



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

**ÇOKLU LİGASYONLA PROB AMPLİFİKASYONU (MLPA)  
YÖNTEMİNİN PRENATAL TANIDAKİ  
YERİ VE ÖNEMİ**

Hazırlayan

Bio. Elif Ari

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Öztürk Özdemir

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2015

**TEZ ONAY FORMU**

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü

Program Adı :

Programın Seviyesi :Yüksek Lisans (X) Doktora ( )

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Elif ARİ

Tez Başlığı : Çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA)  
yönteminin prenatal tanıdaki yeri ve önemi

Sınav Yeri : Tıbbi Genetik ABD

Sınav Tarihi : 27.08.2015 Saat:10.<sup>00</sup>

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Sınav Jürisi**

<b>Danışman (Unvan ve Adı)</b>	<b>Kurumu</b>	<b>İmza</b>
<b>Prof.Dr.Öztürk Özdemir</b>	<b>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi</b>	
<b>Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)</b>		
Prof.Dr.Fatma Sılan	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Doç.Dr.Coşkun Sılan	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Fahri Güneş	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Ahmet Uludağ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**THESIS APPROVAL FORM**

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name :

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ( )

Department : Medical Genetics Department

Student Name and Surname: Elif ARI

Title of the Thesis : / The role and validity of multiple prob amplification (MLPA) technique in prenatal diagnosis

Examination Place : Department of Medical Genetics

Examination Date : 27th August 2015

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved

as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

<b>Supervisor (Title and Name)</b>	<b>Institution</b>	<b>Signature</b>
<b>Prof.Dr.Ozturk Ozdemir</b>	<b>Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine</b>	
<b>Members of Examination Jury (Titles and Names)</b>		
<b>Prof.Dr.Fatma Silan</b>	<b>Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine</b>	
Assoc.Prof.Dr.Coskun Silan	<b>Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine</b>	
Assoc.Prof.Dr.Fahri Gunes	<b>Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine</b>	
Assist.Prof.Dr.Ahmet Uludag	<b>Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine</b>	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated ..... and numbered .....

## **BEYAN FORMU**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih:**

**Tez Sahibi Adı ve Soyadı:** Elif ARİ

**İmza:**

## TEŞEKKÜRLER

Staj yaptığım süre içerisinde yüksek lisans yapmaya karar vermeme yardımcı olan, yüksek lisansım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana verdiği emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım çok değerli tez danışman hocam Sayın Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e,

Yüksek lisans ve tez çalışmalarım boyunca bilgilerini benimle paylaşıp yol gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN'a ve Yrd. Doç.Dr. Ahmet ULUDAĞ'a,

Çalışmalarında tecrübeleriyle yanımda olan ve bilgisiyle çalışmalarımı kolaylaştıran, ilgisiyle çok rahatlıkla iletişim kurabildiğim Asistan Dr. Mine URFALI'ya, özellikle analizlerdeki yardımları için Asistan Dr. Onur YILDIZ'a, Asistan Dr. Barış PAKSOY'a,

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, göstermiş oldukları hassasiyet, anlayış ve her türlü destekleri için başta Biyolog Diğdem UYSAL olmak üzere, her zaman varlığını yanımda hissettiğim arkadaşım Biyolog Göksun ÇAMER'e, aynı süreçlerden geçen dolayısıyla tecrübesiyle işimi hafifleten yüksek lisans mezunlarımızdan Biyolog Ebru ŞIK'a, Kimyager Hülya HAS, Biyolog Gaye ACAR, Biyolog Betül IŞIN, Biyolog Damla KARAAĞAÇLI, Tekniker Şengül TÜRÜNZ, Kimyager Duygu KANKAYA, ve tüm genetik ailesine,

İyi ve kötü her anımda yanımda olan, bana sonsuz destek veren, kararlarımda hep destekçim olan, zor ve stresli geçen bu yolda göstermiş oldukları ilgiyle bu süreci kolaylaştıran, sevgili aileme ve kuzenime en içten duygularıyla sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Proje No: 478 olarak desteklenmiştir.

## ÖZET

Prenatal tanı; doğum öncesi dönemde fetus veya embriyodaki olası hastalıkların tespit edilmesi yöntemidir. Prenatal tanının en temel amacı; yaşamla bağdaşabilen trizomik ve monozomik fetusların doğum öncesi olabildiğince erken evrede tespit edilmesi esasına dayanır. Anabilim dalımıza bağlı sitogenetik ve moleküler genetik laboratuvarlarında 2010 yılından beri prenatal tanı, kantitatif floresan polimerz zincir reaksiyonu (QF-PCR) ve amniyon hücre kültürü-full karyotip analiz yöntemleri ile hizmet vermektedir. Bu projemizde laboratuvarımızda daha önce QF-PCR ile genotiplendirilen amniyon örnekleri ve düşük materyallerine ait deoksiribonükleik asit (DNA) bankası kullanılarak çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA) tekniği ile genotiplendirilmesi varsa olası mikrodelsiyon/duplikasyonların tespit edilmesi amaçlandı. Elde edilen sonuçlar QF-PCR tekniği ile daha önce elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Çalışmamızda anöploidi ve mikrodelsiyon/duplikasyon olmak üzere iki farklı MLPA kiti kullanıldı. 67 amniyon ve 10 adet düşük materyali olmak üzere toplam 77 örnek 36 farklı prob içeren MLPA anöploidi kiti ile genotiplendirildi. 33 amniyon, 11 adet düşük materyali olmak üzere toplam 44 örnek ise 50 adet farklı prob içeren MLPA mikrodelsiyon/duplikasyon kiti ile çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu ve kapiller elektroforez tekniği ile genotiplendirildi.

MLPA anöploidi kiti ile genotiplendirilen örneklerde; 57 adet amniyon normal olarak değerlendirilirken, 10 amniyon ve 7 adet düşük materyali örneklerinde sayısal kromozom anomalileri saptandı. Daha önce OF-PCR ile tanı alan 3 adet triploidi ve 1 adet tetraploidi örneğine MLPA anöploidi kiti ile bu araştırmada tanı konulamadı. Bir adet uninformatif örnek normal olarak değerlendirilirken, paternal uniparental izodizomi tanısı alan diğer amniyon örneği ise Triple X olarak değerlendirildi. QF-PCR ile normal değerlendirilen 2 örnekte kromozom 18 ve 21 de kısmi duplikasyon saptandı. Bunların dışında sayısal anomali tanısı konulmuş diğer tüm örneklerin QF-PCR sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü. MLPA mikrodelsiyon/duplikasyon kiti ile analiz edilen örneklerde; 11 amniyon normal (%33.3) değerlendirilirken, 22 amniyon örneğinde ise (%66.7) mikrodelsiyon ve/veya duplikasyon saptandı. Değerlendirilen toplam 11 adet düşük materyalin tamamında (%100) mikrodelsiyon ve/veya duplikasyon saptandı.

Elde edilen sonuçlar MLPA anöploidi ve mikrolelesyon/duplikasyon tekniğinin prenatal tanı amaçlı genel olarak başarılı bir yöntem olduğunu gösterdi. MLPA anöploidi kiti ile iki tahliye materyali örneğinde başka teknikle belirlenemeyen kromozom 18 ve 21' e ait 18q11.2, 21q22.3 ve 21q11.2 bölgelerinde duplikasyon olduğu belirlendi. MLPA mikrolelesyon/duplikasyon ile analiz edilen ve daha önce normal değerlendirilen örneklerin tamamında mikrolelesyon ve/veya duplikasyon saptanmıştır.

Sonuç olarak, araştırmamızda çalışılan her iki MLPA yönteminin insanda prenatal tanı amaçlı başarı ile kullanılabilceği ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra her iki kitin prenatal amaçlı tek başına kullanılması yerine diğer tekniklerle birlikte kullanılmasının kesin ve doğru sonuç için daha etkili ve geçerli olacağı tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Prenatal tanı, amniyon ve tahliye materyal örnekleri, PCR, QF-PCR, MLPA teknikleri

## ABSTRACT

### **The role and validity of multiple prob amplification (MLPA) technique in prenatal diagnosis**

Prenatal diagnosis is a technique that aim to detect the possible trisomic and/or monosomic chromosomal abnormalities in embryo and fetal cells before birth. In our laboratory the quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) and karyotype analysis after amnion cell culture techniques that well esatblished for the prenatal diagnosis. In the current project it was aimed to check the possible advantage of the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique in prenatal diagnosis. The aneuploidy (36 probs) and microdeletion/duplication (50 probs) MLPA kits and capillary electrophoresis technique were used for that purpose and results were compared to the QF-PCR technique retrospectively.

In a total of 67 amnion and 10 aboted materials were genotyped by aneuploidy kit and 33 different amnion and 11 aborted material samples were genotyped by microdeletion/duplication kit in the current retrospective case - control study. Three aneuplodid and one tetraploidic samples that diagnosed by QF-PCR technique were not diagnosed by MLPA aneuploidic kit in the current study. One uninformativ amniotic sample was normal and the other paternal uniparental isodisomy was diagnosed as triple X syndrome by MLPA technique. Microdeletions were detected in chromosomes 18 and 21 in two different samples that diagnosed as normal by QF-PCR technique in the current results. The rest of other samples were diagnosed as the same as QF-PCR technique. The amniotic samples that diagnosed by microdeletion/duplication kit showed; 11 (33%) normal structure and microdeletion and/or duplications were detected in 22 samples (66.7%) that evalutaed by 50 different probs. Microdeletion and/or duplications were detected in all 11 aborted materials (100%) that evalutaed by 50 different probs in the current results. Two regional chromosomal duplication were detected in chromosome 18 (18q11.2) and 21(21q22.3) of different aborted samples in the current study. In general, the current case-control results showed that MLPA technique is valid and successfully technique in prenatal diagnosis of amnion and/or aborted materials genotyping.



In conclusion, the current results confirmed that both MLPA kits can be use for the prenatal diagnosis successfully, but it is better used with combination of other techniques or need to be confirme by another valid techniques such as QF-PCR, fully karyotyping, sanger sequencing and/or microarray in the prenatal diagnosis.

**Key Words:** Prenatal diagnosis, amnion and aborted materials, PCR, QF-PCR, MLPA techniques

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
İÇ KAPAK	I
TEZ ONAY FORMU	II
BEYAN FORMU	IV
TEŞEKKÜRLER	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
İÇİNDEKİLER	X
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	XIII
ŞEKİLLER	XV
TABLolar	XVII
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Prenatal Tanı	3
2.1.1. Prenatal Tanı Endikasyonları	3
2.1.1.1. İleri Anne Yaşı	3
2.1.1.2. Önceden De Novo Kromozom Anomalili Çocuk Varlığı	4
2.1.1.3. Ebeveynlerden Birinde Yapısal Kromozom Anomalisi Varlığı	4
2.1.1.4. Aile Hikayesinde Biyokimyasal veya DNA Analizi ile Tanı Konulabilen Genetik Hastalık Varlığı	5
2.1.1.5. Nöral Tüp Defekti Riski	5
2.1.1.6. Anne Serumunda Tarama ve Ultrasonografi	5
2.1.2. Prenatal Tanı Metodları	6
2.1.2.1. İnvaziv Testler	6
2.1.2.1.1. Amniyosentez	6
2.1.2.1.2. Koryonik Villus Örnekleme	7
2.1.2.1.3. Kordosentez	7
2.1.2.1.4. Preimplantasyon Genetik Tanı	8

2.1.2.2. İnvaziv Olmayan Testler	9
2.1.2.2.1. Anne Serumunda Alfa-Fetoprotein Ölçümü	9
2.1.2.2.2. Anne Serumu Taraması (Üçlü Tarama)	9
2.1.2.2.3. Ultrasonografi	9
2.1.2.2.4. Maternal Kandaki Fetal Hücreler	10
2.2. Kromozom Anomalileri	10
2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri	12
2.2.1.1. Triploidi ve Tetraploidi	12
2.2.1.2. Anöploidi	12
2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri	12
2.2.2.1. Delesyonlar	13
2.2.2.2. Duplikasyonlar	13
2.2.2.3. Ring Kromozomlar	14
2.2.2.4. İzokromozomlar	14
2.2.2.5. Disentrik Kromozomlar	14
2.2.2.6. İnversiyonlar	14
2.2.2.7. Translokasyonlar	15
2.3. Laboratuvarımızda Prenatal Tanı için Uygulanan Yöntemler	15
2.3.1. Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR)	15
2.3.2. Karyotipleme	16
<b>3. MLPA (ÇOKLU LİGASYONLA PROB AMPLİFİKASYONU) TEKNİĞİ</b>	19
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	21
4. 1. Çalışma Şekli ve Materyal Temini	21
4.1.1. Hasta Seçimi	21
4.1.2. Kullanılan Gereçler	21
4.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	22
4.2. Yöntemler	22
4.2.1. Probemix P095-A3 Anöploidi	22

4.2.2. Probemix P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1	24
4.2.3. DNA'nın Elde Edilmesi	27
4.2.3.1. Düşük Materyallerinden DNA İzolasyonu	27
4.2.3.2. Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu	27
4.2.4. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	28
4.2.4.1. DNA Denatürasyonu ve SALSA MLPA Probemix P095 Anöploidi ile Hibridizasyonu	28
4.2.4.2. Ligasyon	28
4.2.4.3. PCR	29
4.2.4.4. ABI 3130 Cihazına Yükleme	29
4.2.4.5. Değerlendirme	29
<b>5. BULGULAR</b>	31
<b>6. TARTIŞMA</b>	37
<b>7. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	41
<b>8. KAYNAKLAR</b>	43
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	46
<b>10. EKLER</b>	48

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

<b>MLPA</b>	: Çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
<b>QF-PCR</b>	: Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>FISH</b>	: Fluoresan in situ hibridizasyonu
<b>NTD</b>	: Nöral Tüp Defekti
<b>CVS</b>	: Koryonik Villus Örneklemesi
<b>USG</b>	: Ultrasonografi
<b>PGT</b>	: Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>STR</b>	: Short tandem repeats (Kısa bitişik tekrarlar)
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>UBA</b>	: Uzunluğu Belirli Aralık
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SMA</b>	: Spinal Müsküler Atrofi
<b>AFP</b>	: Alfa-Fetoprotein
<b>AST</b>	: Anne Serum Taraması (Üçlü tarama)
<b>NT</b>	: Nükal Kalınlık
<b>HCG</b>	: İnsan Koryonik Gonadotropin
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>uE<sub>3</sub></b>	: Ankonjuge Östriol
<b>nts</b>	: Length (pik boyu uzunluğu)
<b>C</b>	: Sitozin
<b>A</b>	: Adenin
<b>SNP</b>	: Tek nükleotit polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
<b>dk</b>	: Dakika
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>nt</b>	: Nükleotid
<b>sn</b>	: Saniye
<b>RPM</b>	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
<b>TESE</b>	: Testiküler sperm ekstraksiyonu

- VNTR** : Değişken sayılı bitişik tekrar (Variable number of tandem repeats)  
**FFPE** : Formalin ile fikse parafine gömülü

<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>SAYFA NO</b>
<b>Şekil 1.</b> Amniyosentez işleminin yapılışı	6
<b>Şekil 2.</b> Koryonik villus örnekleme işlemi	7
<b>Şekil 3.</b> Plasentanın değişik yerleşimlerine göre kordonsentez uygulaması. Solda posteriyor plasenta, sağda anteriyor plasenta görülmekte	8
<b>Şekil 4.</b> Delesyon meydana gelen kromozomun görsel hali	13
<b>Şekil 5.</b> Bir kromozoma ait duplikasyon bölgesi	13
<b>Şekil 6.</b> .Kromozom 6'ya ait ring kromozomu	14
<b>Şekil 7.</b> Perisentrik inversiyon (solda) ve parasentrik inversiyon (sağda) görselleri	14
<b>Şekil 8.</b> Resiprokal translokasyon (üstte) ve robertsonian translokasyon (altta) görselleri	15
<b>Şekil 9.</b> Solda sayısal olarak normal olan 18. kromozoma ait 1:1 oranında piklerin bulunduğu görüntü, sağda Trizomi 21 tanısı konulan bir hastaya ait 3 adet pikin bulunduğu görüntü bulunmaktadır	16
<b>Şekil 10.</b> Sitogenetik laboratuvarımızda Trizomi 21 tanısı konulan amniyon sıvısından elde edilen kültürün karyotip görüntüsü	17
<b>Şekil 11.</b> MLPA tekniğinin basamakları (MRC MS MLPA 2007)	19
<b>Şekil 12.</b> Sendromik özellikleri eksik olan mental retardasyonlu hastalarda izlenecek yol	25
<b>Şekil 13.</b> Normal olarak değerlendirilen amniyon sıvısına ait P095-A3 Anöploidi sonuç profili. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)	31
<b>Şekil 14.</b> Düşük materyaline ait hedef kromozomlardaki bazı bölgelerin MLPA P095-A3 Anöploidi delesyon ve duplikasyon profili	32

<b>Şekil 15.</b> MLPA P095-A3 Anöploidi çalışılmış Şekil 14'e ait düşük materyalinin karyotip profili	32
<b>Şekil 16.</b> İki amniyon sıvısına ait hedef kromozlardaki bazı bölgelerin P095-A3 Anöploidi kısmi duplikasyon profilleri. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)	33
<b>Şekil 17.</b> Trizomi 18 olarak değerlendirilen amniyon sıvısına ait P095-A3 Anöploidi MLPA profilleri	34
<b>Şekil 18.</b> Mikrodelesyon çalışmasında normal olarak değerlendirilen düşük materyalinin P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 MLPA profili. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)	35
<b>Şekil 19.</b> Çok sayıda bölgede mikrodelesyon/duplikasyon tespit edilmiş düşük materyaline ait örneğin Electropherograms (A), Sample Report (B) P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 MLPA sonuç profilleri	36



<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>SAYFA NO</b>
<b>Tablo 1.</b> Anne yaşına bağlı olarak canlı doğum ve fetuslarda Down sendromu insidansı (Thompson&Thompson, 2006)	4
<b>Tablo 2.</b> DNA analizi ile prenatal tanısı yapılabilen bazı tek gen hastalıkları (Thompson&Thompson, 2006)	5
<b>Tablo 3.</b> Prenatal tanı için kullanılan invaziv ve invaziv olmayan testler	6
<b>Tablo 4.</b> Sonografik olarak tespit edilen seçilmiş izole ve çoklu anomalileri olan fetusların fetal kromozom anomalisi prevalansı (Thompson&Thompson, 2006)	10
<b>Tablo 5.</b> Amniyosentezle elde edilen anomalilerin görülme sıklığı	11
<b>Tablo 6.</b> Spontan abortuslarda sayısal anomalilerin görülme sıklıkları (Kaya 2015)	11
<b>Tablo 7.</b> SALSA MLPA Probemix P095 Anöploidi pik uzunlukları ve kromozomdaki yerleri	23
<b>Tablo 8.</b> SALSA MLPA P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 Probemix ile tespiti yapılabilen sendromlar	24
<b>Tablo 9.</b> SALSA MLPA P245-B1 Mikrodelesyon-1 Probemix kromozomların lokalizasyonları, kullanılan proplar ve klinik olarak tanımları (sendromlar)	26
<b>Tablo 10.</b> Araştırmada kullanılan amniyon ve tahliye materyallerine ait QF-PCR ve MLPA (Anöploidi) sonuçları	31
<b>Tablo 11.</b> Araştırmada kullanılan amniyon ve tahliye materyallerine ait QF-PCR ve MLPA (Mikrodelesyon) sonuçları	35

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prenatal tanı, doğum öncesi dönemde fetus veya embriyodaki olası hastalıkların tespit edilmesi yöntemidir. Genetik hastalıkların önlenmesi ve bebeklerin sağlıklı bir şekilde dünyaya gelmesi için yapılan çalışmalar içinde prenatal tanının önemli bir yer kapladığı unutulmamalıdır.

İnsanda meydana gelen düşüklerin yaklaşık %40-60' ı sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalilerinden kaynaklanmaktadır. Kromozom 13, 18, 21, X ve Y trizomileri yaşarla bağdaşan ve en sık karşılaşılan anomalilerdir. Bunların yanı sıra kromozom 21 ve X monozomik fetuslar da yaşarla bağdaşan anomalilerdendir. Prenatal tanının en temel amacı; yaşarla bağdaşabilen bu trizomik ve monozomik fetusların doğum öncesi olabildiğince erken evrede tespit edilmesi esasına dayanır.

Fetal biyolojik materyalin analiz edildiği yöntemle fetusun genetik yapısının olabildiğince en doğru ve kesin tanı alması, aileye doğru ve etkin genetik danışma verilmesine olanak sağlar. Bu uygulama tıbbi genetik alanında üst düzeyde sorumluluk gerektiren bir uygulamadır (Boormans 2008). Prenatal tanı; kromozomal ve/veya tek gen hastalıklarının doğum öncesi tanı almasına varsa doğum öncesi tedavisine ve doğum sonrası gerekli önlemlerin alınmasına, uygun tedavi planlaması yapılmasına olanak vermektedir. Bundan dolayıdır ki prenatal tanı, genetik hastalıkların önlenmesi ve bebeklerin sağlıklı bir şekilde dünyaya gelmesine katkı vererek koruyucu hekimlikte önemli bir yer tutar.

Prenatal tanı sürekli değişen ve gelişen bir alandır. Bütün dünyada araştırmacıların fetusun genetik kimliğinin en doğru ve kesin olarak ortaya koyması için arayışları devam etmekte olup, her yeni gün farklı teknik ortaya koymaktadırlar. Teknolojik gelişmeler; tanı koymada güvenilirliğin artmasına, daha fazla hastalığa tanı konulmasına, hastalığın daha erken dönemde ve daha hızlı tanımlanabilmesine bunların yanı sıra tarama testlerinin artmasına bağlı olarak yaygınlaşmasına olanak tanımıştır (Sürmeliler 2005).

Anabilim dalımıza bağlı sitogenetik ve moleküler genetik laboratuvarında 2010 yılından beri prenatal tanı kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) ve amniyon hücre kültürü-full karyotip analiz yöntemleri ile hizmet vermektedir. Laboratuvarımızda QF-PCR ile hedef kromozomların kimliklendirilmesi başarılı bir şekilde yapılmasının yanı sıra bazı fetuslarda (özellikle maternal kontaminasyon

şüphesi olan) kısa bitişik tekrar (STR) bölgelerinden alınan amplikon pikleri hekimlerimizi tereddütlere düşürebilmekte ve tekrarlı analiz yapma gereğini ortaya koyabilmektedir. Diğer yandan, tekrar analizler zaman ve maliyet sorununu gündeme getirmektedir. Prenatal tanıda zaman çok önemli olduğu için bu büyük bir sorundur.

Çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA) tekniği ile koryonik villus örnekleme (CVS) ve amniyosentez gibi invaziv girişimler sonrasında elde edilen fetal hücreler üst düzey doğrulukla analiz edilmektedir ve bu doğrultuda elde edilen sonuçlar rapor haline getirilmektedir (Boormans 2008). Çatışmamızın amacı da daha önce QF-PCR tekniği ile elde edilen sonuçları, MLPA yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak ve bu amaçla varsa olası farklılıkları istatistiksel olarak değerlendirmek. Retrospektif bir araştırma olan bu projemizde laboratuvarımızda daha önce QF-PCR ile genotiplendirilen amniyon örneklerine ve düşük materyallerine ait DN (deoksiribonükleik asit) bankası kullanılarak MLPA tekniği ile kimliklendirilmeleri yapıldı. MLPA anöploidi ve mikrodelesyon kitleri olmak üzere iki ayrı kit ile çalışma yapıldı. Böylece hedef kromozomlara ait farklı primer/prob kullanarak 13, 18, 21, X ve Y kromozomları üzerinde ileri düzeyde genotiplenmeleri yapıldı, farklı tekniklerle (QF-PCR, otomatik karyotipleme gibi) elde edilen sonuçlarla korele edildi.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Prenatal Tanı**

Prenatal tanının başlangıcı 1966 yılında Steele ve Breg'in üretilmiş amniyotik sıvı hücrelerinde fetusun kromozom yapısının saptanabileceğini rapor etmesiyle olmuştur. Gelişen tıp ile doğumdan önce fetus hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu sayede fetusa ait hastalıklar, doğumdan önce öğrenilebilmekte ve önlem alınması mümkün olabilmektedir. Bu doğrultuda prenatal tanıyı koyabilmek kadın doğum, ultrasonografi (USG), klinik genetik ve laboratuvar işbirliği ile gerçekleşmektedir (Thompson&Thompson, 2006).

Prenatal tanının amacı sadece anormallikleri fetal hayatta saptamak ve bulunduğu gebeliğin sonlandırılmasına imkan tanımak değildir. Kullanılan yöntemleri, gebeliğin sonlandırılması için bir araç olarak değil de fetusun durumu hakkında aileye doğru bilgi vermek ve aileye kendi kararlarını kişisel, sosyal, etik ilkeler çerçevesinde vermelerini sağlamaktır (Yararbaş 2006). Çiftlerin durumları hakkında genetik riskleri değerlendirerek ve aileleri doğru genetik danışmanlık vererek onları bilgilendirmektir. Bu doğrultuda prenatal tanının gerçek hedeflerini şöyle sıralayabiliriz.

1. Hastalıklı çocuk sahibi olma riski taşıyan çiftlere bilgi vermek. Endişelerini gidermek. Onları psikolojik olarak hazırlamak ve doğru yönlendirmek. Doğum sonrası bakıma hazırlamaya yardımcı olmak.
2. Çiftlere prenatal tanı sayesinde sağlıklı çocuk sahibi olabilme imkanı vermek.
3. Fetusun prenatal tedavisine olanak sağlamak. Bu şu an zor da olsa konjenital anomaliler için mümkündür.

#### **2.1.1. Prenatal Tanı Endikasyonları**

Bugüne kadar prenatal tanının temel endikasyonları arasında ileri anne yaşı gelmektedir. İleri anne yaşının riske sebep olduğu asıl durum Down sendromudur. Temel prenatal tanı endikasyonları aşağıdaki gibidir (Thompson&Thompson, 2006).

##### **2.1.1.1. İleri Anne Yaşı**

İleri anne yaşı, prenatal tanı merkezlerine göre değişkenlik gösteren bir durum olsada genellikle doğumda bu yaş 35 olarak kabul edilir. Kromozom anomalili fetus riski ile amniyosentez işlemine bağlı düşük riskinin neredeyse birbirine eşit olması,

ileri anne yaşı olarak 35 yaşın belirlenmesine neden olmuştur (Tablo 1), (Thompson&Thompson, 2006).

**Tablo 1.** Anne yaşına bağlı olarak canlı doğum ve fetuslarda Down sendromu insidansı (Thompson&Thompson, 2006)

Anne yaşı	İnsidans		
	Doğumda	Amniyosentezde (16. Hafta)	CVS (9.-11. Hafta)
15-19	1/1250	–	–
20-24	1/1400	–	–
25-29	1/1100	–	–
30	1/900	–	–
31	1/900	–	–
32	1/750	–	–
33	1/625	1/420	1/370
34	1/500	1/333	1/250
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/80
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
45 ve üzeri	1/25	1/20	1/15

\*Veriler Hsu (1996) ile Gardner ve Sutherland'dan (1996) alınmıştır. Rakamlar yaklaşıktır.

### 2.1.1.2. Önceden De Novo Kromozom Anomalili Çocuk Varlığı

Kromozom anomalili çocuk sahibi olan çiftlerin kendi kromozom yapıları normal olmasına rağmen, bazı durumlarda sonraki çocukta kromozom anomalisi görülmesi bakımından riskli bir durumdur (Thompson&Thompson, 2006). Yani önceden kalıtsal olmayan bir durumun çocuklarda görülmesi durumudur.

### 2.1.1.3. Ebeveynlerden Birinde Yapısal Kromozom Anomalisi Varlığı

Bu durumda çocukta kromozom anomalisi riski, anomalinin tipine ve taşıyıcı ebeveynin kim olduğuna göre değişir (Thompson&Thompson, 2006).

#### 2.1.1.4. Aile Hikayesinde Biyokimyasal veya DNA Analizi ile Tanı Konulabilen Genetik Hastalık Varlığı

Bu gruptaki hastalıkların çoğu tek gen hastalıkları olup %25 veya %50 tekrarlama riski vardır. DNA analiz yöntemiyle prenatal tanı yapılabilen tek gen hastalıklarının örnekleri Tablo 2’de verilmiştir (Thompson&Thompson, 2006).

**Tablo 2.** DNA analizi ile prenatal tanısı yapılabilen bazı tek gen hastalıkları (Thompson&Thompson, 2006)

Hastalık	Kalıtım Şekli
Akondroplazi	OD
Otozomal dominant böbrek hastalığı	OD
Huntington hastalığı	OD
Miyotonik distrofi	OD
Nörofibromatozis, tip 1	OD
Retinoblastom	OD
Kistik fibrozis	OR
Konjenital adrenal hiperplazi	OR
Friedreich ataksisi	OR
Fenilketonuri	OR
Orak hücreli anemi	OR
Spinal muskuler atrofi	OR
Tay Sachs hastalığı	OR
$\alpha$ ve $\beta$ talasemi	OR
Duchenne ve Becker muskuler distrofi	X’e bağlı
Frajil-X sendromu	X’e bağlı
Hemofili A ve B	X’e bağlı
Ornitin transkarbamilaz eksikliği	X’e bağlı

\*OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif

#### 2.1.1.5. Nöral Tüp Defekti Riski

İnsandaki nöral tüp adı verilen yapı, döllenmenin 2. ile 3. haftasında gelişimini tamamlayan ve beyin dokusundan başlayıp omuriliğide içine alacak şekilde aşağıya doğru uzanan bir yapıdır. Gelişiminde meydana gelen herhangi bir sorun bu yapının açık kalmasına neden olur ve bu durum nöral tüp defekti (NTD) şeklinde adlandırılır (<http://www.gebelik.org/dosyalar/anomaliler/ntd.html>, Erişim tarihi: 08.07.2015). Nöral tüp defektli kişilerin birinci derece akrabaları, artmış NTD’li bebek doğurma riskine sahiptirler (Thompson&Thompson, 2006).

#### 2.1.1.6. Anne Serumunda Tarama ve Ultrasonografi

Düşük riskli gebeliklerde anne serumu taraması veya fetal USG ile fetal anomaliler saptandığında, daha ileri genetik değerlendirme ve testler önerilmektedir.

### 2.1.2. Prenatal Tanı Metodları

Prenatal tanı metodlarını invaziv testler ve invaziv olmayan testler şeklinde ayırabiliriz (Tablo 3).

**Tablo 3.** Prenatal tanı için kullanılan invaziv ve invaziv olmayan testler

<b>İnvaziv Testler</b>	<b>İnvaziv Olmayan Testler</b>
Aminiyosentez	Anne serumunda alfa-fetoprotein
Koryonik villus örnekleme	Anne serum taraması
Kordosentez	Ultrasonografi
Preimplantasyon genetik tanı	Maternal kandaki fetal hücreler

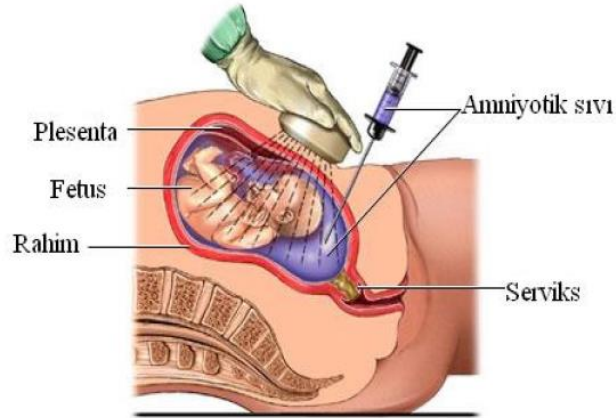
#### 2.1.2.1. İnvaziv Testler

Fetus ve eklerine yapılan doğrudan müdahale teknikleridir. Cildin bütünlüğünü bozduğu için bu tür girişimlerin hepsi invaziv şeklinde adlandırılır.

Günümüzde prenatal tanı sürecinin temel dezavantajlarından biri fetal örneklemelede girişimsel yöntemlerin kullanılmasına bağlı fetal kayıplar olabilmektedir (Harteveld 2009). Girişimsel testleri aşağıda verildiği gibi sıralayabiliriz. Bunlardan amniyosentez ve CVS en yaygın uygulanan doğum öncesi tanı yöntemleridir (Uğurlu 2007).

##### 2.1.2.1.1. Amniyosentez

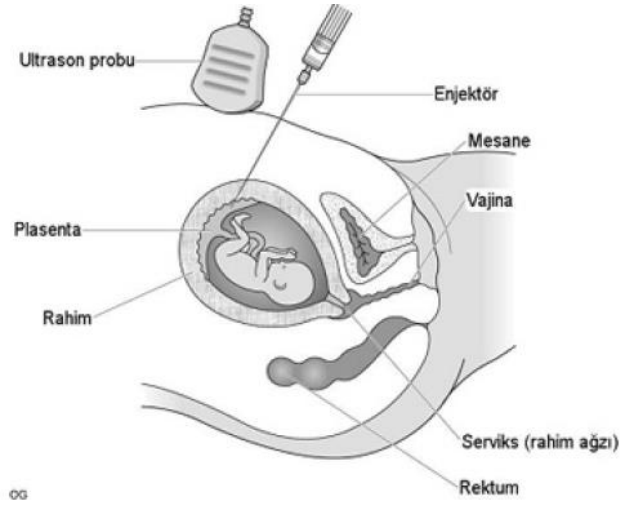
Amniyotik sıvı örneğinin enjektör yardımıyla transabdominal olarak alınması işlemidir (Şekil 1). Bu sıvı içerdiği fetus kökenli hücreler sayesinde tanısal testlerde kullanılabilir (Thompson&Thompson, 2006). Bu sıvı bebeğin doğmadan önceki yaşam ortamıdır ve tüm salgıları bu ortamdadır (Yararbaş 2006). Amniyosentez gebeliğin 15.-16. haftasında uygulanır.



**Şekil 1.** Amniyosentez işleminin yapılışı

### 2.1.2.1.2. Koryonik Villus Örneklemesi

CVS gebeliğin 10.-12. haftalarında transservikal ve transabdominal yolla koryon villuslardan biyopsi alınması işlemidir (Şekil 2). En önemli avantajı gebeliğin daha erken dönemlerinde elde edilebilmesidir. Kromozom analizindeki başarı oranı amniyosentezdeki gibidir (%90'dan yüksek). Ancak sonuçların %2'sinde kromozomal mozaikliğe bağlı belirsizlik vardır. Yöntemin dezavantajı amniyosenteze göre daha zor bir işlem olması, elde edilen hücrelerin doğrudan fetal hücreler olmaması ve sitogenetik incelemede yalancı mozaizm gibi durumların sık olmasıdır (Dündar Yenilmez 2010). Bu durumda, bebekte bir kromozom anomalisi olup olmadığını göstermek için amniyosentez ile kontrol önerilmektedir.

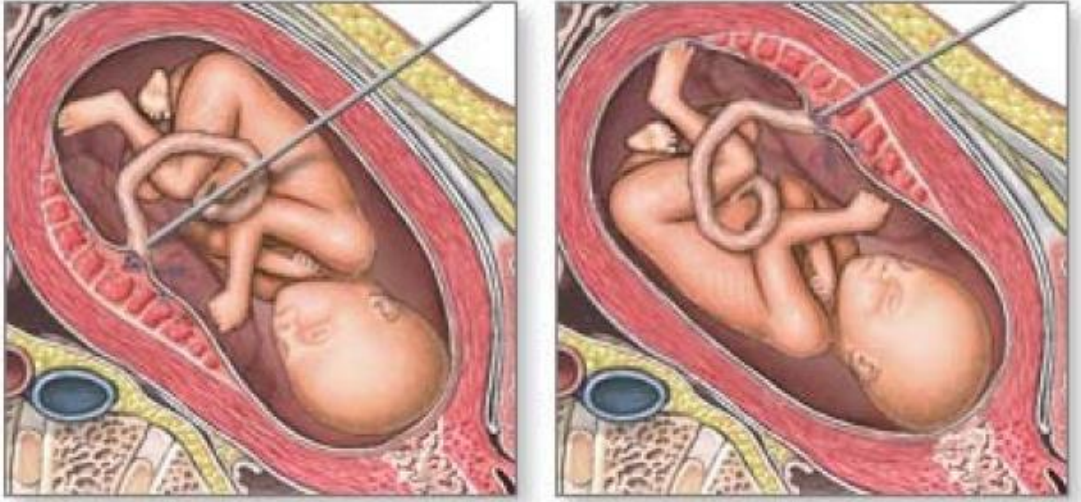


Şekil 2. Koryonik villus örnekleme işlemi

### 2.1.2.1.3. Kordosentez

Fetal kan örneğinin USG rehberliğinde doğrudan umbilikal kordondan alınması işlemidir (Şekil 3). Gebeliğin 19.-21. haftalarında yapılır ve işleme bağlı fetal kayıp oranı %2-3'tür. Kordosentez, fetal anomali saptanan bir USG tetkiki nedeniyle yapılan amniyosentezde kültür üremesi elde edilmediği veya çelişkili sonuçlar alındığında, ya da DNA yöntemi ile tanı konulamayan ancak tanı için fetal plazma veya kanda biyokimyasal testlerin yapılması gereken hastalıklar söz konusu olduğu zaman yapılır (Thompson&Thompson, 2006). Geç dönemde uygulanması bir dezavantaj olmasına rağmen özellikle gecikmiş olgularda tercih edilebilmektedir (Dündar Yenilmez 2010).





**Şekil 3.** Plasentanın değişik yerleşimlerine göre kordonsentez uygulaması. Solda posteriyor plasenta, sağda anterior plasenta görülmekte

#### **2.1.2.1.4. Preimplantasyon Genetik Tanı**

Preimplantasyon genetik tanı (PGT), tüp bebek uygulaması sırasında embriyoların genetik testi yapıldıktan sonra yalnızca sağlıklı olanların seçilip anneye transfer edilmesi işlemidir. Embriyodan alınan hücrelerle, doğacak bebeğin sayısal ya da yapısal bozuklukları ve tek gen hastalığı adı verilen talasemi, orak hücreli anemi, kistik fibrozis gibi problemlerin tanısı yapılabilmektedir. Böylelikle sağlıklı bebeklerin oluşması sağlanabilmektedir.

#### **PGT Kimlere Yapılmalıdır?**

1. 36 yaş ve üzeri yaştaki anne adaylarına
2. İki veya daha çok tüp bebek uygulanmasına rağmen gebelik elde edilememiş çiftlere
3. Tekrarlayan erken gebelik kayıpları olan çiftlere
4. Dengeli translokasyon taşıyıcısı çiftlere
5. Ailevi Akdeniz anemisi, Orak Hücre Anemisi, Kistik fibrozis, Spinal müsküler atrofi (SMA) gibi tanısı mümkün olan bazı tek gen hastalıkları yönünden risk taşıyan eşlere
6. Önceki gebeliklerinden genetik hastalıklı bir çocuk sahibi olan çiftlere
7. Anöploidili (kromozom bozukluğu bulunan) gebelik öyküsü olan annelere
8. Gonadal mozaisizm (iki ya da daha çok aynı anormalliğe sahip doğum ürününe rağmen eşlerin genetik test sonuçlarının normal olması) olgularına

## 9. Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) olguları

(<http://www.jinekolognet.com/preimplantasyon-genetik-tani.asp>, Erişim tarihi: 07.07.2015).

### 2.1.2.2. İnvaziv Olmayan Testler

Tıbbi girişimlerde kişinin hiçbir organı olumsuz etkilenmeden yapılan testlere denir.

#### 2.1.2.2.1. Anne Serumunda Alfa-Fetoprotein Ölçümü

Fetusta NTD olduğunda, amniyotik sıvıda olduğu gibi anne serumunda da, Alfa-Fetoprotein (AFP) düzeyi normale göre daha yüksektir. 16. gebelik haftasında yapılmaktadır. NTD'li bebeklerin %95'i, daha önceden benzer bir hikayenin olmadığı ailelerin bebeği olarak doğduğundan, gerektiğinde daha özgün testlerle desteklenebilecek nispeten basit bir yöntemdir (Thompson&Thompson, 2006).

#### 2.1.2.2.2. Anne Serumu Taraması (Üçlü Tarama)

Anne serumu taraması (AST) yani üçlü tarama testi kandaki üç belirleyiciyi ölçer. Down sendromu, Trizomi 18 ve NTD bakımından artmış riskli gebelikleri saptamak için 15.-20. gebelik haftasında yapılmaktadır. Taramada ölçülen üç serum bileşeni AFP, ankonjuge östriol (uE<sub>3</sub>) ve insan koryonik gonadotropinidir (HCG). Bu ölçümler tanısal test değil bir tarama testidir. Amaç anne ve bebek için oluşabilecek riski saptayabilmektir (Thompson&Thompson, 2006).

#### 2.1.2.2.3. Ultrasonografi

Fetusun değerlendirilmesi ve yapısal anomalilerin saptanması için önemlidir. Geleneksel yöntem olan transabdominal USG gebelik yaşının belirlenmesi, ilk trimesterde anensefali ve kistik higroma gibi anomalilerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Thompson&Thompson, 2006).

Bugüne kadar prenatal tanı yöntemleri arasında bilinen bir zararının olmaması, fetal risk ve anne rahatlığı içinde uygun olması açısından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Uğurlu 2007).

**Kromozomal anöplidilerin saptanması için prenatal USG:** Tabloda USG ile saptanabilen izole veya çoklu anomalileri olan bebeklerin kromozom bozukluklarının sıklığı verilmektedir (Tablo 4). Fetal anöplidi riskini değerlendirmek için diğer bir ölçüm, boyun omurgaları üzerindeki yumuşak doku ile cilt arasındaki mesafenin ölçüldüğü nukal kalınlıktır (NT).

**Tablo 4.** Sonografik olarak tespit edilen seçilmiş izole ve çoklu anomalileri olan fetusların fetal kromozom anomalisi prevalansı (Thompson&Thompson, 2006)

<b>Kromozom anomalileri %</b>	<b>İzole bulgu</b>	<b>Multiple bulgu</b>
Ventrikülomegali	2	17
Koroid pleksus kisti	1	48
Kistik higroma	52	71
Nukal ödem	19	45
Diafram hernisi	2	49
Kalp defektleri	16	66
Duodenal atrezi	38	64
Ekzomfalos	8	46
Böbrek anomalileri	3	24

Sık görülen bu ultrason anomalileri en fazla Trizomi 21, Trizomi 18, Trizomi 13 veya 45, X ile ilişkili olmakla birlikte herhangi bir kromozom anomalisi ile de ilişkili olabilir (Snijders 1966).

#### **2.1.2.2.4. Maternal Kandaki Fetal Hücreler**

1969 yılında anne dolaşımında çok az miktarda fetal hücre bulunduğu gösterilmiştir. Bu, bazı tek gen hastalıkları ve prenatal tanı amacıyla anne kanında bulunan fetal hücrelerin invaziv olmayan bir yöntem olarak kullanılmasına yol açmıştır. Anne dolaşımındaki fetal hücrelerin pek çok anöploidide arttığı ve bu tip gebeliklerin saptanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Thompson&Thompson, 2006).

#### **2.2. Kromozom Anomalileri**

Sayısal veya yapısal olmakla birlikte, otozom veya cinsiyet kromozomu kaynaklı anomalilerdir.

Amniyosentez üzerinde yapılan bir araştırmaya göre en sık gözlenen kromozom anomalileri arasında Trizomi 21 yer almaktadır. Bunu Trizomi 18 ve Trizomi 13 izlemektedir (Yüce 2006). Dede ve arkadaşlarının amniyon sıvısı üzerinde yapmış olduğu bir araştırma sonucunda ise; ileri anne yaşı ( $\geq 35$ ) endikasyonu ile yapılan amniyosentez işlemi sonrasında 1129 örneğin 46 tanesinde kromozom anomalisi saptanmış olup bunların 10 tanesi Trizomi 21, 15 tanesi ise diğer trizomilerdir (Trizomi 18 ve Trizomi 13). 5 örnekte sex kromozom anomalileri ve 16 tanesinde ise dengesiz translokasyon, inversiyon, marker kromozom ve variant olarak tanımlanan anomaliler saptanmıştır (Dede 2013) (Tablo 5).

**Tablo 5.** Amniyosentezle elde edilen anomalilerin görülme sıklığı

<b>Saptanan anomaliler</b>	<b>Anomali görülme sıklığı (n/%)</b> <b>n:46 (%4,07)</b>
Trizomi 21	10 (%0,88)
Diğer trizomiler (Trizomi 18 ve Trizomi 13)	15 (%1,33)
Sex anomalileri	5 (%0,44)
Diğer	16 (%1,42)
Toplamda çalışılan örnek n:1129	

\*Değerler yaklaşıktır.

Düşük materyallerinde en sık görülen kromozom anomalileri ise en başta otozomal trizomileri olmak üzere monozomi X, triploidi ve tetraploidi şeklinde sıralanabilir (Cunningham 2005). Yapılan başka bir araştırmaya göre, abortuslarda gözlenen kromozomal anomalilerin %90'dan fazlasının anöploidi ve poliploidi gibi sayısal anomalilerden oluştuğu; geri kalanının ise translokasyon ve inversiyon gibi yapısal anomaliler ve mozaisizmden oluştuğu saptanmıştır (Philipp 2003, Ward 2000). 84 adet abortus materyali üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; 56'sı normal, 24'ü anomalili, 2 tanesi mozaik ve 2 tanesinde polimorfizm görülmüştür. 24 tane anormal olan örneğin %96'sı sayısal, %4'ü yapısal anomalili olarak tespit edilmiştir. Sayısal anomaliler içinde en sık görülen anöploidi Trizomi 16 olarak görülmüştür. Daha sonra bunu diğer trizomilerin izlediği belirtilmiştir (2, 4, 8, 10, 12, 13, 14, 15 ve 21 kromozomlarına ait trizomiler). Bir örnekte ise double trizomi gözlenmiştir (8 ve 21 kromozomlarının trizomisi) (Kaya 2015). Aşağıdaki tabloda anomalilerin görülme sıklıkları verilmiştir (Tablo 6).

**Tablo 6.** Spontan abortuslarda sayısal anomalilerin görülme sıklıkları (Kaya 2015)

<b>Görülen anöploidiler</b>	<b>Anöploidi dağılımı (%)</b>
Monozomi X	%26
X kromozomal anöploidi	%5,3
Trizomi 16	%16
Diğer trizomiler	%47,4
Double trizomi (8 ve 21 kromozomları)	%5,3

### **Mozaisizm**

Kromozom bozukluğu genelde kişinin her hücresinde olur fakat bir kişide farklı genetik materyal içeren iki ya da daha fazla hücre grubu varlığı olursa mozaisizm ortaya çıkar. Mozaisizm yapısal veya sayısal olabilir.

### **Uniparental Dizomi**

Bir çiftteki kromozomun iki üyesinin tümünün veya bir parçasının anne ya da babadan sadece birinden kalıtıldığı bir dizomik hücre dizisinin varlığıdır. Eğer kromozomun tamamen aynısı bir çiftin iki eşi olarak bulunursa bu durum izodizomi şeklinde adlandırılır. Bir ebeveyndeki iki homolog da kalıtılmışsa buna heterodizomi denir.

### **Polimorfizm**

Popülasyonun %1'i veya daha fazlasında bulunan genetik bir varyasyondur. Çeşitli şekillerde polimorfizm bulunmaktadır:

1. [Tek nükleotit polimorfizmi](#) (SNP)
2. Değişken sayılı bitişik tekrar (VNTR)
  - a. Minisatellitler (20-200 baz çifti tekrarları)
  - b. Mikrosatellitler (CA tekrarları; 2-10 baz çifti tekrarlar)-STR (Yalçıntepe 2013)

#### **2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri**

Normal bir insanda olması gereken kromozom sayısı 46'dır. Bunun dışındaki kromozom sayısına heteroploid denir. Haploid kromozom sayısının (n) tam katlarına öploid, diğer kromozom sayılarına anöploid denir.

##### **2.2.1.1. Triploidi ve Tetraploidi**

Somatik hücrelerdeki normal sayı 2n olursa diploid, bunun dışında eğer bu sayı 3n ise triploidi, 4n ise tetraploidi şeklinde adlandırılır. Laboratuvarımızda yapılan QF-PCR yöntemi ile triploidi ve tetraploidi vakalarına rastlanmıştır. Tez çalışmamızda da bu vakalara yer verilmiş MLPA yöntemi ile anöploidi ve mikrodelesyon kitleri ile ayrı ayrı çalışmaları yapılmıştır.

##### **2.2.1.2. Anöploidi**

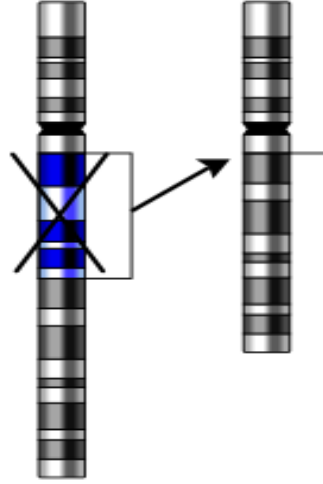
Anöploidi, insan kromozom bozuklukları arasında en sık görülen bozuklukları oluşturur. Kromozomun tek bir temsilcisi olması durumunda monozomi, kromozom çiftlerinin bir fazlası olması durumunda ise trizomi ortaya çıkar. Yaşamla bağdaşan trizomiler ise Trizomi 13, Trizomi 18, Trizomi 21 ve cinsiyet kromozomlarının trizomileridir. Monozomiler daima ölümcüldür fakat X kromozomunun monozomisi (Turner sendromu 45,X) yaşamla bağdaşır.

#### **2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri**

Kromozomun yapısal formunun değişmesiyle oluşan bozukluklardır.

##### **2.2.2.1. Delesyonlar**

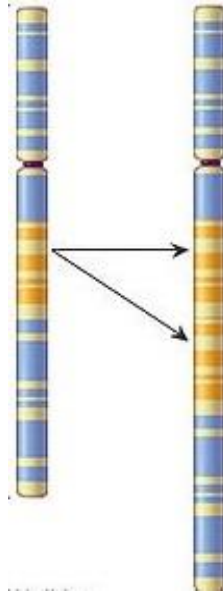
Kromozomun bir kısmının kaybindan kaynaklanan yapısal kromozom bozukluğudur (Şekil 4). Prenatal tanı sırasında birçok delesyon belirlenmiştir, fakat silinen kısımlarda kaybolan işlevsel genlerin bilgisi ve bunların fenotipik sonuçlarla ilişkisi günümüzde hala kısıtlıdır.



**Şekil 4.** Delesyon meydana gelen kromozomun görsel hali

#### 2.2.2.2. Duplikasyonlar

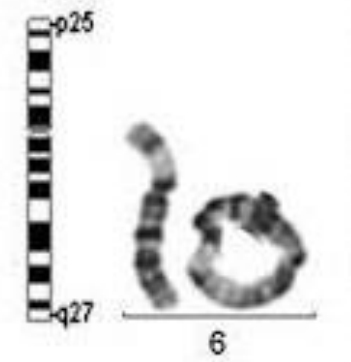
Bir kromozomun bir parçasının kendini eşlemesiyle ve fazla genetik materyal oluşturmasıyla sonuçlanan düzensizliklerdir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Bir kromozoma ait duplikasyon bölgesi

#### 2.2.2.3. Ring Kromozomlar

Bir kromozomda iki kırık oluşur ve dolayısıyla iki kırık uç halka oluşturacak şekilde birleşirse ring kromozomları oluşur (Şekil 6). Genetik materyal kaybı olmadan ya da olarak da gerçekleşebilir.



**Şekil 6.** Kromozom 6'ya ait ring kromozomu

#### 2.2.2.4. İzokromozomlar

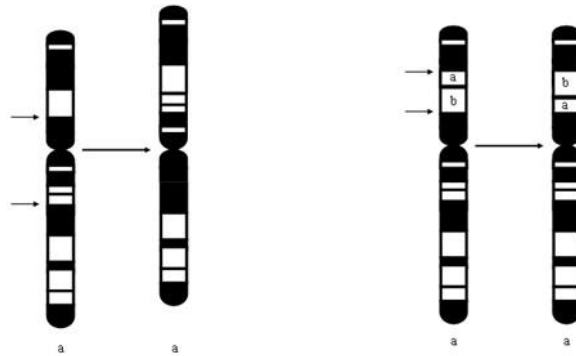
Kromozomun bir kolunun kaybolup, eksik kolunun duplike olması durumudur. Bu nedenle kişinin total genetik materyali içinde bir kolun parsiyel monozomisi, öteki kolun ise parsiyel trizomisi vardır.

#### 2.2.2.5. Disentrik Kromozomlar

Sentromeri bulunan iki kromozom parçasının (farklı ya da aynı kromozomda olabilir) sentromeri bulunmayan parçalarını kaybederek uç uca eklenmesiyle oluşan kromozom tipidir.

#### 2.2.2.6. İnversiyonlar

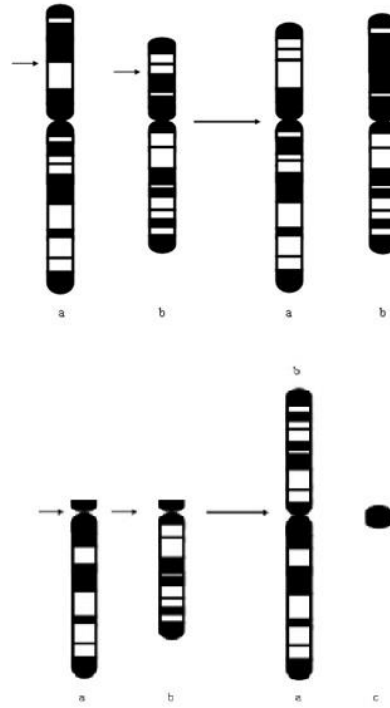
Tek bir kromozomda oluşan iki kırığın ters dönüp tekrar birleşmesiyle oluşan bozukluklardır. Eğer bu kırıklar sentromeri içeriyorsa perisentrik, sentromeri içermiyorsa parasentrik inversiyon denir (Şekil 7).



**Şekil 7.** Perisentrik inversiyon (solda) ve parasentrik inversiyon (sağda) görselleri

#### 2.2.2.7. Translokasyonlar

Homolog olmayan iki kromozom arasında kromozom parçalarının değişimine denir. Resiprokal translokasyon ve robertsonian translokasyon olmak üzere iki tipi vardır. Resiprokal translokasyon homolog olmayan kromozomlar arasında karşılıklı parça değişimleri olması halinde ortaya çıkar. Robertsonian translokasyon ise her iki kromozomun sentromere yakın olarak kopması sonucunda sentrik birleşme ile yeni bir kromozomun meydana gelmesi şeklinde ortaya çıkmasıyla meydana gelmektedir (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Translokasyon>, Erişim tarihi: 17.06.2015), (Şekil 8).



**Şekil 8.** Resiprokal translokasyon (üstte) ve robertsonian translokasyon (altta) görselleri

### 2.3. Laboratuvarımızda Prenatal Tanı için Uygulanan Yöntemler

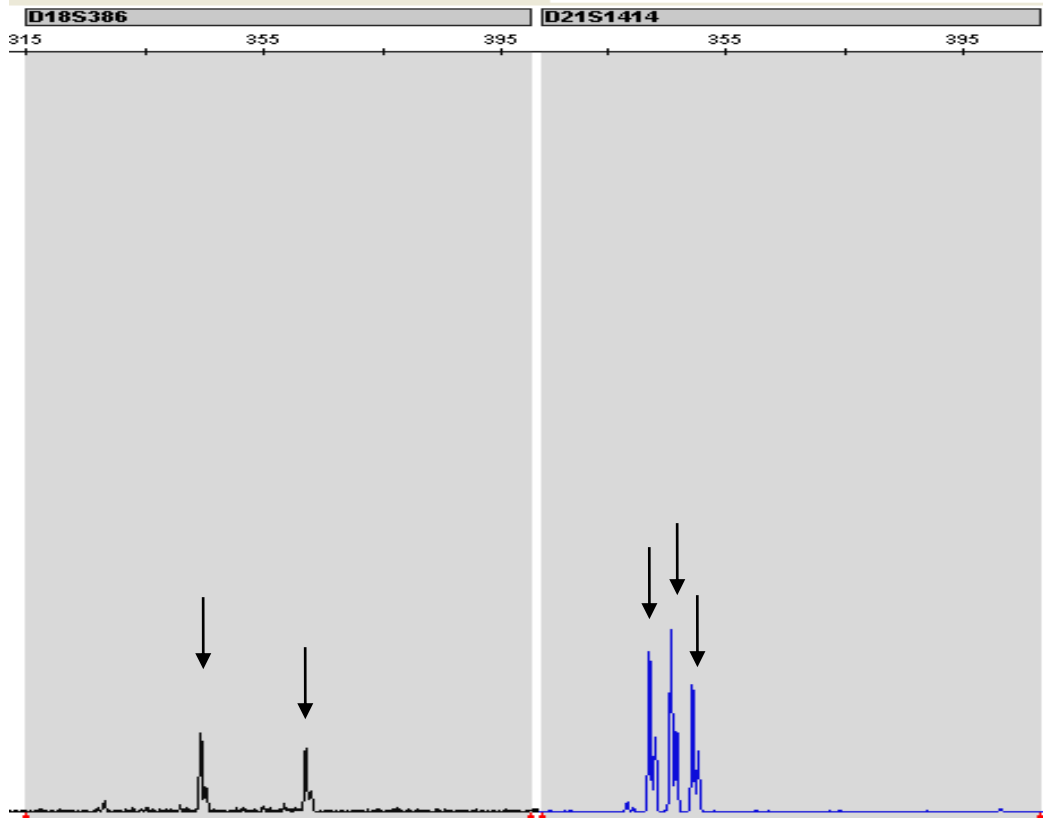
#### 2.3.1. Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR)

QF-PCR, seçilmiş bazı kromozomların fetal hücre kültürünü aşarak ve dolayısıyla hızlı bir şekilde tanı koymak için son zamanlarda sıkça kullanılan bir yöntemdir (Umberto 2004). 24-48 saatte sonuç verilir. Kromozoma özgü küçük DNA dizilerinin çoğaltılması ve kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilmesi esasına dayanır. Floresan primerler yoluyla, çoğaltılan kısımlar görüntülenebilir ve otomatik DNA tarayıcıda pik alanları olarak ölçülebilir. Prenatal dönemdeki 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait bozuklukların %90'a yakını saptayabilir. Çalışmanın temeli bu kromozomlara ait sayısal bozuklukların



saptanması, kromozomlar üzerindeki STR bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması ve kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. STR'lar 4 nükleotitik tekrarlardan oluşur ve sadece belirtilen kromozomlara özgüdürler (Yalçıntepe 2013).

Laboratuvarımızda prenatal tanı ile gelen çok sayıda hastaya QF-PCR yöntemi ile tanı konulmuştur. Aşağıdaki şekilde sayısal olarak kromozomal anomali saptanmayan bir görüntü ve Trizomi 21 saptanan bir görüntü verilmektedir (Şekil 9).

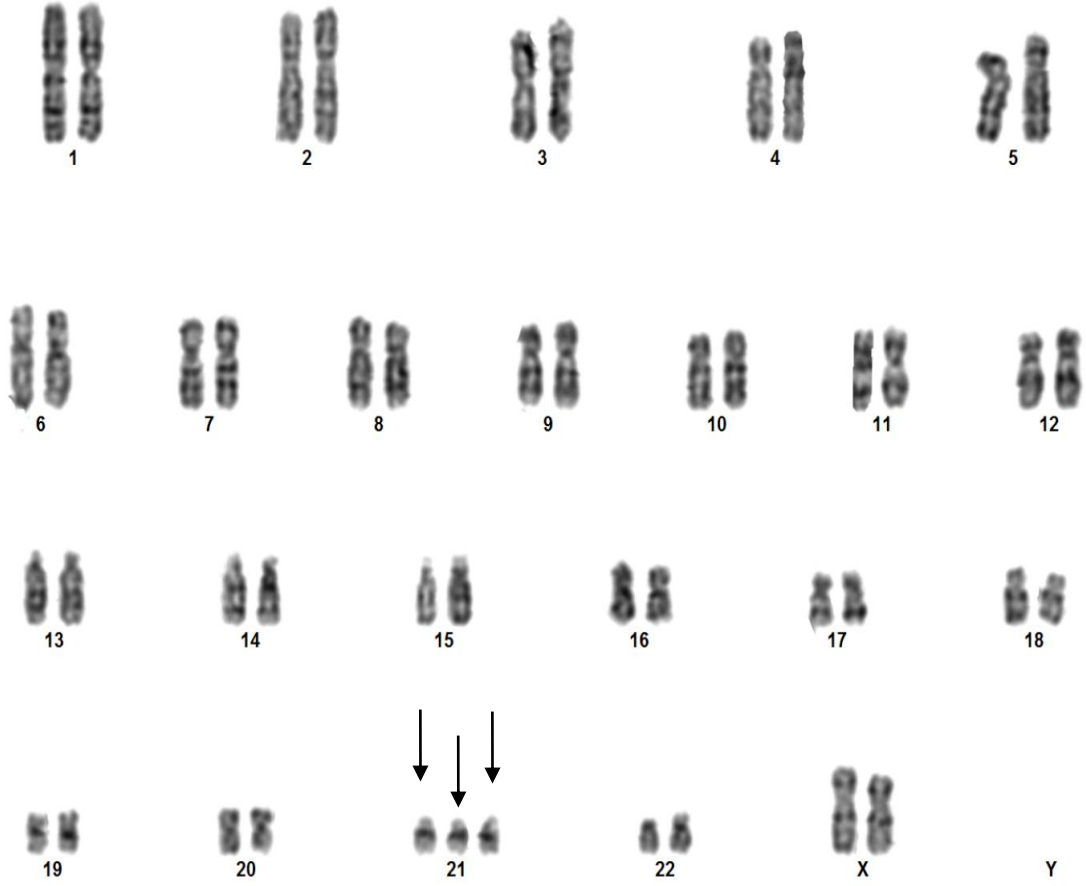


**Şekil 9.** Solda sayısal olarak normal olan 18. kromozoma ait 1:1 oranında piklerin bulunduğu görüntü, sağda Trizomi 21 tanısı konulan bir hastaya ait 3 adet pikin bulunduğu görüntü bulunmaktadır

### 2.3.2. Karyotipleme

Kromozomların belirli bir düzene göre sıralanarak sayı, şekil ve büyüklüklerine bakılarak sıralanması işlemidir. Bu sayede sayısal ve yapısal olarak bozukluklar tespit edilir. Fakat nokta mutasyonları, mikrodelsiyonlar ve insersiyonlar sonucu oluşan hastalıklar bu yöntemle belirlenemez. 14-21 gün gibi çok uzun sürede

sonuçların verilmesi de diğer bir dezavantajdır. Aşağıdaki şekilde laboratuvarımızda Trizomi 21 tanısı konulan bir hastanın görüntüsüne yer verilmektedir (Şekil 10).



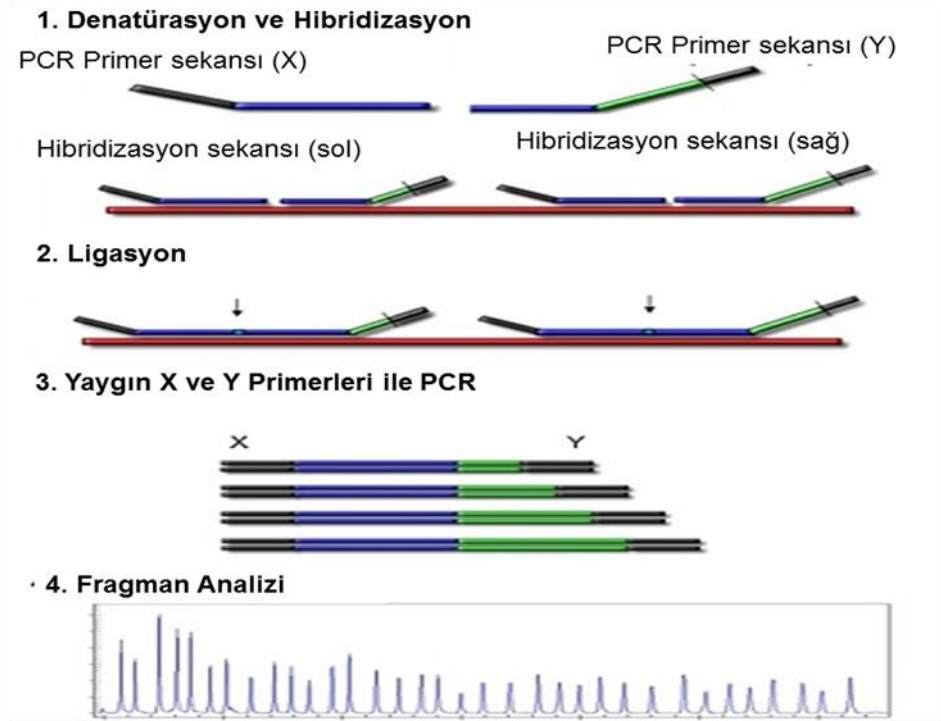
**Şekil 10.** Sitogenetik laboratuvarımızda Trizomi 21 tanısı konulan amniyon sıvısından elde edilen kültürün karyotip görüntüsü

### **3. MLPA (ÇOKLU LİGASYONLA PROB AMPLİFİKASYONU) TEKNİĞİ**

MLPA yöntemi ilk Schouten tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır. Bu yöntem sayesinde hedef gendeki birden fazla gen delesyonları ve duplikasyonları tek bir reaksiyonla tanımlanabilmektedir (Kozlowski 2008). Gen bölgesindeki tek veya her iki allelde meydana gelebilecek delesyonlar ve duplikasyonlar yüzünden oluşan gen miktarlarındaki artış ve azalışlar görüntülenebilmekte, hesaplanabilmektedir. MLPA yöntemi tek bir nükleotit değişikliği olan dizilerin ayrımını sağlayarak, 50 kadar farklı genomik DNA veya RNA (ribonükleik asit) dizisindeki normal olmayan kopya sayısının tespitini yapabilen multipleks bir PCR yöntemidir. Aynı anda 96 numuneyi 24 saat içinde sonuç alacak şekilde işleme tabi tutmak mümkündür. (MRC MS MLPA 2007). Yöntemin uygulanması kolay olup, ucuz bir yöntem olması da bu yöntemin gen düzeyindeki tanı laboratuvarlarında hızlı bir şekilde kabul edilmesini sağlamıştır (Gonzalez 2008), (Gouas 2008).

MLPA yöntemi; hedef DNA denatürasyonu ve problemlerin hibridizasyonu, ligasyon (bağlanma) reaksiyonu, PCR reaksiyonu, amplifiye ürünün elektroforez ile ayrıştırılması, verilerin analizi olmak üzere 5 basamakta gerçekleşmektedir. Temel olarak hedeflenen dizilerin değil, MLPA problemlerinin hedef diziyile hibridizasyonun çoğaltılmasıdır. Birinci basamakta DNA denatürasyonu gerçekleşir ve her biri PCR primer dizilerinden birini içeren iki farklı oligonükleotitten oluşan MLPA prob karışımı ile gece inkübasyonuna bırakılır. Bu iki prob tamamen komşu dizilere hibridize olur (Şekil 11-Adım 1). Eğer DNA'ların hedef dizisi üzerinde herhangi bir mutasyon varsa prob, ligasyonun olduğu uçta DNA üzerine hibridize olamayacaktır. Hibritleşme işlemi sonrasında ligasyon basamağı gelmektedir. Hibritleşmesi başarı ile gerçekleşen problemlerin ligasyonu gerçekleşecek, hibritleşmesi olmayan problemlerin ligasyonu gerçekleşemeyecektir. Ligasyon aşamasında sadece birbirine komşu hedeflere hibridize olmuş iki probun bağlanması gerçekleşir (Şekil 11-Adım 2). Üçüncü basamakta PCR reaksiyonu sırasında sadece bağlı problemler çoğaltılacağından prob bağlı ürünün sayısı, örnekteki hedef dizi sayısı için bir ölçü teşkil eder. PCR basamağında hedef DNA probdan uzaklaştırılır ve problemler uygun primerler yardımıyla amplifiye edilir. Bu aşamada hibritleşme ve ligasyon işlemleri başarısız olan problemler amplifiye edilmezler (Şekil 11-Adım 3). Dördüncü basamakta kapiller elektroforez kullanılarak çoğaltılmış ürünler ayrıştırılır (Şekil 11-Adım 4). Analiz

aşamasında ise çalışılan problardan elde edilen sinyallerin, kontrol grubundan elde edilen sinyallere oranına bakılmaktadır (Gouas 2008), (Kozlowski 2008).



**Şekil 11.** MLPA tekniğinin basamakları (MRC MS MLPA 2007)

MLPA probları 2 oligonükleotitten oluşur. Her bir oligonükleotit ise primer, uzunluğu belirli aralık (UBA) ve hedefe özgü dizilerden oluşmaktadır. Tüm MLPA problemlerinde aynı primer çifti kullanılabilir. Primerler ilgilenilen genomik DNA bölgesinde tümleyicisi bulunmayan dizilerden seçilirler ve genellikle 19-25 nükleotit (nt) uzunluğunda olurlar. UBA'ların kullanılma sebebi; bu yöntemde birden fazla hedef bölgenin incelenmesi için birden fazla prob kullanılacağından, bu problemlerin analiz sonucunda birbirlerine karışmasını engellemek ve dizi analizinde sinyallerin farklı yerlerde çıkış noktaları vermelerini sağlamaktır. Bu sayede her bir prob farklı nükleotit uzunluklarına sahip olur ve dolayısıyla dizi analizindeki sinyalleri farklı yerlerde çıkacaktır. UBA'ların uzunlukları 2-400 nt arasında olmakta ve analizi yapan cihazın kapasitesine bağlı olarak daha da arttırılabilmektedir. Ayrıca aynı uzunluğa sahip problemlerin dizi analizinde sinyallerinin karışmasını önlemek amacıyla primer çiftlerinin farklı renklerde işaretlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu sayede aynı uzunluğa sahip farklı renklerde sinyaller elde edilmektedir. Hedefe özgü

diziler ise ilgilenilen DNA bölgesi baz alınarak tasarlanan dizilerdir. Bu diziler ilgilenilen gen bölgesinin tümleyicisidir. İki oligonükleotitin ligasyonunu sağlamak için hedefe özgü dizi ile başlayan oligonükleotitin ucu fosfor ile işaretlenip ligasyonun sağlanması gerekmektedir. Hedefe özgü dizilerin uzunlukları bir oligonükleotitte 21-30 nt arasında, diğer oligonükleotitte ise 25-43 nt arasında olabilmektedir (Schouten 2002), (Dijk 2005).

Ligasyonlu problemlerin, DNA'dan denatüre edildikten sonra gen üzerinde dizisi bulunmayan primerler ile amplifikasyonu sağlanmaktadır. Kullanılan primerlerden birisi floresan işaretlidir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen problemlerden sinyal elde edilmesi işlemi ise kapiller elektroforezinde gerçekleşmektedir. Uzunlukları farklı olan problemler, kapiller elektroforezde farklı hızlarda yürürler ve farklı yerlerde sinyal verirler. Eğer herhangi bir sinyal elde edilemiyorsa hibritleşme ve ligasyon basamaklarında problemlerin amplifikasyonu sırasında kaynaklanan başarısızlıktan dolayıdır (Sellner 2004), (Dijk 2005).

## **4. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **4.1. Çalışma Şekli ve Materyal Temini**

Çalışmamız retrospektif bir çalışmadır. Çalışmamızda amniyon sıvısı ve düşük materyali kullanılmıştır. Materyaller Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik polikliniğine prenatal tanı amacıyla başvuran hastalardan temin edilmiştir. Çalışmanın tamamı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans tezimiz için 2014-2015 eğitim döneminde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır. Çalışma için öncelikle amniyon sıvısı ve düşük materyalinden DNA izolasyonu yapılmıştır. MLPA yöntemi ile anöploidi (P095) kiti kullanılarak 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal anomalilere bakılmıştır. Mikrodelesyon (P245) kiti kullanılarak mental retardasyona neden olan 23 farklı mikrodelesyon probu içeren gen bölgelerine ait mikrodelesyon/duplikasyon varlığına bakıldı.

#### **4.1.1. Hasta Seçimi**

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarına gelen amniyon sıvısı ve fetal materyallerden elde edilen DNA'lar -20°C'de saklanmıştır. Laboratuvarımızda prenatal tanı çalışmaları 2011 yıllarında başlamıştır. Örnekleri seçerken o yıllardan bugüne olan tüm anomali tespit edilmiş gruplar dahil edilmiştir. Normal çıkan grubu ise DNA kalitesinden dolayı ve kit kaybı olmaması için yakın tarihli gelen örnekler seçilmiştir. Normal olarak seçilen materyaller, QF-PCR ile normal sonuçlanan amniyon sıvılarından seçildi. Örneklerin temininden itibaren analiz edilmesine kadar olan tüm çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **4.1.2. Kullanılan Gereçler**

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 3130)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Vorteks

Derin dondurucu

Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (0,2 ml)

ABI 3130 yükleme tüpleri (ABI)

ABI 3130 36, 50 cm Kapiller (ABI)

### **4.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Probemix P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 (MRC-Holland, HOLLANDA)

Probemix P095-A3 Anöploidi (MRC-Holland, HOLLANDA)

SALSA MLPA Buffer (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase Buffer A (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase Buffer B (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase-65-Buffer enzim (MRC-Holland, HOLLANDA)

SALSA PCR-Primer Mix FAM (MRC-Holland, HOLLANDA)

SALSA Polimeraz (MRC-Holland, HOLLANDA)

PCR suyu

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Kelex: InstaGene Matrix (Markası: BIO-RAD)

Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

10 X TBE Buffer

## **4.2. Yöntemler**

### **4.2.1. Probemix P095-A3 Anöploidi**

Bu kit in vitro olarak 13, 18, 21, X kromozomlarının herbiri üzerinde bulunan sekiz DNA dizisi ile Y kromozomu üzerindeki dört dizinin DNA kopya sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Yani 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının her birindeki prenatal ve postnatal DNA örneklerindeki anöploidiyi belirler. Fakat normal 46,XX ve triploid 69,XXX kadını ayırt edemez. Probemix P095 Anöploidi kiti 136 ve 454 nts (pik boyu uzunluğu) arasında amplifikasyon ürünü olan 36 MLPA probu içerir. 64 ve 105 nts arasında olan dört tane pik DNA fragmentini vermektedir ve bu Q-fragmenti diye adlandırılır. 3 adet denatürasyon fragmenti vardır bunlar D-fragmenti olarak belirtilir (Tablo 7). Normal sonuç ile trizomi sonucunu ayırt etmede kullanılan 1,30 cut-off değeri mozaik örneklerin tespit edilmesine olanak vermez. Örneğin; % 30 Trizomi 21 hücreli mozaik örnekte tüm kromozom 21'e özgü problemlerin oranı 1,10 ve 1,20 arasında olabilir. Deney iyi bir performans ile yapıldığı zaman Coffalyser MLPA analiz programı böyle mozaik örnekleri tespit edebilir.

**Tablo 7.** SALSA MLPA Probemix P095 Anöploidi pik uzunlukları ve kromozomdaki yerleri

<b>Pik uzunluğu (nt)</b>	<b>Kromozomal yeri</b>
64-70-76-82	Q-fragment: DNA kalitesi
88-92-96	D-fragment: Denatürasyon fragmenti
100	X fragmenti
105	Y fragmenti
148	13q32.1
178	13q13.3
220	13q14.2
400	13q14.2
265	13q21.33
310	13q34
445	13q34
355	13q13.1
142	18q21.2
172	18q21.32
211	18q11.2
391	18q11.2
255	18q23
301	18p11.32
346	18q21.33
436	18p11.21
136 ±	21q22.13
166	21q21.1
202	21q21.1
247	21q11.2
291	21q22.11
427	21q22.11
337	21q21.3
382	21q22.3
154 ±	Xq12
184*	Xq23
229	Xp21.3
274*	Xp11.4
319	Xq28
364	Xp22.12
409	Xq26.1
454	Xp21.2
160	Yp11.31
193	Yp11.31
240	Yq11.221
283	Yp11.31

\* 184 nt ve 274 nt problemlerinin değişken olması hakkında birkaç rapor vardır. Her ikisinde bir bölgede hibridize olur ve sağlıklı bireylerde kopya sayısı varyasyonu tanımlanmıştır.



#### 4.2.2. Probemix P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1

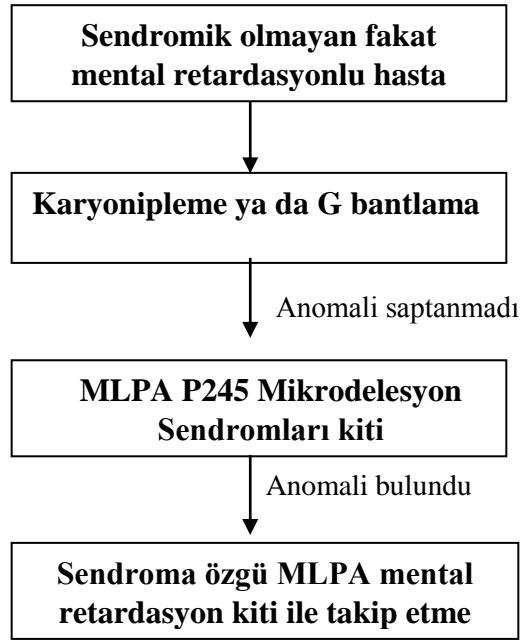
Kit 130 ile 499 nt arasında amplifikasyon ürünü içeren 50 MLPA probu barındırır. Ek olarak 120 nt'den küçük amplifikasyon ürünü üreten 10 kontrol fargmenti içerir (Tablo 9). Mental retardasyona neden olan 23 farklı mikrodelesyon sendromuna ait prob içerir ve bunlar mikrodelesyon sendromları birincil tarama için de kullanılabilir (Tablo 8). P245 Probemix her bir özel kromozom bölgesi için problemler arasında sınırlı sayıda ve bu nedenle sendromların olası nedenlerini belirleyemez. P245 Probemix aşağıda adı geçen DNA örneğindeki kromozom bölgelerindeki bir ya da daha fazla mikrodelesyon\duplikasyonu belirlemek için dizayn edilmiştir (Tablo 9). Deney koşullarındaki küçük değişiklikler ve örneğin saflığı bazı prob sinyalleri için daha duyarlı olabilir.

Sık mikrodelesyon sendromları P245 Mikrodelesyon Sendromları-1 Probemix ile tespit edilebilir ama çok nadir interstisyel delesyonlar tespit edilemeyecektir.

**Tablo 8.** SALSA MLPA P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 Probemix ile tespiti yapılabilen sendromlar

1p36 delesyon sendromu	DiGeorge bölge 2, 10p14
2p16 mikrodelesyonu	Langer-Giedion sendromu, 8q
2q23 mikrodelesyonu / MBD5	Miller-Dieker sendromu, 17p
2q33 mikrodelesyonu / SATB2	NF1 mikrodelesyon sendromu
3q29 mikrodelesyonu	Prader-Willi / Angelman
9q22.3 mikrodelesyonu	MECP2 / Xq28 duplikasyonu
15q24 delesyon sendromu	Rubinstein-Taybi sendromu
17q21 mikrodelesyonu	Smith-Magenis sendromu
22q13 / Phelan-McDermid	Sotos sendromu 5q35.3
Cri du Chat sendromu, 5p15	Williams sendromu
DiGeorge sendromu 22q11	Wolf-Hirschhorn 4p16.3
Distal 22q11 bölgesi	

Bazı durumlarda sendromik olmayan fakat mental retardasyonlu hastalarla ilgili kararsızlıklar yaşanabilmektedir. Bu gibi durumlarda genellikle önce karyotipleme ve G-bantlama yapılır. Eğer sonuç normal ise MLPA P245 Mikrodelesyon kiti ile çalışma yapılır. Çıkan sonuçta anomali tespit edilirse bunu spesifik sendromlar için tasarlanmış MLPA Mental retardasyon kitleri ile çalışma takip edecektir (Şekil 12).



**Şekil 12.** Sendromik özellikleri eksik olan mental retardasyonlu hastalarda izlenecek yol

**Tablo 9.** SALSA MLPA P245-B1 Mikrodelesyon-1 Probemix kromozomların lokalizasyonları, kullanılan probler ve klinik olarak tanımları (sendromlar)

Kromozomal yeri	Sendrom	SALSA MLPA prob	Pik uzunluğu (nt)
1p36.33	1p36 delesyon sendromu	TNFRSF4	130 ±
1p36.33	1p36 delesyon sendromu	GABRD	160 ± ¥
1p36.33	1p36 delesyon sendromu	GNB1	178 ¥
2q16.1	2q16.1 mikrodelesyon sendromu	REL	226*
2p16.1	2p16.1 mikrodelesyon sendromu	PEX13	499*
2q23.1	2q23.1 mikrodelesyon sendromu	MBD5	214*
2q23.1	2q23.1 mikrodelesyon sendromu	MBD5	411*
2q33.1	2q33.1 mikrodelesyon sendromu	SATB2	391*
2q33.1	2q33.1 mikrodelesyon sendromu	SATB2	485 *±
3q29	3q29 mikrodelesyon sendromu	DLG1	355
3q29	3q29 mikrodelesyon sendromu	DLG1	422 ± ¥
4q16.3	Wolf-Hirschhorn sendromu	LETM1	232 ±
4p16.3	Wolf-Hirschhorn sendromu	WHSC1	454*
5p15.31	Cri du Chat sendromu	SEMA5A	283*
5p15.33	Cri du Chat sendromu	TERT	445 ¥
5q35.3	Sotos sendromu	NSD1	154 ¥
5q35.3	Sotos sendromu	NSD1	462 ¥
7q11.23	Williams-Beuren sendromu	ELN	315*
7q11.23	Williams-Beuren sendromu	ELN	364
8q23.3	Langer-Giedion sendromu	TRPS1	401 ±
8q24.11	Langer-Giedion sendromu	EXT1	429*
9q22.32	9q22.3 mikrodelesyon sendromu	PTCH1	323*
9q22.32	9q22.3 mikrodelesyon sendromu	FANCC	436*
10p14	DiGeorge region 2 (10p)	GATA3	136
15q11.2	Prader-Willi-Angelman sendromu	UBE3A	166*
15q11.2	Prader-Willi-Angelman sendromu	SNRPN	244*
15q11.2	Prader-Willi-Angelman sendromu	SNRPN	300 ¥
15q24	15q24 mikrodelesyon sendromu	SEMA7A	190*
15q24.1	15q24 mikrodelesyon sendromu	CYP1A1	331 ¥
16p13.3	Rubinstein-Taybi gen	CREBBP	172 ±
17q11.2	NF1 mikrodelesyon sendromu	NF1	260*
17q11.2	NF1 mikrodelesyon sendromu	NF1	339*
17p11.2	Smith-Magenis sendromu	LRRC48	278 ¥
17p11.2	Smith-Magenis sendromu	LLGL1	307 ± ¥
17p11.2	Smith-Magenis sendromu	RAI1	471*
17p13.3	Miller-Dieker sendromu	PAFAH1B1	142
17p13.3	Miller-Dieker sendromu / lizensefali	PAFAH1B1	238
17q21.31	17q21.31 mikrodelesyon sendromu	MAPT	272*
17q21.31	17q21.31 mikrodelesyon sendromu	KANSL1	346*
22q11.21	DiGeorge sendromu	CLDN5	196
22q11.21	DiGeorge sendromu	GP1BB	208 ± ¥
22q11.21	DiGeorge sendromu	SNAP29	373*
22q11.21	Distal 22q11 sendromu	PPIL2	220*
22q11.22	Distal 22q11 sendromu	RTDR1	265* ±
22q13.33	Phelan-McDermid sendromu	SHANK3	252*±
22q13.33	Phelan- McDermid sendromu	RABL2B	382*
Xq28	RETT sendromu / Xq28 duplikasyonu	MECP2	148 ¥
Xq28	RETT sendromu, Xq28 duplikasyonu	MECP2	184*
Xq28	RETT sendromu, Xq28 duplikasyonu	MECP2	202 ± ¥
Xp21.1	X kromozomu kopya sayısı	DMD	292*

\*Mikrodelesyon B1'in yeni versiyonu

¥ Mikrodelesyon B1'de sekansta değişiklik belirlenmeyen uzunluğu değişen.

± Bu prob içinde çok güçlü ya da ona yakın CpG island bulunur. Düşük sinyal DNA denatürasyonunda eksiklik ya da DNA'da tuzun varlığına işaret eder.

### 4.2.3. DNA'nın Elde Edilmesi

#### 4.2.3.1. Düşük Materyallerinden DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen fetus örneklerinin DNA izolasyonu Qiagen, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Formalin ile fikse parafine gömülü doku) ile gerçekleştirilmiştir.

1. 25 mg'den fazla doku kullanılmadı. Doku mekanik olarak parçalara ayrıldı.
2. 2'lik ependorf tüpe 180 µl ATL Buffer eklendi ve üzerine 20 µl proteinaz K eklenip, vortekslendi. 56°C'de doku tamamen lizis olana kadar Thermomixer'de inkübasyona bırakıldı. Tamamen lizis olması bir gece sürebilir.
3. İnkübasyon sonrası üzerine 200 µl AL Buffer eklendi ve vortekslendi. 70°C'de 10 dakika Thermomixer'de tekrar inkübasyon edildi.
4. 200 µl %96'lık etanol eklenip vortekslendi. Spin colon, collection tüpe kondu ve karışımın tamamı spin colona aktarıldı. 8000 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 1 dakika santrifüj edildi.
5. Spin colon temiz collection tüpe aktarıldı. 500 µl AW1 Buffer eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Spin colon tekrar temiz collection tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl AW2 eklenip 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
7. Spin colon DNA'nın bulunacağı yeni ependorf tüpe alınır. 200 µl ATE Buffer eklenir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

#### **4.2.3.2. Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu**

1. Amniyon sıvısı 2µl'lik ependorf tüpe alınır. 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında pellet bırakıp üstteki kısım atılır. Yeteri kadar pellet elde edilene kadar bu basamak tekrar edilir. 3-4 tekrar yeterli oluyor.
2. Yeteri kadar pellet elde ettikten sonra, daha önceden 40°C'ye bıraktığımız kelex'i (InstaGene Matrix) 80-90 µl (pellet miktarına göre) eklenir ve vortekslenir.
3. Thermomixer'de 99°C 10 dakika inkübe edilir.
4. 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
5. Santrifüjden sonra üstte kalan kısım bebek DNA'sı oluyor. Biz de buradaki kısmını kullandık.

#### **4.2.4. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi**

MLPA tekniğinin basamakları hedef DNA denatürasyonu ve problemlerin hibridizasyonu, ligasyon (bağlanma) reaksiyonu, PCR reaksiyonu, amplifiye ürünün elektroforez ile ayrıştırılması, verilerin analizi olmak üzere beş basamakta gerçekleşmektedir. Çalışmamızda MLPA Probemix P095 Anöploidi ve MLPA P245-B1 Mikrodelesyon-1 Probemix olmak üzere 2 ayrı kit kullanıldı. MLPA Probemix P095 Anöploidi kiti ile düşük materyali ve amniyon sıvısından oluşan toplamda 77 adet örnek çalışıldı. MLPA P245-B1 Mikrodelesyon-1 Probemix kiti ile aynı şekilde düşük materyali ve amniyon sıvısından oluşan 44 adet örneğe bakıldı. Her iki kitinde prosedürleri aynı olup sadece ilk basamakta hibridizasyon için kullanılacak probemix'ler farklıdır. Çalışmamızın yönteminden bahsedilirken tek bir kit üzerinden aktarılacak fakat sonuçlar değerlendirmeler yapılırken ayrı ayrı değerlendirilecektir.

#### **4.2.4.1. DNA Denatürasyonu ve SALSA MLPA Probemix P095 Anöploidi ile Hibridizasyonu**

Fetus materyalinden ve amniyondan izole edilmiş olan DNA örnekleri öncelikle denatürasyona bırakıldı. 5 µl DNA örneği (20-250 ng) 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı. 98<sup>0</sup>C'de 5 dakika Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra Thermal Cycler 25<sup>0</sup>C'ye gelince durduruldu. 25<sup>0</sup>C'deki DNA örneğinin üzerine 1,5 µl SALSA Probe Mix (P095 Anöploidi) ve 1,5 µl MLPA Buffer'dan oluşan hibridizasyon karışımından 3 µl ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi. PCR strip tüplerinde buharlaşmayı kontrol etmek için çalışma grubunun yanına başka bir PCR tüpünde 20 µl steril su konuldu. Böylece 17 saat sonra hibridizasyon sona erdiğinde buharlaşma olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra 95<sup>0</sup>C'de 1 dk inkübe edilip örnekler 60<sup>0</sup>C'de 17 saat hibridizasyona bırakıldı.

#### **4.2.4.2. Ligasyon**

Hibridizasyon sonrası basamak için Ligaze-65 karışımı hazırlandı. Bu karışım; 3 µl Ligaz-Buffer A, 3 µl Ligaz-Buffer B, 25 µl su ve 1 µl Ligaz-65 enzimden meydana gelmektedir. Bir gece önceden 60<sup>0</sup>C'de olan Thermal Cycler, 54<sup>0</sup>C'ye getirildi. Örnekler 54<sup>0</sup>C'de iken hazırlanan mixten 32 µl şeklinde tüplere aktarıldı ve pipetaj ile karıştırıldı. 54<sup>0</sup>C'de 15 dakika inkübe edildi, 98<sup>0</sup>C'de 5 dakika bekletildi.

#### **4.2.4.3. PCR**

PCR basmağı için Polimeraz master karışımı hazırlandı. Bu karışım için 2 µl SALSA PCR-primer mix, 7,5 µl distile su, 0,5 µl SALSA Polimeraz kullanıldı. Hazırlanan karışım 10 µl olacak şekilde ligasyon tüplerine eklendi. Pipetaj ile karıştırıldı ve hava kabarcıkları kontrol edilerek oda sıcaklığında Thermal Cyclera konuldu. PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

95°C 30 sn Denatürasyon	}	35 döngü
60°C 30 sn Bağlanma		
72°C 60 sn Uzama		
72°C 20 dk Son Uzama		

#### 4.2.4.4. ABI 3130 Cihazına Yükleme

Amplifikasyonu gerçekleştiren örnekleri fragment analizi için kapiller jel elektroforez cihazına aşağıda verilen yol izlenerek yüklemesi yapıldı.

1. İnternal size standart (Liz 500) ve formamidden oluşan karışım hazırlandı. 9 µl formamid ve 0,2 µl internal size standart (Liz 500) ependorf tüpüne konuldu, pipetaj yapıp 9,2 µl şeklinde ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
2. Üç basamaktan oluşan MLPA tekniğinin son basamağından elde edilen PCR ürünlerden 0,7 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine eklendi ve iyi bir şekilde homojenize olana kadar pipetaj yapıldı, hava kabarcıkları kontrol edildikten sonra örnekler 86°C de 3 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı. Daha sonra 4°C'de 5 dakika beklendi.
3. ABI 3130 cihazına yükleme yapıldıktan sonra Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
4. Sonuçları değerlendirmek için Coffalyser MLPA analiz programı kullanıldı.

#### 4.2.4.5. Değerlendirme

Değerlendirme yapılırken, çalışılan problardan elde edilen sinyaller ile kontrol grubundan elde edilen sinyallerin oranına bakıldı. Eğer bu oran 1 ise hedef bölgede herhangi bir gen delesyonu veya duplikasyonu söz konusu değildir. Bu oran 0,7 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde mutasyon yani heterozigot bir durum söz konusudur. Oran 1,3 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde duplikasyon söz konusudur.

Çalışmamız retrospektif bir çalışma olduğu için QF-PCR yöntemi ile Gene Mapper programında analiz edilen, prenatal tanı amacıyla başvuran hastalar üzerinde

çalışma yapılmıştır. Gelen örnekler MLPA tekniği ile çalışıldı. Çalışmamızın sonuçlarının değerlendirilmesi Coffalyser MLPA analiz programıyla gerçekleştirildi. MLPA ürünlerindeki problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları bu programla değerlendirildi. Sağlıklı kontrollerle pik alanları ve boyları karşılaştırıldı. Ratio değeri  $<0,7$  olan değerlerde delesyon olduğuna  $>1,3$  olan değerlerde ise duplikasyon olduğu şeklinde değerlendirme yapıldı.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında yürütülen çalışmamızda 77 adet örnek kullanıldı. Bu örnekler fetus ve amniyon sıvısından oluşmaktadır. 77 adet materyale P095-A3 Anöploidi kiti ile çalışma yapıldı. Bunlardan ayrı olarak yine aynı örneklerden oluşan 44 adet materyale ise P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 ile çalışma yapıldı. Örnekler seçilirken öncelikli olarak QF-PCR ile anomali tespit edilmiş örnekler kullanıldı. Toplamı 20 olan anomalili örnek dışında geri kalanının taze örneklerden kullanılmasına dikkat edildi.

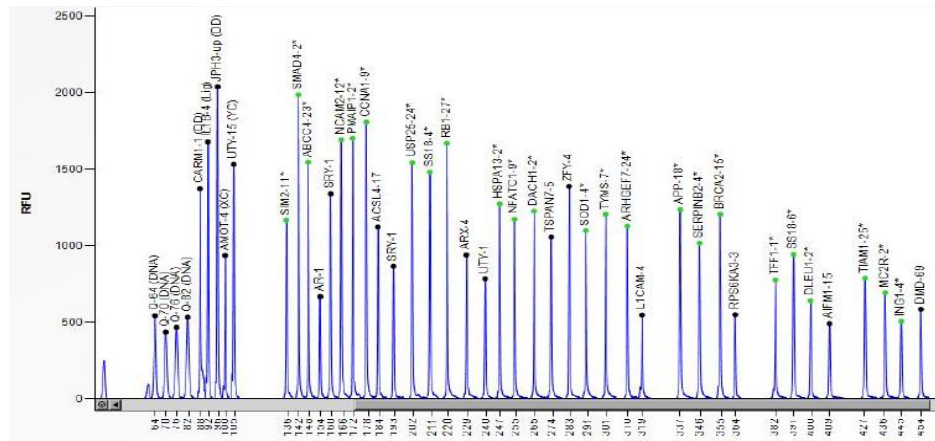
## **5. BULGULAR**

Çalışmamızda P095-A3 Anöploidi ve P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 kitleri kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda 77 adet materyal üzerinde yapılan anöploidi çalışmasına ait sonuçlar veriliyor (Tablo 10).

**Tablo 10.** Araştırmada kullanılan amniyon ve tahliye materyallerine ait QF-PCR ve MLPA (Anöploidi) sonuçları

Çalışma yöntemi		QF-PCR		MLPA (Anöploidi)	
Materyal tipi n:77		Amniyon sıvısı n:67	Düşük materyali n:10	Amniyon sıvısı n:67	Düşük materyali n:10
Normal		58 (%86,5)	1 (%10)	57 (%85)	-
Anomali tipi (n/%)	Sayısal	8 (%12)	7 (%70)	10 (%15)	7 (%70)
	Yapısal (Delesyon/Duplikasyon)	-	1 (%10)	-	-
	Diğer	1 (%1,5)	1 (%10)	-	-

57 adet amniyon sıvısı normal olarak değerlendirme yapılmıştır (Şekil 13). QF-PCR ile normal tanı konulmuş bir adet düşük materyali MLPA tekniği ile çalışıldığında 13, 18, 21 ve X kromozomlarına ait birçok bölgede mikrodelesyon/duplikasyon belirlendi (Şekil 14). Aynı düşük materyalinin karyotiplemesi de Şekil 15’te verilmiştir (Şekil 15).

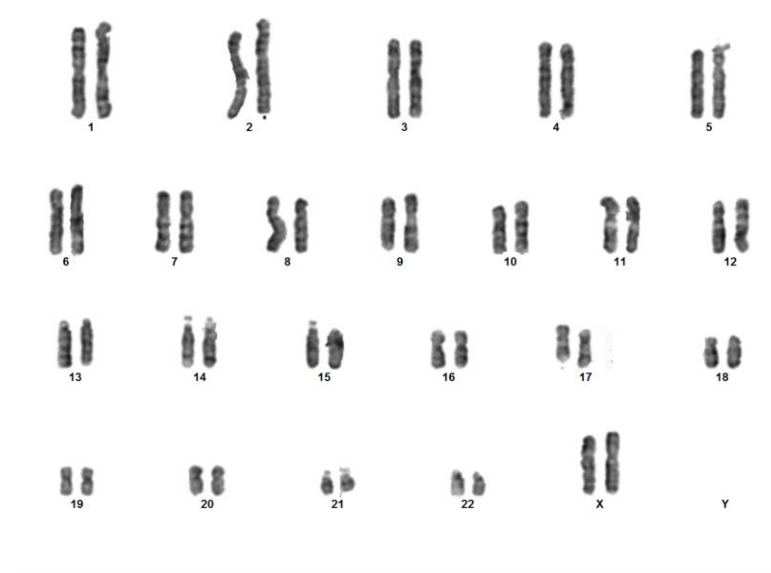


**Şekil 13.** Normal olarak değerlendirilen amniyon sıvısına ait P095-A3 Anöploidi sonuç profili. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)



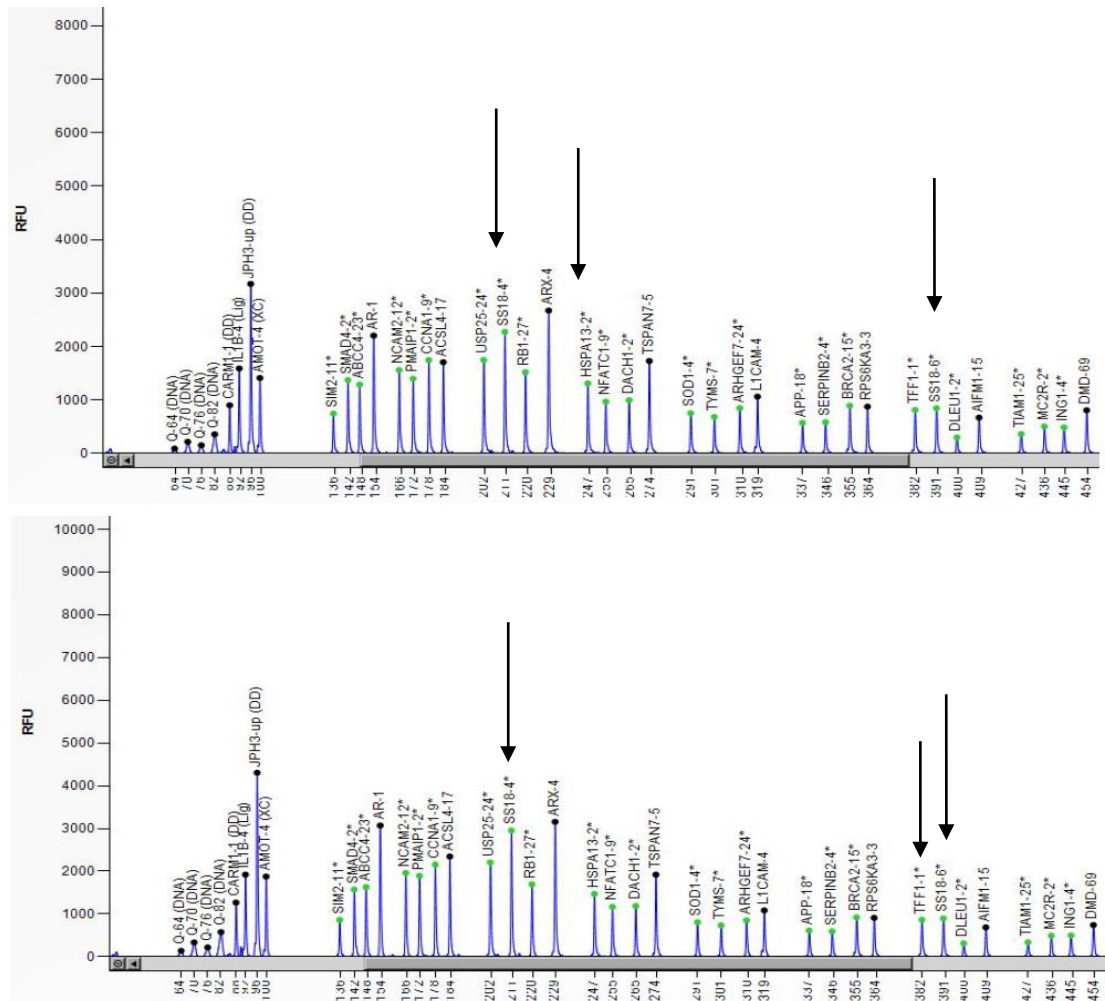
D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	Ratio
364	RPS6KA3-3	Xp22.12	0,68
229	ARX-4	Xp21.3	0,27
454	DMD-69	Xp21.2	0,93
274	TSPAN7-5	Xp11.4	0,65
154	AR-1	Xq12	0,25
184	ACSL4-17	Xq23	0,71
409	AIFM1-15	Xq26.1	0,42
319	L1CAM-4	Xq28	0,25
193	SRY-1	Yp11.31	81%
160	SRY-1	Yp11.31	105%
283	ZFY-4	Yp11.31	135%
240	UTY-1	Yq11.221	55%
355	BRCA2-15*	13q13.1	0,91
178	CCNA1-9*	13q13.3	0,96
220	RB1-27*	13q14.2	1,15
400	DLEU1-2*	13q14.2	1,3
265	DACH1-2*	13q21.33	1,34
148	ABCC4-23*	13q32.1	0,72
445	ING1-4*	13q34	0,91
310	ARHGEF7-24*	13q34	0,78
301	TYMS-7*	18p11.32	1,05
436	MC2R-2*	18p11.21	0,81
391	SS18-6*	18q11.2	1,6
211	SS18-4*	18q11.2	1,19
142	SMAD4-2*	18q21.2	0,79
172	PMAIP1-2*	18q21.32	0,94
346	SERPINB2-4*	18q21.33	1,3
255	NFATC1-9*	18q23	0,43
247	HSPA13-2*	21q11.2	1,11
202	USP25-24*	21q21.1	1,21
166	NCAM2-12*	21q21.1	0,93
337	APP-18*	21q21.3	1,05
427	TIAM1-25*	21q22.11	1,22
291	SOD1-4*	21q22.11	1,34
136	SIM2-11*	21q22.13	0,94
382	TFF1-1*	21q22.3	0,52

Şekil 14. Düşük materyaline ait hedef kromozomlardaki bazı bölgelerin MLPA P095-A3 Anöploididelesyon ve duplikasyon profili

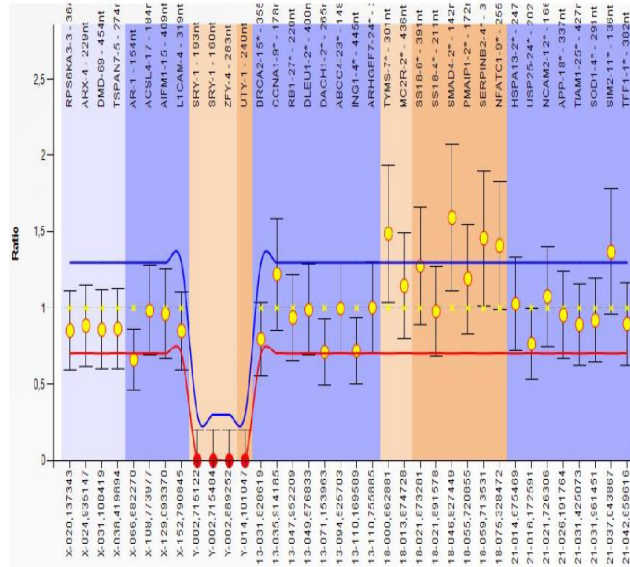
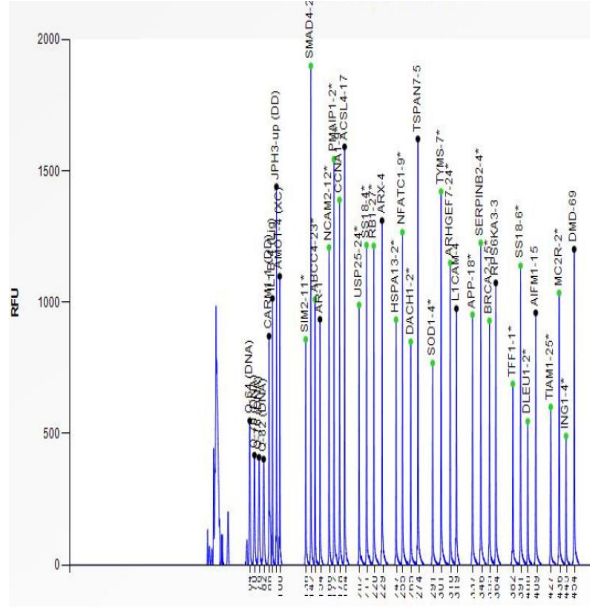


Şekil 15. MLPA P095-A3 Anöploidide çalışılmış Şekil 14'e ait düşük materyalinin karyotip profili

Triploidi ve tetraploidi tanısı konulmuş 3 adet düşük materyaline MLPA tekniği ile tanı konulamadı. Diğer olarak adlandırdığımız anomalilerin biri paternal uniparental izodizomi ve biri de uninformatif yani tanısı konulamayan örneklerdir. Uninformatif olan örnek normal olarak değerlendirildi. Paternal uniparental izodizomi ise Triple X şeklinde değerlendirildi. QF-PCR ile normal sonuç verilen 2 örnekte MLPA ile 18 ve 21 kromozomlarına ait bazı bölgelerde kısmi duplikasyon görüldü (Şekil 16). Bunların dışında sayısal anomali tanısı konulmuş diğer tüm örnekler üzerinde yapılan çalışmada MLPA ile uyumlu çıkmıştır. Trizomi 18 olarak değerlendirilen bir örnek aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 17).



**Şekil 16.** İki amniyon sıvısına ait hedef kromozomlardaki bazı bölgelerin P095-A3 Anöploidi kısmi duplikasyon profilleri. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)



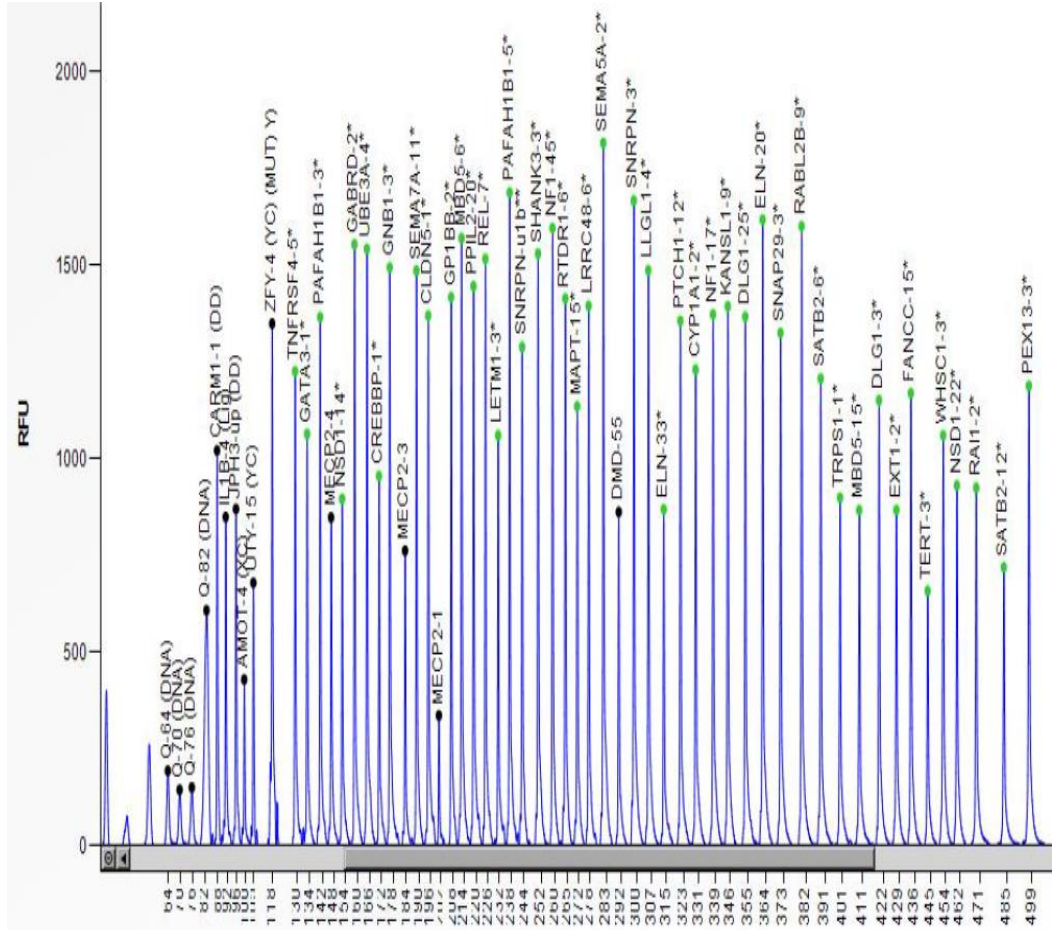
D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	Ratio
364	RPS6KA3-3	Xp22.12	0,85
229	ARX-4	Xp21.3	0,88
454	DMD-69	Xp21.2	0,86
274	TSPAN7-5	Xp11.4	0,86
154	AR-1	Xq12	0,66
184	ACSL4-17	Xq23	0,98
409	AIFM1-15	Xq26.1	0,96
319	L1CAM-4	Xq28	0,85
193	SRY-1	Yp11.31	0
160	SRY-1	Yp11.31	0
283	ZFY-4	Yp11.31	0
240	UTY-1	Yq11.221	0
355	BRCA2-15*	13q13.1	0,8
178	CCNA1-9*	13q13.3	1,22
220	RB1-27*	13q14.2	0,94
400	DLEU1-2*	13q14.2	0,99
265	DACH1-2*	13q21.33	0,71
148	ABCC4-23*	13q32.1	1
445	ING1-4*	13q34	0,72
310	ARHGEF7-24*	13q34	1
301	TYMS-7*	18p11.32	1,49
436	MC2R-2*	18p11.21	1,15
391	SS18-6*	18q11.2	1,27
211	SS18-4*	18q11.2	0,98
142	SMAD4-2*	18q21.2	1,59
172	PMAIP1-2*	18q21.32	1,19
346	SERPINB2-4*	18q21.33	1,46
255	NFATC1-9*	18q23	1,41
247	HSPA13-2*	21q11.2	1,03
202	USP25-24*	21q21.1	0,77
166	NCAM2-12*	21q21.1	1,08
337	APP-18*	21q21.3	0,95
427	TIAM1-25*	21q22.11	0,89
291	SOD1-4*	21q22.11	0,92
136	SIM2-11*	21q22.13	1,37
382	TFF1-1*	21q22.3	0,89

**Şekil 17.** Trizomi 18 olarak değerlendirilen amniyon sıvısına ait P095-A3 Anöploidi MLPA profilleri

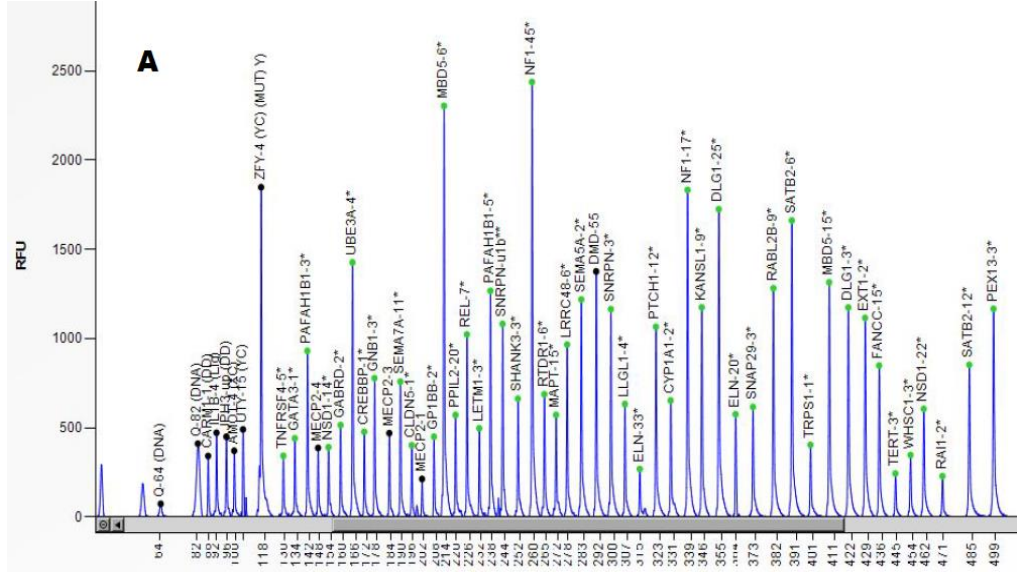
Mikrodelesyon çalışmasında daire aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 11). 33 adet amniyon sıvısından 11'inde herhangi bir mikrodelesyon/duplikasyon bulunamadı ve 22 tane amniyon sıvısında mikrodelesyon ve duplikasyon saptaması yapıldı. 11 adet düşük materyalinden normal olarak değerlendirilen bulunmadı ve hepsinde de mikrodelesyon/duplikasyon olduğuna dair değerlendirme yapıldı (Şekil 18), (Şekil 19).

**Tablo 11.** Araştırmada kullanılan amniyon ve tahliye materyallerine ait QF-PCR ve MLPA (Mikrodelesyon) sonuçları

Çalışma yöntemi	QF-PCR		MLPA (Mikrodelesyon)	
	Amniyon sıvısı n:33	Düşük materyali n:11	Amniyon sıvısı n:33	Düşük materyali n:11
Materyal tipi n:44				
Normal	23 (%70)	1 (%9)	11 (%33)	-
Anomali tipi (n/%)	Sayısal	9 (%27)	-	-
	Yapısal (Delesyon/Duplikasyon)	-	1 (%9)	11 (%100)
Diğer	1 (%3)	1 (%9)	-	-



**Şekil 18.** Mikrodelesyon çalışmasında normal olarak değerlendirilen düşük materyalinin P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 MLPA profili. İlk dört pik Q fragmenti, sonraki üç pik D fragmentleri ve sonraki iki pik cinsiyet fragmentleri (100 nt X fragmenti, 105 nt Y fragmenti)



**B**

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	Ratio
130	TNFRSF4-5*	01p36.33	0,57
178	GNB1-3*	01p36.33	1,01
160	GABRD-2*	01p36.33	0,65
226	REL-7*	02p16.1	1,26
499	PEX13-3*	02p16.1	1,45
214	MBD5-6*	02q23.1	2,76
411	MBD5-15*	02q23.1	2,4
485	SATB2-12*	02q33.1	1,77
391	SATB2-6*	02q33.1	2,22
355	DLG1-25*	03q29	2,1
422	DLG1-3*	03q29	1,6
232	LETM1-3*	04p16.3	0,87
454	WHSC1-3*	04p16.3	0,5
445	TERT-3*	05p15.33	0,57
283	SEMA5A-2*	05p15.31	1,19
154	NSD1-14*	05q35.3	0,87
462	NSD1-22*	05q35.3	0,99
364	ELN-20*	07q11.23	0,59
315	ELN-33*	07q11.23	0,53
401	TRPS1-1*	08q23.3	0,72
429	EXT1-2*	08q24.11	2,01
436	FANCC-15*	09q22.32	1,13
323	PTCH1-12*	09q22.32	1,34
134	GATA3-1*	10p14	0,84
244	SNRPN- <i>u1b</i> **	15q11.2	1,54
300	SNRPN-3*	15q11.2	1,22
166	UBE3A-4*	15q11.2	1,82
190	SEMA7A-11*	15q24.1	0,98
331	CYP1A1-2*	15q24.1	0,9
172	CREBBP-1*	16p13.3	0,98
142	PAFAH1B1-3*	17p13.3	1,37
238	PAFAH1B1-5*	17p13.3	1,38
471	RAI1-2*	17p11.2	0,37
278	LRRC48-6*	17p11.2	1,23
307	LLGL1-4*	17p11.2	0,74
339	NF1-17*	17q11.2	2,25
260	NF1-45*	17q11.2	2,76
272	MAPT-15*	17q21.31	0,9
346	KANSL1-9*	17q21.31	1,41
196	CLDN5-1*	22q11.21	0,56
208	GP1BB-2*	22q11.21	0,6
373	SNAP29-3*	22q11.21	0,76
220	PPIL2-20*	22q11.21	0,74
265	RTDR1-6*	22q11.22	0,89
252	SHANK3-3*	22q13.33	0,79
382	RABL2B-9*	22q13.33	1,3
148	MECP2-4	Xq28	0,91
184	MECP2-3	Xq28	1,19
202	MECP2-1	Xq28	1,2
292	DMD-55	Xp21.1	2,8
118	ZFY.4 (YC) (M	Yp11.31	2,81

Şekil 19. Çok sayıda

bölgede mikrolelesyon/duplikasyon tespit edilmiş düşük materyaline ait örneğin

Electropherograms (A), Sample Report (B) P245-B1 Mikrolelesyon Sendromları-1

MLPA sonuç profilleri

## 6. TARTIŞMA

Prenatal tanının günümüzde bilinen ve kabul edilen anlamından yüzyıllar öncesine dayanan toplumsal bir temeli vardır. Bildiğimiz tabirle prenatal tanı, fetus veya embriyodaki hastalıkların doğum öncesi dönemde tespit edilmesi işlemidir. Prenatal tanıda amaç; nöral tüp defektleri gibi doğumsal anomalileri, Down Sendromu ve Frajil X gibi genetik hastalıkları saptayabilmektir. Ancak bütün hastalıkları bu yöntemle tespit etmenin mümkün olmadığı da unutulmamalıdır. Prenatal tanı için genetik testler; sitogenetik testler (kromozom düzeyinde değerlendirme) ve moleküler testleri (DNA düzeyinde mutasyon analizi) içermektedir.

Özellikle risk taşıyan gebeliklerde bebeğe henüz anne karnındayken tanı konulması prenatal tanı ile mümkün olmaktadır. Gebe kadınların %70'i prenatal tanı için her zaman en hızlı tanı koyabilen yöntemi tercih ediyor (Yan 2011), (Ryan 2005). Örneğin CVS kültüründeki başarısızlık amniyosentez ile tekrar edilebilir. Eğer amniyosentezdede gerekli üreme olmazsa zaman varsa tekrar amniyosentez yapılabilir. Fakat bu durum zaman kaybına neden olacaktır. Bu da prenatal tanı için gerekli önlemlerin alınmasına ters bir durumdur. Prenatal tanı ile aynı zamanda tanı konulduktan sonra hastalığın varsa doğum öncesi tedavisine ve doğum sonrası gerekli önlemlerin alınmasına olanak vermektedir. Ayrıca tedavi planlanması yapılarak genetik danışmanlık verilmesine, ailelerin istekleri doğrultusunda yasal çerçeveler de dahilinde gebeliklerin sonlandırılması da mümkün olabilmektedir.

Prenatal tanı için en çok kullanılan tekniklerden biri olan amniosentez 100 yılı aşkın süreden bu yana uygulanan bir yöntemdir. 1956 yılında amniyon sıvısının genetik hastalıkların tanısında ilk kez kullanımı rapor edilmiştir. Fuschs ve Riis amniyotik sıvıda Barr cisimciğinin varlığı ya da yokluğuna dayanarak fetusun cinsiyetinin belirlenebileceğini bildirmişlerdir (Fuchs 1956). Bu çalışmalar Hemofili A (1960) ve Duchenne müsküler distrofili (1964) hastalıklarının prenatal dönemde tanınmasını olanaklı hale getirmiştir. Steele ve Breg (1966), amniyotik sıvı fetal hücre kültürlerinin karyotipleme için uygun olduğunu göstermiştir. Nadler, amniyon sıvısında fetal hücre kültürlerini kullanarak enzim testleri yapmış ve aynı yıl Trizomi 21'i rapor etmiştir (Nadler 1968). Brock ve Sutcliffe (1972) nöral tüp defekti olan

bebeklerin gebelik amniyon sıvısında alfa fetoprotein düzeyinin artmış olduğunu bulmuşlardır.

Prenatal tanıda amniyosentez ve CVS yöntemleri önemlidir. Sitogenetik düzeyinde; ultrason ile tespit edilen bazı doğumsal defektler kromozom anomalileri ile ilgili olduğundan, amniyon sıvı hücreleri, koryon villus hücreleri ve kordonsentezle alınan fetal kan hücreleri ile karyotipleme yapılmalıdır. Amniyosentez veya CVS hücrelerinin kültür edilmesi, hücrelerden kromozom hazırlanması ve analizi 1-2 hafta sürebilir. CVS için karyotipleme kısa süreli kültür ya da uzun süreli kültür olabilir. Kısa süreli kültür ile hızlı sonuç verilse bile detaylı analiz için gerekli bant sağlanamadığından kalitesiz preparatlar ortaya çıkar.

Moleküler düzeyde yapılan testlerden QF-PCR prenatal dönemde kullanılan 24-48 saat içinde sonuç verebilen hızlı bir yöntemdir. Bu metodun temelinde 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal bozuklukları saptamak vardır. Bu yöntemle anormal hücrelerin tüm hücrelere oranı %15'ten fazla olması durumunda mozaizmi saptayabilmektedir. 8983 amniyon sıvısı üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda 18 mozaik olgunun 12 tanesi QF-PCR ile saptanırken, 8 tanesi karyotip analizi ile saptanmıştır (Donaghue 2005). Maternal hücre kontaminasyonlu bir örneği belirleyebilmesi de diğer bir özelliğidir. MLPA tekniği ile kontamine olan bir örnek belirlenmemektedir.

MLPA, delesyon ve duplikasyonların sık olarak gözlemlendiği genetik hastalıkların tanısında kullanılan yeni, basit ve hızlı bir yöntemdir (Onay H 2009). MLPA prenatal tanıda özellikle riskli gebeliklerin taramasında ucuz, güvenilir ve duyarlı bir tekniktir (Sellner 2004), (Kassirer 1994). MLPA çalışmalarında tüm problemler için aynı çift primerin kullanılması ve 50 veya daha fazla farklı odağın tek bir reaksiyonda incelenebilmesi yöntemin avantajlarından biridir. Yöntemin diğer bir avantajı ise 20 ng gibi çok az miktarda DNA ile çalışılabilmesidir (Cremonesi 2007). 2 ml amniyon örneği kullanılarak DNA elde edilebilir. MLPA tekniği ile 96 adet örneğe aynı anda Thermal cycler da ve kapiller elektroforezi ile çalışma yapılabilir ayrıca 48 saatte sonuçlar verilebilir. Hızlı, güvenilir, az maliyetli bir yöntem olması MLPA'yı postnatal tanı amacıyla da kullanılan bir teknik olmasını sağlamıştır (Slater 2014). Literatürde MLPA yöntemi kullanılarak amniyon sıvısından kromozomal anöploidi

tespiti yapılan çok sayıda arşiv bulunmaktadır (Gerdes 2005), (Van Opstal 2009), (Ryan 2005), (Kooper 2008).

MLPA tekniğinin prenatal tanı için kullanılan diğer yöntemlere karşı birçok üstünlüğü vardır. Floresan in situ hibridizasyonu (FISH) ve QF-PCR teknikleri ile karşılaştırıldığında 50'den fazla kromozom bölgesine bakabiliyor (Tommy 2005). FISH tekniğine göre daha uygun ve ucuz. QF-PCR tekniğine göre subtelomerik delesyon/duplikasyon tespitinde daha avantajlı (Kuo 1991), (Kozlowski 2008). Sonuçların analizi ve yorumlanması bilgisayar destekli programlarla yapıldığı için yorumlamak kolaydır. Bir araştırmada 4484 gebe kadın amniyon sıvısı örneğinde MLPA ve karyotipleme sonuçları karşılaştırılmıştır. Karyotipleme ile elde edilen sonuçlar MLPA ile de elde edilmiştir. Buna ek olarak MLPA karyotipleme ile elde edilemeyen sonuçları da elde etmiştir (Boormans 2010). Yaş ve/veya diğer prenatal tanı endikasyonu olan gebe kadınlar hızlı ve yüzde yüz doğrulukla bilgi sahibi olmak istiyor. Bu amaçla günümüzde FISH, QF-PCR ve MLPA gibi teknikler prenatal tanı amaçlı kullanılan teknikler olmuştur. Literatürlerde her üç tekniğin geçerliliği ve güvenilirliğinin test edildiği çok sayıda akademik veri bulunmaktadır (Boormans 2008).

MLPA tekniğinin bazı dezavantajları da var örneğin yapısal kromozom anomalilerini saptayabiliyor olması bir avantaj fakat triploidiyi saptayamaması ise bir dezavantajdır. Bunların yanı sıra QF-PCR ve MLPA teknikleri prenatal tanı için iyi birer yöntem olmasına rağmen bazı önemli kromozomal anomalileri tanıyamıyor (Yan 2011), (Sparkes 2008). MLPA tekniği ile inversiyon veya dengeli translokasyonlar algılanamıyor. MLPA çok hızlı ve güvenilir olmasına rağmen prenatal tanı amaçlı Mikroarray yöntemide kullanılmaya başlandı. Mikroarray olabildiğince tüm kromozomlardaki anomalilerin tespitinde kullanılan bir tekniktir (Van den Veyver 2006).

Çalışmamızda değerlendirme yapılırken bazı eksikliklerle karşılaşıldı. Bunlardan biri değerlendirme yapılırken üç ekran görüntüsüne bakılıp değerlendirme yapılmalıdır. Bunlar; sample report, ratio chart ve electropherograms. Bazı durumlarda ratio chart görüntüsünde ve sample report bölümünde sıfır olarak değerlendirilen bölgeler, electropherograms ekran görüntüsünde pik verebiliyor fakat pik bölgeleri yazmıyor. Eğer bu üçü değerlendirilmediğinde sıfır görünen bölgenin



çalışmadığı kanısına varılacak bu da bizleri yanlış değerlendirme yapmaya itecektir. Diğer bir eksiklik ise normal olarak değerlendirmelerde  $<0,7$  değeri ile  $>1,3$  değerlerine bakıp, delesyon/ duplikasyon olup olmadığına karar veriliyor. Fakat bazı durumlarda değerler cut off değerlerinin dışında olabiliyor. Örneğin bir hasta için cut off değeri 0,68 ya da 1,29 olsun bunun değerlendirmesi yapılırken delesyon/duplikasyon var mı yok mu şeklinde ikilemde kalınabiliyor. Bu durumlarda o bölgenin bir altında ve bir üstünde bulunan bölgelere bakılıp karar verilmeli. Eğer buradaki değerler cut off sınırlarının dışındaysa o hasta için delesyon/duplikasyon var diyebiliriz ve bu şekilde sonuca varabiliriz. Çalışmamızda da böyle vakalara rastlandı ve aynı bölge içinde bir üst ve altındaki değerlere bakılarak analiz edildi.

Çalışmamızda iki vakada çok sayıda delesyon/duplikasyon olduğu için tekrar çalışıldı eski sonuçlarla doğrulaması yapıldı. Her iki çalışma sonunda da delesyon ve duplikasyon bölgeleri birbirleriyle uyumlu çıktı. Buna ek olarak ekstra bölgelerde delesyon ve duplikasyon saptanan bölgeler bulundu.

## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son 30 yılda klasik karyotip analizi prenatal tanı amaçlı fetal kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. Standart karyotip ve kromozom analizi sayısal ve yapısal kromozom anomalilerin saptanmasında yüksek geçerliliğe ve güvenilirliğe sahiptir. Buna rağmen fazla laboratuvar işgücü gerektirmesi ve sonuçlarının elde edilmesinin uzun süre alması (14-21 gün), özellikle de prenatal tanı için bu tekniklerin yerini başka tekniklerin almasına ya da birlikte kullanılmasına gerek duyulmuştur. Uzun süre alması gerek duyulduğunda gebeliğin yasal terminasyon süresini aştığı için zor olabilmektedir. Bu durum invaziv girişim gerektiren prenatal tanı yönteminin amacına uygun olmamaktadır. Bu sebeple son yıllarda tıbbi genetikte diğer bir altın standart teknik olarak kullanılan invitro gen amplifikasyonu ile desteklenmiş prenatal teknikler kullanılmaktadır. PCR sadece tıbbi genetik ve prenatal tanıda değil tıp alanında tanı amaçlı kullanılan diğer bütün tekniklerden daha güvenilir ve geçerli bir tekniktir. MLPA tekniği de PCR ile desteklenmiş prenatal ve postnatal tanıda kullanılan bir moleküler tıbbi genetik yöntemidir.

Testlerin maliyet, güvenilirlik ve kısa sürede sonuçlandırılabilmesi prenatal tanıda hayati önem arz eder. Bu amaçla kullanılan testlerin birbirleri üzerindeki üstünlükleri/eksiklikleri bulunabilmektedir. MLPA tekniği prenatal tanıda son 5-8 yıldır kullanılan bir moleküler tekniktir. Diğer moleküler tekniklerle kıyaslandığında prenatal tanı için 1-2 ml amniyon sıvısı kullanılıyor olması, ucuz ve kromozomlara ait 50 kadar farklı prob kullanılarak kromozomal identifikasyonun yapılması önemli avantaj olarak kabul edilmektedir.

Çalışmalarımızın sonucunda MLPA tekniği prenatal tanı amaçlı tanı tekniğinde hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olduğu tespit edildi. Çünkü MLPA tamamen çok iyi bir şekilde optimize olmuştur ayrıca kromozomda geniş bir alana bakabiliyor. Her kromozom için ayrıntılı bir şekilde bakıldığı problemler var. Bazı prob sinyalleri deney koşullarındaki küçük değişiklikler ve örneğin saflığına karşı daha duyarlıdır. Bu nedenle, MLPA tarafından tespit edilen delesyon ve duplikasyonlar her zaman diğer yöntemlerle teyit edilmelidir. MLPA tarafından tespit edilen tüm delesyon ve duplikasyonların hepsi hastalığa sebep olan anomaliler değildir. Kullanıcıların bulguları yorumlarken her zaman en son bilimsel literatür ile doğrulaması gerekir.

QF-PCR ile anöploidi tespiti yapılan olgulara MLPA ile de aynı tespit yapılmıştır. Mozaik olgular, triploidi ve tetraploidi hariç diğer sex kromozomları ve 13, 18, 21 kromozomları MLPA ile sonuçlandırılabilmiştir. MLPA maternal DNA ve fetal DNA kontaminasyonunu değerlendiremez ve bu nedenle de tek başına bir yöntem olarak tavsiye edilmez fakat CVS veya amniyosentez ile kombinasyon olarak kullanılmalıdır. Az sayıda vakada, plasenta hücreleri ile fetus hücrelerinin kromozom içerikleri farklı olabilir (yalancı mozaizm). Bu durum yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir.

MLPA problemleri hedef dizinin dışında kalan herhangi bir değişikliği tespit edemez dolayısıyla çoğu inversiyon ve translokasyonları ortaya çıkaramaz. Hiçbir yöntemin tüm kromozomal anormallikleri tespit edebilme yeteneğine sahip olmadığı unutulmamalıdır.

Genetik tanı yöntemlerinin oldukça geliştiği günümüz tıbbında prenatal tanının; genetik hastalıkların önlenmesi ve bebeklerin sağlıklı bir şekilde dünyaya gelmesi için yapılan çalışmalar içinde önemli bir yer kapladığı unutulmamalıdır. MLPA tekniğinin yanı sıra Mikroarray tüm kromozomlara bakabilmesi bu alanda daha cazip gelebilir. Fakat pahalı olması ve altyapı gerektiren bu tekniğin henüz yaygın olarak prenatal tanı amaçlı kullanılmaması, ayrıca ülkemizde de çok fazla laboratuvara girmemiş olması bu tekniğin kullanılmasını güçleştirmektedir.

Araştırmamızda vardığımız sonuca göre prenatal tanı için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunların başında QF-PCR, FISH, karyotip analizi gelmektedir. 2005'te yayınlanan çok merkezli büyük bir çalışmada yazarlar en iyi protokolün PCR+karyotipleme veya FISH+karyotipleme şeklinde olduğu sonucuna varmış (Caine 2005). Bu yöntemlerin dışında MLPA yöntemi de prenatal tanı amaçlı hızla kullanılmaya başlanmıştır. Henüz çok yaygın olmayan fakat iyi bir yöntem olan Mikroarray yöntemi de prenatal tanı için kullanışlı bir yöntemdir. Çalışmamızda MLPA yönteminin prenatal tanıdaki önemini göstermeye çalıştık. Tüm bu yöntemlerin artı ve eksileri bulunmaktadır. Bu yöntemlerin birbirleriyle kombine kullanılması daha doğru sonuçların alınmasında, kafalardaki soru işaretlerinin giderilmesinde yardımcı olacaktır.

## 8. KAYNAKLAR

- Boormans EMA, Birnie E, Wildschut HI, Schuring-Blom HG, Oepkes D, Carla AC Van Oppen, Nijhuis JG, Macville MVE, Kooper AJA, Huijsdens K, Hoffer MVJ, Go A, Creemers J, Bhola AL, Bilardo KM, Suijkerbuijk R, Bouman K, Galjaard Robert-Jan H, Bonsel GJ ve Jan MM Van Lith. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus karyotyping in prenatal diagnosis: the M.A.K.E. study. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2008; 8:18.
- Boormans EMA, Birnie E, Oepkes D, Galjaard RJ, Schuring-Blom GH ve Jan M. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis. Van Lith on behalf of the MLPA and Karyotyping Evaluation (M.A.K.E.) Study Group. 2010; 297-303.
- Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA; UK Association of Clinical Cytogeneticists (ACC). Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet*. 2005; 366 (9480):123-128.
- Cunningham FG, Leveno KJ. *Williams Obstetrics*. McGraw-Hill. 22nd Edition. 2005; 232-236, 1074-1079.
- Dede H, Kandemir Ö, Yalvaç S, Altay M. İleri anne yaşı nedeniyle yapılan ikinci trimester amniyosentez sonuçlarımız: üç yıllık deneyim. *The Journal of Gynecology-Obstetrics and Neonatology*. 2013; 10(38):1586-1588.
- Dijk MCV, Rombout PD, Boots SSH, Straatman H, Bernsen MR, Ruiter DJ, Jeuken JW. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed Tissue. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2005; 14(1):9-16.
- Donaghue C, Mann K, Docherty Z ve Mackie C. Ogilvie Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn*. 2005; 25:65-72.
- Dündar Yenilmez E. Anne kanında fetal nükleik asitlerle prenatal tanı uygulaması. 2010, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, 95 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Abdullah Tuli).
- Fuchs F, Riis P. Antenatal sex determination. *Nature*. 1956; 177:330.
- Gerdes T, Kirchoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M, Lundstee C. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet*. 2005; 13:171-175.
- Gonzalez JR, Carrasco JL, Armengol L, Villatoro S, Jover L, Yasui Y, Estivill X. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BioMed Central Bioinformatics*. 2008; 9:261.

- Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tool for the identification of chromosome abnormalities. [Pathologie Biologie](#) (Paris). 2008; 56(6):345-353.
- Harteveld CL, Kleanthous M, Traeger-Synodinos J. Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: Present and future strategies. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42:1767-1779.
- Kassirer JP. Incorporating patients' preferences into medical decisions. *N Engl J Med*. 1994; 330:1895-1896.
- Kaya I, Turan GA, Ülker YS, Genç M, Kasap E, Gür B, Korkut B, Tatar S. Tekrarlayan gebelik kayıplarında sitogenetik analiz. *İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 2015; 19(2):66-70
- Kooper AJ, Faas BH, Kater-Baats E, Feuth T, Janssen JC, Van Der Burgt I. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn*. 2008; 28:1004-1010.
- Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008; 29:4627-4636.
- Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18 or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet*. 1991; 49:112-119.
- Nadler HL. Antenatal detection of hereditary disorders. *Pediatrics*. 1968; 42:912-918.
- Nöral tüp defekti. Erişim adresi: <http://www.gebelik.org/dosyalar/anomaliler/ntd.html>, Erişim tarihi: 08.07.2015.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. 2005, [Thompson & Thompson Genetics in Medicine](#). Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. Baskı, Güneş Kitabevi, İstanbul 75, 140-149, 359-373.
- Onay H. Beta-Talasemi Hastalarında MLPA Yöntemi ile HBA Mutasyonlarının Saptanması. *Gaziantep Tıp Dergisi*. 2009; 15(1):1-4.
- Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: Factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod*. 2003; 18:1724.
- Preimplantasyon genetik tani. Erişim adresi: <http://www.jinekolognet.com/preimplantasyon-genetik-tani.asp>, Erişim Tarihi: 07.07.2015.
- Ryan M, Diack J, Watson V, Smith N. Rapid prenatal diagnostic testing for Down Syndrome only or longer wait for full karyotype: the views of pregnant women. *Prenat Diagn*. 2005; 25:1206-1211.
- Sellner LN, Taylor GR. MLPA ve MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*. 2004; 23:413-419.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Reserach*. 2002; 30(12):57.
- Sparkes R, Johnson JA, Langlois S, Wilson RD, Allen V, Bight C. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can*. 2008; 30:617-627.
- Sürmeliler E. Prenatal tanı amaçlı kromozom analizi gerektiren amniyosentez endikasyonları ve sonuçlarının değerlendirilmesi. 2005, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 69 sayfa, Adana, (Prof.Dr. Oktay Kadayıfçı).
- Translokasyon. Erişim adresi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Translokasyon>, Erişim Tarihi: 17.06.2015.
- Uğurlu T. Fetal kromozomal anomalilerin QF-PCR (Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespiti ve etkinliğinin aminoasit kültürleri ile karşılaştırılması. 2007, Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İzmir.
- Umberto N, Faustina L, Federica N, Cristina C ve The-Hung B. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *European Society of Human Reproduction and Embryology*. 2004.
- Van Den Veyver IB, Beaudet AL. Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006; 18:185-91.
- Van Opstal D, Boter M, De Jong D, Van Den Berg C, Brüggewirth HT, Wildschut HI. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17:112-121.
- Ward KJ. Genetic factor in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2000; 18:425.
- Yalçıntepe S. Abortus etiyolojisinde embriyonal ve parental genetik faktörlerin değerlendirilmesi. 2013, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Çanakkale, (Prof. Dr. Öztürk Özdemir).
- Yan JB, Xu M, Xiong C, Zhou DW, Ren ZR, Huang Y. Rapid screening for chromosomal aneuploidies using array-MLPA. *BMC Med Genet*, 2011; 12:68.
- Yararbaş K, Ilgın-Ruhi H. Prenatal Tanı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*. 2006; 26:666-674.
- Yüce H, Çalık H, Gürateş B, Erol D, Hanay F, Elyas H. Karyotip analizi amacıyla genetik amniyosentez uygulanan 356 olgunun retrospektif analizi. *Perinatoloji Dergisi*, 2006; 14:2

## 9. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Elif		
<b>Soyadı</b>	ARI		
<b>Doğum Yeri</b>	Van/Erciş	<b>Doğum Tarihi</b>	16.04.1989
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kimlik No</b>	37612940158
<b>E-mail</b>	elifari17@gmail.com	<b>GSM:</b>	05357979489

<b>Eğitim Düzeyi</b>	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü. Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Tıbbi Genetik Programı	2013-2015
<b>Lisans</b>	Balıkesir Üniversitesi	2006-2010

### **A-Laboratuvar deneyimi**

Sitogenetik Laboratuvarı deneyimi; Lenfosit Hücre Kültürü, Harwest, GTG bantlama, Karyotip analizi.

Moleküler Genetik Laboratuvarı deneyimi; DNA izolasyonu, Kapiller Elektroforez yöntemi ile Y Mikrodelesyon, QF-PCR, MLPA tekniği.

Sekans yöntemi ile Connexin, Kistik Fibrozis, BRAF, Agaroz Jel Elektroforezi

### **B-Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Diğer:**

#### **A-Uluslararası yayınlar**

**A-1.** O Ozdemir, F Silan, M Urfali, A Uludag, **E Ari**, M Kayatas. [Variable R. Msp1 fragmentation in genomic DNA due to DNA hypomethylation in CRF patients with MTHFR C677T gene polymorphism: from genetics to epigenetics](#). Gene Therapy and Molecular Biology. 2014; 16, 77-87

#### **B-Uluslararası Bildiriler**

**B-1.** O.Ozdemir, M. Urfali, F. Silan, A. Uludag, E. Ari, M. Kayatas. Variable R.Msp1 fragmentation in genomic DNA due to DNA hypomethylation in CRF patients with *MTHFR* C677T gene polymorphism: from genetics to epigenetics. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. P16.23. Bu araştırma, "Fellowship Award" ile ödüllendirilmiştir.

**B-2.** F. Silan, H. Has, M. Urfali, A. Uludag, E. Ari, M. Gencer, O. Ozdemir. Premature chromatid separation in a woman with unexplained recurrent pregnancy loss; A case report. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.58.

**B-3.** F. Silan, N. Topaloglu, M. Urfali, C. AKURUT, M. G. K. KOCAK, D. Kankaya, E. Ari, O.Ozdemir. Common MEFV gene mutation profiles in Familial Mediterranean Fever patients in Canakkale Population. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J17.22. (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.58.

**B-4.** Ozdemir S, Asik M, Silan F, Ozdemir O, Tan YZ, Ari E, Eroglu M, Ukinc K. The RFLP profiles at BRAF V600E mutations in thyroid FNAB nodules. International Biotechnology Congress. 7-9 May 2015, Bucharest/ROMANIA. **Bu araştırma en iyi Poster 2. 'liği ile ödüllendirilmiştir.**

**B-5.** Silan F, Ari E, Uludag A, Yildiz O, Isin B, Paksoy B, Ozdemir O. The microdeletion/microduplication profiles in spontaneously aborted fetal materials: *Double blind results of QF-PCR and MLPA techniques*. International Biotechnology Congress. 7-9 May 2015, Bucharest/ROMANIA. **Bu araştırma en iyi Poster 3. 'lümü ile ödüllendirilmiştir.**

### **C-Ulusal Bildiriler**

**C-1.** Şık E, Silan F, Uludağ A, Yalçın-tepe S, Urfalı M, Ari E, Özdemir Ö. Çanakkale onsekiz mart üniversitesi tıbbi genetik laboratuvarında saptanan trombofili mutasyonlarının endikasyonlara göre dağılımı. Hematolojik genetik sempozyumu, 2-4 Aralık 2013 İzmir, Bildiri özet Kitabı, s84

**C-2.** Göveç H., Uysal D., Urfalı M., Ari E., Silan F., Özdemir Ö. Sitogenetik Sonuçları Olan Bir Tek Gen Defekti: Prematur Chromatide Separation. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.40, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.

## **10. EKLER**

### **EK. 1**



## SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	X	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	X	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	X	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	X	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	X	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	X	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	X	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	X	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	X	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	X	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	X	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	X	

Tarih: / / 2015

Öğrenci  
Elif ARİ

Tarih: / / 2015

Danışmanın  
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

**EK. 2**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ**

<b>KONTROL BAŞLIĞI</b>	<b>ÖĞRENCİ</b>	<b>DANIŞMAN</b>
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN

Tarih: / / 2015 Öğrenci Elif ARİ	Tarih: / / 2015 Danışmanın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
--	---

**EK. 3**

**T.C.**

## ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

### Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğüne

Yürütücüsü bulunduğum 478 nolu ve "Çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu (MLPA) yönteminin prenatal tanıdaki yeri ve önemi" başlıklı proje kapsamında aşağıdaki satınalma/harcama işlemlerinin gerçekleştirilmesi hususunda gereğini arz ederim.

PROF.DR. ÖZTÜRK ÖZDEMİR

Genel Satın Alma Talebi Açıklaması: ÇOMÜ BAP Başkanlığına,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans yapan Elif Arı'ya ait "Çoklu ligasyonla prob amplifikasyonu yönteminin prenatal tanıdaki yeri ve önemi" isimli tez projesi ile ilgili proformalar tarafımızdan değerlendirilmiştir. Projemize vermiş olduğunuz destekten dolayı teşekkür ediyorum.

Saygılarımla,

30.12.2014

#### **Genel Satın Alma Talebi**

<u>SIRA NO</u>	<u>MALZEME</u>	<u>MİKTAR</u>	
<u>BİRİMİ</u>			
1	SALSA MLPA P095 Anöploidi Probemix	100	Adet

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Proje Yürütücüsü

**EK. 4**



**T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı**


**Sayı** : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99- *182*  
**Konu** : Başvuru İncelemesi

*31/10/2014*

**Sayın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR**

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz “Çoklu Ligasyonla Prob Amplifikasyonu (MLPA) Yönteminin Prenatal Tanıdaki Yeri ve Önemi” başlıklı EK-2014-116 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 30/10/2014 tarih ve 19-02 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

  
**Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR**  
Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkan

**Karar Tarihi** :30.10.2014 14:30  
**Karar No** :2014-19

**Karar-02)** EK-2014-116 no’lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR’in sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada “**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**” kararı verilmiştir. ( Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR projede yer aldığından ve Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN’ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamışlardır.)