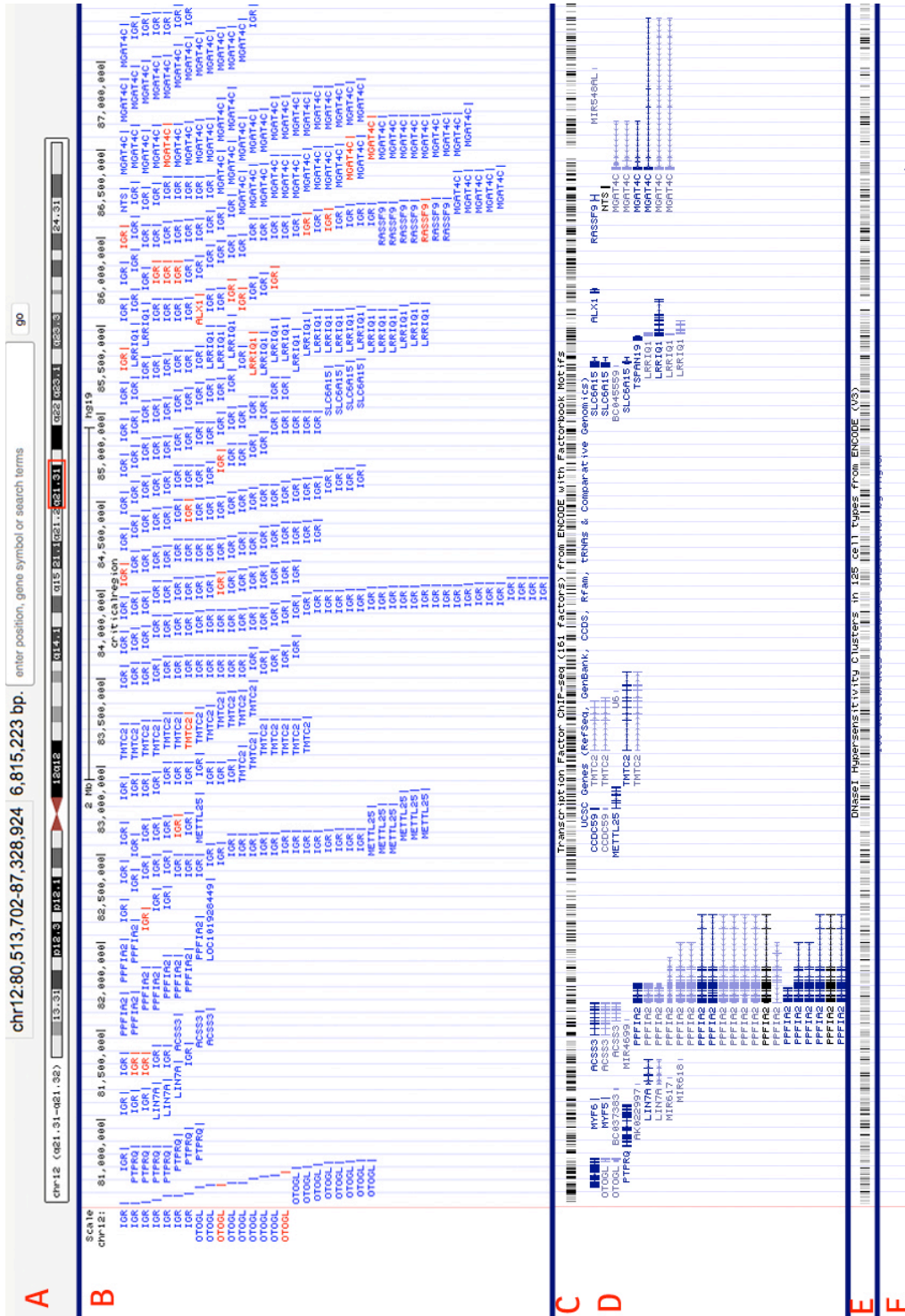
Yazılan kod ile değişiklik;

-eğer bir gen üzerine denk geliyorsa ve yukarıda belirlenen kriterlere göre önemli olduğu düşünülen bölgeye rastlıyorsa "genin ismi ve kırmızı renk" ile gösterildi,

-eğer bir gen üzerine denk geliyorsa ve yukarıda belirlenen kriterlere göre önemli olduğu düşünülmeyen bölgeye rastlıyorsa "genin ismi ve mavi renk" ile gösterildi,

-eğer genler arası bir bölgeye denk geliyorsa 'IGR (intergenic region)' ile gösterildi.

Böylelikle tüm genom ve tüm ekzom ile homozigot bölgede saptanan tüm değişiklikler görselleştirildi (Şekil 4.12.)



Şekil 4.12 Kritik Bölgede Bulunan MAF Skoru <0.01 olan ve Türkiye Popülasyon Veri Bankasında Bulunmayan Değişikliklerin Gösterimi

A. Bölgenin Kromozomal Pozisyonu

B. Kırmızı Gösterilenler, Bilinen Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgesine Denk Düşen Değişiklikler

Mavi Gösterilenler, Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgesine Denk Düşmeyen Değişiklikler

C. Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgesi

E. DNase I Hassas Bölgeler

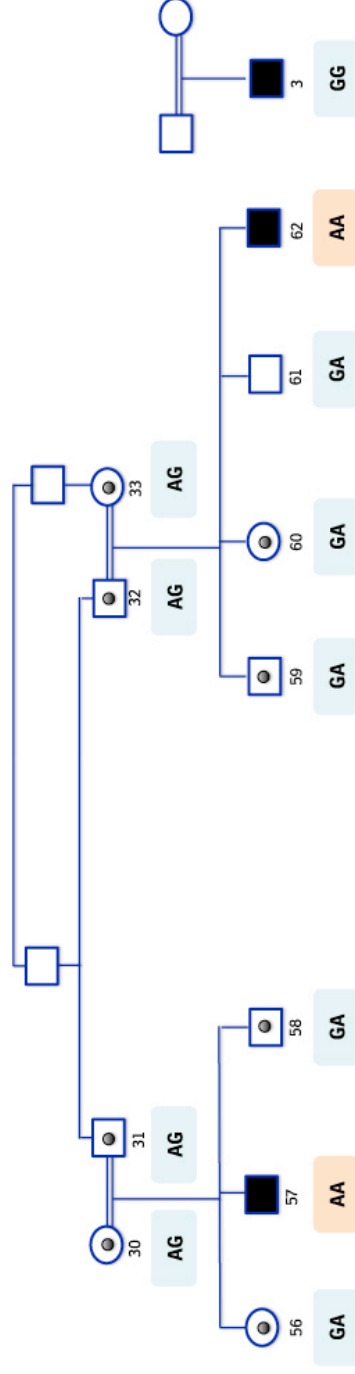
D. Bölgede Yerleşim Gösteren Genler

F. Türler Arası Korunmuş Bölgeler

Tüm genom analizi kullanılarak filtreleme işlemleri sonrasında homozigot blokta toplam 464 değişiklik bulundu. Bunlardan 168 tanesi her hangi bir gen bölgesine denk gelirken, 296 tanesi genler arası bölgeye (intergenic region) denk gelmekteydi. Tüm değişiklikler arasında transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine denk gelen 27 değişiklik bulunmaktaydı.

Bunlardan *LRR1Q1* geni intronik bölgesine denk gelen heterozigot hg19 chr12 g.[85459869 G>A] pozisyona sahip değişiklik, *ALX1* geninin 3' ucunda bulunan heterozigot hg19 chr12 g.[85761515 G>A] pozisyona sahip değişiklik ve yine *Alx1* geninin 3' ucunda bulunan pek çok transkripsiyon faktörünün bağlandığı heterozigot hg19 chr12 g.[85862755 T>C] , heterozigot hg19 chr12 g.[85862762 A>G], heterozigot hg19 chr12 g.[85862766 G>A] pozisyonuna sahip değişikliklerin önemli olduğu düşünüldü.

Bu değişikliklerden *LRR1Q1* geninin intron 8'inde bulunan g.[85459869 G>A] değişikliğinin *USF-1* ve *GATA3* transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine denk geldiği görüldü. *USF1* transkripsiyon faktörünün erken embriyogenik dönemde osteoklastogenezis için önemli olduğu gösterilmiştir (70). Bu nedenle bu bağlanma bölgesi öncelikli aday olarak belirlendi ve *LRR1Q1* intron 8'in tamamına Aile 1 ve Aile 2'de sanger dizileme işlemi yapıldı. Aile 1'de ilgili değişikliğin otozomal resesif kalıtım kalıbı kuralları ile uyumlu olarak kuşaklar arası kalıtıldığı gözlemlendi (Şekil 4.13.). Aile 2 (Pakistan ailesi)'de ise intron 8'de herhangi bir varyasyon saptanmadı. Benzer şekilde *ALX1* geninin distalindeki transkripsiyon faktörü bağlanması açısından önem atfedilen 4 değişiklik her iki ailede tarandı ve Aile 1'de tam segregasyon gözlemlendi fakat aile 2'de herhangi bir değişiklik saptanmadı.



Aile 2

Aile 1

Şekil 4.13. *LRR/Q1* geni intronik bölgesindeki chr12:85459869 g.[85459869 G>A] USF-1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinin sanger dizileme ile taranması. Aile 1 (Türkiye), değişiklik hasta bireylerde segregе olurken, aile 2(pakistan) değişiklik gözlenmemektedir.

5. TARTIŞMA

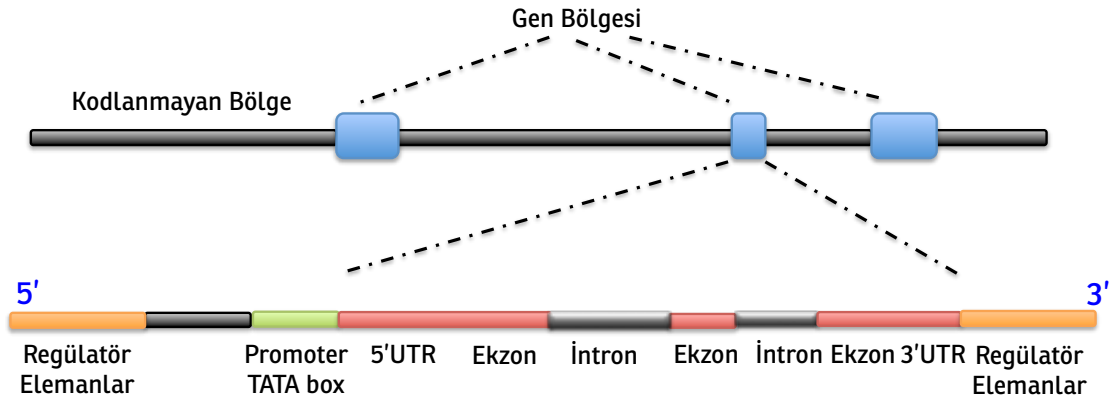
Bu çalışmada *ALXI* ilişkili frontonazal displazi fenotipine (FND3) tam benzerlik gösteren ancak sanger dizileme ile *ALXI* geninde mutasyon saptanamayan yüz malformasyonlu ailelerde hastalıktan sorumlu genetik etyolojinin bulunmasına çalışılmıştır. Açıkça otozomal resesif kalıtım kalıbı gösteren ve birkaç kuşakta FND3 malformasyonunun gözleendiği geniş aile (Aile 1) gen haritalama çalışması için indeks aile olarak kullanılmış genom boyu SNP genotipleme ve homozigotluk haritalaması ile malformasyon genomda kromozom 12q21.3 bölgesindeki yaklaşık 7Mb'lık bir aralığa haritalanmıştır. Genomda başka hiçbir bölgede hastalıkla tam segregasyon gösteren homozigot blok tespit edilememesi bu malformasyonun ilgili bölgeye kesin olarak haritalanmasını olanaklı kılmıştır.

Bu bulguya ek olarak tamamen farklı bir etnik kökenden (Pakistan) gelen ikinci ailenin de aynı bölgede homozigot haplotip göstermesi ilgili bulguyu kuvvetlendirecek niteliktedir. Bu bölgede pek çok gen yer olmakla birlikte özellikle literatürde FND Tip 3 ile ilişkilendirilmiş (4) *ALXI* geninin de 7Mb'lık kritik alanda yer aldığı görülmüştür. Oldukça nadir görülen FND Tip 3 malformasyonuna neden olan *ALXI* geninin bu bölgede bulunuyor olması ve DNA dizi analizinde *ALXI* geninin kodlayan bölgesinde mutasyon saptanamamış olması genin regülasyonunda rol alan bazı faktörlerde meydana gelen değişikliklerin ilgili kliniğe neden olabileceğini akla getirmiştir.

Regülasyonda rol alan en önemli bölgeler promotor ve çok sayıda transkripsiyon faktörünün bağlandığı genin 5' ucunda yer alan yaklaşık 5000 bazlık bir alandır. Tez kapsamında *ALXI* geninin önündeki -4861 baz çiftlik bölge tamamen dizilenmiş bulunan varyantların dbSNP138 veri bankasında yüksek MAF değerlerine sahip olduğunun görülmesi ile bu değişikliklerin hastalıktan sorumlu olmadığına karar verilmiştir. Bunu takiben UCSC verileri kullanılarak intronlar ve 3' ucunda gene yakın yerleşimli aday bölgeler seçilmiş ve bu alanların Sanger dizilenmesi de tamamlanmıştır (Şekil 4.10.). Burada tespit edilen varyantlar içerisinde dBSNP veri bankasında MAF değeri belirtilmeyen ve popülasyon

taramasında homozigotluk verilerinin bulunmadığı tek değişiklik RS63339261 değişikliğidir. Bu değişikliğin uzun tekrarlayan T nükleotid dizisi içinde bir bazlık silinme olduğu görülmüştür. Bu değişiklik için veri bankalarına (ensembl, dbSNP) bakıldığında, değişikliğin heterozigot halinin farklı popülasyonlarda görüldüğü ancak homozigotluğu hakkında popülasyon verisinin bulunmadığı saptanmıştır. İlgili değişikliğin farklı popülasyonlarda tekrarlamalı olarak bildirilmesi değişikliğin hastalıktan sorumlu olmayıp toplumda rastlanan bir polimorfizm olduğunu düşündürmekteyse de, homozigotluk gözlenmemesi bu değişikliğin tam olarak dışlanmasını engellemiştir.

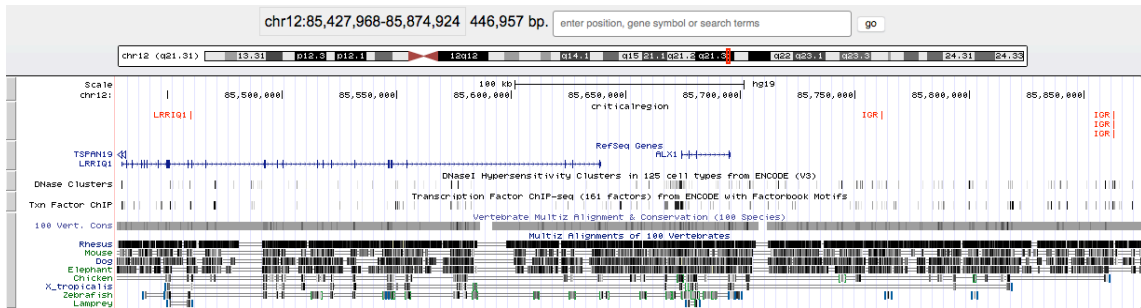
Son yıllarda giderek hız kazanan yüksek çözünürlüklü genom analiz çalışmaları genomda koda dönüşmeyen (non-coding genom bölgeleri) alanlardaki mutasyonların hastalıkların etyolojisinde rol aldığına kanıtlar sunmaktadır (52, 53). İnsan genomu 3.2 milyar baz çiftinden oluşmaktadır ve bundan meydana gelen yaklaşık 19.000 gen, 200.000 ekzon bulunmaktadır (71-73). Genomun sadece %1.5'lik bölümü protein kodlamaktadır. Geriye kalan %98.5'lik bölüme non coding DNA adı verilir. Kodlanmayan genomik bölgelerde; gen ekspresyonunu düzenleyen promotor ve geni ekspresyonunu aktive eden (enhancer) bölgeler, intronik bölümler, lokus kontrol bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 5.1). Bunlardan intronik bölümler genomun %26'sını oluştururken, genomun %20'lik bölümünün gen regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (74).



Şekil 5.1. Genom bölgelerinin gösterimi

Bu bölgelerin genomu nasıl regüle ettiğini açıklamak için 2003 yılında ENCODE (The ENCyclopedia Of DNA Elements) projesi başlatılmış (75) ve ilk verilere 2012 yılında ulaşılmaya başlanmıştır (76). ENCODE kapsamında; transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri, bağlanılan genomik dizinin motifi, histon modifikasyonları yapan genomik diziler, genlerin promotor bölgeleri, enhancer bölgeleri, DNase I hassas bölgeler, türler arası korunmuş bölgeler, DNA metilasyonunun meydana geldiği DNA dizileri, kodlanmayan gen bölgelerinin karakterizasyonu, miRNA ve lincRNA bölgelerinin tespiti başlıklarında çalışmalar yapılmaktadır (77).

ENCODE verileri İnsan Genom Projesi (İGP) kapsamında geliştirilmiş olan veri bankaları ile (UCSC ve Ensembl) bağlantılı hale getirilmiş durumdadır. Bu veriler kullanılarak tez kapsamında tamamlanan tüm ekzom ve tüm genom dizileme verileri bölgeye özel anotasyon yapma amaçlı olarak kullanılabilmiş, varyant filtreleme aşamaları sonucunda kritik olarak saptanan 464 varyantın tamamı fonksiyonda önemi olabilecek üç parametre (TF bağlanma bölgesi olması, DNase I hassasiyeti ve türler arası korunmuşluk) ile eşleştirilerek görselleştirilmiştir (Şekil 4.12.). Bu analiz ilk planda 3 bölgede bulunan 5 değişikliğin kritik regülatör bölgelerle ilişkisini göstermiştir (Şekil 5.2). Bu değişikliklerin MAF değerleri veri bankalarında (Ensembl, dbSNP138) rapor edilmemiştir. Ayrıca Türk popülasyonuna ait veri havuzunda (TÜBİTAK-İGBAM) da gözlenmemiştir.



Şekil 5.2. Transkripsiyon faktörü bağlanma, DNase I hassasiyeti ve türler arası korunmuşluk dikkate alınarak kritik olduğu düşünülen 5 değişikliğin genom üzerine anotasyonu. Değişiklikler kırmızı ile gösterilmiştir.

Bu değişikliklerden; 1-) *ALX1* geninin 5' yönünde 214.167 baz uzağına yerleşim gösteren, *LRR1Q1* geni intronik bölgesine denk gelen heterozigot chr12 g.[85459869 G>A] pozisyona sahip değişiklik ve USF-1 ve GATA3 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesidir. Yapılan çalışmalarda GATA3 erken embriyolojik süreçte nöronal gelişimde önemli olduğu gösterilmiştir (78). USF1 transkripsiyon faktörünün ise erken embriyogenik dönemde osteoklastogenezis için önemli olduğu gösterilmiştir (70). Hastalarda yüz gelişiminde defekt olduğu için USF1 bağlanma bölgesinde meydana gelebilecek değişikliğin kliniğe neden olabileceği düşünölmüştür. 2-) *ALX1* geninin 3' yönünde 65.954 baz çifti uzağına yerleşim gösteren chr12 g.[85761515 G>A] pozisyona sahip değişiklik ve TCF12 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesidir. Yapılan çalışmalarda TCF12'nin heliks kıvrım heliks motifinde bir transkripsiyon faktörü olduğu, kas gelişiminde önemli görev aldığı gösterilmiştir (79). Aynı zamanda mutasyonları kemiklerin erken kapandığı koronal kraniosinostoza neden olduğu bildirilmiştir (80). 3-) geri kalan 3 değişiklik tek bir lokalizasyonda bulunmaktadır. Bunlar *ALX1* geninin 3' yönünde 167.194 baz uzağına yerleşim gösteren pek çok transkripsiyon faktörünün (CTCF, ARID3A, POU2F2, FOSL2, RFX5, ZNF143, FOS, JUN, JUND, BACH1, MAFK, CEBPB, BATF) bağlandığı chr12 g.[85862755 T>C] , chr12 g.[85862762 A>G], chr12 g.[85862766 G>A] pozisyonuna sahip değişiklikler şeklindedir. Bu varyantların tamamının tüm aile bireylerinde dizilenmesi yapılarak ailede otozomal resesif kalıttan beklenen segregasyonun gözlendiği tespit edilmiş ancak bölgeye homozigotluk gösteren Pakistan kökenli ailede ilgili bölgelerde herhangi bir varyant tespit edilememesi nedeni ile bu bölgelerin hastalıkla kesin ilişkisi kanıtlanamamıştır.

ALX1 geninde özellikle 3' ucundaki değişikliklerin genin ifadesi üzerinde etkili olduğu yönünde kanıtlar vardır.

Örnek olarak daha önce literatürde *ALX1* geninin de üyesi olduğu PRD sınıfı bir homeobox geni olan *PAX6* geninin mutasyonları aniridi ile ilişkilendirilmiştir (83). *PAX6* geni türler arası oldukça korunmuş yakın ve uzak yerleşimli geni regüle eden elementler (cis acting) ile çevrelenmiştir (82, 83).

Yapılan çalışmalarda *PAX6* geninin 3' ucunda meydana gelen genomik düzenlenmelerin de genin ekspresyonunu etkilediği ve böylelikle aniridi kliniğine neden olduğu gösterilmiş, (84) genin 3' ucuna regülasyondan sorumlu bazı moleküllerin bağlanabileceği düşünülmüştür (84). Daha sonra yapılan çalışmalar ile genin 3' ucunda yaklaşık 150kb uzağında SIMO adı verilen bir transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesi bulunmuştur (85). Bu transkripsiyon faktörünün genin kodlanmayan bölgesine bağlanarak *PAX6* gen ekspresyonunu cis-acting element olarak regüle ettiği gösterilmiş, SIMO bağlanma bölgesindeki mutasyon da aniridi kliniği ile ilişkilendirilmiştir (85).

Yine farelerde yapılan çalışmalar *ALXI* geninin 3' ucunda yer alan OAR domainin de genin ifadesini düzenleyici etki yapan moleküler bir mekanizma olarak çalıştığını düşündürmektedir (39).

ALXI geninin 3' distal yönünde yer alan yaklaşık 2Mb'lik bir alan tez içeriğinde saptanan kritik bölgeye isabet etmektedir. Bu bölgede bulunan ve dbSNP138 veri bankası ile Türk popülasyonu verilerinde rapor edilmeyen 131 adet yeni değişiklik tespit edilmiştir. Bunlardan 13 tanesi bilinen bir transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine denk gelmektedir. Bu faktörlerden yukarıda söz edildiği şekilde TCF12 koronal kraniosinostozlarla ilişkilendirilmesi nedeniye önemli bir aday olarak düşünülmüş diğerlerinde doğrudan fonksiyon ilişkisi kurulamamıştır. Bununla birlikte literatürde bildirilen *ALXI* geni 3'UTR bölgesine yaklaşık 3.4kb uzaklıkta yer alan translokasyon vakasından elde edilen bulgular kritik bölge arayışında her zaman regülatör bir elmanın aranmasının gerekli olmadığını da ortaya koyar niteliktedir (86). Bu translokasyon vakasında hastanın klinik özellikleri arasında doğrudan FND3 malformasyonu ile ilgili bir bulgu belirtilmese de zeka geriliği, mikrosefali yanısıra hafif kraniofasial bulgular da rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada bu translokasyon bölgesinde herhangi bir regülatör eleman saptanmamış olmakla birlikte 3'UTR'da meydana gelen kırılma sonrası *ALXI* gen regülasyonunun bozulduğu dolayısıyla kliniğe bu durumun neden olabileceği söylenmiştir (86).

Bu bulgularla uyumlu olarak *ALXI* geninin 3' ucunda evrimsel olarak

yüksek düzeyde korunmuş bölgeler de bilinmektedir. Bunlardan özellikle *ALXI* geni 3' UTR bölgesine, çok yakın yerleşimli, 2kb uzaklıkta bulunan chr12:85,696,221-85,696,524 pozisyonundaki bölge herhangi bir transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olmamakla birlikte evrimsel açıdan ileri derecede korunmuş durumdadır. Tez kapsamında bu bölgeye herhangi bir değişikliğin isabet etmediği görülmüştür. Yine de PRD sınıfı gen ailelerinde genlerin 3' distal bölgelerinin gen regülasyonlarındaki önemi göz önüne alınarak 2Mb'lik alanda yer alan 131 değişikliğin tamamının aday olduğu düşünülmüştür.

Literatürde genden çok uzak bölgelere yerleşim gösteren bazı regülatör dizilerinin önemli olabileceği gösterilmiş, bulunan regülatör diziler transgenik fareler üzerinde çalışılmış ve sonuçta hastalıkla ilgili gen dizisinde değişiklik olmaksızın cis-acting element dizilerinde meydana gelen değişikliklerin aynı hastalığa yol açtığı gösterilmiştir (87). Bu verilerden hareketle yüz gelişiminde görev alan önemli genler ve bu genlere ait bulunan regülatör bölgelerin temsil edildiği FaceBase veritabanı yapılmıştır (<https://www.facebase.org/>). FaceBase veri tabanı kullanılarak kromozom 12q21.3'de yer alan kritik aralıkta yüz gelişimi ile ilgili regülatör bir bölge olup olmadığı araştırılmıştır. Fakat ilgili bölgede henüz bir regülatör lokus tanımlanmadığı görülmüştür.

Tespit edilen değişikliklerin ilgili klinik ile ilişkilendirilmesinde yeteri kanıt olmaması üzerine gende kopya sayısı değişimi olup olmadığı sorusu akla gelmiştir. Yeni nesil dizileme genlerdeki büyük duplikasyonları tespit etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu göze alınarak *ALXI* geninde kopya sayısı artışı quantitative PZR ve MLPA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Her iki analizde de kopya sayısında artma/azalma gözlenmemiştir. Buna ek olarak *ALXI* geninin ekspresyon düzeyini etkileyen henüz belirlenemeyen bir varyant olduğu varsayılarak bir bireyden (57 numaralı birey) hücre kültür materyali üzerinde ekspresyon çalışması yapılmış ve *ALXI* mRNA'sının hastada intakt olduğu görülmüştür. Fakat tek birey çalışıldığı için gen ekspresyonunun göreceli kantitasyonu hakkında fikir edinilememiştir.

Bu bulgular ışığında Aile 1'de hasta bireylerin tamamı, taşıyıcı bireyler ve

bölgeye homozigotluk gösteren Aile 2'deki hasta bireyi de kapsayacak şekilde bölgeye özgü yüksek çözünürlüklü dizileme çalışmasının (targeted deep sequencing) yapılmasının gerekli olduğuna karar verilmiştir.

Sonuç olarak;

bu çalışmada FND tip 3 malformasyonu ile uyumlu ailelerde *ALXI* geni kodlayan bölgesinde mutasyon saptanamaması üzerine başlatılan genom boyu SNP çip genotipleme ve homozigotluk analizinde malformasyon *ALXI* geninin kritik aralıkta yer aldığı kromozom 12q21.3 bölgesine haritalanması ile genin regülasyonunu bozan kodlanmayan bölge değişikliklerinin hastalıktan sorumlu olacağı düşünülmüştür. Bu kapsamda genom boyu ekzom ve tüm genom dizileme çalışmasında kritik bölgede yer alan 464 varyant saptanmış kod yazılımları ile bölgeye özgü anotasyon uygulanmış, ailede tam segregasyon gösteren kritik varyantlar belirlenmiştir.

6.SONUÇLAR

1- Oldukça nadir gözlenen FND tip 3 kliniğine sahip dünyadaki ikinci büyük aile (Aile 1) saptanmıştır. Beklenildiğinin aksine *ALXI* geni kodlayan bölgesinde mutasyon saptanmamıştır.

2- Genom boyu homozigotluk analizi ile malformasyonun kesin olarak 12q21.3 bölgesine haritalaması yapılmıştır.

3- İlgili bölgede *ALXI* geninin yer alması nedeni ile geni regüle eden kodlanmayan bölge değişikliklerinin kliniğe neden olabileceği düşünülmüştür.

4- Kod yazılımı ile bölgeye özgü anotasyon yapılmış ve bunun görselleştirilmesi sağlanmıştır. Kritik bölgede hastalıktan sorumlu olabilecek 464 değişiklik bulunmuştur.

5- Regülatör bölgede değişiklikler saptanmakla birlikte ikinci ailede (Aile 2) aynı değişikliklerin gösterilememesi nedeniyle bulgular henüz doğrulanmamıştır.

6- *ALXI* geninde kopya sayısı değişikliği bulunmamıştır.

7- *ALXI* mRNA'sının intakt olduğu gösterilmiş ekspresyonun görece kantitasyonu hakkında bilgi elde edilememiştir.

8- Yeni nesil dizileme sonrası elde edilen yüksek miktardaki verinin analizinde Türk popülasyon veri bankasının gerekliliği çarpıcı şekilde gösterilmiştir. İleri nesil dizileme analizlerinin genom boyu bağlantı/homozigotluk analizleri ile birleştirilmesi kritik öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Sedano HO, Cohen M, Jr Jirasek J, Gorlin RJ. Frontonasal dysplasia. *J Pediatr.* 1970;76:906-13.
2. Sedano H, Gorlin RJ. Frontonasal malformation as a field defect and in syndromic associations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65:704-10
3. Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol.* 2007;166(7):775-85.
4. Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, et al. Disruption of ALX1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal-recessive ALX-related frontonasal dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):789-96.
5. Twigg SR, Versnel SL, Nurnberg G, Lees MM, Bhat M, Hammond P, et al. Frontorhiny, a distinctive presentation of frontonasal dysplasia caused by recessive mutations in the ALX3 homeobox gene. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):698-705.
6. Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, et al. ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Hum Mol Genet.* 2009;18(22):4357-66.
7. Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Berge DT. Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol.* 1999;43(7):651-63.
8. WJ H. *Human Embryology: Development of Form and Function.* WJ H, editor. Baltimore: Williams & Wilkins; 1962.
9. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology.* St.Louis: Mosby-Year Book Inc.; 1994.

10. Richman JM, Tickle C. Epithelial-mesenchymal interactions in the outgrowth of limb buds and facial primordia in chick embryos. *Dev Biol.* 1992;154(2):299-308.
11. Hinrichsen K. The early development of morphology and patterns of the face in the human embryo. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1985;98:1-79.
12. Som PM, Naidich TP. Illustrated review of the embryology and development of the facial region, part 1: Early face and lateral nasal cavities. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(12):2233-40.
13. Steding G, Jian Y. The origin and early development of the nasal septum in human embryos. *Ann Anat.* 2010;192(2):82-5.
14. Eriksson BJ, Samadi L, Schmid A. The expression pattern of the genes engrailed, pax6, otd and six3 with special respect to head and eye development in *Euperipatoides kanangrensis* Reid 1996 (Onychophora: Peripatopsidae). *Dev Genes Evol.* 2013;223(4):237-46.
15. Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell.* 1991;67(6):1059-74.
16. Loosli F, Köster RW, Carl M, Krone A, Wittbrodt J. Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev.* 1998;74(1-2):159-64.
17. Bonnard C, Strobl AC, Shboul M, Lee H, Merriman B, Nelson SF, et al. Mutations in IRX5 impair craniofacial development and germ cell migration via SDF1. *Nat Genet.* 2012;44(6):709-13.
18. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development.* 2005;132(5):851-61.
19. Som PM, Streit A, Naidich TP. Illustrated review of the embryology

and development of the facial region, part 3: an overview of the molecular interactions responsible for facial development. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35(2):223-9.

20. Bürglin TR. Homeodomain subtypes and functional diversity. *Subcell Biochem.* 2011;52:95-122.

21. Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* 2007;5:47.

22. Zhong YF, Butts T, Holland PW. HomeoDB: a database of homeobox gene diversity. *Evol Dev.* 2008;10(5):516-8.

23. Consortium HGR.
<http://homeodb.zoo.ox.ac.uk/families.get?og=Human> 2014.

24. Holland PW. Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(1):31-45.

25. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell.* 1994;78(2):191-201.

26. Wilkie AO. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10):1647-56.

27. Chi Y-I. Homeodomain Revisited: a Lesson from Disease-causing Mutations. *Hum Genet.* 2005;116(6):433-44.

28. Bulfone A, Kim HJ, Puellas L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL. The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev.* 1993;40(3):129-40.

29. Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, et al. Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants

due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*. 1995;121(10):3279-90.

30. Balczarek KA, Lai ZC, Kumar S. Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol*. 1997;14(8):829-42.

31. Henderson DJ, Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Over-expression of the chondroitin sulphate proteoglycan versican is associated with defective neural crest migration in the Pax3 mutant mouse (splotch). *Mech Dev*. 1997;69(1-2):39-51.

32. McGonnell IM, Graham A, Richardson J, Fish JL, Depew MJ, Dee CT, et al. Evolution of the Alx homeobox gene family: parallel retention and independent loss of the vertebrate Alx3 gene. *Evol Dev*. 2011;13(4):343-51.

33. Dee CT, Szymoniuk CR, Mills PE, Takahashi T. Defective neural crest migration revealed by a Zebrafish model of Alx1-related frontonasal dysplasia. *Hum Mol Genet*. 2013;22(2):239-51.

34. Beverdam A, Brouwer A, Reijnen M, Korving J, Meijlink F. Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in Alx3/Alx4 double mutant mice. *Development*. 2001;128:3975-86.

35. Smith JD, Hing AV, Clarke CM, Johnson NM, Perez FA, Park SS, et al. Exome sequencing identifies a recurrent de novo ZSWIM6 mutation associated with acromelic frontonasal dysostosis. *Am J Hum Genet*. 2014;95(2):235-40.

36. Makarov R, Steiner B, Gucev Z, Tasic V, Wieacker P, Wieland I. The impact of CFNS-causing EFN1 mutations on ephrin-B1 function. *BMC Med Genet*. 2010;11:98.

37. Qu S, Li L, Wisdom R. Alx-4: cDNA cloning and characterization of a novel paired-type homeodomain protein. *Gene*. 1997;203(2):217-23.

38. Bürglin TR, Ruvkun G. The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3(4):615-20.
39. Brouwer A, ten Berge D, Wiegerinck R, Meijlink F. The OAR/aristaless domain of the homeodomain protein Cart1 has an attenuating role in vivo. *Mech Dev.* 2003;120(2):241-52.
40. Mavrogiannis LA, Taylor IB, Davies SJ, Ramos FJ, Olivares JL, Wilkie AO. Enlarged parietal foramina caused by mutations in the homeobox genes ALX4 and MSX2: from genotype to phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(2):151-8.
41. Kayserili H, Altunoglu U, Ozgur H, Basaran S, Uyguner ZO. Mild nasal malformations and parietal foramina caused by homozygous ALX4 mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(1):236-44.
42. S LE. Homozygosity Mapping: A Way to Map Human Recessive Traits with the DNA of Inbred Children. In: David B, editor. 1987.
43. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):139-47.
44. Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, Balci-Hayta B, Cirak S, Akarsu NA, et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2010;87(6):834-41.
45. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, et al. Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90(1):76-85.
46. Semerci CN, Kalay E, Yıldırım C, Dinçer T, Olmez A, Toraman B, et al. Novel splice-site and missense mutations in the ALDH1A3 gene underlying autosomal recessive anophthalmia/microphthalmia. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(6):832-40.

47.

http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= pW9F_JKGi64.

48. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.

49. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.

50. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-303.

51. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):e164.

52. Makrythanasis P, Antonarakis SE. Pathogenic variants in non-protein-coding sequences. *Clin Genet*. 2013;84(5):422-8.

53. Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 2010;464(7287):409-12.

54. <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQformat.html - format1.7>.

55. Yariz KO, Duman D, Seco CZ, Dallman J, Huang M, Peters TA, et al. Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2012;91(5):872-82.

56. Schraders M, Oostrik J, Huygen PL, Strom TM, van Wijk E, Kunst HP, et al. Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am J*

Hum Genet. 2010;86(4):604-10.

57. Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 1990;9(3):821-31.

58. Butz S, Okamoto M, Südhof TC. A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell.* 1998;94(6):773-82.

59. Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo EF, Momoi MY, et al. LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. *PLoS One.* 2014;9(3):e92695.

60. Watkins PA, Maiguel D, Jia Z, Pevsner J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2736-50.

61. Serra-Pagès C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M. Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15611-20.

62. Sunryd JC, Cheon B, Graham JB, Giorda KM, Fissore RA, Hebert DN. TMTC1 and TMTC2 are novel endoplasmic reticulum tetratricopeptide repeat-containing adapter proteins involved in calcium homeostasis. *J Biol Chem.* 2014;289(23):16085-99.

63. Bröer A, Tietze N, Kowalczyk S, Chubb S, Munzinger M, Bak LK, et al. The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2). *Biochem J.* 2006;393(Pt 1):421-30.

64. Quast C, Cuboni S, Bader D, Altmann A, Weber P, Arloth J, et al. Functional coding variants in SLC6A15, a possible risk gene for major depression. *PLoS One.* 2013;8(7):e68645.

65. Lee CM, Yang P, Chen LC, Chen CC, Wu SC, Cheng HY, et al. A novel role of RASSF9 in maintaining epidermal homeostasis. *PLoS One*. 2011;6(3):e17867.
66. Mai JK, Triepel J, Metz J. Neurotensin in the human brain. *Neuroscience*. 1987;22(2):499-524.
67. Furukawa T, Youssef EM, Yatsuoka T, Yokoyama T, Makino N, Inoue H, et al. Cloning and characterization of the human UDP-N-acetylglucosamine: alpha-1,3-D-mannoside beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homologue (hGnT-IV-H) gene. *J Hum Genet*. 1999;44(6):397-401.
68. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178-92.
69. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175-85.
70. Kim JH, Kim K, Jin HM, Youn BU, Song I, Choi HS, et al. Upstream stimulatory factors regulate OSCAR gene expression in RANKL-mediated osteoclast differentiation. *J Mol Biol*. 2008;383(3):502-11.
71. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
72. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.
73. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet*. 2014;23(22):5866-78.

74. Boffelli D, Nobrega MA, Rubin EM. Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nat Rev Genet.* 2004;5(6):456-65.
75. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science.* 2004;306(5696):636-40.
76. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57-74.
77. <http://www.nature.com/encode/-/threads>.
78. George KM, Leonard MW, Roth ME, Lieuw KH, Kioussis D, Grosveld F, et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development.* 1994;120(9):2673-86.
79. Zhao P, Hoffman EP. Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn.* 2004;229(2):380-92.
80. Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JA, Hoogeboom AJ, et al. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet.* 2013;45(3):304-7.
81. Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, et al. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet.* 1995;4(3):415-22.
82. Kleinjan DJ, Coutinho P. Cis-ruption mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2009;8(4):317-32.
83. Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, et al. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol.* 2005;3(1):e7.

84. Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T. 3' deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13755-9.

85. Bhatia S, Bengani H, Fish M, Brown A, Divizia MT, de Marco R, et al. Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia. *Am J Hum Genet*. 2013;93(6):1126-34.

86. Liao HM, Fang JS, Chen YJ, Wu KL, Lee KF, Chen CH. Clinical and molecular characterization of a transmitted reciprocal translocation t(1;12)(p32.1;q21.3) in a family co-segregating with mental retardation, language delay, and microcephaly. *BMC Med Genet*. 2011;12:70.

87. Attanasio C, Nord AS, Zhu Y, Blow MJ, Li Z, Liberton DK, et al. Fine tuning of craniofacial morphology by distant-acting enhancers. *Science*. 2013;342(6157):1241006.

EKLER

EK-1

Ek-1a. ALX1 Geni Gerçek Zamanlı PCR İçin Tasarlanan Primerler

Exon	Primer Dizisi	Annealing °C	Bant Uzunluğu (bp)
Exon 1F Exon 1R	GTTTGAAAGGAGGTCTTCCA GCAGCTTATTGTGGTATCCT	57	166

Ek-1b. ALX1 Promotor, 5'UTR, İntronik Bölgeler, 3'UTR İçin Tasarlanan Primerler

	Primer Dizisi	Annealing °C	Bant Uzunluğu (bp)
ALX1-Y-26000F ALX1-Y-26000R	AGTAGGCCAAAGATGTAGACAGATAG TCAGTTATGAAATCTAAGGGACCA	59	765
ALX1-19000F ALX1-19000R	TATTCGGTATCCAGGCAACA CCACCAAGAGAACAGCACTAAA	59	591
ALX1-13700F ALX1-13700R	TGGATGGATTCTTGTAAATGAGAG GTAGCACCTTGGCTTGTATTG	58	559
ALX1-6500F ALX1-6500R	TTGGAAACTGAAAGATGATGTAA CTATCCCGAGCAACACAGA	57	1215
ALX1-YY-P4000-LS1F ALX1-YY-P4000-LS1R	ATAAGCCTCAAACCTCTCACTGC GAGAGGAGGTAGGAGAGCAAC	58	897
ALX1-P4000-L2F ALX1-P4000-L2R	AACATTTCGTTATGGGAGTTTG AGCCAGACAGGTTTTGGTC	57	1500
ALX1-Y-1500F ALX1-Y-1500R	GACTTGTCTGGGGAAACG GTTACAAATAGGGGTTTATGAAGA	55	472
ALX1-In1-L1F ALX1-In1-L1R	TCCTTTCGCTGTAGGGTCTG ATCAGAGAGGCTAAGGGCATC	59	1369
ALX1-In2-L1F ALX1-In2-L1R	GGATGGGATAGGAAAATAAATGG AGGCTCAAGACATCAACAACAAC	60	1579
ALX1-In2-L2F ALX1-In2-L2R	TCGTTCTCTTTCCTGCTTTG GCTTTTCGCTTGTGTATTG	58	1644
ALX1-In3-2000F ALX1-In3-2000R	TTTGAACACTTGACTGTGGTGA CAACATTCCCATGATTTGTG	57	579
ALX1-In3-6000F ALX1-In3-6000R	TAGGACTTGTCTCCTTCAACCA CACTGTAGCTAACTGTACCTTCACC	58	545
ALX1-In3-7000F ALX1-In3-7000R	GTCCATAAATGACTCCAAGCA TTCTTTGGTGTGACTGTATTCTTA	57	490
ALX1-In3-8500F ALX1-In3-8500R	TGTAACATTATGCCAAAGAGGA AAAGTGGATTTTGTGTTCTAACC	58	639
ALX1-3'UTR F ALX1-3'UTR R	GAATGAAAGCCAAGGAGCA TCCCAGAACACCCTGATT	59	502
ALX1-dws1500-L1F	TTTACCATGTGCCAGTCTCC	57	1625

ALX1-dws1500-L1R	GGTACTAGCCAAGGGATACTAA		
ALX1-dws9000-Y-L1F ALX1-dws9000-S1-1R	ATTCAAGCCACGGACTTTGT ACATGAGCCTAGCAAATTCTCT	58	690
ALX1-dws9000-S1-1F ALX1-dws9000-S1-2R	CCCACCTGGCTAAAGTCTGT TGCTAGATGAGGGATGGTGT	57	828
ALX1-dws9000-S1-2F ALX1-dws9000-Y-L1R	CCAATAGTGTACATTGCTTCGAGT TGGTCCACTTTACAAGGTCAA	58	784
ALX1-dws-65000-F ALX1-dws-65000-R	AAATAAGGCCCTTGTACTTGA CACACCCATTCACTTAACCACT	59	280
ALX1-dws-167000-F ALX1-dws-167000-R	ACAGTGAAGCAAAAGCTGAGTC ACTGCTGTTTAAGGCATTGAGA	58	410
USF-BR1-F USF-BR1-R	TTTGCACAGCCTGAGTAATTGT CTTGAGCCTGATGCCTTAAGTT	59	874
USF-BR2-F USF-BR2-R	TGGGAGCTACCAAGGTAACAGT CACACTCAATAGCCTCAATATGGT	60	975

EK-2 .bed Dosyası Yapımı

.bed file ucsc genome browser üzerinde istenilen değişikliklerin (delesyon, duplikasyon, tek nükleotid değişikliği gibi) görselleştirilmesini sağlayan bir kod yazılıdır. Esasen var olan ucsc sekmelerine manuel yeni bir sekme ekleme işlemidir.

Sırasıyla;

1-Kodun başlangıç satırı ekranda gösterilecek aralığı ifade eder.

Örneğin 'browser position chr12:85459868-85862767' yazılırsa eğer, genom üzerinde 12. kromozomun 85459868-85862767 arasındaki bölge ekrana gelecektir.

2-İkinci satırda yüklediğimiz track ismini ifade ettiğimiz, ve renk kodunu açık olduğunu ifade eden bir kod yazılır.

Örneğin ' track name="CHR12CR" description="criticalregion" visibility=2 itemRgb="On"

3-Üçüncü satırda ise kromozom numarası, pozisyonu, değişikliğin adı, yönü (forward +, reverse -) ve rengini ifade eden kod yazılır.

Örneğin 'chr12 85459868 85459870 LRR1Q1 0 + 85459868 85459870 255,0,0'
Bu kısım yazılırken dikkat edilmesi gereken her parametre arasına bir 'tab' bırakılmasıdır (Şekil 1).

```
browser position chr12:85459868-85862767
track name="CHR12CR" description="criticalregion" visibility=2 itemRgb="On"
chr12 85459868 85459870 LRR1Q1 0 + 85459868 85459870 255,0,0
chr12 85761514 85761516 IGR 0 + 85761514 85761516 255,0,0
chr12 85862754 85862756 IGR 0 + 85862754 85862756 255,0,0
chr12 85862761 85862763 IGR 0 + 85862761 85862763 255,0,0
```

Şekil 1. .bed dosyası gösterimi

Kod yazıldıktan sonra ucsc ana sayfasındaki 'manage tracks' sekmesine açılır, açılan sayfada 'add custom tracks' açılır, açılan sayfada 'browse' açılır, dosya bilgisayardaki yeri işaretlenip yüklenir.

EK-3

Sanger Dizileme İle Taranan Bölgelerin Gösterimi İçin Yazılan .ded Dosyası

```
browser position chr12:85650485-85867858
track name="sagner" description="chr12ALX_rs" visibility=2 itemRgb="On"
chr12 85654451 85655019 Sagner 0 + 85654451 85655019 249,0,0
chr12 85660081 85660582 Sagner 0 + 85660081 85660582 249,0,0
chr12 85666598 85667776 Sagner 0 + 85666598 85667776 249,0,0
chr12 85669091 85680819 Sagner 0 + 85669091 85680819 249,0,0
chr12 85682775 85683279 Sagner 0 + 85682775 85683279 249,0,0
chr12 85687948 85688273 Sagner 0 + 85687948 85688273 249,0,0
chr12 85689374 85689924 Sagner 0 + 85689374 85689924 249,0,0
chr12 85694723 85697021 Sagner 0 + 85694723 85697021 249,0,0
chr12 85702054 85705015 Sagner 0 + 85702054 85705015 249,0,0
chr12 85761453 85761736 Sagner 0 + 85761453 85761736 249,0,0
chr12 85862661 85863067 Sagner 0 + 85862661 85863067 249,0,0
```

Tüm Değişikliklerin Bölgede Gösterimi İçin Yazılan .bed Dosyası

```
browser position chr12:80513702-87328924
track name="CHR12CR" description="criticalregion" visibility=2 itemRgb="On"
chr12 80519709 80519711 IGR 0 + 80519709 80519711 0,0,255
chr12 80519962 80519964 IGR 0 + 80519962 80519964 0,0,255
chr12 80525582 80525584 IGR 0 + 80525582 80525584 0,0,255
chr12 80540068 80540070 IGR 0 + 80540068 80540070 0,0,255
chr12 80563992 80563994 IGR 0 + 80563992 80563994 0,0,255
chr12 80565190 80565192 IGR 0 + 80565190 80565192 0,0,255
chr12 80575027 80575029 IGR 0 + 80575027 80575029 0,0,255
chr12 80612574 80612577 OTOGL 0 + 80612574 80612577 0,0,255
chr12 80620876 80620878 OTOGL 0 + 80620876 80620878 0,0,255
chr12 80623771 80623773 OTOGL 0 + 80623771 80623773 255,0,0
chr12 80637595 80637597 OTOGL 0 + 80637595 80637597 0,0,255
chr12 80637631 80637633 OTOGL 0 + 80637631 80637633 0,0,255
chr12 80661186 80661188 OTOGL 0 + 80661186 80661188 0,0,255
chr12 80673568 80673570 OTOGL 0 + 80673568 80673570 0,0,255
chr12 80677078 80677080 OTOGL 0 + 80677078 80677080 0,0,255
chr12 80693389 80693391 OTOGL 0 + 80693389 80693391 255,0,0
chr12 80718810 80718812 OTOGL 0 + 80718810 80718812 0,0,255
chr12 80726078 80726080 OTOGL 0 + 80726078 80726080 0,0,255
chr12 80736908 80736910 OTOGL 0 + 80736908 80736910 0,0,255
chr12 80748986 80748988 OTOGL 0 + 80748986 80748988 0,0,255
chr12 80749245 80749247 OTOGL 0 + 80749245 80749247 0,0,255
chr12 80754219 80754221 OTOGL 0 + 80754219 80754221 0,0,255
chr12 80765682 80765687 OTOGL 0 + 80765682 80765687 0,0,255
chr12 80765686 80765688 OTOGL 0 + 80765686 80765688 0,0,255
chr12 80828303 80828305 IGR 0 + 80828303 80828305 0,0,255
chr12 80841863 80841865 PTPRQ 0 + 80841863 80841865 0,0,255
chr12 80842909 80842911 PTPRQ 0 + 80842909 80842911 0,0,255
chr12 80842910 80842912 PTPRQ 0 + 80842910 80842912 0,0,255
chr12 80842912 80842914 PTPRQ 0 + 80842912 80842914 0,0,255
chr12 80909520 80909523 PTPRQ 0 + 80909520 80909523 0,0,255
chr12 80947133 80947135 PTPRQ 0 + 80947133 80947135 0,0,255
chr12 80967173 80967175 PTPRQ 0 + 80967173 80967175 0,0,255
chr12 81146902 81146904 IGR 0 + 81146902 81146904 0,0,255
chr12 81159689 81159691 IGR 0 + 81159689 81159691 0,0,255
chr12 81168524 81168526 IGR 0 + 81168524 81168526 0,0,255
chr12 81199744 81199746 LIN7A 0 + 81199744 81199746 0,0,255
chr12 81217866 81217868 LIN7A 0 + 81217866 81217868 0,0,255
chr12 81323421 81323423 LIN7A 0 + 81323421 81323423 0,0,255
chr12 81372022 81372024 IGR 0 + 81372022 81372024 0,0,255
chr12 81373373 81373378 IGR 0 + 81373373 81373378 255,0,0
chr12 81373386 81373391 IGR 0 + 81373386 81373391 255,0,0
chr12 81411823 81411825 IGR 0 + 81411823 81411825 0,0,255
chr12 81416331 81416333 IGR 0 + 81416331 81416333 0,0,255
chr12 81425272 81425278 IGR 0 + 81425272 81425278 0,0,255
chr12 81587771 81587773 ACSS3 0 + 81587771 81587773 0,0,255
chr12 81607759 81607761 ACSS3 0 + 81607759 81607761 0,0,255
chr12 81618351 81618357 ACSS3 0 + 81618351 81618357 0,0,255
chr12 81714833 81714835 PPFIA2 0 + 81714833 81714835 0,0,255
chr12 81720852 81720854 PPFIA2 0 + 81720852 81720854 0,0,255
chr12 81856363 81856367 PPFIA2 0 + 81856363 81856367 0,0,255
chr12 81856650 81856652 PPFIA2 0 + 81856650 81856652 0,0,255
chr12 81927470 81927476 PPFIA2 0 + 81927470 81927476 0,0,255
chr12 81927470 81927476 PPFIA2 0 + 81927470 81927476 0,0,255
```

chr12	81960349	81960351	PPFIA2	0	+	81960349	81960351	0,0,255
chr12	82013911	82013913	PPFIA2	0	+	82013911	82013913	0,0,255
chr12	82126291	82126293	PPFIA2	0	+	82126291	82126293	0,0,255
chr12	82145312	82145318	PPFIA2	0	+	82145312	82145318	0,0,255
chr12	82192743	82192745	IGR	0	+	82192743	82192745	255,0,0
chr12	82242198	82242200	IGR	0	+	82242198	82242200	0,0,255
chr12	82300525	82300527	IGR	0	+	82300525	82300527	0,0,255
chr12	82316063	82316065	IGR	0	+	82316063	82316065	0,0,255
chr12	82357860	82357862	LOC101928449	0	+	82357860	82357862	0,0,255
chr12	82411545	82411547	IGR	0	+	82411545	82411547	0,0,255
chr12	82463597	82463599	IGR	0	+	82463597	82463599	0,0,255
chr12	82486198	82486200	IGR	0	+	82486198	82486200	0,0,255
chr12	82495892	82495894	IGR	0	+	82495892	82495894	0,0,255
chr12	82498652	82498666	IGR	0	+	82498652	82498666	0,0,255
chr12	82499069	82499073	IGR	0	+	82499069	82499073	0,0,255
chr12	82499069	82499073	IGR	0	+	82499069	82499073	0,0,255
chr12	82517511	82517513	IGR	0	+	82517511	82517513	0,0,255
chr12	82560093	82560095	IGR	0	+	82560093	82560095	0,0,255
chr12	82565657	82565659	IGR	0	+	82565657	82565659	0,0,255
chr12	82611288	82611290	IGR	0	+	82611288	82611290	0,0,255
chr12	82613811	82613813	IGR	0	+	82613811	82613813	0,0,255
chr12	82615267	82615270	IGR	0	+	82615267	82615270	0,0,255
chr12	82615267	82615270	IGR	0	+	82615267	82615270	0,0,255
chr12	82618120	82618122	IGR	0	+	82618120	82618122	0,0,255
chr12	82618869	82618872	IGR	0	+	82618869	82618872	0,0,255
chr12	82631145	82631149	IGR	0	+	82631145	82631149	0,0,255
chr12	82631145	82631149	IGR	0	+	82631145	82631149	0,0,255
chr12	82631439	82631443	IGR	0	+	82631439	82631443	0,0,255
chr12	82632550	82632553	IGR	0	+	82632550	82632553	0,0,255
chr12	82638656	82638668	IGR	0	+	82638656	82638668	0,0,255
chr12	82642190	82642198	IGR	0	+	82642190	82642198	0,0,255
chr12	82642190	82642198	IGR	0	+	82642190	82642198	0,0,255
chr12	82642221	82642223	IGR	0	+	82642221	82642223	0,0,255
chr12	82680408	82680410	IGR	0	+	82680408	82680410	0,0,255
chr12	82698565	82698567	IGR	0	+	82698565	82698567	0,0,255
chr12	82707290	82707292	IGR	0	+	82707290	82707292	0,0,255
chr12	82715318	82715320	IGR	0	+	82715318	82715320	0,0,255
chr12	82720930	82720932	IGR	0	+	82720930	82720932	255,0,0
chr12	82737439	82737441	IGR	0	+	82737439	82737441	0,0,255
chr12	82770751	82770753	METTL25	0	+	82770751	82770753	0,0,255
chr12	82786440	82786442	METTL25	0	+	82786440	82786442	0,0,255
chr12	82786441	82786443	METTL25	0	+	82786441	82786443	0,0,255
chr12	82846765	82846767	METTL25	0	+	82846765	82846767	0,0,255
chr12	82858549	82858551	METTL25	0	+	82858549	82858551	0,0,255
chr12	82859769	82859771	METTL25	0	+	82859769	82859771	0,0,255
chr12	82867263	82867265	METTL25	0	+	82867263	82867265	0,0,255
chr12	82932517	82932519	IGR	0	+	82932517	82932519	0,0,255
chr12	82955105	82955107	IGR	0	+	82955105	82955107	0,0,255
chr12	82955806	82955808	IGR	0	+	82955806	82955808	0,0,255
chr12	82963681	82963684	IGR	0	+	82963681	82963684	0,0,255
chr12	83022999	83023002	IGR	0	+	83022999	83023002	0,0,255
chr12	83023070	83023072	IGR	0	+	83023070	83023072	0,0,255
chr12	83023074	83023076	IGR	0	+	83023074	83023076	0,0,255
chr12	83023075	83023077	IGR	0	+	83023075	83023077	0,0,255
chr12	83023078	83023080	IGR	0	+	83023078	83023080	0,0,255
chr12	83030164	83030166	IGR	0	+	83030164	83030166	0,0,255
chr12	83071861	83071863	IGR	0	+	83071861	83071863	0,0,255
chr12	83110288	83110290	TMTC2	0	+	83110288	83110290	0,0,255
chr12	83183953	83183955	TMTC2	0	+	83183953	83183955	0,0,255
chr12	83239721	83239723	TMTC2	0	+	83239721	83239723	0,0,255
chr12	83239721	83239725	TMTC2	0	+	83239721	83239725	0,0,255
chr12	83259815	83259817	TMTC2	0	+	83259815	83259817	0,0,255
chr12	83260022	83260025	TMTC2	0	+	83260022	83260025	0,0,255
chr12	83262477	83262480	TMTC2	0	+	83262477	83262480	0,0,255
chr12	83262477	83262480	TMTC2	0	+	83262477	83262480	0,0,255
chr12	83265459	83265473	TMTC2	0	+	83265459	83265473	0,0,255
chr12	83265843	83265846	TMTC2	0	+	83265843	83265846	0,0,255
chr12	83279314	83279317	TMTC2	0	+	83279314	83279317	0,0,255
chr12	83298760	83298762	TMTC2	0	+	83298760	83298762	0,0,255
chr12	83301251	83301253	TMTC2	0	+	83301251	83301253	0,0,255
chr12	83301475	83301477	TMTC2	0	+	83301475	83301477	255,0,0
chr12	83329026	83329028	TMTC2	0	+	83329026	83329028	0,0,255
chr12	83342154	83342156	TMTC2	0	+	83342154	83342156	0,0,255
chr12	83418978	83418981	TMTC2	0	+	83418978	83418981	0,0,255
chr12	83420483	83420491	TMTC2	0	+	83420483	83420491	0,0,255
chr12	83427588	83427592	TMTC2	0	+	83427588	83427592	0,0,255
chr12	83484747	83484749	TMTC2	0	+	83484747	83484749	0,0,255

chr12	83566646	83566648	IGR	0	+	83566646	83566648	0,0,255
chr12	83589429	83589431	IGR	0	+	83589429	83589431	0,0,255
chr12	83589431	83589433	IGR	0	+	83589431	83589433	0,0,255
chr12	83602270	83602272	IGR	0	+	83602270	83602272	0,0,255
chr12	83620360	83620362	IGR	0	+	83620360	83620362	0,0,255
chr12	83620371	83620373	IGR	0	+	83620371	83620373	0,0,255
chr12	83627076	83627078	IGR	0	+	83627076	83627078	0,0,255
chr12	83627076	83627078	IGR	0	+	83627076	83627078	0,0,255
chr12	83627076	83627078	IGR	0	+	83627076	83627078	0,0,255
chr12	83629181	83629183	IGR	0	+	83629181	83629183	0,0,255
chr12	83629182	83629184	IGR	0	+	83629182	83629184	0,0,255
chr12	83629315	83629317	IGR	0	+	83629315	83629317	0,0,255
chr12	83644471	83644473	IGR	0	+	83644471	83644473	0,0,255
chr12	83660903	83660905	IGR	0	+	83660903	83660905	0,0,255
chr12	83669155	83669157	IGR	0	+	83669155	83669157	0,0,255
chr12	83685255	83685257	IGR	0	+	83685255	83685257	0,0,255
chr12	83735933	83735938	IGR	0	+	83735933	83735938	0,0,255
chr12	83763584	83763586	IGR	0	+	83763584	83763586	0,0,255
chr12	83782223	83782225	IGR	0	+	83782223	83782225	0,0,255
chr12	83793754	83793756	IGR	0	+	83793754	83793756	0,0,255
chr12	83851484	83851486	IGR	0	+	83851484	83851486	0,0,255
chr12	83851496	83851498	IGR	0	+	83851496	83851498	0,0,255
chr12	83865000	83865002	IGR	0	+	83865000	83865002	0,0,255
chr12	83865713	83865715	IGR	0	+	83865713	83865715	0,0,255
chr12	83880293	83880295	IGR	0	+	83880293	83880295	0,0,255
chr12	83881820	83881822	IGR	0	+	83881820	83881822	0,0,255
chr12	83882717	83882719	IGR	0	+	83882717	83882719	0,0,255
chr12	83884632	83884634	IGR	0	+	83884632	83884634	0,0,255
chr12	83889969	83889971	IGR	0	+	83889969	83889971	0,0,255
chr12	83898292	83898295	IGR	0	+	83898292	83898295	0,0,255
chr12	83899135	83899139	IGR	0	+	83899135	83899139	0,0,255
chr12	83921240	83921242	IGR	0	+	83921240	83921242	0,0,255
chr12	83936500	83936504	IGR	0	+	83936500	83936504	0,0,255
chr12	83957914	83957916	IGR	0	+	83957914	83957916	0,0,255
chr12	83963758	83963760	IGR	0	+	83963758	83963760	0,0,255
chr12	83979436	83979438	IGR	0	+	83979436	83979438	0,0,255
chr12	83983447	83983449	IGR	0	+	83983447	83983449	0,0,255
chr12	83985867	83985869	IGR	0	+	83985867	83985869	0,0,255
chr12	83991305	83991309	IGR	0	+	83991305	83991309	0,0,255
chr12	83991305	83991309	IGR	0	+	83991305	83991309	0,0,255
chr12	83994357	83994359	IGR	0	+	83994357	83994359	0,0,255
chr12	83999200	83999204	IGR	0	+	83999200	83999204	0,0,255
chr12	83999200	83999204	IGR	0	+	83999200	83999204	0,0,255
chr12	84011923	84011925	IGR	0	+	84011923	84011925	0,0,255
chr12	84012891	84012893	IGR	0	+	84012891	84012893	0,0,255
chr12	84016327	84016329	IGR	0	+	84016327	84016329	0,0,255
chr12	84016814	84016816	IGR	0	+	84016814	84016816	0,0,255
chr12	84019207	84019209	IGR	0	+	84019207	84019209	0,0,255
chr12	84025219	84025225	IGR	0	+	84025219	84025225	0,0,255
chr12	84026890	84026893	IGR	0	+	84026890	84026893	0,0,255
chr12	84026890	84026893	IGR	0	+	84026890	84026893	0,0,255
chr12	84027282	84027288	IGR	0	+	84027282	84027288	0,0,255
chr12	84028306	84028308	IGR	0	+	84028306	84028308	0,0,255
chr12	84038347	84038351	IGR	0	+	84038347	84038351	0,0,255
chr12	84039305	84039307	IGR	0	+	84039305	84039307	0,0,255
chr12	84039323	84039325	IGR	0	+	84039323	84039325	0,0,255
chr12	84051468	84051473	IGR	0	+	84051468	84051473	0,0,255
chr12	84051725	84051729	IGR	0	+	84051725	84051729	0,0,255
chr12	84068514	84068516	IGR	0	+	84068514	84068516	0,0,255
chr12	84068601	84068603	IGR	0	+	84068601	84068603	0,0,255
chr12	84068834	84068836	IGR	0	+	84068834	84068836	0,0,255
chr12	84070290	84070292	IGR	0	+	84070290	84070292	0,0,255
chr12	84070365	84070367	IGR	0	+	84070365	84070367	0,0,255
chr12	84070365	84070368	IGR	0	+	84070365	84070368	0,0,255
chr12	84075685	84075687	IGR	0	+	84075685	84075687	0,0,255
chr12	84080155	84080157	IGR	0	+	84080155	84080157	0,0,255
chr12	84094786	84094794	IGR	0	+	84094786	84094794	255,0,0
chr12	84103314	84103316	IGR	0	+	84103314	84103316	0,0,255
chr12	84114790	84114792	IGR	0	+	84114790	84114792	0,0,255
chr12	84128401	84128403	IGR	0	+	84128401	84128403	0,0,255
chr12	84134887	84134889	IGR	0	+	84134887	84134889	0,0,255
chr12	84144519	84144521	IGR	0	+	84144519	84144521	255,0,0
chr12	84152785	84152787	IGR	0	+	84152785	84152787	0,0,255
chr12	84156185	84156187	IGR	0	+	84156185	84156187	0,0,255
chr12	84166673	84166675	IGR	0	+	84166673	84166675	0,0,255
chr12	84222312	84222314	IGR	0	+	84222312	84222314	0,0,255
chr12	84226955	84226959	IGR	0	+	84226955	84226959	0,0,255

chr12	84242346	84242348	IGR	0	+	84242346	84242348	0,0,255
chr12	84249737	84249739	IGR	0	+	84249737	84249739	0,0,255
chr12	84287767	84287771	IGR	0	+	84287767	84287771	0,0,255
chr12	84287767	84287771	IGR	0	+	84287767	84287771	0,0,255
chr12	84288646	84288648	IGR	0	+	84288646	84288648	0,0,255
chr12	84288819	84288821	IGR	0	+	84288819	84288821	0,0,255
chr12	84294879	84294892	IGR	0	+	84294879	84294892	0,0,255
chr12	84302887	84302889	IGR	0	+	84302887	84302889	0,0,255
chr12	84325920	84325922	IGR	0	+	84325920	84325922	0,0,255
chr12	84325922	84325924	IGR	0	+	84325922	84325924	0,0,255
chr12	84344909	84344911	IGR	0	+	84344909	84344911	0,0,255
chr12	84361517	84361519	IGR	0	+	84361517	84361519	0,0,255
chr12	84368296	84368298	IGR	0	+	84368296	84368298	0,0,255
chr12	84381497	84381499	IGR	0	+	84381497	84381499	0,0,255
chr12	84381515	84381517	IGR	0	+	84381515	84381517	0,0,255
chr12	84389514	84389516	IGR	0	+	84389514	84389516	0,0,255
chr12	84398030	84398032	IGR	0	+	84398030	84398032	0,0,255
chr12	84418434	84418436	IGR	0	+	84418434	84418436	0,0,255
chr12	84450788	84450790	IGR	0	+	84450788	84450790	0,0,255
chr12	84465188	84465190	IGR	0	+	84465188	84465190	0,0,255
chr12	84466125	84466127	IGR	0	+	84466125	84466127	0,0,255
chr12	84508619	84508625	IGR	0	+	84508619	84508625	0,0,255
chr12	84510985	84510987	IGR	0	+	84510985	84510987	255,0,0
chr12	84515390	84515392	IGR	0	+	84515390	84515392	0,0,255
chr12	84522293	84522295	IGR	0	+	84522293	84522295	0,0,255
chr12	84531784	84531786	IGR	0	+	84531784	84531786	0,0,255
chr12	84551491	84551493	IGR	0	+	84551491	84551493	0,0,255
chr12	84556719	84556721	IGR	0	+	84556719	84556721	0,0,255
chr12	84565758	84565760	IGR	0	+	84565758	84565760	0,0,255
chr12	84576178	84576180	IGR	0	+	84576178	84576180	0,0,255
chr12	84595102	84595104	IGR	0	+	84595102	84595104	0,0,255
chr12	84599711	84599714	IGR	0	+	84599711	84599714	0,0,255
chr12	84613099	84613101	IGR	0	+	84613099	84613101	0,0,255
chr12	84615164	84615166	IGR	0	+	84615164	84615166	0,0,255
chr12	84627601	84627603	IGR	0	+	84627601	84627603	0,0,255
chr12	84635782	84635784	IGR	0	+	84635782	84635784	0,0,255
chr12	84639696	84639698	IGR	0	+	84639696	84639698	0,0,255
chr12	84647545	84647547	IGR	0	+	84647545	84647547	0,0,255
chr12	84657548	84657550	IGR	0	+	84657548	84657550	0,0,255
chr12	84667961	84667963	IGR	0	+	84667961	84667963	0,0,255
chr12	84675292	84675295	IGR	0	+	84675292	84675295	0,0,255
chr12	84689839	84689841	IGR	0	+	84689839	84689841	0,0,255
chr12	84690413	84690416	IGR	0	+	84690413	84690416	0,0,255
chr12	84703442	84703445	IGR	0	+	84703442	84703445	0,0,255
chr12	84707226	84707228	IGR	0	+	84707226	84707228	0,0,255
chr12	84707338	84707341	IGR	0	+	84707338	84707341	0,0,255
chr12	84708404	84708412	IGR	0	+	84708404	84708412	0,0,255
chr12	84721642	84721648	IGR	0	+	84721642	84721648	0,0,255
chr12	84768908	84768910	IGR	0	+	84768908	84768910	0,0,255
chr12	84790925	84790927	IGR	0	+	84790925	84790927	255,0,0
chr12	84813726	84813731	IGR	0	+	84813726	84813731	0,0,255
chr12	84827043	84827045	IGR	0	+	84827043	84827045	0,0,255
chr12	84829828	84829830	IGR	0	+	84829828	84829830	0,0,255
chr12	84858643	84858646	IGR	0	+	84858643	84858646	0,0,255
chr12	84863449	84863451	IGR	0	+	84863449	84863451	0,0,255
chr12	84869394	84869396	IGR	0	+	84869394	84869396	0,0,255
chr12	84875044	84875046	IGR	0	+	84875044	84875046	0,0,255
chr12	84895288	84895293	IGR	0	+	84895288	84895293	0,0,255
chr12	84911473	84911475	IGR	0	+	84911473	84911475	0,0,255
chr12	84916561	84916563	IGR	0	+	84916561	84916563	0,0,255
chr12	84947767	84947769	IGR	0	+	84947767	84947769	0,0,255
chr12	84948149	84948151	IGR	0	+	84948149	84948151	0,0,255
chr12	84969246	84969248	IGR	0	+	84969246	84969248	0,0,255
chr12	85003607	85003609	IGR	0	+	85003607	85003609	0,0,255
chr12	85004174	85004193	IGR	0	+	85004174	85004193	0,0,255
chr12	85009327	85009329	IGR	0	+	85009327	85009329	0,0,255
chr12	85009416	85009418	IGR	0	+	85009416	85009418	0,0,255
chr12	85009509	85009511	IGR	0	+	85009509	85009511	0,0,255
chr12	85010033	85010035	IGR	0	+	85010033	85010035	0,0,255
chr12	85010034	85010036	IGR	0	+	85010034	85010036	0,0,255
chr12	85032607	85032609	IGR	0	+	85032607	85032609	0,0,255
chr12	85040497	85040499	IGR	0	+	85040497	85040499	0,0,255
chr12	85072456	85072466	IGR	0	+	85072456	85072466	0,0,255
chr12	85078399	85078401	IGR	0	+	85078399	85078401	0,0,255
chr12	85090965	85090967	IGR	0	+	85090965	85090967	0,0,255
chr12	85093403	85093405	IGR	0	+	85093403	85093405	0,0,255
chr12	85094143	85094145	IGR	0	+	85094143	85094145	0,0,255

chr12	85131494	85131496	IGR	0	+	85131494	85131496	0,0,255
chr12	85147326	85147328	IGR	0	+	85147326	85147328	0,0,255
chr12	85173834	85173836	IGR	0	+	85173834	85173836	0,0,255
chr12	85177611	85177613	IGR	0	+	85177611	85177613	0,0,255
chr12	85194533	85194535	IGR	0	+	85194533	85194535	0,0,255
chr12	85198192	85198194	IGR	0	+	85198192	85198194	0,0,255
chr12	85202542	85202545	IGR	0	+	85202542	85202545	0,0,255
chr12	85202549	85202551	IGR	0	+	85202549	85202551	0,0,255
chr12	85202870	85202872	IGR	0	+	85202870	85202872	0,0,255
chr12	85247722	85247724	IGR	0	+	85247722	85247724	0,0,255
chr12	85263237	85263239	SLC6A15	0	+	85263237	85263239	0,0,255
chr12	85269465	85269480	SLC6A15	0	+	85269465	85269480	0,0,255
chr12	85295123	85295125	SLC6A15	0	+	85295123	85295125	0,0,255
chr12	85311337	85311339	SLC6A15	0	+	85311337	85311339	0,0,255
chr12	85323555	85323557	IGR	0	+	85323555	85323557	0,0,255
chr12	85328233	85328235	IGR	0	+	85328233	85328235	0,0,255
chr12	85338837	85338839	IGR	0	+	85338837	85338839	0,0,255
chr12	85356652	85356654	IGR	0	+	85356652	85356654	0,0,255
chr12	85357768	85357770	IGR	0	+	85357768	85357770	0,0,255
chr12	85368179	85368181	IGR	0	+	85368179	85368181	255,0,0
chr12	85381160	85381166	IGR	0	+	85381160	85381166	0,0,255
chr12	85381160	85381166	IGR	0	+	85381160	85381166	0,0,255
chr12	85459868	85459870	LRRIQ1	0	+	85459868	85459870	255,0,0
chr12	85461315	85461317	LRRIQ1	0	+	85461315	85461317	0,0,255
chr12	85476056	85476058	LRRIQ1	0	+	85476056	85476058	0,0,255
chr12	85496721	85496724	LRRIQ1	0	+	85496721	85496724	0,0,255
chr12	85496734	85496736	LRRIQ1	0	+	85496734	85496736	0,0,255
chr12	85507668	85507670	LRRIQ1	0	+	85507668	85507670	0,0,255
chr12	85536048	85536051	LRRIQ1	0	+	85536048	85536051	0,0,255
chr12	85537057	85537059	LRRIQ1	0	+	85537057	85537059	0,0,255
chr12	85558981	85558983	LRRIQ1	0	+	85558981	85558983	0,0,255
chr12	85570374	85570376	LRRIQ1	0	+	85570374	85570376	0,0,255
chr12	85591397	85591399	LRRIQ1	0	+	85591397	85591399	0,0,255
chr12	85591444	85591446	LRRIQ1	0	+	85591444	85591446	0,0,255
chr12	85591463	85591465	LRRIQ1	0	+	85591463	85591465	0,0,255
chr12	85591469	85591471	LRRIQ1	0	+	85591469	85591471	0,0,255
chr12	85591527	85591529	LRRIQ1	0	+	85591527	85591529	0,0,255
chr12	85591528	85591530	LRRIQ1	0	+	85591528	85591530	0,0,255
chr12	85595011	85595013	LRRIQ1	0	+	85595011	85595013	0,0,255
chr12	85605506	85605508	LRRIQ1	0	+	85605506	85605508	0,0,255
chr12	85611287	85611289	LRRIQ1	0	+	85611287	85611289	0,0,255
chr12	85623242	85623245	LRRIQ1	0	+	85623242	85623245	0,0,255
chr12	85623246	85623248	LRRIQ1	0	+	85623246	85623248	0,0,255
chr12	85625761	85625763	LRRIQ1	0	+	85625761	85625763	0,0,255
chr12	85650958	85650960	IGR	0	+	85650958	85650960	0,0,255
chr12	85650959	85650961	IGR	0	+	85650959	85650961	0,0,255
chr12	85650961	85650963	IGR	0	+	85650961	85650963	0,0,255
chr12	85651953	85651955	IGR	0	+	85651953	85651955	0,0,255
chr12	85653906	85653908	IGR	0	+	85653906	85653908	0,0,255
chr12	85672394	85672396	ALX1	0	+	85672394	85672396	255,0,0
chr12	85706423	85706425	IGR	0	+	85706423	85706425	0,0,255
chr12	85706617	85706619	IGR	0	+	85706617	85706619	0,0,255
chr12	85711965	85711967	IGR	0	+	85711965	85711967	0,0,255
chr12	85712064	85712066	IGR	0	+	85712064	85712066	255,0,0
chr12	85761514	85761516	IGR	0	+	85761514	85761516	255,0,0
chr12	85773195	85773197	IGR	0	+	85773195	85773197	0,0,255
chr12	85795899	85795901	IGR	0	+	85795899	85795901	0,0,255
chr12	85826594	85826596	IGR	0	+	85826594	85826596	0,0,255
chr12	85834560	85834562	IGR	0	+	85834560	85834562	255,0,0
chr12	85857852	85857854	IGR	0	+	85857852	85857854	0,0,255
chr12	85862754	85862756	IGR	0	+	85862754	85862756	255,0,0
chr12	85862761	85862763	IGR	0	+	85862761	85862763	255,0,0
chr12	85862765	85862767	IGR	0	+	85862765	85862767	255,0,0
chr12	85868259	85868261	IGR	0	+	85868259	85868261	0,0,255
chr12	85890806	85890808	IGR	0	+	85890806	85890808	0,0,255
chr12	85930011	85930013	IGR	0	+	85930011	85930013	0,0,255
chr12	85954341	85954343	IGR	0	+	85954341	85954343	0,0,255
chr12	85978683	85978685	IGR	0	+	85978683	85978685	0,0,255
chr12	86009352	86009354	IGR	0	+	86009352	86009354	0,0,255
chr12	86012290	86012292	IGR	0	+	86012290	86012292	0,0,255
chr12	86063291	86063297	IGR	0	+	86063291	86063297	255,0,0
chr12	86067279	86067281	IGR	0	+	86067279	86067281	0,0,255
chr12	86067294	86067296	IGR	0	+	86067294	86067296	0,0,255
chr12	86090369	86090371	IGR	0	+	86090369	86090371	0,0,255
chr12	86092739	86092741	IGR	0	+	86092739	86092741	0,0,255
chr12	86100504	86100507	IGR	0	+	86100504	86100507	0,0,255
chr12	86102892	86102894	IGR	0	+	86102892	86102894	0,0,255

chr12	86104084	86104087	IGR	0	+	86104084	86104087	0,0,255
chr12	86107306	86107309	IGR	0	+	86107306	86107309	0,0,255
chr12	86115458	86115460	IGR	0	+	86115458	86115460	0,0,255
chr12	86117085	86117089	IGR	0	+	86117085	86117089	0,0,255
chr12	86117085	86117089	IGR	0	+	86117085	86117089	0,0,255
chr12	86132285	86132291	IGR	0	+	86132285	86132291	0,0,255
chr12	86134261	86134264	IGR	0	+	86134261	86134264	255,0,0
chr12	86148104	86148106	IGR	0	+	86148104	86148106	0,0,255
chr12	86151664	86151666	IGR	0	+	86151664	86151666	0,0,255
chr12	86159133	86159135	IGR	0	+	86159133	86159135	255,0,0
chr12	86168824	86168826	IGR	0	+	86168824	86168826	0,0,255
chr12	86175113	86175115	IGR	0	+	86175113	86175115	0,0,255
chr12	86186994	86186996	IGR	0	+	86186994	86186996	0,0,255
chr12	86190268	86190270	IGR	0	+	86190268	86190270	0,0,255
chr12	86191919	86191921	IGR	0	+	86191919	86191921	0,0,255
chr12	86195594	86195598	RASSF9	0	+	86195594	86195598	0,0,255
chr12	86195600	86195602	RASSF9	0	+	86195600	86195602	0,0,255
chr12	86208436	86208439	RASSF9	0	+	86208436	86208439	0,0,255
chr12	86208436	86208439	RASSF9	0	+	86208436	86208439	0,0,255
chr12	86216976	86216979	RASSF9	0	+	86216976	86216979	255,0,0
chr12	86218843	86218845	RASSF9	0	+	86218843	86218845	0,0,255
chr12	86220915	86220917	RASSF9	0	+	86220915	86220917	0,0,255
chr12	86242520	86242522	IGR	0	+	86242520	86242522	0,0,255
chr12	86277849	86277851	NTS	0	+	86277849	86277851	0,0,255
chr12	86285340	86285342	IGR	0	+	86285340	86285342	0,0,255
chr12	86304396	86304398	IGR	0	+	86304396	86304398	0,0,255
chr12	86314997	86314999	IGR	0	+	86314997	86314999	0,0,255
chr12	86340133	86340137	IGR	0	+	86340133	86340137	0,0,255
chr12	86340133	86340137	IGR	0	+	86340133	86340137	0,0,255
chr12	86342456	86342459	IGR	0	+	86342456	86342459	0,0,255
chr12	86343610	86343612	IGR	0	+	86343610	86343612	0,0,255
chr12	86347377	86347379	IGR	0	+	86347377	86347379	0,0,255
chr12	86371593	86371595	MGAT4C	0	+	86371593	86371595	0,0,255
chr12	86371594	86371596	MGAT4C	0	+	86371594	86371596	0,0,255
chr12	86376888	86376890	MGAT4C	0	+	86376888	86376890	0,0,255
chr12	86376890	86376892	MGAT4C	0	+	86376890	86376892	0,0,255
chr12	86388383	86388385	MGAT4C	0	+	86388383	86388385	0,0,255
chr12	86404480	86404482	MGAT4C	0	+	86404480	86404482	0,0,255
chr12	86409030	86409032	MGAT4C	0	+	86409030	86409032	0,0,255
chr12	86417182	86417185	MGAT4C	0	+	86417182	86417185	0,0,255
chr12	86462372	86462374	MGAT4C	0	+	86462372	86462374	0,0,255
chr12	86465803	86465807	MGAT4C	0	+	86465803	86465807	0,0,255
chr12	86465803	86465807	MGAT4C	0	+	86465803	86465807	0,0,255
chr12	86487508	86487513	MGAT4C	0	+	86487508	86487513	0,0,255
chr12	86504079	86504081	MGAT4C	0	+	86504079	86504081	0,0,255
chr12	86513499	86513502	MGAT4C	0	+	86513499	86513502	0,0,255
chr12	86515387	86515389	MGAT4C	0	+	86515387	86515389	0,0,255
chr12	86525943	86525945	MGAT4C	0	+	86525943	86525945	0,0,255
chr12	86545566	86545568	MGAT4C	0	+	86545566	86545568	0,0,255
chr12	86567006	86567013	MGAT4C	0	+	86567006	86567013	255,0,0
chr12	86571870	86571872	MGAT4C	0	+	86571870	86571872	0,0,255
chr12	86597734	86597737	MGAT4C	0	+	86597734	86597737	0,0,255
chr12	86605220	86605222	MGAT4C	0	+	86605220	86605222	0,0,255
chr12	86633659	86633661	MGAT4C	0	+	86633659	86633661	0,0,255
chr12	86633980	86633982	MGAT4C	0	+	86633980	86633982	0,0,255
chr12	86641971	86641973	MGAT4C	0	+	86641971	86641973	255,0,0
chr12	86643548	86643550	MGAT4C	0	+	86643548	86643550	0,0,255
chr12	86653576	86653578	MGAT4C	0	+	86653576	86653578	0,0,255
chr12	86663340	86663342	MGAT4C	0	+	86663340	86663342	0,0,255
chr12	86672468	86672471	MGAT4C	0	+	86672468	86672471	0,0,255
chr12	86680392	86680394	MGAT4C	0	+	86680392	86680394	0,0,255
chr12	86681024	86681026	MGAT4C	0	+	86681024	86681026	255,0,0
chr12	86684754	86684756	MGAT4C	0	+	86684754	86684756	0,0,255
chr12	86687895	86687897	MGAT4C	0	+	86687895	86687897	0,0,255
chr12	86688467	86688469	MGAT4C	0	+	86688467	86688469	0,0,255
chr12	86689548	86689550	MGAT4C	0	+	86689548	86689550	0,0,255
chr12	86690086	86690088	MGAT4C	0	+	86690086	86690088	0,0,255
chr12	86696182	86696184	MGAT4C	0	+	86696182	86696184	0,0,255
chr12	86703063	86703065	MGAT4C	0	+	86703063	86703065	0,0,255
chr12	86703065	86703067	MGAT4C	0	+	86703065	86703067	0,0,255
chr12	86717589	86717591	MGAT4C	0	+	86717589	86717591	0,0,255
chr12	86726421	86726423	MGAT4C	0	+	86726421	86726423	0,0,255
chr12	86756977	86756979	MGAT4C	0	+	86756977	86756979	0,0,255
chr12	86788388	86788415	MGAT4C	0	+	86788388	86788415	0,0,255
chr12	86793854	86793856	MGAT4C	0	+	86793854	86793856	0,0,255
chr12	86799735	86799737	MGAT4C	0	+	86799735	86799737	0,0,255
chr12	86818809	86818811	MGAT4C	0	+	86818809	86818811	0,0,255

chr12	86818810	86818812	MGAT4C	0	+	86818810	86818812	0,0,255
chr12	86849820	86849822	MGAT4C	0	+	86849820	86849822	0,0,255
chr12	86855012	86855014	MGAT4C	0	+	86855012	86855014	0,0,255
chr12	86855516	86855518	MGAT4C	0	+	86855516	86855518	0,0,255
chr12	86867027	86867029	MGAT4C	0	+	86867027	86867029	0,0,255
chr12	86880152	86880168	MGAT4C	0	+	86880152	86880168	0,0,255
chr12	86896709	86896711	MGAT4C	0	+	86896709	86896711	0,0,255
chr12	86897422	86897424	MGAT4C	0	+	86897422	86897424	0,0,255
chr12	86967473	86967475	MGAT4C	0	+	86967473	86967475	0,0,255
chr12	86997307	86997313	MGAT4C	0	+	86997307	86997313	0,0,255
chr12	87026962	87026964	MGAT4C	0	+	87026962	87026964	0,0,255
chr12	87032677	87032679	MGAT4C	0	+	87032677	87032679	0,0,255
chr12	87090923	87090925	MGAT4C	0	+	87090923	87090925	0,0,255
chr12	87136892	87136894	MGAT4C	0	+	87136892	87136894	0,0,255
chr12	87159797	87159799	MGAT4C	0	+	87159797	87159799	0,0,255
chr12	87170549	87170551	MGAT4C	0	+	87170549	87170551	0,0,255
chr12	87189919	87189921	MGAT4C	0	+	87189919	87189921	0,0,255
chr12	87197035	87197037	MGAT4C	0	+	87197035	87197037	0,0,255
chr12	87205112	87205114	MGAT4C	0	+	87205112	87205114	0,0,255
chr12	87234633	87234635	MGAT4C	0	+	87234633	87234635	0,0,255
chr12	87251713	87251715	IGR	0	+	87251713	87251715	0,0,255
chr12	87267977	87267979	IGR	0	+	87267977	87267979	0,0,255
chr12	87274270	87274273	IGR	0	+	87274270	87274273	0,0,255
chr12	87275307	87275309	IGR	0	+	87275307	87275309	0,0,255
chr12	87314778	87314781	IGR	0	+	87314778	87314781	0,0,255
chr12	87317780	87317782	IGR	0	+	87317780	87317782	0,0,255
chr12	87327909	87327911	IGR	0	+	87327909	87327911	0,0,255