

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRADER-WILLI, ANGELMAN VE MILLER-DIEKER OLGULARDA  
FISH ( FLUORESAN IN SITU HİBRİDİZASYON ) METODU İLE  
MİKRODELESYON ARAŞTIRILMASI**

Biyolog. Seda ÖRENAY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

118843

118843

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

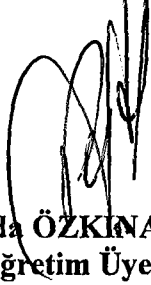
**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

MANİSA – 2002

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seda ÖRENAY'ın "Prader-Willi, Angelman ve Miller- Dieker olgularda FISH ( Fluoresan In Situ Hibridizasyon) metodu ile mikrolelesyon araştırılması" konulu tezini incelemek üzere tez değerlendirme jürisi 02/05/2002 günü saat 10.00 da Anabilim Dalı Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Jürimizce bu çalışma, Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



**Prof.Dr.Ferda ÖZKINAY**  
Danışman Öğretim Üyesi



**Yrd.Doç.Dr.Nuray ALTINTAŞ**  
Anabilim Dalı Başkanı



**Yrd.Doç.Dr.Cumhur GÜNDÜZ**  
Öğretim Üyesi

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25.05.2002.....gün ve 9-4... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU**  
**DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Prof.Dr.Ertan ÖZDEMİR**  
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



## YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DÖKÜMANTASYON MERKEZİ

### TEZİ VERİ RAPORU

Tez No:

Konu:

Üniv. Kodu:

**Not:** Bu bölüm merkezimiz tarafından doldurulacaktır.

#### Tez Yazarının

Soyadı: **ÖRENAY**

Adı: **Seda**

Tezin Türkçe adı:

Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker Sendromlu Hastalarda FISH ( Fluoresan İn Situ Hibridizasyon ) metodu ile mikrolelesyon taranması

Tezin Yabancı adı:

Screening microdeletion by FISH method ( Fluoresan In Situ Hybridization) in patients with Miller-Dieker and Angelman, Prader-Willi syndromes.

#### Tezin yapıldığı

Üniversite: **Celal Bayar**

Enstitü:

**Sağlık Bilimleri**

Yılı: **2002**

Tezin Türü: **1- Yüksek lisans \***  
2- Doktora  
3- Tıpta Uzm.  
4- Sanatta Yeterlilik

Dili: **Türkçe**  
Sayfa sayısı:

Tez Danışmanının

Ünvanı: **Prof. Dr.**

Adı: **Ferda**

Soyadı: **ÖZKINAY**

#### Türkçe anahtar kelimeler

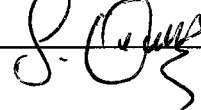
- 1- FISH
- 2- Prader-Willi / Angelman sendromları
- 3- Miller-Dieker sendromu
- 4- Lizensefali
- 5- Mikrolelesyon sendromları

#### İngilizce anahtar kelimeler

- 1- FISH
- 2- Prader-Willi / Angelman syndromes
- 3- Miller-Dieker syndrome
- 4- Lissencephaly
- 5- Syndromes of microdeletion

Tarih: **02.05.2002**

İmza:



## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Tablo Adı</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1	Prader-Willi sendromunun tanı koydurucu kriterleri	2
Tablo 2	Angelman sendromunda gelişme ve laboratuvar bulguları	3
Tablo 3	Angelman sendromunun tanı koydurucu kriterleri	3
Tablo 4	Miller- Dieker sendromunun karakteristik özellikleri	17
Tablo 5	Miller- Dieker sendromunda sitogenetik mekanizmalar	19
Tablo 6	FISH için prob tipinin seçimi	27
Tablo 7	FISH 'da izotopik olmayan işaretleme ve belirleme sistemleri	28
Tablo 8	FISH aşamaları	37
Tablo 9	FISH uygulamaları sırasında ortaya çıkan sorunlar ve çözümleri	39
Tablo 10	Prader-Willi sendrom ön tanılı 12 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları	43
Tablo 11	Angelman sendrom ön tanılı 1 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları	44
Tablo 12	Miller- Dieker sendrom ön tanılı 13 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Şekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1	15q 11-13' ün paternal ve maternal delesyonu ve Prader-Willi ve Angelman sendromları	5
Şekil 2	Uniparental dizominin oluş mekanizmasına ilişkin ileri sürülen olasılıklar	7
Şekil 3	Maternal ve paternal imprintingi açıklayan pedigrî örnekleri	10
Şekil 4	Lizensefalik bir olguda MRI	14
Şekil 5	Normal serebral korteks ile lizensefalik serebral korteksin karşılaştırılması	14
Şekil 6	Miller-Dieker sendromunda 17p13.3 delesyonu	20
Şekil 7	Metafaz kromozomlarının eldesi ve karyotipleme	35
Şekil 8	FISH' in şematik gösterimi	40
Şekil 9	Prader-Willi / Angelman probunun işaretlediği kromozomal bölge	41
Şekil 10	Miller-Dieker / ILS ve Smith-Magenis probunun işaretlediği kromozomal bölge	42
Şekil 11	Prader-Willi /Angelman sendrom ön tanılı olguların fenotipleri A <sub>1</sub> : PWS ön tanılı olgunun genel görünümü A <sub>2</sub> : Küçük eller A <sub>3</sub> : Angelman sendrom ön tanılı olgunun fenotipi A <sub>4</sub> : İğsi ve küçük eller	44
Şekil 12	PWS ön tanılı bir olguya ait karyotip	45
Şekil 13	SNRPN/IC ( Cytocell ) probuyla işaretlenmiş interfaz çekirdeği ve metafaz plağı. SNRPN gen bölgesinde mikrolelesyon yok.	46
Şekil 14	MDS ön tanılı bir olgunun genel ve fasial görünümü	48
Şekil 15	MDS ön tanılı bir olguya ait karyotip	49
Şekil 16	LS1 ve FL1 (Cytocell) probuyla işaretlenmiş interfaz çekirdeği ve. metafaz plağı. Miller-Dieker ve Smith –Magenis gen bölgelerinde delesyon yok.	50

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>III</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PRADER-WİLLİ VE ANGELMAN SENDROMLARI</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Klinik Özellikler</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Genetik</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3. Genetik etiyolojileri</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.1. Kromozom 15q11, 2 -13, 2 sitogenetik ve moleküler delesyonu</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.2. Uniparental Dizomi</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3.3. Metilasyon imprinting mutasyonlar</b>	<b>8</b>
<b>1.1.3.4. UBE3A mutasyonları</b>	<b>10</b>
<b>1.1.3.5. Nedeni bilinmeyen</b>	<b>10</b>
<b>1.1.4. Sitogenetik</b>	<b>10</b>
<b>1.1.5. Moleküler genetik</b>	<b>11</b>
<b>1.2. LİZENSEFALİ VE MİLLER-DİEKER SENDROMU</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1. Lizensefali</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2. Patoloji</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3. Patogenez</b>	<b>15</b>
<b>1.2.4. Lizensefali tipleri</b>	<b>15</b>
<b>1.2.5. Klinik sendromları</b>	<b>16</b>
<b>1.2.5.1. Miller-Dieker Sendromu</b>	<b>16</b>
<b>1.2.5.1.1. Klinik özellikler</b>	<b>16</b>
<b>1.2.5.1.2. Genetik</b>	<b>18</b>
<b>1.2.5.1.3. Sitogenetik</b>	<b>18</b>
<b>1.2.5.1.4. Moleküler genetik</b>	<b>19</b>
<b>1.2.5.1.5. Teşhis</b>	<b>21</b>
<b>1.3. FLUORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON ( FISH )</b>	<b>22</b>
<b>1.3.1. FISH problemlerinin seçimi</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2. Prob tipleri</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3. Prob uzunluğu</b>	<b>25</b>
<b>1.3.4. Prob işaretlenmesi</b>	<b>26</b>
<b>1.3.5. Uygulama alanları</b>	<b>30</b>

<b>1.3.5.1. Sitogenetik</b>	<b>30</b>
<b>1.3.5.2. Moleküler genetik</b>	<b>31</b>
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Materyal</b>	<b>32</b>
<b>2.2. Metod</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1. Periferik kan kültürü</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1.1. Kullanılan solüsyonlar</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1.2. İşlemler</b>	<b>33</b>
<b>2.2.2. Tripsin -Giemsa bantlama (GTG bantlama )</b>	<b>34</b>
<b>2.3. FISH analizi</b>	<b>35</b>
<b>2.3.1. Kullanılan solüsyonlar</b>	<b>35</b>
<b>2.3.2. Yöntem</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2.1. Preperatların hazırlanması</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.2. Materyalin eldesi ve preperat üzerinde sabitleştirilmesi</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.3. Pre-denatürasyon</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.4. Prob ve hedef DNA' nın denatürasyonu</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.5. Prob ve hedef DNA' nın hibridizasyonu</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.6. Hibridizasyon sonrası yıkamalar</b>	<b>38</b>
<b>2.3.2.7. Prob sinyallerinin görüntülenmesi ve inceleme</b>	<b>39</b>
<b>2.3.2.8. FISH uygulaması sırasında ortaya çıkan sorunlar ve çözümleri</b>	<b>39</b>
<b>2.3.3. FISH değerlendirme</b>	<b>41</b>
<b>3. BULGULAR</b>	<b>43</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>52</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>55</b>

## ÖZET

Prader-Willi Sendromu (PWS), infantlarda santral müsküler hipotoni, beslenme bozuklukları, gelişme geriliği ile karakterize nöroendokrin bir bozukluktur. En önemli özellikleri fasial dismorfizm, hipogonadizm, kriptorşidizm, kısa boy, kısa el ve ayaklar ve mental retardasyondur. Genellikle erken çocukluk çağında klinik tabloya aşıru yeme sonucunda gelişen obesite de eklenmektedir.

Angelman Sendromu (AS) ise, mental retardasyon, konuşma eksikliği, gülme krizi, ataksik ani hareketler, mikrosefali, krizler, anormal EEG, dışarı çıkmış dil ve çene çıkıklığı ile karakterizedir.

Miller-Dieker Sendromu (MDS), karakteristik fasial görünüm ve lizensefali tip I ile karakterize multipli malformasyon sendromudur. Miller-Dieker sendromunda lizensefaliye ek olarak, şiddetli mental retardasyon, çıkıntılı alın, bitemporal darlık, kısa bir burun ile dışa dönük burun delikleri , çıkık üst dudak ve kk çene bulguları mevcuttur.

Prader-Willi ve Angelman sendromlu hastaların % 70' i parental veya maternal D15S9-D15S12 lokuslarını taşıyan intersitial de nova mikrodelesyonlara sahiptir. Prader-Willi sendromlu hastaların çoğu ve Angelman sendromlu hastaların az bir kısmı sırasıyla maternal ve paternal uniparental dizomi ( UPD ) 15'i taşımaktadır. Daha başka kromozom 15 düzenlemeleri ve normal olmayan metilasyona sebep olan kk mikrodelesyonlarda ender olarak görülür.

Miller-Dieker Sendromu, Miller-Dieker kritik bölgesinde hem Miller-Dieker Sendromu, hemde İzole Lizensefali Sendromu (ILS) ile tanımlanan 17p13.3 kromozom mikrodelesyonuna sahiptir Miller-Dieker sendromlu hastaların % 90' nında, normal kromozomlar mevcut olsa bile, 12q:17p translokasyonları, 17. kromozomun ringi ve 17. kromozomun uzun kolunun duplikasyonu ile tanımlanan kısa kol delesyonu mevcuttur.

Bu çalışmada mikrodelesyonları saptayan Cytocell'in, Prader- Willi / Angelman sendromlu hastalarda 15q11-13 delesyonu için SNRPN (small nüklear riboprotein polipeptid N) / IC probu ve 15qter telomere spesifik probu (kontrol probu), Miller-Dieker sendromlu hastalarda 17p13.3 delesyonu için MDS / ILS probu ve SMS probu (Simith-Magenis sendrom probu ) ile FISH ( Flouresan İn Situ Hibridizasyon) yöntemi uygulandı. Prader-Willi / Angelman sendromu olduğu dşnlen 12 hastada ve Miller-Dieker n tanılı ve lizensefalili 13 hastada FISH bulguları, klasik sitogenetik bulgularla karşılaştırıldı.Bu



hastalık gruplarını kapsayan toplam 25 hastada mikrodelyon ve herhangi bir sitogenetik anomali saptanmadı.

FISH yöntemi, Prader-Willi / Angelman ve Miller-Dieker sendromu düşünölen hastaların teşhisi için gerekli testlerden ilk sırada yer alan bir test olarak belirtilmektedir. Bu çalışmada, klinik muayene ile ön tanı olarak Prader-Wili/Angelman ve Miller-Dieker sendromu düşünölen bu hastalarda FISH yöntemi ile mikrodelyon saptanmaması, klinik tanıda daha seçici olunması gerektiğini düşöndürdü. Tüm hastalarda uygulanan yöntem ile mikrodelyon aranılan bölgelere ait sinyallerin alınması bu yöntemin rutin olarak laboratuvarımızda kullanılabileceğini gösterdi.



## SUMMARY

Prader-Willi syndrome (PWS) is a neuroendocrine disorder characterized by central muscular hypotonia, nutritional disorders, thrive failure in infants. The most common features of the syndrome are facial dysmorphism, hypogonadism, cryptorchidism, short stature, short hands and feet, and mental retardation. Obesity caused by hyperphagia has been usually added to clinical picture in the early childhood stage.

Angelman syndrome (AS) is characterized by mental retardation, absence of speech, paroxysms of laughter, ataxic jerky movements, microcephaly, seizures, an abnormal electroencephalogram (EEG) pattern, with protruding tongue, and prognathism.

Miller-Dieker syndrome (MDS) is a multiple malformation syndrome characterized by type I lissencephaly and characteristic facial appearance. In addition to the lissencephaly, a severe mental retardation, prominent forehead, bitemporal narrowness, a short nose with turned up nares, protuberant upper lip, and small jaw is present the findings in Miller-Dieker syndrome.

About 70% of patients with Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome have a common interstitial de novo microdeletion encompassing paternal or maternal loci D15S9 to D15S12. Most of the Prader-Willi syndrome patients and a small number of Angelman syndrome patients have a maternal or paternal uniparental disomy (UPD) 15, respectively. Other chromosome 15 rearrangements and a few smaller atypical deletions associated with an abnormal methylation pattern, are rarely to be seen.

Microdeletions of chromosome 17p13.3 also known as the Miller-Dieker critical region, have been associated with both Miller-Dieker syndrome and isolated lissencephaly syndrome. Normal chromosomes are present in 90% but others are associated with chromosomal abnormalities which include deletion of the short arm in association with the duplication of long arm of chromosome 17, ring chromosome 17, and 12q:17p translocation.

SNRPN/IC and 15qter telomere specific probes for 15q11-13 region in Prader Willi / Angelman syndrome cases; MDS/ILS and SMS probes for 17p13.3 region in Miller-Dieker syndrome cases were used by FISH technique. The results of FISH in 12 cases with Prader Willi / Angelman syndrome and 13 cases with Miller-Dieker and lissencephaly who were diagnosed according to the clinical assessment; were compared with the cytogenetic findings of those cases. No microdeletion or cytogenetic anomaly was detected in all patients.

## II-1

In both group ( 25 patients ) no microdeletion was detected FISH method has been reported that is the first choice to investigate the microdeletion in Prader Willi / Angelman syndrome and Miller-Dieker syndrome patient. In this study having no patient with microdeletion generated a thought of being more cautious in clinical diagnosis. It is considered that the FISH method used in this study can be performed routinely in our laboratory since all patients chromosomes showed fluorescent signals in the loci investigated.



## **TEŞEKKÜR**

Tez alıőmam sırasında değerli bilgileri ile yol gösteren ve her türlü desteği sağlayan sayın Anabilim Dalı Baőkanım Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ, Danışman Hocam Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY ve Yrd. Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e sonsuz teşekkür ve saygılarımla.



# 1. GİRİŞ

## 1.1. PRADER-WİLLİ VE ANGELMAN SENDROMLARI

### 1.1.1. Klinik Özellikler

Prader-Willi sendromu (PWS), ilk kez Prader, Labhart ve Willi tarafından 1956 yılında tanımlanan pek çok sistemi etkileyen ve bu nedenle tanının güç konulduğu hastalıklar kompleksi olarak tanımlanmıştır (1). 1968 yılına kadar literatürde bazı vakalar bildirilmiş olmasına rağmen semptomların prevalansına dair raporlar ancak 1972 yılında yayınlanmış ve ilk kez hipotoni (H), hipogonadizm (H), hipomentia (H) ve obeziteye (O) sahip 9 çocukta bildirilmiştir (2, 3). Bulguların çeşitli oluşu ve değişik zamanlarda ortaya çıkması nedeniyle Prader-Willi sendromuna hayatın herhangi bir anında tanı konabilir.

Zelweger adlı araştırmacı; Prader-Willi sendromunu 2 döneme ayırmıştır. İlk dönem infantil faz olup hipotoni ile karakterizedir, ikinci dönem ise hipotonik fazı izleyen aşırı kilo artma dönemidir (4). Whitman ve Accordo ise sendroma adolosan evresi diye üçüncü bir dönem daha eklemiş ve bu evreye özgü davranış bozuklukları bildirmişlerdir (5).

Prader-Willi sendromunda, gerek bulguların çeşitliliği, gerekse bu bulguların farklı yaşlarda ortaya çıkışı tanı koymayı güçleştirmektedir. Tüm bunların yanında özellikle infant dönemde pek çok hastalık ile karışarak tanın gecikmesine yol açmaktadır. Tüm bu zorluklar 1992 yılında Prader-Willi sendromu için tanı kriterleri konusunda bir konsensus gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Holm ve arkadaşları'nın 1992 yılında yayınladıkları raporda Prader-Willi sendromunun tanısı için majör, minör ve destekleyici kriterler bildirilmiştir (Tablo 1). Holm ve arkadaşları'na göre, 3 yaşın altında 5 majör veya 4 majör ve 1 minör; 3 yaş ve üzerinde 5'i majör olmak üzere 8 majör kriterin var olması şartı getirmişlerdir (6).

Prader-Willi sendromunda gözlenen hiperfaji ve aşırı obezite sonucu kardiyopulmoner yetmezlik sonucu erken ölümler gözlenmektedir. Prader-Willi sendromunda en sık ölüm nedeni hiperfajiye bağlı obezitedir (7).

Angelman sendromu ise, Prader-Willi sendromundan klinik olarak farklı fenotipik özelliklere sahip genetik bir hastalıktır. İlk kez bir İngiliz pediatrist olan Harry Angelman tarafından epilepsi, ifade yokluğu, dismorfik yüz görünümü, paroksizmal gülme ve hafif derecede mental retardasyon örneği gösteren 3 çocukta tanımlanmıştır. Bu sendrom "Kukla Çocuk Sendromu" olarak da isimlendirilir. Çünkü ataksik yürüyüşleri ve kollarını yanarım kütula

açık tutma ile kukla pastürünü anımsatırlar. Genellikle hiperaktif çocuklar olup bebeklik döneminden itibaren spontan gülme atakları nedeniyle de "Mutlu Kukla Sendromu" olarak adlandırılır. Fakat Williams ve Frias adlı araştırmacılar mutlu kukla sendromu adının birçok profesyoneli ve ebeveynleri küçük düşürdüğünü düşünerek sendromun adını " Angelman Sendromu " olarak değiştirdiler ve 1995 'de Angelman sendromunun diagnostik kriterleri için bir konsensus geliştirdiler [Tablo 2 ve 3 (8)].

### **Tablo1.Prader-Willi sendromunun tanı koydurucu kriterleri**

#### **MAJÖR**

- 1- Neonatal hipotoni
- 2- İnfant döneminde beslenme güçlüğü / gelişme geriliği
- 3- Bir yaştan sonra aşırı kilo alımı
- 4- Karakteristik yüz görünümü ( dar bifrontal çap, badem şeklinde palpebral aralık, küçük ağız, ince üst dudak, yüksek kemerli damak )
- 5- Hipogonadizm (genital hipoplazi ve gecikmiş veya imkomplet gonadal maturasyon)
- 6- Mental retardasyon veya öğrenme güçlüğü (altı yaş öncesi global gelişme geriliği)
- 7- Hiperfaji, besinlere obsesyon
- 8- Sitogenetik / moleküler anormallik: 15q11-13 delesyonu

#### **MINÖR**

- 1- İnfant döneminde zayıf ağlama, hipotoni
- 2- Davranış bozuklukları (obsesiv-kompulsiv, çalma ve yalancılığa eğilim, iddiacılığa eğilim, zıtlık... )
- 3- Uyku bozuklukları ve uyku apnesi
- 4- On beş yaşından sonra kısa boy
- 5- Hipopigmentasyon
- 6- Küçük el (25. P' den az ), küçük ayak (10. P' den az )
- 7- Dar el ve ulnar kenarda silinme
- 8- Göz anomalileri (ezotrophia, miyopi )
- 9- Ağız köşesinde birikme ile giden kalın visköz tükürük
- 10- Konuşma ve heceleme defektleri
- 11- Deri katlantıları

## **DESTEKLEYİCİ**

- 1- Yüksek ağrı eşiği
- 2- Kusmada azalma
- 3- İnfantta ısı değişikliği, çocuk ve adütte değişken ısı sensitivitesi
- 4- Skolyoz ve / veya kifoz
- 5- Erken adrenarş
- 6- Osteoporoz
- 7- Alışılmamış titreme
- 8- Normal nöromuskular çalışmalar

### **Tablo2. Angelman sendromunda gelişme ve laboratuvar bulguları**

- 1- Prenatal ve postnatal dönemde normal baş çevresi. Majör doğum defektleri bulunmaz.
- 2- Bebeklikten itibaren gelişme gecikmesi (altı - on iki haftalık olanlarda gelişimsel geç kalma ve geç kalmış gelişimin ilerlemesi)
- 3- Normal metabolik, kimyasal ve hematolojik profil
- 4- MRI (Manyetik rezonans görüntüleme) veya CT (bilgisayarlı tomografi) bulgularında normal beyin yapısı

### **Tablo3. Angelman sendromunun tanı koydurucu kriterleri**

#### **BULGULAR ( %100 hastada)**

- 1- Şiddetli fonksiyonel gelişme geriliği
- 2- Konuşma yokluğu veya minimal kelime kullanımı: altı kelimeyi geçmeyen konuşma, sözel olmayan işaretli anlatımla iletişim
- 3- Denge veya hareket bozukluğu, genellikle kollarda titrek hareket ve / veya ataksik yürüyüş
- 4- Sık sık tekrarlayan gülme krizleri, göze çarpan mutlu tavır, kolay heyecanlanma, çoğu kez gözlenen el çırpma hareketleri ile hipermotorik davranışlar, kısa ilgi aralığı

#### **SIK GÖRÜLEN BULGULAR ( % 80' den fazla hastada)**

- 1- Baş çevresinde oransız büyüme, genellikle iki yaşına kadar mikrosefali vardır.
- 2- Genellikle üç yaşından erken başlayan nöbetler
- 3- Anormal EEG

## **DAHA NADİR GÖRÜLEN BULGULAR (% 20- % 80 hastada )**

- 1- Başın arka kısmının yassı olması
- 2- Kafatasının arka alt kısmında oluk
- 3- Sarkmış dil
- 4- Dilde itme, emme / yutma güçlüğü
- 5- İnfant dönemde beslenme problemleri
- 6- Prognatizm
- 7- Açık ağız, geniş aralıklı dişler
- 8- Salya akması
- 9- Aşırı çiğneme hareketleri / dudaklarını oynatarak bir şey söyler gibi yapma
- 10- Strabismus
- 11- Çenede hipopigmentasyon, sadece delesyonlu vakalarda görülen renkli göz ve açık renk saç
- 12- Tendon reflekslerinde artma
- 13- Taşikardi
- 14- Uyku bozukluğu

### **1.1.2. Genetik**

Hastaların çoğunda kromozom delesyonu bulunmasından önce, Prader-Willi sendromu için otozomal resesif ve otozomal dominant kalıtım modelleri düşünülüyordu. Prader-Willi sendromlu olguların büyük çoğunluğu sporadiktir ve bildirilen familial olguların sayısı azdır. Bu familial olguların içinde, normal karyotipli ve birden fazla Prader-Willi sendromlu hastaların olduğu iki aile rapor edilmiş ve dengeli kromozomal yeniden düzenlenmelerin neden olduğu bir familial olgu bildirilmiştir. Bu konuda çalışan Cassidy, Prader-Willi sendromu prevalansının 1/10000 – 1/20000 arasında değişmekte olduğunu saptamış ve bu çalışmalarında normal karyotipli Prader-Willi sendromunu temel almıştır.

Angelman sendromunda olguların çoğunluğu sporadiktir ve otozomal dominant geçişlidir. Angelman sendromu, bazen otozomal resesif kalıtım da gösterir. İmprinting lokusun otozomal dominant geçişi ile, kromozom 15'e bağlı bir çok familial Angelman sendrom olgusunda yapılan analizler, Angelman sendromlu olguların büyük çoğunluğunda kromozom 15 anormallikleri bulunmasını sağlamıştır (9).

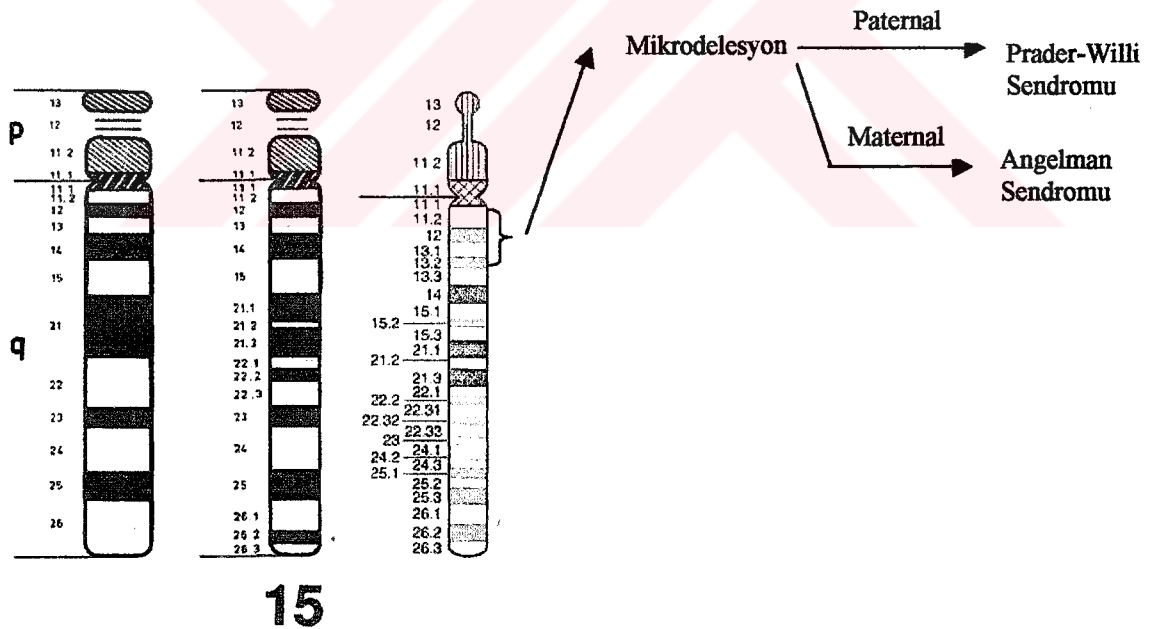


### 1.1.3. Genetik Etiyolojileri

#### 1.1.3.1. Kromozom 15q11,2-13,2 sitogenetik ve moleküler delesyonu

Prader-Willi ve Angelman sendromundan sorumlu kromozom bölgeleri 1000-1500 kb alanı kaplar. Prader-Willi için kritik kromozomal bölge yaklaşık 400 kb'dır ve D15S63 (PW71 probu) ve SNRPN (küçük nükleer riboprotein N, bir gen) olmak üzere iki lokus içerir. SNRPN Prader-Willi için aday genidir. Angelman sendromu için kritik bölgede uca doğru yaklaşık 100 kb daha ötede olup D15S10 (3-21 problemleri) lokusu ile tanımlanır (10).

Prader-Willi ve Angelman sendromlu hastaların % 70 'inde, genelde rastlanan D15S9-D15S12 bölgelerini içeren 15 nolu kromozomun uzun kolunun proksimalinde de nova 3-4 Mb bir intersitiasl mikrodelesyonu (15q11,2-13,2) bulunmaktadır. Delesyonun paternal kromozomda olması Prader-Willi sendromuna, maternal kromozomda olması Angelman sendromuna neden olur. Diğer deyişle 15q11-13 mikrodelesyonu, Prader-Willi sendromunda paternal kökenli, Angelman sendromunda maternal kökenlidir (Şekil1). Böyle delesyonlu hastalar ailede tekrar riski olmayan seyrek görülen olgulardır (11).



Şekil1.15q11-13'ün paternal ve maternal delesyonu ve Prader-Willi veAngelman Sendromu

### 1.1.3.2. Uniparental Dizomi

İsviçreli Dr. Eric Engel fare yavrularında yaptığı sitogenetik çalışmalarda bazen, homolog kromozom çiftinin ana veya babanın sadece birinden geldiğini ( diğ er ebeveynin söz konusu kromozomu nakletmediğini ) gözlemiştir. Yani total kromozom sayısı normal, ancak söz konusu kromozom çiftinin, ana babanın sadece birinden geçtiğini göstermiştir. Fenomen, izodizomi (ebeveynin birinden gelen tek kromozomun duplike olması) veya heterodizomi (iki homolog kromozomdan her birinin farklı ebeveyninden gelmesi) olarak gözlenmekteydi. Önceleri sadece deney hayvanlarına has bir özellik sanılan uniparental dizominin insanlarda da görüldüğü ve bu olayın ender olmadığı ispatlandı (12 ).

Uniparental dizomi (UPD) kısaca, sadece bir ebeveyine ait iki homolog kromozom çiftinin (veya kromozom segmentinin) var olması diğ er ebeveyine ait o kromozomun bulunmaması olarak tanımlanan bir fenomendir. Eğer ebeveyine ait homolog kromozom çiftinin her ikisinde anneden geliyorsa maternal uniparental dizomi, sadece babadan geliyorsa parental uniparental dizomiden söz edilir (13).

Uniparental dizominin oluşumuna ilişkin birkaç model önerilmektedir;

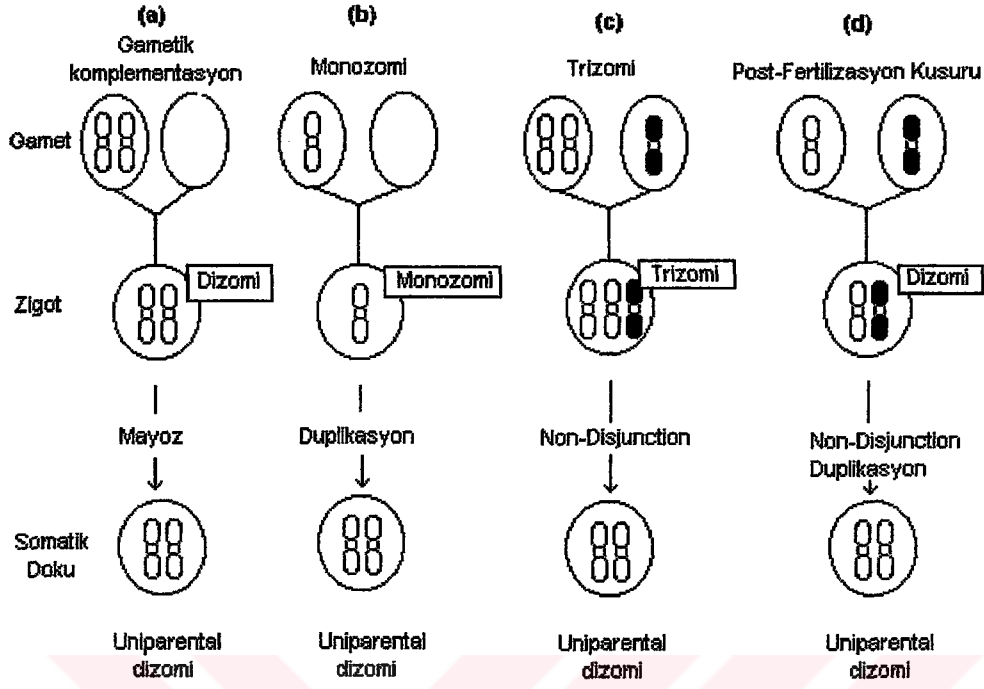
**a-** Birinci olasılıkta gametlerden birinde ilgili kromozom diploid sayıda bulunurken diğ er gamette bu kromozom hiç temsil edilmemektedir.( Şekil 2a).

**b-** Uniparental dizomi, gametlerin monozomik veya trizomik olduğu durumlarda da görülebilmektedir. Monozomik durumda, bir normal nüllizomik gametden monozomik bir zigot oluştuktan sonra bir duplikasyonla izodizomik hücre oluşur (Şekil 2b).

**c-** Trizomik durumda ise, bir normal gamet ile ilgili kromozom bakımından diploid olan bir gametin birleşmesinden trizomik bir zigot oluşur. Ve bir kromozom ayrılmaması sonucu uniparental dizomili bir hücre ortaya çıkar (Şekil 2c). Bu mekanizma uniparental dizomiyi oluşturan en yaygın mekanizma olarak değerlendirilmektedir.

**d-** Ayrıca uniparental dizomi fertilizasyon sonrası bir kusura bağılı olarak da oluşabilmektedir ve bir kromozom ayrılmaması ve duplikasyon sonucunda izodizomi ortaya çıkmaktadır

[Şekil 2d (14)].



Şekil 2. Uniparental dizominin oluş mekanizmasına ilişkin ileri sürülen olasılıklar

Uniparental dizomi, insanda fenotipik anomalilerle sonuçlanır. Şimdiye kadar saptanmış olanlar; 2, 7, 14, 15, 16 numaralı kromozomlarda maternal uniparental dizomi; 6, 11, 14, 15, ve 20 numaralı kromozomlarda paternal uniparental dizomi görülmektedir (13).

Prader-Willi ve Angelman sendromları 15. kromozomda maternal ve paternal uniparental dizomi bölgeleriyle assosiyel uniparental dizominin en çarpıcı örnekleridir. Prader-Willi sendromlu hastaların yaklaşık üçte biri ve Angelman sendromlu hastaların %20-30' unda delesyon gösterilmemiştir. Bunun yerine, Prader-Willi sendromlu hastaların yaklaşık % 30' u ve Angelman sendromlu olguların % 2 'sinde uniparental dizomi görülebilmektedir(15). Prader-Willi sendromlu hastalarda 15 numaralı kromozom için maternal uniparental dizomi vardır ve paternal kökenli 15 numaralı kromozom yoktur, her iki 15 numaralı kromozom maternal kaynaklıdır. Angelman sendromlu hastalarda ise aynı kromozomun paternal uniparental dizomisi bildirilmiştir. Bu olgularda uniparental dizominin ortaya çıkmasında en olası neden, bir trizomik zigottaki üç kromozomdan birinin, somatik kromozom ayrılmaması yada anafazda geri kalma sonucu kaybolmasıdır (14).

### 1.1.3.3. Metilasyon imprinting mutasyonlar

Her diploid insan hücresi, 22 çift otozom ve 1 çift seks kromozomuna sahiptir. 1980'lere kadar, anne ve babadan gelen otozomal kromozom çiftlerinin her üyesinin kopyalarının da benzer görevler yürütüp, eşit olduğu düşünülmüştü. Fakat, hayvanlar üzerinde yapılan deneyler ve insanlarda rastlanan birkaç hastalığın analizi, bunun doğru olmadığını, bazı genlerin ya sadece anneden yada sadece babadan kalıtılmış kopya ile ifade edildiğini ortaya çıkardı. Bu şaşırtıcı gelişmeler klasik mendeliyel genetiğinin bazı değişiklikler geçirmesiyle sonlandı ve bir genetik paradoks ortaya çıktı. Bir gen lokusunun düzenlenmesindeki bu olay, geçen 15 yıl içerisinde tanımlanmış epigenetik bir fenomendir ve genomik veya gametik imprintlenme olarak adlandırılır (13).

Kısaca bu fenomende ; maternal ve paternal genomların bazı bölgeleri işlevsel olarak eşit değildir. Böyle bölgelerdeki gen lokusları parental kökenlerine göre aktivite farklılıkları gösterebilirler. Bu nedenle bazı genler için, paternal ve maternal genomlar embriyonun gelişmesine farklı şekillerde katkıda bulunurlar(16).

Genomik imprintlenme paternal yada maternal kökenli bir gen lokusunu kapsayabilir. Maternal olarak imprint edilmiş genler sadece paternal allel ile ifade edilir ve maternal imprinting olarak adlandırılır, bunu terside doğrudur.( Paternal imprint maternal genler ile, paternal imprinting ) (13).

Genomik imprintlemenin bir açıklamasıda, metilasyon farklılıklarından kaynaklandığı şeklindedir. Eğer maternal kökenli bir gen metillenmişse ( inaktif ), paternal metillenmemişse sadece paternal gen ekspre olacaktır. Genomik imprinting olgusunda maternal ve paternal olarak kalıtılan genlerin ifadesindeki farklılıklar germ hücresinde belirlenir. Ve arka arkaya olan mitotik bölünmeler ile bir sonraki nesil için sabitleştirilir. Bu durumda, dişi germ hattındaki homolog genlerin her ikisinde metile olurken, erkek germ hattındakilerin her ikisinde demetile olacaktır. Sonuç olarak zigotta imprintlenen genin metilasyon patterninde allelik farklılık görülecektir. Genomik imprinting de henüz genetik etiketin maternal veya paternal germ hücrelerinde farklı olarak gösterilmesi, silinmesi ve yeniden ayarlanmasına ait mekanizmalar açıklık kazanmamıştır (17).

1980'lilerin başlarında bir dizi fare embriyolarında yapılan manipülasyonlarla gen çiftleri ifadesinin eşit olmadığına ait ilk ipuçlarını sağladı. Gelişmiş pronükleer transplantasyon deneylerinde, androjenik ve ginojenik embriyolar üretmek için maternal ve paternal pronükleuslar zigottan ayrıldı ve sonra sadece bir tipi tekrar fareye geri verildi. Sadece maternal kromozom çiftini taşıyan embriyolar ginojenik ve paternal kromozom

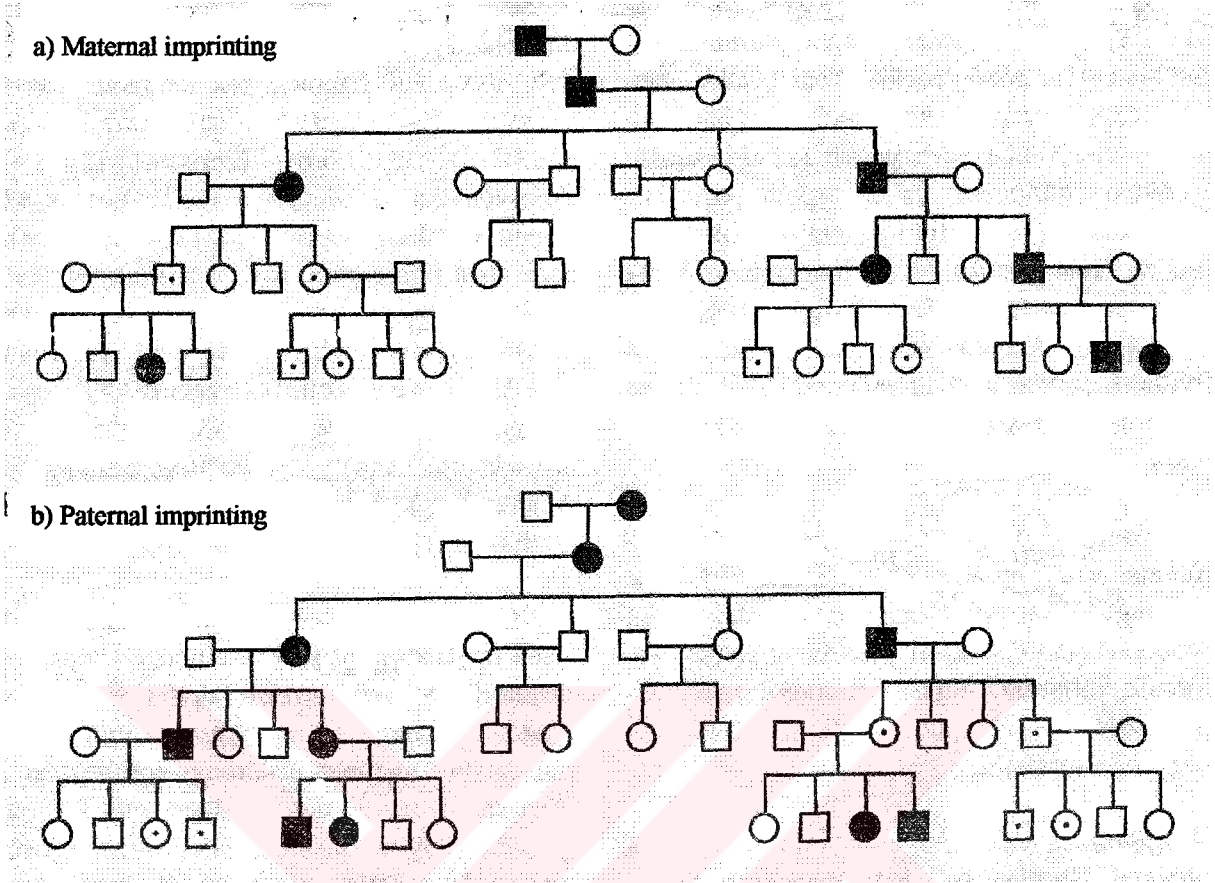
çiftine sahip olanlarda androgenik olarak adlandırılmışlardır. Bu fetusların hamile farelerin uteruslarındaki büyümeleri karşılaştırıldı. Şaşırtıcı olmakla beraber, zigotların hiçbiri yaşayamadı, fakat ikisi arasında hem morfolojik hemde gelişimsel değişiklikler vardı. Ginogenik fetuslarda, nispi olarak normal fetal büyüme ve ekstraembriyonik dokularda yetersiz büyüme görülmüş; buna rağmen androjenik fetusta tam tersi bir büyüme gözlenmişti. Bu çalışmalar, paternal olarak ifade edilen genlerin plasenta gelişimini düzenlediği, fakat maternal olarak belirtilmiş genlerin embriyonik gelişimde görev aldığını göstermiştir.

İnsanlarda doğal olarak meydana gelen genomik imprinting en güzel örneklerinden biri fetal dokunun bulunmadığı insan gebeliklerinde görülmektedir. Hidatiform mol, tamamıyla trofoblastik dokudan oluşur ve genotipi sadece paternal kalıtmalıdır. Nükleusuz bir yumurtanın ya haploid bir sperm (paternal genomun duplikasyonunu takip eder) yada iki haploid sperm ile döllemesi sonucu oluşur. Bu trofoblastik hastalık tamamen androjenite ile karakterizedir ve hiperplastik ekstra embriyonik büyüme ile birlikte yok olmuş veya azalmış fetal büyüme söz konusudur (13).

İnsanlardaki genomik imprinting bir diğer çarpıcı örnek Prader-Willi ve Angelman sendromlarıdır. Prader-Willi ve Angelman sendromlarının kromozomal bölgesindeki gen lokusu genomik imprinting uygundur. Prader-Willi bölgesi, paternal kromozom üzerinde aktif, maternal kromozom üzerinde inaktiftir. Angelman kromozom bölgesi, maternal kromozom 15 üzerinde aktif, fakat paternal kromozom üzerinde inaktiftir. Başka deyişle, Prader-Willi sendromunda allel baba tarafından kalıtıldığı zaman ifadesini bulan, anne tarafından kalıtıldığında baskılanan maternal imprinting, Angelman sendromu ise allelin anne tarafında kalıtıldığında ifade bulan paternal imprinting mekanizmasına sahiptir (Şekil 3).

Bu sendromlardaki farklı parental köken, D15S63 (PW 71 probu) lokusunda metilasyon düzeninin analizi ile gösterilebilir; çünkü inaktif bölgelerdeki DNA aşırı metillenmiştir (18).

15q11-13' deki imprinting bir çok geni etkiler ve bu bölgedeki tek imprinting merkezi tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Imprinting merkezi mutasyonları, bir cinsin germ hattından belirtisizce geçer ancak karşı cinsten yeniden imprinting bloke eder (19). Taşıyıcı baba yada anneden kalıtılan imprinting defektlerinde gelecek çocukta teorik olarak % 50 etkilenim olacaktır. Bu tür ailelere genetik danışmanlık ve ileri araştırmalar önerilmektedir (20).



Şekil 3. Maternal ve paternal imprintingi açıklayan pedigrî örnekleri

#### 1.1.3.4.UBE3A Mutasyonları

Kromozom delesyonu olmayan Angelman sendromlu hastaların %20 'sinde, protein turnoverını sağlayan Ubiquitin protein ligazı kodlayan UBE3A geninde kısaltma mutasyonu saptanmıştır.

UBE3A geni 15q11-13 bölgesinde haritalanmış ve maternal olarak ekspre olduğu bulunmuştur. Angelman sendromlu hastalarda beyin gelişimindeki anormalliklerden UBE3A 'nın maternale özgü ekspresyonununun sorumlu olduğu saptanmıştır(8).

#### 1.1.3.5. Nedeni Bilinmeyen

Prader-Willi sendromlu hastaların %1-2'sinde ve Angelman sendromlu hastaların %15-20 'sinde ne delesyon nede uniparental dizomi gösterilmemiştir. Bu durumlarda da hastalık ailesel olarak görülür (8).

#### 1.1.4. Sitogenetik

Hawkey ve Simithes ilk kez 1976' da Prader-Willi sendromu ve 15. kromozom arasında bir ilişki olduğunu öne sürdüler. Bu öne sürüş, birkaç benzer anormallikleri gösteren bir makale ve bir 15:15 Robertsens translokasyonlu hasta baz alınarak yapıldı. Sonraki yayınlarda; sendrom için 13q15q, 14q15q veya 15q15q gibi dengeli translokasyonlar, 15. kromozomda intersitiasl delesyon veya perisentrik inversiyon, ters tandem duplikasyon, 15p düzensizliklerine kadar çeşitli anormal karyotipler tanımlanmıştır. Çeşitliliğe rağmen D grubu kromozomlar üzerinde durulduğu dikkati çekmektedir. Ve çoğu sendromda olduğu gibi, olguların hemen yarıya yakınında normal karyotipler bildirilmiştir.

Mattei ve arkadaşları (1983 ) kendi grubundaki bulgulara dayanarak Prader-Willi tanısı için konan kriterlere tam uyanların kromozom 15q11-12 delesyonu taşıdıklarını, normal karyotip içeren olgularda ise kriterlerin bazılarını uymadıklarını saptamışlardır. Böylece çalışmaların bir kısmının teşhis eksiklikleri taşıdıkları sonucuna varılmıştır .

1987 yılında ise ilk kez Angelman sendromlu hastalarda da 15. kromozomda bir delesyon olacağı ileri sürüldü ve sonra hastaların yaklaşık %85 'inde gösterildi. Bununla birlikte, ilk olarak Prader-Willi ve Angelman sendromlu hastalarda 15q proksimalinde biraz farklı büyüklük ve lokasyonda sitogenetik delesyonlar ileri sürüldü. Bu delesyonlar bu hastalık gruplarında moleküler analizler kullanımı ile delesyon noktaları bulunarak gösterildi. Gözlenen farklı fenotip, delesyon orjinini farklılığından kaynaklanmaktadır. Yalnız Prader-Willi sendromlu hastalarda delesyonlar parental orjinli, Angelman sendromlu hastalarda da söz konusu delesyon maternal orjinlidir. Bu mevcut iki genetik hastalığa bazı kromozom bölgelerindeki delesyonlar sebep olmaktadır (9).

#### 1.1.5. Moleküler genetik

Prader-Willi ve Angelman sendromlu hastalarda kesin tanının hızlı ve yeterli bir şekilde ortaya çıkarılması klinik açıdan çok önemlidir. Bu sendromların yeni doğanda ve genç infant bebeklerde sadece klinik inceleme ile tanısı zordur ve erken tanı ölümle sonuçlanan olguları engelleyebilir (PWS' da obezite gibi)(11).

Prader-Willi ve Angelman sendromlu hastalar veya sitogenetik olarak 15q delesyonu tayin edilemeyen olgularda moleküler düzeyde teşhis konulması kritik önem taşımaktadır. Bu sendromların moleküler tanısında standart FISH , RT-PCR (Reverse Transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu), allele özel D15S63 ve SNPRN lokuslarının metilasyonu, Southern blot,

STRP's (kısa tandem tekrar polimorfizmi ), RFLP ( D15S9- D15S12 işaretli restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) teknikleri kullanılmaktadır. FISH, her iki sendromda %70 etkili D15S9-D15S12 lokuslarındaki mikrodelesyonların teşhisi sağlanırken, Southern blot analizi ile izodizomik ve heterodizomik olgular belirlenebilir. D15S63'ün DNA metilasyon analizinin her iki sendromunun moleküler teşhisinde faydalı olduğu gösterilmiştir ve bu son zamanlarda Prader-Willi sendromu olduğu düşünülen hastaların testinde temel olarak kullanılmıştır. Daha kapsamlı araştırmalarda ise PCR, RFLP ve STRP yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler, paternal ve maternal dizomilerin, delesyonun parental orjinin belirlenmesini sağlamaktadır

(11, 1).





## 1.2. LİZENSEFALİ VE MİLLER-DİEKER SENDROMU

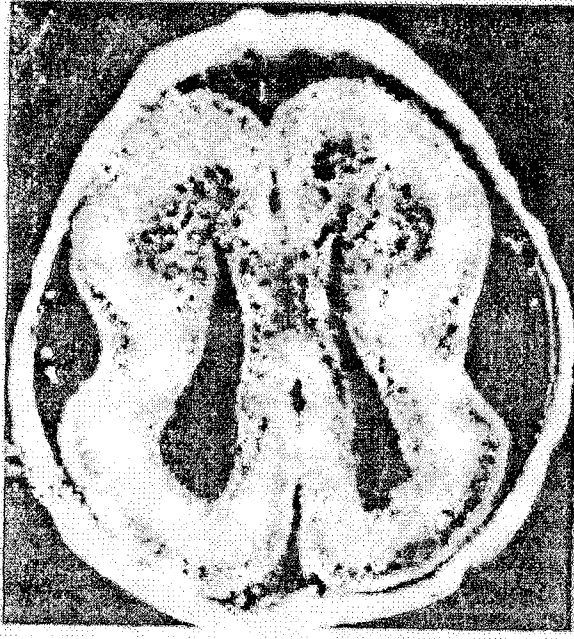
### 1.2.1. Lizensefali

Lizensefali düz serebral yüzeyin ve tamamlanamamış nöral migrasyonun görüldüğü bir beyin malformasyonudur (21, 22). Ağirilerin yokluğu ve geniş pakigirilerin görüldüğü, küçük çok sayıda polimikrogiri ve diğer kortikal dizplazilerin yer almadığı bir malformasyon olarak tanımlanabilir. Klinik gözlemler, lizensefali sıklığının en az 100.000 canlı doğumdan birinde görüldüğünü göstermiştir (23). MRI (mağnetik rezonans görüntüleme) ve yeni laboratuvar teşhis metodları hastaların prognozunda ve genetik incelemesinde daha kesin bilgiler sağlamaktadır(24) .

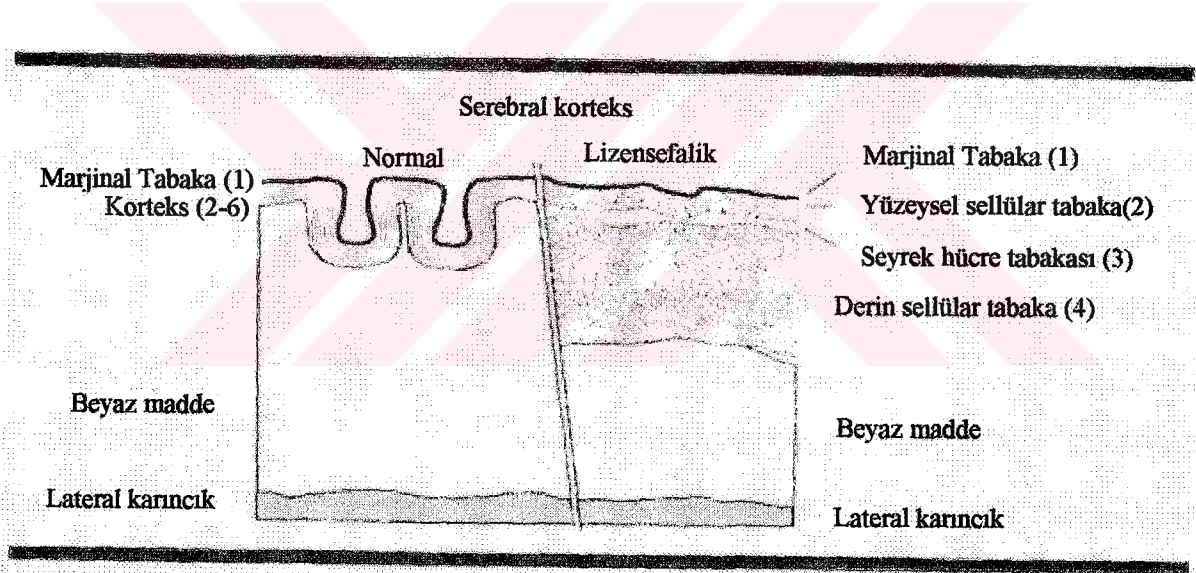
### 1.2.2. Patoloji

Lizensefalinin klasik formunda beyin ağırlığı normal veya düşüktür. Şekil 4'de görüldüğü gibi beynin sylvian bölgesi frontal ve temporal operkulanın insula üzerinde büyüme geriliği göstermesinden dolayı açık kalmıştır. Serebral hemisferler bütün beyin yüzeyi üzerinde azalmış sayıda kıvrıma sahiptir ve bu hastalığın ciddiyetine göre agridi, pakigiri veye her ikisini de içerebilir. Giral malformasyonların ciddiyetindeki farklılıklara göre morfolojik sınıflandırma geliştirilmiştir. 1.derece lizensefali tüm yüzey agridisi, 2. derece sulkusun genel olarak frontal loba sınırlandırıldığı agridi, 3. derece pakigirinin genellikle frontal ve agrinin pasteriol bölgede yer aldığı geniş agridi (hem agridi hem pakigiri alanları), 4. derece agrinin olmadığı geniş alanlara verilmiş pakigiriden oluşmaktadır (25,26).

Korteks normalden daha kalındır, beyaz maddenin genişliğinin en az yarısını oluşturur. Ventrikular frontal bölge normaldir; fakat arkada embriyodaki ventriküllere benzer şekilde genişlemiştir. Korpus kallosum normalden küçük olabilir veya bulunmayabilir. Kavum septi pellusidi genellikle bulunur. Miller-Dieker'lı hastaların yaklaşık yarısında septum bölgesinin orta hatlarında küçük kalsifikasyonlara rastlanır. Beyin sapı ve serebellum normal görülmektedir. Bu anormalliklerin hepsi CT (bilgisayarlı tomografi) ve özellikle de baş MRI ile görülebilmektedir (Şekil 4 ).



Şekil 4. Lizensefalik bir olguda MRI.



Şekil 5. Normal serebral korteks ile lizensefalik serebral korteksin karşılaştırılması

Serebral hemisferlerin hücre yapısı gelişmemiştir ve fetal beyni andıran 4 tabakadan oluşmuştur. Hücre içermeyen marjinal tabaka normal görünür. Yüzeysel sellüler tabaka gelişmemiş kortekse benzer. Bazı zamanlarda bu tabaka III, V ve normal korteksin VI. tabakasına benzer bölgeler halinde ayrılır; fakat hücre popülasyonu azalmıştır. Heterotopik nöronların oluşturduğu derin sellular tabaka, yüzeysel tabakadan genişliği değişen hücre sayısı bakımından az sellular olmayan bir tabaka ile ayrılır. Gri madde genellikle normalden daha ince olarak beyaz maddede görülür [Şekil 5 (27)].

### 1.2.3. Patogenez

Lizensefali ve ona bağılı giral malformasyonlar, hamileliğin 3. ve 4. ayında gerçekleşen olgunlaşmamış nöronların serebral kortekse tam olarak göç etmemesinin direkt sonuçlarıdır. Göçün erken dönemlerinde subependimal tabakadaki glia, yüzeye dik olarak radial glia olarak bilinen uzun hücre uzantılarını gönderir. Postmitotik nöronlar pial membran altında duracak şekilde serebral yüzeye doğru radial glialar boyunca tırmanır. Migrasyon yolu orijinal olarak radial şekilde kabul edildiği halde son zamanlarda bilgiler teğetsel bir yayılma olduğunu ortaya çıkarmıştır. İlk nöronlar hamileliğin yaklaşık 8. haftasında tırmanışa başlar. 10. ve 14. haftalar arasında olgunlaşmış korteksteki nöronların bir çoğunu temin etmek amacıyla arka arkaya gerçekleşen olgunlaşmamış nöron dalgaları migrasyona başlar ve radial glialar boyunca daha önceleri ulaşmış nöronların üzerine tırmanarak yüzeysel tabakalara yerleşir. Bu sebeptendir ki ilk nöronların migrasyonu korteksin dip tabakalarında sonlanırken, daha sonra migrasyon yapan nöronlar yüzeye daha yakın lokalize olur.

Klasik lizensefalideki nöral migrasyon bozukluğunun sebebi henüz bilmemektedir. Fakat nöroglast çoğalması, radial glia oluşumu ve migrasyonu sınırlayan pial membran normal görünmektedir. Bu anormalliğin migrasyonu başlatan veya devam ettiren işaretlerde veya nöronların radial gliaları etkin şekilde tırmanmadığı tahminini ortaya atar (28).

### 1.2.4. Lizensefali Tipleri

İntrauterin 20. haftadan önce yaygın nöral migrasyonun inhibisyonu ve ardından kortikal organizasyonunun bozulması ile lizensefali tip I tablosu, lokal migrasyon bozukluğu ile tip II, tip III, tip IV lizensefaliler, kortikal heteropatiler ve polimikrogiriler gelişir. Tip I lizensefali, pakigiri-agiri kompleksi olarak da bilinen genetik bir bozukluk olup İzole Lizensefali, Miller- Dieker sendromu olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Tip II lizensefali genelde Fukuyama Konjenital Musküler Distrofisi ve Walker sendromu ile birlikte dir. Encha Razavi ve arkadaşları tip III lizensefali sendromunu letal seyirli, ailesel fetal akinezi ile tanımlamışlardır(29).

Tip I lizensefalide serebral korteks 12 haftalık bir fetusunki ile aynı olup, giruslar belirgin azalmış ya da yoktur. Kraniyal görüntüleme de, beyin yüzeyinde düzleşme, geniş ve vertikal silviyan fissür, orta derecede ventriküler dilatasyon ve kalınlaşmamış bir korteks izlenir. Hastalığın etiyopatogenezi açık değildir. Gebeliğin 20. haftasından önce histolojik gelişmeyi bozan perfizyon yetersizliği / hipoksi, enfeksiyon, kromozomal bozukluklar,

travma, metabolik bozukluklar ve çevresel nedenlerle massif nöral migrasyonu yetmezliği gelişmekte ve lizensefali tip I oluşmaktadır.

Tip I lizensefalili hastaların gebelik süreleri normal olmakla birlikte intrauterin büyüme geriliği gözlenir(30). Genellikle polihidramnios görülür; fakat spesifik değildir. Dış görünüş lizensefali sendromuna göre normal veya anormal olabilir (28). Tüm sendromlarda bitemporal daralma ve mikrognati, vakaların yaklaşık yarısında klinodaktili ve küçük bir kısmında doğumda mikrosefaliye rastlanır (30). Bütün çocuklar ilk bir yıl içerisinde mikrosefalik olduğu halde sadece az sayıda çocuk, doğuştan mikrosefaliye sahiptir(28). Genel olarak yeni doğan döneminde emme zayıflığı, erken çocukluk döneminde hipotoni ve ileri dönemde hipertoni sıklıkla bulunur. Bazı vakalarda da apne atakları gözlenmekte, ilk yıldan sonra çoğu vakada infantil spazmlar şeklinde konvulziyonlar gözlenmektedir. Diğer nörolojik bozukluklar ise, belirgin mental retardasyon, spastik kuadriplejiyle birlikte hipotoni ve opistotonustur. Tip I lizensefali çoğu vakada sporadik olup, nadiren ailesel vakalar bildirilmiştir (30).

#### **1.2.5. Klinik Sendromları**

Klasik lizensefali (Tip I Lizensefali ), ILS olarak tabir edilen izole edilmiş lizensefali veya Miller- Dieker olarak bilinen multipli konjenital anomali sendromunun bir parçası olarak görülmektedir (27).

##### **1.2.5.1. Miller- Dieker Sendromu**

###### **1.2.5.1.1. Klinik Özellikler**

Miller 1963 'de bazı konjenital anomalileri bulunan iki kardeşin otopsisinde lizensefali saptamış, Dieker ve arkadaşları ise 1969 ' da sendrom bulgularını mikrosefali, iki taraflı temporal darlık, lizensefali, uzun filitrum, ince üst dudak, mikrognati, malforme kulaklar, yukarı dönük burun delikleri ve gelişme geriliği olarak ifade etmişlerdir ( 27).

Miller-Dieker sendromu karakteristik anormal bir fasial görünüme ve bazende diğer doğum bozukluklarıyla seyreden lizensefali Tip I ile karakterize bir multipli malformasyon sendromudur. Lizensefali daima ciddi boyutta vardır ve derece 1 ve derece 2 olarak görünür. Büyük ve şiddetli mental retardasyon gibi nörolojik anormallikler, küçük çene, bitemporal darlık Miller-Dieker için spesifiktir. Miller–Dieker sendromunda beyin anormalliklerine ek olarak , mevcut çukuntılı ve açık alın, yukarıya bakan burun deliklere sahip kısa burun, dışarı

fırlamış (çıkık) üst dudak, ince dudaklar içerir. Bazı hastalar olağan olmayan korpus kallozuma veya septumda görülen orta hat kalsifikasyonlarına sahiptir. Etkilenmiş çocukların hepsinde önemli ölçüde zihinsel ve fiziksel engeller bulunur (31). Miller-Dieker sendromuna ait karakteristik özellikler Tablo 4 ' te gösterilmiştir (16).

Tip I lizensefalinin görüldüğü Miller- Dieker sendromundan başka İzole Lizensefali sendromunda normal veya normal sayılabilecek fasial görüntü mevcuttur. Beyin malformasyonu Miller- Dieker sendromundaki gibi ciddi olabilir veya ağıri veya pakigiri karışımı veya pakigirinin yalnız olarak bulunduğu daha hafif durumlar seyredebilir. Bir çok hastada küçük çene ve bitemporal darlık gibi küçük fasial değişiklikler olabilir. Bazı klasik lizensefali, izole lizensefalili hastalarda teşhis için yeterli olmayan Miller-Dieker sendromunu andıran bazı küçük fasial değişikliklere sahiptir. Diğer doğumsal bozukluklar nadirdir. Hepsinde mental retardasyon görülür ve bunların yarısı geliştirilebilen becerileri başaramaz. Geri kalanı ise bazı sosyal cevaplar gösterebilir(26).

**Tablo 4. Miller-Dieker Sendromunun karakteristik özellikleri**

<b>Baş ve Boyun</b>	: Mikrosefali, çıkık alın, bitemporal darlık, mikrognati
<b>Kulaklar</b>	: Kulakların normal yerinde bulunmaması, malforme kulaklar
<b>Gözler</b>	: Anormal iris, karmaşık fundal damarlar, telekantus, hipertelorizm, hafif blefaroptoz
<b>Burun</b>	: Kısa burun, yukarı dönük burun delikleri, çökük burun köprüsü
<b>Ağız</b>	: Belirgin dışa çıkıntılı ve ince üst dudak, geç diş dökülümü
<b>El ve ayaklar</b>	: Klinodaktili, kamptodaktili, irregular palmar çizgiler, dermatolojik anormallikler
<b>Kaslar</b>	: Erken çocukluk döneminde hipotoni ileri dönemde hipertoni
<b>Sinir sistemi</b>	: Lizensefali tip I ve ağıri ile-veya serebral korteksin bölgesel kalınlaşması dışında olan- pakigri, hipoplazi, küçük serebellum, korpus kallozumun hipolazisi, serebral korteks yapısının displazisi, orta hat kalsifikasyonları. Epilepsi ve spastik paraplegia
<b>Kardiyovasküler sistem</b>	: Ventrikular septal defektler ve arterior

	kanallarını içine alan çeşitli kardiyovasküler defektler
<b>Üregenital sistem</b>	: Kriptorşidizm, pilonidal sinus, böbrek agenesisi, Hydronefroz
<b>Büyüme ve gelişme</b>	: Büyüme, mental, ifade ve motor retardasyon, polihidraminoz ve prenatal gelişimde bozukluk, fetal hareket azlığı
<b>Davranış ve performans</b>	: Gelişimde başarısızlık, spontan aktivitelerin azalması, nöbetler, beslenme güçlükleri
<b>Diğer</b>	: Çocukluk veya infant dönemde ölüm

#### 1.2.5.1.2. Genetik

Miller-Dieker sendromu çoğu vakada sporadik olup, bildirilen ailesel vakaların sayısı azdır ve sonradan eklenen ailesel olgular nedeniyle otozomal resesif geçişli olduğuna inanılmaktadır. Bunlara ek olarak bugün için sendromla ilgili X'e bağlı kalıtıma ilişkin pedigrî bildirilmiştir (9).

#### 1.2.5.1.3. Sitogenetik

Miller- Dieker sendromunun kromozom etiyolojisinde, ilk olarak 17q' nun distalinde ve 17p 'nin distalindeki küçük bir bölgenin delesyonu ile bir hastada 17. kromozomun ringi bildirilmiştir.

İlk kez Dobyn ve arkadaşları, 17p13 bölgesindeki sitogenetik anormalliklerin Miller - Dieker sendromuyla ilişkili olduğunu tespit etmiştir. Dobyn, 26 ailedeki 25 kişinin sitogenetik ve moleküler genetik bulgularını bildirmiştir ve yüksek çözünürlüklü kromozom analizlerinde, 25 probandın 14' ünde 17p13.3 delesyonunu saptamıştır. Bu de nova delesyonlardan 3' ünün ailesel kromozom düzenlenmesi ( resiprokal translokasyonlar ve perisentrik inversiyonlar ), 11' nin terminal veya intersitial delesyonlar, ring kromozomları ve disentrik kromozom düzenlenmeleri olduğunu bulmuştur ( Tablo 5). Diğer bir çalışmasında ise ring kromozomu 17 ' ye sahip iki hastanın da Miller- Dieker fenotipini gösterdiği bildirilmiştir(32). Bununla birlikte şimdilerde Miller- Dieker sendromlu ebeveynlerin çoğunda kromozom 17' nin de nova delesyonları ( 17p- veya 17p13 ) bulunmaktadır (9, 32).

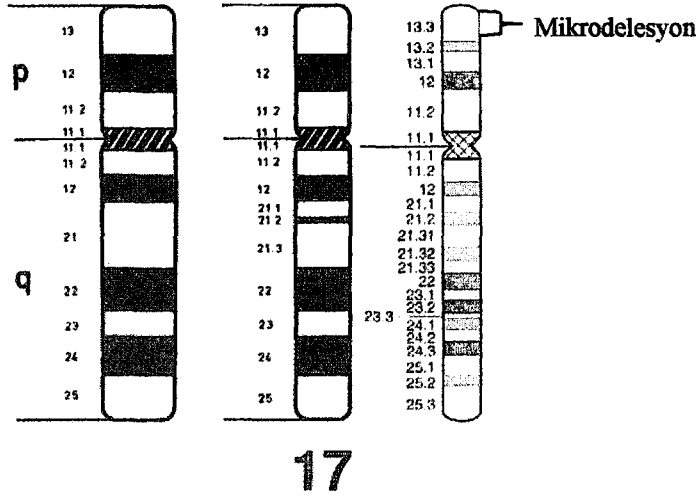
Dobyn tarafından İzole lizensefali sendromlu 58 hastanın 57'sinde yapılan çalışmalarda da yüksek rezulosyonlu kromozom analizi ile karyotipler normal saptanmıştır. Tek anormal karyotip klasik lizensefalili bayanda görülen X ve 2 nolu kromozom arasındaki ( 46,XX t ( X;2 ) ( q22;p25 ) de nova dengeli translokasyonudur (9).

**Tablo 5. Miller-Dieker Sendromunda Sitogenetik Mekanizmalar (32)**

<b>Mekanizma</b>	<b>No</b>	<b>%</b>
De novo abnormaliteler		
Delesyon (terminal veya intersitial )	9	36
Disentrik translokasyon	1	4
Ring kromozom	1	4
Familiyal yeniden düzenlenmeler		
Resiprokal translokasyon	2	8
Perisentrik inversiyon	1	4
Normal karyotip		
Submikroskobik delesyon	9	36
Delesyonlu olmayan bulgular	2	8
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>100</b>

#### 1.2.5.1.4. Moleküler Genetik

Bir çok Miller- Dieker hastalarında 17p 13.3' ün sitogenetik delesyonlarının ( Şekil 6) saptanmasından sonra L..Better ve arkadaşları Miller-Dieker sendromunda ve İzole lizensefali sendromunda görülen 17p13.3' ün submikroskobik delesyonlarını tanımlayabilmek için yeni moleküler genetik yöntemlerini tanımlamışlardır. Bu çalışmalardaki incelemeler sonucunda; Miller-Dieker sendromunun birbiriyle ilişkisi olmayan birkaç genin kromozom üzerinde aynı anda gerçekleşen delesyonlarının kompleks bir fenotip oluşturan bir gen sendromu olduğunu ortaya koymuşlardır. Geliştirdikleri modele göre Miller–Dieker sendromunda; bireyin gelişiminde önemli rol oynayan gen ve genlerin ; İzole lizensefali sendromunda ise sadece beyin gelişiminde rol oynayan gen ve genlerin delesyonun olduğunu ileri sürmüşlerdir. Prader-Willi ve Angelman sendromlarındaki mikrodelesyonların aksine, delesyonların parental kökeni fenotipi açık olarak etkilememiştir. Bu yapısal bozuklukların büyüklüğü, 17p13' de yer alan bağımsız birkaç genin delesyonun büyüklüğü ile paralel olduğu ileri sürülmüştür



Şekil 6. Miller-Dieker sendromunda 17p13.3 delesyonu

Sitogenetik analizi normal görüne bile moleküler teknikler kullanarak hemen hemen bütün Miller-Dieker sendromlu hastaların büyük çoğunluğunun 17p moleküler delesyonuna sahip olduğu saptanmıştır. 17p13.3'ün değişik boyutlardaki delesyonları RFLP veya somatik hücre hibrit analizleriyle sitogenetik bakımından normal olan hastalarda gösterilmiştir. Polimorfik tekrarları kapsayan özel sıralamalara göre hazırlanmış primerler kullanılarak yapılan PCR, delesyonların hızlı ve çabuk bir biçimde tespitine izin vermiştir.

Miller- Dieker sendromunun kritik bölgelerinin moleküler diseksiyonu bir başka teknik stratejisi geliştirmiştir. Hastadaki delesyonların, tanıdaki eksik metodlar yüzünden ve kullanılan metodların çok sensitif olmamasından bu bölgelerdeki submikroskopik delesyonların keşfi FISH ( Fluoresan İn Situ Hibridizasyon ) metoduyla sağlanmıştır. Kuwano bu metodu 17p13.3' ün biotinlenmiş 2 kosmid probunu Miller-Dieker sendromlu ailelerde yarı görünmez yada görünmez translokasyonları ortaya çıkarmak için kullanmıştır ( Görülmeyen translokasyonlar yüksek çözünürlüklü bantlanmış preparatlarda farkedilmeyen translokasyonlardır).

FISH metodu ile, gözle görülür veya submikroskopik delesyonlar, İzole lizensefali sendromlu hastaların 4 'te birinde ve Miller-Dieker sendromlu hastaların %90' nın üstünde bulunmuştur. Önemli olan delesyonun çocuğun ebeveynlerden hangisinden geldiğinin analizinin ve kromozom analizi ile bulunamayan inversiyon veya kritik translokasyonların FISH metoduyla yapılabilmesidir. Dengesiz döller için tekrar riskini getiren yeniden düzenlenmelerde ve hasta bireydeki delesyonun parental orjininin tanımlanmasında FISH uygulamaları şarttır. Aynı zamanda FISH methodunun bir çok sitogenetik laboratuvarlarında



gittikçe popüler olduğu dönemlerde kolaylıkla gerçekleştirilebilen tekniklerin normal kromozomları gösterdiği zamanlarda da Miller-Dieker sendromunun teşhisinde kullanılan ilk seçenektir. Miller-Dieker sendromlu hastalarda moleküler delesyonlar teşhis edildiğinde görülmeyen dengelenmiş parental düzenlenmeleri saf dışı bırakan veya destekleyen tek tekniktir (9, 28, 32).

#### 1.2.5.1.5. Teşhis

CT ve MRI sayesinde bugün lizensefali daha doğru bir şekilde ve geçmiş yıllara oranla daha sık teşhis edilmektedir. Bir olguda, lizensefali teşhisi desteklendiyse ve karakteristik kranio fasial anormallikler bulunuyorsa Miller-Dieker sendromu düşünülmektedir. Bu kranio fasial anormalliklerin bazıları (mikrosefali, bitemporal darlık, mikrognati) lizensefalinin göstericisi olarak düşünülmektedir. Miller-Dieker sendromlu hastalar genellikle ek olarak orta hat kalsifikasyonları, çıkık alın, kısa burun, yukarıya doğru yönelmiş burun delkileri ve bazı diğer anormallikler göstermektedir. Diğer bazı malformasyonlar dengelenmemiş translokasyon gösteren kromozomlara ve dengelenmemiş inversiyonlarla alakalıdır. Miller-Dieker sendromunun düşünüldüğü her durumda yüksek çözünürlü bantlama tekniğinin içerildiği kromozom analizleri zorunludur. Bu tip kromozom çalışmaları için teşhisin özel olarak belirtilmesi önem taşımaktadır. Çünkü diğer mikrodelesyon sendromlarında olduğu gibi Miller-Dieker sendromunda görülen yapısal bozukluklar sitogenetik çalışmalarda muhtemelen teşhis dışı kalırlar. Normal kromozomlar Miller-Dieker sendromunu saf dışı bırakmaz. Bir sonraki teşhis basamakları uygun problemlerin kullanıldığı FISH ve yukarıda bahsettiğimiz PCR' dir. Bazı durumlarda da diğer moleküler teknikler gerekmektedir. Özellikle büyüklüğü fazla olan delesyonlar bulunduğu, potansiyeli yüksek tekrar riskinden dolayı parental dengelenmiş yapısal düzenlenmeler göz önüne alınmalıdır. FISH özellikle görülmeyen parental yapısal anormalliklerin tespitinde yardımcıdır.

Son zamanlarda Miller-Dieker sendromunun teşhisinde ilerlemelerinin ışığı altında, otozomal resesif kalıtımı destekleyen ikna edici bir ipucu bulunmamıştır. Miller-Dieker sendromunun tekrar riski genellikle parental dengelenmiş translokasyonlar ve inversiyonlarda yüksektir. Koryonik villus örnekleme ile yapılan prenatal teşhis kesin teşhise yardımcı olmaktadır. Sitogenetik olarak saptanabilen veya submikroskopik de nova delesyonları sadece düşük tekrarı riskine sahiptir. Prenatal fetal büyüme, fetal hareketler, amniyotik

miktarı ve beyin gelişiminde ultrasonografik incelemelerin güvenilirliği bazı vakalarla sınırlı olmaktadır. Sonuç olarak yeni teşhis araçları etkilenmiş aileleri desteklemekte bize büyük olanaklar sağlamaktadır (28, 32).

## 1.2. FLUORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH )

İn Situ Hibridizasyon (ISH), spesifik DNA veya RNA bölgelerinin doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini sağlayan bir tekniktir. Bir başka deyişle, ISH heterojen bir hücre popülasyonunda DNA ve RNA bölgelerinin nükleer veya sellüler lokalizasyonlarını ifade eden tek yöntemdir. İn situ hibridizasyonu diğer hibridizasyon tekniklerinden ayıran bir özelliği nükleik asitlerin kendi doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlamasıdır (doku/hücre yapısı hiç bir şekilde bozulmamaktadır) (33).

Gerçekte ISH modern biyoloji tekniklerinin en eskilerinden birisidir. 1869 yılında Miescher' in ilk olarak DNA' yı izole etmesi, 1944 yılında DNA' nın genetik bilgi taşıdığına ortaya konması ve daha sonra da 1950 yılında Franklin ve Wilkins ile 1953 yılında Watson ve Crick' in DNA' nın çift dallı sarmal yapıda olduğunu ortaya koymasından sonra DNA nükleik asidine ilgi yoğunlaşmıştır. 1960-1961 yıllarında DNA' nın denatürasyon ve renatürasyon özelliği ile bu olayların gerçekleştiği kimyasal ortamlar belirlenince, DNA molekülünün komplementeri ile hibridize olabileceği düşünülerek bu alanda çalışmalar başlamıştır. ISH' nun bulucuları olan Gall ve Pardue ile bunlardan bağımsız olarak çalışan John ve arkadaşları 1970 yılında radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Orijinal teknikte, büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığıyla belirlenmişlerdir .

Tritium ( $^3\text{H}$ ) molekülüne ek olarak  $^{125}\text{I}$  ve  $^{32}\text{P}$  moleküllerinin de işaretleme molekülleri olarak ISH'da kullanılabileceği 1970 'lerin başlarında ortaya konmuştur (34, 35).

ISH için radyoizotop kullanılmasının zorlukları ve olumsuz yönleri daha ilk günlerden itibaren kendini göstermiş ve araştırmacılar nonradyoaktif bir işaretleme molekülü arayışı içerisine girmişlerdir. Bu konuda ilk olarak 1975 yılında Manging ve arkadaşları nonradyoaktif bir molekül olan biotin molekülünü deneylerinde kullanmışlardır. Biotin sitokrom C aracılığı ile nükleik asite kovalent olarak bağlanmış ve bu bağlanma elektron mikroskopik düzeyde avidin mikrosferleri ile belirgin hale getirilmiştir. Tekniğin geliştiği bu ilk yıllarda moleküler klonlama teknikleri bilinmediği için işaretlenecek nükleik asit, biyokimyasal yöntemlerle izole edilip hibridizasyona sokulmuştur. Moleküler klonlamanın

gelişmesindeki anahtar 1970' lerin başlarında çift sarmal DNA' daki spesifik sekansları tanıyıp o bölgelerden DNA' yı kesen bakteriyel restriksiyon endonükleaz enzimlerinin ortaya çıkarılmasıdır ki bu rekombinant DNA teknolojisinin de temelini atmıştır.1977 yılında klonlama yöntemleriyle elde edilen problemlerin, radyoaktif ve nonradyoaktif moleküllerle işaretlenmesini sağlayan Nick translasyon yöntemi Riby ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (36).

Brahic ve Hoose' nin 1978 yılında Visna virüsü ile enfekte olan koyun koroid pleksus hücrelerinin saptanmasında ISH yöntemini kullanmış ve bu tekniğin kullanım alanını genişletmiştir. 1983 yılında Feinberg ve Vogelstein diğer prob işaretleme yöntemi olan "random priming" in kullanılabilirliğini göstermişlerdir. 1987 yılında Garson ve arkadaşları translasyon yöntemi ile Biotinin DNA probuna sokulabilirliğini göstermişlerdir.

Karyotipleme ile tümör dokusunda yeterli ve kaliteli metafaz bulma zorluğundan dolayı kromozoma özgü DNA problemlerinin kullanıldığı ISH yöntemleri geliştirilmiştir (1985). Bu çalışmalarda, kromozomların interfaz nükleuslarında bir alan oluşturdukları ve spesifik problemler ile bu alanların yapı ve kısmen miktarı konusunda bilgi alınabileceği görülmüş ve böylece ISH ile "interfaz sitogenetigi" analizi adı verilen alt bir dal doğmuştur. Bu gelişme özellikle prenatal tanı analizlerinde son derece etkili olmuştur. Fetal cinsiyet ve fetal anöploidi tayininin hücre kültürüne gerek kalmadan çok kısa süre içerisinde yapılabilmesi bu alanın gelişmesini sağlamıştır

Biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleriyle işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim veya kolloidal altın gibi aracı moleküller ile belirgin hale getirilmesi, ISH tekniğinin hassasiyet ve güvenilirliğini arttırmıştır. Biotinin yanısıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı moleküllerin birlikte kullanılması 1986 yılında, Horgman ve arkadaşlarının iki renkli, Nedersof ve arkadaşlarının (1986) da üç renkli hibridizasyonu gerçekleştirmelerini sağlamıştır. Gelişmeler birbirlerini takip etmiş ve bugün 12 renge kadar varan çok renkli ISH uygulamalarının gerçekleştirilebilir duruma gelinmiştir.

ISH daki bu hızlı gelişmeye rağmen, kullanılan probun büyüklüğüne bağlı olarak sinyal dansitelerindeki değişiklikler ile yöntemlerde sinyalin görüntülenmesi amacıyla kullanılan florokrom maddelerin mikroskopta belirgin hale getirilmesi ve fotograflanmasındaki sorunlar mikroskop için yeni filtre ve optik sistemlerin gelişmesine ivme kazandırmıştır (Shozton 1989, Makowski ve Ruzin 1993). Konfokal laser scanning mikroskoplarının geliştirilmesi ISH tekniğinin gelişmesini sağlamıştır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri CCD (coupled cooled camera) kamera sisteminin geliştirilmesidir .

Non - radyoaktif molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immünolojik ya da afinite reaksiyonları ile floresans veya enzimatik olarak görüntülenmesi ise non-izotopik ISH (NISH) olarak ifade edilir. DNA' nın NISH için işaretlenmesinde direkt ve indirekt olmak üzere iki yöntem kullanılır. 1991 yılında floresanlanmış nükleotid analoglarının direkt ve indirekt ISH yöntemlerinde kullanılmaya başlanmasıyla, NISH teriminde bir alt dal oluşmuştur ki bu da Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) olarak ifade edilmektedir (29).

FISH tekniğinin kolay uygulanabilirliği, probun stabilitesi, metodun hızı, 2-5 kbp'e ulaşan duyarlılığı, birden fazla bölgenin farklı renklerde işaretlenmesine olanak tanıyan farklı işaretleme yöntemlerinin kullanılabilmesi, metafaz ve interfazda bütünlüğü bozmadan uygulanabilirliği, florokrom moleküllerin yaygın olarak kullanılabilmesi ve kolaylıkla taşınabilmesi, gene-kromozoma-genoma özgü görüntülemeye olanak tanması bu yöntemin hem temel araştırma hem de diagnostik alanlarda aranılan primer yöntem haline gelmesine neden olmuştur. Tüm FISH yöntemlerindeki temel prensibi aynıdır. Temel olay, iki DNA sarmalı arasındaki komplementerliktir. Prob olarak kullanılan DNA molekülü florokrom ile işaretlenir, yani eksojen olarak reaksiyona sokulan işaretli nükleotid, prob DNA' sındaki uygun nükleotid ile yer değiştirir. Prob işaretlendikten sonra lam / lamel üzerine fikse edilen metafaz ve / veya interfazdaki proteinler uzaklaştırılır, çift sarmal halde bulunan gerek prob gerekse hedef DNA 'lar denatürasyon ile tek zincir haline getirilirler. Önceden işaretlenmiş prob ile spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA hibridize edilir. Daha sonra oluşan hibrid spesifik görüntüleme sistemleri ile belirgin hale getirilir.

FISH tekniğinin tanı ve araştırma amaçlı kullanım alanlarını genel olarak şöyle sıralanabilir.

### **I.Tanısal Amaçlı Kullanılan FISH**

- 1- Klinik sitogenetik
- 2- Prenatal tanı
- 3-İnterfaz sitogenetiği
- 4- Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
- 5- Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı
- 6- Kanser sitogenetiği
- 7- Dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesi

## **II. Araştırma Amaçlı FISH**

- 1- Gen haritalaması
- 2- Tümör biyolojisi
- 3- Mikrobiyoloji / viroloji
- 4- Gen ekspresyon analizi
- 5- Somatik hücre hibrit analizleri
- 6- Mayoz / mitoz analizleri
- 7- Hücre tanımlaması

Başarılı bir FISH için yöntemin üç temel aşaması çok önemlidir .Bu aşamalar;

- 1- Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliğini kaybetmeden korunması
- 2- Probla hedefin yüksek bir etkinlikle birbirine bağlanması
- 3- Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir raportör ile en az zemin sinyaliyle en parlak şekilde görüntülenmesidir .

FISH uygulamalarında bir DNA-DNA ya da RNA-DNA hibridinin stabilitesi erime ısısına ( $T_m$ ) bağlıdır.  $T_m$  değeri sarmalın % 50 sinin ayrıldığı ısıdır. Denatüre edilmiş iki DNA molekülünün eşleşmesi için en uygun ısı ise  $T_m$  değerinin  $25^\circ C$  altıdır. Düşük tuz konsantrasyonu ve yüksek ısı bazların doğru olarak eşleşmesini kolaylaştırır. Ortamda formamid bulunması doğru eşleşme için gereken ısyı düşürerek kromozom morfolojisinin korunmasını sağlar. Dekstran Sülfat da DNA. dizilerinin doğru eşleşme oranını artırır. Hibridizasyon karışımındaki somon sperm DNA' sı, işaretli probun spesifik olmayan eşleşmesini önler. Işığın formamidi hızla iyonlaştırması sebebiyle hibridizasyon işlemi genellikle karanlıkta, preparatların kurumaması için de nemli bir ortamda yapılır. Kullanılan probun cinsine göre denatürasyon ve hibridizasyon için optimal ısı, tuz ve formamid konsantrasyonu ile modifiye edilebilir (37, 38, 41).

### **1.3.1. FISH Problarının Seçimi**

FISH ' de kullanılacak problemlerin seçilmesinde iki temel nokta vardır: Prob olarak kullanılacak nükleik asidin tipi ve uygun işaretleme cinsi (39)(41).

### 1.3.2. Prob Tipleri

Prob olarak hazırlanan nükleik asitler; çift sarmal DNA , tek zincirli DNA , tek zincirli RNA ve oligonükleotidler olarak sınıflandırılabilirler (Tablo 6). Parça izolasyon, klonlama, in vitro transkripsiyon veya kimyasal sentez yoluyla elde edilebilirler. Kromozomlar üzerinde gerçekleştirilen FISH' da ve viral DNA tayinlerinde genellikle DNA problemleri, mRNA tayinlerinde ise tek zincirli RNA problemleri veya oligonükleotidler tercih edilmektedir (39)(41).

### 1.3.3. Prob Uzunluğu

Maksimum melezleme oranı uzun problemler ile elde edilir. Ancak FISH 'da kısa problemler gereklidir. Çünkü, probun hücre veya kromozomlar çevresindeki yoğun matriksten geçerek hedefe ulaşması gerekmektedir. Problemlerin 50-150 bazlık olanları bir çok doku için en iyi sinyali verir. Çok kısa problemler ise çok zayıf sinyal verirler, bazen de istenmeyen işaretlere neden olabilirler. Dokunun özelliği, fiksasyon tipi, prehibridizasyon işlemlerinin uygulanıp uygulanmamasına göre de prob uzunluğunun seçimi değişir.

Oligonükleotidler tek zincirli oluşları ve çok iyi penetrasyon özelliklerine sahip olmalarından dolayı FISH için oldukça avantajlı problemlerdir. Fakat küçük boyutlu olduklarından hedef nükleik asidin ancak küçük bir bölümü ile eşleşirler (39)(41).

### 1.3.4. Probun İşaretlenmesi

Prob işaretlenmesinde alternatif iki ana yol vardır:

**İzotopik işaretleme :** İşaretleme radyoaktif madde ile yapılır ve işaretin belirlenmesi için otoradyografi kullanılır. Reaksiyon sonucunun hızına, prob stabilitesine ve çalışılan konuya göre farklı tipte izotoplar kullanılır. H<sup>3</sup> işaretli problemler; subsellüler uygulamalar için kullanılır, yüksek rezolüsyona ( 0.5- 1 µm ) sahiptir. İşaretli problemler birkaç yıl saklanabilir. S<sup>35</sup>-NTP FISH'da en yaygın olarak kullanılan radyoaktif işaretlemedir. S<sup>35</sup>-NTP. işaretli problemler, özellikle hücresel uygulamalar için uygundur. Otoradyografi işlemi 1 hafta sürebilir. İşaretli prob birkaç ay içinde tüketilmelidir. Rezolüsyonu 10-15 µm kadardır. P<sup>32</sup>-NTP, geniş çaplı alanlar için uygulanır. Rezolüsyon 20-30 µm'dir. İşaretli problemler bir hafta içinde kullanılmalıdır.

**İzotopik olmayan işaretleme :** İşaretleme radyoaktif olmayan maddelerle yapılır ve işaretin tayini için imminohistokimyasal yöntemler kullanılır. Son yıllarda izotopik olmayan işaretleme daha sıklıkla kullanılmaktadır. Dezavantajları; duyarlılığın izotopik işaretlemelemlerden daha az olması ve istenmeyen bağlantılara daha fazla yol açabilmesidir. İzotopik olanlara göre avantajları, işaretli problemlerin 6 ay veya daha uzun süreli olarak  $-20^{\circ}\text{C}$ ' da saklanabilmesi, rezolüsyonunu yüksek olması, hızlı sonuç alınması, daha fazla sayıda işaretleme yöntemi bulunması ve güvenilir olmasıdır. Tüm bu avantajlar prob işaretlemeinde iki ana tekniğin kullanılmasına yol açmıştır:

- 1- İşaretin, doğrudan doğruya nükleik asit probuna bağlandığı ve hedef nükleik asit ile melezlemeden hemen sonra mikroskop altında gözlenmeye imkan sağlayan direkt işaretleme,
- 2- Herhangibir haptenin proba bağlanması ve bunun, işaretli bir protein yada oluşan prob – hedef dizi hibridine spesifik bir antikor ile görüntülenmesini sağlayan indirekt işaretlemedir.

İndirekt prob işaretlemelemleri kimyasal ve enzimatik reaksiyonlarla yapılır. En yaygın kullanılan işaret maddeleri biotin, dioksijenin gibi haptenler ve FITC (fluoresin izotiyosiyanat yeşil), teksas kırmızısı, AMCA (amino metil kumarin asetik asit) gibi fluoresan maddelerdir (Tablo 7). Ayrıca, ender olarak peroksidaz, alkalın fosfataz gibi enzim ve kolloidal altın gibi metal işaretlemelemlerine rastlanır. Haptin işaretli problemler mRNA FISH için güvenilirlik, yüksek stabilite, hızlı sonuç verme ve tek hücre rezolüsyonu gibi önemli avantajlara sahiptirler.

En duyarlı yöntem, spesifik bir antikora uygun olan bir haptenin, bir nükleotid türevine bağlanması ile gerçekleştirilir.(örneğin, digoksijenin ddUTP veya dUTP' ye bağlanır ). Melezleme ve yıkamaları takiben doku bir enzime bağlı olan ve hapteni bağlayan bir protein ile inkübe edilir. Daha sonra sinyal bu enzim için uygun substratın kullanılması sonucunda, ürünün renklendirilmesi şeklinde elde edilir. Bu işlem fluoresin işaret maddesinin kullanımı içinde benzer şekildedir. İşaret fluoresan mikroskobunda gözlenir(40).

**Tablo 6. FISH İçin prob Tipinin seçimi**

<b>Prob tipi</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
<b>RNA</b>	RNA:RNA melezleri oldukça dengelidir.  Prob denatürasyonu gerektirmez.	Melezleme sonrası RNAz uygulaması melezlenmeyen problemleri ortadan kaldırır.  Probun RNAz aktivitesinden korunması gereklidir.Çok çabuk parçalanır.

	Melezleme işlemi sırasında yeniden eşleşme olmaz Prob vektör içermez.	Probun vektör içine subklonlanması gerekir.
<b>Çift iplikli DNA</b>	Subklonlama gerektirmez. Fazla sayıda ve uygun işaretleme metodları uygulanabilir.	Prob denatürasyonu gerekir. Melezleme sırasında tamamlayıcı zincirler yeniden eşleşir. Melezler RNA problemlerinden daha az dengelidir.
<b>Oligonükleotidler</b>	Klonlama gerektirmez. Kendi içinde eşleşmeye uğramaz. Dokuya penetrasyonu çok iyidir. Protein dizilerden yararlanarak hazırlanabilir.	Sınırlı işaretleme metodu uygulanır Dizileme sırasında hatalar oluşabilir. Melezleme için oldukça kısa dizilerdir

**Tablo 7. FISH ' da İzotopik olmayan işaretleme ve belirleme sistemleri**

<b>İşaret molekülü</b>	<b>Tayin</b>	<b>Yorum</b>
<b>BIOTİN*</b>	Avidin	Avidin bir glikoproteindir. Yüksek oranda istenmeyen bağlantılara neden olur.
	Streptavidin	Avidinden daha iyi, fakat Büyük bir moleküldür. Dokuya penetrasyonu zayıftır.
	Anti- biotin	Dokuya penetrasyonu daha iyi , fakat avidinden daha düşük afiniteye sahiptir
<b>DIOKSİGENİN**</b>	Anti-dioksigenin	Endojen işaret molekülleri ile sorun yoktur.



DİREKT ENZİM  
(Peroksidaz, alkalın fosfataz)

Büyük konjugatlarıdır, zayıf penetrasyona sahiptir.

DİREKT FLUORESEİN\*\*\*  
(FITC / TRICT )

Çok hızlı lokalizasyona sahiptir, indirekt yöntemden daha az duyarlıdır.

\*Biotin işaretlemede en büyük problem, doku veya hücre kültüründeki endojen biotin varlığıdır.

\*\*Digoksigenin bitkiden elde edilen bir steroiddir. Nükleik asitler içine kolayca yerleşebilirler. Spesifik antikorlar kullanarak tayin edilebilir. Dokuda endojen digoksigenin problemi yoktur.

\*\*\*Enzimatik olarak fluoresan işaretleme için , FITC işaretli nükleotid analogları ticari olarak mevcuttur.

**FISH tekniğinin sitogenetik alanındaki kullanımında 5 farklı prob çeşidi vardır.**

a-Genomik problemler

b-Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemleri )

c-Lokusa özgü problemler

d-Tüm kromozomu boyayan problemler

e- Banda özgü problemler

#### **a- Genomik Problemler**

Tüm genomu işaretleme için kullanılmaktadır. Total nükleer genomun işaretleme için kullanılması olarak tanıyacak özellikleri taşımalıdır. Bunun için, tek gen dizilerinden çok, hızlı hibridizasyona olanak veren tekrarlayan diziler kullanılır. Türe özgü işaretleme için Alu dizileri sıklıkla kullanılmaktadır (41).

#### **b- Tekrarlayan Dizi Problemleri**

Satellit yada telomerik tekrar dizilerine özgü problemlerdir. ( İnsan DNA'sının %10-% 20'si kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde bulunan satelit dizilerden oluşur.) Alfa satelit problemler, sentromerdeki alfa DNA dizilerine özgün olup özellikle aneuploidilerin ve marker kromozomların sentromer kökenlerinin saptanmasında interfaz ve

metafazda kullanılmaktadır. Işıma yoğunlukları son derece yüksektir (42,43). Beta satellit problar ise insan kromozomlarının perisentrik heterokromatin bölgelerinde yer alan tekrar dizilerine, 9. kromozoma spesifik olarak hazırlanmışlardır. Akrosentrik kromozomların polimorfik satellit bölgelerinin gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır (44). Klasik satellit probları 1, 19, 15, 16. kromozomların sekonder konstriksiyon bölgelerinde ve Y kromozomunun uzun kolunda yer alan tekrar dizinleri için kullanılmaktadır (43).

Telomerik problar, kromozomun uç bölgelerine özgün dizinlerin komplementerleri olup, telomeri içeren yapısal kromozom değişikliklerinde sık kullanım alanı bulmaktadır (43).

### **c- Lokusa Özgü Problar**

Lokusa özgü problemlerin uzunluğu 15 ile 500 Kbp arasındadır. Genomdaki tek kopya dizinlerine yönelik olan bu problemlerin hibridizasyon verimi gözlenecek olan bölgenin büyüklüğü ile ilişkilidir. Hedefin 2 kbp'den uzun olması başarıyı artırır. Lokusa özgü problemler ilgili kromozoma ilişkin sayısal düzensizliklerin, ilgili bölgeyi içeren yapısal düzensizliklerin, mikrodelyasyon sendromlarının tanısında kullanılmaktadır. Plazmid, faj, YAC, kozmid klonları ile oligonükleotidler bu grup problemler içerisinde yer alır (45).

### **d- Tüm Kromozomu Boyayan Problar**

Kromozom boyunca değişik bölgelere özgü DNA dizisi içeren prob karışımının kullanılması halinde, o dizilere özgün kromozom tümüyle boyanır Bu nedenle de boyama koleksiyonları (painting collections) olarak da adlandırılırlar. Hibridizasyonu takiben uygulanan görüntüleme basamakları ile ilgili kromozom son derece belirgin olarak gözlenir. Plazmid, YAC klonlarından, somatik hücre problemlerinden, kromozom kütüphanelerinden elde edilen problemler bu amaçla kullanılır. Translokasyon değerlendirmesinde marker ve ring kromozom incelemelerinde tercih edilen problemlerdir(46).

### **e- Banda Özgü Problar**

Şüpheli görülen ve spesifik problemin olmadığı durumlarda kullanılan bu yöntemde önce ilgili kromozom segmenti mikrodisekte edilir. DNA ekstraksiyonundan sonra PCR ile çoğaltılarak prob haline getirilir ve normal metafaz kromozomları ile hibridize edilir.

Özellikle kriptik dengesiz translokasyonlarda, terminal delesyonların saptanmasında uygulanan bir yöntemdir(41).

### **1.3.5. Uygulama Alanları**

#### **1.3.5.1. Sitogenetik**

##### **a- Anöploidi**

21,18,13, X ve Y kromozomlarına ait anöploidiler özellikle prenatal tanı ile ilgili olarak klinik genetikçiler için en sık karşılaşılan problemlerdendir. X ve 18. kromozomların sentromerlerine ve Y kromozomunun uzun kolundaki heterokromatin bölgeye özgü tekrarlayan dizilerin prob olarak kullanımı ile metafaz ve interfazda söz konusu kromozomların sayılarını izlemek olasıdır. 21. ve 13. kromozomların sentomerik tekrarlayan dizinleri çapraz hibridleme vermektedir. Bu nedenle, sentromerik problemleri interfazda bu iki kromozomun toplam kopya sayısını verirler. Bundan dolayı, 21.ve 13. kromozomlar için lokusa özgü prob tercih edilmektedir. Çok renkli FISH uygulaması ile özellikle anöploidik değişiklikler gösteren solid tümör interfaz hücrelerinde, her kromozomun sayısının saptanması olası olabilmektedir. Özellikle, metafaz eldesinin güç olduğu bu olgularda çok renkli FISH uygulaması son derece bilgi verici olmaktadır(47).

##### **b- Yapısal kromozom anomalileri**

FISH kullanarak, translokasyonların ve delesyonların hatta bazı durumlarda özellikle perisentrik inversiyonların tanınması olası olmaktadır.

Translokasyonlar için tüm kromozomu boyayan proplar yanısıra tek gen problemlerinin de kullanımı söz konusu olmaktadır. Kırık noktalarına özgü dizinlerin kullanımı, translokasyonların interfazda da tanınmasına olanak vermektedir. Örneğin, Kronik Myeloid Lösemilerde görülen 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyonların izlenmesi bu iki kromozomun tam kromozom problemleri ile olasıdır. Ancak interfaz incelenmesinde tüm kromozom boyaları net sonuç vermez. Bunun yerine kırık noktalarına yerleşen bcr ve abl genlerine özgü proplar kullanıldığında, interfazda sinyallerin konumları bilgi verici olmaktadır.

GTG (G bantlama) ve HRB (High resolution bantlama) bantlama yöntemleri ile çok küçük delesyonları saptama olanağı olmadığından mikrolelesyonlarda FISH için en uygun kullanım alanlarından birini oluşturmaktadır. Lokusa özgü proplar aracılığıyla Prader-Willi, Angelman, Miller- Dieker, Di George, Smith-Magenis, Cri-du-chat gibi mikrolelesyon sendromlarının laboratuvar tanısı konmaktadır. İnterfaz nükleuslarında da ilgili bölgelere

spesifik problemlerle kolaylıkla tanıya gidilebilir. Metafaz ve interfazda sinyalin olmaması ile delesyon belirlenmekte olup, duyarlı ve güvenilir sonuçlar alınmaktadır (48).

Inversiyonlar için de gene özgü dizimler kullanılmaktadır. Bu durumda iki farklı prob seçilerek birbirlerine ve sentromere göre pozisyonları değerlendirilmelidir. M4 tip akut lösemilerde, 16.kromozom üzerine yerleşen iki tek kopya dizin ve sentromerik prob kullanıldığında, normalde gen -gen -sentromer olarak izlenen sinyaller inversiyon sonunda gen-sentromer-gen olarak değişmektedir.

### 1.3.5.2. Moleküler Genetik

#### a- Gen amplifikasyonları

Özellikle onkoloji olgularında ilaca dirençli hücrelerin saptanması için kullanılmaktadır. Bunun için drg (drug resistance gene) dizinleri prob olarak kullanılarak, kopya sayısı izlenebilir. Bunun yanısıra onkogenlere ait amplifikasyonlar içinde kullanılabilirler.

Özellikle "imprinting " olgusunun söz konusu olduğu hastalarda gen kopya sayısındaki artışların da saptanması olasıdır.

#### b- Gen Haritalanması

DNA dizinlerinin kromozomal yerleşimleri FISH ile direkt olarak tanımlanabilir. Birbirine çok yakın olan dizinlerin yerlerinin saptanması, rezolüsyonun arttırılarak, işlem sırasının iyi düzenlenmesine bağlıdır. Rezolüsyonun arttırılması, vektörün uygun kromozom paketlenme düzeyinin seçimi ile yakından ilişkilidir (49, 41).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. MATERYAL:

1990-2002 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik laboratuvarına başvuran Prader-Willi ve Angelman sendromu ön tanılı ve obezite ve mental retardasyona sahip 16 olgu, yine bu tarihler arası Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Noröloji Anabilim Dalına başvuran lizensefali, migrasyon anomalisi, pakigri. ve Miller-Dieker sendrom ön tanılı 16 olgu arşivden yapılan taramalar sonucu bulundu. Toplam 25 hastaya ulaşılabildi (PWS / AS ön tanılı 12 hasta, MDS tanılı 13 hasta) ve bu hastalardan alınan periferik kan örneği ile çalışma materyali oluşturuldu.

### 2.2. METOD:

#### 2.2.1. Periferik Kan Kültürü

##### 2.2.1.1. Kullanılan Solüsyonlar :

##### a-Besiyerinin Hazırlanışı:

Steril 100 ml'lik ambalajlarda sağlanan RPMI 1640 besi ortamına steril fetal dana serum, fitohemaglutinin, streptomisin-penisilin ve L-Glutamin aşağıdaki oranlarda ilave edildi. Hazırlanan bu karışımdan steril olarak 5'er ml besi ortamı steril kapaklı kültür tüplerine dağıtıldı. 4<sup>0</sup>C'lık buzdolabında saklandı. Her olgu için 2'şer tüp kullanıldı

RPMI 1640	100ml
FCS (Fötal dana serum)	20ml
PHA (Fitohemaglutinin)	5ml
Penisilin-Streptomisin	1ml
L-Glutamin	1ml

Hazırlanan bu karışımdan steril olarak 5'er ml besi ortamı steril kapaklı doku kültürü tüplerine dağıtıldı. Her olgu için 2'şer tüp kullanıldı.

#### **b- Antibiyotiğin Hazırlanışı**

Kültür ortamına işlemler sırasında herhangi bir bulaşmayı önlemek amacıyla besi ortamına penicilin- streptomycin konuldu. 4°C 'da saklanan 1.000.000 IU'luk penicilin-streptomycin 20ml steril bidistile suda çözüldü. Bu stoktan 0,1 ml alınarak 25ml steril bidistile su ilave edilerek hazırlandı.

#### **c- Hipotonik Solüsyonu (0,075M KCl)**

2,5 gr KCl 500ml distile suda çözülerek hazırlandı.

#### **d- Fiksatif Solüsyonu**

Fiksatif solüsyonu içindeki alkolün uçuculuğu nedeniyle her zaman taze olarak 3:1 oranında metil alkol ve glisial asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

#### **e-Tampon Solüsyonu ( Sorenson buffer)**

0,1 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250ml distile suda çözündürülerek PH=7 olan tampon solüsyonu hazırlandı.

#### **f-Tripsin Solüsyonu:**

0,1 gr tripsin 10ml bisdistile su ile sulandırıldı. Sulandırılan tripsinden 5ml çekildi. Üzerine 95ml izotonik konularak hazırlandı ve PH=7'ye ayarlandı. Kullanılmak üzere -20 C°'a kaldırıldı. 37°C su banyosunda ısıtılarak kullanıldı.

#### **g- 2xSSC Solüsyonu**

1,7530 gr sodyum klorür 100ml distile suda çözüldü. 0,8823gr tri-sodyum sitrat 100ml distile suda çözüldü. İki solüsyon birbiri ile karıştırılarak hazırlandı.

## **h- Boya Solüsyonu**

16 ml Leishman boyası (100ml Metil Alkol+ 0,1 gr Leishman Boyası), 4ml Giemsa boyası filtre kağıdından süzülerek karıştırıldı. Karıştırılarak hazırlanan bu boya solüsyonu şalelelere konuldu ve üzerine tampon solüsyonundan ve distile sudan belirli miktarda eklendi.

### **2.2.1.2. İşlemler:**

#### **A- Hücre Kültür Aşaması:**

**a-** Heparinli enjektörle olgudan alınan 2ml venöz kan, ağzı kapaklı steril besi ortamı bulunan 2 tüpe ayrı ayrı 8'er damla damlatıldı ve hafifçe karıştırıldı. Üzerine olgunun adı,soyadı, tarih yazılı bant yapıştırılarak ve kapağı kapatılarak 37<sup>0</sup>C 'da etüve kondu ve 71 saat bekletildi.

**b-** Kültürün 71. saatinde kolsemid 0,1 ml (2 damla ) olarak ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve 30 dakika 37<sup>0</sup>C' de bekletildi. Kolsemid ilavesiyle hücre bölünmesi metafaz safhasında durduruldu.

#### **B- Preparasyon Aşaması:**

**a-** Süre bitiminde kültür tüpleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

**b-** Süpernatant pastör pipeti ile atıldı. Hücre çökeltisi ve üstünde kalan 0,5 ml'lık sıvı pastör pipeti ile karıştırılarak üzerine 10 ml hipotonik solüsyon (0,075M KCl ) konuldu ve 20 dakika 37<sup>0</sup>C etüvde inkübe edildi. Böylece kültürdeki hücrelerin şişirilerek kromozomların birbirlerinden iyice ayrılması sağlandı.

**c-** 20 dakikalık inkübasyondan sonra tüpler 1000 rpm.de 10 dakika santrifüj edildi.

**d-** Süpernatant atıldıktan sonra hücre çökeltisi üzerinde bırakılan 0,5ml hipotonik ile yavaşça çalkalanır ve vorteks yardımıyla karıştırılarak pastör pipetiyle yavaşça toplam 10ml fiksatif eklendi. 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.

**e-** Fiksatifle yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.

**f-** Hücre çökeltisinin durumuna göre üzerinde belli bir miktar fiksatif bırakarak süpernatant atıldı. Kalan miktar yavaş yavaş pipetaj yapılarak karıştırıldı.

**g-** Bu şekilde fikse edilen hücreler bir pipetle alınıp önce fiksatiften geçirilerek temizlenen sonra -20<sup>0</sup> C 'da bekletilen lamlara 45<sup>0</sup> C 'lik açı ile 10 cm yukarıdan 3-4 damla damlatılarak yayıldı. Damlaların iyice yayılması için beklenildi.

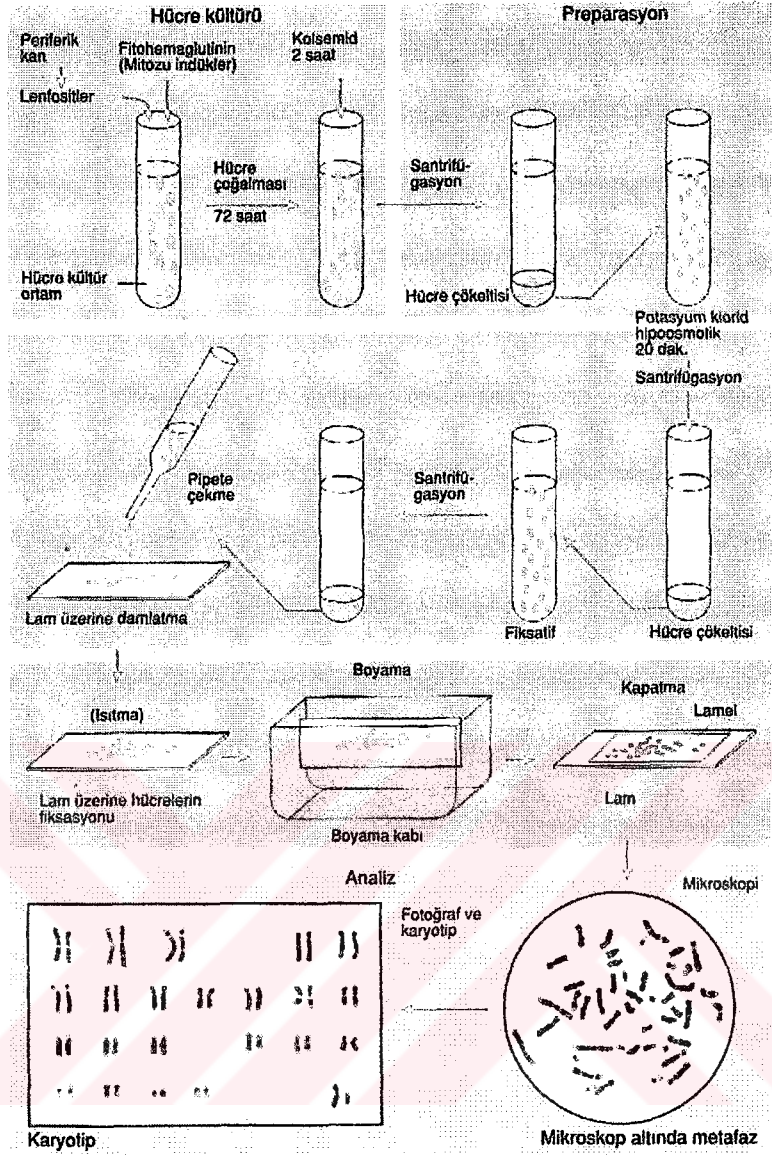
## **C- Yaşlandırma Aşaması**

a- Preparatlar GTG ( Giemsa bantlama) için 60<sup>0</sup> C'da bir gece ya da 90<sup>0</sup> C'da 1.5 saat inkübe edilerek, FISH uygulaması içinde oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek yaşlandırılır. Mikroskopta mitotik indeks bakımından kontrol edilen preparatlardan indeksi yüksek olanlar için FISH yöntemi uygulandı.

### **2.2.2. Tripsin Giemsa Bantlama (GTG-Banding)**

- a- Yaşlandırılmış periferik kan preparatları 60<sup>0</sup>C 2xSSC solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Süre sonunda preparatlar çeşme suyundan ve ardından distile sudan geçirildi.
- b- Kurutulan preparatlar 5-10 saniye arasında değişen bir süre tripsin solüsyonunda tutuldu. Her olguya ait bir preperat tripsin solüsyonundan geçirilerek uygun süre saptandı ve bu süreler dikkate alınarak olguya ait diğer preperatlar bantlandı.
- c- Tripsinden çıkarılan preparatlar tampon solüsyonuna daldırılıp çıkarılarak yıkandı.
- d- Boya solüsyonunda 4-5 dakika arasında değişen sürelerde preparatlar boyandı.
- e- Boyanan preparatlar çeşme suyu ve ardından distile sudan geçirilerek kurutuldu.
- f- Uygun metafazlar ikiden fazla kromozom üst üste gelmemiş ve bantları iyi ayırt edilebilen kromozomlu ) mikroskopta 100X büyütme ile 20 metafazda inceleme yapıldı Kromozomlar sayısal ve yapısal olarak değerlendirildi.. Anomali durumunda bu sayı 50'ye çıkarıldı. İncelenen metafazlardan 4'nün bilgisayarlı karyotip analiz sistemi ile karyotipi yapıldı (Şekil 7).





Şekil 7. Metafaz kromozomlarının eldesi ve karyotipleme (50)

## 2.3.FISH ANALİZİ

### 2.3.1. Kullanılan Solüsyonlar:

#### a-Ethanol Serileri

Saf etanolden %70, %85, %100'lük ethanol serileri hazırlandı.

**b- 20x SSC Stok Solüsyonu**

800ml distile suda 175,3 gr sodyum klorür ve 88,2 gr tri-sodyum sitrat çözüldü. PH=7,2 'ye konstre HCl kullanılarak getirildi. Hacim 1000ml'ye tamamlandı.

**c- 4xSSC Solüsyonu**

20xSSC stok solüsyonu 1=5 oranında dilue edilerek hazırlandı.

**d- 2xSSC Solüsyonu**

20xSSC stok solüsyonu 1:10 oranında dilue edilerek hazırlandı.

**e- 0,4xSSC Solüsyonu**

20xSSC stok solüsyonu 1: 50 oranında dilue edilerek hazırlandı.

**f- 2xSSC , 0,05% Tween 20 Solüsyonu**

10ml 20xSSC ile 90ml distile su karışımına 50µl Tween 20 eklenerek hazırlandı.

**g- Kromoprop ( Cytocell cat no:LPU 005 )**

**ğ- 500µl Hibridizasyon Solüsyonu**

Formamid, Dekstran Sülfat, SSC

**h- 500µl Boya Solüsyonu**

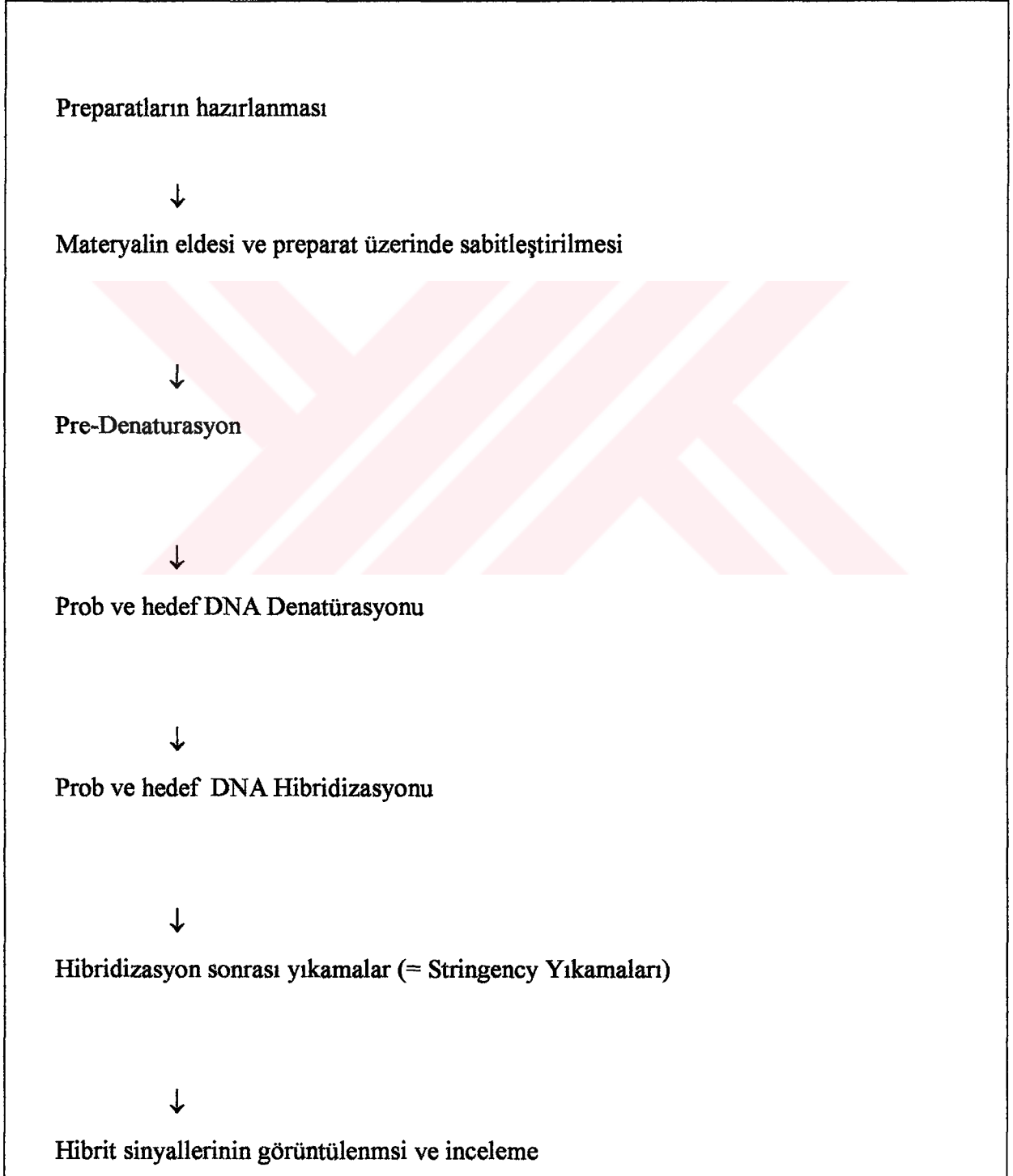
Solmayan DAPI

### 2.3.2. YÖNTEM

Yapılan literatür incelemesi sonucu belirlenen FISH yöntemi laboratuvarımız şartlarına uygun olarak modifiye edilmiştir. Yöntem Prader-Willi / Angelman, Miller-Dieker ön tanımlı olgulara ait kan örneklerinden hazırlanan interfaz ve metafaz plaklarında nükleik asit probu ile hibridizasyonu ve son evresinde ise görüntüleme esasına dayanmaktadır.

Uyguladığımız FISH protokolü 7 basamaktan oluşmaktadır (Tablo 8):

Tablo 8. FISH aşamaları



### **2.3.2.1. Preparatların Hazırlanması:**

FISH tekniğinde lamaların kalitesi çok önemlidir. İyi temizlenmemiş ve otofloresans olmayan lamalar zemin boyanmasına yol açabilir. Bu nedenle otofloresans lamalar önce metanol asetik asit fiksatifleriyle temizlendi ve bol distile sudan geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Laminin orta kısmına 2-3 cm olacak şekilde iki çizgi çekilerek lam işaretlendi.

### **1.3.2.2. Materyelin Eldesi ve Preparat Üzerinde Sabitleştirilmesi:**

a- Materyal olarak Prader-Willi / Angelman, Miller-Dieker ön tanımlı olgulara ait periferik kan kullanılarak standart periferik kan kültürü gerçekleştirildi. Periferik kan kültür yönteminin fiksatifle yıkama işleminin 3. aşamasında supernatant atıldıktan sonra kalan çökelti pipetaj edilerek bir veya iki damla olacak şekilde laminin işaretli olan bölgesine damlatıldı ve hasatanın ismi ve protokolü lam üzerine yazıldı. Işık mikroskopunda mitotik indeks ve metafaz dağılımı bakımından preparat incelendi ve yeterli sayıda metafaz plağı olan preparatlar FISH analizine alındı.

b- Uygun olan preparatlar oda sıcaklığında gece boyunca yaşlandırılmaya bırakıldı.

c- Yaşlanan preparatlar, 2 dakika oda ısısında 2xSSC solüsyonunda yıkandı.

d- %70, %85 ve %100'lük etanol serisinden 2'er dakika geçirilerek dehidre edildi ve havada kurutuldu.

### **2.3.2.3. Pre-Denaturasyon**

a- Pre-denatürasyon ve sonraki denatürasyon işlemleri karanlık odada gerçekleştirildi. 20<sup>0</sup> C 'de tutulan prob çözülünceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak karıştırılan probdan 10µl alındı ve preparat üzerindeki belirlenen bölgeye damlatıldı.

b- Lamelle kapatılıp lamel çevresi yapışkanla kapatıldı.

c- Preparat Hot Plate üzerinde 37<sup>0</sup> C'de 2-3 dakika bekletildi.

### **2.3.2.4. Prob ve Hedef DNA'nın Denatürasyonu**

Preparatın hot plate üzerinde 72<sup>0</sup>C'de 5 dakika tutulması ile probun ve hedef DNA'nın denatüre olması sağlandı

### **2.3.2.5. Prob ve Hedef DNA'nın Hibridizasyonu**

Denatürasyon işlemi biten preparatlar nemli ve karanlık ortama yerleştirilerek 37 °C'de bir gece bekletildi. Böylece prob ve hedef DNA'nın hibridizasyonu gerçekleştirildi.

### **2.3.2.6. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

İşaretili prob hedef dizi dışında homoloji gösteren başka dizilerle özgün olmayan melezlemeler yapılabilir. Böyle melezler doğru eşlenmiş olanlar göre daha dayanıksızdır; bu nedenle çeşitli yıkama işlemleri ile çözülebilir. Melezleme sonrası yıkamalar zayıf bağlanan probu temizlemek ve sadece doğru eşleme olanları bırakmak amacıyla uygulanır. Bu amaçla ;

- a- Lamel preparat üzerinden çıkarılarak 72<sup>0</sup> C'lik 0,4xSSC solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
- b- Ppreparatlar 2xSSC, %0,05 Tween20 (PH=7 ) solüsyonunda 30 saniye bekletildi.

### **2.3.2.7. Prob Sinyallerinin Görüntülenmesi ve İnceleme**

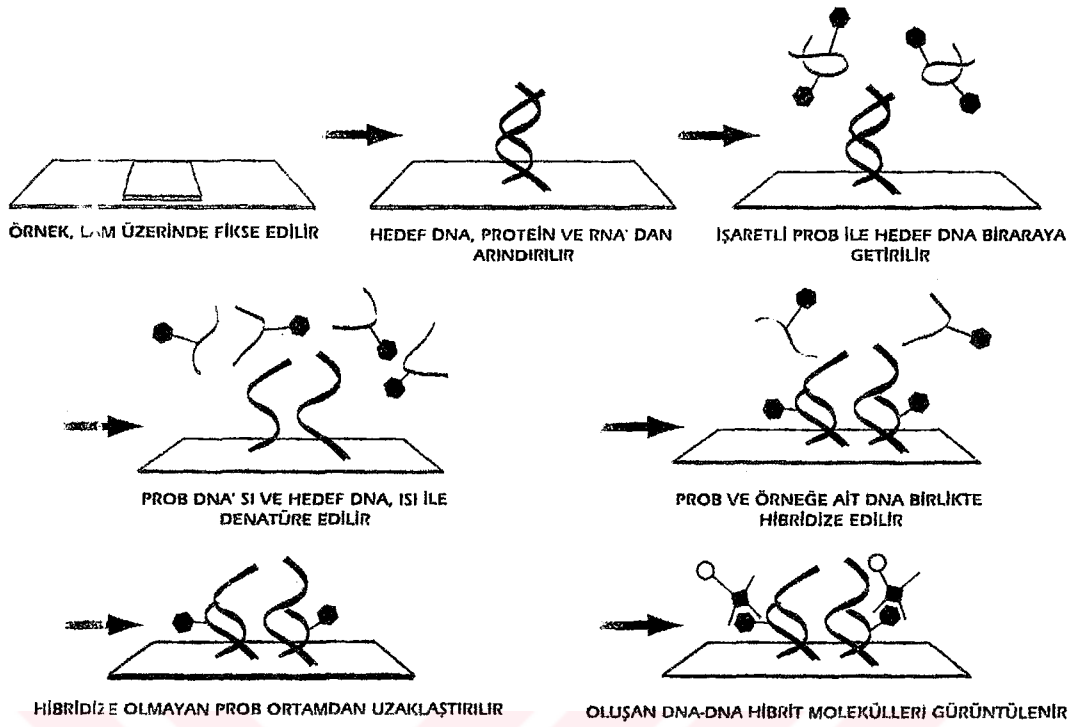
- a- Preparat üzerinde % 0,05 Tween-20 solüsyonu kurumadan lam üzerindeki işaretili bölgeye 10 µl DAPI damlatıldı.
- b- 24x60 mm 'lik lamelle kapatılan preparatlar nemli ve karanlık bir ortamda 10 dakika inkube edildi.
- c- Her hasta için en az 25 metafaz ve 25 interfaz analiz edildi. Kromozom ve interfaz nükleusları 4, 6 diamino – 2- fenolindol (DAPI ), flouressein izotiyosiyanat (FITC ) ve tetrametil rhodenine izotiyosiyanat (TRITC ) üçlü filitre sistemi olan fluoressan mikroskobu ile incelendi. 3 metafaz bilgisayarlı imec analiz sistemi ile fotoğrafı çekilerek görüntülendi ( Şekil 8).

### **2.3.2.8. FISH uygulamaları sırasında ortaya çıkan sorunlar ve çözümleri**

FISH uygulaması sırasında karşılaşılan sorunlar ile bunlara yol açabilecek durumlar ve alınması gereken önlemler Tablo 9'da verilmiştir (51).

**Tablo 9. FISH uygulamaları sırasında ortaya çıkan sorunlar ve çözümleri**

<b>Problem</b>	<b>Olası nedenler</b>	<b>Cözüm</b>
1- Kesitlerin düşmesi	-Lam kapama işlemlerinde eksik veya uygunsuz uygulama -Kesit lam üzerine alındıktan sonra yeterince kurutulmamış	-Lam kapama işlemi yenilenmeli veya değiştirilmeli. - Lam üzerine alınan kesitler 37°da kurutulmalı
2- FISH işaretlerinin	-Hedef nükleik asit yok. yokluğu veya azlığı -Prob işaretlenmemiş -Melezleme sağlamlığı az ve arkasından çok fazla yıkamalar yapılmış -Prob yada nükleik asit denatüre olmamış( çift iplikli prob kullanılmış ise ) -Probun hücre içine girişi çok zayıf veya yetersiz -Prob konsantrasyonu çok düşük	-Nükleik asit varlığı kontrol edilmeli - Probun işaretli olup olmadığı kontrol edilmeli - Melezleme sağlamlığı artırılmalı veya daha düşük ısı uygulanmalı -sDNA hedefleri ve/veya problemleri denatüre edilmeli - Doku geçirgenliğinin ve/veya prob uzunluğunun kontrolü yapılmalı - Prob konsantrasyonu artırılmalı
3- Kesitte spesifik olmayan, çok fazla işaret alınması (istenmeyen zemin boyanması)	-Melezleme sonrası yıkama işlemi unutulmuş veya çok kısa tutulmuş yada yıkama yetersiz kalmış - Prob konsantrasyonu çok yüksek -Kesitler işlem sırasında kurumuş -Spesifik olmayan bağlanmalar kurulmuş -Substrat inkübasyonu çok uzun olmuş veya sıcaklık yükselmiş - Substrat inkübasyonundan sonra yetersiz yıkamalar yapılmış	-Yıkama solüsyonundaki NaCl miktarı azaltılmalı veya yıkama sıcaklığı yükseltilmeli - Prob konsantrasyonu düşürülmeli -Kesitlerin hiçbir aşamada kurutulmamasına dikkat etmeli -Dokuda maskeleyme yapılmalı veya asetilasyon artırılmalı -Renk reaksiyon kontrolü sık yapılmalı -Yıkama işlemleri dikkatli yapılmalı



Şekil 8. FISH' in şematik gösterimi (52)

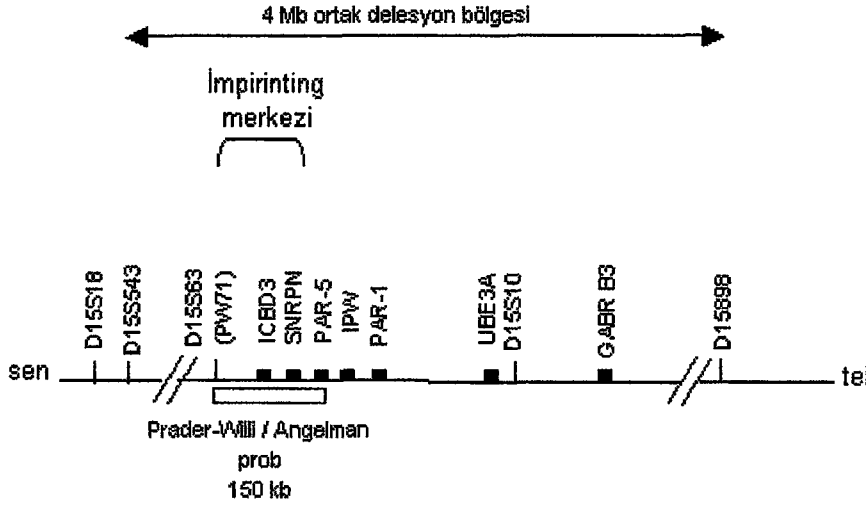
### 2.3.3. FISH Değerlendirme:

#### 1- Prader-Willi / Angelman sendromları için;

a- Kullandığımız PWS/ AS probu, telomerleri kontrol probu ile işaretlemekte ve yeşil fluoresan vermektedir. SNRPN gen bölgesi ise SNRPN/IC probu ile işaretlenmekte ve kırmızı fluoresan vermektedir.

b- FISH analizinde o olguda eğer delesyon yoksa; kontrol probunda 2 yeşil sinyal ve SNRPN / IC probu her iki homolog kromozom üzerinde 2 kırmızı sinyal oluşturur.

c- Eğer olguda mikrodelesyon varsa ; SNRPN/IC probu, homologların sadece birinde sinyal oluştururken kontrol probu her iki homologda da sinyal verir ( Şekil 9).

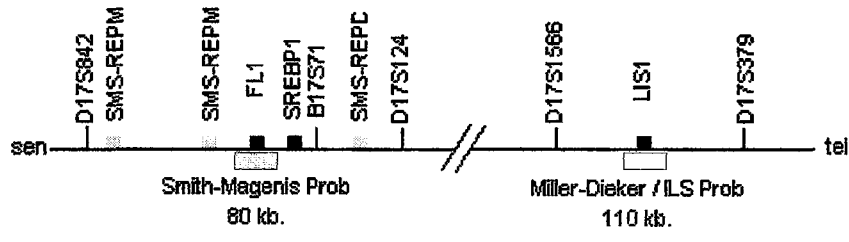


Şekil 9.

## 2) Miller- Dieker sendromu için

- a- Bir metafazdan sonuç elde edileceği zaman LIS1 ( Miller-Dieker / ILS prob) ve FL1 ( Smith-Magenis probu ) kontrol problemleri 17. kromozomun her iki homologunun p kolunda sırasıyla kırmızı ve yeşil renkte 2' şer sinyal verirler.
- b- Olguda delesyon yoksa; analiz edilen hücrelerde LS1 ve FL1 problemlerinin her ikisi ile her iki homolog kromozom üzerinde sinyal gözlenir.
- c- Miller-Dieker / Isolated Lissensefali sequansı için bir delesyon örneğinde, LIS1 probu ile homologların sadece bir tanesinde sinyal gözlenirken, FL1 kontrol probu ile homologların her ikisinde de sinyal gözlenir.
- d- Smith- Magenis kromozom bölgesi için bir delesyon örneğinde ise, FL1 probu ile homologların sadece bir tanesinde sinyal gözlenirken, LS1 kontrol probu ile homologların her ikisinde de sinyal gözlenir ( Şekil 10).





Şekil 10.



## BULGULAR

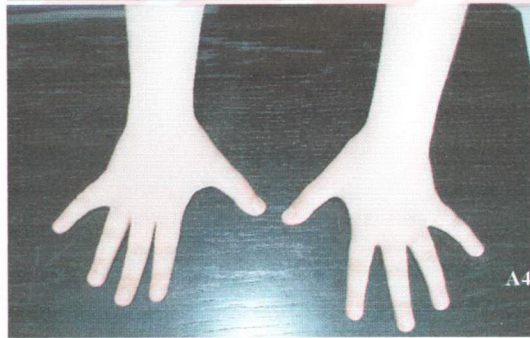
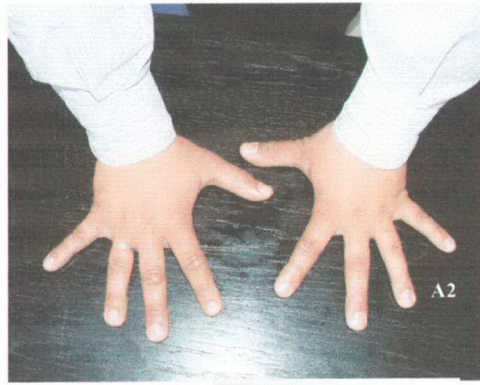
Çalışmamızda, Prader-Willi / Angelman sendrom ön tanılı, obezite ve mental retardasyon görülen 12 olgu ve Miller-Dieker sendrom ön tanılı ve lizensefalli 13 olgu, toplam 25 olgunun periferik kanından hazırlanan preparatlarda FISH ve klasik kromozom analiz yöntemleri uygulandı. PWS/AS ve MDS ' lu olgulara ait klinik, sitogenetik ve FISH bulguları şöyledir (Tablo 10, 11, 12):

Tablo 10. Prader-Willi sendrom ön tanılı 11 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları

	<u>PWS</u>	<u>Bulgu yüzdesi</u>
<b>Kız</b>	1	%9
<b>Erkek</b>	10	%91
<b>Akrabalık</b>	1	%9
<b>Neonatal hipotoni</b>	7	%64
<b>İnfant dönemde beslenme güçlüğü ve büyüme geriliği</b>	6	%55
<b>Obezite</b>	11	%100
<b>Hipogonadizm</b>	9	%82
<b>Mental retardasyon</b>	10 ( Hafif-Orta )	%91
<b>Darbifrontal çap badem şeklinde palpebral aralık</b>	6	%55
<b>Küçük ağız</b>	6	%55
<b>Kısa boy</b>	5	%45
<b>Küçük el ve ayaklar</b>	7	%64
<b>Sitogenetik bulguları</b>	46, XX (1) 46, XY (10)	%9 %91
<b>FISH bulguları</b>	46, XX (1) 46, XY (10)	%9 %91

Tablo 11. Angelman sendrom ön tanılı 1 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları

	<u>AS</u>
<b>Kız</b>	+
<b>Erkek</b>	-
<b>Akrabalık</b>	-
<b>Gelişme geriliği</b>	+
<b>Mental retardasyon</b>	+(Hafif)
<b>Konuşma yokluğu / minimal kelime kullanımı</b>	-
<b>Ataksik yürüyüş</b>	+
<b>Kollarda titrek hareket</b>	+
<b>Mutlu tavır</b>	+
<b>Gülme krizleri</b>	-
<b>Kolay heyecanlanma</b>	+
<b>Nöbetler</b>	-
<b>İki yaşına kadar mikrosefali</b>	+
<b>Anormal EEG</b>	+
<b>Sitogenetik bulguları</b>	46, XX
<b>FISH bulguları</b>	46, XX



Şekil 11 . Prader-Willi / Angelman Sendrom ön tanılı olguların fenotipleri

A1: PWS ön tanılı olgunun genel görünümü

A3: AS ön tanılı olgunun genel görünümü

A2: Kısa eller

A4: İğsi ve kısa eller

**Sitogenetik inceleme bulguları:** Toplam 12 PWS / AS ön tanılı olgularadan hazırlanan American Collage of Medical Genetics tarafından kural olarak saptanan G bantlı en az 20 metafaz analiz edildi . Sitogenetik analiz sonucu incelenen metafazlarda sayısal ve yapısal açıdan herhangi bir anormalite saptanmadı (Şekil 12).



Şekil 12. PWS/AS ön tanılı bir olguya ait karyotip

**FISH bulguları:** PWS / AS 'larında SNRPN gen bölgesine özgü prob kullanılarak yapılan FISH uygulamalarında toplam 25 interfaz çekirdeği ve 25 metafaz plağı incelendi. Kontrol probu ile 15. kromozomun telomerleri, SNRPN/IC probu ile de PWS/AS 'na özgü SNRPN gen bölgesi işaretlendi. FISH analizinde kontrol probleleriyle işaretlenen telomer bölgelerinde 2 yeşil sinyal, SNRPN/IC probu ile işaretli her iki homoloğun SNRPN gen bölgesinde 2 kırmızı sinyal gözlemlendi ve toplam 12 PWS/AS ön tanımlı hastada mikrodilesyon saptanamadı. ( Şekil 13 )



Şekil 13 : SNRPN/IC ( Cytocell ) probuyla işaretlenmiş metafaz plağı. SNRPN gen bölgesinde mikrodilesyon yok.

**Tablo 12. Miller-Dieker ön tanı 13 olgunun klinik ve laboratuvar bulguları**

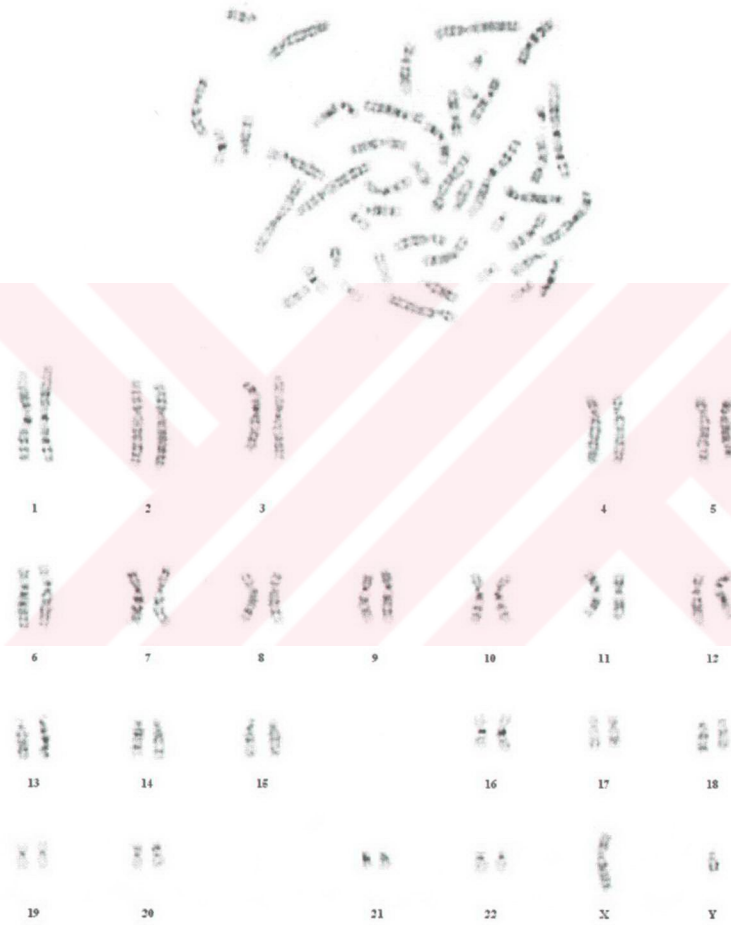
	<u>MDS</u>	<u>Bulgu yüzdesi</u>
<b>Kız</b>	5	%38
<b>Erkek</b>	8	%62
<b>Akrabalık</b>	1	%7.6
<b>Mental retardasyon</b>	13	%100
<b>MR ( lizensefali, pakigri, migrasyon anomalisi)</b>	13	%100
<b>Nöbetler</b>	5	%38
<b>Mikrosefali</b>	4	%31
<b>Bitemporal darlık</b>	4	%31
<b>Küçük ve dışa dönük burun delikleri</b>	10	%77
<b>Mikrognati</b>	2	%15
<b>Düşük arkaya doğru köşeli kulak</b>	1	%7.6
<b>Çekik gözler</b>	7	%54
<b>Geniş alveolar köprü</b>	1	%7.6
<b>Süt dişlerinin geç çıkması</b>	2	%15
<b>Kriptorşitizm</b>	7	%88 (7/8)
<b>Beşinci parmakta klinodaktili</b>	1	%7.6
<b>Kardiyak defekt</b>	1	%7.6
<b>Sık enfeksiyonlar</b>	8	%62
<b>Sitogenetik bulguları</b>	46, XX (5) 46, XY (8)	%38 %62
<b>FISH bulguları</b>	46, XX (5) 46, XY (8)	%38 %62



Şekil 14. A1 ve A2. MDS ön tanıı olgunun genel ve fasial görünümü

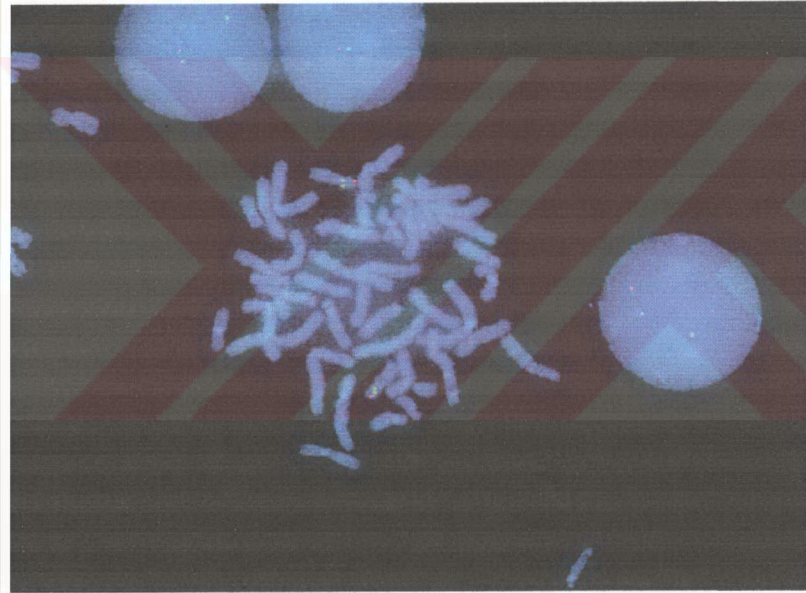


**Sitogenetik inceleme bulguları:** 13 MDS ön tanı ve lizensefalili olgularda incelenen 20 metafaz plağında sayısal ve yapısal açıdan anormallite saptanmadı. ( Şekil 15 )



Şekil 15: MDS ön tanımlı bir olguya ait karyotip

**FISH bulguları:** Toplam 20 interfaz ve 20 metafazın incelendiği MDS ön tanılı 13 olguda uygulanan FISH analizinde, LS1 probe ile 17. kromozomun Miller-Dieker/ Isolated lizensefali bölgesinde 2 kırmızı sinyal gözlenerek, mikrodelesyon saptanamadı. Ayrıca Miller-Dieker sendromu için kullanılan mikrodelesyon probe bir başka mikrodelesyon sendromu olan Smith-Magenis sendromuna spesifik bir probe kombine edildiğinden, Miller-Dieker sendrom grubularında ( n=13 ) Smith-Magenis sendromuna yol açan mikrodelesyon bölgelerinde, FL1 probe ile incelendi ve 17.kromozom üzerinde oluşan 2 yeşil sinyal; bu olgularda Smith-Magenis sendromuna yol açan mikrodelesyonun yokluğunu gösterdi.(Şekil 16)



Şekil 16: LS1 ve FL1 ( Cytocell) probe ile işaretlenmiş metafaz plâğı ve interfaz çekirdeği. Miller-Dieker ve Smith -Magenis gen bölgelerinde delesyon yok.

### 3. TARTIŞMA

Fluoresan İn Situ hibridizasyon (FISH), bir çok teşhis laboratuvarlarında Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker gibi mikrodelesyon sendromlarının teşhisi için birinci ve yardımcı test olarak ortaya konmuştur. Belirtmek gerekirse bu çalışmanın amacı, klinik olarak tanımlanmış Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker sendrom hastalarında mikrodelesyonları karakterize etmede SNPRN / IC ve SMS / MDS problemlerinin kullanıldığı FISH delesyon metodunun, laboratuvarımızda rutin kullanılan sitogenetik bir metod haline getirmektir.

Birkaç çalışma Prader-Willi, Angelman sendromlarının klinik, sitogenetik ve moleküler teşhisini değerlendirdiği halde bu kapsamlı çalışmaların hiçbirinde FISH kullanılmamıştır (53, 54, 55, 56). Son zamanlarda 3 çalışmada FISH metodu moleküler yöntemlerle karşılaştırılmıştır (57, 58, 59). Bu çalışmaların çoğunda kesin teşhis konulan klinik olarak iyi karakterize edilmiş hastalar moleküler bakımdan analiz edilmiştir. Özellikle metilasyon testi ile yapılan moleküler analizlerin FISH metodundan daha yeterli olduğuna karar verilmiştir. Çünkü allta yatan bozukluğu göze almaksızın Prader-Willi, Angelman sendromlu hastaların hepsi teşhis edilir. Fakat moleküler testleri negatif çıkan bir çok hasta için sitogenetik analizler yapılması gerekliliği de dikkat çekmektedir (11). Yine bir başka çalışmada da, bu hastalık gruplarında YAC 273A2 FISH delesyon metodu, klasik sitogenetik ve herhangi bir DNA analiz metodundan ( D15S63 metilasyon testi, RFLP ve STRP) elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. FISH delesyon yönteminin, Prader-Willi, Angelman sendromlu olduğu düşünülen hastaların mikrodelesyon analizinde ve teşhis için gerekli testlerde ilk sırada yer alan en yeterli test olduğu sonucuna varılmıştır (11).

Son zamanlarda Miller- Dieker ve İzole Lissensefali Sendromlu hastaların sitogenetik bulgularında 17p13.3 delesyonuna ait sitogenetik bulgular rapor edilmiştir. Bu delesyonların resiprokal translokasyonlar, pelosentrik inversiyonlar ve de nova ring kromozomlarının, disentrik lokasyonların bir sonucu olduğu saptanmıştır (31). Ayrıca sonradan açıklanmış ring kromozomu 17'ye sahip en az iki hastasında Miller-Dieker fenotipi gösterdiği görülmüştür (60). Başka bir çalışmada 4 normal kontrol grubu ve 3 submikroskopik delesyonlu Miller-Dieker hastalarında 17p13.3 kritik bölgenin delesyonunu araştırmak üzere 2 kosmid prob kullanılarak FISH yapılmıştır. Sonuçta sadece 17p13.3 delesyonu, 13q;7p translokasyonu ve 1 normal karyotip saptandı ve moleküler delesyonların ve kritik translokasyonların analizinde FISH yönteminin diğer moleküler stratejilere göre üstünlüğü belirtilmiştir (61). Yine Miller-Dieker/ İzole lissensefali sendromunda görülen submikroskopik delesyonları tanımlayabilmek

için normal karyotipli hastalara RFLP ve somatik hücre hibrit analizi uygulandı ve değişik boyutlarda delesyonlar saptanmıştır (62). Daha sonraki çalışmalarda da kritik bölgenin moleküler diseksiyonu için FISH yöntemi uygulanmıştır. Hastalarda 17p13.3 delesyonları saptanırken hasta ebeveynlerinde 17p;2q translokasyonları ve kromozom 17'nin inversiyonları gözlenmiştir (63, 64, 65).

Bu çalışmaların ve bizim FISH delesyon çalışmamızın bilgileri açıkça gösterdi ki;

Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker sendromlarının FISH ideal olarak sadece güçlü bir klinik teşhisle uygulanmalıdır. FISH ile teşhis konan hastaların hepsi Prader-Willi, Angelman veya Miller-Dieker klinik teşhisiyle gönderilmiştir veya en azından Prader-Willi, Angelman veya Miller-Dieker olduğu şüphe edilmektedir. Şu zamana kadar olan çalışmalarda da majör olmayan Prader-Willi, Angelman veya Miller-Dieker sendrom teşhisi hastalarda delesyon bulunamamıştır. En küçük tanımlanmış delesyonlar veya imprint yapan mutasyonlar bile tipik bir fenotipe sebep olur. Sapmaların klasik olmayan hastalarda FISH veya moleküler methodlar ile bulunması beklenemez. Bu, sitogenetik analizin daha sık gerek duyulduğu alternatif teşhislerde ve teşhisin daha zor olduğu infant vakalarda geçerli değildir. Bu açıdan doğru teşhis önemlidir. Uygulanan klinik kriterler FISH teşhisi için uyulması mutlak ön koşuldur. Bu çalışmada hastalarımızın çoğu daha önceden belirttiğimiz majör ve minör kriterleri hemen hemen taşımalarına rağmen FISH ve yapılan sitogenetik analizler sonucunda delesyon saptanmadı. Hastaların büyük bir kısmının mikrolelesyon göstermeyen hasta grubuna girdiğine inanılmakla birlikte klinik tanının yinede yeniden gözden geçirilmesi uygun olacaktır.

Bu hastalık gruplarında yapılan klasik kromozom analizlerinin yanısıra FISH analizlerinin maliyet ve emek artışına yol açsada tanısal açıdan kromozom analiz sonuçlarını desteklemesi, doğrulaması ve güvenilirliğini artırması nedeniyle son derece önemli bir yöntem olarak değerlendirilir. Çünkü medikal genetikte kimi zaman sitogenetik olarak tanı konulan bazı olguların ikinci ve güvenilir bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere FISH tekniği konfirmasyon amaçlı güvenilir bir yöntem olarak sitogenetik laboratuvarlarında kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

SNRP/ IC ve SMS / MDS probu kullandığımız çalışmamız ve diğer çalışmalar delesyon taranmasının FISH metoduyla hızlı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Metodun hibridizasyon yeterliliği yüksektir ve sendroma sebep olan kritik bölgelerde lokalize olmakta ve metafaz ve interfazda bütünlüğü bozmadan uygulanabilmektedir.

FISH metodunun açık dezavantajı ise uniparental dizomi ve başka moleküler mutasyonları ortaya çıkaramamasıdır. FISH metodu non- delesyonlu uniparental dizomi

hastalarında(% 30 PWS, % 3 AS) veya moleküler gen bozukluklarında yanlış negatif sonuçlar verdiği için Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker sendromlu hastaların teşhisinde DNA testi gerekmektedir.Fakat hastalarda allta yatan bozukluğun tamamen ortaya çıkarılmasında tek bir test yeterli değildir.Bütün bu testlerin avantajları ve dezavantajları vardır ve biz bu testleri özel olmaktan ziyade tamamlayıcı olarak düşünmekteyiz.

STRP metodu, küçük delesyonları saptaması ve uniparental dizomi- delesyon ayırımı yapması açısından avantaj sağlar. Dezavantajları ise, hastanın anne ve babasından alınan kan örneklerinin ve elde edilmesi çoğu zaman kolay olmayan örneklerin incelenmesi gerekliliğidir. Ayrıca, allellerin kalıtım biçmi genelde kesin bir sonuca yol açmadığı için bu metotta hasta sayısı tanımlanmamıştır.

Metilasyon testinin avantajları ise, sadece sık görülen delesyonları ve uniparental dizomiyi değil aynı zamanda imprint yapan mutasyonları da ortaya çıkarmasıdır. Fakat yalnızca metilasyon testi, mutasyon tipini çözemez. Hiçbir DNA testi kromozom ve FISH analizinin yerini tutamaz. Çünkü ailde tekrar riskini gösteren parental translokasyon ve inversiyonları ortaya çıkaramamaktadır. Moleküler analiz tekrar riskini tahmin edemediği için, moleküler ve klinik olarak teşhis edilen Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker sendromlu hastalarında bile FISH analizi güçlü bir polemik olarak düşünülür.

Özet olarak, FISH metodu uygulanmasının alternatif bir yol olduğu düşünülmektedir. Metilasyon testi, Prader-Willi, Angelman ve Miller-Dieker sendromlarının doğrulanması veya saf dışı bırakılmasında tercih edilen günümüz metodudur.

Kısaca, Prader-Willi/Angelman ve Miller-Dieker sendromu ön tanıli hastalarda uyguladığımız FISH yöntemi, konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle DNA analiz yöntemleri arasında köprü görevini gören bir moleküler sitogenetik yöntemdir. Bu yöntem sitogenetik laboratuvarlarında konfirmasyon yöntemi olarak yerini almaktadır. Şüpheli olgularda klinik tanıya destek vermek amacıyla kullanılabilir.

FISH yöntemi, Prader-Willi / Angelman ve Miller-Dieker sendromu düşünülen hastaların teşhisi için gerekli testlerden ilk sırada yer alan bir test olarak belirtilmektedir. Bu çalışmada, klinik muayene ile ön tanı olarak Prader-Wili/Angelman ve Miller-Dieker sendromu düşünülen bu hastalarda FISH yöntemi ile mikrodelesyon saptanmaması, klinik tanıda daha seçici olunması gerektiğini düşündürdü. Tüm hastalarda uygulanan yöntem ile mikrodelesyon aranılan bölgelere ait sinyallerin alınması bu yöntemin rutin olarak laboratuvarımızda kullanılabileceğini gösterdi.

## 4.KAYNAKLAR

- 1) Lai LW, Erickson RP, Cassidy SB. Clinical Correlates of chromosome 15 deletions and maternal disomy in Prader-Willi syndrome. *AJ DC* 147: 1217-23, 1993.
- 2) Hall BD, Smith DW. Prader-Willi syndrome: a resume of 32 cases including an instance of affected first cousins, one of whom is of normal stature and intelligence. *J Pediatr* 81: 286-93, 1972
- 3) Orenstion MD, Thomas LB. Hypoventilation in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 97: 765-7, 1980
- 4) Zelweger H. Diagnosis and therapy in first phase of Prader-Willi syndrome. In : Holm VA, Scizbacher S, Pipes PL, eds. *The Prader-Willi syndrome*. Baltimore: University Park Press 55-68, 1981
- 5) Whitman By, Accordo P. Emotional symptoms of Prader-Willi adolescents. *Am J Med Genet* 28:897-905, 1987
- 6) Holm VA, Cassidy SB. Butler MG, Erickson RP. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91: 398-402, 1992.
- 7) Donaldson MDC, Chu CE, Cooke A, Wilson A, Greene SA, Stephenson JBP. The Prader-Willi syndrome. *Arch Dis Child* 70: 58-63, 1994.
- 8) Laan LAEM, Haeringen A, Brouwer OF. Angelman syndrome: a review of clinical and genetics aspects. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 101: 161-70, 1999.
- 9) Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 1: del ( 15q11-13) Prader-Willi and Angelman syndromes: 826-828, del ( 17p13.3) and Miller-Dieker syndrome: 823-824, 1995.
- 10) Buiting K, et al. Microdissection of the Prader-Willi syndrome chromosome region and identification of potential gene sequences *Genomics*. 6: 521-527, 1990.
- 11) Erdel M, Schuffenhauer S, Buchholz B, Witte UB, Köchl S, et al. Routine screening for microdeletions by FISH in 77 patients suspected of having Prader-Willi or Angelman syndromes using YAC clone 273A2 ( D15S10 ). *Hum Genet* 97: 784-793, 1996.
- 12) Say B. Amerikadan Notlar : Non-Mendelien kalıtım. *Yeni Tıp Dergisi* , Mayıs 2000-3.
- 13) Preece MA, Moore GE. Genomic imprinting, uniparental disomy and foetal growth. *TEM* Vol.11, No.7, 2000.
- 14) Başaran N , *Tıbbi Genetik Ders Kitabı*. 264-266, 1996.

- 15) Nicholls RD. Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes : a review . *Am J Med Genet* 46:16-25, 1993.
- 16) Wilson GN, Hall JG, Cruz de la F. Genomic imprinting: summary of on NICHD conference. *Am J Med Genet* 46: 675-680, 1993.
- 17) Nicholls RD. New insights reveal complex mechanisms involving genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 54: 733-740, 1994.
- 18) Dittrich B, et al. Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent of origin specific DNA methylation in 15q11-13. *Hum Genet* 90: 313-315, 1992.
- 19) Buiting K, et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genet* 9: 395-400, 1995.
- 20) Sutcliffe JS, Nakao M, Christian SL, Orstavik KH, et al. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nature Genet* 8: 52-8, 1994.
- 21) Barth PG. Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 14: 1-16, 1987.
- 22) Dobyns WB. The neurogenetics of lissencephaly. *Neurol Clin* 7: 89-105, 1989.
- 23) de Rijk-van Andel JF, Arts WFM, Hofman A, Staal A, Niermeijer MF. Epidemiology of lissencephaly type I. *Neuroepidemiology* 10:200-204, 1991.
- 24) Reiner O, Carozzo R, Shen Y, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein like repeats. *Nature* 364: 717-721, 1993.
- 25) de Rijk-van Andel JF, Arts WFM, Barth PG, Loonen MCB. Diagnostic features and clinical signs of 21 patients with lissencephaly type I. *Dev Med Child Neurol* 32: 707-717, 1990.
- 26) Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC, Pagon RA, Ledbetter DH. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology* 42: 1375-1388, 1992.
- 27) Dobyns WB. Developmental aspects of lissencephaly and the lissencephaly syndromes. *Birth Defects* 23. 225-241, 1997.
- 28) Dobyns WB, Reiner O, Carozzo R, Ledbetter D. Lissencephaly. *JAMA* 270: 2838-2842, 1993.
- 29) Kenneth F Swaiman. *Pediatric neurology principles and practice*. Mosby 1: 438, 1994.
- 30) Erdoğan R, Kumandaş S, Elmas B. İki kardeşle İzole tip lissensefali. *Yeni Tıp Dergisi OCAK* 2001-1.
- 31) Dobyns WB, Curry CJR, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 48: 584-594, 1991.

- 32) Miny P, Holzgreve W, Horst J. Genetic factors in lissencephaly syndromes : a review. *Child's Nerv Syst* 9: 413-417, 1993.
- 33) Verma RS, Babu A, et al. *Human chromosomes manual of basic techniques* pergamon. Press, New York, 1989.
- 34) Wimber DE, Stefwinen DM, et al. Localization of 5s RNA gene on *Drosophila* chromosomes by DNA-RNA hybridization. *Science*: 639-641, 1970.
- 35) Elder RT, Szabo P, Uhlenbeck OC. ISH of three transfer RNAs to polytene chromosomes of *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Molecular Biology* 142: 1-4, 1980.
- 36) Boehringer Mannheim. *Nonradioactive In Situ Hybridization: Application manual*. Biochemia , 1992.
- 37) Homes BD, Higgns J. *Nukleic acid hybridization: a practical approach*, Oxford England, 1988.
- 38) Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch J. *Inn Situ Hybridization: a practical approach*, 1994.
- 39) Barrisch O, Schwinger E. *A simplified protocol of FISH with repetitive DNA probes and its use in clinical cytogenetics*, 1991.
- 40) Levy ER, Herrington CS. *Non-isotopic methods in molecular biology: a practical approach*, Oxford University Press, 1995.
- 41) Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization. *TIG*, 7: 149-154, 1991.
- 42) Wayne JS, Willard HF, et al. Chromosome specific Alpha Satellite DNA, *Nucl Acids Res* 13: 2731-2743, 1985.
- 43) Tharapel AT, Wilroy RS, Qusiyeh MB, et al. Identification of origin of centromeres in whole arm translocation using FISH with Alpha Satellite DNA probes. *Am J Med Genet* 40: 117-120, 1991.
- 44) Grieg GM, Willard HF. Beta Satellite DNA probes. *Genomic* 12: 573-580, 1992.
- 45) Fuscoe JG. Human chromosome specific DNA libraries: Use of oligonucleotide probe to detect non recombinants. *Gene* 52: 291-296, 1987.
- 46) Von Dila MA, Albright KL, Fuscoe J, Trask B, et al. Human chromosome specific DNA libraries: Construction and availability. *Biotechnology* 4:537-552, 1986.
- 47) Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 51:55-65, 1992.
- 48) Tkachuk DC, Pinkel D, Kuo WL, et al. Clinical applications of fluorescence in situ hybridization. *GATA* 8: 67-74, 1991.



- 49) Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, et al. High resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1: 587-591, 1992.
- 50) Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. *Renkli Genetik Atlası*, 2000.
- 51) Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyolojide kullanılan Yöntemler*, 1999.
- 52) Başaran N. *Teorik ve Pratik FISH*, 1999.
- 53) Robinson WP, Bottani A, et al. Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet* 49: 1219-1234, 1991.
- 54) Gibellesen Koesbach G, Gross s, Kaya Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 32: 88-92, 1995.
- 55) Chan CT, Clayton Smith J, Cheng XJ, Buxton J, WebbT, Pembrey ME, Malcom S. molecular mechanisms in Angelman syndrome: a survery of 93 patients. *J Med Genet* 30: 895-902, 1993.
- 56) Webb T, Clarke D, et al. A clinical , cytogenetic, and molecular study of 40 adults with the Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 32: 181-185, 1995.
- 57) Bettio d. Rizzi N, et al. FISH aanlysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* 56: 224-228, 1995.
- 58) Delach J A, Rosengren SS, Kaplan L, et al. Comparison of high resolution chromosome banding and FISH for evaluation of Prader-Willi and Angelman syndrome. *Am J Med Genet* 52: 85-91, 1994.
- 59) Butler MG, et al. High resolution chromosome analysis and FISH in patients referred for Prader-Willi and Angelman syndrome (letter). *Am J Med Genet* 56: 420-422, 1995.
- 60) Sharief RF, Dobyns WB, Airhart SD, et al. Miller- Dieker syndrome with ring chromosome 17. *Arch Dis Child* 66: 710-712, 1991.
- 61) Kuwano A, Letbetter SA, Dobyns WB. Detection of and crytic translocations in Miller-Dieker syndrome by in situ hybridization . *Am J Hum Genet* 49: 707-714, 1991.
- 62) Ledbetter SA, Kuwano A, Dobyns WB, et al. Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet* 50: 182-189, 1992.
- 63) Pliz DT, Dalton A, et al. Detection deletions in the critical region for lissencephaly on 17p13.3 using FISH and a PCR assay identifying a dinucleotide report polymorphism. *J Med Genet Apr; 32 (4): 275-278, 1995.*
- 64) Kingston HM, Ledbetter DH, et al. Miller-dieker syndrome resulting from rearregement of familiyal chromosome 17 inversion detected by FISH. *J Med Genet Jan 33(1): 69-72, 1996.*

---

65) Huang HC, Baustista SL, et al. Miller-Dieker syndrome with microdeletion of chromosome 17p13.3 report one case. *Zhanghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* Nov- Dec: 38(6): 472-476, 1997.

