

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA BAZI
MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Ebru DERELLİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2010

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ebru DERELLİ tarafından hazırlanan ‘Sendromsuz Dudak Damak Yarıklı Türk Hastalarda Bazı Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi’ adlı tez çalışması 09/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN

Gazi Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA BAZI MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Ebru DERELLİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU

Dudak ve/veya damak yarıkları konjenital (doğuştan) bozuklukların en yaygın sınıflarından birini temsil etmektedir. Farklı populasyonlarda, coğrafik yerleşim, etnik köken ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak, her 500- 2500 doğumda bir bireye etki ettiği saptanmış olan genel bir sağlık problemidir. Sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda genetik faktörlerin rollerine ilişkin çalışmaların çoğu hayvan modellerinde aday genlerin yapıları ve ekspresyon düzeylerinin araştırılması üzerine olmuştur. Bu çalışmada Türk toplumunda, başka populasyonlarda sendromsuz dudak damak yarıklı vakalarda saptanan aday genlerden $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ 'deki mutasyonların tanımlanması ve bu aday genlerin Türk populasyonundaki sıklığının saptanması amaçlanmıştır. Çalışma için 70 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta birey, 85 kontrol birey kullanılmıştır. Sendromsuz dudak damak yarıklı hastalardan elde edilen DNA'larda, $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ genlerindeki mutasyonların araştırılmasında ilgili genlere ait belirli ekzon bölgelerinin PZR'ları yapılmıştır. Ve RFLP işlemlerine geçilmiştir. $TGF\alpha$ geni için elde edilen PZR ürünü $HinfI$ restriksiyon enzimi, $TGF\beta_3$ geni için elde edilen PZR ürünü $XapI$ enzimi ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak; $TGF\alpha$ geni için sendromsuz dudak damak yarıklı oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.0365$, $p<0.05$). Fakat $TGF\beta_3$ geni için sendromsuz dudak damak yarıklı oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.618$, $p>0.05$). Türk toplumunu içeren daha fazla çalışmaya, özellikle her toplumda olduğu gibi Türk toplumunda da dudak damak yarıklı vakaların incelenmesinde çevresel faktörlerin ve bundan sonraki araştırmalarla ortaya çıkarılabilecek moleküler etmenlerin göz önünde bulundurulduğu genetik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Haziran 2010, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sendromsuz dudak yarığı ve/veya damak yarığı, PZR, RFLP, $TGF\alpha$, $TGF\beta_3$.

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF SOME MUTATION TYPES IN TURKISH PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP AND/OR PALATE

Ebru DERELLİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU

Cleft lip and/or cleft palate is among the most common of all major birth defects, occurring with an incidence of 1/500 to 1/2500 in different populations, varying with geographic location, ethnic group, and socioeconomic conditions. Nonsyndromic cleft lip and/or palate in the formation, most of the studies happened concerning the genetic factors, construct and expression levels to investigate of candidate genes in the animal models. In this study, Turkish population, nonsyndromic cleft lip and palate cases in other population was determined from candidate genes in $TGF\alpha$ and $TGF\beta_3$ describe to mutations and to determine this candidate genes frequency in Turkish population. For study, 70 cleft lip and palate cases, 85 control individuals was used. DNA obtained from nonsyndromic cleft lip and palate patients, investigations of $TGF\alpha$ and $TGF\beta_3$ the PCR product obtained for genes mutations, PCR made of certain exon regions. And RFLP procedures were passed. The PCR product obtained for $TGF\alpha$ gene with $HinfI$ restriction enzyme, the PCR product obtained for $TGF\beta_3$ with $XapI$ restriction enzyme was treated. As a result, for $TGF\alpha$ gene in terms of the formation of nonsyndromic cleft lip and palate, was found significant difference between patient and control group ($p=0.0365$, $p<0.05$). But for $TGF\beta_3$ gene in terms of the formation of nonsyndromic cleft lip and palate, was not found significant difference between patient and control group ($p=0.618$, $p>0.05$). Turkish society with more work, especially in every society, as well as in Turkish society cleft lip and palate cases with analysis of environmental factors and subsequent investigations revealed to be the molecular factors taken into consideration are needed genetic studies.

June 2010, 49 pages

Key Words: Nonsyndromic cleft lip and/or palate, PCR, RFLP, $TGF\alpha$, $TGF\beta_3$.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, yetişmemde emeği geçen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN'a (Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Osman KETENOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), agaroz jel elektroforez görüntülenmesi işlemlerinde önemli katkıda bulunan Prof. Dr. Nuri YİĞİT ve çalışma ekibine (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), tez yazım aşamasında önerileri ile katkı sağlayan Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), çalışma grubumuzun oluşturulmasında katkı sağlayan Prof. Dr. Erhan ÖZDİLER'e (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı), istatistiksel işlemlerimizi gerçekleştiren Zeynep BIYIKLI'ya (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı) ve çalışmalarım sırasında birçok fedakarlık göstererek beni destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ebru DERELLİ

Ankara, Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Dudak ve Damağın Embriyolojik Gelişimi.....	3
2.2 Dudak Damak Yarıklarının Sınıflandırması ve Embriyolojik Temeli	6
2.3 Dudak Damak Yarıklarının Etiyolojisi.....	8
2.4 Dudak Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi	8
2.5 Sendromsuz Dudak Damak Yarıklarında Çevresel ve Genetik Faktörler.....	9
2.5.1 Sendromsuz dudak damak yarıklarında çevresel faktörler	9
2.5.2 Sendromsuz dudak damak yarıklarında genetik faktörler.....	11
2.5.3 TGF α geni	14
2.5.3.1 TGF α geninin yapısı.....	14
2.5.3.2 TGF α gen ifadesi	14
2.5.4 TGF β 3 geni	15
2.5.4.1 TGF β 3 geninin yapısı	15
2.5.4.2 TGF β 3 gen ifadesi	16
2.6 Dudak Damak Yarığı Hastalarındaki Mutasyonların Saptanması İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler	18
2.6.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	18
2.6.2 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP).....	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Çalışma grubu	22
3.1.2 Kimyasal malzemeler.....	22

3.1.3 Çalışmada kullanılan gereçler ve cihazlar	23
3.1.4 Solüsyonlar	23
3.1.4.1 Periferel kandan DNA izolasyon tamponları	23
3.1.4.2 Agaroz jel elektroforez solüsyonları.....	25
3.2 Yöntem	25
3.2.1 Periferel kandan fenol kloroform yöntemi ile DNA izolasyon yöntemi.....	25
3.2.2 PZR ile TGF α ve TGF β 3 genlerindeki mutasyonların analizi	26
3.2.2.1 Amplifikasyonda kullanılacak primerlerin seçimi	27
3.2.2.2 PZR koşulları.....	27
3.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi.....	29
3.2.4 PZR/RFLP işlemleri	30
3.2.4.1 PZR/RFLP ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi	31
3.2.5 İstatiksel analiz.....	31
4. BULGULAR	32
4.1 TGF α ve TGF β 3 Genlerinin Amplifikasyon Sonuçları	32
4.2 TGF α ve TGF β 3 Genlerinin RFLP Sonuçları.....	33
4.3 TGF α ve TGF β 3 Genleri İçin Elde Edilen Genotip Sonuçları	34
4.4 Allel ve Genotip Frekanslarının Hesaplanması.....	35
4.5 Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
IRF6	Interferon Düzenleyici Faktör 6
MSX1	Muscle Segment Homolog Proteini 1
TGF α	Transforme Edici Büyüme Faktörü alfa
TGF β 3	Transforme Edici Büyüme Faktörü beta 3
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
PVRL1	Poliovirüs Reseptör İlişkili Protein 1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	Kırmızı Kan Hücresi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STE	Sodyum Tris EDTA
TE	Tris EDTA
TBE	Tris-Borate EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hamileliğin 4. ve 5. haftalarında yüz gelişimi.....	4
Şekil 2.2 Yüz gelişiminde 6., 7. ve 8. haftalar	4
Şekil 2.3 Primer damak sınıflandırması.....	7
Şekil 2.4 Sekonder damak sınıflandırması.....	7
Şekil 2.5 Primer-Sekonder damak yarıkları.....	8
Şekil 2.6 TGF α geninin kromozom 2 üzerindeki yeri	14
Şekil 2.7 TGF β_3 geninin kromozom 14 üzerindeki yeri	16
Şekil 2.8 İnsanda embriyonik dönemde 7. ve 9-10. haftalarda TGF β_3 gen ifadesi.....	17
Şekil 2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	20
Şekil 2.10. Restriksiyon endonükleaz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılan ürünün kesilip agaroz jelde görüntülenmesi.....	21
Şekil 4.1 TGF α geni amplifikasyonu agaroz jel görüntüsü	32
Şekil 4.2 TGF β_3 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntüsü	32
Şekil 4.3 TGF α geni HinFI restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü kesimi agaroz jel görüntüsü	33
Şekil 4.4 TGF β_3 geni XapI (ApoI) restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü kesimi agaroz jel görüntüsü	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Baş ve yüz gelişiminde rol oynayan faktörler.....	3
Çizelge 3.1 TGF α geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler	27
Çizelge 3.2 TGF β_3 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler	27
Çizelge 3.3 Amplifikasyonda kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu miktar ve karışım şartları.....	28
Çizelge 3.4 TGF α geninin amplifikasyonunda kullanılan PZR döngü basamakları.....	28
Çizelge 3.5 TGF β_3 geninin amplifikasyonunda kullanılan PZR döngü basamakları.....	29
Çizelge 3.6 TGF α geni ve TGF β_3 geni restriksiyon endonükleaz enzimi reaksiyon karışımları	30
Çizelge 4.1 TGF α geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler	34
Çizelge 4.2 TGF β_3 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler	35
Çizelge 4.3 TGF α geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri.....	35
Çizelge 4.4 TGF β_3 geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri.....	36
Çizelge 4.5 TGF α geni hasta ve kontrol grubu için χ^2 testi.....	37
Çizelge 4.6 TGF β_3 geni hasta ve kontrol grubu için χ^2 testi	37

1. GİRİŞ

Dudak ve/veya damak yarıkları konjenital (doğuştan) bozuklukların en yaygın sınıflarından birini temsil etmektedir. Farklı popülasyonlarda, coğrafik yerleşim, etnik köken ve sosyoekonomik koşullara bağlı olarak, her 500-2500 doğumda bir bireye etki ettiği saptanmış olan genel bir sağlık problemidir (Spritz 2001).

Günümüzde dudak ve damakta yarıklık oluşumunun genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği veya her iki faktörün de yarıklık oluşumunda birlikte etkisinin olduğu kabul edilmektedir (Murray 2001).

Orofasiyal yarıklar (baş ve yüzle ilgili olan yarıklar) eğer başka bir sendromla beraber görülüyorsa sendromik, görülüyorsa ise sendromsuz (izole) dudak damak yarığı olarak adlandırılır. Dudak damak yarıklarının, yaklaşık olarak %70'inde izole, kendiliğinden oluşan bozukluklar izlenirken, %30'unun da 400'den fazla tanımlanmış olan sendromik olgudan birinin bulunduğu saptanmıştır. Aday genlerin tanımlanmasında öncülük eden bu sendromlar genellikle basit Mendelyan kalıtımına sahiptir (Rajion ve Alwi 2007).

Sendromsuz yarıklar “sadece dudak yarığı” (CLO, cleft lip only), “sadece damak yarığı”(CPO, cleft palate only), “dudak ve damak yarığı” (CLP, cleft lip and palate) olarak fenotiplere ayrılabilir (Morknien vd. 2006).

Meydana gelen bozuklukların temel nedeni nazal boşluk ile oral boşluğun gelişim sırasında tam olarak ayrılamamasıdır (Gorlin vd. 2001, Carinci vd. 2007). Bu hastalar doğumlarından hemen sonra konuşma, beslenme zorlukları, orta kulak enfeksiyonları gibi sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalmaktadırlar (Moore 1988, Stainer ve Moore 2004). Tedavileri uzun ve genellikle multi-disipliner olarak doğumdan sonra ergenliğe kadar devam eder ve şiddetli vakalar birden fazla cerrahi müdahale ile normale döndürülmeye çalışılır (Christensen vd. 2004).

Bugüne kadar, Asya, Avrupa, Güney ve Kuzey Amerika'daki sendromsuz dudak damak yarıklı bireylerde aday genlerin saptanması ve haritalanması konusunda çok sayıda araştırma yapılmış ve Transforme edici büyüme faktörü alfa ($TGF\alpha$) ve Transforme edici büyüme faktörü beta 3 ($TGF\beta_3$) genlerindeki mutasyonlar haritalanmış ve sıklıkları hesaplanmıştır (Tanabe vd. 2000, Jugessur vd. 2003, Vieira vd. 2003, Suzuki vd. 2004, Reutter vd. 2008).

Bu çalışmada Türk toplumunda, başka populasyonlarda sendromsuz dudak damak yarıklı vakalarda saptanan aday genlerden $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ 'deki mutasyonların tanımlanması ve bu aday genlerin Türk populasyonundaki sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Dudak ve Damağın Embriyolojik Gelişimi

Baş ve yüz gelişimi, birçok sinyal iletim sistemini, büyüme faktörleri ve onların reseptörlerini, transkripsiyon faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks komponentlerini içine alan oldukça karmaşık bir metabolik gelişim sistemidir (Çizelge 2.1), (Stainer ve Moore 2004).

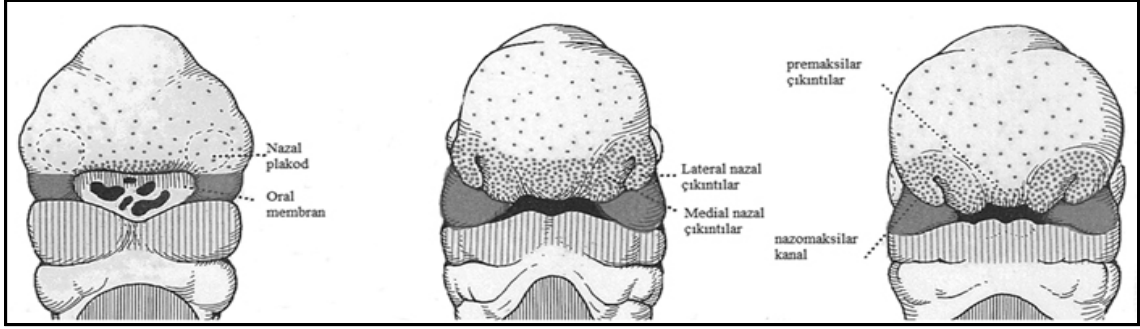
Çizelge 2.1 Baş ve yüz gelişiminde rol oynayan faktörler (Stainer ve Moore 2004)

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

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

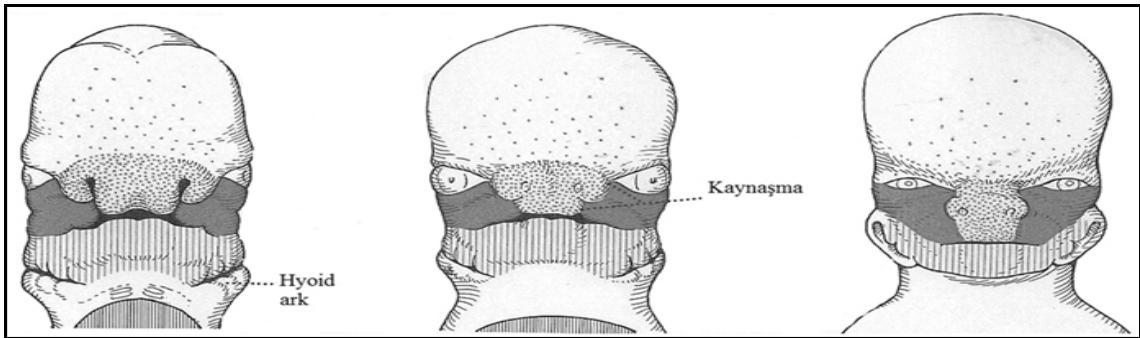
Erken embriyonik safhada anterior nöropod kapatılır, oral membran kaybolur ve olfaktori (koku alma ile ilgili) plakodlar belirgin değildir. Pentagonal stomedium göz kadehleri, maksillar ve mandibular merkezler, ilk farengial arklar ve ektodermle kaplı ön beyin şekillenir (Jirasek 2004).

Gebeliğin 4. haftasında nazal çıkıntılar medial ve lateral nazal yapıları oluşturur (Şekil 2.1), iki yapının ortasında ise, ileride burun deliklerini ortaya çıkaracak olan nazal girintiler oluşur (Moore 1988).



Şekil 2.1 Hamileliğin 4. ve 5. haftalarında yüz gelişimi (Wyszynski 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

Geç embriyonik safhada primer damak kapandıktan sonra, gebeliğin 6-7. haftaları boyunca nazal çukurun premaksillar ve lateral kısımları burun deliklerine anterior olarak (ön kısma doğru) kaynaşır ve nazal çıkıntılarının ve maksillar primordianının, premaksillar kısımları primer damağın her bir kısmında kaynaşır. Sağ ve sol premaksillar kısımlar arasındaki çentik nazal kapsülün septal mezenşimiyle doldurulur. Nazal kapsül burunun dorsum (arka) ve uç noktasına katılır. Göz yarıkları göz kapaklarının kaynaşmasıyla kapanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Yüz gelişiminde 6., 7. ve 8. haftalar (Wyszynski 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

9. haftada, yani fetal safhada, bilateral (çift taraflı) damak rafı, dil etrafında hareket ederek, birbirleriyle ve nazal bölmeyle kaynaşarak horizontal (yatay) biçimde değişim gösterir. Bu işlem orta hat epiteli (mes: medial edge epithelium) tamamen kaybolduğunda sona ermektedir (Wong ve Hägg 2004).

Damak nazal epiteli yalancı tabakalı silli epitele, oral kısımdaki hücreler keratinleşmemiş çok katlı yassı epitele farklılaşır. Bu arada yumuşak damak gelişir ve sonrasında kemikleşmeyle birlikte sert damak meydana gelir (Meng vd. 2009).

Dudağın embriyolojik gelişimi damağa kıyasla daha basittir. Alt dudaklar mandibular çıkıntılardan ve yaklaşık 11- 12. haftalarda meydana gelmektedir (Murray 2001, Stainer ve Moore 2004). Üst dudak maksillar çıkıntı tarafından oluşturulur. Maksillar çıkıntılar mediyale göç ederken lateral ve mediyal nazal çıkıntıları da mediyale doğru iter. Nazal çıkıntılar mediyalde birleşerek üst dudak filtrumu ve Cupid yayı, burun ucu ve ön kısmı meydana gelir. Aynı zamanda maksillar çıkıntılarının yardımıyla ve nazal çıkıntılarla birleşmesiyle premaksilla ve primer damak oluşur. Hareketlerine devam eden maksillar çıkıntılar üst dudak ve üst yanak gelişimini sağlar. Tek taraflı dudak yarığı mediyal nazal ve maksillar çıkıntılarının birleşme kusurlarından meydana gelir. Çift taraflı dudak yarığında da iki tarafta nazal çıkıntılar maksillar çıkıntılarla birleşmemektedir (Moore 1988, Jones 1997, Kerrigan vd. 2000).

Fasiyal primordianın normal gelişimini sinyal etkileşimleri kontrol etmektedir. Yapılan fare mutant modellemeleri ve insan çalışmaları da büyüme faktörleri, hücre dışı matriks proteinleri, hücre adezyon molekülleri gibi gen ürünlerinden oluşan faktörlerin sıkı kontrolü altındaki damak gelişiminde, bölgesel düzenlemelerde görev yaptıklarını ortaya koymaktadır (Meng vd. 2009). Bu faktörler gen ekspresyonunun gelişimsel olarak anlamlı oluşuyla sonuçlanan, hücre içi ve hücreler arası olaylarda etkileşime girmektedirler. Burada sözü edilen genlerin yapılarında meydana gelebilecek bozukluklar ve hatalar dudak damak yarıklarına neden olmaktadır.

Özellikle gebeliğin 30–37. günleri arasında maksillar (çene kemiğine ait) ve lateral nazal çıkıntılarının, orta nazal çıkıntı ile meydana gelen füzyonunun duraklaması dudak yarıklarının meydana gelmesine yol açar (Wong ve Hägg 2004).

Gebeliğin 50–60. günleri arasında damak raflarının orta hatta ve yatay düzlemde oluşan füzyonunun duraklaması ise damak yarıklarının meydana gelmesine neden olur (Wong ve Hägg 2004).

2.2 Dudak Damak Yarıklarının Sınıflandırması ve Embriyolojik Temeli

Günümüze kadar birçok sınıflandırma yapılmış olmasına rağmen klasik bir sınıflandırma henüz tanımlanamamıştır. Ancak başka bir sendromla beraber görülüp görülmemesine göre oral (ağız) yarıklarını iki grupta toplayabiliriz;

Sendromsuz (İzole) Oral Yarıklar: Bireylerde herhangi bir kusur bulunmadan sadece dudak damak yarıkları veya sadece damak yarığının bulunmasıdır.

Sendromik (İzole Olmayan) Oral Yarıklar: Bireylerde başka bir kusur ile ortaya çıkan dudak damak yarıkları veya sadece damak yarıklarıdır.

Sendromik ve non-sendromik oral yarıklar:

- Primer (Ön) damak yarıkları
- Sekonder (Arka) damak yarıkları
- Primer-Sekonder damak yarıkları
- Tek taraflı (unilateral) damak yarıkları
- İki taraflı (bilateral) damak yarıkları (Moore 1988)

Primer Damak Yarıkları: Lateral damak çıkıntılarını oluşturan mezenşim hücrelerinin kendi aralarında ve primer damaktaki mezenşim hücreleri ile tam olarak birleşmemesinden dolayı meydana gelen yarıktır (Wong ve Hägg 2004), (Şekil 2.3).

A



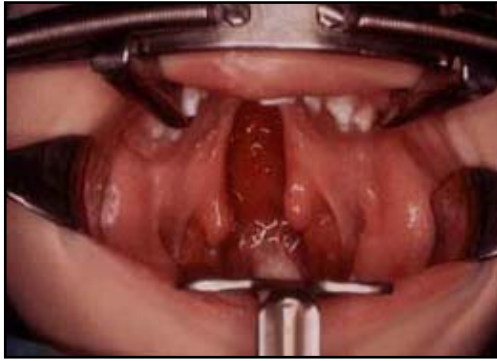
B



Şekil 2.3 Primer damak sınıflandırması (A: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-65/issue-5/279.html>, Erişim Tarihi: 13.02.2009. B: Stoll vd. 2004)

Sekonder Damak Yarıkları: Lateral damaktaki mezenşim hücrelerinin birbirleriyle ve nazal septumla birleşememesiyle meydana gelmektedir (Wong ve Hägg 2004), (Şekil 2.4)

A



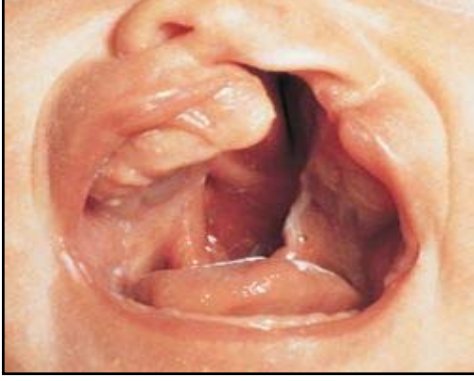
B



Şekil 2.4 Sekonder damak sınıflandırması (A: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-65/issue-5/279.html>, Erişim Tarihi: 13.02.2009. B: Stoll vd. 2004)

Primer-Sekonder Damak Yarıkları: Lateral damak çıkıntılarını oluşturan mezenşim hücrelerinin hem kendi aralarında, hem de primer damak mezenşimi ve nazal septum hücreleri ile birleşememesinden meydana gelirler (Wong ve Hägg 2004, Vieira 2008) (Şekil 2.5).

A



B



Şekil 2.5 Primer - Sekonder damak yarıkları A: Unilateral, B: Bilateral (A: [http://emedicine.medscape.com/article/837347 - media](http://emedicine.medscape.com/article/837347-media), Erişim Tarihi: 09.02.2009, B: Stoll vd. 2004)

2.3 Dudak Damak Yarıklarının Etiyolojisi

Fasiyal yarıkların oluşumuyla ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen etiyolojisi ve patojenitesi hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Ancak dudak damak yarıklarının genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği bilinmektedir. Tek yumurta ikizlerinde dudak damak yarıkları oluşumunun %100 uyumlu olmaması (diskordans) genetik faktörlerin tek başına etkili olmadığını göstermektedir (Murray 2001, Vieira 2008).

Gebelik döneminde beslenme alışkanlığı, anti-epileptik ilaç, içki ve sigara kullanımı, folik asit ve multivitamin eksiklikleri, viral enfeksiyonlar gibi genetik olmayan çevresel faktörlerin etkisi araştırılmış olmasına rağmen sorunun genetik temeline dayanan çalışmalar ön plana çıkmıştır (Wyszynski ve Beaty 1996, Wong ve Hägg 2004).

2.4 Dudak Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi

Dudak damak yarıklarının değişik ırklarda insidansları farklıdır ve ortalama olarak 1/700 olarak bildirilmiştir (Murray 2001). Afrikalı ve Afrika kökenlilerde oran daha düşük, Amerikalı Hintliler, Japonlar ve Çinlilerde ise daha fazladır (Mossey ve Little 2002). Sendromsuz dudak damak yarığı beyaz ırkta 0,7- 1/ 1000, Çinlilerde 1,7/ 1000,

Kore’ de 1,87/ 1000, Japonlarda 2,1/ 1000, Türkiye’de 0,95/ 1000 olarak belirtilmiştir (Kim vd. 2002, Van Rooj vd. 2003, Tunçbilek vd. 2004). Dudak yarığı vakasının sıklığı ortalama 1/300, sadece damak yarığı ortalama 1/ 1500 ve her iki vakanın bir arada bulunma sıklığı da ortalama 1/ 2500’ tür. Finlandiya’ da damak yarığı sıklığı 1/1000, kuzey-doğu Fransa’da 0,41/1000, İtalya’da 0,34/1000 olarak görülmüştür. Oranların bu kadar değişik olmasının nedenleri arasında coğrafik, etnik köken ve kalıtım kalıplarının farklılıkları olabileceği gibi, fasiyal yarığın tipine göre de farklılık görülmektedir. Yarık dudaklı hastaların %50 sinde yarık damak bulunmaktadır (Wyszynski ve Beaty 1996, Murray 2001, Stainer ve Moore 2004).

2.5 Sendromsuz Dudak Damak Yarıklarında Çevresel ve Genetik Faktörler

2.5.1 Sendromsuz dudak damak yarıklarında çevresel faktörler

Dudak damak yarıklarının oluşumunda birçok teratojen etken ile ilgili çalışma yapılmıştır. Bu faktörler arasında en fazla çalışılanlar gebelik sırasında maternal sigara ve alkol kullanımı, vitamin ve özellikle folik asit eksikliği, viral enfeksiyonlar ve bazı ilaçlardır (Spritz 2001). Bu faktörlere annenin gebeliği sırasında maruz kalma sıklığı, maruz kalınan faktörün dozajı ve gebelik süresi, meydana gelebilecek fetal kusurların şiddetini değiştirebilmektedir.

Alkol: Alkolün fetus üzerindeki etkisi “fetal alkol sendromu” olarak bilinir. Maternal alkol kullanımının fetus üzerindeki etkileri arasında zeka geriliği, baş yüz sorunları, kalp ve ürogenital sistem bozuklukları sayılabilir (Jones 1997). Alkolden etkilenen fetal yapıların ortak özelliği nöral krest hücrelerinden köken almalarıdır. Bugüne kadar alkol ile dudak damak yarıkları arasında pozitif ilişki bulunan çalışmalar olmasına rağmen (Munger vd. 1996, Beaty vd. 2001, Loffredo vd. 2001), tersine herhangi bir ilişkinin bulunmadığı da çalışmalarda bildirilmiştir (Shaw ve Lammer 1999).

Sigara: Dudak damak yarık oluşumunda ise maternal sigara kullanımı en fazla çalışılmış olan teratojenik faktördür (Werler vd. 1997). Sigara kullanımının etkileri farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (Murray 2001, Stainer ve Moore 2004, Bille vd.

2005). Sigaranın yarık oluşumunu etkilediğini bildiren çalışmalar olduğu gibi (Wyszynski ve Beaty 1996, Lieff vd. 1999, Chung vd. 2000, Wyszynski ve Diehl 2000) etkilemediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Malloy vd. 1989, Lieff vd. 1999). Yapılan bir araştırmada, sigara kullanımının dudak damak yarığı oluşumuna etkisi %4, çift taraflı dudak damak yarığı oluşumuna ise etkisinin %12 olduğu bildirilmiştir. Sigara içen gebelerdeki başlıca sorun kan karboksihemoglobin yükselmesine bağlı olarak fetüste hipoksinin görülmesidir. Bu vakalarda prematüre doğumlar olabileceği gibi düşük ağırlıklı doğumların da görülebileceği belirtilmiştir (Honein vd. 2007).

Folik asit kullanımı: Araştırmacılar hamileliğin ilk zamanlarında folik asit kullanımı ve multivitaminlerin hiç kullanılmamasının dudak damak yarığı oluşumunda 3 kat daha fazla etkili olabileceğini saptamıştır (Tolarova ve Haris 1995). Ayrıca yapılan araştırmalarda, TGF α /TaqI C2 genotipiyle birlikte folik asit eksikliğinin ayrıca dudak damak yarığı oluşumu riskini arttırabileceği bulunmuştur (Bertoja vd. 2008).

Bununla beraber düşük miktardaki folik asit alımının ise bu bozukluğun oluşmasını önleyemeyeceği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Dudak damak yarıklarının folik asit kullanımına bağlı olarak önlenmesi amacıyla annenin hamilelik periyodu boyunca, araştırmalarda saptanan % 65'lik oran göz önünde bulundurularak günlük 10 mg folik asit ilavesine ihtiyaç duyulmaktadır (Wong ve Hägg 2004).

İlaçlar: Özellikle antikonvülzan ilaç kullanan annelerin çocuklarında konjenital anomaliler oldukça sık görülmektedir. Yapılan çalışmalar gebeliğin birinci trimesterinde fenitoin, karbamazepin gibi folik asit antagonisti olan ilaçların kullanımının dudak damak yarıklı çocuk doğurma riskini arttırdığını belirtmiştir (Park-Wyllie vd. 2000).

Antikoagülanlar kanın pıhtılaşmasını önleyen ilaçlardır. Bunlardan aspirin tüketiminin, dudak damak yarığı oluşumun etiolojisinde hamileliğin ilk 3 ayı boyunca etkili olduğu önerilmiştir. Ancak hayvan ve insan deneylerinin epidemiyolojik verileri, hamile kadın ve gelişen fetusta ters etkinin direkt kesin kanıtını sağlamamıştır (Chung vd. 2000).

Steroidler: Dudak damak yarıklarının oluşmasında etkileri olan ilaçlardan steroidler, kadınlarda hamilelik dönemlerinde meydana gelen birçok durumun tedavisi için ilk safhada kullanılan ilaçlardır. Hayvanlar üzerinde yapılan birçok araştırmada steroidlerin kullanımı sonucu döllerde meydana gelen yarık oluşumuna dair bilgiler net bir şekilde rapor edilmiştir (Martinelli vd. 2004). Yapılan deneylerde fare damaklarının gelişiminde özellikle ekzojen glukokortikoidlerin hücre içerisindeki varlığında ve yokluğunda, glukokortikoide duyarlı, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 ve EGF-R genlerinin gelişimsel olarak ifadesi analiz edilmiştir. Bu moleküller hücre üremesini engellediği bilinen damak TGF-beta 2 transkriptinin aşağı regülasyonunu geciktirmektedir (Park-Wyllie vd. 2000).

2.5.2 Sendromsuz dudak damak yarıklarında genetik faktörler

Sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda genetik faktörlerin rollerine ilişkin çalışmaların çoğu hayvan modellerinde aday genlerin yapıları ve ekspresyon düzeylerinin araştırılması üzerine olmuştur. Ayrıca ilişki görülen aday genler ile dudak damak yarığına sahip bireylerdeki, bu gene ait mutasyonların saptanması da çalışmanın devamı niteliğindedir. Dudak damak yarığının çok etkenli bir sendrom olduğu bilinmektedir ve gerek etkin genetik faktörler, gerekse teratojenlerin genetik yapı üzerindeki etkisi halen çalışılmaktadır. Aile hikayesi bulunan bireylerde yapılan bağlantı çalışmalarıyla da yeni bölgeler ile dudak damak yarığı arasındaki ilişkiler saptanmaya çalışılmaktadır. Bugüne kadar yapılan genetik çalışmalarda ön plana çıkan aday genler aşağıda verilmiştir;

PVRL1: Yüz ve damak gelişiminde ifade edilen, hücre adezyon molekülü, Poliovirüs reseptör ilişkili protein (PVRL1)'de mutasyonlar tanımlanmıştır ve yerleşim olarak 11q23 lokusunda yer alır (Stainer ve Moore 2004). PVRL1 geni nektin adı verilen ve hücre adezyonunda görev alan integrin membran proteini kodlar. Aynı zamanda nektin1 proteini alfa- herpes virüsleri için hücre yüzey reseptörüdür. Bugüne kadar üç farklı ektodermal displazi-dudak damak yarık vakasına neden olan PVRL1 gen mutasyonu tanımlanmıştır (Suzuki vd. 2000, Scapoli vd. 2006). Başka bir çalışmada PVRL1 genindeki W185X mutasyonu Kuzey Venezuela'lı populasyonda oldukça yüksek

çıkılmış ve bu genin dudak damak yarığı için risk teşkil edebileceği bildirilmiştir (Sozen vd. 2001). Yapılan benzer çalışmada İtalyan popülasyonunda, sendromsuz dudak damak yarığı için risk faktörü olmadığı belirtilmiştir (Scapoli 2005).

TGF α : TGF α , C2 allelinin dudak damak yarığı oluşumu ile bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar, TGF α C2 allelinin risk faktörleri arasına alınması gerektiğini göstermiştir (Shiang vd.1993, Feng vd. 1994, Jugessur vd. 2003).

TGF β 3: Dudak damak yarıkları ile ilgili yapılan bağlantı analizlerinde TGF β 3 gen lokusu ile dudak damak yarığı arasında anlamlı bir ilişki ortaya çıkmasından sonra bu gen ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Vieira vd. (2003), makalelerinde bu gen ile dudak damak yarığı, Jugessur vd. (2003), makalelerinde bu gen ile dudak damak yarığı arasında kuvvetli ilişki bulmuştur.

IRF6: Kromozomal lokusu 1q32.3-q41 olan İnterferon düzenleyici faktör 6 (IRF6), viral enfeksiyondan sonra interferon alfa ve ve betanın ekspresyonunu regüle eden dokuz transkripsiyon faktöründen biridir. Dudak damak yarığı ile son yıllarda yapılan en etkili çalışmalar, dudak damak yarığı ile IRF6 varyasyonları arasındaki ilişkinin saptanmasıdır (Zuccherro vd. 2004, Scapoli 2005). IRF6 sadece sendromsuz dudak damak yarığının oluşmasından değil, aynı zamanda sendromik dudak damak yarığının da oluşmasında etkin olan faktörlerden biridir (Carinci vd. 2007). IRF6 ile dudak damak yarığı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla farklı popülasyonları içine alan birçok çalışma yapılmış ve IRF6'nın sadece dudak damak yarığı değil, diş eksikliğinin de sorumlu genlerinden biri olduğu gösterilmiştir (Vieira vd. 2007).

MSX1: Kromozomal lokusu 4p16.3-p16.1 olan Muscle segment homolog proteini 1 (MSX1) geni, homeobox içeren genlerin ailesine dahil olan transkripsiyon faktörüdür. MSX ailesinin protein üyelerinin başlıca sinir sistemi gelişimi, kraniyofasiyal gelişim, odontogenez, tümör büyüme inhibisyonu ve kol- bacak gelişimlerinde önemli modüle edici görevleri vardır (Catron vd. 1993, Bendall vd. 1999). Sendromsuz dudak damak yarığı ile MSX1 gen ilişkisini saptamaya yönelik çalışmalar ilk olarak Lidral (1997), tarafından başlatılmıştır. Sonraki çalışmalar da MSX1 geni ve sendromsuz dudak damak

yarığı oluşunu ile intron bölgesindeki CA tekrarlarının varlığına göre allelik varyasyon analizleri yapılmış ve aralarında ilişkiler bulunmuştur (Romitti 1999). Günümüzde halen MSX1 geninin rolü net olarak anlaşılamasa da, sendromsuz dudak damak yarığı oluşumunda tek başına değil, diğer genler ile etkileşerek etki gösterdiği düşünülmektedir (Vieira 2005).

MTHFR: Kromozomal lokusu 1p36.3 olan Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni, konjenital anomaliler ve nöral tüp defektleri ile belki de en fazla ilişkisi olan gendir. Tolarova vd. (1998), makalelerinde 92 sendromsuz dudak damak yarıklı kardeş çiftlerinde yaptığı çalışmada MTHFR 677C-T varyantının bulunduğu bölgenin dudak damak yarığı ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada 38 İtalyan ailede MTHFR gen bölgesi dudak damak yarığı oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (Van Rooj vd. 2003). Arruda vd. (1998), makalelerinde dudak damak yarığına sahip olgularda, TT genotipinin c kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Farklı toplumlarda MTHFR TT alleli ile dudak damak yarığı arasında pozitif ilişki bulunmasına rağmen (Arruda vd. 1998, Martinelli vd. 2001, Van Rooj vd. 2001, Van Rooj vd. 2003), bazı çalışmalarda bu ilişki bulunamamıştır (Catron vd. 1993, Blanton vd. 2002).

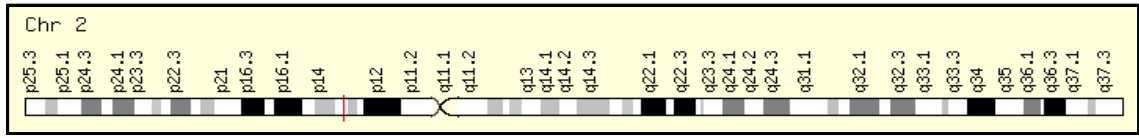
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) genlerinin sendromsuz dudak damak yarığı oluşumunda en fazla %3' lk etkisi olduğu bildirilmiştir (Riley vd. 2007). Son yıllarda FGF ile ilgili çalışmalar da önem kazanmaya başlamıştır.

SUMO1: Sumo ve ubiquitin proteinleri birçok hücresel proteini modifiye ederek onların metabolizmaları ve fonksiyonlarına etki ederler. Ubiquitin, proteinlerin yıkılmasını sağlarken sumo proteinleri etki ettikleri proteinlerin nüklear transport, transkripsiyon regülasyonu, apoptozis gibi hücresel fonksiyonlarını düzenler (Scapoli vd. 2006). Yapılan alışmalarla SUMO genlerinin farelerde 13,5. embriyonik günde üst dudak, primer ve sekonder damak dokularında ifade edilmesi SUMO1' in dudak damak yarığı oluşumundaki önemini arttırmıştır (Alkuraya 2006). Sonraki çalışmalarda ise SUMO1' in MSX1 genini regüle ettiği bildirilmiştir (Gupta ve Bei 2006).

2.5.3 TGF α geni

2.5.3.1 TGF α geninin yapısı

Kromozomal lokusu 2p13 olan TGF α ; çok iyi tanımlanmış, bir memeli büyüme faktörüdür. Genomik DNA'nın 80 kilobazını oluşturur ve 6 ekzondan oluşur. (Büyüklikleri: ekzon 1, 40 bp; ekzon 2, 57 bp; ekzon 3, 118 bp; ekzon 4, 150 bp; ekzon 5, 110 bp) (Vieira 2006), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 TGF α geninin kromozom 2 üzerindeki yeri (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFB3&search=TGFA> Erişim Tarihi: 12.10.2009)

2.5.3.2 TGF α gen ifadesi

Damak epitelyum ve mezenşimi aracılığıyla ifade edilen TGF α geni, ekstrasellüler matriks biyosentezini uyarırken, kraniyofasiyal gelişim süresince, damak raf erimesinin orta hat epitelinde ifade edilir (Stainer ve Moore 2004, Vieira 2006).

Farelerde damak oluşumu süresince TGF α ifade edilmesine rağmen, TGF α geninin sessiz (null) mutasyonu ile fareler anormal deri, saç ve gözlere sahip, fakat ağız yarıklarına sahip değildir. Epidermal büyüme faktör reseptör negatif/negatif yeni doğan fareler damak yarığının yüksek oluşumuna sahiptir, ve bu TGF α polimorfizmleri ile insan ağız yarıklarının genetik korelasyonunu açıklayabilir, çünkü TGF α epidermal büyüme faktörü reseptörü için muhtemel bir ligandır (Vieira 2006).

Ardinger vd. (1989), makalelerinde bir vaka-kontrol çalışmasıyla TGF α geninin sendromsuz dudak damak yarıkları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Diğer populasyonlardaki takip eden çok sayıda çalışma karışık sonuçlar sağlamaktadır.

Machida vd. (1999), makalelerinde sendromsuz dudak damak yarıklı bir grup hastada TGF α genine ait sekans analizi yapmıştır ve orofasiyal yarıkla etiyolojik olarak ilişkili olabilecek beş mutasyon bulmuştur.

Sendromsuz dudak damak yarıklı hastalardaki TGF α mutasyonunun karmaşık etkileri ve çevresel faktörler birçok araştırmacı tarafından analiz edilmiştir. Nadir TGF α varyantı (TaqI C2 allel) ve maternal sigara kullanımı damak yarığı riskini 6/8 (%75) ve dudak ve/veya damak yarığı riskini iki kat arttırmaktadır. Hamileliğin ilk üç ayı boyunca multivitaminler alınmazsa ve bebek TGF α TaqI C2 allelini taşıyorsa, dudak ve/veya damak yarığı için göreceli risk 3/8 (%37,5) oranında artmaktadır (Wong ve Hägg 2004).

Brezilya popülasyonunda TGF α /TaqI polimorfizmi ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada hastaların çoğunda 114 (%81,4) C1C1 (iki normal allel) genotipi görülmüştür. 25 (%17,9) hastada C1C2 (bir normal bir mutant allel) genotipi ve 1 (%0,7) hastada C2C2 genotipine rastlanmıştır. TGF α /TaqI polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır (Bertoja vd. 2008). İtalyan popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise TGF α /TaqI polimorfizmi ile dudak ve/veya damak yarığı arasında bağlantılı eşitsizlik saptanamamıştır (Carinci vd. 2007).

Carinci vd. (2007), makalelerinde 38 aileden oluşan bir grupta genetik heterojenlik için kanıt elde etmiştir. Bu sonuçlardan, dudak damak yarığı gelişiminde 2p13 kromozom bölgesindeki TGF α geninin etkili bir role sahip olduğu ve çok sayıda ailenin kullanıldığı bağlantı çalışmasında, bu bozuklukta içerilen lokusun tespit edilebileceği ispatlanmıştır.

2.5.4 TGF β 3 geni

2.5.4.1 TGF β 3 geninin yapısı

Kromozomal lokusu 14q24 olan TGF β 3 geni, TGF β süper ailesinin bir üyesidir. TGF β grubu, kemik morfogenetik proteinler (BMPs) ve aktive edici büyüme ve farklılaşma

faktörleri ile yapısal olarak ilişkilidir (Meng vd. 2009). TGF β 3 geni, 23 kb büyüklüğünde ve 7 ekzon içermektedir (Rajion ve Alwi 2007), (Şekil 2.7).



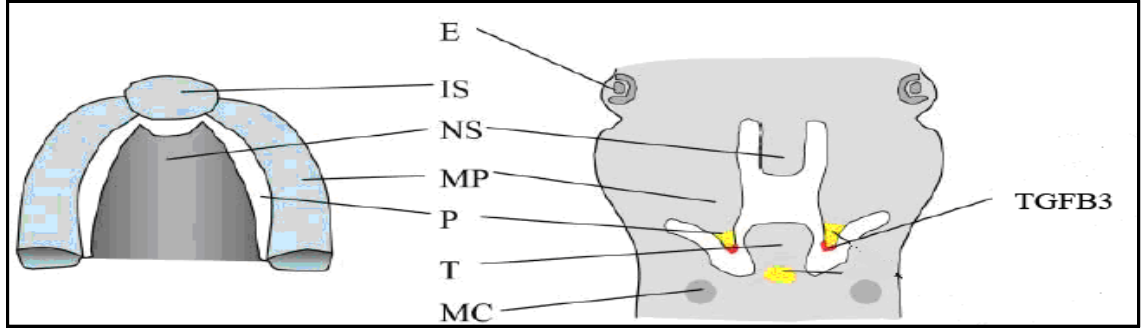
Şekil 2.7 TGF β 3 geninin kromozom 14 üzerindeki yeri (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFB3&search=TGFA> Erişim tarihi: 12.10.2009)

2.5.4.2 TGF β 3 gen ifadesi

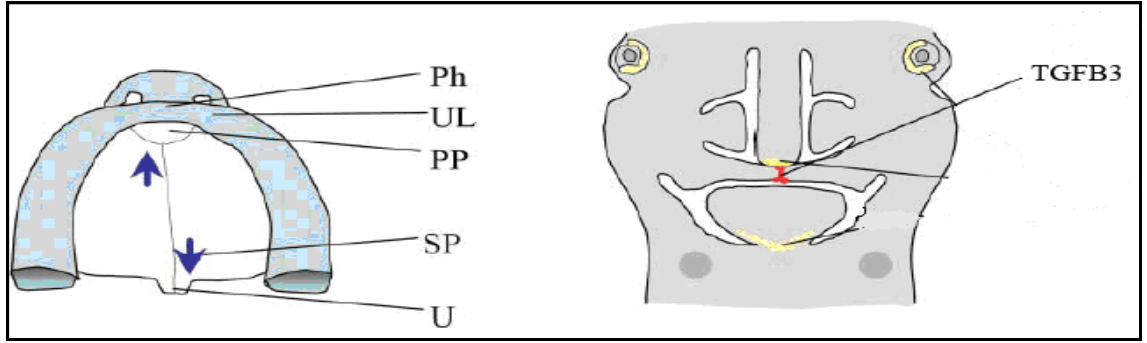
TGF β 3 geni, palatogenez boyunca hücre proliferasyonu, apoptozis, ekstrasellüler matriks (ECM) sentezi, epitelyal-mezenşimal değişim gibi birçok biyolojik işlemde yer almaktadır (Meng vd. 2009).

TGF β 3 damak gelişiminde özellikle dikkat çeker ve dikey damak rafının epitelyal bileşenlerinde bulunmuştur. Yatay damak raf ve orta hat epiteline (MEE, medial edge epithelia) daha sonra ifade edilir, fakat epitelyum katman bozukluklarında ifadesi tespit edilmemiştir (Şekil 2.8). TGF β 1 ve TGF β 2 damak raf füzyonunu hızlandırırken, TGF β 3 büyüme inhibisyonunda rol oynayabilir ve adeziv etkileşim için önemlidir. Aslında, knock-out (ölü) farelerde TGF β 3, damak raf füzyonunun başarısızlığından kaynaklı sendromsuz damak yarığında görülür (Stainer ve Moore 2004).

A



B



Şekil 2.8 İnsanda embriyonik dönemde A) 7. haftada, B) 9-10. haftada TGFβ₃ gen ifadesi (E = Göz, IS = İntermaksilar segment, NS = Nazal septum, MP = Maksillar çıkıntı, P= Damak rafı, T= Dil, MC= Meckel kıkırdağı, Ph= Filtrum, UL = Üst dudak, PP = Primer damak, SP = Yumuşak damak, U = Uvula) (Stainer ve Moore 2004)

Yarık oluşumu İtalyan popülasyonunda yaygın olarak araştırılmıştır. Özellikle sendromsuz dudak ve/veya damak yarığında TGFβ₃ geninin pozitif bir sebep yüklendiği kaydedilmiştir ve yarık hastalıklarında potansiyel bir rolü önerilmiştir. Bunun yanında, önceki araştırmalarda, sadece damak yarıklı hastaların in vitro fibroblast fenotiplerinde önemli farklılıklar gösterilmiştir. Özellikle sadece damak yarığı (CPO) fibroblastlarının, normal fibroblastlardan daha fazla glikozaminoglikan ve kollajen ürettiği gözlenmiş ve tüm TGFβ₃ izoformları katıldığında ekstrasellüler matriks üretiminin arttığı tespit edilmiştir (Rullo vd. 2006).

TGFβ₃'ü kodlayan, farelerde az görülen fonksiyonel gen, damak rafının tersindeki kusurlu adezyon nedeniyle damak yarığı oluşumu sergilemektedir. Ayrıca yeni

keşfedilen TGFβ₃ tek nükleotid polimorfizminin (SNP) (IVS5+104 A>G) Kore populasyonunda dudak damak yarığı oluşumu riskini 16 kat daha arttırdığı tespit edilmiştir (Wong ve Hägg 2004).

Güney Amerika populasyonunda yapılan bir çalışmada, MSX1 ve TGFβ₃ lokuslarında, hem dudak damak yarığı, hem de sadece damak yarığı için genetik varyasyon arasındaki ilişki adına bulgular sağlanmıştır. Ayrıca, sonuçlar Güney Amerikalı'larda ağız yarıklarının gelişiminde iki genin olası etkileşimini akla getirmiştir. İnsan yarığı oluşumunda içerilen aday genlerin tanımlanması adına, kromozom yeniden düzenlenmesi, kültür hücrelerinde genlerin ifadesi kadar, bağlantı ve bağlantı eşitsizliğinden sağlanan bilgilerle, genellikle uyumlu olduğu ve buna göre, MSX1 ve TGFβ₃'ün insanlarda ağız yarıkları için güçlü iki aday gen olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Vieira vd. 2003).

Orofasiyal yarıkların etiolojisindeki TGFα, TGFβ₃ ve MSX1 aday genlerinin rolünü keşfetmek için, Norveç ve Vietnam populasyonlarında 262 vaka-ebeveyn üçlüsü ile araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmaya göre, MSX1 ve TGFβ₃ markerlarının ikisi için daha anlamlı 'p' değerlerine (0.012 – 0.013) ulaşılmış, TGFα markerı için önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Jugessur vd. 2003, Suzuki vd. 2004).

2.6 Dudak Damak Yarığı Hastalarındaki Mutasyonların Saptanması İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.6.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

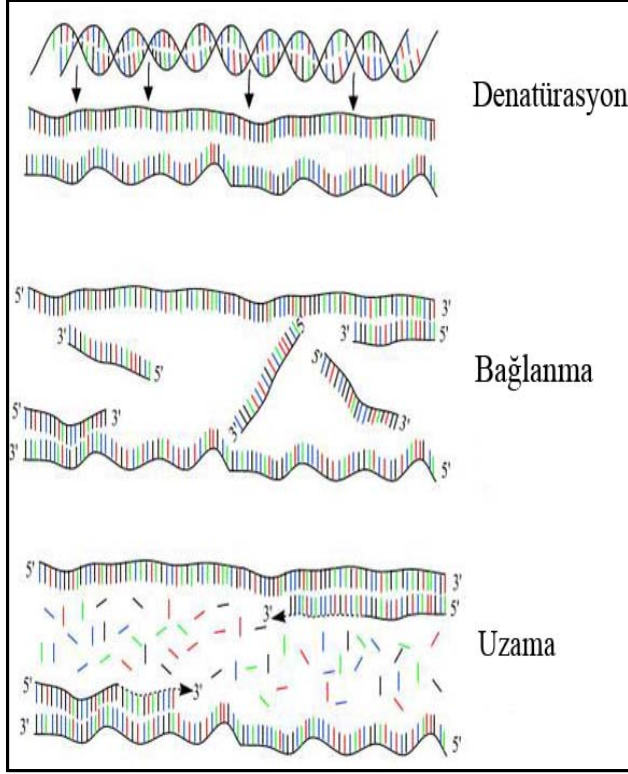
Bir çeşit in vitro klonlama olan, basit olarak, tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasını esas alan PZR, 1985 yılında ilk kez Randall K. Saiki ve arkadaşları tarafından olmak üzere, araştırmalarda ve klinik laboratuvarlarda sıkça kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli, genomik Deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde çoğaltılmak istenen hedef bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı, ortalama 18-20

baz uzunluğunda bir çift oligonükleotid primer kullanılarak ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimiyle birlikte, sınırlandırılmış hedef bölge olan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PZR'da hedef bölgenin çoğaltılmasında, üç temel aşama mevcuttur. Bunlar sırasıyla; denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama (extension) aşamalarıdır (Şekil 2.9).

1. Denatürasyon: Çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılarak tek zincirli hale getirildiği basamaktır. Genomik DNA, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz, bir çift sentetik oligonükleotid primer, dört adet dNTP'den (Adenin, Timin, Sitozin, Guanin) ve uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan (Mg²⁺) tampondan meydana gelen reaksiyon karışımı, 94-98°C'de beş dakika kadar ısıtılarak denatüre edilir.
2. Bağlanma: Denatürasyon sonucu iki zincire ayrılan hedef DNA'ya sentetik oligonükleotid primerlerin 37-65°C arasında bir sıcaklıkla bağlandığı basamaktır.
3. Uzama: Isıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi tarafından 72°C'de tek zincirli DNA'ya bağlanan primerlerin uzadığı basamaktır.



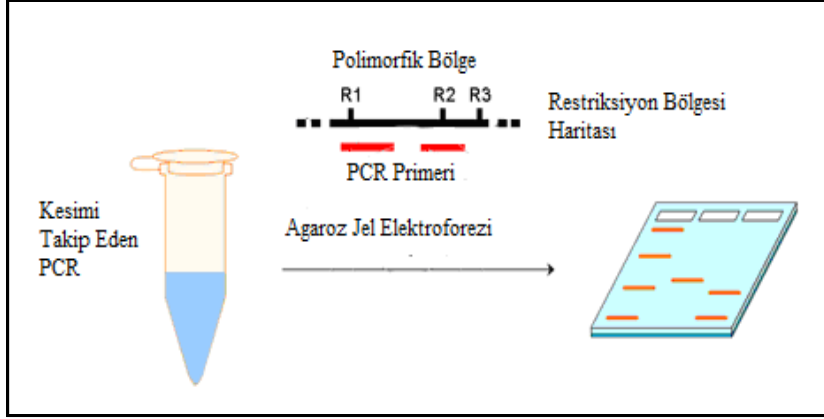
Şekil 2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu

(www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/images/PCR_000.jpg, Erişim Tarihi:05.06.2009)

2.6.2 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Bir popülasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. Genomik DNA'da oluşan polimorfizmler, hastalık sebebi olmayan sessiz nükleotid değişimleridir. Ancak bunlar, restriksiyon endonükleazların kesim bölgesinin yok olmasına ve palindromik bölgenin bozulmasına veya yeniden oluşmasına neden olabilirler (Klug ve Cummings 2003).

RFLP yöntemi ile, DNA örneğinde özgül Restriksiyon Endonükleazlar (RE) ile yapılan kesimlerde farklı uzunlukta DNA parçaları oluşur ve agaroz jelde yapılan görüntüleme ile sonuçlanan analizde, kesim ürünleri değişik pozisyonlarda görülürler (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Restriksiyon endonükleaz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılan ürünün kesilip agaroz jelde görüntülenmesi (<http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/f2.gif>, Erişim Tarihi: 12.06.2009)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışma grubu

Bu tez çalışmasında, çalışma grubu olarak Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'na başvuran 70 sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı olan hasta birey ve 85 kontrol birey seçilmiştir. Bu bireylerden alınan 9 ml'lik EDTA'lı tüpteki periferik kan örneğinden, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Genetik laboratuvarında DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışma grubunu oluşturan bireylerden (hasta ve kontrol) gönüllü onam formu alınmıştır.

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Amonyum klorid (NH_3Cl) (Riedel de haen)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck)

Etilen diaimin tetra asetik asit (EDTA) (Merck)

Sodyum klorür (NaCl) (Merck)

Tris ($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (Merck)

Hidroklorik asit (HCl) (Merck)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Applichem)

Proteinaz K (Applichem)

Fenol (CH_3OH) (Merck)

Kloroform (CHCl_3) (Merck)

Sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) (Merck)

Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)

İzoamil alkol (Merck)

Borik asit (H_3BO_3) (Merck)

Ethidium bromide ($\text{C}_{12}\text{H}_2\text{ON}_3\text{Br}$) (Applichem)

Bromofenol blue ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$) (Promega)

Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) (Promega)

Oligonükleotid primer (Fermentas)

Agaroz (Prona)

Restriksiyon enzimi (Fermentas)

3.1.3 Çalışmada kullanılan gereçler ve cihazlar

10 ml EDTA'lı tüp (Vacutest)

Ependorf tüpler (Sealrite)

Otomatik pipet seti (Thermo)

Otomatik pipet uçları (Thermo)

Buzdolabı (Altus)

Hassas terazi (Scaltech)

Manyetik karıştırıcı (Stuart)

pH metre (WTW)

Etüv (Heraeus)

Vorteks (Velp)

Yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Heraeus)

Derin dondurucu (Indesit)

Termocycler (Techgene)

Yatay elektroforez düzeneği (Thermo)

Doğru akım güç kaynağı (Thermo)

Ultraviyole transillüminatör (Vilberlourmat)

Su banyosu (Grand)

3.1.4 Solüsyonlar

3.1.4.1 Periferel kandan DNA izolasyon tamponları

Kırmızı kan hücreleri lizis çözeltisi (RBC lizis çözeltisi)

- 12 gr Amonyum klorür
- 1.2 gr Sodyum karbonat

- 200 µl EDTA (pH=8) 500 ml distile su içerisinde çözülerek toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp, + 4°C'de saklanmıştır.

Sodyum Tris EDTA (STE)

- 2,336 gr 0.1 M Sodyum klorür
- 4 ml 10 mM Tris hidroklorik asit (pH=8)
- 0,8 ml 1 mM EDTA (pH=8) 400 ml su içerisinde çözülmüştür.

%10'luk Sodyum Dodesilsülfat (SDS)

- 100 mg SDS, 68°C su banyosunda 900 ml distile su içerisinde eritilmiştir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak pH=7,2'ye ayarlanmıştır.

Proteinaz K

- Liyofilize haldeki proteinaz K (20 mg/ ml 100 mg) 5 ml distile su içerisinde eritilip, -20°C'de saklanmıştır.

Fenol

- 25 ml Fenol (65°C su banyosunda eritilir.)
- 24 ml Kloroform
- 1 ml İzoamilalkol
- 1:1 oranında 100 mM Tris HCl (pH=8) karıştırılmıştır. +4°C'de bir gece bekletilmiştir.

Kloroform

- 24 ml Kloroform
- 1 ml İzoamil alkol karıştırılmıştır.

3M Sodyum Asetat

- 408,1 gr Sodyum asetat 800 ml distile su içerisinde eritilip, pH=7'ye ayarlanmıştır, toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris HCl EDTA

- 1 ml Tris hidroklorik asit (1M, pH=8)
- 0,2 ml EDTA (0,5 M, pH=8) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.2 Agaroz jel elektroforez solüsyonları

Tris-Borate EDTA 5X (TBE 5X)

- 54 gr Trisma Base (Tris)
- 27,5 gr Borik asit
- 20 ml EDTA (0,5 M, pH=8) 800 ml distile su içerisinde çözülüp, toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris-Borate EDTA 1X (TBE 1X)

- Trisma Base 5X, 1/5 oranında distile su ile sulandırılmıştır.

Ethidium Bromide

- 1 gr Ethidium Bromide, 100 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile boya çözülünceye kadar karıştırılıp, + 4 °C 'de saklanmıştır.

DNA Marker (100 bç Plus DNA Ladder/Fermentas)

- 1-2 µl DNA Ladder
- 1 µl 6X DNA Loading Dye
- 3-4 µl Deiyonize su

3.2 Yöntem

3.2.1 Periferel kandan fenol kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu

Genomik DNA, standart prosedürler kullanılarak periferel kan lökositlerinden izole edilmiştir (Maxam ve Gilbert 1997). Başlangıçta 1 ml, 0.5 M EDTA bulunan tüpe alınan 9 ml periferel kan örneği 50 ml'lik santrifüj tüpüne boşaltılmıştır. Hacminin 2.5 katı kadar Red Blood Cell (RBC) lizis ilave edilerek çalkalanıp, 20 dakika buzda

bekletilmiştir. +4°C, 4000 rpm yüksek devirli soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Dipte lökosit tabakası elde edilinceye kadar bu işlem tekrarlanmıştır. Kırmızı kan hücreleri parçalayıp lökosit tabakası elde edilince üst kısımdaki sıvı dökülüp, RBC lizis solüsyonu ile 1-2 kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında 1000 µl RBC Lysis solüsyonu ilave edilerek, vorteksle homojen hale getirilmiştir. Toplam hacmin 1/5'i ile işleme devam edilmiştir. 500 µl STE, 30 µl SDS (%10'luk) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildikten sonra, 56°C sıcaklıkta su banyosunda bir gece bekletilmiştir.

Daha sonra, örneğe 1:1 oranında fenol ilave edilerek, 10 dakika çalkalandıktan sonra 20 dakika buzda bekletilmiştir. +4°C, 4000 rpm yüksek devirli soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant başka bir tüpe alınarak, üzerine 1:1 oranında kloroform ilave edilerek fenol aşamasındaki işlemler aynen tekrarlanmıştır. Son hacmin 1/10'u kadar 2M sodyum asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etanol ilave edilmiştir. Tüp hafifçe alt üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlanmış ve -20°C'de bir gece bekletilmiştir.

Bir gün sonra -20°C'den alınan tüp, 4°C, 4000 rpm yüksek devirli soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edilip, sıvı kısım atılmıştır. Tüpteki DNA yoğunluğuna bakılarak eklenecek olan TE (Tris-EDTA) miktarı belirlenmiştir. Tüpe %70'lik etanol ilave edilerek +4°C, 4000 rpm yüksek devirli soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edilmiştir. %70'lik alkol dikkatlice dökülerek alkolün uzaklaşması amacıyla kurumaya bırakılmıştır. Daha önceden belirlenen miktarda TE ilave edilip, 37°C su banyosunda bir gece bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlanmış ve +4°C'de saklanmıştır (Maxam ve Gilbert 1997).

3.2.2 PZR ile TGF α ve TGF β 3 genlerindeki mutasyonların analizi

Bu genetik analizlerin gerçekleştirilmesinde öncelikle; sendromsuz dudak damak yarıklı hastalardan elde edilen DNA'larda, TGF α ve TGF β 3 genlerindeki mutasyonların araştırılmasında, TGF α genine ait 3.ekzon ve TGF β 3 genine ait 5.ekzon bölgelerinin belirli kısımlarının PZR'ları yapılmıştır.

3.2.2.1 Amplifikasyonda kullanılacak primerlerin seçimi

Sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklı Türk hastaların DNA'larında görülen TGF α ve TGF β_3 genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde kullanılacak primerlerin saptanması, kaynak taraması yapılarak belirlenmiştir. TGF α geni için, Tanabe vd. (2000)'nin, makalelerindeki primerler (Çizelge 3.1); TGF β_3 geni için ise, Reutter vd. (2008)'nin, makalelerindeki primerler ilgili gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılmasında kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 TGF α geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler

Gen	Primer	Uzunluk (bç)	Referans
TGF α	F:5' GAGACGGACTCCTGTTACCTAGG 3' R:5' CAAGGGTGGCGATAGCTTGGG 3'	345	Tanabe vd. 2000

Çizelge 3.2 TGF β_3 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler

Gen	Primer	Uzunluk (bç)	Referans
TGF β_3	F:5'TCAGCCTGGACAACATAGGGAGGACC3' R:5'TATGTACATTTTCTTTGATCTCCCAGG3'	405	Reutter vd. 2008

3.2.2.2 PZR koşulları

İlgili gen bölgeleri, çizelge 3.1-3.2'de verilen primerler kullanılarak, aşağıda içeriğinin ve şartlarının verildiği miktarlarda karışımlar hazırlanarak uygun şartlarda PZR ile çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3 Amplifikasyonda kullanılan polimeraz zincir reaksiyon miktar ve karışım şartları

İçerik	Konsantrasyon	TGF α	TGF β 3
		1x μ l	1x μ l
10X PZR Tampon	500 Ünite	5	5
MgCl₂	25 mM	1.5	1.5
Dntp	10 mM	2	2
Forward primeri		1.5	1.5
Reverse primeri		1.5	1.5
Taq polimeraz		0.2	0.2
DNA		3	3
dH₂O		35.3	35.3
	Toplam	50	50

Çizelge 3.4 TGF α geninin amplifikasyonunda kullanılan PZR döngü basamakları

Enzim aktivasyonu	92°C	5 dk.	
Denatürasyon	92°C	1 dk.	
Bağlanma	56°C	30 sn.	35 döngü
Uzama	72°C	1 dk.	
Son Uzama	72°C	10 dk.	

Çizelge 3.5 TGFβ₃ geninin amplifikasyonunda kullanılan PZR döngü basamakları

Enzim aktivasyonu	94°C	4 dk.	
Denatürasyon	94°C	1 dk.	
Bağlanma	56°C	1 dk.	35 döngü
Uzama	72°C	2 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	

3.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi

PZR ile ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin kontrol edilmesinde % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. 1 gr tartılan agaroz, 50 ml 1XTBE tamponu ilave edilerek hazırlanan karışım mikrodalga fırın içerisinde homojen bir şekilde çözülmüş ve 4 µl ethidium bromide eklenip karıştırılarak, elektroforez aparatlarından biri olan jel tablasının içerisine dökülmüştür. Hazırlanan agaroz jel, jel tablasına dökülmeden önce, yükleme kuyucukları elde etmek için jel tablasının içine uygun bir şekilde taraklar yerleştirilmiştir. Sonrasında, çözelti polimerleşme sağlanıncaya kadar oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra, elde edilen agaroz jel elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir.

Thermo marka elektroforez tankına 1XTBE tamponundan eklenmiş ve agaroz jelden tarak çıkartılmıştır. PZR sonucu elde edilen ürünlerin her biri yükleme tamponu blue-bromo-fenol ile karıştırılarak, 9. µl'si jele yüklenmiştir ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 84 V'da 45 dakika yürütülmüş ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi için, transillüminatörde ultraviyole ışık altında jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.4 PZR/RFLP işlemleri

TGF α geni için elde edilen PZR ürünü Hinfl restriksiyon enzimi, TGF β_3 geni için elde edilen PZR ürünü XapI enzimi ile muamele edilmiştir. Bu işlem için eppendorf tüpünde hazırlanan karışımda, 17 μ l distile su, 2 μ l 10X Fermentas Fast Digest enzim buffer, 10 μ l PZR ürünü, 1 μ l Fermentas Fast Digest enzim bulunmaktadır. Sonrasında hazırlanan karışıma minifüj yapılmıştır. Daha sonra 37°C su banyosunda minimum 5 dakika inkübe edilmiştir (Çizelge 3.6).

TGF α genine ait Hinfl restriksiyon enzimi kesim bölgesi;

5'G[^]ANTC.....3'

3'CTNA[^]G.....5'

TGF β_3 genine ait XapI restriksiyon enzimi kesim bölgesi;

5'A[^]TTNGC.....3'

3.....CGNTT[^]A.....5'

Çizelge 3.6 TGF α geni ve TGF β_3 geni restriksiyon endonükleaz enzimi reaksiyon karışımları

Deiyonize Su	17 μ l
Enzim	1 μ l
Tampon	2 μ l
PZR ürünü	10 μ l
Toplam	30 μ l

3.2.4.1. PZR/RFLP ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PZR ürünlerinin kontrolünde, ethidium bromide eklenmiş % 3'lük agaroz jel kullanılmıştır. Thermo marka elektroforez tankında elde edilen ürünün 20 µl'si blue-bromo fenol ile karıştırılarak mutasyon analizi için, jele yüklenmiştir. 100 voltda 20 dakika yürütülmüştür.

Daha sonra kesim ürünleri "Vilber Lourmat" marka transillüminatörde, ultraviyole ışık altında jel görüntülenmiştir.

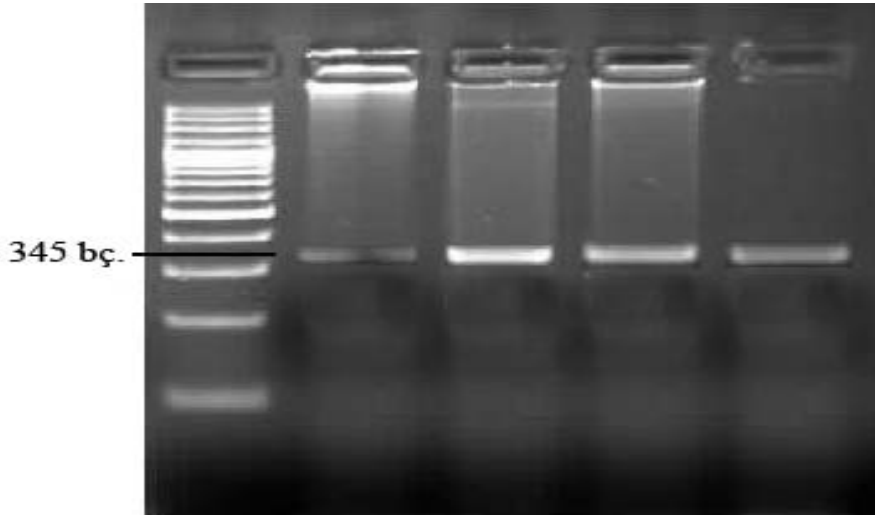
3.2.5 İstatiksel analiz

Bu çalışmada, sendromsuz dudak damak yarıklı vakalarda saptanan aday genlerden TGF α ve TGF β 3 genlerindeki mutasyonların tanımlanması, bu aday genlerin Türk populasyonundaki sıklığının saptanması ve hastalar ile kontrol grubu arasındaki farklılıkların araştırılması için, Hardy-Weinberg equilibrium testi ve Ki-kare testi, risk hesapları için Odd Ratio (OR) testi kullanılmıştır. Çalışmanın istatiksel analizi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

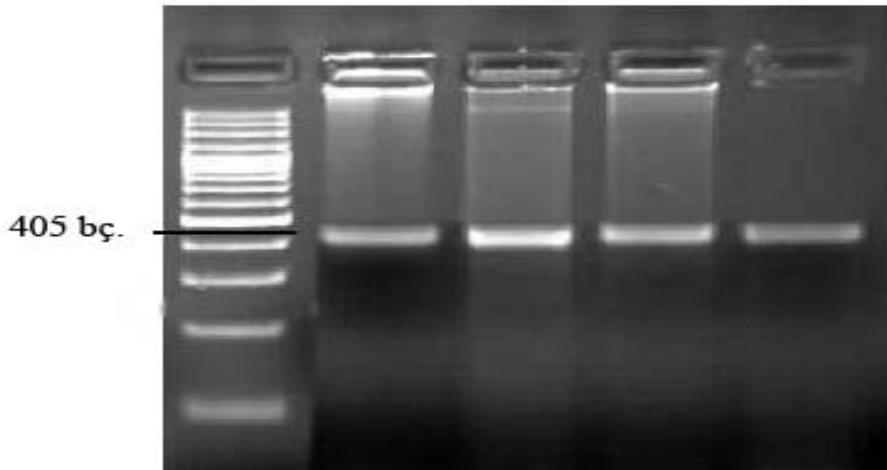
4. BULGULAR

4.1 TGF α ve TGF β_3 Genlerinin Amplifikasyon Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarından DNA izolasyonu ile elde edilen DNA moleküllerinde, TGF α geni üzerinde 345 ve TGF β_3 geni üzerinde 405 baz çiftlik bölge, PZR yöntemiyle amplifiye edilerek, hazırlanan %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1 TGF α geni amplifikasyonu agaroz jel görüntüsü

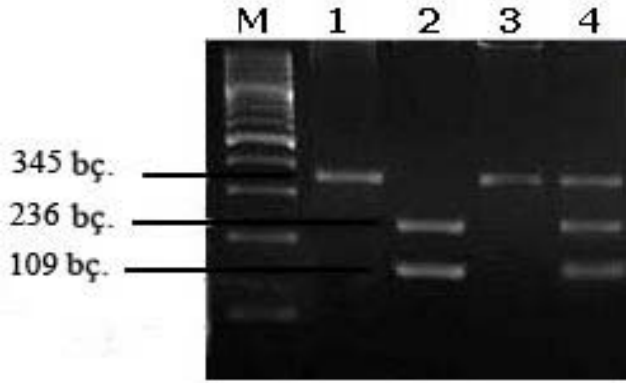


Şekil 4.2 TGF β_3 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntüsü

4.2 TGF α ve TGF β_3 Genlerinin RFLP Sonuçları

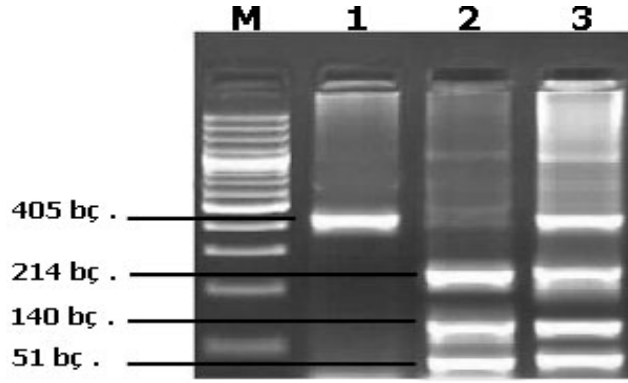
PZR ile amplifikasyonu yapılmış ürünlerin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi ve kesim sonrası jel analizi, bölüm 3.2.4'te belirtilen prosedürlere uygun bir şekilde yapılmıştır.

TGF α genindeki polimorfizmin saptanması için kullanılan HinfI enzimi için kesim bölgesi içeren AA homozigot bireylerde 236 ve 109 baz çiftlik 2 bant gözlenmiştir. AG heterozigot bireylerde ise 345, 236 ve 109 baz çiftlik 3 bant gözlenmiştir. HinfI enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde ise sadece 345 baz çifti uzunluğunda tek bant gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 TGF α geni HinfI restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü kesimi agaroz jel görüntüsü (M: Marker, 1:GG genotipli normal birey, 2:AA genotipli homozigot birey, 3:GG genotipli normal birey, 4:GA genotipli heterozigot birey)

TGF β_3 genindeki polimorfizmin saptanması için kullanılan XapI (ApoI) enzimi için kesim bölgesi içeren TT homozigot bireylerde 214, 140 ve 51 baz çiftlik 3 bant gözlenmiştir. TA heterozigot bireylerde ise 405, 214, 140 ve 51 baz çiftlik 4 bant gözlenmiştir. XapI enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde ise sadece 405 baz çifti uzunluğunda tek bant gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 TGF β_3 geni XapI (ApoI) restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü Kesimi agaroz jel görüntüsü (M: Marker, 1:AA genotipli normal birey, 2: TT genotipli homozigot birey, 3:TA genotipli heterozigot birey)

4.3 TGF α ve TGF β_3 Genleri İçin Elde Edilen Genotip Sonuçları

TGF α geninde PZR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütülmesi sonucu, elde edilen görüntüler yorumlanarak, 70 hasta ve 85 kontrol grubunda, AA, AG ve GG genotiplerine ait sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 TGF α geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler

Genotipler	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
	(n = 70) Gözlenen	(n = 85) Gözlenen
AA	13	0
AG	44	3
GG	13	82

Aynı şekilde TGF β_3 geninde PZR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütülmesi sonucu, elde edilen görüntüler yorumlanarak, 70 hasta ve 85 kontrol grubunda, TT, TA ve AA genotiplerine ait sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 TGF β 3 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler

Genotipler	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
	(n = 70)	(n = 85)
	Gözlenen	Gözlenen
TT	21	0
TA	33	0
AA	16	85

4.4 Allel ve Genotip Frekanslarının Hesaplanması

TGF α geninde, hasta gruplarında AA (13), AG (44), GG (13) ve kontrol gruplarında AA (0), AG (3), GG (82) olarak gözlenen genotip değerleri için allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 TGF α geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri

Allel		Hasta Grubu	Kontrol Grubu
		(n = 70)	(n = 85)
	A	0.5	0.02
	G	0.5	0.98
Genotip	AA	0.186	0
	AG	0.628	0.0353
	GG	0.186	0.9647

Benzer şekilde TGF β 3 geninde, hasta gruplarında TT (21), TA (33), AA (16) ve kontrol gruplarında TT (0), TA (0), AA (85) olarak gözlenen genotip değerleri için allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4 TGFβ₃ geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri

Allel		Hasta Grubu (n = 70)	Kontrol Grubu (n = 85)
	T	0.535	0
	A	0.465	1
Genotip			
	TT	0.30	0
	TA	0.471	0
	AA	0.229	1

4.5 Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması

Hardy-Weinberg kanunu varsayımlarından, birinin veya birkaçının bir populasyonda ihlal edilip edilmediğini anlamının bir yolu populasyondaki genotiplerin dengede olup olmadığının belirlenmesidir. Bunun için öncelikle genotip frekansı hesaplanır ve sonra gözlenen toplam birey sayısı ile ilgili allel frekans değerleri çarpılarak her bir genotip için beklenen değerler hesaplanır. Beklenen değerlerin, Hardy-Weinberg kanununa göre $p^2+2pq+q^2=1$ denkleminde uyması beklenir (Klug ve Cummings 2003).

Çalışmamızda Hardy-Weinberg dengesine uygunluk hipotezlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. Bu işlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 TGF α geni hasta ve kontrol grubu için χ^2 testi

Genotipler	Hasta Grubu (n = 70)		Kontrol Grubu (n = 85)	
	Gözlenen	Beklenen	Gözlenen	Beklenen
AA	13	(17.37)	0	(0)
AG	44	(35.25)	3	(2.96)
GG	13	(17.37)	82	(82.017)
X ² (p value)	p= 0.0365 (p<0.05)			

Çizelge 4.6 TGF β_3 geni hasta ve kontrol grubu için χ^2 testi

Genotipler	Hasta Grubu (n = 70)		Kontrol Grubu (n = 85)	
	Gözlenen	Beklenen	Gözlenen	Beklenen
TT	21	(19.964)	0	(0)
TA	33	(35.071)	0	(0)
AA	16	(14.964)	85	(1)
X ² (p value)	p= 0.618 (p>0.05)			

İstatiksel verilere göre, TGF α geni için sendromsuz dudak damak yarık oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0.0365).

TGF β_3 geni için sendromsuz dudak damak yarık oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0.618).

Ayrıca TGF α ve TGF β_3 genleri için yapılan Odd Ratio (OR) testi sonuçlarına göre, TGF α geni için OR=1.228 (%95 CI= 1.098-1.373), TGF β_3 için OR=1.425, (%95 CI= 1.225-1.665) sonuçlarına ulaşılmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sendromsuz dudak damak yarığı, ortalama 1/ 700'lük görülme sıklığı ile konjenital (doğuştan) bozukluklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Cerrahi müdahalelerin yanında bu kişilerde doğumla beraber beslenme, konuşma ve işitme bozuklukları ve enfeksiyonlara yatkınlık söz konusudur. Aynı zamanda yaşla beraber bu kişilerde dental sorunlar da görülmektedir. Bu medikal sorunlara ek olarak bu kişilerin ortalama yaşam süreleri ve psikolojik rahatsızlık geçirme oranları sağlıklı bireylere göre daha fazladır (Christensen vd. 2004). Konu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, dudak damak yarıklı bireylerde belli kanser tiplerinin görülme sıklığının, sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Bille vd. 2005). Bu açıdan bakıldığında gerek sendromsuz, gerekse sendromik dudak damak yarıklı vakalar, sağlıklarına kavuşmak veya bozuklukların düzeltilmesi ve meydana gelebilecek ek anomalilerin tedavisi için yüksek harcamalar yapmaktadır.

İnsanlarda dudak ve damak gelişiminin moleküler temelleri tam olarak anlaşılammıştır. Aday genleri belirleme çalışmaları genelde kusurların görüldüğü ailelerde bağlantı analizleri, ilgili gen bölgelerinin belirlenmesi, model organizmalarda knock-out (ölü) ve fonksiyon analizleri ile model organizmalardaki fenotip değişimlerinin gözlenmesi prensiplerine dayanmaktadır (Murray 2001, Mossey ve Little 2002, Vieira 2005). Üzerinde en çok çalışılan genler arasında $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ yer almaktadır. Bu genlerin analizini içeren birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bazılarında doğrudan gen dizilemesi (Shiang vd. 1993, Tanabe vd. 2000), bazılarında bağlantı analizleri (Mitchell 1996, Beaty vd. 2002, Jugessur vd. 2003, Vieira vd. 2003, Rullo vd. 2006, Bertoja vd. 2008), bazılarında ise geniş populasyonlar üzerinde SNP analizleri uygulanmıştır (Suzuki vd. 2004, Reutter vd. 2008).

Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farkların belirlenmesi $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ genlerinin bu bozukluk üzerindeki önemini göstermektedir. Bazı çalışmalarda sendromsuz dudak damak yarıklı bireylerde herhangi bir varyasyon belirlenememiştir (Moreno vd. 2004, Carinci vd. 2007). Bazı çalışmalarda ise farklı varyasyonlar bulunmuş, ancak oran %2 civarında kalmıştır (Vieira vd. 2003, Wong ve Hägg 2004). Bizim çalışmamızda, $TGF\alpha$

geni için sendromsuz dudak damak yarık oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.0365$, $p<0.05$), fakat $TGF\beta_3$ geni için sendromsuz dudak damak yarık oluşumu bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.618$, $p>0.05$).

Farklı populasyonlarda dudak damak yarık oluşumu ile $TGF\alpha$ ve $TGF\beta_3$ genleri ile ilgili olarak yapılan istatistiksel çalışmaların sonuçlarına göre; Beyaz ırk için $p<.0001$, $OR=1.51$ (%95 $CI=1.20-1.91$), Afrika-Amerika populasyonunda $p=0.0036$, $OR=1.42$ (%95 $CI=1.16-1.73$), İspanyol'larda $p=0.05$ $OR=1.28$ (%95 $CI=0.45-3.41$) değerleri ile dudak damak yarık oluşumu ve genler arasında ilişki bulunmuştur. Asya'lılarda $p=0.06$, $OR=1.41$ (%95 $CI=1.13-1.73$), Japon populasyonunda $p=0.17$, $OR=1.63$ (%95 $CI=0.85-3.09$), Filipinlerde $p=0.08$, $OR=1.54$ (%95 $CI=0.63-4.32$), Şili populasyonunda $p=0.08$, $OR=0.98$ (%95 $CI=0.27-3.38$) değerleri ile dudak damak yarık oluşumu ve genler arasında bir ilişki bulunamamıştır (Mitchell 1996).

Sendromsuz dudak damak yarıklı Japon populasyonunda yapılan çalışmada, bizim çalışmamız ile uyumlu olarak $TGF\alpha$ geni için hasta ve kontrol grupları arasında önemli farklılıklar gözlenirken ($p=0.017$, $p<0.05$), $TGF\beta_3$ geni için hasta ve kontrol varyantları arasında önemli bir fark saptanamamıştır ($p=0.520$, $p>0.05$) (Tanabe vd. 2000).

Bertoja vd. (2008), makalelerinde Brezilya populasyonunda $TGF\alpha/TaqI$ polimorfizmi ile ilgili olarak yaptığı çalışmada, hastaların çoğunda (114-%81,4) C1C1 (iki normal allele) genotipi görüldüğü bildirilmiştir. 25 (%17,9) hastada C1C2 (bir normal bir mutant allele) genotipi ve 1 (%0,7) hastada C2C2 genotipine rastlanmıştır. $TGF\alpha/TaqI$ polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır. İtalyan populasyonunda yapılan çalışmada ise, $TGF\alpha/TaqI$ polimorfizmi ile dudak ve/veya damak yarığı arasında bağlantılı eşitsizlik saptanamamıştır (Carinci vd. 2007). $TGF\alpha/TaqI$ polimorfizmi sonuçlarının aksine, çalışmamızda ele aldığımız $TGF\alpha/HinfI$ polimorfizm sonuçları anlamlı bulunmuştur ve bu, $TGF\alpha$ geninin dudak damak yarığı oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir.

Güney Amerika populasyonunda yapılan bir çalışmada, MSX1 ve TGF β 3 genleri hem dudak ve/veya damak yarığı, hem de sadece damak yarığı için genetik varyasyon arasındaki ilişki adına bulgular sağlamak amacıyla birlikte ele alınmıştır. TGF β 3 genine ait dudak ve/veya damak yarığı için $p=0.24$, $p>0.05$ olduğundan çalışmamız ile uyumlu olarak anlamlı bir sonuç saptanmamıştır. Fakat sadece damak yarığı için $p=0.02$, $p<0.05$ olduğundan olumlu sonuç gözlenmiştir (Vieira vd. 2003).

Reutter vd. (2008), makalelerinde sendromsuz dudak damak yarıklı Avrupalı'lar arasında, 204 hasta ve bunların ebeveynleri ile birlikte yaptıkları üçlü araştırma sonucunda, TGF β 3 tek nükleotid polimorfizminin (SNP) (IVS1+5231) hasta grubunda yüksek oranda tespit edildiği ve $p=0.019$, $p<0.05$ değeri ile bizim elde ettiğimiz sonucun aksine TGF β 3 geninin yarık oluşum riskini arttırdığını bildirmişlerdir.

Orofasiyal yarıkların etiolojisindeki TGF α ve TGF β 3 aday genlerinin rolünü keşfetmek için, Norveç ve Vietnam populasyonlarında 262 vaka-ebeveyn üçlüsü ile araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmaya göre, TGF β 3 markerı için daha anlamlı 'p' değerine ($p=0.013$, $p<0.05$) ulaşılmış, TGF α markerı için önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.30$, $p>0.05$) (Jugessur vd. 2003, Suzuki vd. 2004).

TGF α ve TGF β 3 genlerinin rolünü keşfetmek için Amerika, Maryland'de yapılan bir diğer çalışmada ise, TGF α geni ($p=0.048$, $p<0.05$) için araştırma sonuçlarımıza uygun bir şekilde dudak damak yarık oluşumuna katkı sağladığı, TGF β 3 geni ($p=0.251$, $p>0.05$) için ise önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca Amerikan populasyonunda yapılan bu çalışmada, Odd Ratio değeri hesaplanmış TGF α geni için $OR=1.51$ (%95 CI= 0.65-3.50) ve TGF β 3 geni için $OR=2.43$ (%95 CI= 1.2-4.8) olarak kaydedilmiştir (Beaty vd. 2002). Bizim çalışmamızda ulaştığımız Odd Ratio değerleri ise TGF α geni için yakın değer ($OR=1.228$, %95 CI= 1.098-1.373), TGF β 3 için farklı değer ($OR=1.425$, %95 CI= 1.225-1.665) aralığındadır.

Sonuç olarak, genetik varyasyonların ortaya konulması ile ilgili bazı çalışmalar, dudak damak yarık oluşumu ile bağlantılı çıkmış ancak aynı genotipler farklı bir populasyonda, anomali üzerinde aynı etkiyi göstermemiştir. Bu tip sonuçlar çok etkenli

kalıtım kalıbına sahip olan anomaliler için sık rastlanılan bir durumdur. Aynı mutasyon tiplerinin aynı veya farklı populasyonlarda aynı etkiyi göstermemeleri hem kusurun ortaya çıkmasında diğer genlerin de etkili olduğunu göstermekte, hem de çevresel faktörlerin önemini arttırmaktadır. Çok etkenli hastalıklar, tanı konması ve hastalığın temelini anlaşılmaması açısından en karmaşık hastalıklardır. Hastalığın nedeni birden fazla gen grubu ve bu genlerin ekspresyon düzeylerini etkileyen çevresel faktörlerin oluşturduğu düzensizliklerdir. Yapılacak olan çalışmalar ile sadece dudak damak yarığı gibi kusurların değil, diğer çok etkenli hastalıkların da nedenleri anlaşılmaya çalışılacaktır. Türk toplumunu içeren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Özellikle her toplumda olduğu gibi Türk toplumunda da dudak damak yarıklı vakaların incelenmesinde çevresel faktörlerin ve bundan sonraki araştırmalarla ortaya çıkarılabilecek moleküler etmenlerin göz önünde bulundurulduğu genetik danışma birimlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarımızda, daha fazla sayıda hasta grubu ile oral yarıkların etiyolojisinde önemi olan gen analizlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alkuraya, F.S. 2006. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science*, 313(5794); 1751-8.
- Anonymous. 2009a. Web Sitesi: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-65/issue-5/279.html>, Erişim Tarihi: 13.02.2009.
- Anonymous. 2009b. Web Sitesi: <http://www.emedicine.medscape.com/article/837347-media>, Erişim Tarihi: 09.02.2009.
- Anonymous. 2009c. Web Sitesi: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFB3&search=TGFA>, Erişim Tarihi: 12.10.2009.
- Anonymous. 2009d. Web Sitesi: http://www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/images/PCR_000.jpg, Erişim Tarihi: 05.06.2009.
- Anonymous. 2009e. Web Sitesi: <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/f2.gif>, Erişim Tarihi: 12.06.2009.
- Ardinger, H.H., Buetow, K.H., Bell, G.I., Bardach, J., Van Demark, D.R. and Murray, J.C. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*, 45; 348-53.
- Arruda, V.R., Siqueira, L.H., Goncalves, M.S., Von Zuben, P.M., Soares, M.P., Menezes, R., Annichino-Bizzacchi, J.M. and Costa, F.F. 1998. Prevalance of the Mutation C677/T in the Methylene Tetrahydrofolate reductase Gene Among Distinct Ethnic Groups in Brazil. *Am J Med Genet*, 78; 332-35.
- Beaty, T.H., Wang, H. and Hetmanski, J.B. 2001. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol*, 11(6); 434-42.
- Beaty, T.H., Hetmanski, J.B., Zeiger, J.S., Fan, F.T., Liang, K.Y., VanderKolk, C.A. and McIntosh, I. 2002. Testing Candidate Genes for Non-syndromic Oral Clefts Using a Case-Parent Trio Design. *Genetic Epidemiology*, 22; 1-11.
- Bendall, A.J., Ding, J., Hu, G., Shen, M.M. and Abate-Shen, C. 1999. Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development*, 126; 965-76.
- Bertoja, A.E., Alho, C.S., Menegotto, B. and Robinson, W.M. 2008. TGFA/Taq I Polymorphism in Nonsyndromic Cleft Lip and Palate Patients From Rio Grande do Sul, Brazil. *Cleft Palate–Craniofacial Journal*, 45(5); 539-544.

- Bille, C., Winther, J.F., Bautz, A., Murray, J.C., Olsen, J. and Christensen, K. 2005. Cancer risk in persons with oral cleft- a population-based study of 8,093 cases, *Am J Epidemiol*, 161; 1047-55.
- Blanton, S.H., Patel, S., Hecht, J.T. and Mulliken, J.B. 2002. MTHFR Is Not a Risk Factor in The Development of Isolated Nonsyndromic Cleft Lip and Palate, *Am J Med Genet*, 110; 404-05.
- Carinci, F., Scapoli, L., Palmieri, A., Zollino, I. and Pezzetti, F. 2007. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 71; 1509-19.
- Catron, K.M., Iler, N. and Abate, C. 1993. Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, 13; 2354-65.
- Christensen, K., Juel, K., Herskind, A.M. and Murray, J.C. 2004. Long term follow up of survival associated with cleft lip and palate birth. *BMJ*, 328; 1405-9.
- Chung, K.C., Kowalski, C.P. and Kim, H.M. 2000. Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast Reconstr Surg*, 105(2); 485-91.
- Feng, H., Sassani, R., Bartlett, S.P., Lee, A., Hecht, J.T., Malcom, S., Winter, R.M., Vintiner, G.M., Buetow, K.H. and Gasser, D.L. 1994. Evidence, from Family Studies, for Linkage Disequilibrium between TGFA and a Gene for Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Am J Hum Genet*, 55; 932-36.
- Gorlin, R.J., Cohen, M.J. and Levin, L.S. 2001. *Syndromes of the Head and Neck*. Oxford University Press, pp. 482-485, Oxford.
- Gupta, V. and Bei, V. 2006. Modification of Msx1 by SUMO-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345(1); 74-77.
- Honein, M.A., Rasmussen, S.A., Reefhuis, J., Romitti, P.A., Lammer, E.J. and Sun, L. 2007. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology*, 18; 226-33.
- Jirasek, J.E. 2004. *An Atlas of Human Prenatal Developmental Mechanics*. Taylor and Francis Group, pp. 118-121, United Kingdom.
- Jones, K.L. 1997. *Smith's recognizable patterns of human malformations*, 5th edition, pp. 555-558, Philadelphia.

- Jugessur, A., Lie, R., Wilcox, A., Murray, J.C., Taylor, J., Saugstad, O., Hallvard, A. and Abyholm, F. 2003. Variants of Developmental Genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and Their Associations With Orofacial Clefts: A Case-Parent Triad Analysis. *Genetic Epidemiology*, 24; 230-239.
- Kerrigan, J., Mansell, J.P., Sengupta, A., Brown, N. and Sandy, J.R. 2000. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J.R.Coll.Surg.Edinb.*, 45; 351-358.
- Kim, S., Kim, J.W., Oh, C. and Kim, J.C. 2002. Cleft lip and palate incidence among the live births in the republic of Korea. *J Korean Med Sci*, 17; 49-52.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. 2003. *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık, pp. 683-690, Ankara.
- Lidral, A.C. 1997. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac. J.*, 34(1); 1-6.
- Lieff, S., Olshan, A.F., Werler, M., Straus, R.P., Smith, J. and Mitchell, A. 1999. Maternal Cigarette Smoking during Pregnancy and Risk of Oral Clefts in Newborns *Am J Epidemiol*, 150; 683-94.
- Loffredo, L.C., Souza, J.M. and Freitas, J.A. 2001. Oral clefts and vitamin Supplementation. *Cleft Palate Craniofac J*, 38 (1); 76-83.
- Machida, J., Yoshiura, K., Funkhauser, C.D., Natsume, N., Kawai, T. and Murray, J.C. 1999. Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics*, 61; 237-42.
- Malloy, M.H., Kleinman, J.C., Bakewell, J.M., Schramm, W.F. and Land, G.H. 1989. Maternal smoking during pregnancy: no association with congenital malformations in Missouri 1980-83. *Am J Public Health*, 79; 1243-6.
- Martinelli, M., Scapoli, L., Pezzetti, F., Carinci, F., Carinci, P., Stabellini, G., Bisceglia, L., Gombos, F. and Tognon, M. 2001. C677T Variant Form at the MTHFR Gene and CL/P: A Risk Factor for Mothers?. *Am J Med Genet*, 98; 357-60.
- Martinelli, M., Carinci, F., Scapoli, L., Pezzetti, F., Marchesini, J., Palmieri, A., Caramelli, E., Baciliero, U., Padula, E., Gombos, F., Rullo, R., Carls, F., Becchetti, A., Tognon, M. and Carinci, P. 2004. Drugs, Environmental Factors, Loci and Genes Involved in Nonsyndromic Orofacial Cleft. *Current Pharmacogenomics*, 2(3); 277-286.
- Maxam A. and Gilbert W. 1997. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74; 560-4.

- Meng, L., Bian, Z., Torensma, R. and Hoff, J.W. 2009. Biological Mechanism in Palatogenesis and Cleft Palate. *J Dent Res*, 88(1); 22-33.
- Mitchell, L.E. 1996. Transforming Growth Factor a Locus and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate: A Reappraisal. *Genetic Epidemiology*, 14; 231-240.
- Moore, K.L. 1988. *The developing human*, 3rd edition. WB Saunders, 567, Philadelphia.
- Moreno, L.M., Arcos-Burgos, M., Marazita, L.M., Krahn, K., Maher, S.B., Cooper, M.E., Valencia-Ramirez, C.R. and Lidral, A.C. 2004. Genetic Analysis of Candidate Loci in Non-Syndromic Cleft Lip Families From Antioquia-Colombia and Ohio. *American Journal of Medical Genetics*, 125A; 135-144.
- Morknien, A., Steponavieit, D., Utkus, A. and Kueinskas, V. 2006. Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. *J Appl Genet*, 48(1); 89-91.
- Mossey, P.A. and Little, J. 2002. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: *Cleft lip & palate*. Oxford University Press, 432, Oxford.
- Munger, R.G., Romitti, P.A. and Daack-Hirsch, S. 1996. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*, 54(1); 27-33.
- Murray, J.C. 2001. Gene/ environment causes of cleft lip and/ or palate. *Clin. Gen.* 61; 248-256.
- Park-Wyllie, L., Mazotta, P., Pastuszak, A., Moretti, M.E., Beique, L., Hunnisett, L., Friesen, M.H., Jacobson, S., Kasapinovic, S., Chang, D., Diav-Citrin, O., Chitayat, D., Nulman I., Einarson T.R. and Koren G. 2000. Birth Defects After Maternal Exposure to Corticosteroids: prospective Cohort Study and Meta-Analysis of Epidemiological Studies, *Teratology*, 62; 385-392.
- Rajion, Z. and Alwi, Z. 2007. Genetics of Cleft Lip and Palate: A Review. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 14(1); 4-9.
- Reutter, H., Birnbaum, S., Mende, M., Lauster, C., Schmidt, G., Henschke H., Saffar, M., Martini, M., Lauster, R., Schiefke, F., Reich, H., Braumann, B., Scheer, M., Knapp, M., Nöthen, M., Kramer, J. and Mangold, E. 2008. TGFB3 Displays-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate. *J Hum Genet.*, 53; 656-661.
- Riley, B.M., Mansilla, M.A., Ma, J., Daack-Hirsch, S., Maher, B.S. and Raffensperger, L.M. 2007. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci*, 104; 4512-17.

- Romitti, P.A. 1999. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*, 59(1); 39-50.
- Rullo, R., Gombos, F., Ferraraccio, F., Farina, A., Morano, D., Festa, V.M., Guida, L., Martinelli, M., Scapoli, L., Pezzetti, F. and Carinci, F. 2006. TGFB3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 70; 1759-1764.
- Scapoli, L. 2005. Strong evidence of linkage disequilibrium between Polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am. J. Hum. Genet*, 76 (1); 180-83.
- Scapoli, L., Palmieri, A., Martinelli, M., Vaccari, C., Marchesini, J., Pezzetti, U., Baciliero, U., Padula, E., Carinci, P. and Carinci, F. 2006. Study of the PVRL1 gene in Italian Nonsyndromic Cleft Lip Patients with or without Cleft Palate, *Annals of Human Genetics*, 70; 410- 3.
- Shaw, G.M. and Lammer, E.J. 1999. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr*, 134 (3); 298-303.
- Shiang, R., Lidral, C., Ardinger, H.H., Buetow, K.H., Romitti, P.A, Munger, R.G. and Murray, J.C. 1993. Association of Transforming Growth-Factor Alpha gene polymorphisms with Nonsyndromic Cleft Palate Only (CPO). *Am J Hum Genet*, 53; 836-43.
- Sozen, M., Suzuki, K., Tolarova, M., Bustos, T., Iglesias, J.E. and Spritz, R. A. 2001. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non- syndromic cleft lip/ palate in Northern Venezuela. *Nature Genetics*, 29; 141-2.
- Spritz, R.A. 2001. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Current Opinion in Pediatrics*, 13; 556-560.
- Stainer, P. and Moore, G.E. 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non- syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13(1); 73-81.
- Stoll, C., Mengsteab, S., Stoll, D., Riediger, D., Gressner, A.M. and Weiskirchen, R. 2004. Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy adults. *BMC Medical Genetics*, 5(15); 1-9.
- Suzuki, K., Hu, D., Bustos, T., Zlotogora, J., Helms, J. and Spritz, R.A. 2000. Mutations of PVRL1, encoding a cell- cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/ palate actodermal dysplasia. *Nature Genetics*, 25; 427-30.

- Suzuki, Y., Jezewski, P.A., Machida, J., Watanabe, Y., Shi, M., Cooper, M.E., Viet, L., Hai, H., Natsume, N. and Shimozato, K. 2004. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med*, 6(3); 117–125.
- Tanabe, A, Taketani, S., Ichikawa, Y., Tokunaga, R., Ogawa, Y. and Hiramato, M. 2000. Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clinical Science*, 99; 105-111.
- Tolarova, M.M. and Haris, J. 1995. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptual supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*, 51; 71-78.
- Tolarova, M.M., Van Rooj, A.M., Pastor, M., Van Der Put, M.J., Goldberg, A.C., Capozzi, A., Thomas, C.G., Pastor, L., Mosby, T., Ferrari, C., Eskes, T.B. and Steegers –Theunissen, R.M. 1998. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet*, 63; Abstract 27.
- Tunçbilek, E., Özgür, F. ve Balcı, S. 2004. Yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*, 47; 172-176.
- Van Rooj, I.A., Wegerif, M.J. and Roelofs, H.M. 2001. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene–environment interaction. *Epidemiology*, 12 (5); 502-507.
- Van Rooj, I.A., Vermeij-Keers, C., Kluijtmans, L.J., Ocke, M.C., Zielhuis, G.A., Goorhuis-Brouwer, S.M., Van Der Blezen, J.J., Kuijpers-Jagtman, A.M. and Steegers-Theunissen, R.M. 2003. Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate?. *Am J Epidemiol*, 157; 583-591.
- Vieira, A.R., Orioli, I.M., Castilla, E.E., Cooper, M.E., Marazita, M.L. and Murray, J.C. 2003. MSX1 and TGFB3 Contibute to Clefting South America. *J Dent Res* 82(4); 289-292.
- Vieira, A.R. 2005. Medical sequencing for candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate, *Plos Genetic*, 1(6); 64.
- Vieira, A.R. 2006. Association between the Transforming Growth Factor Alpha Gene and Nonsyndromic Oral Clefts: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*, 163; 790-810.
- Vieira, A.R., Modesto, A., Meira, R., Barbosa, A.S., Lidral, A.C. and Murray, J.C. 2007. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet*, 143; 538-545.

- Vieira, A.R. 2008. Unraveling Human Cleft Lip and Palate Research. *J Dent Res*, 87(2); 119-125.
- Werler, M., Lammer, E.J. and Rosenberg, L. 1997. Maternal cigarette smoking during Pregnancy in relation to oral clefts. *Am J Epidemiol*, 132; 926-932.
- Wong, F.K. and Hägg, U. 2004. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J*, 10; 331-336.
- Wyszynski, D.F. and Beaty, T.H. 1996. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*, 53(5); 305-17.
- Wyszynski, D.F. and Diehl, S.R. 2000. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. *Am J Med Genet*, 92(1); 79-80.
- Wyszynski, D.F. 2002. *Cleft Lip & Palate: From Origin to Treatment*, 1st Edition. Oxford University Press, 619, Oxford.
- Zuccherro, T.M., Cooper, M.E., Maher, B.S., Daack-Hirsch, S., Nepomuceno, B. and Ribeiro, L. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip and palate. *N Engl J Med*, 351; 769-780.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ebru DERELLİ

Doğum Yeri : Çankırı

Doğum Tarihi : 22.11.1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu Kurum ve Yılı

Lise : Çankırı Anadolu Lisesi (1998-2002)

Lisans : Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2003-2007)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Eylül 2008-Haziran 2010)