

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI

AİLESEL KONJENİTAL DİŞ EKSİKLİĞİNDE
SORUMLU GENİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Bilgin KÜTÜKCÜ

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2011

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİMDALI

AİLESEL KONJENİTAL DİŞ EKSİKLİĞİNDE
SORUMLU GENİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Bilgin KÜTÜKCÜ

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU

ANKARA

2011

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlık eğitimim boyunca bilimsel, verimli, sıcak ve samimi bir ortam sağlayan, bilgi ve deneyimlerini aktaran başta anabilimdalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet Alikışıfoğlu olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek Aktaş, Prof. Dr. Koray Boduroğlu, Doç. Dr. Yasemin Alanay, Doç. Dr. Eda Ütine ve emekli olduğu için kendisiyle sadece 4 ay gibi kısa bir süre çalışma fırsatı bulabildiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Ergül Tunçbilek' e teşekkür ederim.

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süre zarfında değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen, asistanlığım boyunca bana hep yol gösteren, hocam olduğu için mutluluk duyduğum çok kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Nurten Akarsu' ya teşekkür ederim. Hiç bitmeyen bir enerjiyle çalışan hocama gülyüzlü ve neşeli tavırlarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Hatay' da saha çalışmasında ailelerin muayenesine yardımcı olan Ortodonti uzmanı Dt. Soner Kamacı, Plastik Cerrahi uzmanı Doç. Dr. İbrahim Vargel' e ve çalışmaya katılan tüm aile bireyelerine teşekkür ederim.

Aynı bölümde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Pelin Özlem şimşek, Esra Kılıç, Yavuz Bayram, Arda Çetinkaya ve Yavuz şahin' e, tüm hemşire ve sekreter arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim. Deneyleerin yapılmasında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Elif Uz başta olmak üzere tüm Genetik Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelebilmem için maddi manevi desteklerini esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim. 3 yıl önce evlendiğim, sıkıntılı ve zor zamanlarımda hep yanımda olan eşim Rabia Açar Kütükcü' ye en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Son olarak projeyi destekleyen E-RARE konsorsiyumu ve TÜBİTAK' a sonsuz teşekkürler.

ÖZET

KÜTÜKCÜ, B. Ailesel konjenital diş eksikliğinde sorumlu genin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011. Diş agenezisi (MIM 106600), bir veya daha fazla dişin konjenital eksikliği olarak tanımlanır ve insanlarda en sık görülen konjenital anomalilerden biridir. Sistemik anomalilerle birlikte görülebildiği gibi izole olarak da ortaya çıkabilir. Klinik ve genetik heterojenite gösterir. Şu ana kadar nonsendromik ailesel diş agenezisi ile ilişkilendirilmiş olan beş farklı gen tanımlanmıştır. Ülkemizde konjenital diş eksikliğinin moleküler temellerini araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada farklı tipte diş malformasyonları (oligodonti, hipodonti, mikrodonti ve dismorfik bulguların eşlik ettiği diş anomalileri) bulunan bir ailenin moleküler patolojisinin bulunması hedeflendi. Saha çalışması ve pedigrî analizleri ailede otozomal dominant ve resesif kalıtılan iki farklı malformasyonun birarada bulunduğunu düşündürdü. İzole konjenital diş eksikliği malformasyonunun otozomal dominant bir genle kalıtıldığı görüldü. Genom boyu analiz ve çok noktali bağlantı analizleri ilgili malformasyonu 14q11-q21 bölgesine haritaladı. Kritik bölgede yer alan *PAX9* geni DNA dizi analizinde başlangıç kodonunu etkileyen yeni bir mutasyon (p.M1I) tanımlandı. Ailede gözlenen oligodonti, mikrodonti ve hipodonti malformasyonlarının *PAX9* gen mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı saptandı.

Ailede kompleks fenotip gösteren bireylerde otozomal resesif Carnevale sendromu düşünüldü. Genom boyu homozigotluk analizi 1, 3 ve 18 numaralı kromozomların hastalıktan sorumlu geni bulundurabileceğini düşündürdü. 3q27 bölgesinde bulunan *MASPI* geni DNA dizi analizinde 2 numaralı exonda 4 bazlık homozigot delesyon (c.82-85delTTTG) saptandı. İlgili değişiklik (p.Phe28AlafsX18) proteinde erken terminasyona yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diş agenezisi, hipodonti, *PAX9*, Carnevale sendromu, *MASPI*

Destekleyen Kurumlar: Avrupa Birliği 6. Çerçeve ERANET Programı, E-RARE Konsorsiyumu ve TÜBİTAK (108S420 numaralı proje).

ABSTRACT

KÜTÜKCÜ, B. Investigation of the gene responsible for familial congenital absence of teeth. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Thesis, Ankara, 2011. Tooth agenesis (MIM 106600), congenital absence of one or more teeth, is one of the most common congenital anomalies in human. It is clinically and genetically heterogeneous disorder. Mutations in a total of 5 genes have hitherto been associated to tooth agenesis. To the best of our knowledge there is no other report investigating molecular pathologies of tooth agenesis in our country.

In this study, molecular genetics of a large family overloaded various congenital tooth malformations, such as oligodontia, hypodontia, microdontia and teeth anomalies associated with dysmorphic findings was studied. Field study and pedigree analysis revealed that two distinct congenital malformations with autosomal dominant and recessive etiologies were co-segregated in this family. The mode of inheritance of isolated congenital tooth agenesis was autosomal dominant. Genome-wide analysis followed by multipoint linkage analysis mapped this malformation to chromosome 14q11-q21 region. DNA sequencing of *PAX9* gene from the critical region identified a novel mutation (p.M1I) in the initiation codon of the gene. Family members with variable phenotypes ranging from oligodontia to microdontia demonstrated the same mutation in the *PAX9*.

Autosomal recessive Carnevale syndrome was considered in some family members with complex phenotype. Specific portions of chromosomes 1, 3 and 18 were identified as likely loci based on genome-wide homozygosity analysis. *MASPI* gene on chromosome 3q27 was sequenced and a total of four bases deletion (c.82-85delTTTG) were identified in the second exon. This would cause a premature termination (p.Phe28AlafsX18) of the protein.

Key Words: Tooth agenesis, hypodontia, *PAX9*, Carnevale syndrome, *MASPI*

Supported by TÜBİTAK (Grant number 108S420) and the overall consortium (CRANIRARE) was supported by the European Research Area Network (ERARE-Grant number R07197KS).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER	X
TABLolar	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Konjenital Diş Eksikliği	3
2.1.1. Tanım ve Terminoloji	3
2.1.2. Klinik Epidemiyoloji	4
2.1.3. Etiyoloji	5
2.1.3.1. Çevresel Faktörler	6
2.1.3.2. Genetik Faktörler	6
2.1.4. Diş Agenezisiyle İlişkili Dental Anomaliler	9
2.1.5. Sendromla İlişkili Diş Agenezisi	10
2.1.6. Nonsendromik Ailesel Diş Agenezisi	12
2.2. Diş Gelişimi	13
2.2.1. Diş Gelişim Evreleri	14
2.2.1.1. İnisiyasyon (Başlangıç) Evresi	15
2.2.1.2. <i>Bud</i> (Tomurcuklanma) Evresi	15
2.2.1.3. <i>Cap</i> (Şapka) Evresi	15
2.2.1.4. <i>Bell</i> (Çan) Evresi	15
2.2.1.5. Maturasyon evresi	16
2.2.2. Diş Gelişiminin Kronolojisi	16
2.2.3. Diş Aileleri	16
2.3. Diş Gelişiminde Moleküler Mekanizmalar	17
2.4. Diş Agenezisiyle İlgili Fare Çalışmaları	21

2.5. Diş Agenezisinde <i>MSX1</i> ve <i>PAX9</i> Genleri	22
2.5.1. <i>MSX1</i>	24
2.5.2. <i>PAX9</i>	25
2.6. Carnevale Sendromu	28
2.7. Kompleman Sistemi	30
3. BİREYLER VE YÖNTEM	33
3.1. Aile Paneli ve Klinik İncelemeler	33
3.2. Kalıtım Tipinin Belirlenmesi	33
3.3. Genomik DNA İzolasyonu	35
3.4. DNA' nın Niteliksel ve Niceliksel Analizi	35
3.5. Gen Haritalaması	36
3.5.1. Bağlantı (<i>Linkage</i>) Analizi	38
3.6. SNP <i>Microarray</i> (Çip, Mikrodizin) Analizi	41
3.7. DNA Dizi Analizi	45
3.7.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	45
3.7.1.1. <i>PAX9</i> Geninin PCR' ı	46
3.7.1.2. <i>MASPI</i> geninin PCR' ı	47
3.7.2. Agaroz jel elektroforezi	49
3.7.3. <i>PAX9</i> Geninin Dizilenmesi	49
3.7.4. <i>MASPI</i> Geninin Dizilenmesi	50
3.8. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	50
3.8.1. <i>MspI</i> ile enzim kesimi	51
3.8.2. <i>BseMI</i> ile enzim kesimi	51
4. BULGULAR	52
4.1. Klinik Bulgular	52
4.2. Laboratuvar Bulguları	57
4.3. Dismorfik İki Kardeşin Değerlendirilmesi	63
5. TARTIŞMA	69
5.1. Otozomal Dominant Konjenital Diş Eksikliği	69
5.2. 3MC sendromu	75
6. SONUÇLAR	81
KAYNAKLAR	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

ag	Antijen
ab	Antikor
<i>ATR</i>	Ataxia-Telangiectasia and RAD3-Related
<i>AXIN2</i>	<i>Axis inhibitor 2</i>
<i>BMP</i>	<i>Bone morphogenetic protein</i>
<i>CBFA1</i>	<i>Core-Binding Factor, Runt domain, Alpha subunit 1</i>
CL-K1	<i>Collectin, Kidney 1</i>
cM	<i>centiMorgan</i>
<i>COLEC11</i>	<i>Collectin 11</i>
CXORF5	Chromosome X Open Reading Frame 5
<i>EDA</i>	Ektodisplazin A
<i>EDAR</i>	Ektodisplazin A reseptörü
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GCOS	<i>GeneChip® Operating Software</i>
hd	<i>homeodomain</i>
<i>HOX7</i>	<i>Homeobox 7</i>
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP-5	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-5
<i>IKK-γ</i>	<i>Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, Kinase of Gamma</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
LOD	<i>Logarithm of Odds</i>
<i>LTBP3</i>	Latent transforming growth factor-beta binding protein
<i>Mp44</i>	Mannoz bağlayan lektin-ilişkili protein 44 kDa
<i>MASP1</i>	Mannoz bağlayan lektin Serin Proteaz 1
MBL	Mannoz bağlayan lektin
<i>MSX</i>	<i>Drosophila muscle segment gene</i>
<i>NEMO</i>	<i>NF-Kappa-B Essential Modulator</i>
NLB	<i>Nuclei lysis buffer</i>
OD	Optik dansite

OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAX	<i>Drosophila paired-box gene</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pd	<i>Paired domain</i>
PITX2	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 2</i>
P63	Tümör protein p63
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm
rpm	<i>Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)</i>
RUNX2	<i>Runt-Related transcription factor 2</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
STHAG	Selektif diş agenezisi (<i>Selective Tooth Agenesis</i>)
TE Buffer	Tris-Klorür EDTA
WNT	<i>Wingless-type</i>

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Dişin sayısal anomalileri ve sıklıkları	3
Şekil 2.2. Diş gelişiminin şematik görünümü	14
Şekil 2.3. Süt dişlerinin şematik görüntüsü	16
Şekil 2.4. Daimi dişlerin şematik görüntüsü	17
Şekil 2.5. Diş gelişiminde epitelyum ve mezenşim arasındaki karşılıklı sinyaller	18
Şekil 2.6. Diş gelişiminin moleküler regülasyonu	19
Şekil 2.7. <i>PAX9</i> mutasyonu bulunan bir kişinin panoramik radyografik görüntüsü	23
Şekil 2.8. <i>PAX9</i> geninin şematik görünümü	25
Şekil 2.9. 3MC sendromu spektrumundaki hastalıkların klinik özellikleri	29
Şekil 2.10. Kompleman sisteminin aktivasyonu	31
Şekil 3.1. Pedigri	34
Şekil 3.2. Genom boyu genotip bilgilerinin izlendiği ve haplotip analizin tamamlandığı VIGENOS programı görüntüsü	41
Şekil 3.3. 250K Nsp SNP çip yönteminin aşamalarının şematik görünümü.	42
Şekil 4.1. Bazı bireylerin diş resimleri ve panoramik radyografik görüntüsü	56
Şekil 4.2. Merlin programı çok noktali bağlantı (multipoint linkage) analizi sonuçları	57-58
Şekil 4.3. IV-3 nolu bireyin <i>PAX9</i> geni sekans sonuçları	59
Şekil 4.4. <i>MspI</i> ile elde edilen enzim kesim ürünlerinin %2' lik agaroz jel görüntüsü	60
Şekil 4.5. II-2 ve II-3 nolu bireylerin <i>PAX9</i> exon 1 sekans görüntüleri	61
Şekil 4.6. <i>BseMI</i> ile elde edilen enzim kesim ürünlerinin %2' lik agaroz jel görüntüsü	61
Şekil 4.7. Pedigri üzerinde <i>PAX9</i> p.M1I heterozigot değişikliğinin segregasyonu	62

Şekil 4.8.	Kontrol grubunda BseMI ile yapılan enzim kesiminin agaroz jel görüntüsü örneği	62
Şekil 4.9.	Carnevale sendromu düşünülen IV-12 ve IV-14 nolu bireylerin literatürle karşılaştırmalı resimleri	64
Şekil 4.10.	IV-12 ve IV-14 nolu bireylerin homozigotluk analizi	66
Şekil 4.11.	IV-12 ve III-12 nolu bireylerin <i>MASPI</i> exon 2 sekans görüntüleri	67
Şekil 4.12.	Carnevale sendromu tanısı alan çocukların pedigrisi ve sekans sonuçları	68
Şekil 5.1.	İnsan, şempanze, <i>mouse</i> , <i>rat</i> , tavuk ve <i>zebrafish</i> ' te <i>PAX9</i> sekanslarının karşılaştırılması	70
Şekil 5.2.	<i>MSX1</i> ve <i>PAX9</i> ' daki gen defektlerinin yol açtığı fenotiplerin karşılaştırılması	71
Şekil 5.3.	Literatürde bildirilmiş <i>PAX9</i> mutasyonları	72
Şekil 5.4.	<i>MASPI</i> geninin kodladığı 3 izoform ve protein domain yapısının şematik görünümü	76

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. Diş agenezisiyle birlikte görülen sendromlar	11
Tablo 2.2. Selektif diş agenezileri	12
Tablo 2.3. Diş agenezisiyle ilgili fare modelleri	21
Tablo 2.4. Diş agenezisiyle ilişkili <i>MSXI</i> mutasyonları	25
Tablo 2.5. Nonsendromik konjenital diş agenezisiyle ilişkili <i>PAX9</i> mutasyonları	27
Tablo 3.1. <i>PAX9</i> primerleri	46
Tablo 3.2. <i>MASPI</i> primerleri	48
Tablo 4.1. Tüm aile bireylerinin klinik muayene bulguları	52-53
Tablo 4.2. Konjenital diş eksikliği olan bireylerin diş fenotipleri	55
Tablo 4.3. Carnevale sendromu düşünülen iki hastanın fenotipik bulgularının literatürde bildirilmiş olan Carnevale sendromlu vakalarla karşılaştırılması	65
Tablo 5.1. Literatürde p.M1V mutasyonu bulunan aile ile bu tezde çalışılan ailenin diş fenotiplerinin karşılaştırılması	73
Tablo 5.2. <i>MASPI</i> mutasyonu bulunan hastaların klinik bulgularının karşılaştırılması	77

GİRİŞ VE AMAÇ

Moleküler genetikteki gelişmeler ve insan genom projesi sayesinde, hastalıkların patogenezinin sorumlu genlerin bulunmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir. Bunlar arasında mine ve dentin oluşumu ve sayısal diş anomalileri sayılabilir. Diş yapısını etkileyen genetik hastalıklar; etkilenen dokuya (mine veya dentin), sendromik veya non-sendromik olmasına ve kalıtım kalıbına göre (otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR) veya X' e bağlı kalıtım olarak) sınıflandırılmıştır (1).

Diş agenezisi, bir veya daha fazla dişin konjenital eksikliği olarak tanımlanır ve insanlarda en sık görülen konjenital anomalilerden biridir (2). Toplumun neredeyse %20'sinde görülebilen bu anomali, çok önemli bir sağlık problemi olmamakla birlikte konuşma, estetik ve kas fonksiyonlarında bozukluklara neden olabilmektedir. Diş agenezisinde çoğunlukla eksik olan diş sayısına göre sınıflama yapılır. Altıdan daha az olan diş eksikliği hipodonti, altı veya daha fazla olan diş eksikliği oligodonti olarak tanımlanır. Anodonti ise tüm dişlerin eksik olduğu durumdur (3).

Bazı araştırmacılar eksik olan diş tipine göre diş agenezisini sınıflamışlardır. Örnek olarak, bazı çalışmalarda "selektif diş agenezisi", "kesici diş agenezisi", "kesici ve premolar hipodonti" veya "molar oligodonti" tanımlanmıştır (4). Bununla birlikte son yıllarda aynı gen mutasyonunun hem hipodonti hem de oligodontiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu hastalıkları selektif diş agenezisi başlığı altında toplamak yaygın olarak kabul edilmiştir (5).

Genel popülasyonda diş agenezisinin görülme sıklığı daimi dişlerde %2,6-11,3 arasında iken (6), süt dişlerinde %0.5-0.9 arasındadır (7). Daimi dişlerde %20 insidansla en sık üçüncü molarların (yirmi yaş dişi) agenezisi görülür (7).

Diş agenezisi vakalarının yaklaşık olarak %80' inde bir veya iki diş eksikliği vardır (8). Özellikle de ikinci premolar ve üst lateral kesiciler etkilenir (9). Oligodonti prevalansı ise %1' in altındadır (10).

Diş gelişimi hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkisi altındadır. Kemoterapötikler ve radyasyonun diş gelişimini bozucu etkileri vardır. Aile çalışmaları, izole diş agenezisinin çoğunlukla otozomal dominant kalıtıldığını göstermiştir. Otozomal resesif, X' e bağlı, poligenik ve multifaktöriyel kalıtım modelleri de bildirilmiştir (11-13).

Günümüzde, diş gelişiminde rol alan birçok genin, diş eksikliğinde de potansiyel aday genler oldukları bildirilmektedir. Diş agenezisinde sorumlu genlerin araştırılmasında aile çalışmalarının büyük önemi vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda diş gelişiminde rol aldığı bildirilen *MSX1*, *PAX9* ve *AXIN2* genlerinde meydana gelen mutasyonların diş eksikliğine neden oldukları bildirilmiştir. Bunun yanında nonsendromik diş agenezisine neden olabilecek ve henüz tanımlanmamış birçok genin olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde konjenital diş eksikliğinin moleküler genetiğiyle ilgili literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada nonsendromik konjenital diş eksikliği bulunan ve otozomal dominant kalıtım kalıbı gösteren üç kuşak bir ailede bu malformasyondan sorumlu genin saptanması planlanmıştır. Aynı ailede saptanan ve diş anomalileri yanısıra dismorfik bulguların da gözlemlendiği bireylerdeki malformasyonun genetik temellerinin araştırılması da tez kapsamına alınmıştır.

Çalışma genom-boyu DNA çip analizi, bölgeye özgü aday gen yaklaşımı ve DNA dizi analizi yöntemlerini kullanarak ailede yüklülük gösteren ve birbirleri ile ilişkili olabilecek fenotip spektrumuna yol açan gen (ya da genleri) bulmayı hedeflemektedir.




GENEL BİLGİLER

2.1. Konjenital Diş Eksikliği

2.1.1. Tanım ve Terminoloji

Konjenital diş eksikliği, herhangi bir nedenden ötürü bir ya da daha fazla dişin oluşmaması sonucu ağızdaki dişlerin normal sayılarından daha az olması durumudur. Bir dişin ağız boşluğunda erüpsiyon olmaması ve radyografide görünmemesi, o dişin konjenital eksikliği olarak tanımlanır (1). Doğumda tüm süt dişleri ve daimi birinci molar dişler radyografide görünebilir. Tüm süt dişleri 3 yaş civarında, daimi dişler ise (3. molarlar hariç) 12-14 yaşları arasında erüpsiyon olur. Bu nedenle süt dişlerin konjenital eksikliği için 3-4 yaş, daimi dişlerin konjenital eksikliği için 12-14 yaş klinik muayene için uygun zamanlardır. Tanı için klinik muayene ile birlikte panoramik radyografi çekilmesi gereklidir (1).

Diş agenezisi, diş gelişiminin en sık anomalisidir. Literatürde dişlerin sayıca az olmasını ifade eden (hipodonti, oligodonti, diş aplazisi, diş agenezisi, konjenital eksik diş gibi) birçok terim vardır. Üçüncü molarlar dışında altıdan daha az dişin gelişimsel olarak eksik olmasına “hipodonti”, üçüncü molarlar dışında altı ya da daha fazla dişin konjenital eksikliğine “oligodonti” denir. “Anodonti” ise tüm dişlerin eksikliğini ifade eden nadir bir durumdur (3) (Şekil 2.1).

Hipodonti	Oligodonti	Anodonti
		
% 2,6-11,3	% 0,08-1,1	Çok nadir

Şekil 2.1. Dişin sayısal anomalileri ve sıklıkları (10).

2.1.2. Klinik Epidemiyoloji

Diş agenezisi toplumun %20'sinde görünebilen sık bir anomalidir (14). Herhangi bir sistemik hastalık olmadan birkaç dişle sınırlı olan diş agenezisi genellikle normalin varyantı olarak değerlendirilir ve sık görülür. Daimi dişler süt dişlerine göre daha sık etkilenir. Üçüncü molar dişler hariç daimi diş agenezisinin genel popülasyondaki insidansı %2,6-11,3 arasındadır (6, 15, 16).

Diş agenezisi olan hastaların büyük çoğunluğunda (%76-83) bir veya iki daimi diş eksikliği vardır. Genellikle unilateraldir. İstisna olarak maxiller lateral kesicilerin agenezisi sıklıkla bilateral görülür (17). Oligodonti prevalansı ise %1' in altındadır (0,08-1,1) (10).

Diş agenezisi prevalansı ile ilgili yapılmış birçok çalışmada popülasyonlar, kıtalar ve ırklar arasında farklılıklar görülmüştür. Diş agenezisi prevalansında etnik farklılıklar göze çarpar. Siyahlarda beyazlara göre daha düşük prevalans gösterirken Asyalılarda agenezi prevalansı daha yüksektir (17). Diş agenezisi prevalansı Avrupa (erkekler %4,6; dişiler %6,3) ve Avustralya'da (erkekler %5,5; dişiler %7,6) Kuzey Amerika'daki beyazlara (erkekler %3,2; dişiler %4,6) göre daha yüksektir (17).

Diş agenezisi insidansı kadınlarda daha yüksektir (18-25). Bazı çalışmalarda kadınlarda 1,37 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (6, 17, 26), bazılarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (22, 25, 27, 28).

Diş agenezisi insidansı diş grupları arasında farklılık gösterir. Popülasyon çalışmalarında %20-22 insidansla en sık üçüncü molarların (yirmi yaş dişi) agenezisi görülür (6). Üçüncü molarlardan sonra en sık görülen diş agenezisi mandibular ikinci premolar dişlerdir. Bunu maksiller lateral kesiciler ve ikinci premolarlar izler (9, 17, 29). Eksikliği en az görülen dişler maxiller santral kesiciler (prevalansı %0,016) ve mandibular birinci molar ve kaninlerdir (prevalansı %0,03' tür) (17) .

Japonya'da yapılan çalışmalarda ise %8,5-9,4 prevalans ile birlikte sıklıkla mandibular ikinci premolar ve mandibular kesicilerin etkilendiği bildirilmiştir (28, 30).

2010 'da Çelikoğlu ve ark.'nın Türk toplumunda 3341 ortodonti hastasında yaptıkları çalışmada hipodonti ve oligodonti prevalansları sırasıyla %4,3 ve %0,3 (toplam diş agenezisi prevalansı: %4,6) bulunmuştur. Eksikliği en sık görülen dişler %46,5 ile maxiller kesiciler olmuştur. Bunu %22,5 ile mandibular ikinci premolar ve %13,4 ile mandibular santral kesiciler izlemiştir. Diş agenezisi kadınlarda daha sık bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diş eksikliği sıklıkla maxillada görülmüştür. Bununla birlikte sağ-sol arasında eşit dağılım göstermiştir (25). Türkiye'de yapılmış diğer bir çalışmada da sırasıyla maksiller lateral kesicilerin (%33,2), mandibular ikinci premolar (%18,8) ve maksiller ikinci premolar (%12,5) dişlerin eksikliği gösterilmiştir (24).

Süt dişlerinde agenezi insidansı daha düşüktür. Örnek olarak Avrupalılarda %0,4-0,9 arasında iken (18, 31), Japonlarda %2,4 olduğu bildirilmiştir (32). Vakaların %60'ında süt dişlerinde en sık alt lateral kesicilerin eksikliği görülür (32).

Muller ve ark., eksik olan diş sayısı ile diş grubu arasında ilginç bir korelasyon kurmuştur. 14940 adolesanda yaptıkları çalışmada sadece 1 veya 2 diş eksik olduğunda en sık maksiller lateral kesicilerin, ikiden fazla diş eksikliği olduğu zaman ise en sık ikinci premolar dişlerin eksik olduğunu bildirmişlerdir (18).

2.1.3. Etiyoloji

Diş gelişimini inceleyen birçok araştırma yapılmasına rağmen diş eksikliğinin etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda birçok genin diş agenezisi ile ilişkisi olduğunun görülmesine rağmen, insanlarda nonsendromik ailesel diş agenezisi ile ilgili 5 gen tanımlanmıştır. Bunlar; *MSX1*, *PAX9*, *LTBP3*, *EDA* ve *AXIN2*' dir. Diş agenezisiyle ilişkilendirilmiş genler sayfa 12' de detaylandırılmıştır. Son bulgular, konjenital diş eksikliğinin, gen fonksiyonları, çevresel ilişki ve dişin gelişim zamanlamasının kombinasyonundan etkilenen, multifaktöriyel bir durum olduğunu göstermektedir (33).

Diş agenezisi ailesel veya sporadik olabildiği gibi sendromla ilişkili veya non-sendromik olabilir. Diş agenezisine neden olan birçok çevresel ve genetik faktör vardır.

2.1.3.1. Çevresel Faktörler

Diş agenezisine neden olan çevresel faktörlerin başında enfeksiyon, ilaçlar ve radyasyon gelir (6). Diş tomurcuklarının gelişiminin durmasında birçok faktörün etkisi olabilir. Bu faktörler arasında; hamilelik sırasındaki beslenme ve hormonal bozukluklar, rubella, sifilis ve rikets enfeksiyonları, yüksek ateş ve radyoterapi sayılabilir (34). Travma, çeneye cerrahi müdahale ve süt dişinin ekstraksiyonu da diş gelişimini durdurabilir.

Literatürde, hamilelik sırasında kullanılan ilaçların diş eksikliğine neden olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. 1998 yılında yapılan bir çalışmada hamilelik sırasında antikonvülsan ilaç kullanımının yol açtığı en belirgin dental anomalinin konjenital diş eksikliği olduğu bildirilmiştir (35).

Gelişmekte olan dişler kemoterapi ve radyoterapiden yaşa ve doza bağlı olarak etkilenir (36). Erken yaşta malign hastalıklar nedeniyle tedavi gören çocuklarda, diş gelişiminin durması, kısa diş kökleri, erken apikal kapanma, mine hipoplazisi, mikrodonti ve hipodonti gibi diş anomalileri bildirilmiştir (37). Bununla birlikte radyasyonun etkisinin kemoterapötik ajanlardan daha şiddetli olduğu gösterilmiştir (36).

2.1.3.2. Genetik Faktörler

Güçlü bir genetik etkinin varlığı birçok aile ve ikiz çalışmasında gösterilmiştir (38). Diş agenezisinde çoğu vaka sporadiktir. Bununla birlikte etkilenmiş bireylerin ebeveyn, kardeş ve birinci derece akrabalarında genel popülasyona göre prevalansın yüksek bulunması genetik bir etiyolojinin varlığını gösterir (39-41). Brook, vakaların çoğunluğunda hipodontinin poligenik kalıtım gösterdiğini bildirmiştir. Bu nedenle de etkilenmiş kişilerin yakınlarının hipodonti olma riskinin birçok çevresel ve genetik faktöre bağlı olduğunu ifade etmiştir (38). Başka bir çalışmada hipodontisi olanların birinci derece akrabalarında hipodonti prevalansı genel topluma göre 5 kat daha yüksek bulunmuş ve etkilenmemiş kişilerde kontrollere göre daha küçük dişler saptanmıştır (42).

İkiz çalışmalarında, monozigotik ikizlerde dizigotiklere göre yüksek konkordans gösterilmiştir (43). Bununla birlikte birçok monozigotik ikiz çalışmasında hipodontinin değişken ekspresyonu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, çevresel ve epigenetik faktörlerin fenotip ekspresyonuna katkısını desteklemektedir (6).

Popülasyon çalışmalarında diş agenezisinin izole bir bulgu olabildiği gibi sendromun bir parçası da olabildiği gösterilmiştir (44). İzole formları sporadik veya ailesel olabilir. Ailesel diş agenezisinde inkomplet penetrans ve değişken ekspresyonla birlikte çoğu vakada otozomal dominant kalıtım bildirilmiştir (11, 39). Otozomal resesif, X'e bağlı, poligenik veya multifaktöriyel kalıtım modelleri de bildirilmiştir (11-13).

Diş agenezisinin ekspresyon fenotipi değişkenlik gösterebilir. Eksik olan dişlerin sayısının ve yerlerinin farklı olması ve çeşitli diş anomalilerinin eşlik edebilmesi değişken ekspresyona neden olur. Maxiller lateral kesicileri eksik olan bir ailede koni şeklinde maxiller lateral kesiciler görülebilir ve bu durum parsiyel ekspresyonun bir örneği olabilir (45). Fenotip şiddetindeki değişkenlik pedigrilerde sıklıkla gözlenmektedir. Aynı ailedeki etkilenmiş bireylerde farklı sayıda ve tipte diş eksikliği gözlenmiştir. Parkin ve ark., aile içinde hipodonti ekspresyonundaki farklılıklara neden olarak genetik faktörlere ek olarak epigenetik ve çevresel faktörlerin de önemli olabileceğini bildirmiştir. Bu da multifaktöriyel bir etiyolojiyi düşündürmektedir (41).

Diş agenezisi genetik ve fenotipik olarak heterojen bir durumdur. Son 15 yılda yapılan çalışmalarla diş agenezisinin genetiğiyle ilgili önemli bilgiler elde edildi. Bugüne kadar diş gelişiminde rol alan 200'den fazla gen tanımlanmıştır (46). Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks moleküllerini kodlayan birçok gen ailesinin diş gelişiminde eksprese oldukları gösterilmiştir (47). Bu genlerden bazılarının mutasyonunda diş gelişiminin durduğu bilinmektedir. Diş oluşumuyla (odontogenez) ilgili moleküler çalışmalar diş gelişiminin sıkı kontrol altında olduğunu göstermiştir (48).

Yakın zamanda diş agenezisiyle ilişkili birçok mutasyon tanımlanmıştır. Nonsendromik diş agenezisinde tanımlanan ilk genler *PAX9* ve *MSX1*'dir (4, 14, 49).

PAX9 ve *MSX1* genleri diş oluşumundan sorumlu transkripsiyon faktörleridir. Fare çalışmalarında her ikisinin de erken diş morfogenezinde gerekli oldukları gösterilmiştir (50, 51). Bu genler, diş gelişiminin başlangıç safhasından sonra, epiteliyel sinyallere cevap olarak dental mezenşimde eksprese olurlar (52).

Vastardis ve ark., ikinci premolarları ve üçüncü molarları eksik bireylerde 4. kromozomdaki (4p16.1) *MSX1* geninin mutasyona uğradığını bulmuşlardır (4). Bu ailede bazı etkilenmiş bireylerde, bu dişlerin yanında maksiller 1. premolar, mandibular 1. molar ve kesici diş eksikliği de mevcuttur. Van den Boogaard ve ark., *MSX1* geninin diş agenezisi ve dudak damak yarığının çeşitli kombinasyonları ile alakalı olduğunu bildirmiştir (53).

Diş agenezisine neden olan diğer bir transkripsiyon faktörü geni ise 14. kromozomda (14q21-q13) bulunan *PAX9* genidir. Stockton ve ark., bu gendeki mutasyonun bir ailede otozomal dominant oligodontiye neden olduğunu göstermiştir (14). Guanin insersiyonu, çerçeve kaymasına ve proteinin erken terminasyonuna neden olmuştur (14). Etkilenmiş bireylerde daimi molar dişlerin büyük çoğunluğu ile ikinci premolar ve mandibular santral kesicilerin eksikliği mevcuttur.

Farelerde *Msx1* ve *Pax9* genlerinin inaktivasyonu, diş gelişiminin *bud* (tomurcuk) evresinde durmasına, damak, ekstremit ve faringeal kese malformasyonlarına neden olur. Bununla birlikte heterozigot farelerde diş gelişimi normal devam eder (50, 54). İnsanlarda genin bir kopyasının inaktivasyonu, dental defektlere veya *MSX1* mutasyonunda olduğu gibi dental defekt ve yarıklara neden olur (4, 14).

PAX9 ve *MSX1* genlerinin haricinde, 2004 yılında Lammi ve ark., *AXIN2* geninin de diş gelişiminden sorumlu olduğunu ve bu gendeki mutasyonların konjenital diş eksikliğine sebep olduğunu bulmuşlardır (55). Matalova ve ark., sendroma bağlı olmayan diş eksikliklerinde *PAX9*, *MSX1* ve *AXIN2* genlerinin, sendromlara bağlı diş eksikliklerinde ise *EDA*, *EDAR*, *EDARADD*, *IRF6*, *MSX1*, *NEMO*, *P63*, *PITX2* ve *SHH* genlerinin ilişkili olduğunu bildirmiştir (10).

Stritzel ve ark. koni şeklinde lateral kesicilerin veya rudimenter üçüncü molarların diş agenezisine neden olan gen defektinin inkomplet ekspresyonu; unilateral agenezinin de düşük penetransın bir sonucu olduğunu ifade etmiştir (56).

2.1.4. Diş Agenezisiyle İlişkili Dental Anomaliler

Herhangi bir dental anomalisi olan bir hastada, başka bir dental anomali görülme olasılığı, normal popülasyona ya da kontrol grubuna göre daha fazladır. Konjenital diş eksikliği ile ilişkili birçok dental anomali bulunmaktadır (33, 57). Bunlar;

- Diş formasyonu ve erüpsiyonunda gecikme,
- Küçük diş formu (mikrodonti),
- Konik kron şekli,
- Süt dişlerinin uzamış retansiyonu (persistansı),
- Gömülü diş (özellikle maxiller kaninler),
- Ektopik erüpsiyon,
- Dişlerin malpozisyonları,
- Süt molarların infrapozisyonu,
- Kısa köklü dişler,
- Molar taurodontizm,
- Premolarlar ve/veya maksiller lateral kesicilerdeki rotasyonlar,
- Mine hipoplazisi ve hipokalsifikasyonlarıdır.

Diş agenezisiyle birlikte görülen en sık dental bozukluk mikrodontidir (58). Mikrodonti, normalden küçük olan diş olarak tanımlanır. Genel mikrodonti, konjenital hipopituiterizm, ektodermal displazi ve Down sendromunda görülebilen nadir bir durumdur. Lokal mikrodonti ise daha sık görülür ve genellikle hipodonti ile ilişkilidir (59).

Gomes ve ark' nın 1049 ortodontik hastada yaptıkları araştırmada hipodontisi olanların biri hariç tümünde en az bir dental anomalinin eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu dental anomaliler; süt dişi persistansı (%30,3), ektopik kanin erüpsiyonu (%25,8), taurodontizm (%21,2) ve koni şeklinde maxiller lateral kesicilerdir (% 16,7) (60).

Diş agenezisiyle, diş boyutunda azalma ve palatal olarak yer değiştirmiş kanin anomalilerinin genetik olarak birbiriyle ilişkili bozukluklar olduğuna dair hipotezler vardır (61).

Rune ve Sarnas, konjenital diş eksikliğine sahip hastaların, kontrol grubuna oranla diş gelişiminin gecikmiş olduğunu bildirmişlerdir (62). Bunların dışında birçok araştırmacı konjenital diş eksikliğine sahip hastaların normalden daha küçük dişlere sahip olduklarını göstermişlerdir (58, 63, 64). Bu küçülmenin homojen olmadığı, ön dişlerin arka dişlerden daha küçük olduğu belirtilmiştir. Şiddetli diş agenezisi (oligodonti) olanlarda ise diş küçüklüğü daha kayda değerdir (63).

Garib ve ark., ikinci premolarları konjenital olarak eksik olan hastalarda, diğer dişlerin eksikliği, mikrodonti, süt molarların infraoklüzyonu ve dişlerin ektopik pozisyonda olması gibi dental anomalilerin normal popülasyona göre daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir (57). Genel popülasyonla karşılaştırıldığında ikinci premolar agenezisi olan hastalarda maxiller lateral kesicilerin mikrodontisi 5 kat daha fazla görülür. Baccetti, küçük (veya koni şeklinde) lateral kesicilerin, ikinci premolar dişlerin agenezisiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir (65). Bu sonuçlar agenezi ve mikrodontinin aynı genetik defektin düşük penetransla birlikte farklı ekspresyonları olduğunu gösterir (57, 66).

2.1.5. Sendromla İlişkili Diş agenezisi

Birçok sendromda, diğer organların malformasyonları ile birlikte dental belirtiler de görülebilir. Konjenital diş eksikliği de bazı sistemik sendromlar ve diğer dental anomalilerle ilişkili olabilir. Bu nedenle konjenital diş eksikliğine sahip bireylerin diğer anomaliler açısından değerlendirilmesi önem kazanmaktadır (6).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)' de diş agenezisiyle ilişkili 60'tan fazla sendrom bildirilmektedir. Bu da bize diş ve diğer organların gelişiminde ortak mekanizmaların bulunduğunu gösterir.

Diş agenezisinin en sık görüldüğü sendromlar arasında ektodermal displaziler, Oral-Fasiyel-Dijital sendrom ve yarık dudak veya damakla birlikte

görülen sendromlar, Van der Woude sendromu ve Wolf-Hirschhorn sendromu sayılabilir.

Normal popülasyona kıyasla, yarık dudak-damak yarığı olanlarda konjenital diş eksikliği daha fazla görülmektedir (6). Yarık dudağı olanlarda hipodonti prevalansı %31 (67), yarık damağı olanlarda %70-77 olarak bildirilmektedir (68, 69). Nonsendromik yarık dudak ve/veya damağı olan hastalarda hipodonti prevalansı yarığın şiddetiyle doğru orantılı olarak artmaktadır (70).

Diş agenezisiyle birlikte görülen sendromlardan bir kısmı **Tablo 2.1'** de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Diş agenezisiyle birlikte görülen sendromlar.

Sendrom	Önemli bulguları	Sorumlu Gen ve lokus
Down sendromu	Mental retardasyon, karakteristik yüz	Trizomi 21
Ektodermal displazi, OD tipi	Hipohidrozis, hipotrikozis, hipodonti,	<i>EDAR</i> (2q11-q13)
Ektodermal displazi, OR tipi	Hipohidrozis, hipotrikozis, hipodonti,	<i>EDAR</i> (2q11-q13)
Ektodermal displazi, X' e bağlı	Hipohidrozis, hipotrikozis, hipodonti,	<i>EDA</i> (Xq12-q13.1)
EEC sendromu	Ektrodaktili, ektodermal displazi, yarık dudak/damak	<i>P63</i> (3q27)
<i>Incontinentia pigmenti</i>	Alopesi, pigmente maküller, mental retardasyon	<i>IKK-γ (NEMO)</i> (Xq28)
Oral-Fasiyel-Digital sendrom tip 1	Yüz, ağız ve parmak malformasyonları	<i>CXORF5</i> (Xp22.3-22.2)
Pierre Robin sendromu	Yarık damak, mikrognati, glossopitozis	17q24.3-q25.1
Rieger sendromu	Hipoplastik iris, orta yüz hipoplazisi, umblikal herni	<i>PITX2</i> (4q25-q26)
Seckel sendromu	Büyüme geriliğı, mikrosefali	<i>ATR</i> (3q22, 14q)
Van der Woude sendromu	Yarık dudak/damak, alt dudakta <i>pit</i> ler	<i>IRF6</i> (1q32-q41)
Witkop tooth-and-nail sendromu	Diş ve tırnak hipoplazisi	<i>MSX1</i> (4p16.1)
Wolf-Hirschhorn sendromu	Mental motor retardasyon, mikrosefali, yarık dudak/damak	4p delesyonu

2.1.6. Nonsendromik Ailesel Diş Agenezisi

OMIM’ de nonsendromik ailesel diş agenezileri “selektif diş agenezileri” grubu altında etiyojolojiye göre 6 altgrupta toplanmıştır (**Tablo 2.2**) (5). Moleküler çalışmalar neticesinde STHAG1 (Selektif diş agenezisi 1) 4p16.1’ e, STHAG2 16q12.1’ e, STHAG3 14q12’ ye, STHAG5 10q11.2’ ye, STHAG6 11q12’ ye ve STHAGX1 X kromozomuna haritalanmıştır. STHAG4’ ün inkomplet penetransla OD kalıtım gösterdiği bildirilmiş fakat herhangi bir bölgeye lokalize edilememiştir. Selektif diş agenezisinin bu formunda eksik veya koni şeklinde üst lateral kesiciler vardır. Nieminen ve ark. bu durumu “kesici ve premolar hipodonti” olarak adlandırmıştır (45).

Tablo 2. Selektif diş agenezileri.

	OMIM	Kalıtım	Lokalizasyon	Gen
STHAG1	106600	OD	4p16.1	<i>MSX1</i>
STHAG2	602639	OR	16q12.1	?
STHAG3	604625	OD	14q12-q13	<i>PAX9</i>
STHAG4	150400	OD inkomplet penetrans	?	?
STHAG5	610926	?	10q11.2-q21	?
STHAG6	613097	OR	11q12	<i>LTBP3</i>
STHAGX1	313500	X’e bağlı	Xq12-q13.1	<i>EDA</i>

STHAG: *Selective tooth agenesis*, OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif

STHAG1 ve STHAG3 sırasıyla *MSX1* ve *PAX9* genleriyle ilişkili bulunmuştur. İkisi de OD kalıtım gösterirler.

STHAG2, aralarında akrabalık olan Pakistanlı bir ailede resesif kalıtım gösteren diş anomalileriyle tanımlanmıştır. Bağlantı analizinde 16q12.1’ e lokalize edilmiş fakat geni saptanamamıştır (12).

STHAG5, daimi diş agenezisinin olduğu Çinli geniş bir ailede tanımlanmıştır. Wang ve ark. bu durumu “He-Zhao eksikliği” olarak adlandırmıştır. Bağlantı analizlerinde 10q11.2’ ye lokalize edilmiş fakat geni saptanamamıştır (71, 72).

STHAG6, 11q12’ de *Latent transforming growth factor-beta binding protein 3 (LTBP3)* genindeki mutasyondan kaynaklanır. Noor ve ark., aralarında akrabalık olan Pakistanlı bir ailenin 5 çocuğunda oligodonti tanımlamıştır. Genom boyu bağlantı analiziyle oligodontiye *LTBP3* geninde homozigot *nonsense* mutasyonun (Y744X) neden olduğunu göstermiştir (73).

STHAGX1, Xq12-q13.1’ de lokalize ektodisplazin A (*EDA*) genindeki mutasyondan kaynaklanır. Aynı gendeki mutasyonlar “hipohidrotik ektodermal displazi” ye de neden olabilir. İlk defa Tao ve ark., konjenital hipodontisi olan Moğol bir ailede *EDA* geninde *missense* mutasyon tanımlamıştır (13). Bu hastalarda özellikle maxiller ve mandibular lateral kesicilerle mandibular santral kesicilerin eksikliği bildirilmiştir (74).

OMIM’ de ayrıca Oligodonti-Kolorektal Kanseri Sendromu (#608615) başlığı altında kompleks bir hastalık da mevcuttur. Lammi ve ark., dominant kalıtımla giden şiddetli diş agenezisi (oligodonti) ve kolorektal kanser olan Finlandiyalı bir ailede 17. kromozomda lokalize *Axis inhibitor 2 (AXIN2)* geninde *nonsense* mutasyon tanımlamıştır (55). *AXIN2*, Wnt/ β -catenin sinyal yolağında *feedback* inhibitör olarak fonksiyon görmektedir.

2.2. Diş Gelişimi

Gelişimsel olarak diş, epitelial-mezenşimal organa tipik bir örnektir. İnsan embriyosunda süt ve daimi dişler, oral ektoderm ve kranial nöral krestten fasiyel *prose* göç eden mezenşimal hücrelerden gelişir (59). Dişler, omurgalıların ağız bölgesinde oluşan epitelial uzantılardır. Üst çene kemiği ve alt çene kemiğinin alveolar kısmında diş torbası adı verilen torbacık benzeri yapılar içinde gelişirler. Diş gelişimi; ter bezi, saç folikülü ve tırnak gibi diğer organların gelişimine morfolojik ve moleküler olarak benzer (75). Diş gelişimini düzenleyen en önemli mekanizma epitelial ve mezenşimal hücreler arasındaki etkileşimlerdir (59). Bu etkileşimlerin en karakteristik özelliği ardışık ve karşılıklı olmasıdır (76).

Süt dişleri gelişirken gelecekteki daimi dişlerin gelişiminden sorumlu olan dental lamina da oluşur. Bu nedenle süt santraller, lateraller ve kaninler gelecek daimi santraller, lateraller ve kaninlerin dental laminasını oluşturur. Birinci ve 2. süt molarlar gelecek 1. ve 2. daimi premolarların dental laminasını oluşturur. Daimi molarlar ise 2. süt molarların distalindeki dental laminadan gelişir (77).

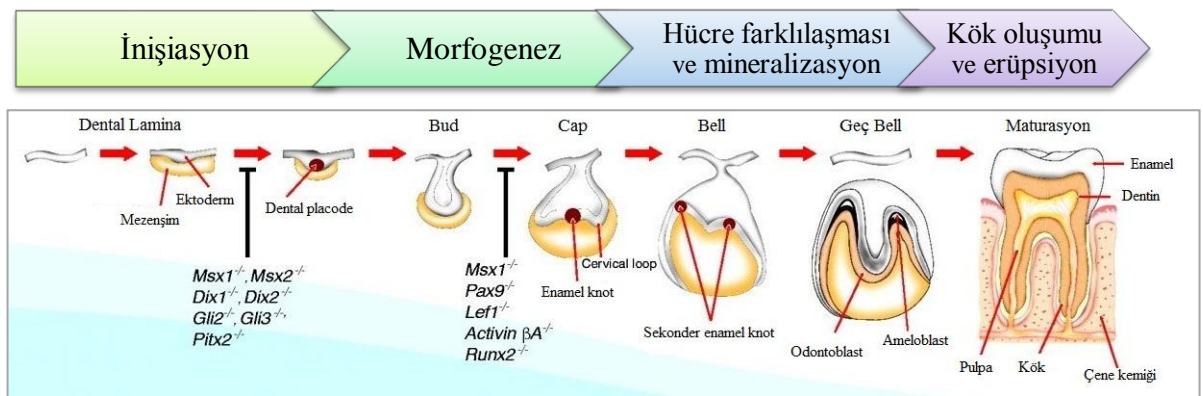
2.2.1. Diş Gelişim Evreleri

Diş gelişimindeki (odontogenez) evreler dişin histolojik görünümüne göre klasik terimlerle tarif edilir. Bu evreler sırasıyla:

- İnisiyasyon (Başlangıç) evresi
- *Bud* (Tomurcuklanma) evresi
- *Cap* evresi
- *Bell* evresi
- Maturasyon evresidir (78).

Diş gelişiminin şematik görünümü **Şekil 2.2**' de gösterilmiştir.

Yakın zamanda diş gelişiminin moleküler kontrolünün anlaşılması yeni terminolojilerin gelişmesini sağlamıştır. Bu yeni terminolojiye göre diş gelişimi başlangıç, morfogenez, hücre farklılaşması ve erüpsiyon olarak 4 fazda değerlendirilebilir (78).



Şekil 2.2. Diş gelişiminin şematik görünümü. Ektoderm beyaz, mezenşim sarı renkte gösterildi. Diş gelişim evreleri bir sonraki sayfada ayrıntılarıyla anlatılmıştır. Journal of Cell Science 2003 (116): 1647-1648' den uyarlanmıştır (75).

2.2.1.1. İnişiasyon (Başlangıç) Evresi

İnsanda embryogenezin 6. haftasında çizgi halinde oral epitelyum hücreleri “dental lamina”yı oluşturmak için kalınlaşır (**Şekil 2.2**). Ağız içini döşeyen ektodermal epitelin kalınlaşması, diş gelişiminin ilk basamağını oluşturur. Nöral krest türevi mezenşimal hücreler bu bölgeye göç eder ve çoğalmaya başlar (78).

2.2.1.2. *Bud* (Tomurcuklanma) Evresi

Dental laminanın ve mezenşim hücrelerinin devamlı büyümesiyle karakterizedir. Oral epitelin kalınlaşması sonucu oluşan *placode* mezenşime tomurcuklanmaya başlar (**Şekil 2.2**). Epitelden gelen sinyallerle mezenşim hücreleri tomurcuk etrafında yoğunlaşır ve dental papillayı oluşturur (75).

2.2.1.3. *Cap* (Şapka) Evresi

Epitelin hızlı büyümesi ve katlanmasıyla oluşan şapka (*cap*) şeklindeki yapı “*dental organ*” veya “*enamel organ*” olarak adlandırılır. Bu yapı mezenşimal dental papillayı çevreler. Tomurcuklanma evresinden *cap* evresine geçiş, diş gelişiminde önemli bir basamaktır, çünkü kron oluşumu bu aşamada başlar (78).

İç dental epitelin lokal yoğunlaşmasıyla oluşan “*enamel knot*” (düğüm) (**Şekil 2.2**) adı verilen hücre kümesi dental organ içinde kasp (*cusps*) oluşumunda görevli kontrol merkezidir. Enamel düğüm, hem kron şeklini hem de dental papilla gelişimini etkileyen sinyal moleküllerini eksprese eder (78).

2.2.1.4. *Bell* (Çan) Evresi

Diş kronunun morfolojisi belirlenir. Dental organın dental papillaya proliferasyonu ve invajinasyonu neticesinde çan şeklindeki yapı oluşur.

Dental papillanın en dıştaki hücreleri “odontoblast” lara (dentin oluşturan hücreler) farklılaşır. Bu aşamada dental papilla, “dental pulpa” adını alır. İç dental epitel hücreleri “ameloblast” lara (enamel üreten hücreler) farklılaşır. Dentin ve enamel depolanmasının ardından kasp uçlarında mineralizasyon başlar ve servikal yönde ilerler (**Şekil 2.2**). Daimi dişler süt diş germinin epitelinden gelişir ve tomurcuklanması süt dişi gelişiminin bell evresinde başlar (59, 78).

2.2.1.5. Maturasyon evresi

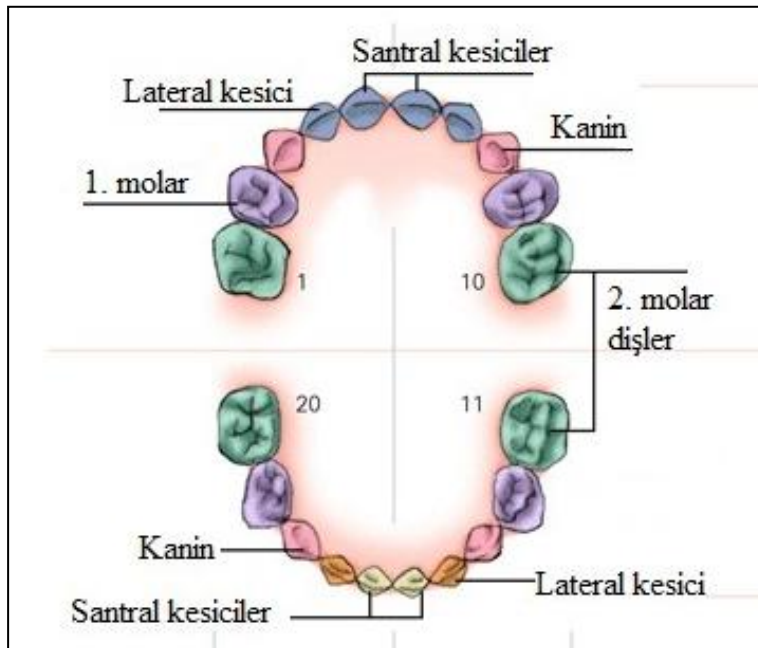
Kron oluşumu tamamlanır ve kök gelişimi başlar (78).

Erüpsiyon (dişin ağız boşluğuna doğru hareketi) bu evrede gerçekleşir.

2.2.2. Diş Gelişiminin Kronolojisi

İnsanda süt dişi gelişimi 6-8. embryonik haftalarda başlar. Kalsifikasyon 14-18. haftalarda başlar ve kron oluşumu 1 yaşından önce tamamlanır. İlk erüpsiyon olan dişler alt santral kesicilerdir (ortalama olarak 7. ay). Diğer süt dişleri ise 2 yaşına kadar erüpsiyon olur (77). 5 yaşına kadar olan çocuklarda 20 adet süt dişi bulunur (**Şekil 2.3**). 5 yaşından sonra süt dişlerinin yerini daimi dişlere bıraktığı karma dişlenme süreci başlar.

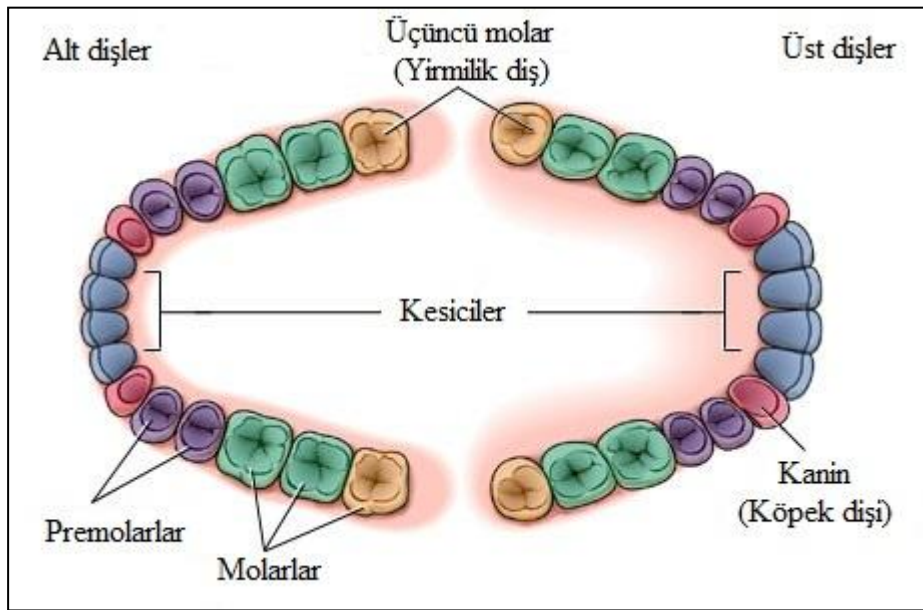
Daimi dişlerin gelişimi de prenatal 20-22. haftalarda başlar. Daimi dişlerin kronları üçüncü molarlar hariç 7-8 yaşlarında tamamlanır. İlk erüpsiyon olan daimi dişler alt santral kesicilerdir (6-7 yaş). Üçüncü molarlar hariç tüm daimi dişler 13 yaşından önce çıkmış olur. Üçüncü molarların kalsifikasyonu 7-9 yaşlarında başlar, kron oluşumu 12-16 yaşlarında tamamlanır (77).



Şekil 2.3. Süt dişlerinin şematik görüntüsü.

2.2.3. Diş Aileleri

Erişkin bir insanın ağızında toplam 32 diş bulunur. Dişler çenedeki spesifik lokalizasyonlarına göre ailelere ayrılır. İnsanlarda diş aileleri tipik şekillerine göre kesiciler, kaninler, premolarlar ve molarlar olarak gruplandırılır (**Şekil 2.4**). Aileler arasında tipik şekil farklılıkları bulunurken, aynı ailedeki dişler birbirine benzer. Her bir diş grubu bir epiteliyel kalınlıktan (dental lamina) oluşur ve gelişim en ön diştten başlar, arkaya doğru ilerler (79).

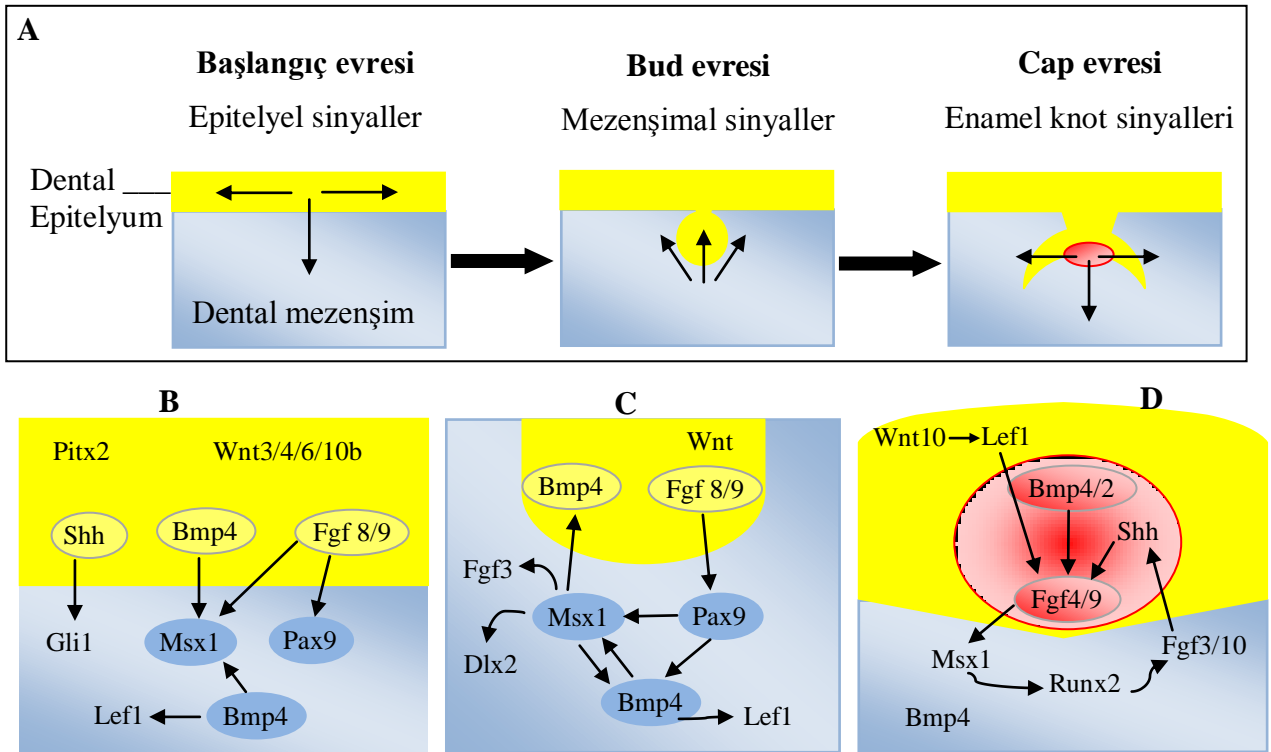


Şekil 2.4. Daimi dişlerin şematik görüntüsü.

2.3. Diş Gelişiminde Moleküler Mekanizmalar

Son 20 yılda diş morfogenezıyla ilişkili önemli moleküller ve moleküler mekanizmalar bulunmuştur. Bugüne kadar dişin gelişim basamaklarında eksprese olan 200' den fazla gen tanımlanmıştır (46). Diş gelişimi boyunca kompleks moleküler bir ağ etkilidir. Fare dişinin model olarak kullanıldığı moleküler seviyedeki odontogenez çalışmaları diş gelişiminin sıkı genetik kontrol altında olduğunu göstermiştir (80, 81). Epiteliyel ve mezenşimal dokular arasındaki kompleks etkileşimler, diş gelişiminin tüm evrelerinde düzenleyici rol oynar (59).

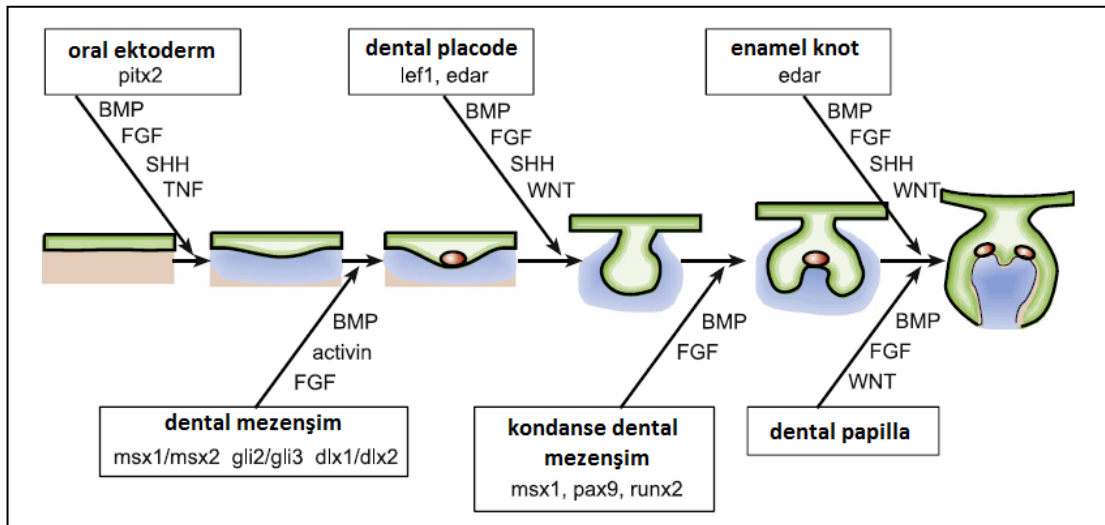
Diş gelişiminin başlangıç evresinde diş tipinin belirlenmesinde ve mezenşimal hücrelerin uyarılmasında en önemli rol epiteldedir. Tomurcuklanma evresinde diş gelişimini düzenleme görevi mezenşime geçer ve mezenşimal sinyaller epitelyum morfogenezini ve diş şeklini düzenler (59) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Diş gelişiminde epitelyum ve mezenşim arasındaki karşılıklı sinyaller önemli rol oynar. **A.** Morfogenez basamakları boyunca diş gelişimini regüle eden sinyal merkezleri oluşturulur. Bunlar epitelyel, mezenşimal ve enamel *knot* sinyal merkezleridir. **B.** Dental epiteldeki ilk belirteç dental laminadaki *Pitx2* ekspresyonudur. Dental *placode* Fgf, Bmp, Shh ve Wnt gibi büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerini salgılayan sinyal merkezi olarak fonksiyon görür. **C.** *Bud* evresinde epitelden gelen sinyallere karşılık olarak dental mezenşimde *Pax9*, *Msx1* ve *Bmp4* eksprese olur. **D.** *Cap* evresinde enamel *knot*' ta epitel ve mezenşimin büyümesini kontrol eden Shh, Fgf4, Fgf9 ve Bmp' ler salgılanır. Journal of Oral Pathology & Medicine 2009 (38): 1-17' den uyarlanmıştır (46).

Başta büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere birçok sinyal molekülü ve reseptörleri diş gelişiminde epitelium ve mezenşim arasında karşılıklı fonksiyon görür. Bunlar *transforming growth faktör β* (TGFβ), *bone morphogenetic protein* (BMP), fibroblast *growth* faktörler (FGF), epidermal *growth* faktörler (EGF) ile *hedgehog* (Hh) ve *wingless* (Wnt) aileleridir (1). Bu sinyallere ek olarak uyarılan dokularda birçok gen ekspresyonu olmaktadır (Şekil 2.5-2.6).

Epitel ve mezenşim arasında aktarılan sinyallerden ilk tanımlanan TGFβ ailesinin üyesi olan BMP' dir. BMP4 ve FGF8, epiteliumdan salgılanarak mezenşimi indükler ve Msx1, Msx2, Dlx1, Dlx2 gibi birçok mezenşimal transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu sağlar (Şekil 2.5). Bunun üzerine mezenşimal sinyal molekülleri *activin*, FGF ve BMP4 epiteliuma karşı sinyal olarak salınır ve dental *placode* oluşumunu uyarır (75, 82) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Diş gelişiminin moleküler regülasyonu. Epiteliyel (yeşil) ve mezenşimal dokular (mavi) arasındaki etkileşimler sinyal molekülleriyle sağlanır. Bu sinyaller, uyardıkları dokularda gen ekspresyonunu düzenler. Sinyal merkezleri (kırmızı) epiteliumda ortaya çıkar ve morfogenezi ve diş şeklini regüle eden 10' dan fazla sinyal molekülü salgılar. European Journal of Medical Genetics 2008 (51): 273-291' den uyarlanmıştır (1).

Morfogenez basamakları boyunca epitelde geçici sinyal merkezleri oluşturulur. İlk sinyal merkezi, epiteliyel tomurcuklanma başladığında dental *placode*' da ortaya çıkar (75) (**Şekil 2.5**). Buradan salgılanan sinyaller epitelin tomurcuklanması ve mezenşimal hücrelerin kondanse olmasını regüle eder. Bu esnada tomurcuğun ucunda enamel düğümü oluşumu için mezenşimal BMP4 gereklidir (75). Enamel düğümleri, geçici dental epiteliyel hücre kümeleridir ve kasp gelişiminde uyarı merkezi olarak görev yaparlar. Epiteliyel tomurcuğun ucundaki primer enamel düğümü; *FGF*, *BMP*, *SHH* ve *WNT* ailelerini içeren birçok sinyal molekülü eksprese eder (**Şekil 2.6**). Enamel düğümünden gelen sinyaller hem epiteliyel hem de mezenşimal hücreleri etkileyebilir. Enamel düğümlerin, *cap* evresinde epiteliyel katlanmayı kontrol ettiği düşünülüyor (79). Diş gelişiminin *bell* evresinde gelişmekte olan kaspların ucunda bulunan sekonder enamel düğümlerin, kaspların büyümesini uyardığı ve fonksiyonel diş şeklini belirlediği öne sürülmektedir (81). Sekonder enamel düğümü de, başta FGF olmak üzere aynı sinyal moleküllerini salgılamaya devam eder.

BMP4 diğer bir sinyal proteini olan *lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef-1)* ekspresyonunu indükler (83) (**Şekil 2.5**). *Lef-1*, mezenşimin indüklenmesi ve sonrasında dental pulpanın oluşumunda gereklidir. Diş gelişiminde önemli olan sinyal proteinlerinden *Sonic hedgehog (Shh)*, diş ektoderminin proliferasyonunun indüklenmesi ve mezenşime invajinasyonu ile diş tomurcuğu oluşumundan sorumludur (83).

Diş morfogenezinde epiteliyel-mezenşimal etkileşimlere katılan birçok transkripsiyon faktörü vardır. Kondanse dental mezenşimde eksprese olan *Msx1*, *Pax9* ve *Runx2* transkripsiyon faktörleri önemlidir. Ekspresyonları epiteliyel sinyallerle regüle edilir. *Msx1*, *BMP* ve *FGF* tarafından, *Pax9* ile *Runx2* ise *FGF* tarafından indüklenir (84) (**Şekil 2.5**). Bu üç genin *knock-out* fare modellerinde diş gelişiminin *bud* evresinde durduğu, *cap* evresine geçemediği gösterilmiştir (54, 82).

İnsanlarda *RUNX2 (CBFA1)*' nin heterozigot fonksiyon kaybı Kleidokraniyel displaziye neden olur (85). Kleidokraniyel displazi, klavikula hipoplazisi/aplazisi, diş anomalileri (*supernumerary* diş, dişlerin geç çıkması gibi) ve boy kısalığıyla karakterize otozomal dominant bir durumdur.

2.4. Diş Agenezisiyle İlgili Fare Çalışmaları

Gelişim mekanizmalarının anlaşılmasında ve hastalıklara model olarak transgenik fareler sıklıkla kullanılmaktadır. Diş gelişimindeki sinyal ağlarında birçok gen rol alır. Bu genlerdeki mutasyonlar farelerde diş gelişiminin durmasına neden olur (52).

Msx1-defektli farenin tüm dişlerinin eksik olduğu gösterildikten sonra *Msx1*'in farenin diş gelişiminde gerekli olduğu anlaşılmıştır (50). Daha sonra yapılan çalışmalarla *Msx1*, *Pax9* ve *Lef1 knockout* farede diş gelişiminin tomurcuklanma evresinde, *Pitx2*, *Gli2/3* ve *p63 knockout* farede başlangıç evresinde durduğu gösterilmiştir (**Tablo 2.3**). Farede *Msx1* ve *Pax9*, dental mezenşimde eksprese olur, epiteliyel sinyallerle indüklenir ve mezenşimden epitelyuma karşılıklı sinyallerde rol alır (86). *Msx1* ve *Pax9* transkripsiyon faktörleri farede kraniyofasiyel ve diş gelişiminde birlikte eksprese (koeksprese) olur (87). İnsanlarda *MSX1* ve *PAX9* heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları hastalığa neden olurken, heterozigot mutant farelerde anormal fenotipe yol açmaz (86).

Tablo 2.3. Diş agenezisiyle ilgili fare modelleri (48).

Gen	Mutasyon	Diş fenotipi
<i>Msx1, Msx2</i>	Çifte mutasyon	Başlangıç evresinde bloke olur
<i>Dlx1, Dlx2</i>	Çifte mutasyon	Başlangıç evresinde bloke olur
<i>Pitx2</i>	Null	Başlangıç evresinde bloke olur
<i>Gli2, Gli3</i>	Çifte mutasyon	Başlangıç evresinde bloke olur
<i>P63</i>	Null	Başlangıç evresinde bloke olur
<i>Pax9</i>	Null	Bud evresinde bloke olur
<i>Msx1</i>	Null	Bud evresinde bloke olur
<i>Lef1</i>	Null	Bud evresinde bloke olur
<i>Runx2</i>	Null	Bud evresinde bloke olur
<i>Barx1</i>	Null	Bud evresinde bloke olur
<i>Activin βA</i>	Null	Bud evresinde bloke olur

Tomurcuklanma evresinde *Msx1* ve *Pax9*' un dental mezenşimde koekspres olarak *Bmp4* ekspresyonunu sağladıkları gösterilmiştir (51, 88). *Msx1* delesyonunda *Bmp4* ve *Fgf3* ekspresyonu inhibe olur (52). *Msx1* mutant diş germelerinde BMP4 eklenmesiyle diş gelişiminin *bud* evresinden *cap* evresine geçebildiği gösterilmiştir (88, 89).

Msx2; mezenşim, epiteliyel hücreler, enamel düğümde ekspres olur ve kasp gelişiminde fonksiyon görür (52). *Msx2*' nin aynı zamanda kranial sütürlerde de bulunduğu bildirilmiş ve *Msx2* mutant farelerde kafa osifikasyonunda defektler gösterilmiştir (90). *Msx2* mutasyonunun insanlarda Boston-tipi kraniosinostoza neden olduğu bildirilmiştir (91, 92).

2.5. Diş Agenezisinde *MSX1* ve *PAX9* Genleri

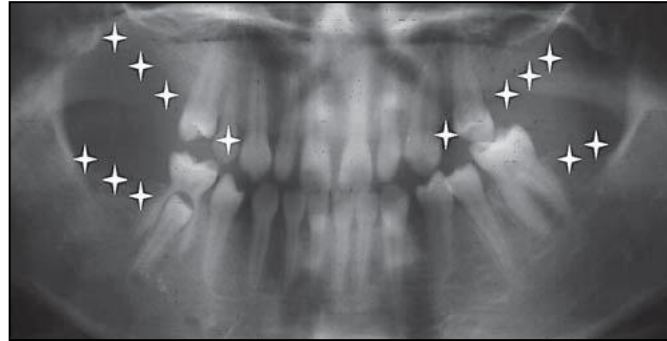
Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklı diş gruplarını oluşturmak için özelleşmeleri *homeobox* gen ailesinin kontrolü altındadır (93). *Homeobox* genleri, kraniofasial gelişimin kontrolünde çok önemli rolleri olan genlerdir. İlk defa *drosophila* (meyve sineği)' da tanımlanmış, evrim boyunca iyi derecede korunmuş olan bu genler tüm omurgalılarda bulunur (94). Bu genlerin kodladığı proteinler transkripsiyon faktörüdür ve gen ekspresyonunu kontrol ederler (6).

Nonsendromik diş agenezisinde tanımlanan ilk genler *homeobox* ailesinden *MSX1* ve *paired-box* ailesinden *PAX9*'dur (4, 14). Diş gelişiminde her ikisinin de gerekli oldukları fare çalışmalarında gösterilmiştir (50, 51). *MSX1* ve *PAX9* diş gelişiminde *bud* evresinde *cap* evresine geçişte birbirleriyle etkileşirler. *MSX1* ve *PAX9*' un diş gelişiminin erken evrelerinde dental mezenşimde koekspres oldukları ve fare embriyolarında *Msx1* veya *Pax9*' un homozigot delesyonunda diş gelişiminin tomurcuklanma evresinde durduğu gösterilmiştir (50, 54, 88). Tek heterozigot *Msx1*^{+/-} veya *Pax9*^{+/-} mutant farede diş gelişimi normalken, bileşik heterozigot *Msx1*^{+/-} *Pax9*^{+/-} olan farede alt kesiciler ve molar dişlerde eksiklik görülmüştür (88).

PAX9, tomurcuklanma evresinde *MSX1* transkripsiyonunu aktive eder. Yakın zamanda her iki molekülün de dimer oluşturarak *BMP4* transkripsiyonunu aktive ettikleri gösterilmiştir (95). Diş gelişiminde anahtar rol oynayan *Bmp4*' ün

mezenşimal ekspresyonu, *Msx1* veya *Pax9* homozigot mutant farede azaldığı gösterilmiştir (88). *Bmp4*, dental epitelde geçici sinyal merkezi olan enamel düğümün indüklenmesini sağlayan *downstream* sinyallerde efektör molekül olarak rol alır (96).

İnsanlarda *PAX9* veya *MSX1*' in heterozigot fonksiyon kaybı oligodontiye neden olur (4, 14). Diş fenotipleri birbirinden farklı olmasına rağmen *PAX9* ve *MSX1* mutasyonları insanlarda posterior diş agenezisine neden olur. *PAX9* mutasyonları daha çok molar ageneziye neden olurken, *MSX1* mutasyonları özellikle premolarları etkiler (8). Her iki gen de üçüncü molarları etkiler. *MSX1* mutasyonlarında sıklıkla 2. premolar ve maxiller 1. premolarların agenezisi bulunurken, *PAX9* mutasyonlarında çoğunlukla maxiller 1. ve 2. molarlar ile mandibular 2. molarların agenezisi saptanır (86). *PAX9* mutasyonu olan vakaların sadece birkaçında süt dişlerinde agenezi bildirilmiştir (97, 98). **Şekil 2.7**' de *PAX9* mutasyonuna örnek olarak bir kişinin panoramik radyografisi gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *PAX9* mutasyonu bulunan bir kişinin panoramik radyografik görüntüsü. Bilateral maxiller tüm molarların eksikliği, sağ mandibular 1-3. molarlar, sol mandibular 2. ve 3. molarların eksikliği ve bilateral maxiller 1. premolarların eksikliği görülüyor. Ayrıca koni şeklinde maxiller lateral kesiciler mevcut. Bu şekil *Cells Tissues Organs* 2009; 189: 80-87' den alınmıştır (99).

Bugüne kadar dominant kalıtmı şiddetli diş agenezisiyle ilişkili *MSX1* ve *PAX9*' da birçok mutasyon bildirilmiştir. *MSX1* ve *PAX9*' da tanımlanmış gen

defektleri arasında delesyon, *nonsense*, *missense* ve çerçeve kayması mutasyonları vardır ve bunlar çoğunlukla DNA bağlanma bölgesinde yerleşmiştir.

2.5.1. *MSX1*

Eskiden *HOX7* olarak adlandırılan *MSX1*, *Drosophila muscle segment homeobox* geniyle ilişkilidir ve homeobox genlerinin altailesinin bir üyesidir. *MSX1*, 60 amino asit uzunluğundaki, DNA'ya bağlanan homeodomaini kodlayan iyi korunmuş homeobox dizisi içerir (100).

MSX1, 4p16.1 bölgesine lokalize, 590 ve 1214 baz çifti (bp) uzunluğunda 2 exondan oluşan bir gendir. DNA'ya bağlanan *homeodomain* içeren ikinci exon, *PAX9* ve *DLX* ailesi gibi diğer odontojenik moleküllerle *MSX1*'in protein-protein etkileşimini kolaylaştırır (95).

Msx1 homozigot delesyon olan farelerde sekonder yarık damak, mandibula ve maxillanın alveolar kemiklerinin eksikliği ve diş gelişiminde bozulma gösterilmiştir (50). *MSX1 homeodomain* bölgesindeki mutasyonlar molar ve premolar dişlerin agenezisi ile yarık damaktan sorumludur.

Bugüne kadar *MSX1* geninde diş agenezisine neden olan 8 farklı mutasyon tanımlanmıştır ve bunların çoğunluğu *homeodomain* bölgesinde lokalizedir. İlk defa 1996'da otozomal dominant diş agenezisi olan geniş bir ailede *MSX1*'in *homeodomain* bölgesinde Arg196Pro *missense* mutasyonu saptanmıştır (4). Bu ailelerde en sık etkilenen dişler ikinci premolar ve üçüncü molarlardır. Literatürde bildirilmiş *MSX1* mutasyonları **Tablo 2.4'** te özetlenmiştir.

MSX1'in *homeodomain* bölgesinde Ser202Stop mutasyonu, diş agenezisi ve tırnak disgenezisi ile karakterize Witkop *tooth-and-nail* sendromu (OMIM #189500) ile ilişkilendirilmiştir (101).

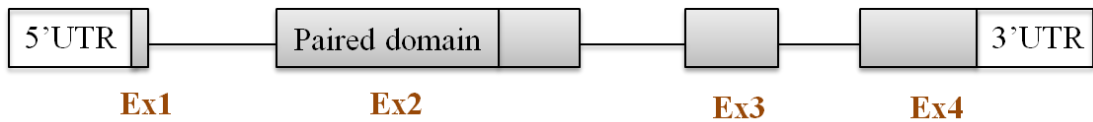
Tablo 2.4. Diş agenezisiyle ilişkili *MSX1* mutasyonları.

Lokalizasyon	Mutasyon	Aminoasit değişikliği	Fenotip	Ref
Exon 1	c.182T>A	M61K	OD izole oligodonti	(8)
Exon 1	c.314C>A	S105X	OD diş agenezisi, izole yarık dudak/damak	(53)
Exon 1	c.62dupG	G22RfsX168	OD oligodonti	(102)
Exon 2 hd	c.559C>T	Q187X	OD oligodonti, yarık dudak/damak	(103)
Exon 2 hd	c.587G>C	R196P	OD diş agenezisi	(4)
Exon 2 hd	c.605C>A	S202X	Witkop sendromu	(101)
Exon 2 hd	c.655G>A	A219T	Otozomal resesif oligodonti	(104)
Tüm gen	4q' da heterozigot delesyon		Oligodonti, Wolf-Hirschhorn sendromu	(105)

Ref: Referans, hd: *homeodomain*

2.5.2. *PAX9*

PAX9, 14q12.13 bölgesine lokalize, 4 exondan oluşan bir gendir (**Şekil 2.8**). 1026 kodlayan baz çifti içerir ve 341 aa' lik bir protein kodlar. *PAX9*, odontogenezin başlangıcı için gerekli olan epiteliyel ve mezenşimal dokular arasındaki etkileşimlere katılan transkripsiyon faktörünü kodlar (75).



Şekil 2.8. *PAX9* geninin şematik görünümü. Kodlayan bölge (gri renkte) toplam 1026 bp uzunluğundadır. Exon 1' de 4 baz çifti vardır ve sadece Metiyonin başlangıç kodonunu kodlar. Exon 2, 3 ve 4 sırasıyla 627, 140 ve 255 bp uzunluğundadır.

PAX9, embriyogenezde anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Pax* gen ailesinin bir üyesidir (106). *Paired box (Pax)* genleri, 128 aa uzunluğunda DNA'ya bağlanan *paired domain* olarak adlandırılan motifin bulunmasıyla karakterize transkripsiyon faktör ailesidir (54, 107). Paired box, ilk defa *Drosophilada* tanımlanmış, korunmuş bir DNA bölgesidir. Memelilerde 4 altgruba ayrılmış 9 farklı *Pax* geni vardır. *Pax* genlerinin embriyonik gelişim ve organogenezde önemli fonksiyonları vardır (54). *Pax* genlerinin böbrek, göz, kulak, burun, ekstremite kasları ve vertebral kolon ve beyin organogenezinde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (106).

Aynı altgrupta bulunan *Pax9* ve *Pax1* genleri homologdur ve tüm omurgalılarda bulunur. Her iki gen de faringeal arkustan oluşan timüs, paratiroid bezler, üstaki borusu ve tonsillerde ekspresyon gösterir. Fakat sadece *Pax9* geni kraniyofasiyel ve diş gelişiminde yer alan nöral krest türevli mezenşimde eksprese olur (107). *Pax9*, fare embriyogenezinde foregut endodermi, somitler, ekstremite mezenşimi, midbrain ve sefalik nöral krest türevlerinde spesifik ekspresyon gösterir (108). Fare embriyolarında *Pax9*, odontogenezin herhangi bir morfolojik bulgusu olmadan mandibular arkus mezenşiminde eksprese olur ve sonrasında gelişmekte olan diş mezenşiminde ekspresyonu devam eder (108).

Bugüne kadar *PAX9* geninde diş agenezisine neden olan 18 farklı mutasyon tanımlanmıştır ve bunların çoğunluğu *paired domain* bölgesinde lokalizedir. İlk defa 2000 yılında otozomal dominant oligodonti olan geniş bir ailede *PAX9*'un *paired domain* bölgesinde 219. nükleotidde Guanin insersiyonu saptanmıştır (14). Etkilenmiş bireylerde daimi molar dişlerin büyük çoğunluğu ile ikinci premolar ve mandibular santral kesicilerin eksikliği mevcuttur. Bugüne kadar literatürde bildirilmiş *PAX9* mutasyonlarının tümü **Tablo 2.5'** te özetlenmiştir. Diş agenezisine neden olan *PAX9* mutasyonları heterozigottur ve genellikle sadece daimi dişleri etkiler.

Tablo 2.5. Nonsendromik konjenital diş agenezisiyle ilişkili *PAX9* mutasyonları.

Exon	Mutasyon	Aminoasit değişikliği	Fenotip	Referans
Exon 1	c.1A>G	M1V	OD Oligodonti	Klein ve ark.(2005) (109)
Exon 2 pd	c.16G>A	G6R	Sporadik Hipodonti	Wang ve ark.(2008) (99)
Exon 2 pd	c.62T>C	L21P	OD Hipodonti/ Oligodonti	Das ve ark.(2003) (110)
Exon 2 pd	c.76C>T	R26W	OD Oligodonti	Lammi ve ark.(2003) (111)
Exon 2 pd	c.83G>C	R28P	OD Oligodonti	Jumlongras ve ark.(2004) (47)
Exon 2 pd	c.128G>A	S43K	OD Hipodonti/ Oligodonti	Wang ve ark.(2008) (99)
Exon 2 pd	c.139C>T	R47W	OD Oligodonti	Zhao ve ark.(2005) (112)
Exon 2 pd	c.151G>A	G51S	Sporadik Oligodonti	Mostowska ve ark.(2003) (113)
Exon 2 pd	c.259A>T	I87F	OD Oligodonti	Kapadia ve ark.(2006) (114)
Exon 2 pd	c.271A>G	K91E	OD Hipodonti/ Oligodonti	Das ve ark.(2003) (110)
Exon 2 pd	c.340A>T	K114X	OD Oligodonti	Nieminen ve ark.(2001) (97)
Exon 2	c.433C>T	Q145X	OD Hipodonti/ Oligodonti	Hansen ve ark. (2007) (115)
Exon 2 pd	c.175_183delGATACAAins288bp	R58fsX177	OD Oligodonti	Das ve ark.(2003) (110)
Exon 2 pd	c.108_109insG	I37fsX41	OD Oligodonti	Zhao ve ark.(2005) (116)
Exon 2 pd	c.218_219insG	G73fsX316	OD Hipodonti/ Oligodonti	Stockton ve ark.(2000) (14)
Exon 2	c.619_621delATCins24bp	I207fsX211	OD Oligodonti	Mostowska ve ark.(2006) (117)
Exon 4	c.792_793insC	A264fsX315	OD Oligodonti	Frazier-Bowers ve ark.(2002) (118)
Tüm gen delesyonu	44-100 kb delesyon	Heterozigot delesyon	Süt ve daimi dişlerde şiddetli oligodonti	Das ve ark.(2002) (98)

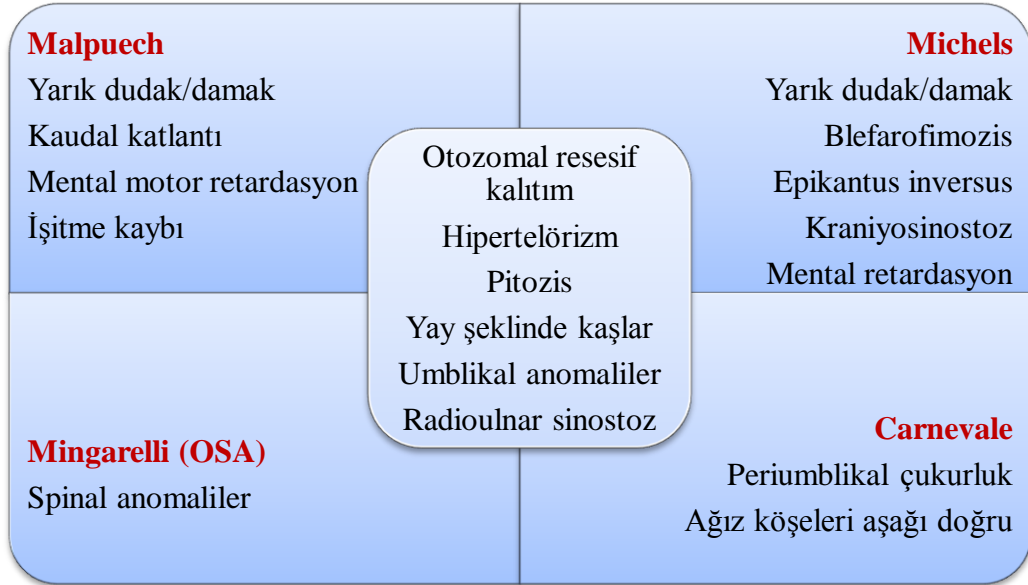
pd: *paired domain*

Peters ve ark.'nın yaptığı hayvan modellerinde homozigot *Pax9*-mutant farenin doğumdan kısa bir süre sonra öldüğü ve birçok gelişimsel defektin buna eşlik ettiği gösterilmiştir. Bunlar arasında 3. ve 4. faringeal arkuslardan oluşan timus ve paratiroid bezin yokluğu, yarık damak ve diş eksikliği gibi kraniyofasiyel anomalilerle birlikte ekstremite anomalileri bulunmaktadır (54). Homozigot *Pax9*-mutant fare embryolarında diş gelişiminin tomurcuklanma evresinde durduğu, heterozigotların ise etkilenmediği gösterilmiştir (54).

2.6. Carnevale Sendromu

Diş eksikliği malformasyonunun yüklülük gösterdiği ailede bazı bireylerde diş anomalileri ile birliktelik gösteren dismorfik bulgular saptanmıştır. Klinik değerlendirme bu bireylerin 3MC Sendromu olarak bilinen bir malformasyon grubuna ait olan Carnevale sendromuna uygunluğunu düşündürdüğünden bu spektrumun özellikleri bu bölümde tanıtılmaktadır.

Carnevale sendromu, ilk defa Carnevale ve ark. tarafından 1989 yılında anne-babası akraba olan, palpebral aralıkları aşağı doğru, göz kapaklarında pitozis, hipertelörizm, gelişme geriliği, radioulnar sinostoz ve periumblikal çukurluk bulguları olan iki erkek kardeşte tanımlanmıştır (119). Titomanlio ve ark. Carnevale, Michels, Oculo-Skeletal-Abdominal (OSA, Mingarelli) ve Malpuech sendromlarının aynı hastalık spektrumunun farklı ekspresyonları olduğunu ileri sürmüş ve bu antitenin “3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale) Sendromu” olarak isimlendirilmesini önermiştir (120). Bu hastalıkların ortak ve farklı klinik bulguları **Şekil 2.9**'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9. 3MC sendromu spektrumundaki hastalıkların ortak özellikleri ortadaki kutucukta, birbirinden farklı özellikleri ise köşelerdeki kutucuklarda gösterilmiştir.

3MC sendromu spektrumundaki sendromların başlıca özellikleri arasında %70-95' inde hipertelörizm, blafaropitozis ve kavisli kaşlar gibi fasiyel dismorfik özelliklerin bulunması vardır. Vakaların %40-60' ında yarık dudak/damak, postnatal büyüme geriliği, kognitif bozukluk ve işitme kaybı bildirilmiştir. %20-30' unda ise kraniyosinostoz, radioulnar sinostoz, genital ve vezikorenal anomaliler görülebilir. Nadiren de kaudal katlantı, umblikal anomaliler, omfalosel ve diastazis rekti görülebilir. Hepsi de otozomal resesif kalıtılır. Bugüne kadar 20 ailede 32 vaka tanımlanmıştır (121).

Sorumlu genler yakın zamana kadar bilinmiyordu. Gelişen yeni tekniklerle bu hastalıklardan sorumlu genler bulundu. İlk olarak Sırmacı ve ark. Kasım 2010' da Türkiye' den iki ailede tüm exom sekanslama yöntemiyle *MASPI* (Mannan-bağlayan lektin-ilişkili serin proteaz 1) geninde 2 farklı mutasyon tanımladılar (122). Bunlar *MASP-1* izoform 2 (diğer adıyla *MASP-3*)' de p.G687R *missense* mutasyon ve *MASP-1*' de p.W290X *nonsense* mutasyondur.

Kısa bir süre sonra da Rooryck ve ark., 3MC sendromunda lektin kompleman yolağında rol alan genlerden *COLEC11* ve *MASPI*' in mutasyona uğradığını göstermiştir (121). *MASPI*, 3q27-q28' de lokalizedir ve mannan-bağlayan serin proteaz 1' i kodlar (MIM 600521). MASP-1 proteini, mannoz-bağlayan lektine (MBL) bağlanarak kompleman sistemini aktive eden serin proteazdır. *COLEC11* (MIM 612502), 2p25.3' te lokalizedir ve C tipi lektin kollektin ailesinin bir üyesi olan CL-K1' i kodlar. CL-K1 proteini kollajen-benzeri *domain* ve karbonhidrat-tanımaya *domaini* içerir ve konak (*host*) defansında rol oynar (123). Karbonhidrat tanımaya *domaini*, kollektin ailesinin diğer bir üyesi ve serum proteini olan MBL' ye benzer ve çeşitli ligandlara bağlanarak opsonizasyon ve kompleman kaskadının aktivasyonunu sağlayarak, neticede hücrenin parçalanması için “membran atak kompleksi” ni oluşturur. CL-K1, MBL gibi lektin kompleman yolağında etki gösterebilir (121).

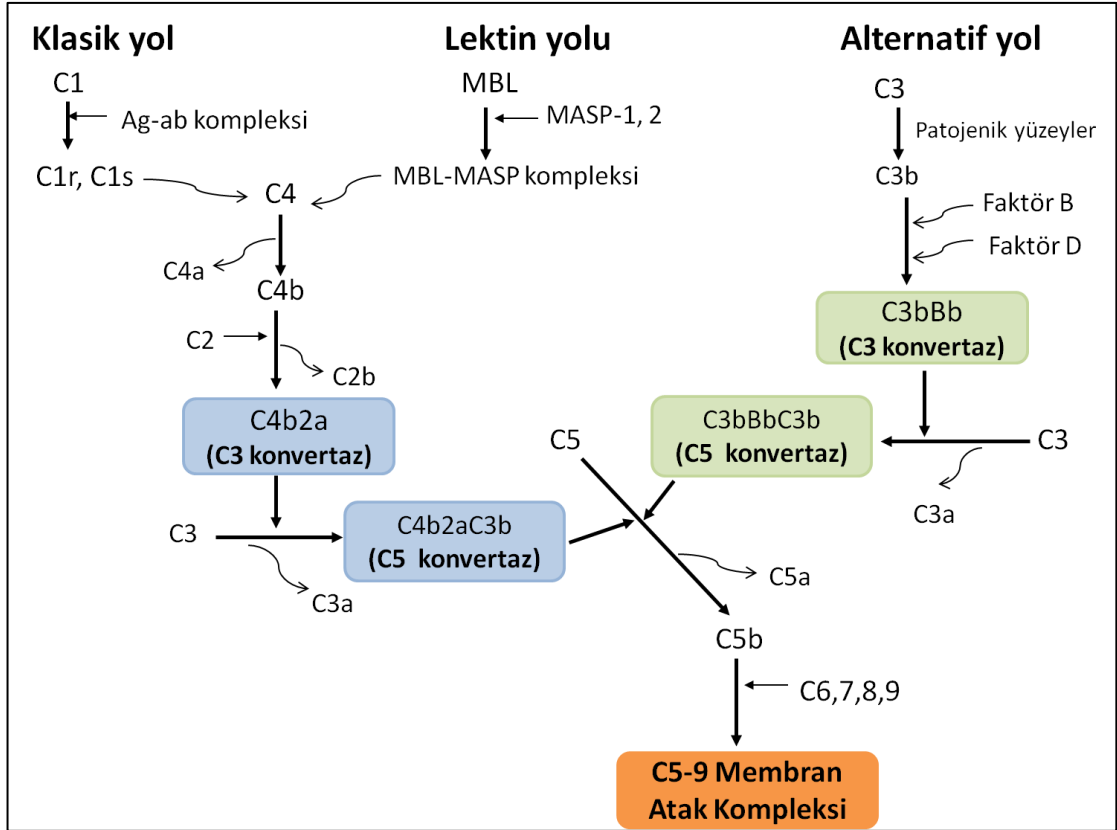
2.7. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi, doğuştan gelen (*innate*) immünitinin önemli bir efektör mekanizmasıdır. Konağın mikroorganizmalara karşı savunmasında önemli rolleri olan 30 kadar plazma proteini içerir. Bu sistemin ana bileşenleri dolaşımda “zimojen” olarak bulunan serin proteazlardır. Kompleman aktivasyonu bu proteazlar birbirlerini ardarda (kaskad benzeri yolla) aktive eder (124) (**Şekil 2.10**).

Kompleman sisteminin aktive olabilmesi için klasik, alternatif ve lektin olmak üzere 3 türlü yolak vardır. Klasik yolağın aktivasyonu için antikor gereklidir. Alternatif ve lektin yolaklarının aktivasyonu ise antikora bağımlı değildir. Klasik ve lektin yolaklarında tanıma molekülleri sırasıyla antijene bağlı İmmünglobülin izotoplarına ve mikroorganizmaların yüzeyindeki mannoz gruplarına bağlanır. Bu bağlanmanın üzerine tanıma molekülü-ilişkili serin proteazlar aktive olur ve proteolitik kaskadı başlatırlar (124)

Klasik yolak, kompleman C1' in antijen-immünglobulin kompleksiyle etkileşimi sonucunda aktive olur. Antijen-antikor kompleksine C1r ve C1s serin

proteazlarının bağlanmasıyla C1 kompleksi oluşur. Aktive olan C1s, C4 ve C2' yi fragmanlarına ayırarak C3-konvertazı (C4b2a) oluşturur (124).



Şekil 2.10. Kompleman sisteminin aktivasyonu.

Lektin yolağı, yapısal ve fonksiyonel olarak klasik yolağa benzer. Lektin yolağında C1q yerine mikroorganizmaların yüzeyindeki karbonhidratları tanıyan MBL (mannoz bağlayan lektin) ve fikolinler (M-, L- ve H-fikolin) olmak üzere 4 çeşit molekül vardır (124). MBL' nin patojen yüzeyindeki mannoz kalıntılarına bağlanması MASP-1, MASP-2 ve MASP-3 olarak adlandırılan MBL-ilişkili serin proteazları aktive eder (125). MASP-1 ve MASP-3, *MASP1* geni tarafından kodlanan homolog proteazlardır. MASP-2' yi ise *MASP2* geni kodlar (126).

MASP proteinleri, klasik yolakta rol alan C1r ve C1s' ye homologdur. MBL veya fikolin molekülüyle MASP-2' nin oluşturduğu başlangıç kompleksi kompleman

kaskadını başlatır. MASP-2, klasik yolaktaki C1s gibi C4 ve C2' yi fragmanlarına ayırarak C3 konvertazı (C4b2a) oluşturur (125). MASP-3' ün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan araştırmalarda MASP-1' in de C2' yi ayırarak MASP-2 ile birlikte C3 konvertazı oluşturduğu ve lektin yolağının aktivasyonunda rol oynadığı düşünölmektedir (127)

Kompleman sisteminin aktivasyonunda her üç yolakta da C3' ün aktivasyonu önemli bir basamaktır. Kompleman C3' ün aktivasyonu inflamatuvar cevabı başlatır ve C5-C9 komplemanlarının aktif hale gelmesiyle “membran atak kompleksi” oluşur (125).

BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Aile Paneli ve Klinik İncelemeler

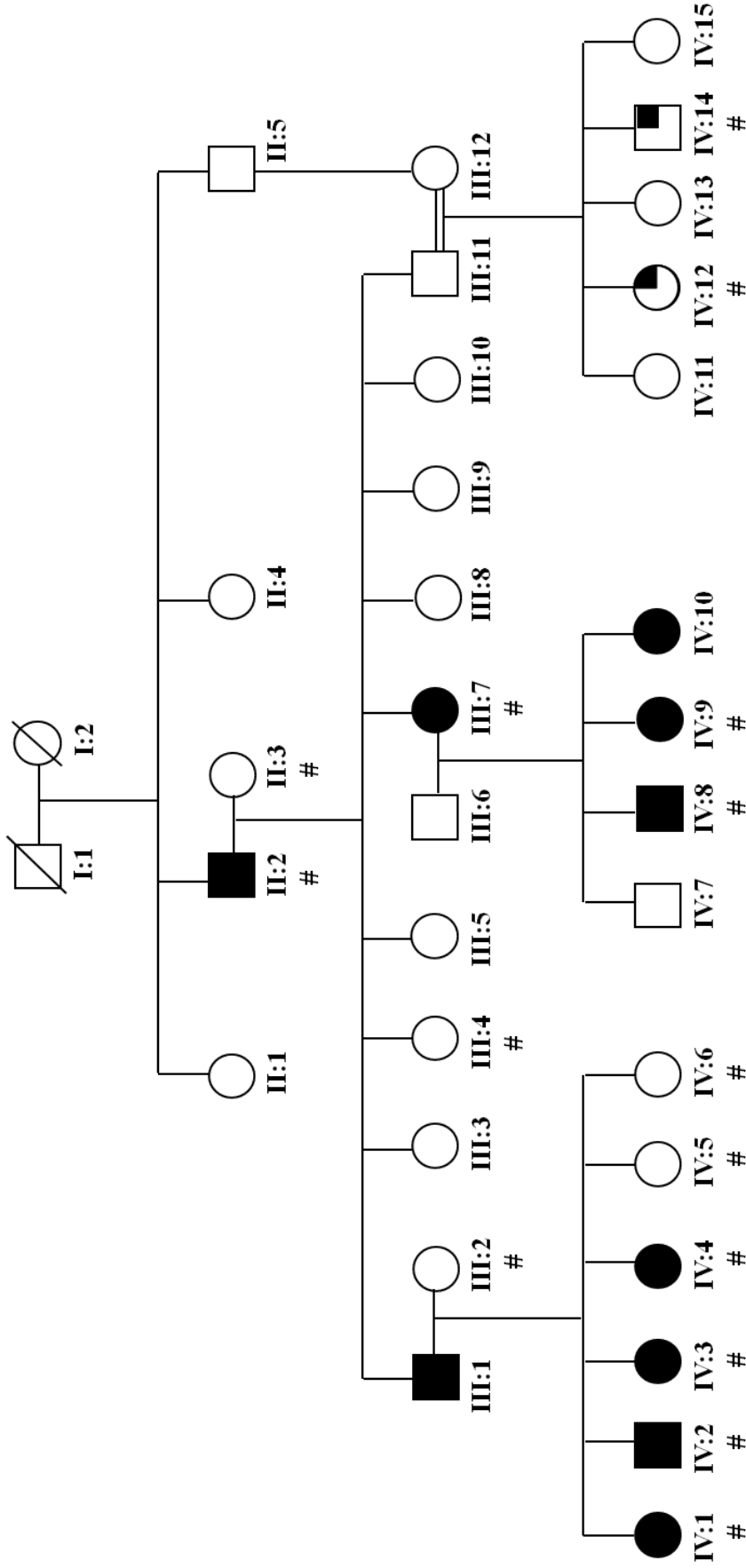
Bu çalışmaya konu olan aile Hatay ili Samandağı ilçesine yapılan saha çalışması sırasında saptandı. Hacettepe Üniversitesi Kraniyomaksillofasiyal Cerrahi konseyi tarafından izlenen bir ailede farklı aile bireylerinde Crouzon sendromu, nistagmus, konjenital diş agenezisi ve prognatizm birlikteliği gözlenmesi üzerine bölgeye saha gezisi düzenlendi. Detaylı pedigr analizi ve takibinde yapılan moleküler analizler birbiri ile ilişkili olabilecek bu malformasyonların farklı genetik temellere dayanan hastalıkların bölgede yoğunlaşması sonucunda ortaya çıktığını kanıtladı. Nistagmus fenotipinin X' e bağlı dominant, Crouzon sendromlu bireylerin otozomal resesif ve konjenital diş eksikliği gösteren aile kolunun da otozomal dominant kalıtım kalıbı özellikleri gösterdiği saptandı. Aileler ayrı ayrı analize alındı. Konjenital diş eksikliği gösteren aile bu tez çalışmasına eklendi.

Konjenital diş eksikliği ailesinden toplam 29 birey saha koşullarında muayene edildi ve fotoğrafları çekildi. Ailenin eksik bireyleriyle alakalı sözel bilgi alındı. Aile hakkında bilgisi iyi olan yakınların yardımıyla aile ağacı (pedigr) oluşturuldu (**Şekil 3.1**). Toplam iki bireye (**Şekil 3.1**, IV-2 ve IV-9 numaralı bireyler) panoramik film çekildi. Diş anomalileri ile birlikte dismorfik bulguların gözlendiği iki aile bireyinden IV-12 numaralı bireyde el-bilek ve dirsek grafileri de tamamlandı.

Proje, Avrupa Birliği 6. Çerçeve ERANET Programı, E-RARE Konsorsiyumu tarafından desteklenen ve TÜBİTAK tarafından fonlanması yapılan TÜBİTAK 108S420 numaralı proje ile desteklenmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 26/02/2009 tarihli TBK 09/4-42 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. Kalıtım Tipinin Belirlenmesi

Pedigrden, otozomal dominant kalıtım gösterdiği düşünüldü.



Şekil 3.1. Pedigri.

□ ○ : Normal

■ ● : Diş agenesi olan bireyler

◻ ◯ : Diş anomaliyle birlikte dismorfik olan bireyler

#: Çip analizi yapılan bireyler

3.3. Genomik DNA İzolasyonu

Pedigri oluşturulduktan sonra normal ve etkilenmiş olan aile bireylerinden onayları alınarak EDTA'lı tüplere 5-10 cc kan alındı. Kendilerine ulaşamadığımız sadece 2 kişiden kan alınamadı. DNA izolasyonu amonyum asetat tuzuyla çöktürme yöntemiyle ya da ticari olarak elde edilen kitlerle yapılabilir. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Genetik Laboratuvarı'nda, alınan kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.

Tuzla çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu:

- a. 10 cc'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne boşaltılır. Otoklavlanmış soğuk distile su ile 50 ml'ye tamamlanır ve elde kuvvetlice çalkalanır.
- b. Tüpler 20 dk 1750 rpm' de santrifüjlendikten sonra süpernatant dökülür ve peletin üzerine tekrar otoklavlanmış soğuk distile su eklenerek 45 ml'ye tamamlanır. Dipteki pelet çalkalanarak çözündürülür ve 1900 rpm' de 20 dk santrifüj edilir.
- c. Süpernatant döküldükten sonra tüpe 3 ml *Nuclei lysis buffer* (NLB), 150 µl Proteinaz-K ve 200 µl %10' luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) solüsyonları eklenir.
- d. Vorteksle karıştırıldıktan sonra tüpler 16 saat süreyle 37°C etüvde bekletilir.
- e. Tüpleri etüvden çıkardıktan sonra 3 ml amonyum asetat eklenir ve kuvvetlice çalkalanır.
- f. Oda sıcaklığında 20 dk bekletilir.
- g. 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilir. İçinde DNA bulunan süpernatant pastör pipetiyle dipteki pelete dokunmadan ikinci bir falkon tüpüne alınır ve üzerine aynı miktarda alkol eklenir.
- h. Tüp elde çalkalanır. Alkol eklenmesiyle gözle görünür hale gelen DNA yumağı pipet ucuyla toplanarak, içinde 400 µl TE Buffer (tampon çözeltisi) bulunan ependorfa aktarılır. DNA, çözünmesi için bir gece daha etüvde bekletildikten sonra -20 °C' deki derin donduruculara kaldırılır.

3.4. DNA' nın Niteliksel ve Niceliksel Analizi

PCR aşamasında elde edilen DNA'dan reaksiyon başına yaklaşık olarak 40–100 ng kullanılır. DNA konsantrasyonu ve elde edilen DNA'nın temizliği

spektrofotometre kullanılarak değerlendirilir. Bu amaçla 260/280 absorbans değerlerinin ölçülebildiği bir UV spektrofotometreye ihtiyaç duyulmaktadır. DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmektedir. Optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml' ye karşılık gelmektedir.

DNA'nın temizliği için $A_{260/280}$ ve $A_{260/230}$ değerlerine bakılmaktadır. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230 nm dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır. Temiz bir DNA' da $A_{260/280}$ oranı 1,8 ile 2,0 arasında; $A_{260/230}$ oranı ise 2' den büyük olmalıdır. 1,8' in altında elde edilen $A_{260/280}$ değeri protein kontaminasyonunu, 2' nin üzerinde elde edilen $A_{260/280}$ değeri de RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir. PCR yönteminde ne kadar saf ve yüksek molekül ağırlıklı DNA izole edilebilirse bantların belirginliği ve üretilebilirliği o derece artmaktadır.

Genomik DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü için laboratuvarımızda bulunan NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Genomik DNA'nın bütünlüğünün ve moleküler ağırlığının değerlendirilmesi için agaroz jel elektroforezi kullanıldı.

3.5. Gen Haritalaması

Genetik etiyolojili hastalıklarda sorumlu genin araştırılmasında birtakım metodlar uygulanmaktadır. Gen haritalaması, genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin (lokus) gösterilmesidir. Sitogenetik haritalama, genetik haritalama ve fiziksel haritalama olmak üzere temelde üç tip gen haritası vardır.

Genetik haritalama, kromozomal yeri bilinen polimorfik özellikte bir genetik belirleyici (markır) kullanılarak, hastalık geninin polimorfik DNA markırına olan uzaklığının istatistiksel olarak saptanması esasına dayanır. Metod, en genel anlamı ile lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonu bilinen bir markırın kuşaklar arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi esasına dayanır. Bunun için aile bireylerinin

fenotipleri kesin olarak tanımlanmalı ve kalıtım kalıbı belirlenmelidir. Eğer iki gen lokusu, yani markır ve hastalık lokusu, birbirlerine çok yakınsa mayoz sırasında birlikte kalıtılma şansları yüksek olacaktır. Haritalamada amaç hastalık geni ile hiç rekombinasyon göstermeyen polimorfik markırların bulunduğu parçayı tespit etmektir (128).

Gen haritalamada kullanılacak metodlar iki ana gruba ayrılır.

a. Parametrik metodlar: *Linkage* (Bağlantı) analizi olarak bilinir. Genlerin lokalizasyonu ve fonksiyonlarını ilişkilendirmek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. *Linkage* analizinin başarılı olabilmesi için:

- Kalıtım kalıbı kesin olarak bilinmelidir,
- Üç kuşaklı geniş ailelere ihtiyaç vardır,
- Etkilenmiş bireylerden olduğu kadar normal bireylerden de örnek alınması gereklidir.

Analizler kalıtım kalıbı varsayımlarından etkilenir. Hasta ve normal bireylerin doğru saptanması analiz sonuçlarını direkt etkiler.

b. Non-parametrik metodlar (Asosiasyon çalışmaları): Kalıtım kalıbı tam olarak tahmin edilemediği durumlarda kullanılır. Burada hastalığın ortaya çıkmasında etkili olabilecek aday genler belirlenir ve bu bölgelerde yer alan polimorfik markırlar saptanır. Daha sonra polimorfizm ile hastalık aleli arasında ilişki olup olmadığına bakılır. *Linkage* analizine göre avantajları:

- Kalıtım kalıbının bilinmesine gerek yoktur,
- Ailelerden çok vaka ve kontrollerin toplanması gerekmektedir.

Dezavantajları:

- Örnek sayısı çok fazla olmalıdır,
- Özellikle kontrol grubunun oluşturulmasında çok dikkatli olunmalıdır.

Bu çalışmada üç kuşaklı ve kalıtım kalıbı bilinen bir ailede sorumlu genin araştırılması için parametrik *linkage* analizi yapıldı.

Gen haritalamasında başlıca iki yol vardır:

i. Aday lokalizasyon yaklaşımı: Mevcut durumla alakalı aday genler belirlenir ve bu genlerin hangi kromozom bölgelerinde bulunduğu saptanır. Bu bölgelere sıkı bağlantı gösteren markırlar öncelikli olarak test edilir. Aday bölgeler tarandıktan sonra herhangi bir lokalizasyon saptanamazsa tüm genom taramasına geçilir.

ii. Genom-boyu (*Genome-wide*) tarama: Burada hastalığın hangi kromozomda ya da hangi aday gen ile ilişkili olacağına dair bir öngörü yoktur.

Günümüzde genom-boyu analiz yöntemlerinin gelişmesi, çok sayıda polimorfik markırın DNA çipleri aracılığıyla tek seferde genotiplenmesi sonucu genom-boyu analizler, aday lokalizasyon yaklaşımının yerini almıştır. Genom-boyu analiz ve ardından uygun bağlantı (*linkage*) analizinin aday lokalizasyon yaklaşımına en büyük üstünlüğü, tüm genoma ait genotip ve haplotip bilgisi elde edebildiği için çalışılan ailenin kaç farklı bölgeye olası bağlantı gösterdiğinin anlaşılabilmesidir.

Bağlantı analizi bir olasılık tahmini olduğu için genomda tek bir bölgeye bağlantı yakalanabilmesi ve diğer bölgelerin dışlanması hastalık geninin kesin lokalizasyonunu belirleyen çok güçlü bir delildir. Genom bilgisi burada sunulan ailede gözlenen karıştırıcı faktörlerin aydınlatılmasına da yarar. Bu çalışmada izlenen ailede bazı bireylerde sadece konjenital diş eksikliği gözlenirken bazı bireylerde ise diş anomalileri ile birlikte dismorfik bulgular da saptanmıştır. Genom boyu analiz aile içi farklı varyasyon gösteren bireylerin aynı gen bölgesini ilgili kalıtım kalıbı varsayımı altında kalıtıp kalıtmadığının da kesin olarak belirlenmesine yardım eder.

3.5.1. Bağlantı (*Linkage*) Analizi

Bağlantı (*Linkage*) analizi, iki genin bir nesilden diğerine aktarılırken bağlantı gösterip göstermediklerini saptamak için aile çalışmalarını kullanan bir gen haritalama metodudur (129). Haritalama çalışmalarında en sık kullanılan methodur. Bağlantı analizinde bir ailede markır ve hastalığın birlikte segregasyonuna bakılır ve

ölçüm yapılır. Markır ve hastalık lokusu aynı kromozomda birbirine yakın olursa mayozda aralarında rekombinasyon olma şansı düşük olur.

Rekombinasyon, mayoz sırasında eş kromozomlar arasındaki parça değişimidir. İki lokusun birbirine olan uzaklığı ne kadar fazla ise mayoz sırasında yer değiştirme ihtimali de o kadar fazladır. Bağlantı analizinde farklı lokusların birbirlerine olan yakınlıklarını ölçmek için rekombinasyon sıklığı kullanılır. Rekombinasyon sıklığı ne kadar küçükse iki lokus birbirine o kadar yakındır. Rekombinasyon sıklığı θ (teta) ile ifade edilir ve 0 ile 0,5 arasında bir değerdir. İki lokus birbirine çok yakınsa yani $\theta = 0$ ise tam bağlantı olduğunu, birbirinden uzaksa, $\theta = 0,5$ ise aralarında bağlantı olmadığı anlamına gelir (129).

Rekombinasyon birimi *centiMorgan* (cM) ile ifade edilir. 1 cM her 100 bireyden en az birinde rekombinasyon olduğunu göstergesidir (129). Genetik uzaklıklar, fiziksel anlamda ölçülebilir uzaklıklar değildir. Teorik olarak iki lokus arasında 1 cM'lık bir uzaklıktan söz edildiği zaman, yaklaşık olarak 1 milyon baz çiftinden söz ediliyor demektir (128).

Bağlantı analizi için LOD skor analizi uygulanır. LOD (*Logarithm of Odds*) skoru, hastalık aleli ile markır aleli arasında bağlantı olma olasılığının, bağlantı olmaması olasılığına oranının logaritmik değerinde ifade biçimidir. Diğer bir ifadeyle aranan genin, test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının ilgili lokusta bulunmaması olasılığına oranıdır. Örneğin sonucun 3 olması demek bu iki gen arasında bağlantı olma ihtimalinin olmama ihtimalinden $10^3 = 1000$ kez daha fazla olduğunu ifade eder. Sonuçta çıkan değer arttıkça lokalizasyonun saptanma olasılığı da artacaktır. LOD skor 3 ve üstü olan değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilir.

LOD Skor analizleri hastalık ile tek bir DNA markırının olası ilişkisinin test edildiği “Tek noktalı (Singlepoint) bağlantı” analizi ve ardışık sıralanmış bir dizi DNA markır ile hastalık alelinin olası bağlantısının test edildiği “Çok noktalı (multipoint) bağlantı” analizi olarak iki farklı yöntemle hesaplanır. Çok noktalı bağlantı analizi geniş genom verilerinin analizinde haplotip boyunca olası bağlantıyı test edebildiği için daha fazla tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemle

kromozomlara özgü çok noktalı bağlantı grafikleri çizdirilebilir ve kromozomların herhangi bir bölümünde bağlantı gözlenip gözlenmediği görsel olarak kolayca izlenebilir.

LOD skor analizleri için yaygın olarak kullanılan program LINKAGE paket programıdır (130). Daha sonra FASTLINK, GENEHUNTER ve MERLIN gibi paket programlar geliştirilmişse de bu programlar LINKAGE programının giriş dosyaları ile uyumlu çalışırlar. Bütün bu programlarda pedigri verileri, aile bireylerinin birbirleri ile akrabalık ilişkisi, genotip verileri ve bireylerin hasta olup olmadıkları bilgisinin yer aldığı pedigri dosyası ve analizlerde kullanılacak parametrelerin (gen frekansı, markır alel frekansı, genotip-fenotip matrisi, penetrans ya da fenokopi bilgileri) eklendiği parametre dosyaları bulunması gereklidir. Bu çalışmada MERLIN programı kullanılarak çok noktalı LOD skor analizleri yapılmış ve tüm kromozomlara ait grafikler çizdirilerek LOD skor pozitif olarak gözlenen bölgeler haplotip analizine alınmıştır. Analizler otozomal dominant kalıtım modeli varsayımı altında tamamlanmıştır.

Ailedeki yoğun akrabalık ilişkileri de göz önüne alınarak genom-boyu çip analizi verileri homozigotluk haritalaması yapılarak da değerlendirilmiştir. Bu analiz için Visual Genome Studio (VIGENOS) programı kullanılmış, genom boyu haplotip blokları belirlenmiştir (**Şekil 3.2**). Genom boyu genotip bilgileri 16 pixel görüntüde açıkça izlenirken 1 pixel görünüm genomdaki haplotip bloklarının hızlıca taranması için kullanılmıştır. Her bir kromozom ayrı ayrı incelenmiş hasta bireylerde çakışma gösteren büyük haploip blokları (yaklaşık 5-10 Mb) anlamlı kabul edilmiştir. Bu analiz otozomal dominant kalıtım kalıbı düşündüğümüz konjenital diş eksikliği gösteren bireylerde resesif kalıtımı tamamen dışlarken dismorfik bulgular gözlediğimiz bireylerde üç kromozom bölgesinde anlamlı olabilecek sonuç vermiştir (**Şekil 4.10**).

VIGENOS programı bağlantı analizine giriş dosyalarını oluşturmak amacı ile de kullanılmıştır. VIGENOS programını geliştiren HEMOSOFT şirketi, Hacettepe Üniversitesi Teknopark bünyesinde faaliyet gösteren bir araştırma şirkettir.

İndeks	Kromozom no	Lokalizasyon	Pozisyon	SNP no	Baba	Anne	IV-12	IV-14	16 pixel/ markır
1	18	0.3624	210341	SNP_A-2057202	AA	AB	AA	AA	
2	18	0.3705	215051	SNP_A-2139230	AB	BB	AA	AA	
3	18	0.5876	341114	SNP_A-1876275	NC	AB	AA	AA	
4	18	0.5902	342577	SNP_A-2084777	AB	NC	AA	AA	
5	18	0.5962	346095	SNP_A-1781906	AB	AB	AA	AA	

İndeks	Kromozom no	Lokalizasyon	Pozisyon		Baba	Anne	IV-12	IV-14	1 pixel/ markır
1	18	0.3624	210341						
17	18	0.9013	523191						
33	18	1.4731	675447						
49	18	1.9996	922503						
65	18	3.0267	1404472						

Şekil 3.2. Genom boyu genotip bilgilerinin izlendiği ve haplotip analizinin tamamlandığı VIGENOS programı görüntüsü. Çip verilerinden elde edilen tüm genotip bilgileri VIGENOS programına aktarılmıştır. Veriler 1 ve 16 pixel olmak üzere iki farklı rezolüsyonda değerlendirilmiştir.

Bir pixel görüntü: Her satır 1 markıra karşılık gelir. Bu, sıkıştırılmış görüntüdür. Bu sayede geniş bloklar görülebilir. Heterozigot genotipler (AB) turuncu, hastalıkla ilişkili homozigot genotipler (AA) mavi, ilişkili olmayan homozigot genotipler (BB) beyaz ile gösterildi. Gri alanlar, sinyal alınamayan bölgelerdir (*No-call*).

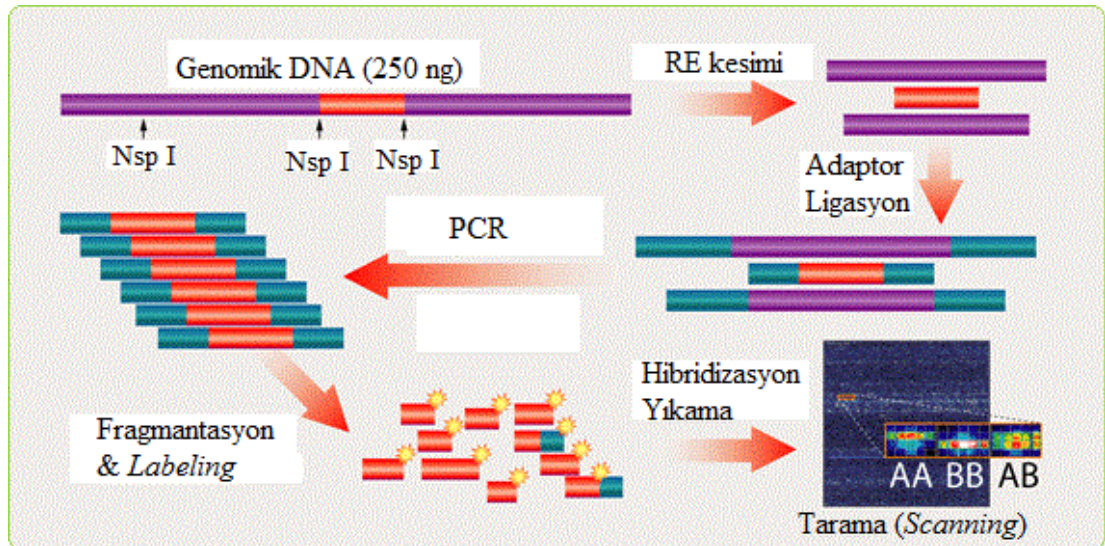
16 pixel görüntü: Her markır 16 pixel yüksekliğinde bir satırla gösterilir. Bütün markır detayları ve SNP numaraları görünür haldedir.

3.6. SNP Microarray (Çip, Mikrodizin) Analizi

Genomda polimorfik özellik gösteren tek nükleotid (*single nucleotide polymorphism*; SNP) değişiklikleri mevcuttur. SNP Çip analizi yöntemi bu tek nükleotid değişikliklerini çip üzerine hibridize etmeye ve bunları floresan yöntemle taramaya dayanır. Belli markır panellerinin kullanıldığı diğer yöntemlere üstünlüğü

genomu daha yüksek çözünürlükte ve daha hızlı tarayabilmesidir. Çalışmada 250.000 tek nükleotid değişikliğini taramaya imkan veren Affymetrix® 250K Nsp çipi kullanılmıştır.

SNP çip analizi, Affymetrix şirketi tarafından sağlanan protokole göre çalışılmıştır (131). Yöntemin esası genomun enzimle kesimi, kesilen uçlara adaptör bağlanması, adaptöre özgü primer ile tüm genomun amplifikasyonu, genomun 50-100 baz çiftlik parçalara ayrılması (fragmentasyon) ve çipler üzerine hibridizasyon işleminden oluşur (**Şekil 3.3**). Hibridizasyon aşamasından sonra çipler bir tarayıcı yardımıyla okunur ve Affymetrix tarafından geliştirilmiş program sayesinde genotiplenir. Genotip bilgileri daha sonra analizin yapılacağı programlara aktarılır.



Şekil 3.3. 250K Nsp SNP çip yönteminin aşamalarının şematik görünümü.

SNP mikrodizin analizi aşağıda anlatıldığı şekilde yapılır.

a. DNA'nın hazırlanması ve kesimi

Periferik kandan elde edilen genomik DNA, konsantrasyonu ölçüldükten sonra EDTA TE tampon çözeltisi kullanılarak 50 ng/μL' ye seyreltilir. DNA örneğinden 5 μL alınır, ependorf tüpüne aktarılır. Buz üzerinde çalışılır. 9,75 μL

deiyonize su, 2 µL NE tampon çözeltisi, 2 µL BSA ve 1 µL Nsp I içeren kesim solüsyonları karışımından 14,75 µL ependorf tüpüne eklenir. Termal *cycler*da 37°C' de 120 dk, 65°C' de 20 dk durduktan sonra 4°C' de beklemeye bırakılır.

b. Ligasyon

Kesim tamamlandıktan 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. Termal *cycler*da 16°C' de 180 dk, 70°C' de 20 dk durduktan sonra 4°C' de beklemeye bırakılır.

c. PCR

Elde edilen kesilmiş ve adaptör ligasyonu yapılmış DNA örnekleri deiyonize su kullanılarak 1/4 oranında seyreltilir. Buz üzerinde 10 µL ligasyon ürününün üzerine 39,5 µL su, 10 µL Taq PCR tamponu, 20 µL GC-Melt, 14 µL dNTP, 4,5 µL PCR primer ve 2 µL Taq polimerazdan oluşan PCR 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 PCR reaksiyonu başlatılır. Elde edilen örnekten 3 µL' lik kısım %2' lik TBE agaroz jelde 120 V' ta bir saat boyunca yürütülür. Jelde yaklaşık 200-1100 bp arasında ürün yığılımının olması beklenir.

d. PCR ürünlerinin pürifikasyonu (saflaştırılması) ve kantifikasyonu

Qiagen MinElute® 96 UF Plate kullanılarak saflaştırma yapılır. Vakum cihazı 800 mbar'a ayarlanır. Her kuyucuğa 32 µL PCR 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 PCR ürünü elde edilir. Saflaştırma sonrasında elde edilmiş olan ürünün kantifikasyonu spektrofotometre ile yapılır. OD ölçümü 90 µg/µL'nin üzerinde ise bir sonraki aşamaya geçilir. 315 µL olan elimizdeki PCR ürününün suyunu uçurmak

için Vacum Drier'da 60°C' de 1,5 saat beklettikten sonra fragmentasyon basamağı için gerekli olan 45 µL ürün elde edilir.

e. Fragmentasyon

Fragmentasyon enziminin konsantrasyonu 2,5 U/µL olduğu için öncelikle 0,05 U/µL'ye seyreltilir. Dilüe edilmiş fragmentasyon enziminden 5 µL, 50 µL pürifiye PCR 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 bp'in altında ürün yığılımının olması beklenir.

f. İşaretleme (*Labeling*)

Elimizdeki 50,5 µL'lik fragmente DNA ile 14 µL TdT tamponu, 2 µL GeneChip® DNA labeling reagent ve 3,5 µL TdT enzimi karıştırılır. Termal *cycler*da 37°C' de 4 saat, 95°C' de 15 dk durduktan sonra 4°C' de beklemeye bırakılır.

g. 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 Fluidics yıkama istasyonuna 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 baloncuk oluşmamasına dikkat edilir. Yıkama işlemi, 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. Arkasından çipler GeneChip Scanner 3000 7G tarayıcısına yerleştirilir. Sonuçlar “.CEL” formatında otomatik olarak dosyalanır. Veri dosyaları daha sonra Genotyping Console yazılımına aktarılır ve “.CHP” dosyası haline çevrilir. Tarama sonucunda mikrodizinden elde edilen SNP sinyal alımı yüzdesi hesaplanır. SNP *Call rate* değerleri %80'in üstündeyse analiz başarılı bir sonuç verir.

3.7. DNA Dizi Analizi

3.7.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR, nükleik asitlerin *in-vitro* olarak (canlı organizma dışında), uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR' ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır.

PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bir PCR döngüsü, sırasıyla, deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon-*annealing*) ve zincirin yeni çift zincirli DNA' lar oluşturacak şekilde uzaması (ekstansiyon) aşamalarından oluşur. Bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Sıcaklık aralıkları genel olarak şu şekildedir:

Denatürasyon: >94°C - 98°C

Annealing: >37°C - 65°C

Ekstansiyon: >72°C

PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA ya da RNA için kullanılabilir. PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-25 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR' ın önemli bir avantajı da çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır.

3.7.1.1. PAX9 Geninin PCR' ı

PCR reaksiyonları GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) termal *cycler* cihazında yapıldı.

PAX9 geninin kodlayan bölgelerinin amplifikasyonu için internette PrimerQuest programı kullanılarak (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Application/Primerquest>) 5 set primer dizayn edildi. Primerler ve *annealing* sıcaklıkları **Tablo 3.1'** de gösterildi.

Tablo 3.1. PAX9 primerleri.

Exon	Primer sekansı	Annealing °C	Bant uzunluğu (bp)
Exon 1F Exon 1R	GCCCACGTTGCTGCTTAGATTGAA AATGGCATCAACAGCCACCCAGTA	55	483
Exon 2a F Exon 2a R	G TTCAGGCGTCAAGACCGATTTCT GTTGCCGATCTTGTGCGCAGAAT	65	710
Exon 2b F Exon 2b R	AGCAAGATCCTGGCGCGATACAA AGACTGTGTGTGGCAAGGAAACCA	65	677
Exon 3 F Exon 3 R	AGGCGTGGGTCAGAGAATTTGGAA AGCTCAGAAAGGGACCCATCACAA	65	463
Exon 4 F Exon 4 R	AGTAGAGTCAGAGCATTGCTGGCT TGAGTCCGTACAGCCAGCTTTCAA	65	505

Exon 1 dışındaki PCR reaksiyonları *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enzimiyle yapıldı. Geneamp® PCR System 9700 termal *cycler* cihazında 94°C' de 5 dk denatürasyon, sonrasında 30 döngü 94°C' de 30 sn, 65°C' de 30 sn ve 72°C' de 30 sn ve son olarak 72°C' de 5 dk uzama basamaklarından oluşan PCR reaksiyonu uygulandı.

Exon 1' in PCR reaksiyonu ise Promega master mix ile yapıldı. Termal *cycler*lerde 94°C' de 5 dk denatürasyon, sonrasında 35 döngü 94°C' de 30 sn, 55°C' de 30 sn ve 72°C' de 30 sn ve son olarak 72°C' de 5 dk uzama basamaklarından oluşan PCR programı uygulandı.

3.7.1.2. MASPI geninin PCR' ı

MASPI PCR için 16 set primer kullanıldı. Primerler, Dr. Bernd Wollnik (Köln Üniversitesi, Almanya) tarafından laboratuvarımıza gönderildi. Primerler ve *annealing* sıcaklıkları **Tablo 3.2'** de gösterildi.

PCR reaksiyonları *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enzimiyle yapıldı. Geneamp® PCR System 9700 termal *cycler* cihazında sadece *annealing* sıcaklıkları farklı olmak üzere 94°C' de 5 dk denatürasyon, sonrasında 30 döngü 94°C' de 30 sn, 54-61°C' de 30 sn ve 72°C' de 40 sn ve son olarak 72°C' de 5 dk uzama basamaklarından oluşan PCR reaksiyonları uygulandı.

PCR' ın ardından elde edilen amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle yapıldı.

Tablo 3.2. *MASPI* primerleri.

Exon	Primer sekansı	Annealing °C	Bant uzunluğu (bp)
Exon 1F Exon1R	GTTGTCAGGTTCTGGGAG AGAAAGCCCCTCACTACCAC	61	395
Exon 2F Exon 2R	GGAAAGCTAATTACGGCAGG CCACCTTGACCTGAATTCATAC	59	499
Exon 3F Exon 3R	TTGTAATGCGTCTTTTCTCAAG TGAATTGCTGGATGGATAGAG	59	529
Exon 4F Exon 4R	GATAATGGCTACCTCTGGGC TCTGCATCTTCATCCATGTG	61	439
Exon 5F Exon 5R	CTAGACATGCGACCTTGAGC CCTGGAATAGATCTAACTAAGATGG	59	540
Exon 6F Exon 6R	CATTTGGTGAATGGTAAGGC CAGCTGCTCAACTGGGAG	55	443
Exon 7F Exon 7R	AGATCCATGCCTCCAATACC GCAGCTAGGAAATTCTGTGC	57	371
Exon 8F Exon 8R	GGTGGAAAATCTCAGTCGAG TTAAATTCCTGCTCCCATCC	57	325
Exon 10F Exon 10R	CATTGCTTTCTGGAATTGTG GTGTGAGTGACACGTTTTGC	57	400
Exon 11F Exon 11R	TGACCATTTGGAGGACTTTG GACCTTTAACCTTTTGAAGACATC	59	344
Exon 13F Exon 13R	GGGATGCTATTATCAGGAAGG TACCGCACTGTGCTTCTG	57	408
Exon 14F Exon 14R	AGGCATGGCCATTTTCAAG AGGTTCTTGACCTCCATC	57	380
Exon 15F Exon 15R	GTGGATGAAGGCAGTGAAAG AAGCAGTTGGTGAGTCAAGC	57	444
Exon 16F Exon 16R	CACCACACCACCTTTCTCTG CTTTCTGGGGTTCAAAGTCC	57	372
Exon 17F Exon 17R	AGATCAAGTCTAAGGTAGACACAGG ACGGCCTTCTCCAGTC	57	359
Exon 18F Exon 18R	CAGAGCTGAGGTTTGGGTC AGTAATGGATAGGCCGAAGG	54	453

3.7.2. Agaroz jel elektroforezi

DNA moleküllerinin analizinde rutin olarak kullanılan basit bir yöntemdir. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerinde hareketine dayanmaktadır. Bu hareketin hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmanlarının ayrılabilmesini sağlamasıdır. UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromür (EtBr) boyasının kullanımı ile çok düşük konsantrasyonlarda (1–10 ng) olsa bile, DNA'nın jel üzerindeki yerini belirlemek mümkündür.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz konsantrasyonu %0,5–4 arasında değiştirilerek jelin por çapı belirlenebilir. Bu şekilde hazırlanan yüksek konsantrasyonlu jeller ile küçük, düşük konsantrasyonlu jeller ile de büyük DNA fragmanlarının en uygun şekilde jelde yürütülmesi sağlanır.

Bant büyüklüklerinin karşılaştırılabilmesi için bant büyüklükleri bilinen bir DNA standardı (DNA *size* markır) jele yüklenir. Ortalama olarak 100-200 V arasında 30 dk yürütülebilmekle birlikte, jelin yürütülme süresi kullanılan elektroforez tankının büyüklüğüne, kullanılan agaroz çeşidine ve analiz edilen bant büyüklüğüne bağlı olarak farklılık gösterebilir. Elektroforez işleminin ardından UV ışık altında görüntüleme sistemi ile bantların değerlendirilmesi yapılır.

3.7.3. PAX9 Geninin Dizilenmesi

PCR ürünlerinin pürifikasyonu, QIAquick PCR pürifikasyon kitiyle (Qiagen, Valencia, CA, USA) üretici firmanın protokolüne göre yapıldı.

PCR 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. Dört exon da *forward* primerler kullanılarak dizilendi. 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.

3.7.4. MASP1 Geninin Dizilenmesi

MASP1 PCR' ları laboratuvarlarımız bünyesinde yapıldıktan sonra DNA dizi analizi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Teknokenti bünyesinde faaliyet gösteren GEN-TR şirketinden hizmet alımı yapılması yolu ile gerçekleştirilmiştir.

3.8. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı ikiye ayırır. İlki Hamilton tarafından keşfedilen Hind III başta olmak üzere, 200 den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan çok sayıda restriksiyon enzimi bulunmuştur. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir. Enzim tanıma bölgesinde oluşan bir değişiklik, bölgenin enzim tarafından tanınmamasına ve kesme işleminin gerçekleşmemesine sebep olur.

RFLP analizinin daha kolay uygulanır olabilmesi açısından seçilen enzim büyük önem taşımaktadır. Seçilen enzimin kesilmek istenilen DNA'yı birden fazla noktada kesmesi sonucu oluşan çok sayıda ve birbirine yakın büyüklükte ki fragmanlar analizi zorlaştırmaktadır. RFLP tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir.

3.8.1. *MspI* ile enzim kesimi

PAX9 geninin 3. exonunu C[^]CGG noktasından kesen *MspI* restriksiyon enzimi kullanılarak enzim kesim reaksiyonu konuldu. C.718G>C değişikliği varsa kesim olacak, ilgili değişiklik yok ise kesim olmayacaktı. Kesim işleminde sonrasında beklenen fragman büyüklükleri sonuçlar bölümünde sayfa 60' ta verilmiştir. 12 µL distile su, 2 µL Buffer (10X) ve 1 µL *MspI* (10U/µL) enzimi kullanılarak 20 µL' lik reaksiyon hazırlandı ve 37°C' de 1 saat inkübasyon yapıldı. Enzim kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde görüntülendi.

3.8.2. *BseMI* ile enzim kesimi

Tek nükleotid değişikliğinin olduğu bölgeden DNA' yı kesecek restriksiyon enzimi FastDigest® *BseMI* (*BsrDI*) (Fermentas) sipariş edildi. Bu enzim doğal tip DNA' yı kesecek, mutant tipi kesmeyecekti. 10,3 µL distile su, 2,0 µL Buffer R (10X) ve 0,2 µL *BseMI* (5U/µL) enzimi kullanılarak 20 µL' lik reaksiyon hazırlandı ve termal *cycler*da 55°C' de 60 dk ve 80 °C' de 20 dk bekletildi. Enzim kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde görüntülendi.

BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Konjenital diş eksikliği ailesi 10 bireyde diş eksikliği, 2 bireyde kompleks malformasyonlar gözlenen toplam 34 bireyden oluşmaktaydı (**Şekil 3.1**). Bunlardan ilk kuşaktaki iki birey çalışmadan çok önce vefat etmişti ve konjenital diş eksikliği bulunup bulunmadığı bilinmiyordu. Geri kalan 32 bireyden 29 tanesine saha koşullarında ulaşılarak muayeneleri tamamlandı. Saha çalışması Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti bölümünden Dt. Soner Kamacı, Kırıkkale Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalından Dr. İbrahim Vargel, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalından Dr. Nurten Akarsu ve Dr. Bilgin Kütükcü tarafından gerçekleştirildi. Aile bireylerinin klinik muayene bulguları **Tablo 4.1**' de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Tüm aile bireylerinin klinik muayene bulguları.

Birey	Yaşı	Diş bulguları	Ek bulgular
II-1	72	Total protez	-
II-2	77	20 yaşından sonra hiç dişi kalmamış, oligodonti, Total protez	-
II-3	69	Yaşına bağlı olarak diş eksikliği	-
II-4	64	Diş eksikliği yok	Dişleri aralıklı ve küçük
II-5	62	Diş eksikliği yok	-
III-1	46	Oligodonti	Sınıf 3 kapanış, Mandibular prognatizm
III-2	40	Diş eksikliği yok	-
III-3	50	Diş eksikliği yok	-
III-4	48	Diş eksikliği yok	Ön açık kapanış, Sınıf 2 maloklüzyon
III-5	42	Diş eksikliği yok	-

Tablo 4.1. Tüm aile bireylerinin klinik muayene bulguları (devamı).

III-6	40	Diş eksikliği yok	-
III-7	36	Diş eksikliği var	-
III-8	41	Diş eksikliği yok	Sınıf 2 kapanış
III-9	34	Diş eksikliği yok	-
III-10	29	Diş eksikliği yok	-
III-11	45	Diş eksikliği yok	-
III-12	40	Diş eksikliği yok	-
IV-2	19	Koni şeklinde sağ üst lateral kesici diş, Hipodonti	Sınıf 3 kapanış, Mandibular prognatizm, Sol kalçada <i>perthes</i> hastalığı, torakal kifoz
IV-3	17	Oligodonti	Sağ kalçada <i>perthes</i> hastalığı
IV-4	16	Oligodonti	-
IV-5	14	Diş eksikliği yok	-
IV-6	9	Diş eksikliği yok	-
IV-7	17	Diş eksikliği yok	-
IV-8	15	Mikrodonti, Hipodonti	-
IV-9	12	Persiste alt santral süt dişi, Oligodonti	-
IV-10	10	Persiste alt santral süt dişi, Oligodonti	-
IV-11	19	Diş eksikliği yok	-
IV-12	17	Sağ üst lateral kesici dişi eksik, sol üst gömülü kanin	Geniş alın, Fasiyel asimetri, Hipertelörizm, Pitozis, Skolyoz, Üst damak dar-yüksek, Opere omfalosel
IV-13	15	Diş eksikliği yok	-
IV-14	13	Sağ üst lateral kesici dişi mikrodontik, sol üst gömülü kanin	Geniş alın, Hipertelörizm, Pitozis, Umbilikal skar
IV-15	12	Diş eksikliği yok	-

Klinik muayeneler sonucunda aile bireylerinde saç, tırnak ve deriyle ilgili herhangi bir bulguya rastlanmadı. Ailede iki birey hariç hiçbirinde yarık dudak/damak veya başka bir kraniyofasiyel bozukluk yoktu. Aralarında akrabalık olan anne-babanın beş çocuğundan ikisinde diş anomalisine ek olarak dismorfik bulgular mevcuttu. Bu iki çocukla alakalı ayrıntılı bilgi ileriki başlıklarda verilecektir. II-2 nolu birey 20' li yaşlarda tüm dişlerini kaybetmiş ve total protezi olduğundan kaç dişinin eksik olduğu tam olarak değerlendirilemedi. II-3 nolu bireyin de protezi olması ve birçok dişinin çekilmiş olması nedeniyle tam değerlendirme yapılamadı.

Ailede konjenital diş eksikliği olan 10 birey bulunmaktadır. IV-1 nolu birey hariç diğerleri muayene edildi. IV-1 nolu bireyin diş eksikliği olduğu sözel olarak öğrenildi.

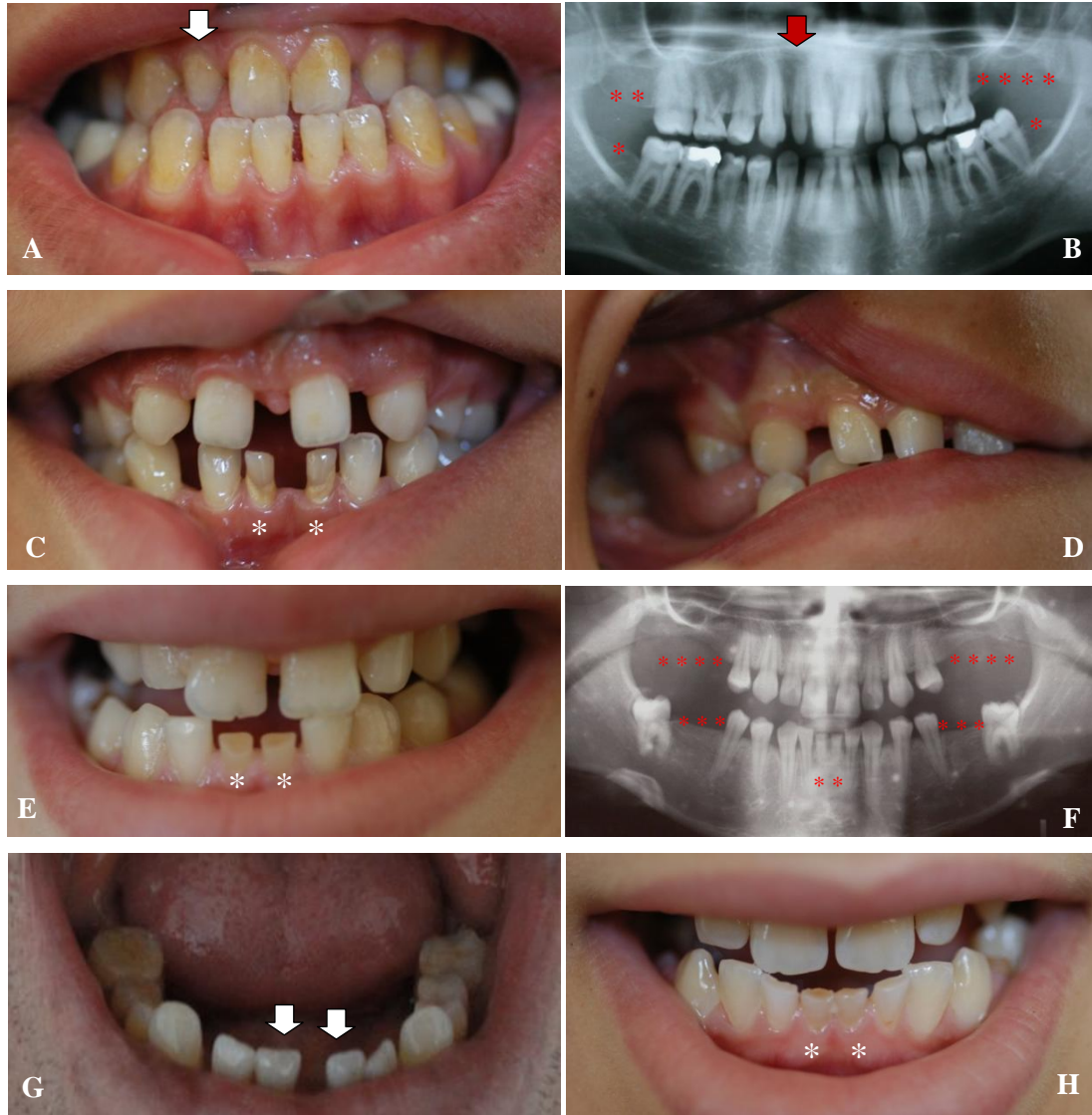
Konjenital diş eksikliği olan aile bireylerinin diş fenotipleri **Tablo 4.2'** de gösterilmektedir. 7 bireyde (II-2, III-1, III-7, IV-3 ve IV-4, IV-9, IV-10) oligodonti, 2 bireyde (IV-2 ve IV-8) hipodonti bulunmaktadır. Oligodontisi olan bireylerin 3. molarlar hariç sırasıyla 28, 6, 13, 12, 12, 14 ve 6 adet daimi diş eksikliği vardır. Hipodontisi olan bireylerin de sırasıyla 5 ve 4 adet daimi diş eksikliği vardır.

Tablo 4.2. Konjenital diş eksikliği olan bireylerin diş fenotipleri.

Birey no	Yaş	Diş no	Sağ								Sol						3.molar dişler hariç eksik diş sayısı		
			molar			premolar		kanin	kesici		kesici		kanin	premolar		molar			
			3	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	3	
II:2	77	Üst	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	28
		Alt	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
III-1	46	Üst	*	*	*											*	*	*	6
		Alt	*	*						m	m						*	*	
III-7	36	Üst	*	*	*	*									*	*	*	*	13
		Alt	*	*	*	*				*	*					*	*	*	
IV:2	19	Üst	*	*		*			k						*	*	*	*	5
		Alt	*															*	
IV:3	17	Üst	*	*	*	*									*	*	*	*	12
		Alt	*	*	*	*									*	*	*	*	
IV:4	16	Üst		*		*			*			*			*		*		12
		Alt		*		*				*	*				*		*		
IV:8	15	Üst		m		*									*				4
		Alt								*	*								
IV:9	12	Üst	*	*	*	*									*	*	*	*	14
		Alt		*	*	*				*	*				*	*	*	*	
IV:10	10	Üst				*									*				6
		Alt			*					*	*					*			

*: Konjenital diş eksikliği, **m**: mikrodonti, **k**: konik kron şekli

Etkilenmiş bireylerin özellikle molar, 2. premolar ve alt santral kesici dişlerinin eksikliği mevcuttur. Bazı bireylerde alt santral kesiciler normalden küçüktür. Bununla birlikte etkilenmiş bireylerin genel olarak dişlerinin aralıklı ve normalden biraz küçük olduğu belirlendi. Bazı bireylerin diş resimleri ve panoramik radyografik görüntüsü **Şekil 4.1**' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. A. IV-2: Üst 2. premolarlar ile 2. ve 3. molarlar eksik. Okla gösterilen sağ üst lateral kesici dişi koni (*peg*) şeklinde. **B.** IV-2 nolu bireyin panoramik radyografik görüntüsü. Eksik olan dişler "*" ile gösterildi.

C. IV-4: Üst lateral kesiciler, alt santral kesiciler ve 2. premolarlar eksik. Persiste alt santral kesici süt dişleri var.

D. IV-3: Alt-üst 2. premolar ve tüm molar dişleri eksik.

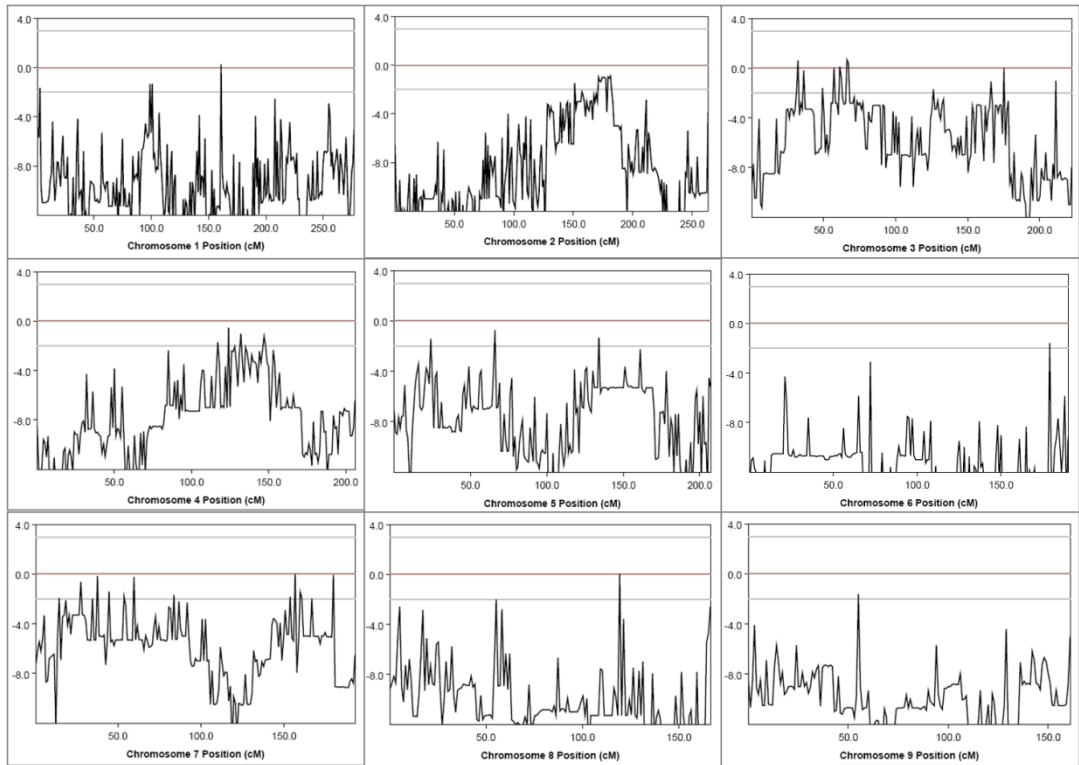
E. IV-9: Daimi alt santral kesicileri eksik, persiste alt santral kesici süt dişleri var. **F.** IV-9 nolu bireyin panoramik radyografik görüntüsü. Bilateral 2. premolarlar ve alt 3. molarlar hariç tüm molar dişleri eksik.

G. III-1: Bilateral 2. ve 3. molarları eksik. Alt santral kesicileri mikrodontik.

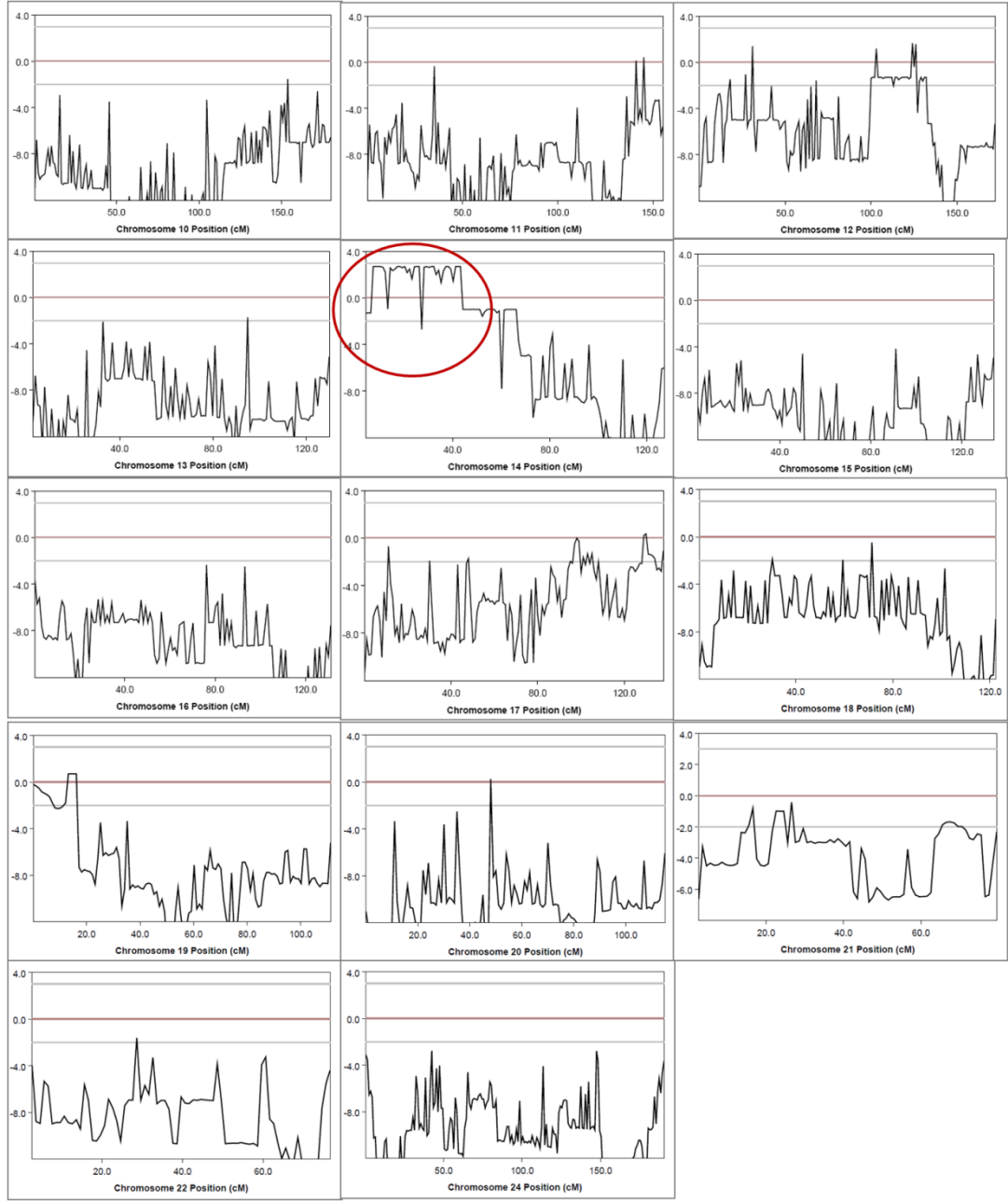
H. IV-10: Daimi alt santral kesicileri eksik. Persiste alt santral kesici süt dişleri var.

4.2. Laboratuvar Bulguları

Aileden 13 kişiye Affymetrix şirketinin protokolüne göre 250K SNP çiple genom boyu bağlantı analizi yapıldı. Tarayıcıdan çıkan verilerle Merlin programı kullanılarak LOD skoru hesaplandı. LOD skor analiz sonuçları MERLIN programından elde edilen grafiklerle **Şekil 4.2'** de gösterildi.



Şekil 4.2. Merlin programı çok noktalı bağlantı (*multipoint linkage*) analizi sonuçları (Devamı arka sayfada).

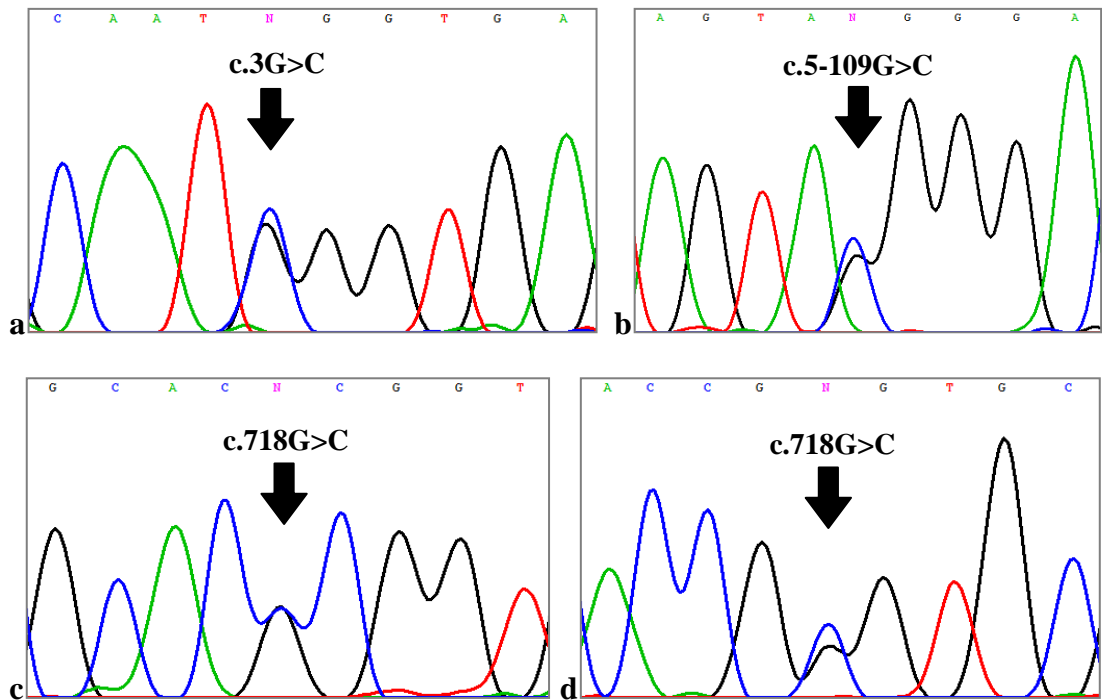


Şekil 4.2. Merlin programı çok noktali bağlantı (*multipoint linkage*) analizi sonuçları. X aksı cM cinsinden rekombinasyon fraksiyonu değerlerini göstererek kromozom boyunca genetik pozisyonu belirlemektedir. Y aksında ise lokalizasyon skorları (LOD; *logarithm of odds ratio*) yer almaktadır. Pozitif lod skorlar (0.0 hattının üzerinde kalan bölgeler) sadece 14 numaralı kromozomda gözlenmiş ve şekil üzerinde daire içinde işaretlenmiştir.

Otozomal dominant kalıtım kalıbı ve tam penetrans varsayımı altında 14q11-q21 bölgesinde çok noktalı LOD skor analizi ile pozitif lod skorlar saptandı. Maksimum lod skor 2.696 olacak şekilde telomerik bölgede yaklaşık 40 cM'lık bir alanda pozitif lod skorlar alındı. Bunun dışında herhangi bir kromozom bölgesinde pozitif lod skor saptanmadığı için 14q11-q21 bölgesi bu malformasyondan sorumlu gen lokalizasyonu olarak kabul edildi. Bu bölgede dış agenezisine neden olan *PAX9* geni lokalize olduğundan dolayı *PAX9* geninde DNA dizi analizi uygulandı. *MSX1* geninin lokalize olduğu 4p bölgesi bağlantı analizinde kesin olarak dışlandığı için bu gende mutasyon taraması yapılmadı.

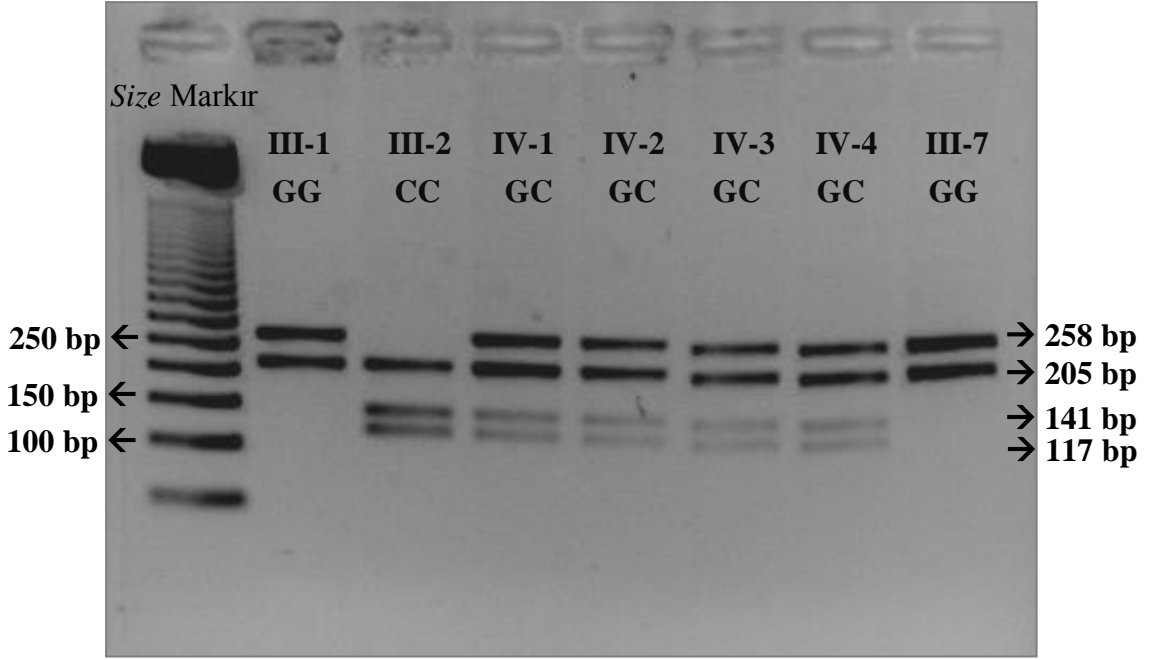
İlk olarak IV-3 nolu bireyde *PAX9* geni dizilendi. Dizi analizi sonucunda;

- Exon 1' de heterozigot c.3G>C (p.M1I),
- Exon 3' te heterozigot c.718G>C (p.A240P),
- İtron 1' de heterozigot c.5-109G>C değişiklikleri saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. IV-3 nolu bireyin *PAX9* geni sekans sonuçları. **a.** Exon 1' de heterozigot c.3G>C transversiyonu **b.** İtron 1' de heterozigot c.5-109G>C transversiyonu **c-d.** Exon 3' te heterozigot c.718G>C transversiyonu **c.** forward, **d.** reverse dizi

Restriksiyon enzim analiziyle ailenin tüm bireylerinde Exon 3' teki c.718G>C değişikliğine bakıldı. *MspI* ile yapılan enzim kesim sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü **Şekil 4.4'** te gösterildi.



Şekil 14. *MspI* ile elde edilen enzim kesim ürünlerinin %2' lik agaroz jel görüntüsü.

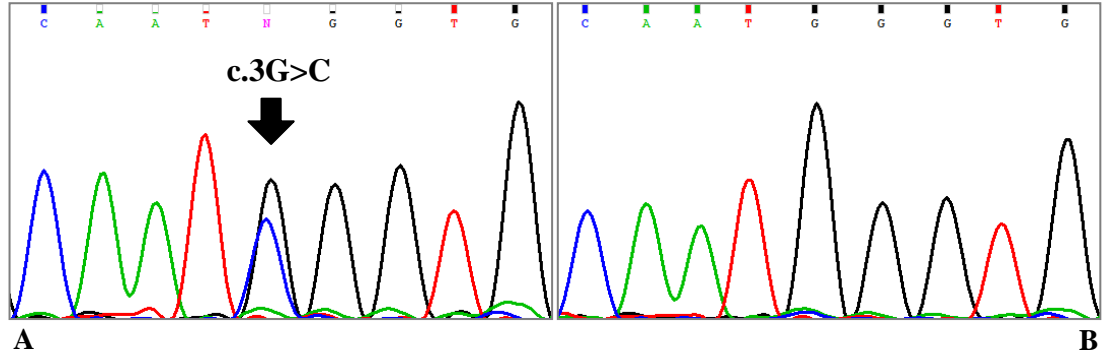
GG → 258 bp ve 205 bp

GC → 258 bp, 205 bp, 141 bp ve 117 bp

CC → 205 bp, 141 bp ve 117 bp olarak kesilir.

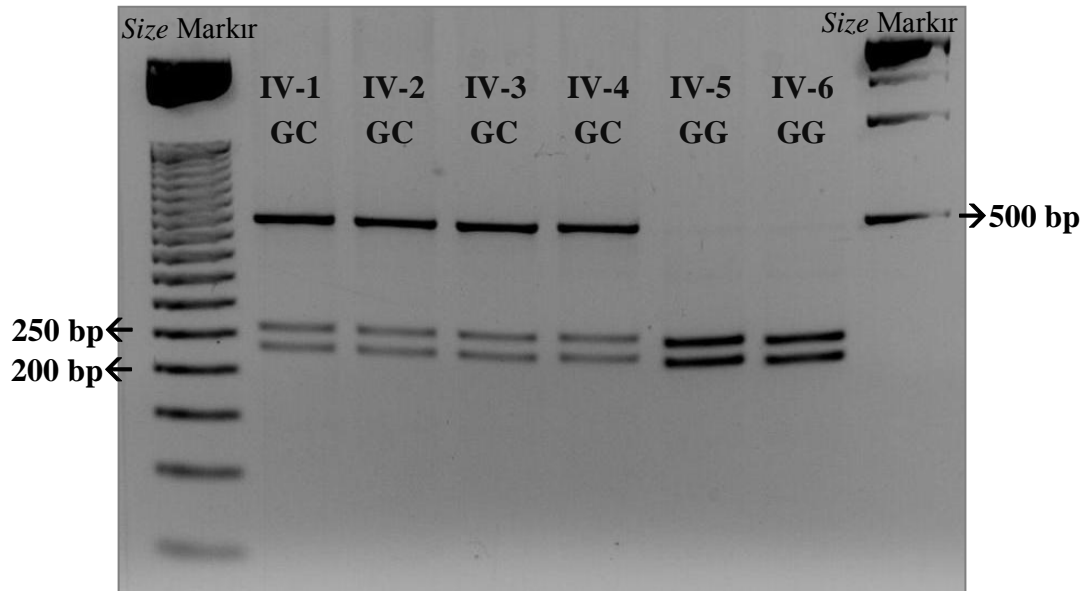
c.718G>C transversiyonu Ala240Pro değişikliğine neden olur. Hem etkilenmiş hem de etkilenmemiş bireylerde p.A240P değişikliği mevcuttu. Dolayısıyla bu değişikliğin hastalık fenotipiyle ilişkili olmadığı düşünüldü. Yedi bireyde homozigot GG, 1 bireyde homozigot CC, diğer 21 bireyde ise heterozigot GC saptandı. İlgili değişikliğin bulunduğu pozisyon Ensembl veri bankasında kontrol edildi ve daha önce bildirilmiş polimorfik bir değişiklik olduğu görüldü (**rs4904210**).

PAX9 exon 1' deki heterozigot MII değişikliği, diş eksikliği olan tüm bireylerde mevcuttu. Etkilenmemiş bireylerde ise bu değişikliğe rastlanmadı (**şekil 4.5**).



şekil 4.5. **A.** II-2 nolu bireyin *PAX9* exon 1 sekans görüntüsü. Heterozigot c.3G>C değişikliği okla gösteriliyor. **B.** II-3 nolu bireye ait normal *PAX9* exon 1 sekansı.

Bu sekans değişikliği *BseMI* restriksiyon enzimi kullanılarak aile bireyleri ve kontrol grubunda analiz edildi. Aileden 6 kardeşin enzim kesimi sonrası elektroforez jel görüntüsü **şekil 4.6**' da gösterildi.

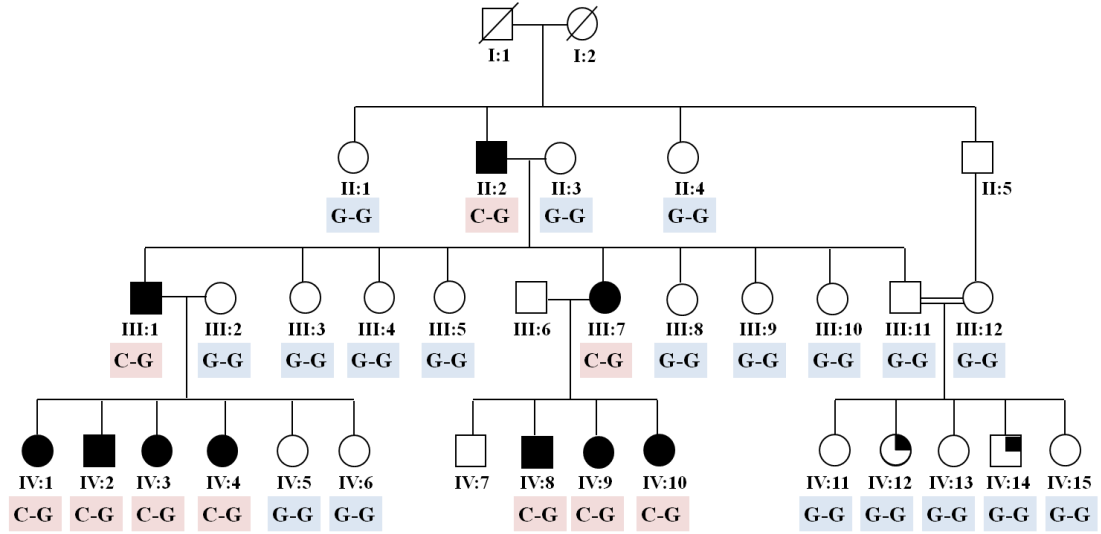


şekil 16. *BseMI* ile elde edilen enzim kesim ürünlerinin %2' lik agaroz jel görüntüsü.

GC → 483 bp, 254 bp ve 229 bp

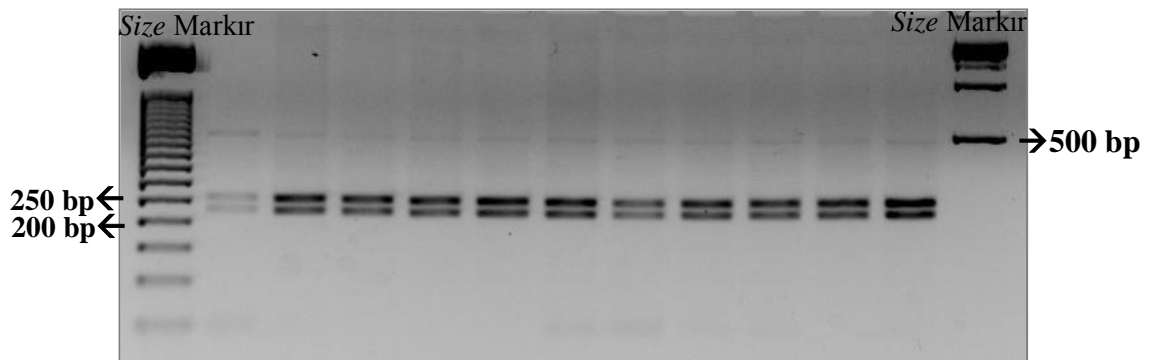
GG → 254 bp ve 229 bp olarak kesilir.

Pedigri üzerinde *PAX9* p.M1I heterozigot değişikliğinin segregasyonu Şekil 4.7' de gösterildi.



Şekil 4.7. Pedigri üzerinde *PAX9* p.M1I (c.3G>C) heterozigot değişikliğinin segregasyonu. Konjenital diş eksikliği bulunan bireylerde mutasyon saptanırken, normal bireylerde saptanmadı.

Aynı şekilde *BseMI* enzimi kullanılarak sağlıklı bireyler tarandı. Aynı bölgede bu aileyle yakınlığı olmayan 96 kişide (192 kromozom) *PAX9* c.3G>C değişikliğine rastlanmadı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kontrol grubunda *BseMI* ile yapılan enzim kesiminin agaroz jel görüntüsü örneği. Örneklerin hepsinde DNA 254 bp ve 229 bp bantlarına ayrılmış halde görülmektedir. Bu da hepsinin GG genotipine sahip olduğunu gösterir.

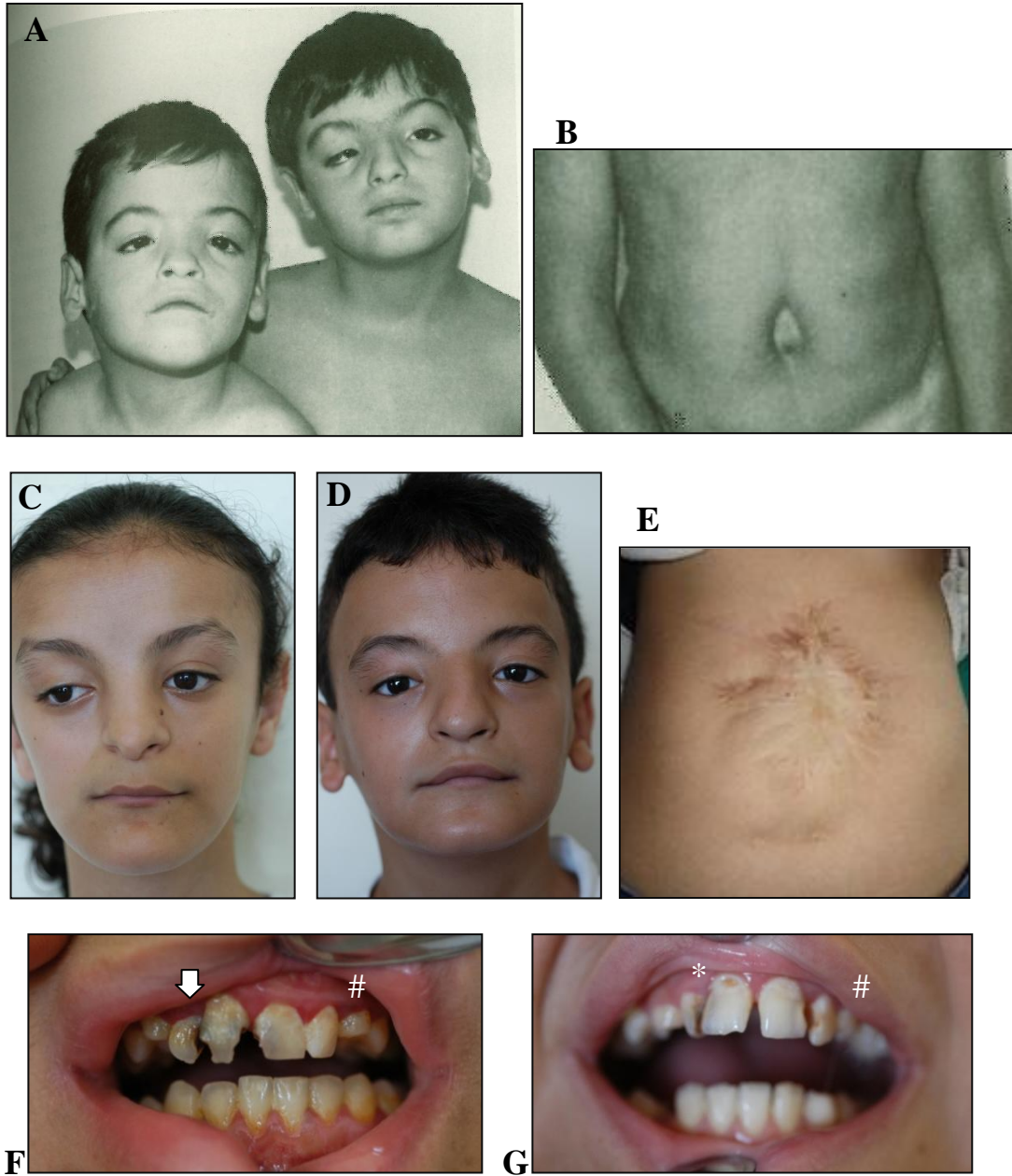
4.3. Dismorfik İki Kardeşin Değerlendirilmesi

Diş eksikliği olmayan fakat diş anomalisiyle birlikte dismorfik bulguları olan iki kardeş (IV-12 ve IV-14) saha gezisinde muayene edildi. Fizik muayenelerinde geniş alın, kavisli kaşlar, telekantus, hipertelörizm, aşağı doğru palpebral aralıklar, blefaropitozis, alt göz kapağında eversiyon ve aşağı bakan ağız köşeleri saptandı (**Şekil 4.9**). Mental ve motor gelişimleri yaşlarıyla uyumluydu.

IV-12 nolu bireyin 23 yaşındayken baş çevresi 55 cm (50 persentil), boyu 150 cm (3 persentil), vücut ağırlığı 42 kg (3 persentil) ölçüldü. Fizik muayenesinde sağ üst lateral kesici dişi eksik ve sol üst kanin gömülüydü. El parmak eklemlerinde hafif katılık, dirsek ekleminde eklem kısıtlılığı ve skolyoz vardı. Klinik öyküden doğum sonrası omfalosel nedeniyle opere olduğu (**Şekil 4.9**), 1 ay hastanede yattığı ve yatışı sırasında menenjit geçirdiği öğrenildi. Çocukluk döneminde sık sık enfeksiyon geçirdiği ve geç iyileştiği öğrenildi. El-bilek grafisi yaşıyla uyumluydu, parmaklarda kısıklık yoktu. Dirsek grafisinde radioulnar sinostoza rastlanmadı.

IV-14 nolu bireyin 19 yaşındayken ölçülen boyu 160 cm (3 persentil) idi. Fizik muayenesinde sağ üst lateral kesici dişi mikrodontik, sol üst kanin gömülüydü ve umbilikal skar vardı. Göbeğinin düştükten 2 hafta sonra iyileştiği, doğumda ASD' sinin olduğu, sonra kendiğinden kapandığı ve testislerinin skrotuma geç indiği öğrenildi. Çocukluk döneminde kardeşi kadar ağır ve uzun süren enfeksiyon geçirmediği öğrenildi. Her ikisinin de ön fontanelleri geç kapanmış (2 yaşında).

Hastaların fenotipik görünüşleri Genetik ünitemizde değerlendirildi ve bu çocukların fotoğraflarının Carnevale sendromuna çok benzediği düşünüldü. **Şekil 4.9'** da vakaların literatür ile karşılaştırmalı olarak resimleri verilmektedir. Benzerlik dikkat çekicidir.



Şekil 4.9. A-B. Literatürde bildirilen ilk Carnevale sendromlu 2 erkek kardeşin yüz görünümleri. Pitozis, aşağı doğru palpebral aralıklar, aşağı dönük ağız köşeleri ve yay gibi kaşlar görülüyor. Büyük kardeşte umbilikal çukurluk görülüyor. American Journal of Medical Genetics 1989 (33): 186-189' ten alınmıştır (119).

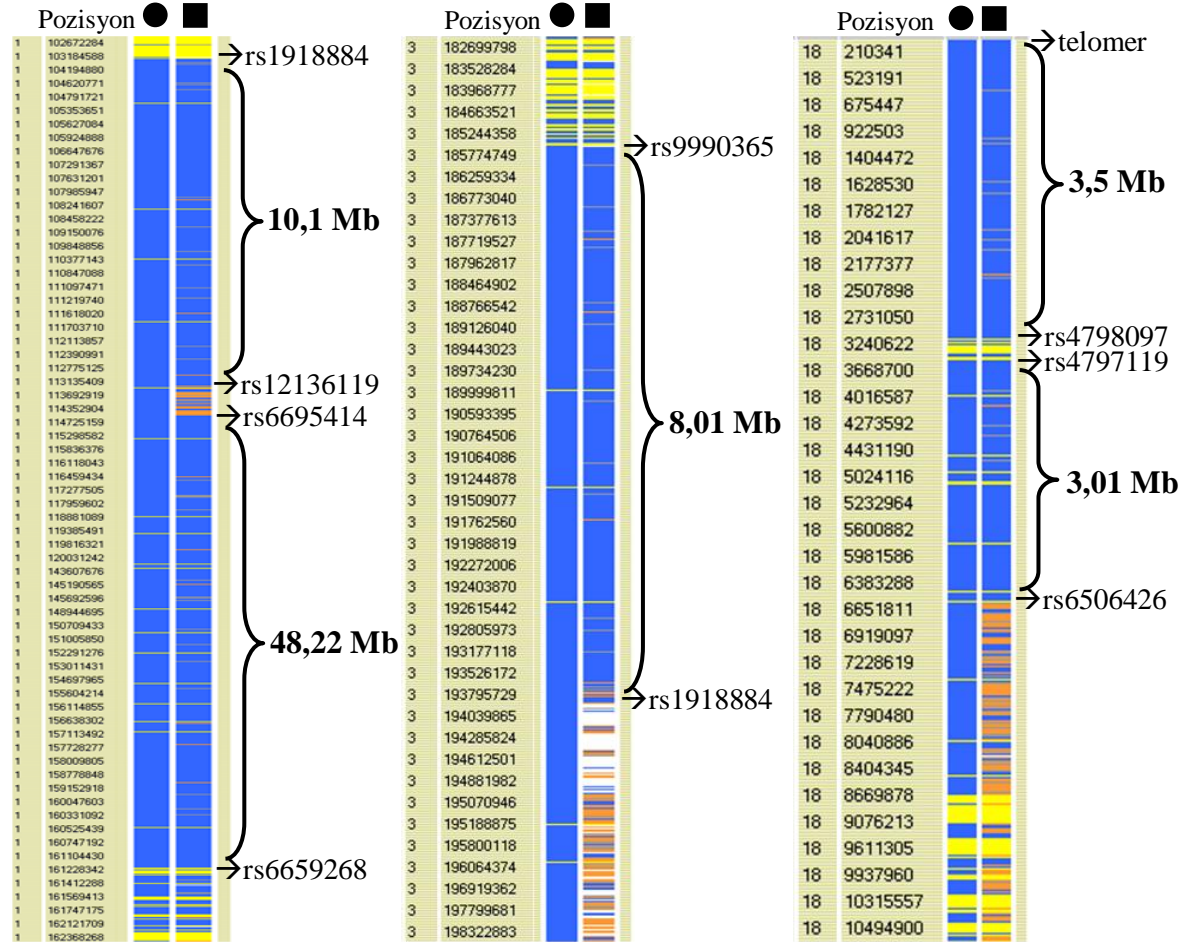
C-D. Carnevale sendromu düşünülen IV-12 ve IV-14 nolu bireylerin yüzleri literatürde bildirilmiş olan vakalara çok benziyor. **E.** IV-12 nolu kız bireyin omfalosel operasyon skarı. **F.** IV-12: Daimi maxiller sağ lateral kesici dişi (*) eksik. Her iki hastanın da maxiller gömülü kaninleri (#) ve çürükleri bulunmaktadır. **G.** IV-14: Sağ maxiller lateral kesici dişi mikrodontik (okla gösterildi).

Hastaların fenotipik bulgularının literatürde bildirilmiş olan Carnevale sendromlu vakalarla karşılaştırılması **Tablo 4.3'** te gösterildi.

Tablo 4.3. Carnevale sendromu düşünülen iki hastanın fenotipik bulgularının literatürde bildirilmiş olan Carnevale sendromlu vakalarla karşılaştırılması.

Fenotipik bulgular	Literatürde bildirilmiş vakalar (119, 132)	IV-12	IV-14
Boy kısalığı	0/4	+	+
Mental retardasyon	1/4	-	-
Kraniyofasiyel bulgular			
Asimetrik kafa/ kraniyosinostoz	3/4	+	-
Geniş alın	2/4	+	+
Kavisli kaşlar	4/4	+	+
Telekantus	4/4	+	+
Hipertelörizm	4/4	+	+
Palpebral aralıklar aşağı doğru	4/4	+	+
Blafaropitozis	4/4	+	+
Alt göz kapağında eversiyon	4/4	+	+
Strabismus	2/4	-	-
Burun ucu geniş ve düz	2/4	<i>Columella</i> aşağı doğru	+
Geniş filtrum	1/4	Filtrum uzun	Filtrum kısa
Ağız köşeleri aşağı doğru	4/4	+	+
Yarık dudak/damak	1/4	Dar-yüksek damak	-
Santral ve lateral kesici dişlerin küçüklüğü	1/2	Üst sağ lateral kesici eksik	Üst sağ lateral kesici dişi küçük
Abdominal bulgular			
Umbilikal çukurluk	3/4	-	Umbilikal skar
Omfalotel	0/4	Opere omfalotel	-
Diastazis rekti	4/4	+	-
İskelet bulguları			
Tortikollis	1/4	-	-
Kalça anomalisi	3/4	-	-
Deviye veya kısa parmaklar	1/4	-	-
Dirsek ekleminde hareket kısıtlılığı	3/4	+	-
Vertebral anomaliler	0/2	Skolyoz	-
Genitoüriner anomaliler			
Kriptorşidizm	2/3	-	+

Bunun üzerine genom-boyu çip analizi verileri homozigotluk analizi kullanılarak tekrar değerlendirildi. Bir, 3 ve 18 numaralı kromozomlarda geniş homozigot blokların bulunduğu saptandı (Şekil 4.10). Bunlardan 3q27 bölgesi daha önce 3MC sendromuna neden olduğu bildirilen *MASPI* genini içermekteydi. Bu nedenle *MASPI* geninde DNA dizi analizi uygulandı

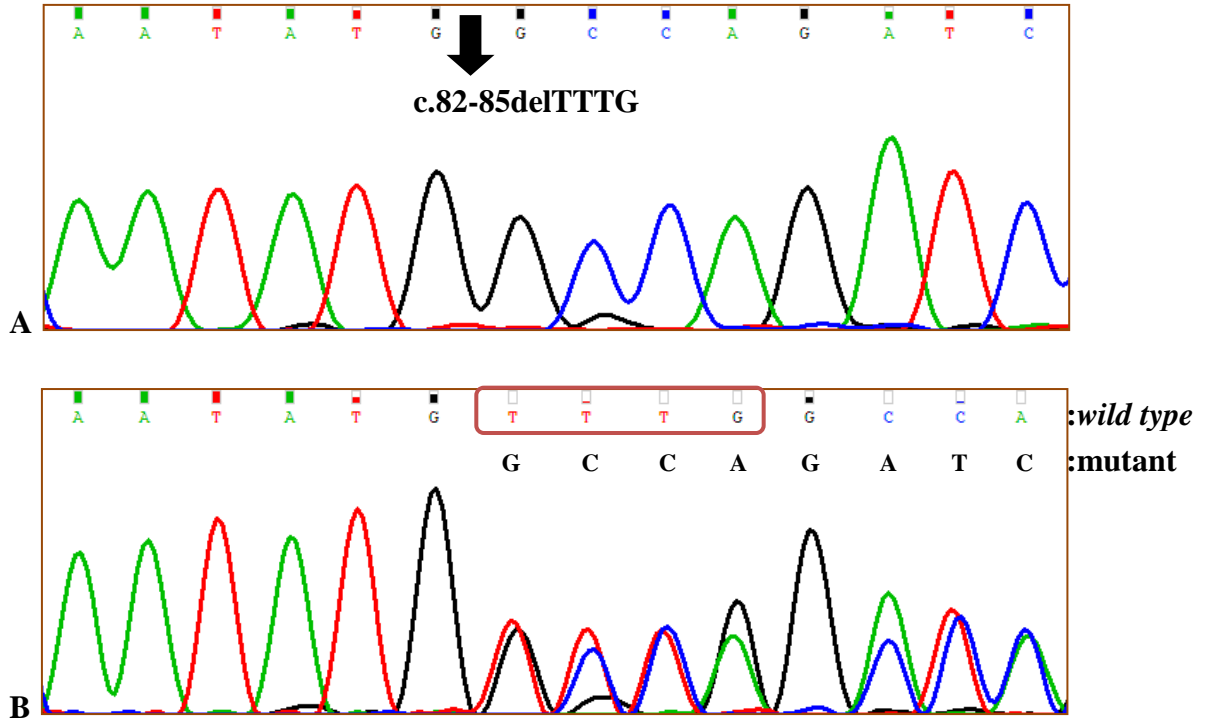


Şekil 4.10. IV-12 ve IV-14 nolu bireylerin homozigotluk analizi. Kromozom 1, 3q ve 18p’ de saptanan homozigot bloklar ve büyüklükleri görülmüyor.

● : IV-12, ■ : IV-14 nolu birey

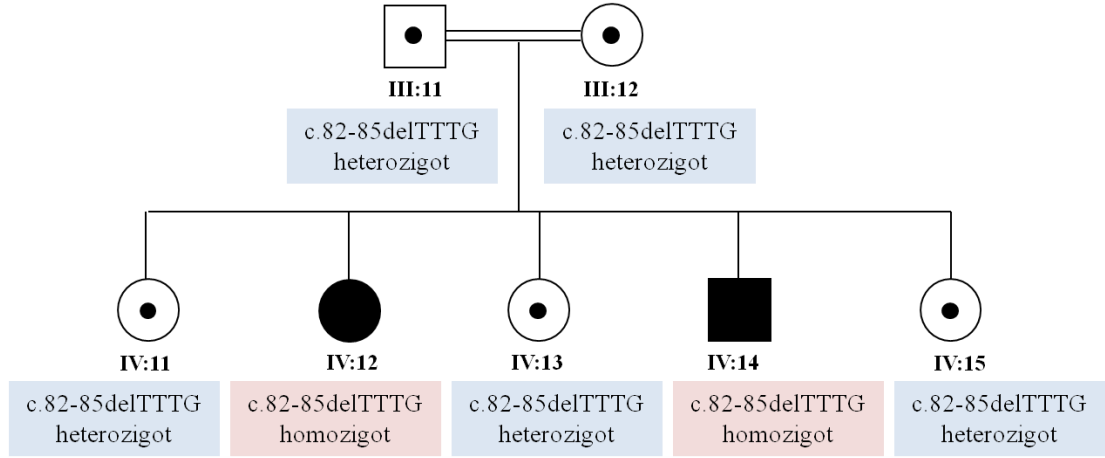
MASPI geninde dizi analizi sonucunda IV-12 nolu bireyde 2. exonda homozigot 4 baz delesyon (c.82-85delTTTG) saptandı (Şekil 4.11). Diğer exonlarda herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Bunun üzerine anne, baba ve kardeşlerine de exon 2’ nin dizi analizi yapıldı. Sonuçta Carnevale sendromu düşünülen kardeşinde

homozigot, anne, baba ve diğer kardeşlerinde heterozigot delesyon saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. A. IV-12 nolu bireyin *MASP1* exon 2 sekans görüntüsü. Homozigot c.82-85delTTTG değişikliği görülüyor. **B.** III-12 nolu bireyin sekans görüntüsü. Heterozigot c.82-85delTTTG değişikliği görülüyor.

Dört baz delesyonu çerçeve kaymasına ve 17 aa sonrasında terminasyon kodonu oluşmasına neden olmaktadır (p.Phe28AlafsX18). Bunun sonucunda normalde 699 aa' ten oluşan *MASP1*' in translasyonu 44. aa' te durmaktadır.



Şekil 4.12. Carnevale sendromu tanısı alan çocukların pedigrisi ve sekans sonuçları.

TARTIŞMA

Bu çalışmada üç kuşakta toplam 10 bireyde konjenital diş agenezisi bulunan geniş bir ailede bu nitelikten sorumlu genin bulunmasına çalışılmıştır. Ailede diş anomalilerine ek olarak dismorfik bulguların eşlik ettiği bireylerin bulunması ailenin fenotip tanımlamasını karmaşıklaştırmaktadır. Pedigri analizi ve genom-boyu DNA çip analizleri bu ailede iki farklı anomalinin yüklülük gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu anomalilerden konjenital diş eksikliği malformasyonu tam penetranslı otozomal dominant kalıtım kalıbı gösterirken kompleks fenotip gösteren bireylerin otozomal resesif Carnevale sendromuna uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Genom-boyu analiz sonrasında uygulanan aday gen yaklaşımı ve DNA dizi analizleri sonucunda otozomal dominant konjenital diş eksikliğinden *PAX9* gen mutasyonunun sorumlu olduğu belirlenirken, Cranevale sendromuna *MASPI* gen mutasyonunun neden olduğu gösterilmiştir. Böylelikle dismorfik bireylerde gözlenen diş anomalilerinin *PAX9* gen mutasyonuna bağlı bir varyasyon olmadığı, tamamen farklı bir genetik temele dayandığı gösterilmiştir. Tartışma her iki malformasyonun genetik temeline yönelik olarak ayrı ayrı yapılmıştır.

5.1. Otozomal Dominant Konjenital Diş Eksikliği

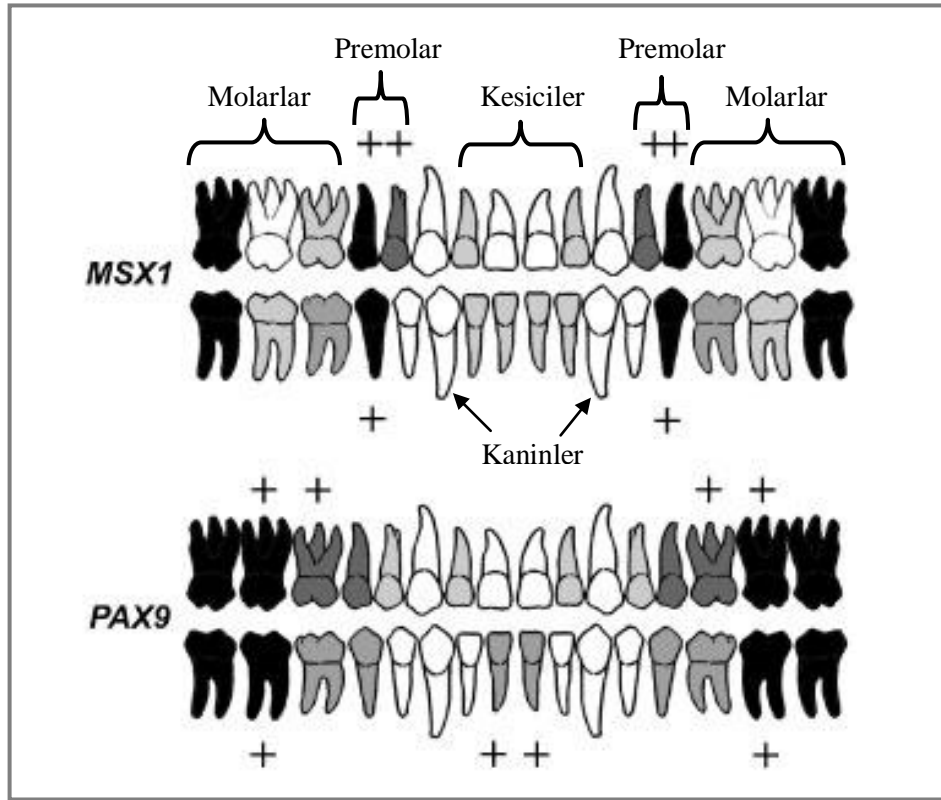
Birçok çalışmada izole diş agenezisinin düşük penetrans ve değişken ekspresyonla otozomal dominant kalıtıldığı bildirilmekle birlikte bizim çalışmamızda otozomal dominant tam penetrans gösteren bir genle kalıtıldığı gözlenmiştir. Genom boyu çip analizini takiben uygulanan bağlantı analizi bu malformasyonu 14q11-q21 bölgesine haritalamıştır. Bu bölgede yer alan *PAX9* geninde yapılan DNA dizi analizi, evrimsel süreçte korunmuş olan (Şekil 5.1) başlangıç kodonundaki Metiyonin aminoasitini İzolösine çeviren p.M1I mutasyonunun malformasyondan sorumlu olduğunu göstermiştir. İlgili mutasyon literatürde daha önce tanımlanmamış olan yeni bir mutasyondur.

İnsan	MEPAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	50
Şempanze	MEPAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	50
Mouse	MEPAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	50
Rat	MEPAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	50
Tavuk	--PAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	48
Zebrafish	MEPAFGEVNQLGGVFNDRPLPNAILRLRIVELAQLGIRPCDISRQLRVSH	50

Şekil 5.1. İnsan, şempanze, *mouse*, *rat*, tavuk ve *zebrafish*' te PAX9 sekanslarının karşılaştırılması. Protein dizileri UniProtKB' den (<http://uniprot.org>) alındı ve ClustelW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) yazılımı kullanılarak *align* edildi. PAX9' un ilk aminoasiti olan Metiyoninin korunduğu görülüyor.

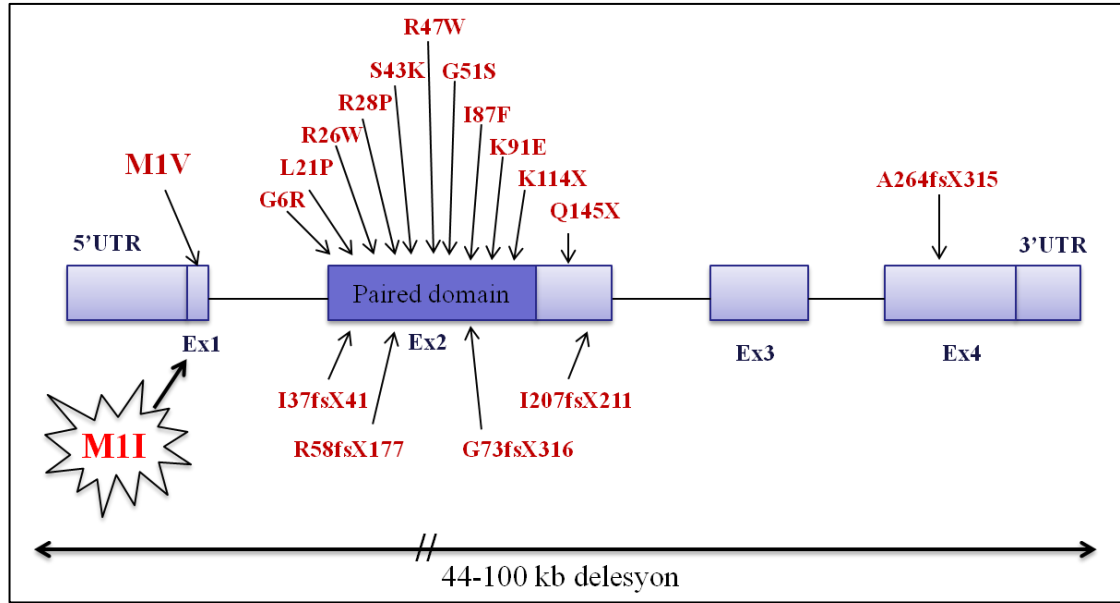
PAX9 ve *MSX1* gen mutasyonları literatürde sıklıkla konjenital diş eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Her iki genin diş gelişiminin erken evrelerinde dental mezenşimde birlikte eksprese (koeksprese) oldukları ve fare embryolarında *Msx1* veya *Pax9*' un homozigot delesyonunda diş gelişiminin tomurcuklanma evresinde durduğu gösterilmiştir (50, 54, 88). Her iki gen de insanlarda posterior diş agenezisine neden olurken etkiledikleri dişler birbirinden farklıdır. *PAX9* mutasyonları daha çok molar ageneziye neden olurken, *MSX1* mutasyonları özellikle premolarları etkiler (8). **Şekil 5.2'** de *PAX9* ve *MSX1* gen defektlerinin yol açtığı fenotiplerin karşılaştırması yapılmıştır. Kim ve ark.' na göre *PAX9*' la ilişkili diş agenezilerinde %80 oranla maxiller ve mandibular 2. molar dişlerin eksikliği görülür. *MSX1* ile ilişkili diş agenezilerinde maxiller ve mandibular 2. premolar ve maxiller 1. premolarların sıklıkla etkilendiği görülmektedir (133) (**Şekil 5.2**).

Bu ailede mutasyon saptanan bireylerin diş fenotipi, literatürde bildirilen *PAX9* mutasyonlu vakalara benzemektedir. Diş eksikliği olan bireylerin %89' unda molar ve 2. premolar dişler, %67' sinde alt santral kesicilerin eksikliği bulunmaktadır. Aile bireylerinin hiçbirinde kanin veya 1. premolar diş eksikliğine rastlanmamıştır.



Şekil 5.2. *MSX1* ve *PAX9*'daki gen defektlerinin yol açtığı fenotiplerin karşılaştırılması. Eksikliği daha sık görülen dişler daha koyu renkle gösterildi. Daha iyi anlaşılması açısından eksikliği daha çok görülen dişler "+" işaretiyle gösterildi. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 2009 (312B):320-342' den alınmıştır (86).

Bugüne kadar literatürde nonsendromik diş agenezisine neden olan 18 farklı *PAX9* mutasyonu tanımlanmıştır (**Şekil 5.3**). Bunların büyük bir çoğunluğu (13 tanesi) 2. exonda *paired domain* bölgesinde yığılım gösterirken, ikisi 2. exonda *paired domain* dışında, biri başlangıç kodonunda (exon 1), biri de 4. exonda lokalizedir. Bir de tüm *PAX9* geninin delesyona uğradığı şiddetli bir vaka vardır. Vakaların ikisi dışında hepsi ailevidir ve dominant geçişlidir. Diğer ikisi sporadik *de novo* mutasyonlu vakalardır. Otozomal resesif geçişli *PAX9* mutasyonu bugüne kadar hiç bildirilmemiştir.



Şekil 5.3. Literatürde bildirilmiş *PAX9* mutasyonları.

PAX9 özellikle en distaldeki dişlerin (molar dişler) gelişiminde önemli rol oynamakla birlikte *PAX9* mutasyonlarında üst lateral veya alt santral kesicilerin agenezisine de sıklıkla rastlanmaktadır (86).

Bildirilen *PAX9* mutasyonlarının genotip-fenotip korelasyonlarına bakıldığında prematüre stop kodon oluşturan çerçeve kayması veya *nonsense* mutasyonlarda daimi dişler ve süt dişlerinde farklı derecelerde agenezi oluşmaktadır. *Missense* mutasyonlarda ise sadece daimi dişlerin etkilendiği süt dişlerin etkilenmediği bildirilmiştir (47). *PAX9* mutasyonu ile ilişkili en şiddetli fenotip daimi dişlerde şiddetli oligodonti ve tüm süt molarların agenezisinin görüldüğü *PAX9* tüm gen heterozigot delesyonunda bildirilmiştir (98).

Bizim ailemizde heterozigot missense p.M1I mutasyonunu taşıyan bireylerde *PAX9* mutasyon profili ile uyumlu olarak molarlar, 2. premolarlar ve alt santral kesicilerin agenezisi bulunmaktadır. Süt dişlerinin etkilendiğine dair herhangi bir delil bulunmamıştır ve bu durum yukarıda söz edildiği şekilde missense mutasyonlarda süt dişlerinin etkilenmediği hipotezi ile uyumludur.

PAX9 geninde başlangıç kodon mutasyonu literatürde sadece bir kez bildirilmiştir. 2005 yılında Klein ve ark. tarafından otozomal dominant nonsendromik diş agenezisi olan Çinli bir ailede *PAX9* geninin başlangıç kodonunda c.1A>G transversiyonu saptanmış ve bu değişiklik p.M1V mutasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (109). İlgili çalışmada etkilenmiş kişilerin tüm daimi molarlar, 2. premolarlar ve üst 1. premolarlarına ek olarak süt dişlerinde de eksiklik olduğu bildirilmiştir. Ayrıca üst lateral kesicilerin koni şeklinde olduğu ve her iki alt santral kesicinin de eksikliği belirtilmiştir. O ailedeki fenotipin diğer *PAX9* mutasyonlarına göre daha şiddetli olduğu ve en çok *PAX9* delesyonu olan ailenin fenotipine benzediği bildirilmiştir (109). Klein ve ark., *PAX9* başlangıç kodonundaki heterozigot c.1A>G mutasyonunun *PAX9* translasyonunun bir alele şiddetli veya tam inhibisyonuna yol açarak daha az miktarda *PAX9* transkripsiyon faktörünün oluşmasına neden olduğunu speküle etmişlerdir (109).

Tablo 5.1. Literatürde p.M1V mutasyonu bulunan aile ile bu tezde çalışılan ailenin diş fenotiplerinin karşılaştırılması.

Diş Grupları	p.M1V Klein ve ark. (109)	p.M1I Bu tezde çalışılan aile
Santral kesiciler	+	+
Lateral kesiciler	-/ koni şeklinde	+/ koni şeklinde
Kaninler	+	-
1. Premolar	+	-
2. Premolar	+	+
1., 2., 3. Molar dişler	+	+
Süt dişleri	+	-

Etkilenen dişler “+”, etkilenmemiş dişler “-“ ile gösterildi.

Bu çalışmada sunulan ailenin eksik olan diş profili, Klein ve ark.’nın çalışmasındaki bireylere benzemekle birlikte ondan daha hafiftir (**Tablo 5.1**). Her iki çalışmada da daimi molarlar, 2. premolarlar ve alt santral kesicilerin eksikliği mevcuttur. Her ikisinde de birer bireyde koni şeklinde üst lateral kesici diş

saptanmıştır. Farklı olarak bu çalışmada etkilenmiş bireylerin kanin, 1. premolar ve süt dişlerinin eksikliğine dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Literatürde konjenital diş eksikliğine sahip hastaların, kontrol grubuna oranla diş gelişiminin gecikmiş olduğu, normalden daha küçük dişlere sahip oldukları bildirilmiştir. Diş agenezisi ve diş boyutunda azalmanın genetik olarak birbiriyle ilişkili oldukları düşünülmektedir (58, 61-64). Bu küçülmenin homojen olmadığı, ön dişlerin arka dişlere göre daha çok etkilendiği belirtilmiştir. Diş eksikliği ne kadar şiddetliyse küçük dişlere o kadar sık rastlanır (63). Bu ailede diş agenezisi olan bireylerin özellikle ön dişlerinin nispeten daha küçük oldukları görüldü. Bununla birlikte 3 bireyde çok daha belirgin küçüklükte (mikrodontik) diş yapısı görüldü. IV-8 nolu bireyin sağ üst 2. premoları ve III-1 nolu bireyin alt santral kesicileri mikrodontiktir. Diş agenezisi ve mikrodontinin aynı genetik defektin azalmış penetransla birlikte farklı ekspresyonları olduğunu bildiren yazarlar vardır (57, 66).

Literatürde diş agenezisi olanların büyük bir kısmında süt dişi persistansı ve koni şeklinde maxiller lateral kesiciler gibi diş anomalilerinin eşlik ettiği gösterilmiştir (60). Bu ailede de literatürle uyumlu olarak. IV-2 nolu bireyin koni şeklinde sağ maxiller lateral kesici dişi bulunmaktadır (**Şekil 4.1**). Ayrıca daimi alt santral kesici dişi eksik olan 5 bireyin hepsinde de santral kesici süt dişleri bulunmaktadır.

- p.M1I değişikliğinin ailede sadece diş agenezisi olan bireylerde bulunması, diğerlerinde bulunmaması,
- Aynı bölgede bu aileden bağımsız 96 kişide (192 kromozom) p.M1I değişikliğinin bulunmaması,
- *PAX9* geninin 1. pozisyonunda metiyoninin türler arasında korunmuş olması nedeniyle *PAX9* genindeki p.M1I değişikliğinin diş agenezisinden sorumlu mutasyon olduğu kanaatine varılmıştır.

Bu çalışma Türkiye’ de diş agenezisinin moleküler genetiğinin çalışıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. *PAX9* genindeki mutasyonun diş gelişimine nasıl etki ettiğine yönelik fonksiyon çalışmaları bu tezin kapsamı dışında tutulmuştur.

5.2. 3MC Sendromu

İlk olarak birbirinden farklı sendromlar olarak bildirilen Malpuech, Michels, OSA ve Carnevale sendromlarının aynı hastalık spektrumunun farklı ekspresyonları olduğu ilk defa Titomanlio ve ark. tarafından dile getirilmiştir (120). Bu spektrum da “3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale) Sendromu” olarak adlandırılmıştır.

Carnevale sendromu 3MC spektrumu içerisinde nadir görülen konjenital anomalilerden biridir. Hastalarda genel olarak mental gerilik olmamakla beraber dismorfik yüz bulguları ve umbilikal anomaliler görülmektedir. IV-12 ve IV-14 nolu bireyler fenotipik olarak Carnevale sendromuna benziyordu.

Son 1 yıla kadar Carnevale sendromunun moleküler temeli bilinmiyordu. Gelişen teknolojiyle beraber homozigotluk haritalamaları yapılarak sorumlu genlerden ikisi bulundu. Rooryck ve ark., 3MC sendromunda lektin kompleman yolağında rol alan genlerden *COLEC11* ve *MASPI*' in mutasyona uğradığını göstermiştir (121). Bu konuda eş zamanlı yayınlanan iki makalede (Sırmacı ve ark., Rooryck ve ark.) 3MC sendromu bulunan 13 ailede *COLEC11*' de 6, *MASPI*' de 5 farklı mutasyon tanımlanmıştır (121, 122).

Carnevale, Malpuech, Michels ve Mingarelli sendromlarına bu iki gendeki mutasyonların neden olması bu sendromların aynı hastalığın allelik varyantları olduğunu gösterir. Rooryck ve ark., bu sendromların “3MC sendromu” veya daha tanımlayıcı bir ifadeyle “kraniofasiyel-ulnar-renal sendrom” olarak adlandırılması gerektiğini bildirmiştir (121). Carnevale sendromu özelinde bugüne kadar hastaların dördünde *MASPI*, üçünde *COLEC11* geninde mutasyon gösterilmiştir.

MASPI genetik lokusu komplekstir ve alternatif *splicing* mekanizmasıyla amino terminal bölgeleri aynı, serin proteaz domaini içeren karboksi terminal bölgeleri farklı olan üç farklı izoformda protein kodlar. Birinci ve ikinci izoformlar (MASP-1 ve MASP-3) farklı serin proteaz *domain*leri içerir. Üçüncü izoformda (MAp44) ise serin proteaz *domaini* yoktur (122) (**Şekil 5.4**).

Tablo 5.2. *MASPI* mutasyonu bulunan hastaların klinik bulgularının karşılaştırılması.

Aile	Sırmacı ve ark.(122)			Rooryck ve ark. (121)						
	FAM 1	FAM 2	MC3	MC5		MC6		MC7	Bu aile	
Hasta	101	102	3.1	5.1	5.2	6.1	6.2	7.1	IV-12	IV-14
Tanı	Carnevale	Carnevale	Carnevale	Malpuech	Malpuech	3MC	3MC	Michels	Carnevale	Carnevale
Mutasyon	G687R	W290X	H497Y	C630R		G666E		F28AfsX18		
Etkilenen domain	Serin proteaz	CUB2	Serin proteaz	Serin proteaz		Serin proteaz		CUB1		
Büyüme geriliği	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Mental retardasyon	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelörizm	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Kavisli kaşlar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blefaropitozis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimetrik kafa	?	?	+	-	-	-	-	-	+	-
Yarı dudak/damak	-	-	+	+	+	-	-	+	Dar- yüksek damak	-
İşitme kaybı	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Periumbilikal çukurluk	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Omfalosele	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dirsek hareketlerinde kısıtlılık	+	-	-	-	-	+	-	-	+	?
Vezikorenal anomali	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Kaudal katlantı	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-

MASPI mutasyonu saptanan hastaların tamamında tipik yüz görünümü (hipertelörizm, kavisli kaşlar, blefaropitozis), %78' inde işitme kaybı ve kaudal katlantı, %45' inde yarık dudak/damak, %34' ünde büyüme geriliği, mental retardasyon, periumblikal çukurluk ve vezikorenal anomaliler, %22' sinde ise dirsekte hareket kısıtlılığı bulunmaktadır.

Bu ailedeki iki vakanın klinik bulguları literatürdeki vakalarla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda farklı olarak bir hastada omfalosel bulunmaktaydı. Ayrıca diğer vakalarda sıklıkla bulunan işitme kaybı ve kaudal katlantı bizim vakalarda saptanmadı.

Bu çalışma sonucunda Carnevale sendromu düşünülen 2 kardeşte *MASPI* geninde 2. exon' da 4 baz çiftinin homozigot delesyonu saptandı. Bu şekilde ilk defa *MASPI* geni exon 2' de CUB1 domaininde mutasyon gösterilmiş oldu (**Şekil 5.4**). Literatürde *MASPI* geninde bir hasta dışında bütün mutasyonların serin proteaz domaininde yer aldığı görülmektedir ve CUB1 domaininde şu ana kadar mutasyon bildirilmemiştir. Serin proteaz domaininde yer almayan tek mutasyon Sırmacı ve ark.' nın yayınladığı diğer bir Türk hastada görülmüş ve CUB2 domaininde *nonsense* mutasyon saptandığı bildirilmiştir. CUB1 ve CUB2 domainleri MASP proteininin ağır zincirini oluşturan domainlerde yer almaktadır ve tüm MASP1 izoformlarında korunmuş durumdadır. Bu çalışmada sunulan iki vaka, CUB2 domaininde mutasyon saptanan hastanın yüz fenotipine benzemekle birlikte mental retardasyonun, kaudal katlantının olmaması ve dirsek hareketlerinde kısıtlılık ve omfaloselin olmasıyla o hastadan farklılık göstermektedir. Ayrıca bu iki vakada rastlanan ön fontanelerin geç kapanması, diğer vakalarda bahsedilmeyen bir bulgudur.

MASP-1, kompleman sisteminin aktivasyonunda rol alan bir proteindir. Yapısal olarak klasik yolda rol alan C1r ve C1s'e benzer. Lektin yolağında MBL-MASP kompleksine katılır ve C4 ve C2'yi fragmanlarına ayırarak C4b2a (C3 konvertaz) kompleksinin oluşumuna katkıda bulunur (**Şekil 2.10**). *MASPI* geninin ikinci izoformu olan MASP-3, C1s gibi davranarak insülin-benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinin (IGFBP-5) işlenmesinde rol alır. IGFBP-5, IGF-I gibi IGF' lere bağlanır ve bu şekilde IGF' lerin hücre yüzeyindeki reseptörleriyle etkileşimini düzenler. Benzer şekilde *COLEC11* de lektin kompleman yolağında rol alan MBL

benzeri bir proteindir. Her iki proteinin de kompleman yolağında rol alması doğuştan olan bağışıklık sistemi (*innate immune system*) ile ilgili fonksiyonlarda bir değişiklik görülebileceğini düşündürmektedir. Şaşırtıcı olarak serum kompleman düzeyleri (C2, C3 ve C4) *COLEC11* mutasyonu taşıyan iki hastada çalışılmış ve normal bulunmuştur (121). Gerek *COLEC11*, gerekse *MASP1* genlerinde mutasyon olan hastaların hiçbirisinde immün sistemle ilgili bir bozukluk bildirilmemiştir.

Bizim ailemizde serum kompleman düzeyleri çalışılmadığı için immün fonksiyonlar açısından kesin bir şey söylemek olanaksızdır. Ancak IV-12 nolu bireyin klinik öyküsünden doğum sonrası 1 ay hastanede yattığı ve yatışı sırasında menenjit geçirdiği, çocukluk döneminde sık sık enfeksiyon geçirdiği ve geç iyileştiği öğrenildi. Bu nedenle bu bulgular hastada immün yetmezlik olabileceğini düşündürmektedir. IV-14 nolu bireyin de göbeğinin düştükten iki hafta sonra iyileşmesi bu düşünceyi desteklemektedir. İleriye yönelik olarak bu hastalarda kompleman düzeylerinin test edilmesi anlamlı olabilir.

MASP-1 ve *COLEC11* gen mutasyonlarının bu genlerin kodladıkları proteinlerin (*MASP-1*, *MASP-3*, *MAp44* ve *CL-K1*) asıl rol aldığı kompleman sistemine yönelik fonksiyonlar ile doğrudan ilintili olabilecek bir fenotip gözlenmeksizin gelişim anomalilerine yol açması her iki proteinin de embriyogenezin erken dönemlerinde rol aldığına göstergesidir. Bunu destekleyen farklı fonksiyon çalışmaları da bulunmaktadır (121).

Zebrafish' te hem *colec11* hem de *masp1* için yapılan ekspresyon çalışmalarında her ikisinin de eksikliğinde kraniyofasiyel iskelet ve kıkırdak gelişiminde bozukluklar tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *MASP-1* ve *CL-K1* proteinlerinin embriyonik gelişimde kraniyel nöral krest hücrelerinin göçünde rolü olduğu bulunmuştur (121).

MASP-3' ün *IGFBP-5* üzerinden *IGF* sinyal yolağıyla olan ilişkisi bu hastalardaki dismorfik yüz bulguları, iskelet anomalileri ve kas gelişimindeki defektleri açıklayabilir (122). *IGFBP-5*, farenin embriyonik gelişiminde kraniyofasiyel bölgede eksprese olur. Kraniyofasiyel mezenşimin iskelet dokusuna farklılaştığı sırada gelişmekte olan kıkırdak ve kemiğin etrafında *IGFBP-5* ekprese

eden hücreler gösterilmiştir (134). IGFBP-5' in IGF-II' ye bağlanarak kas hücrelerinin farklılaşmasında da rolü olduğu düşünülmüştür (135). Bu sonuçlarla MASP-3' ün IGFBP-5 üzerinden kraniyofasiyel ve kas gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (122).

Sonuç olarak Malpuech, Michels, OSA ve Carnevale sendromları aynı spektrum içerisinde farklı fenotip görünümleri olan hastalıklardır. Belirgin bir genotip-fenotip ilişkisi kurulmaksızın aynı gendeki mutasyonlardan spektrumu oluşturan bütün alt fenotiplerin kaynaklandığının gösterilmesi, bu hastalıkları ayrı ayrı isimlendirmek yerine 3MC sendromu tanımlamasının daha doğru olduğunu desteklemektedir. Bu spektrumla uyumlu olan ancak *MASPI* ve *COLEC11* genlerine bağlantı gösterilemeyen başka ailelerin bulunması bu spektrumda geniş bir genetik heterojeniteye işaret etmektedir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada;

1. Türkiye’de ilk defa otozomal dominant kalımlı diş eksikliği olan bir ailede sorumlu gen araştırıldı ve *PAX9* geninde başlangıç kodonunu etkileyen yeni bir mutasyon (p. M1I) saptandı.

2. Fenotip bulguları daha önce bildirilen *PAX9* mutasyonlarının yol açtığı fenotip verileri ile karşılaştırıldı. Ailede rastlanan fenotip *PAX9 missense* mutasyon fenotipi ile uyumlu olarak bulundu.

3. Şu ana kadar başlangıç kodonunda mutasyon (p.M1V mutasyonu) tek bir vakada bildirilmişti. Bu mutasyon süt dişi gelişimini de etkileyerek oldukça ağır bir fenotip göstermesine karşın bizim saptadığımız p. M1I mutasyonunun süt dişi gelişimini etkilemediği ve göreceli olarak diğer başlangıç kodon mutasyonlu bireye göre daha hafif seyrettiği saptandı.

4. *PAX9* mutasyonunun literatürdeki bulgular ile uyumlu olarak bu ailede de genel diş gelişimini etkilediği ve ailede görünen oligodonti, hipodonti ve mikrodonti malformasyonlarına neden olduğu belirlendi.

5. Aynı aile içinde bulunan ve diş anomalilerine dismorfik yüz bulgularının eklendiği kompleks vakaların farklı bir kalıtım kalıbı gösterdiği ve otozomal resesif Carnevale sendromuna uyduğu belirlendi.

6. Genom boyu analiz ve *PAX9* geni DNA dizi analizi bu kompleks vakalarda *PAX9* geninin rolünü dışladı. Homozigotluk analizi ve aday gen yaklaşımı ile *MASPI* geni aday olarak belirlendi. Bu gende mutasyon analizi sonucu MASP-1 proteininde erken terminasyona yol açan daha önce bildirilmemiş bir mutasyon bulundu (p.Phe28AlafsX18).

7. *MASPI* geninde gösterilen bu mutasyon tüm MASP proteinlerinde korunmuş olan CUB1 domainine denk gelmektedir. Şu ana kadar bildirilen mutasyonların çoğu serin proteaz domainini kodlayan exonlarda bulunmaktaydı. Bu domainin dışında tek bir vakada CUB2 domainini kodlayan exon 6’ da mutasyon bildirilmiştir. CUB1 domainine rastlayan bu mutasyonun fenotipik görünümü ile diğer domainlere rastlayan mutasyonların fenotip görünümleri arasında bir fark bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, & Berdal A (2008) The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders. *Eur J Med Genet* 51(4):273-291.
2. Dhanrajani PJ (2002) Hypodontia: etiology, clinical features, and management. *Quintessence Int* 33(4):294-302.
3. Arte S (2001) Phenotypic and genotypic features of familial hypodontia. *Department of Pedodontics and Orthodontics. Helsinki, Finland: Univesity of Helsinki.*
4. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, & Seidman CE (1996) A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 13(4):417-421.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
6. Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, & Stirrups DR (2005) Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int* 36(4):263-270.
7. Vastardis H (2000) The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 117(6):650-656.
8. Lidral AC & Reising BC (2002) The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 81(4):274-278.
9. Symons AL, Stritzel F, & Stamation J (1993) Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. *J Clin Pediatr Dent* 17(2):109-111.
10. Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, & Tucker AS (2008) Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res* 87(7):617-623.
11. Burzynski NJ & Escobar VH (1983) Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. *Birth Defects Orig Artic Ser* 19(1):95-106.
12. Ahmad W, et al. (1998) A locus for autosomal recessive hypodontia with associated dental anomalies maps to chromosome 16q12.1. *Am J Hum Genet* 62(4):987-991.

13. Tao R, *et al.* (2006) A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet* 51(5):498-502.
14. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, & Patel PI (2000) Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 24(1):18-19.
15. Rolling S & Poulsen S (2001) Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 59(2):111-112.
16. Backman N & Grahnen H (1992) [Dental care is recognized as a social right in 1920's Sweden]. *Nord Medicinhist Arsb*:171-179.
17. Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, & Kuijpers-Jagtman AM (2004) A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol* 32(3):217-226.
18. Muller TP, Hill IN, Peterson AC, & Blayney JR (1970) A survey of congenitally missing permanent teeth. *J Am Dent Assoc* 81(1):101-107.
19. Haavikko K (1971) Hypodontia of permanent teeth. An orthopantomographic study. *Suom Hammaslaak Toim* 67(4):219-225.
20. Bergstrom K (1977) An orthopantomographic study of hypodontia, supernumeraries and other anomalies in school children between the ages of 8-9 years. An epidemiological study. *Swed Dent J* 1(4):145-157.
21. Boran TL, Deveaux GL, & MacInnis WA (1988) Overdentures as treatment for severe hypodontia. *Gen Dent* 36(6):472, 474.
22. Sisman Y, Uysal T, & Gelgor IE (2007) Hypodontia. Does the prevalence and distribution pattern differ in orthodontic patients? *Eur J Dent* 1(3):167-173.
23. Maatouk F, Baaziz A, Ghnima S, Masmoudi F, & Ghedira H (2008) Survey on hypodontia in Sayada, Tunisia. *Quintessence Int* 39(3):e115-120.
24. Peker I, Kaya E, & Darendeliler-Yaman S (2009) Clinic and radiographical evaluation of non-syndromic hypodontia and hyperdontia in permanent dentition. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14(8):e393-397.
25. Celikoglu M, *et al.* (2010) Frequency and characteristics of tooth agenesis among an orthodontic patient population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15(5):e797-801.

26. Egermark-Eriksson I & Lind V (1971) Congenital numerical variation in the permanent dentition. D. Sex distribution of hypodontia and hyperodontia. *Odontol Revy* 22(3):309-315.
27. Rolling S (1980) Hypodontia of permanent teeth in Danish schoolchildren. *Scand J Dent Res* 88(5):365-369.
28. Endo T, Ozoe R, Kubota M, Akiyama M, & Shimooka S (2006) A survey of hypodontia in Japanese orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129(1):29-35.
29. Jursic A & Skrinjaric I (1989) [Variations in expressivity and penetrance of hypodontia]. *Acta Stomatol Croat* 23(1):13-18.
30. Goya HA, Tanaka S, Maeda T, & Akimoto Y (2008) An orthopantomographic study of hypodontia in permanent teeth of Japanese pediatric patients. *J Oral Sci* 50(2):143-150.
31. Jarvinen S & Lehtinen L (1981) Supernumerary and congenitally missing primary teeth in Finnish children. An epidemiologic study. *Acta Odontol Scand* 39(2):83-86.
32. Yonezu T, Hayashi Y, Sasaki J, & Machida Y (1997) Prevalence of congenital dental anomalies of the deciduous dentition in Japanese children. *Bull Tokyo Dent Coll* 38(1):27-32.
33. Cobourne MT (2007) Familial human hypodontia--is it all in the genes? *Br Dent J* 203(4):203-208.
34. Stimson JM, Sivers JE, & Hlava GL (1997) Features of oligodontia in three generations. *J Clin Pediatr Dent* 21(3):269-275.
35. Orup HI, Jr., Keith DA, & Holmes LB (1998) Prenatal anticonvulsant drug exposure: teratogenic effect on the dentition. *J Craniofac Genet Dev Biol* 18(3):129-137.
36. Nasman M, Forsberg CM, & Dahllof G (1997) Long-term dental development in children after treatment for malignant disease. *Eur J Orthod* 19(2):151-159.
37. Ducka-Karska K (1983) [Various dental anomalies in the black population of Lubumbashi (Zaire)]. *Odontostomatol Trop* 6(3):127-130.

38. Brook AH (1984) A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. *Arch Oral Biol* 29(5):373-378.
39. Grahnen H (1956) Hypodontia in the permanent dentition. *Odontol Revy* 7 (Suppl. 3):1-100.
40. Schalk-van der Weide Y & Bosman F (1996) Tooth size in relatives of individuals with oligodontia. *Arch Oral Biol* 41(5):469-472.
41. Parkin N, Elcock C, Smith RN, Griffin RC, & Brook AH (2009) The aetiology of hypodontia: the prevalence, severity and location of hypodontia within families. *Arch Oral Biol* 54 Suppl 1:S52-56.
42. Brook AH, *et al.* (2002) Further studies of a model for the etiology of anomalies of tooth number and size in humans. *Connective Tissue Research* 43(2-3):289-295.
43. Markovic M (1982) Hypodontia in twins. *Swed Dent J Suppl* 15:153-162.
44. Jorgenson RJ (1980) Clinician's view of hypodontia. *J Am Dent Assoc* 101(2):283-286.
45. Nieminen P, Arte S, Pirinen S, Peltonen L, & Thesleff I (1995) Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. *Hum Genet* 96(3):305-308.
46. De Coster PJ, Marks LA, Martens LC, & Huysseune A (2009) Dental agenesis: genetic and clinical perspectives. *J Oral Pathol Med* 38(1):1-17.
47. Jumlongras D, *et al.* (2004) A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet* 114(3):242-249.
48. Mostowska A, Kobiela A, & Trzeciak WH (2003) Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci* 111(5):365-370.
49. Kapadia H, Mues G, & D'Souza R (2007) Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res* 10(3):105-113.
50. Satokata I & Maas R (1994) Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6(4):348-356.
51. Peters H & Balling R (1999) Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet* 15(2):59-65.

52. Thesleff I (2000) Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand* 58(5):191-194.
53. van den Boogaard MJH, Dorland M, Beemer FA, & van Amstel HKP (2000) MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature Genetics* 24(4):342-343.
54. Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, & Balling R (1998) Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12(17):2735-2747.
55. Lammi L, *et al.* (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 74(5):1043-1050.
56. Stritzel F, Symons AL, & Gage JP (1990) Agenesis of the second premolar in males and females: distribution, number and sites affected. *J Clin Pediatr Dent* 15(1):39-41.
57. Garib DG, Peck S, & Gomes SC (2009) Increased occurrence of dental anomalies associated with second-premolar agenesis. *Angle Orthod* 79(3):436-441.
58. Schalk-van der Weide Y, Steen WH, Beemer FA, & Bosman F (1994) Reductions in size and left-right asymmetry of teeth in human oligodontia. *Arch Oral Biol* 39(11):935-939.
59. Koch G & Thesleff I (2001) Developmental disturbances in number and shape of teeth and their treatment. *Pediatric Dentistry - a clinical approach*, eds Koch G & Poulsen S (Munksgaard Copenhagen), 1st Ed, pp 253-271.
60. Gomes RR, da Fonseca JA, Paula LM, Faber J, & Acevedo AC (2010) Prevalence of hypodontia in orthodontic patients in Brasilia, Brazil. *Eur J Orthod* 32(3):302-306.
61. Peck S, Peck L, & Kataja M (1996) Prevalence of tooth agenesis and peg-shaped maxillary lateral incisor associated with palatally displaced canine (PDC) anomaly. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 110(4):441-443.
62. Rune B & Sarnas KV (1974) Tooth size and tooth formation in children with advanced hypodontia. *Angle Orthod* 44(4):316-321.
63. Garn SM & Lewis AB (1970) The gradient and the pattern of crown-size reduction in simple hypodontia. *Angle Orthod* 40(1):51-58.

64. McKeown HF, Robinson DL, Elcock C, al-Sharood M, & Brook AH (2002) Tooth dimensions in hypodontia patients, their unaffected relatives and a control group measured by a new image analysis system. *Eur J Orthod* 24(2):131-141.
65. Baccetti T (1998) A clinical and statistical study of etiologic aspects related to associated tooth anomalies in number, size, and position. *Minerva Stomatol* 47(12):655-663.
66. Alvesalo L & Portin P (1969) The inheritance pattern of missing, peg-shaped, and strongly mesio-distally reduced upper lateral incisors. *Acta Odontol Scand* 27(6):563-575.
67. da Silva AP, Costa B, & de Carvalho Carrara CF (2008) Dental anomalies of number in the permanent dentition of patients with bilateral cleft lip: radiographic study. *Cleft Palate Craniofac J* 45(5):473-476.
68. Shapira Y, Lubit E, & Kuftinec MM (2000) Hypodontia in children with various types of clefts. *Angle Orthod* 70(1):16-21.
69. Tereza GP, Carrara CF, & Costa B (2010) Tooth abnormalities of number and position in the permanent dentition of patients with complete bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 47(3):247-252.
70. Karsten A, Larson M, & Larson O (2005) Length of the cleft in relation to the incidence of hypodontia of the second premolar and to inheritance of cleft lip and palate in children with isolated cleft palate. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 39(5):283-286.
71. Wang H, *et al.* (2000) Congenital absence of permanent teeth in a six-generation Chinese kindred. *American journal of medical genetics* 90(3):193-198.
72. Liu W, *et al.* (2001) The novel gene locus for agenesis of permanent teeth (He-Zhao deficiency) maps to chromosome 10q11.2. *Journal of dental research* 80(8):1716-1720.
73. Vincent JB, *et al.* (2009) Oligodontia Is Caused by Mutation in LTBP3, the Gene Encoding Latent TGF-beta Binding Protein 3. *American Journal of Human Genetics* 84(4):519-523.

74. Han D, *et al.* (2008) Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis. *Eur J Med Genet* 51(6):536-546.
75. Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1647-1648.
76. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, & Aberg T (1995) Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* 32(1-4):9-15.
77. Pinkham JR (2005) The Dynamics of Change. *Pediatric Dentistry: Infancy Through Adolescence*, ed Pinkham JR (Saunders, Missouri), 4th Ed, pp 166-194.
78. D'Souza R, Kapadia H, & Vieira AR (2006) Teeth. *Human Malformations and Related Anomalies*, eds Stevenson RE & Hall JG (Oxford, New York), 2nd Ed, pp 425-430.
79. Thesleff I & Sharpe P (1997) Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 67(2):111-123.
80. Thesleff I & Nieminen P (1996) Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 8(6):844-850.
81. Jernvall J & Thesleff I (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92(1):19-29.
82. Bei M & Maas R (1998) FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125(21):4325-4333.
83. Cobourne MT & Sharpe PT (2003) Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 48(1):1-14.
84. Thesleff I (2006) The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A* 140(23):2530-2535.
85. Mundlos S, *et al.* (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5):773-779.
86. Nieminen P (2009) Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B(4):320-342.

87. Nakatomi M, *et al.* (2010) Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 340(2):438-449.
88. Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, & Maas R (1996) Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 122(10):3035-3044.
89. Bei M, Kratochwil K, & Maas RL (2000) BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 127(21):4711-4718.
90. Satokata I, *et al.* (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24(4):391-395.
91. Jabs EW, *et al.* (1993) A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75(3):443-450.
92. Ma L, Golden S, Wu L, & Maxson R (1996) The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 5(12):1915-1920.
93. Cobourne MT (1999) The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod* 26(1):21-28.
94. McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, & Gehring WJ (1984) A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37(2):403-408.
95. Ogawa T, Kapadia H, Wang B, & D'Souza RN (2005) Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. *Arch Oral Biol* 50(2):141-145.
96. Laurikkala J, Kassai Y, Pakkasjarvi L, Thesleff I, & Itoh N (2003) Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev Biol* 264(1):91-105.
97. Nieminen P, *et al.* (2001) Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 9(10):743-746.
98. Das P, *et al.* (2002) Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet* 110(4):371-376.

99. Wang Y, *et al.* (2009) Identification and functional analysis of two novel PAX9 mutations. *Cells Tissues Organs* 189(1-4):80-87.
100. Hewitt JE, Clark LN, Ivens A, & Williamson R (1991) Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7. *Genomics* 11(3):670-678.
101. Jumlongras D, *et al.* (2001) A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 69(1):67-74.
102. Kim JW, Simmer JP, Lin BP, & Hu JC (2006) Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 85(3):267-271.
103. De Muyneck S, *et al.* (2004) A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet A* 128A(4):401-403.
104. Chishti MS, Muhammad D, Haider M, & Ahmad W (2006) A novel missense mutation in MSX1 underlies autosomal recessive oligodontia with associated dental anomalies in Pakistani families. *J Hum Genet* 51(10):872-878.
105. Nieminen P, *et al.* (2003) MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J Dent Res* 82(12):1013-1017.
106. Dahl E, Koseki H, & Balling R (1997) Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 19(9):755-765.
107. Neubuser A, Koseki H, & Balling R (1995) Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev Biol* 170(2):701-716.
108. Peters H, Neubuser A, & Balling R (1998) Pax genes and organogenesis: Pax9 meets tooth development. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:38-43.
109. Klein ML, Nieminen P, Lammi L, Niebuhr E, & Kreiborg S (2005) Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *J Dent Res* 84(1):43-47.
110. Das P, *et al.* (2003) Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet A* 118A(1):35-42.
111. Lammi L, *et al.* (2003) A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet* 11(11):866-871.
112. Zhao J, *et al.* (2007) A novel missense mutation in the paired domain of human PAX9 causes oligodontia. *Am J Med Genet A* 143A(21):2592-2597.

113. Mostowska A, Kobiela A, Biedziak B, & Trzeciak WH (2003) Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci* 111(3):272-276.
114. Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, & D'Souza RN (2006) Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet* 14(4):403-409.
115. Hansen L, Kreiborg S, Jarlov H, Niebuhr E, & Eiberg H (2007) A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. *Eur J Oral Sci* 115(4):330-333.
116. Zhao JL, *et al.* (2005) [Novel mutations of PAX9 gene in Chinese patients with oligodontia]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 40(4):266-270.
117. Mostowska A, Biedziak B, & Trzeciak WH (2006) A novel mutation in PAX9 causes familial form of molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 14(2):173-179.
118. Frazier-Bowers SA, *et al.* (2002) A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res* 81(2):129-133.
119. Carnevale F, Krajewska G, Fischetto R, Greco MG, & Bonvino A (1989) Ptosis of eyelids, strabismus, diastasis recti, hip defect, cryptorchidism, and developmental delay in two sibs. *American journal of medical genetics* 33(2):186-189.
120. Titomanlio L, *et al.* (2005) Michels syndrome, Carnevale syndrome, OSA syndrome, and Malpuech syndrome: variable expression of a single disorder (3MC syndrome)? *American journal of medical genetics. Part A* 137A(3):332-335.
121. Rooryck C, *et al.* (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nature genetics* 43(3):197-203.
122. Sirmaci A, *et al.* (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *American journal of human genetics* 87(5):679-686.
123. Keshi H, *et al.* (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol* 50(12):1001-1013.

124. Kocsis A, *et al.* (2010) Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *Journal of immunology* 185(7):4169-4178.
125. Takahashi M, *et al.* (2008) Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *Journal of immunology* 180(9):6132-6138.
126. Degn SE, *et al.* (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol* 183(11):7371-7378.
127. Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjöholm A, Matsushita M, & Jensenius JC (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol* 19(2):141-149.
128. Akarsu AN, LG (2002) Gen haritalaması: Ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl yorumlanıyor. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi (İnsan genom projesi-özel sayı):*29-39.
129. Nussbaum R.L. MRR, Willard H.F. (2007) Human Gene Mapping and Disease Gene Identification. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, (Saunders Elsevier, Philadelphia), 7th Ed, pp 207-229.
130. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, & Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(11):3443-3446.
131. http://affymetrix.com/support/downloads/manuals/500k_assay_manual.pdf
132. Al Kaissi A, *et al.* (2007) Asymmetrical skull, ptosis, hypertelorism, high nasal bridge, clefting, umbilical anomalies, and skeletal anomalies in sibs: is Carnevale syndrome a separate entity? *American journal of medical genetics. Part A* 143(4):349-354.
133. Kim JW, Simmer JP, Lin BP, & Hu JC (2006) Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *Journal of dental research* 85(3):267-271.
134. Bobola N & Engist B (2008) IGFBP5 is a potential regulator of craniofacial skeletogenesis. *Genesis* 46(1):52-59.

135. Ren H, Yin P, & Duan C (2008) IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J Cell Biol* 182(5):979-991.