

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ**

**(UZMANLIK TEZİ)**

**KORPUS KALLOZUM DİSGENEZİLİ HASTALARDA  
SUBTELOMERİK DEĞİŞİKLİKLERİN MLPA YÖNTEMİ  
İLE İNCELENMESİ**

**DR. ENDER KARACA**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. MUSTAFA ÖZEN**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2011**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezin çalışılmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif hakkını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Ender Karaca

**İTHAF**

Çok kıymetli anne ve babama,  
Yaşam sevincimiz Elif'ime,  
Sevgili hayat arkadaşım Ayşegülüm'e,  
Canım kardeşlerime,  
Hayatıma ve yaşama anlam katan herkese, herşeye...

## TEŞEKKÜR

Tez danışmalığımlı üstlenen ve her konuda yardım ve imkânlarını seferber eden Sn. Doç Dr. Mustafa Özen'e

Uzmanlık eğitimim başta olmak üzere tezimin belirlenmesi ve hastalara ulaşmamda her alanda emeğini ve tavsiyelerini esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Adnan Yüksel'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda bilgi ve birikimleriyle desteklerini hiç esirgemeyen hocalarım Sn. Prof. Dr. Beyhan Tüysüz, Sn. Doç. Dr. Mehmet Seven, Sn. Yrd. Doç Dr. Gülgün S. Güven, Sn. Yrd. Doç. Dr. Hakan Ulucan ve Uzm. Dr. Elif Yosunkaya'ya

Hastaların beyin MR görüntülerinin yorumlanmasındaki katkılarından ötürü Sn. Prof. Dr. Sait Albayram'a

Uzmanlık eğitimime olan katkılarından dolayı Sn. Prof. Dr. Turgut Ulutin, Sn. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu, Sn. Prof. Dr. Nur Buyru, Sn. Doç. Dr. Ayhan Deviren'e ve onların şahsında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD çalışanlarına,

Hep yanımda olan çalışma arkadaşlarım Dr. Sarenur Yılmaz, Dr. Gözde Yeşil, Dr. Elif Yılmaz Güleç, Dr. Alper Gezdirici, Dr. Hatip Aydın, Dr. Erkan Koparır ve Dr. Asuman Koparır'a

Sitogenetik rotasyonum boyunca bilgi birikimlerini benden esirgemeyen Bio. Bülent Bağlama, Bio. Zeliha Özcan, Bio. Emir Keresteciler ve Bio. İbrahim Bayrak'a,

Tezimin laboratuvar aşamasında desteklerini ve esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Bahadır Batar, Serhat Seveli başta olmak üzere yüksek lisan öğrencileri İlknur Suer, Esra Güzel, Ali Gökğöz ve aramıza yeni katılan Ayşe Karaca'ya

Hastaların aranması ve kan örneklerinin toplanması başta olmak üzere klinik genetik uygulamalarımızda hep yanımda olan polikliniğimizin vazgeçilmezi Hemşire Aysun Ayaz Sarı'ya,

Yine hastalardan kan örneklerinin toplanmasında ve laboratuvar uygulamalarımda her zaman yardımımıza koşan Asiye Kasapođlu Demirtaş'a,

Sınırlı sayıda bazı laboratuvar araçlarını kullanmamda bana gösterdikleri anlayıştan ötürü değerli sitogenetik ekibi Abdullah Çelebi, Özlem Yüksel Demirel ve Aslı Talılık'a,

Resmi prosedürler hakkında yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen bölüm sekreterlerimiz Sibel Koç ve Fatma Öner'e, dosyaların toplanması ve arşivlenmesi konusunda hiç sorun yaşamamamızı sağlayan Şaban Çorkuş ve tertemiz bir ortamda çalışmamıza katkıda bulunan Şenay Sayın'a,

En çok da bana her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de destek olan çok sevdiğim eşim Ayşegül Karaca'ya ve beni yürekleri ve emekleri ile yetiştiren çok kıymetli aneme ve rahmetli babama,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10228

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Korpus kallozum	5
2.1.1. Kısa Tarihçe	5
2.1.2. Anatomisi	5
2.1.3. Normal Gelişimi	6
2.1.4. Korpus Kallozum Anomalilerinin Tanımlanması	9
2.1.5. İnsanlarda Korpus Kallozum Gelişim Kusurlarının Nedenleri	9
2.1.5.1. Çevresel Nedenler	9
2.1.5.2 Genetik Nedenler	10
2.1.5.2.1. Kromozomal Anomaliler ve Yeniden Düzenlenmeler	10
2.1.5.2.2. Sendromik Nedenler	14
2.1.5.2.2.1. Akrokollozal Sendrom (AKS; Schinzel sendromu)	14
2.1.5.2.2.2. Korpus Kallozum Agenezisi ve Kuşkulu Genitalyanın Eşlik Ettiği X'e Bağlı Lizensefali (XLAG)	16
2.1.5.2.2.3 CRASH Sendromu	16
2.1.5.2.2.4 Anderman Sendromu	16
2.1.5.2.2.5. Aicardi Sendromu	17
2.1.5.2.2.6. Meckel-Gruber Sendromu	17
2.2. KROMOZOM MORFOLOJİSİ VE SUBTELOMERİK BÖLGELERİN ÖZELLİKLERİ	18
2.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	21
2.3.1 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)'nın Genel Özellikleri	21
2.3.3 SUBTELOMERİK YENİDEN DÜZENLENMELERİN TESBİTİNDE MLPA TEKNİĞİNİN KULLANIMI	25
2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)	27
2.4.1. PZR Çeşitleri	27
2.4.1.a Klasik PZR	27

2.4.1.b Multipleks PZR	28
2.4.1.c Nested PZR	28
2.5. KAPİLLER JEL ELEKTROFOREZİ	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. GEREÇ (Hastalar)	31
3.2. YÖNTEM	33
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	33
3.2.2. DNA izolasyonu	33
3.2.3. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	34
3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P070 Prob Miks İle Hibridizasyonu	34
3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu	34
3.2.3.3. PZR	35
3.2.3.4. PZR ürünlerinin ABI 310 Genetic Analyzer cihazına yüklenmesi ve analizi	36
3.2.4.5. Değerlendirme	36
4. BULGULAR	37
4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuar Bulguları	38
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÇIKARIMLAR	64
7. KAYNAKLAR	66

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2.1: Korpus kallozum anomalisi ile ilişkili sendromlar ve tanımlanmış gen ve lokalizasyonları	15
Tablo 2.2: MLPA Salsa P070 subtelomerik Kiti Prob Bölgeleri	26
Tablo 3.1: Hastaların yaş, cinsiyet ve ailede akrabalık öyküsü özellikleri	32
Tablo 4.1: Hastaların beyin MR görüntüleme bulguları, mental retardasyon/gelişim geriliği dereceleri ve eşlik eden majör klinik özellikler	39
Tablo 4.2: Hastaların klinik muayene ve anamnez özellikleri ve bunların kallozal anomaliye göre dağılımı	41
Tablo 4.3: Hastalarda eşlik eden somatik bulgular ve bunların kallozal anomaliye göre dağılımı	42
Tablo 4.4: Hastaların beyin MR görüntülemesinde saptanan merkezi sinir sistemi bulguları ve bunların mevcut korpus kallozum anomalisine göre dağılımı	43
Tablo 4.5: 16p subtelomerik bölgede kopya sayısı artışı saptanan hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılması	49
Tablo 4.6: 21q subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılması	51
Tablo 5.1: DECIPHER v5.1 veri tabanındaki <i>DEC2</i> genini de içine alacak şekilde meydana gelen kopya sayısı artış bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikler	59



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Beynin iki yarımküresini bağlayan korpus kallozumun alttan görünüşü	7
Şekil 2.2: Korpus kallozumun anatomik yapısı ve komşuluklarının şematik görünümü, sagittal kesit	8
Şekil 2.3: Korpus kallozum hipoplazisi	11
Şekil 2.4: Korpus kallozum displazisi ve agenezisi	12
Şekil 2.5: Korpus kallozumun doğumsal gelişim anomalileri ile ilişkili kromozom bölgeleri	13
Şekil 2.6: Kromozom morfolojisi	19
Şekil 2.7: Telomerik ve subtelomerik bölgelerin şematik görünümü	20
Şekil 2.8: MLPA'nın çalışma prensibi	23
Şekil 2.9: Amplifiye edilen MLPA problemlerinin kapiller jel elektroforezinde yürütülmesi ile elde edilen pikler	24
Şekil 2.10: Kapiller jel elektroforezin çalışma şeması	29
Şekil 4.1a: Kontrol ve H02 numaralı hastanın MLPA analiz sonuçları	44
Şekil 4.1b: Kontrol ve H33 numaralı hastanın MLPA analiz sonuçları	45
Şekil 4.1c: Kontrol ve H32 numaralı hastanın MLPA analiz sonuçları	46
Şekil 4.1d: Kontrol ve H39 numaralı hastanın MLPA analiz sonuçları	47
Şekil 4.2: 16p subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların orta sagittal beyin MR görüntüleri	50
Şekil 4.3: 21q subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların orta sagittal beyin MR görüntüleri	52
Şekil 5.1: DECIPHER veri tabanında korpus kallozum agenezisi ve hipoplazisi ile ilişkili olduğu bildirilen kopya sayısı değişiklikleri bölgeleri	55
Şekil 5.2: DECIPHER v5.1 veri tabanında <i>DECR2</i> genini içine alan kopya sayısı artış bölgeleri	57
Şekil 5.3: DECIPHER v5.1 veri tabanında <i>S100B</i> geninin bir bölümünü içine alan kopya sayısı artış bölgesi	62

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ACC,</b>	Agenesis of Corpus Callosum
<b>aCGH,</b>	Array based Comprehensive Genomic Hybridization
<b>AKT3</b>	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 3
<b>ARX</b>	Aristalless Related Homeobox Gene
<b>Bç</b>	Baz çifti
<b>CC2D2A</b>	Coiled-Coil And C2 Domains-Containing Protein 2A;
<b>CEP290</b>	Centrosomal Protein, 290-KD
<b>DD</b>	Developmental delay
<b>DECR2</b>	2 4-dienoil-CoA redüktaz
<b>FAS</b>	Fetal Alkol Sendromu
<b>FISH</b>	Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>FOXP1</b>	Forkhead Box G1
<b>HNPCC</b>	Hereditör Nonpolipozis Colorectal Cancer
<b>HCC</b>	Hypoplasia of Corpus Callosum
<b>İMR</b>	İdiyopatik Mental Retardasyon
<b>Kb</b>	Kilobaz
<b>KKA</b>	Korpus Kallozum Agenezisi
<b>KKH</b>	Korpus Kallozum Hipoplazisi
<b>KSD</b>	Kopya Sayısı Değişiklikleri
<b>KSA</b>	Kopya Sayısı Artışı
<b>L1CAM</b>	L1 Cell Adhesion Molecule
<b>Mb</b>	Megabaz
<b>MLPA</b>	Multiplex Ligation Probe Amplification
<b>MKA</b>	Multipl Konjenital Anomali
<b>MKS</b>	Meckel Syndrome
<b>MR</b>	Mental Retardasyon
<b>MRG</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RPGRIP1L</b>	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein-1 Like Protein
<b>S100B</b>	S100 Calcium-Binding Protein, Beta
<b>TMEM216</b>	Transmembrane Protein 216
<b>TMEM67</b>	Transmembrane Protein 67

## ÖZET

**Karaca E.** Korpus Kallozum Disgenezili Hastalarda Subtelomerik Değişikliklerin Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi İle İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi. İstanbul. 2011.

Korpus kallozumun doğumsal anomalileri birçok farklı genetik ve çevresel nedene bağlı olarak çeşitli klinik prezentasyonda karşımıza çıkabilen yapısal bir beyin anomalileridir. Çoğunlukla genetik etkenlere bağlı bir tablo olmasına rağmen bu anomaliyle bugüne kadar herhangi bir sendromla bağlantısı olmayan sadece bir genin ilişkisi kanıtlanabilmiştir. Bu gen 1q43-44'te yerleşmiş *AKT3* genidir. Korpus kallozumun doğumsal gelişim kusurlarının eşlik ettiği bildirilen çok çeşitli kromozomal yeniden düzenlenme bulunmakla birlikte bunların önemli bir kısmının kromozomların subtelomerik bölgelerini içerdiği dikkat çekmektedir. Subtelomerik bölge değişiklikleri daha önce spesifik olarak korpus kallozum anomalili hastalarda çalışılmamış olmakla birlikte, mental retardasyon/gelişim geriliği grubunda bu oran ortalama %5'tir.

Bu çalışmada korpus kallozumun doğumsal gelişim kusuru bulunan hastalarda olası subtelomerik yeniden düzenlenmelerin saptanması ve bu bulguların eşlik eden klinik özellikleri ile ilişkilendirilmesi ve bu şekilde genotip-fenotip korelasyonu yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda korpus kallozumun doğumsal gelişim kusurunun olduğu 50 hasta incelenmiştir. Subtelomerik kromozomal değişikliklerin saptanmasında multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucunda iki hastada 16. kromozom kısa kolu (16p) subtelomerik bölgesine ve diğer iki hastada da 21. kromozom uzun kolu (21q) subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanmış olup hasta grubumuzda saptanan subtelomerik kopya sayısı değişikliği oranı %8'dir. Ayrıca hastaların klinik özellikleri (fasial dismorfizm, eşlik eden diğer doğumsal anomaliler, epilepsi..vb) ve beyin manyetik rezonans görüntüleme bulguları da sınıflandırılarak fenotip-genotip ilişkilendirilmesi yapılmıştır.

Korpus kallozumun doğumsal gelişim kusuru bulunan hastalarda gen içeriği bakımından zengin olan subtelomerik değişikliklerin tanımlanmasının sorumlu kritik bölgelerin ortaya konmasına ve yeni aday genlerin belirlenmesine katkıda bulunacağı ve yeni çalışmalara da kaynak teşkil edebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Korpus kallozum, subtelomerik değişiklikler, MLPA, *DECR2*, *S100B*, kopya sayısı değişiklikleri.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10228

## ABSTRACT

**Karaca E.** Analysis of Subtelomeric Rearrangements in Patients with Corpus Callosum Dysgenesis by Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA). İstanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Genetics. İstanbul. Specialization in medicine thesis. 2011.

Anomaly of corpus callosum is a common brain malformation of variable clinical expression that is seen in many syndromes of various etiologies. Although its etiology is predominantly genetic, only one causative gene, *AKT3*, has yet been identified. On the other hand studies for identification of genomic loci contributing to agenesis/hypoplasia of the corpus callosum revealed several candidate loci that dominantly include subtelomeric regions which are also widely accepted as associated to developmental delay/mental retardation. These regions of chromosomes are rich in gene and their rearrangements cannot be identified by conventional chromosome analysis.

The main purpose of this study is to identify subtelomeric rearrangements of patients with corpus callosum abnormality and classify patients according to their clinical picture (facial dysmorphism, cognitive functions, seizures.etc ), and cerebral magnetic resonance imaging findings. Consequently, we want to provide a genotype-phenotype correlation data. Subtelomeric alterations in patients with corpus callosum anomalies have not been specifically studied so far. However, the rate of subtelomeric alterations in patients with mental retardation/developmental delay is %5.

This study included fifty patients with corpus callosum birth defects. We used subtelomeric-MLPA method to determine the subtelomeric copy number variations in these patients. MLPA analysis revealed subtelomeric copy number variation in 4 patients, two of whom had duplication on 16p subtelomeric region and other two had duplication on 21q subtelomeric region. Subtelomeric copy number variation rate of our patients is %8. Accompanying clinical findings, cerebral magnetic resonance imaging findings were also categorized.

We believe that fine mapping of aberrations in gene-enriched subtelomeric regions in these patients provides both essential clues for localizing critical regions, and a strategy for identifying new candidate genes important for corpus callosum development.

**Key Words:** Corpus callosum, subtelomeric alterations, MLPA, *DECR2*, *S100B*, copy number variation.

This study was supported by Istanbul University, Scientific Research Unit Project Nr: 10228

**1. BÖLÜM**  
**GİRİŞ VE AMAÇ**

Korpus kallozum beynin en büyük konnektif yapısı olup iki hemisfer arasında bilgi transferi yapan yaklaşık 190 milyon aksondan oluşur (1). Hem homotopik ve hem de heterotopik olacak şekilde beyin yarımküreleri arasında bağlantılar içerir (interhemisferik transfer). Halen tartışmalı olsa da baskın görüş primer uyarıcı (eksitatör) nöronların uzantılarından oluştuğu yönündedir (2). İnsanlarda korpus kallozumun fonksiyonu üzerine ilk araştırmalar epilepsinin tedavisi amacı ile korpus kallozumu cerrahi olarak ayrılmış ‘yarık beyin’ vakalarında yapılmıştır (3,4). Bununla birlikte korpus kallozumun fonksiyonlarına yönelik çok değerli bilgiler sunan bir diğer hasta grubu da şüphesiz, bu yapının gelişim kusuru olduğu hastalardır. Korpus kallozum agenezisi (KKA) terimi, korpus kallozumun kısmen ya da tümüyle gelişmediği durumlar için kullanılır. Korpus kallozum hipoplazisi (KKH) ise total ya da parsiyel agenezi olmaksızın normalden ince morfolojideki korpus kallozumu ifade eder. Genel populasyonda tahmin edilen prevalansı her 1000 canlı doğumda 3-7 iken, gelişim kusuru bulunan populasyonda bu oran 2-3% olarak bildirilmektedir (5,6).

Kollozal gelişim bozukluğu, akson uzantılarının gelişmemesi veya gelişmesine rağmen karşı beyin yarım küresine geçememesi sonucu oluşabilir (7). Korpus kallozumun prenatal gelişimi, gestasyonel 8. ve 20. haftalar arasında beyin gelişimindeki (sinir hücrelerinin çoğalması ve görev yerlerine göçlerini de içeren) bir çok kompleks süreç ile çakışmaktadır. Bu nedenle, korpus kallozum agenezisi sıklıkla telensefalik ya da posterior fossa anomalilerinin bir parçası olarak karşımıza çıkar. Bununla birlikte çok farklı sendromların da klinik özellikleri arasında yer almaktadır (8).

Korpus kallozum agenezisi izole malformasyon olarak karşımıza çıkabileceği gibi yukarıda da belirtildiği üzere kompleks malformasyon sendromlarının bir parçası da olabilir. Genetik etyolojinin dışında maternal alkol kullanımı ya da maternal fenilketonüri gibi çevresel etkenlerin de kollozal gelişim bozukluklarına yol açabildiği gösterilmiştir (9,10). Bugüne kadar çok sayıda kromozomal yeniden düzenlenmeler ve tek gen hastalığına eşlik ettiği rapor edilmiştir (11,12). Söz konusu geniş genetik heterojenite büyük olasılıkla korpus kallozumun formasyonundan sorumlu embriyolojik sürece çok sayıda genin katkıda bulunmasına bağlıdır. Diğer taraftan, kollozal gelişim süreci ile ilişkili genetik bozukluklar, diğer merkezi sistem anomalileri ve farklı organların malformasyonlarına da yol açmaktadırlar (13). Bu yönü ile de kollozal gelişim bozuklukları bulunan hastalarda genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmaları hasta alt gruplarının oluşturulması ve daha spesifik moleküler ve klinik çalışmalar için önem taşımaktadır.



Kromozomların subtelomerik bölgeleri, zengin gen içeriği olan kromozom uç bölgeleridir. Patolojik kromozomal yeniden düzenlenmeler, diğer kromozom kısımlarına nazaran buralarda sıklıkla meydana gelir (14,15). Subtelomerik yeniden düzenlenmelerin klasik sitogenetik yöntemlerle yakalanması oldukça zordur. Bununla birlikte subtelomerik submikroskopik değişikliklerin zamanla geliştirilen yeni sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerle (fluorescent in situ hybridization (FISH), multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) ve array comparative genomic hybridization (aCGH)) saptanması gittikçe kolaylaşmaktadır. Bu yöntemler kullanılarak bugüne kadar idiopatik mental retardasyonlu (İMR) hastalarda ve multipl konjenital anomalili (MKA) hastalarda subtelomerik yeniden düzenlenmeler çalışılmıştır (16-23). Bu çalışmalarda saptanan patolojik subtelomerik değişikliklerin oranı ortalama %5 civarındadır (24). Değişikliklerin saptandığı bölgelerde henüz keşfedilmemiş sorumlu genlerin bulunmasına yönelik yeni stratejiler geliştirilmekte ve bu kritik bölgelerde gen haritalaması çalışması birçok araştırma grubu tarafından sürdürülmektedir (25).

İdiopatik mental retardasyonlu ve nörogelişimsel bozukluğu olan hastalarda patolojik değişikliklerin nisbeten sıklıkla saptandığı subtelomerik bölgelerin, beynin ve beynin en büyük bağlantısal yapısı olan korpus kallozumun normal embriyonik gelişiminden sorumlu genler bakımından da zengin olduğu düşünülmektedir. Örneğin literatürde bildiğimiz kadarıyla korpus kallozum agenezisi ile ilişkisi ispatlanmış tek gen olan *AKT3*'ün, 1. kromozomun uzun kolunda telomere yakın lokalizasyonu (1q43-44) bunu destekler niteliktedir (25). Bu noktadan hareketle korpus kallozumun doğumsal gelişim kusurları bulunan hastalarda olası subtelomerik yeniden düzenlenmelerin eşlik eden diğer klinik bulgular ile ilişkilendirilmesi ve bu şekilde genotip-fenotip korelasyonu yapılması hedeflenmiştir. Bu hastalarda gen içeriği bakımından zengin olan subtelomerik değişikliklerin saptanmasının sorumlu kritik bölgelerin ortaya konması ve yeni aday genlerin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## **2. BÖLÜM**

# **GENEL BİLGİLER**

## 2.1. Korpus Kallozum

### 2.1.1. Kısa Tarihçe

Korpus kallozum ismi, görünüşünün kemiği andırması nedeniyle Callus kelimesinden gelir. Bu tanımlama ilk kez Galenus tarafından 2. yüzyılda (yy) yapılmış olup korpus kallozumun ilk anatomik tarifini ise 16. yy'da Andreas Velsius yapmıştır (26). On yedinci yüzyılda Thomas Willis korpus kallozumun girus singuli ile birlikte hayal gücü merkezi olduğunu ileri sürmüştür (27). Korpus kallozumun beynin iki yarım küresi arasındaki bağlantıyı sağlağı ise ilk kez 18. yy'da Fransız nörolog Felix Vicq D'azir tarafından ortaya atıldı (28). Korpus kallozumun fonksiyonu ile ilgili ilk değerli veriler cerrahi olarak elde edilen ayırık beyin (split brain) ile gerçekleşmiştir (3,4). Sperry ve Bogen bu ayırık beyin çalışması kendilerine Nobel ödülü getirmiştir. Yakın zamandaki verilerin önemli bir kısmı korpus korpus kallozumun doğumsal total yokluğu ve korpus kallozumun diğer gelişimsel anomalileri (hipogenezi, hipoplazi) bulunan hastalardan elde edildiğı söylenebilir. Etyolojik çalışmalar günümüzde moleküler analiz uygulamalarındaki gelişmelerin de etkisi ile genomdaki değişikliklerin saptanması üzerine yoğunlaşmıştır.

### 2.1.2. Anatomisi

Korteksin iki yarım küresindeki ilgili bölgeleri bağlayan 190 milyonun üzerinde akson uzantısından oluşur. İçerdiği akson sayısıyla beyaz cevherin en büyük bağlantı yapısını oluşturur. Konumu itibariyle korpus kallozumun önünde ve üstünde girus singulatus, daha yukarda sulkus singulatus bulunur. İnsula ile de komşuluğı vardır. Arka kısmında singulat girusun istmusu bulunur. Alt kısmında lateral ventriküller, septum pellisidum ve vejetatif merkezler vardır. Çevresini hemen hemen hipotalamus, hipokampus, girus singuli, forniks, amigdaller ve mamillar cisimciklerden oluşan limbik sistem sarar (**Şekil 2.1** ve **2.2**).

Korpus kallozum farklı anatomik bölgelerden oluşur. Arka kısım 'splenium' olarak, dize benzetilen ön kısım ise 'genu' (diz) olarak adlandırılmıştır (**Şekil 2.2**). Bu iki kısım arasındaki bölge korpus kallozumun 'gövde' sidir. Gövde ile splenium komşuluğı sıklıkla incelmış olarak gözlenir. Bu incelmış kısım 'istmus' olarak tarif edilir. Diz bölgesinin önünden arka aşağı doğru kuş gagası şeklinde uzanan yapı 'rostrum' dur (**Şekil 2.2**).

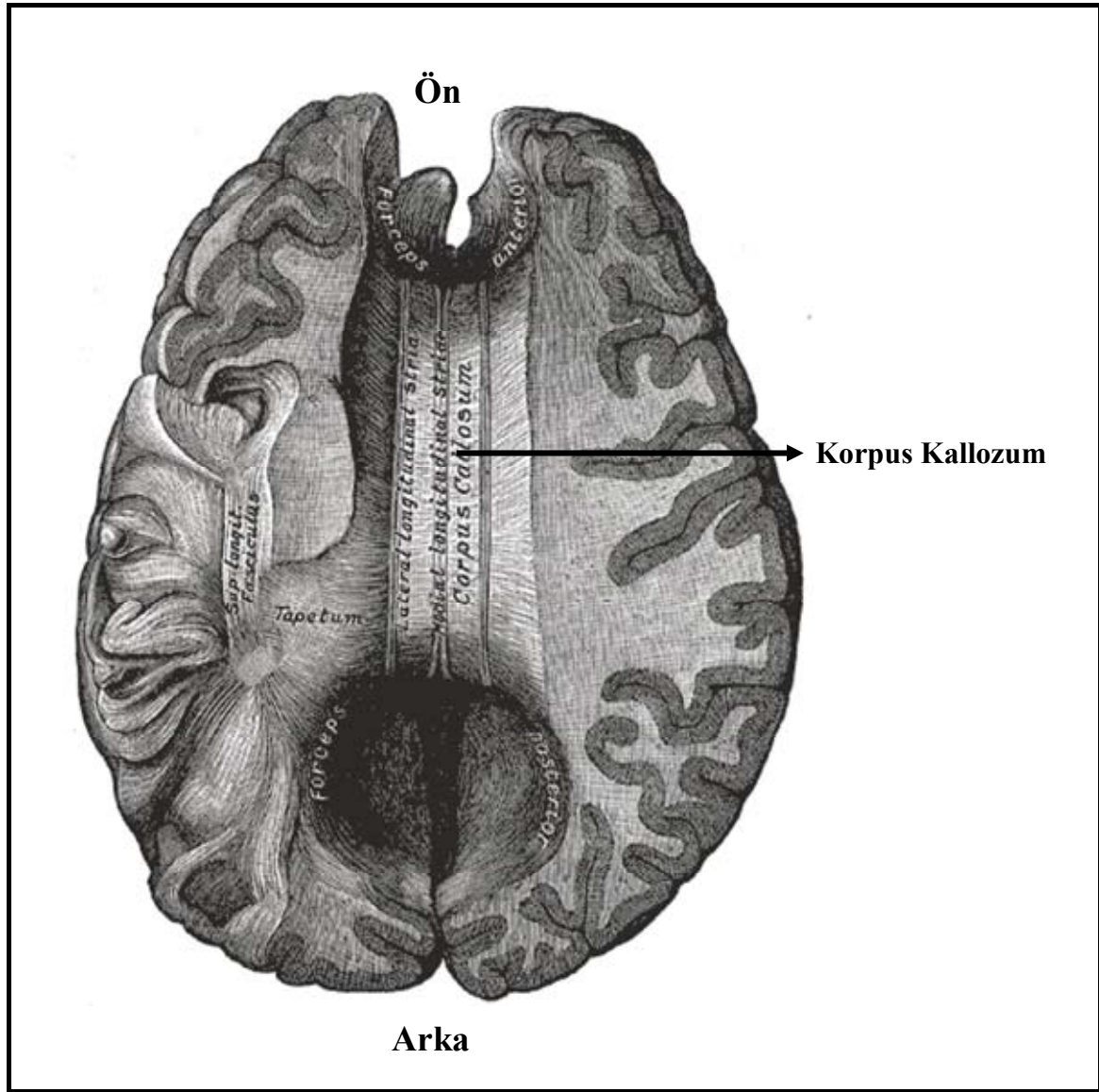
Bu yapılar morfolojik farklılık göstermelerinin ötesinde fonksiyon açısından da kendi içinde özelleşmişlerdir. Örneğin diz ve rostrum bölgeleri vücut şeması, işitsel ve bilişsel

iletim yolları ile ilişkilidir. Gövde kısmı ipsilateral motor yollar ve karmaşık dokunma bilgileri taşıyan yolların kesiştiği bölgedir. Splenium ise hemisferler arası görsel duyu ve sözel enfemasyonun sağlanmasında rol oynar.

### **2.1.3. Normal Gelişimi**

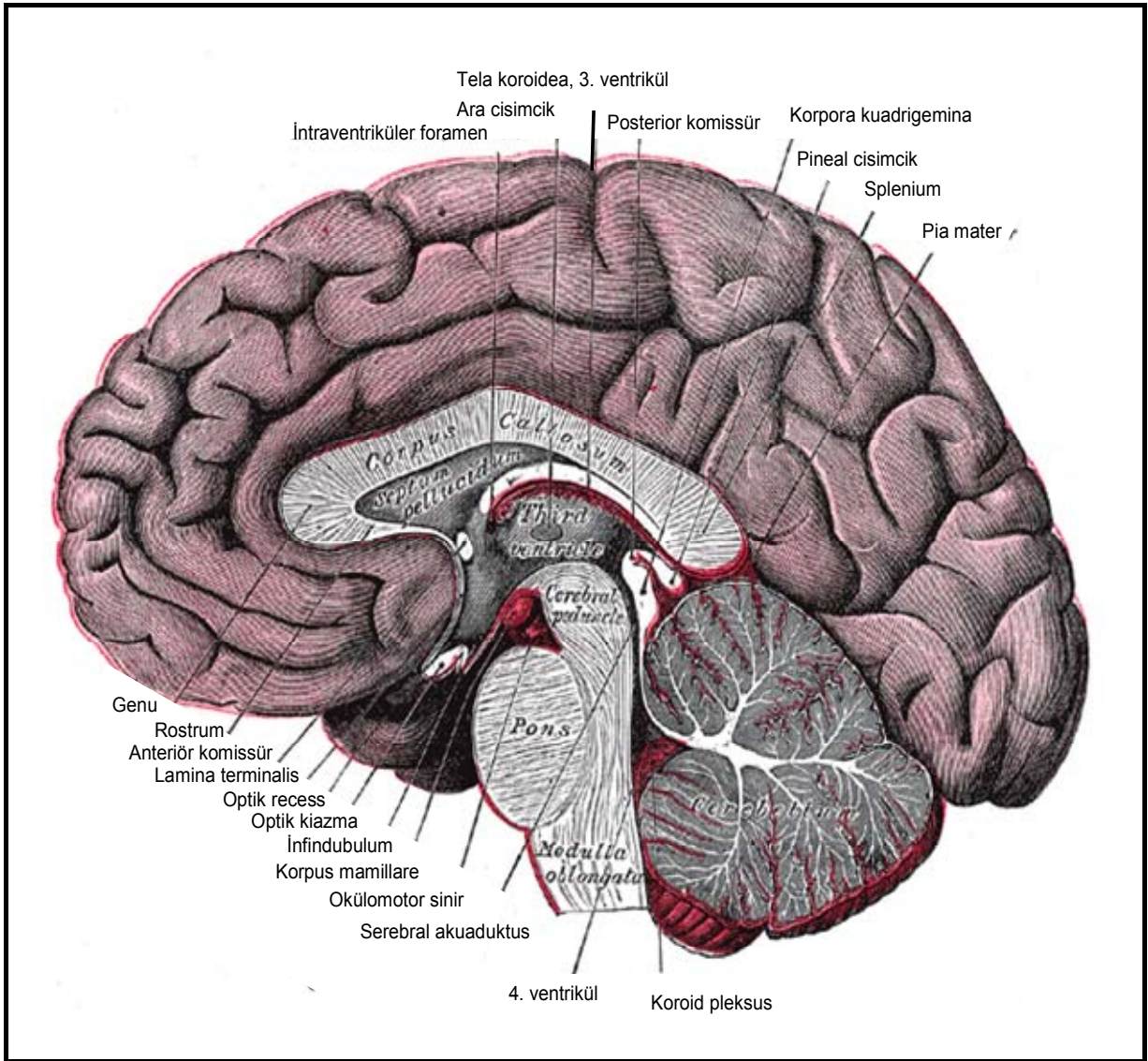
Korpus kallozumun gelişimi, ilk başta doğru orta hat paterni, telensefalik yarımkürelerin oluşması, karşı yarımküredeki hedefe ulaşmak için aksonlara rehberlik edilmesi ve bağlantı nöronlarının özelleşmesi olmak üzere birçok basamaktan oluşur (2). Kallozal gelişimle ilgili bugün bilinenlerin hemen hepsi hayvan modeli çalışmalarından elde edilmiştir (29,30).

Korpus kallozumun gelişimi gestasyonel 6. haftada başlar (11). Bu dönemde karşı beyin yarımküresine geçmek üzere mediale doğru gelişimleri gözlenebilir. Onbir-12. haftalarda ilk sinir uzantıları, ön ve hipokampal komissürler arasında yerleşen massa komissuralis boyunca karşı beyin yarımküresine geçer. Massa komissuralis daha sonra korpus kallozumu oluşturacaktır. Beynin gelişimi süresince akson yolakları, hayvan modellerinde de gösterildiği gibi, genel olarak korunmuş ontogenetik sıraya göre şekillenirler (31,32). Çoğu akson, glia gibi nöral olmayan hücrelerle birlikte gelişimlerini sürdürür. Bu yardımcı hücreler öncü aksonların hedeflerine ulaşmasına rehberlik ederler (33-35). Bu şekilde, nöronlara ek olarak bir kısım glial hücrelerin de kallozal gelişimde görev yaptıkları ortaya konmuştur. Bu glialardan ‘orta hat fermuarı’ olarak adlandırılan bir kısmının, adından da anlaşılacağı üzere korpus kallozumun oluşumunda çok önemli bir safha olan orta hat füzyonuna öncülük ettiği gösterilmiştir (36). Araştırmacılar ayrıca dorsomedial lateral ventriküllerde oluşan ‘glial kama’ ve indisyum griseumda şekillenen glial hücre gruplarının da korpus kallozum gelişiminde çok önemli role sahip olduklarını gösterdiler (37,38). Orta hat yürüyüşü (midline sling) adı verilen ve esas itibarı ile göç edici nöronlardan oluşan bir diğer yapı ise orta hatta aksonların karşı yarımküredeki hedeflerine ulaşmalarını sağlayan bir köprü oluşturur (39). On sekiz-20. gebelik haftasında korpus kallozumun son şeklini alması beklenir. Bununla birlikte kaudal olarak büyümeye ve genel olarak kalınlaşmaya devam eder.



**Şekil 2.1:** Beynin iki yarımküresini bağlayan korpus kallozumun el çizimi alttan görünüşü.

(Grey's Anatomy, ABD, 20. baskısından değiştirilerek alınmıştır)



**Şekil 2.2:** Korpus kallozumun anatomik yapısı ve komşulukları el çizimi şematik görünümü, sagittal kesit (Grey's Anatomy, ABD, 20. Baskı'dan değiştirilerek alınmıştır).

#### 2.1.4. Korpus Kallozum Anomalilerinin Tanımlanması

Korpus kallozum gelişim kusurlarının tanımlanmasında araştırmacılar tarafından kullanılan terimler aynı olsa da, bu terimlere karşılık gelen anomalinin ne olduğu hususunda tam bir mutabakat olduğu söylenemez. Örneğin, bazı araştırmacılar korpus kallozumun total ve parsiyel agenezisini ‘korpus kallozum agenezisi’ adı altında toplarken, farklı çalışmalarda korpus kallozum agenezisi tanımlamasının sadece total agenezi için kullanılması önerilmiş ve parsiyel ageneziler ‘hipogenezi’ olarak ifade edilmiştir (40). Bu alandaki ihtiyacı Hanna ve arkadaşları bu yılın başlarında yayınladıkları bir çalışma ile bir ölçüde gidermişlerdir (41). Bu çalışmada korpus kallozumun total yokluğu ‘korpus kallozum agenezisi’ olarak tanımlanmaktadır. Korpus kallozumun tüm kısımlarının şekillendiği ancak normalden ince (yaygın veya kısmen) olduğu durumlar için ‘Displazinin eşlik etmediği hipoplazi’ tanımlaması kullanılmıştır. Korpus kallozumun tam olarak şekillenemeden ön kısımda bir nokta olarak kaldığı durumlar da bu gruba dâhil edilmişlerdir. Displazi ise hipoplazinin eşlik edip etmemesine göre aşağıdaki gibi tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır (Şekil 2.3 ve 2.4).

#### 2.1.5. İnsanlarda Korpus Kallozum Gelişim Kusurlarının Nedenleri

##### 2.1.5.1. Çevresel Nedenler

Korpus kallozumun gelişimi itibariyle birçok genetik ve çevresel faktörün etkisi altında olduğu bilinmektedir. Kallozal gelişim sorunlarına neden olan asfiksi, hipoksik iskemik ensefalopati, kronik hipoksi, teratojen etkenler (örn. etanol), yer kaplayan lezyonlar ve yaralanma gibi birçok çevresel etken mevcuttur.

Bu etkenlerin arasında korpus kallozum gelişimi üzerindeki etkisi en net tariflenen Fetal Alkol Sendromu’dur (FAS). FAS olgularındaki korpus kallozum agenezisi oranı %6.8’dir (42). Birçok vakada ise korpus kallozum hipoplazisi gözlenmiştir. Bu olgularda kallozal gelişimin sonraki basamaklarının etkilendiği düşünülebilir. Hem klinik hem de deneysel tecrübeler in utero alkol maruziyetinin gliogenezisi ve glia-nöron hücreleri etkileşimini azalttığını ortaya koymuşlardır (43,44). Bu iki süreç, beynin birçok yapısı için olduğu gibi korpus kallozumun gelişimi açısından da büyük öneme sahiptir. Yine etanolün *LICAM* (L1 hücre adhezyon molekülü) geninin transkripsiyonunu ve biyokimyasal aktivitesini olumsuz etkilediği yönünde çalışmalar da bulunmaktadır (45-47).

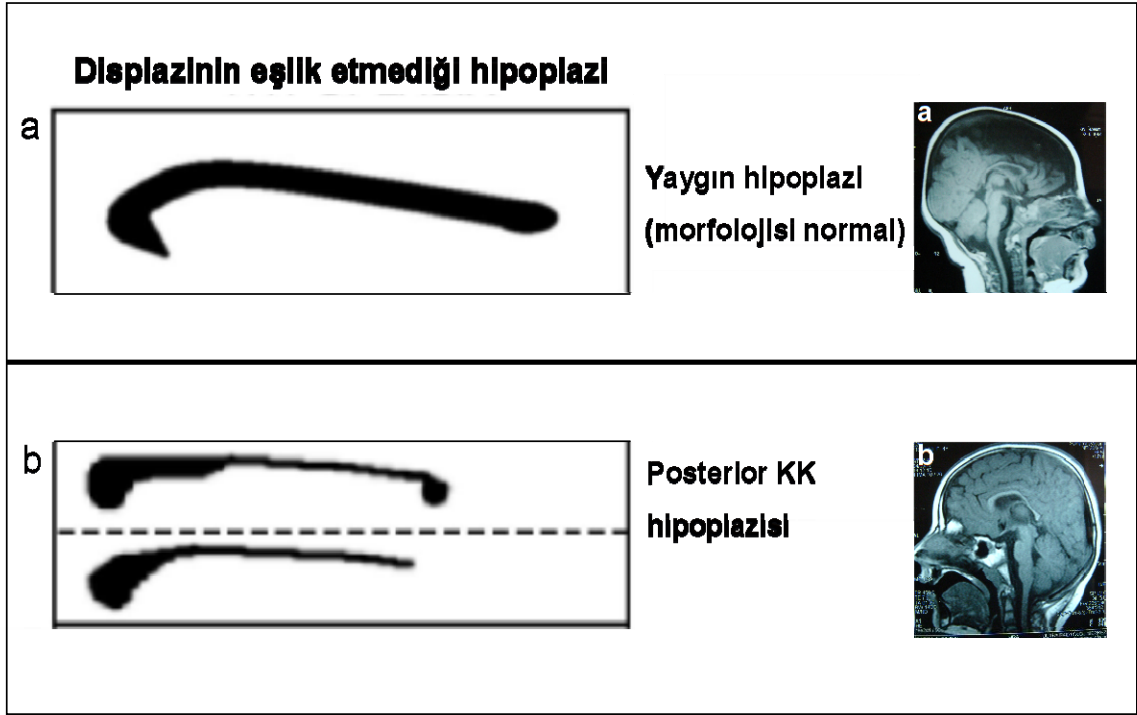
## 2.1.5.2 Genetik Nedenler

### 2.1.5.2.1. Kromozomal Anomaliler ve Yeniden Düzenlenmeler

Korpus kallozum gelişim kusurları, yaygın trizomi sendromları (trizomi 21, 18 ve 13) dışında çok sayıda kromozomal anomalide bildirilmiş olmakla birlikte bunların en sık olanı 1p36 delesyonu sendromudur (MIM 607872) (Şekil 1.5). Bu sendrom, klinik olarak tanımlanabilir fenotipe sahip en yaygın terminal delesyon tablosudur (22). Bu delesyondan etkilenmiş hastaların incelendiği derlemelerde %5.8 oranında kallozal anomali birlikteliği bildirilmiştir (48-50). Bu hastalarda daha çok agenezi olmaksızın ince korpus kallozum görüldüğü ifade edilmektedir (51). Bildirilmiş bir diğer sorumlu kromozom bölgesi ise 1. kromozom uzun kolu 4. bant bölgesidir (1q4). Bu hastalarda yapılan çalışmalarda *AKT3* geninin korpus kallozum agenezisi ile ilişkili olduğu saptanmış ve bu bulgu hayvan deneyleri ile de ispatlanmıştır (52-54). Bunlara ek olarak 6p25 ve 6q2 delesyonu, 8p'deki yeniden düzenlenmeler, 13q delesyonu ve 14q delesyonu, korpus kallozum gelişim bozukluklarının rapor edildiği önde gelen kromozom anomalileridir (55-63).

14q'da bulunan *FOXG1* geninin korpus kallozum agenezisinden sorumlu bir diğer gen olduğu bazı araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir (64).

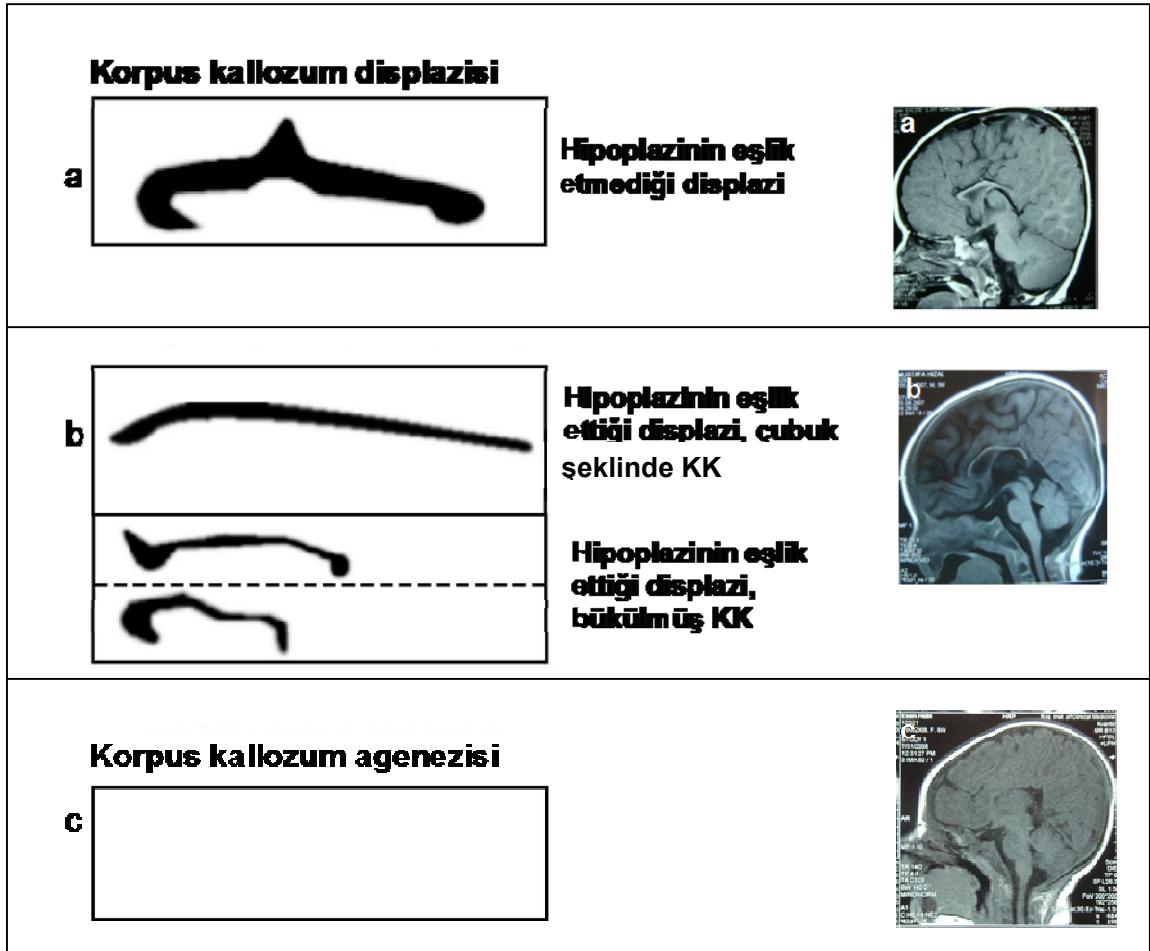




**Şekil 2.3:** Korpus kallozum anomalilerinin tanımlanması; (a) Displazinin eşlik etmediği yaygın hipoplazi, (b) Korpus kallozum posterior kısmında hipoplazi. Yan tarafında ise hasta grubumuzda benzer kallozal anomali bulunan hastaların mid sagittal beyin MR görüntüleri.

(Şekil Hanna ve ark., 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

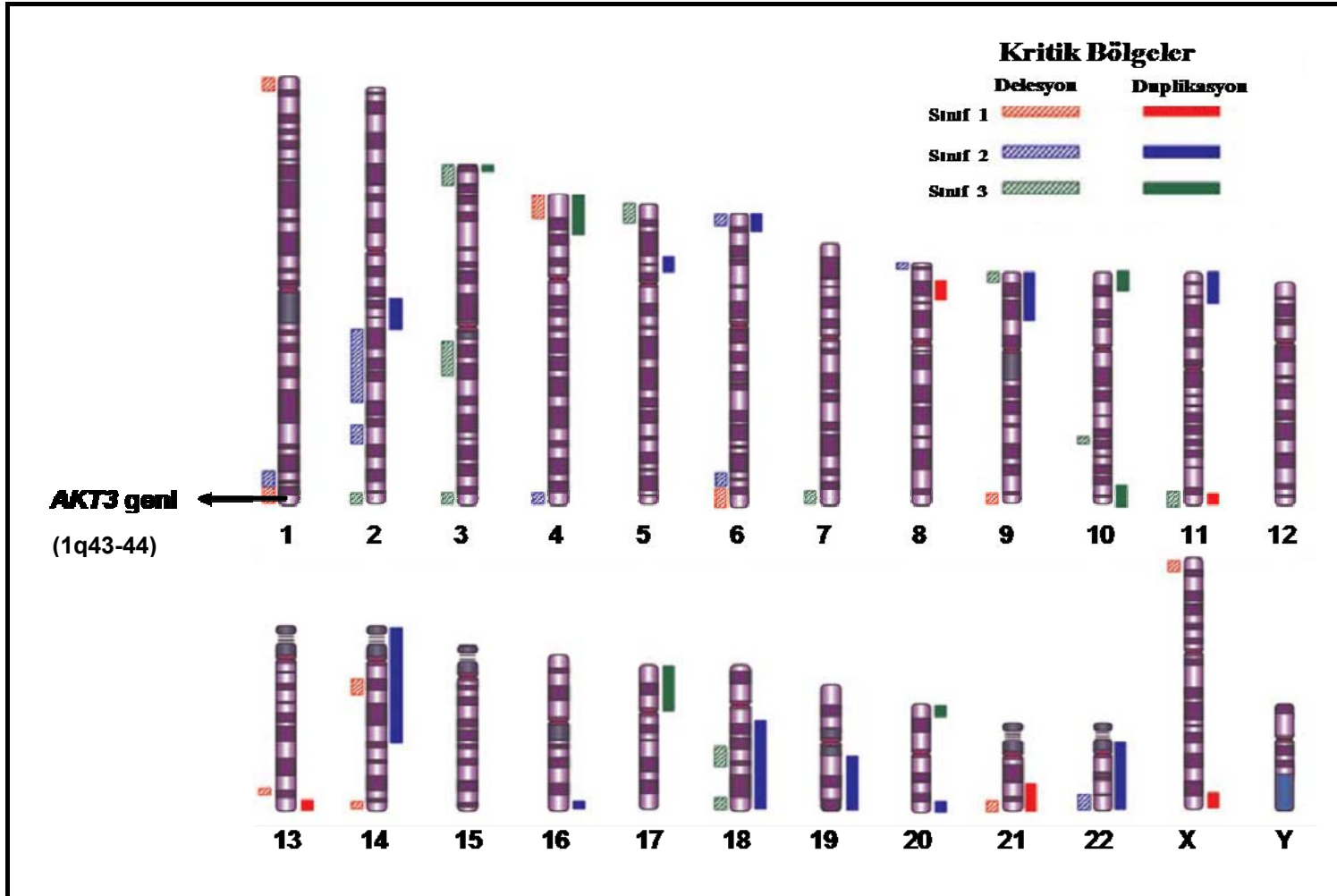
**KK:** Korpus kallozum



**Şekil 2.4:** Korpus kallozum displazisi; (a) Hipoplazinin eşlik etmediği displazi, (b) Hipoplazinin eşlik ettiği displazinin şematik görünümü ve hasta grubumuzda benzer kallozal anomali bulunan hastaların mid sagittal beyin MR görüntüleri.

(Şekil Hanna ve ark., 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

**KK:** Korpus kallozum



**Şekil 2.5:** Korpus kallozumun doğumsal gelişim anomalileri ile ilişkili kromozom bölgeleri. Delesyon ve duplikasyonlar kallozal anomaliye yol açma sıklıklarına göre 3 sınıfa ayrılmış olup, her bir sınıfa ait renkli kutucukla gösterilmiştir. KK agenezisi ile ilişkisi ispatlanmış tek gen olan AT3 geni 1q44 bölgesinde siyah okla gösterilmektedir (O'Driscoll ve ark., 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

### 2.1.5.2.2. Sendromik Nedenler

Korpus kallozum gelişim bozuklukları kromozom anomalilerinin dışında çok çeşitli genetik bozukluğa bağlı oluşabilir. Bu bir bakıma kallozal gelişim sürecinin kompleksliğinin bir göstergesidir (2,11,22). İlgili retrospektif derlemeler ve kros-seksiyonel kohort çalışmaları, kollazal gelişim bozukluğu olan hastaların yaklaşık % 30-45’inde altta yatan nedenin aydınlatıldığını göstermektedir (2). Bu hastaların yaklaşık %10’nunda kromozom anomalisi varken, kalan %20-35’nin tanımlanmış bir genetik sendromdan etkilendiği bildirilmektedir (12) (**Tablo 2.1**). Kollazal disgenezi sadece korpus kallozum agenezisi ile sınırlı tutulursa tanımlanabilir sendrom oranı 10-15%’e düşmekte ve bu durumda altta yatan nedenin ortaya çıkarılması gereken kısmın 75%’lik bir orana sahip olduğu görülmektedir (2, 11, 12).

Kallozal disgenezi ile ilişkili bazı Mendelyen sendromlar aşağıda detaylandırılmıştır:

**2.1.5.2.2.1. Akrokallozal Sendrom (AKS; Schinzel sendromu):** Çift ayak başparmağı, post aksiyel polidaktili ve korpus kallozum agenezisi ile karakterize otozomal resesif bir sendromdur (65). Bunlara ek olarak hipertelorizm ve farklı klinik ağırlıkta psikomotor gerilik başta olmak üzere çok sayıda sistemik bulgular da tariflenmiştir (66,67). Elson ve arkadaşları 2002 yılında 1 hastada *GLI3* geninde mutasyon tanımlamış olmakla birlikte farklı bazı çalışmalarda bu genin dışlanmış olması ve yine bazı haritalama çalışmalarında 12. kromozm kısa kolundaki bir bölgenin AKS ile ilişkilendirilmesi nedeniyle bu sendromun genetik heterojenite gösterdiği ve farklı hastalarda farklı genlerde mutasyonların etyolojiden sorumlu olabileceği bildirilmektedir (68).

**Tablo 2.1:** Korpus kallozum anomalisi ile ilişkili sendromlar ve tanımlanmış gen ve lokalizasyonları

Sendromlar	Öne çıkan Klinik Özellikler	Sorumlu Gen	Lokalizasyon
<b>Tanımlanmış gen(ler) bulunan sendromlar</b>			
XLAG	Lizensefali, KKA, inatçı epilepsi	<i>ARX</i>	Xp22.13
Mowat Wilson sendromu	Hirschsprung hastalığı, KKA	<i>ZFHX1B</i>	2q22
KKA'nın eşlik ettiği fatal laktik asidoz	KKA, beyin anomalisi	<i>MRPS16</i>	10q22.1
HSAS/MASA sendromu	Hidrosefali, addukte el baş parmakları, KKA, MR	<i>LICAM</i>	Xq28
Donnai–Barrow sendromu	Diafragmatik herni, ekzomfalos, KKA, sağırılık	<i>LRP2</i>	2q24-q31
FG sendromu	MR, KKA, kraniyofasial değişiklikler, makrosefali	<i>MED12, FLNA</i>	Xq13, Xq28
Akrokallozal sendrom	KKA, polidaktili, kraniyofasial değişiklikler, MR	<i>GLI3</i>	7p13
<b>KKA'nın görüldüğü ancak sorumlu genin saptanamadığı sendromlar</b>			
Aicardi sendromu	KKA, korioretinal lakün, infantil spazm, MR		Xp22
Chudley–McCullough sendromu	İşitme kaybı, hidrosefali, KKA, kolposefali		
Genitopatellar sendrom	Patella yokluğu, ürogenital malformasyonları, KKA		
Temtamy sendromu	KKA, optik kolobom, kraniyofasial değişiklikler, MR		
Toriello–Carey sendromu	KKA, kraniyofasial değişiklikler, kardiyak defekt, MR		
<b>KKA'nın nadir görüldüğü sendromlar</b>			
KKA'nın eşlik ettiği spastik paraparezi	Progresif spastisite ve nöropati, ince korpus kallozum	<i>SPG11</i>	15q21.1
Kraniyofrontonazal sendrom	Koronal kraniyosinostozis, fasial asimetri, yarık burun	<i>EFNB1</i>	Xq12
Fryns sendromu	KDH, pulmoner hipoplazi, kraniyofasial değişiklikler		
Marden–Walker sendromu	Blefarofimozis, mikrognati, kontraktürler, KKA		
Meckel–Gruber sendromu	Ensefalosel, polidaktili ve polikistik böbrekler	<i>MKS1, TMEM216, TMEM67, CEP290, RPGRIPL, CC2D2A</i>	17q23 11q13 8q 12q 16q12 4p15
Lineer deri defektli mikroftalmi	Mikroftalmi, çizgisel deri defektleri, nöbetler	<i>HCCS</i>	Xp22
Opitz G sendromu, X'e bağlı tip	Farengyal yarık, kraniyofasial değişiklikler, KKA, MR	<i>MID1</i>	Xp22
Orofasiodigital sendrom, Tip 1	Dilde hamartom, mikroretrognati, klinikodaktili	<i>CXORF5</i>	Xp22.3-p22.2
Piruvat dekarboksilaz eksikliği	Laktik asidoz, nöbetler, ağır MR ve spastisite	<i>PDHA1</i>	Xp22.2-p22.1
Rubinstein–Taybi sendromu	Geniş el ve ayak baş parmakları, MR, mikrosefali	<i>CREBBP, EP300</i>	16p13 22q13
Septo-optik displazi (DeMorsier sendromu)	Septum pellucidum ve optik kiazma hipoplazisi	<i>HESX1</i>	3q21.1-p21.1
Sotos sendromu	Fiziki aşırı büyüme, MR, kraniyofasial değişiklikler	<i>NSD1</i>	5q35
Warburg Micro sendromu	Mikrosefali, mikroftalmi, mikrogenitalya, MR	<i>RAB3GAP</i>	2q21.3

#### **2.1.5.2.2.2. Korpus Kallozum Agenezisi ve Kuşku Genitalyanın Eşlik Ettiği X'e Bağlı Lizensefali (XLAG):**

Aristaless ilişkili homebox genindeki (*ARX*) mutasyonlar sonucu oluşur. Bu sendrom ilk kez erkeklerde tanımlanmıştır. Daha sonraları *ARX* gen mutasyonu olan kız çocuklarında da bildirilmiştir (69). Kız çocuklarında klinik normal olabileceği gibi spastisite, mental retardasyon ve nöbetler de görülebilir ki klinik bulgulardaki bu durumun X inaktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu hastaların beyin manyetik rezonans görüntülemesinde (MRG) Probst demetlerinin eşlik ettiği izole KKA'ne rastlanmıştır (70). Hayvan modeli çalışmalarında kullanılan *Arx*-knockout erkek farelerde kallozal disgenezi ve diğer XLAG sendromunda görülen semptomlara rastlanmıştır (71). Bu farelerde rastlanan kortikal internöronların belirgin azlığının bu hastalarda görülen kontrol edilemeyen inatçı nöbetlerden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (72).

#### **2.1.5.2.2.3 CRASH Sendromu:**

İsmi majör klinik özellikleri olan korpus kallozum agenezisi, mental retardasyon, addukte el başparmağı ve hidrosefalinin baş harflerinden alır. Bu hastalarda beyin sapındaki kortikospinal ağda belirgin azalma mevcuttur. L1 hücre adezyon molekülü (L1 cell adhesion molecule, *LICAM*) genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Bu gen özellikle merkezi sinir sisteminde eksprese olan bir transmembran hücre adezyon molekülünü kodlar. *LICAM*' in inaktive edildiği farelerde total ya da parsiyel KKA, hidrosefali, küçük kortikospinal yolaklar, azalmış nöron sayısı ve ilave olarak kortikal piramidal nöronların apikal dentritlerinde işleyiş bozukluğu gözlenmiştir (73). Yakın zamanda elde edilen veriler, *LICAM*'in homofilik bağlanmasının inhibe edilmesi durumunda hidrosefalinin geliştiği ancak kallozal disgenezinin oluşması için integrinler de dâhil heterofilik etkileşmelerinin de engellenmesi gerektiğini ortaya koymuştur (74). Burada dikkat çeken bir diğer husus da heterozigot knockout farelerin parsiyel KKA gösterirken, homozigotların total KKA göstermesidir. Buradan hareketle gen dozaj etkisinden söz edilebileceği öne sürülmektedir (75).

#### **2.1.5.2.2.4 Anderman Sendromu:**

Otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren bu sendromda kallozal disgenezi (hipoplazi veya agenezi) bilişsel fonksiyonlarda zayıflık, psikoz atakları, progresif merkezi ve periferik nöropati bildirilmiştir. KCL (potasyum-klorür) kotransporter'ı kodlayan *KCC3* genindeki (sinonimi *SLC12A6*) mutasyonlarla oluşur. Bu genin bloke edildiği fare

modellerinde nörodejenerasyon, işitme kaybı ve ilerleyici nöropati gözlenmiştir (76). *KCC3* mutasyonu olan bazı hastalarda korpus kallozumun tamamıyla oluştuğu görülebilmektedir. Aile içi klinik çeşitliliklerin de görülebilmesi farklı genetik etkenlerin de sürece katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanmaktadır (2).

#### **2.1.5.2.2.5. Aicardi Sendromu**

Kallozal agenezi, infantil spazm ve koryoretinal lakün üçlemesiyle karakterize X'e bağlı dominant bir hastalıktır. İlk kez 1969 yılında Aicardi ve arkadaşları tarafından 15 bayan hastada tanımlanmıştır (77). İnfant dönemdeki fleksiyon spazmları genellikle ilk klinik prezentasyon bulgusudur. Aicardi sendromuna yol açan mutasyonların hemizigot erkekler için letal etki gösterdiği ve bu nedenle de ilgili mutasyonların tümünün de novo olduğu belirtilmektedir (78). Diğer taraftan Curatolo ve arkadaşları tarafından tanımlanmış erkek (46,XY) bir Aicardi sendromu hastası da mevcuttur (79). Xp22 bölgesinin hastalıktan sorumlu lokusu taşıdığı belirtilen Aicardi sendromunun bugün için tanımlanmış bir geni bulunmamaktadır.

#### **2.1.5.2.2.6. Meckel-Gruber Sendromu**

Oksipital ensefalosel başta olmak üzere merkezi sinir sisteminin gelişimsel anomalileri, hepatik duktal kistler ve polidaktili ile karakterize, otozomal resesif bir siliyopati sendromudur. Bugüne kadar Meckel-Gruber sendromundan sorumlu 6 gen tanımlanmıştır. Bunlar 17q23'teki flagellar apparatus basal body proteome (MKS1), 11q13'teki *TMEM216* (MKS2), 8q'daki *TMEM67* (MKS3), 12q'daki *CEP290* (MKS4), 16q12.2'deki *RPGRIP1L* (MKS5) ve 4p15'deki *CC2D2A* (MKS6) genleridir. Hayvan modellerinde ilgili genlerin etkisizleştirilmesinin KKA, hidrosefali, ve böbrek kistlerine yol açtığı gösterilmiştir (80).

## 2.2. KROMOZOM MORFOLOJİSİ VE SUBTELOMERİK BÖLGELERİN ÖZELLİKLERİ

İnsan somatik hücrelerinde 23 çift kromozom bulunmaktadır. Bunlardan 22'si otozom olarak adlandırılır. 23. çift cinsiyeti belirleyen cinsiyet kromozomlarıdır (X ve Y). Toplam 46 kromozom olup kromozom kuruluşu dişilerde 46,XX, erkeklerde 46,XY şeklindedir.

Hücre bölünmesinin metafaz evresi kromozomların en iyi gözlenebildiği ve incelendiği evredir. Metafaz evresindeki kromozomlar en kısa ve en kalın hallerinde olurlar ve tipik şekillerini gösterirler. Bu safhadaki bir kromozomda genel olarak sentromer, primer boğum, sekonder boğum, telomer ve satellit kısımları ayırt edilebilir (**Şekil 2.6**).

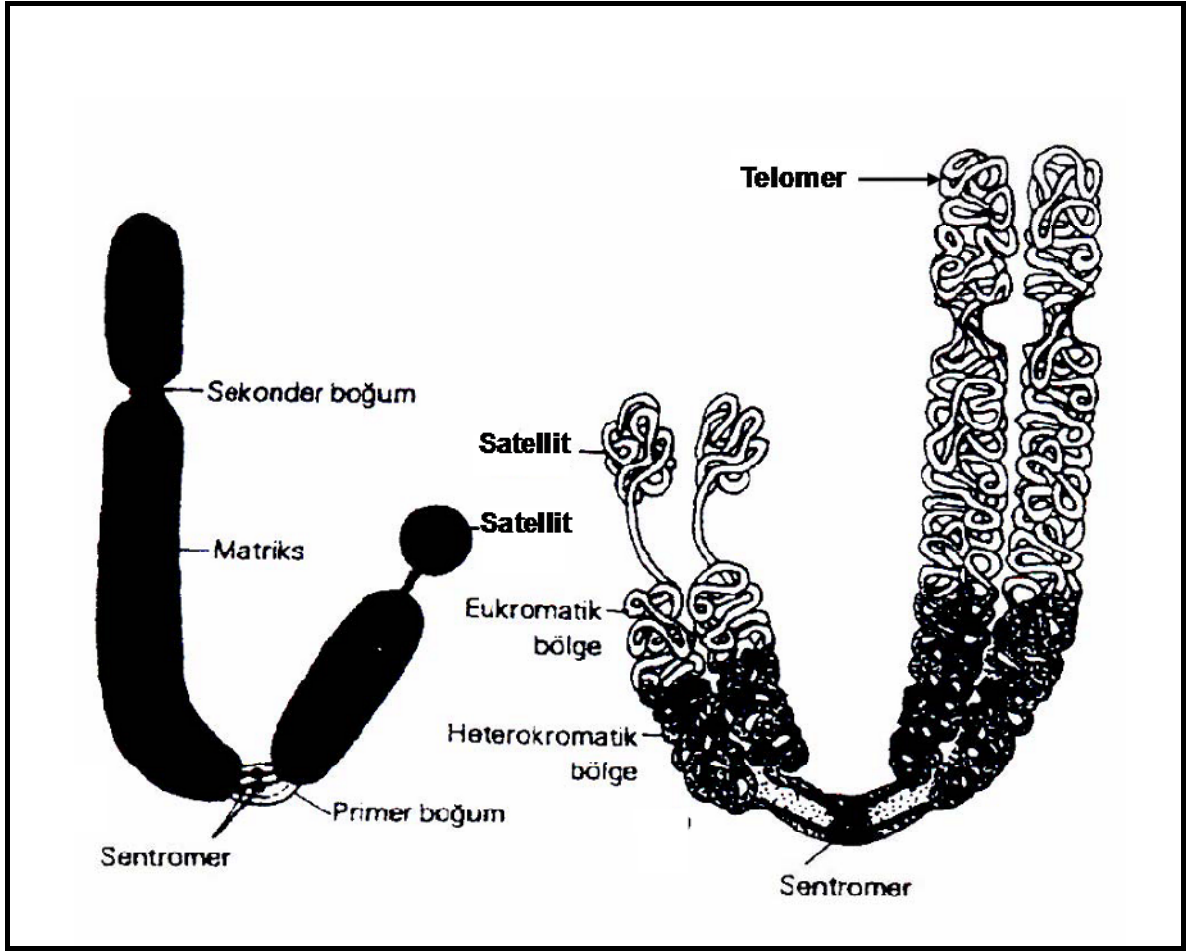
Kromozomlardaki telomer bölgeleri, her iki uçta kromozomu örten özel yapılardır. Bu bölgedeki DNA birkaç bin kez tekrarlanan diziler içerir. Bu dizi bir DNA zincirinde TTAGGG iken komplementer zincirde CCCTAA şeklindedir. Bu tekrar dizileri ortalama 10kb uzunluğundadır (81).

Telomerler kromozom uçlarının düzgün ve tam bölünebilmelerinde önemli rol üstlenirler. Yine homolog kromozomların mayozun profaz safasında eşleşmesinde kritik görev üstlenirler. Telomer bölgeleri aynı zamanda farklı proteinlerle etkileşim gösterirler. Bunlardan en önde geleni, serbest DNA uçlarını ekzonükleazlardan koruyan proteinlerdir. Diğer proteinlerin ise telomerlerin mitoz esnasında hücre çekirdek zarı ve birbirleri ile etkileşimde rol aldıkları düşünülmektedir (82).

Subtelomerik bölgeler ise ökromatik kromozomun 500kb'lık terminal kısmı olarak tanımlanmaktadır ki bu tanım önceden karakterize edilmiş subtelomerik tekrar bölgelerinin tümünü içermektedir (83,84). İnsan kromozomunun subtelomerik bölgesi kısaca subtelomerik tekrarlar, segmental duplikasyonlar, satellit dizileri ve TTAGGGn benzeri dizi bölgeleri içermektedir (85) (**Şekil 2.7**).

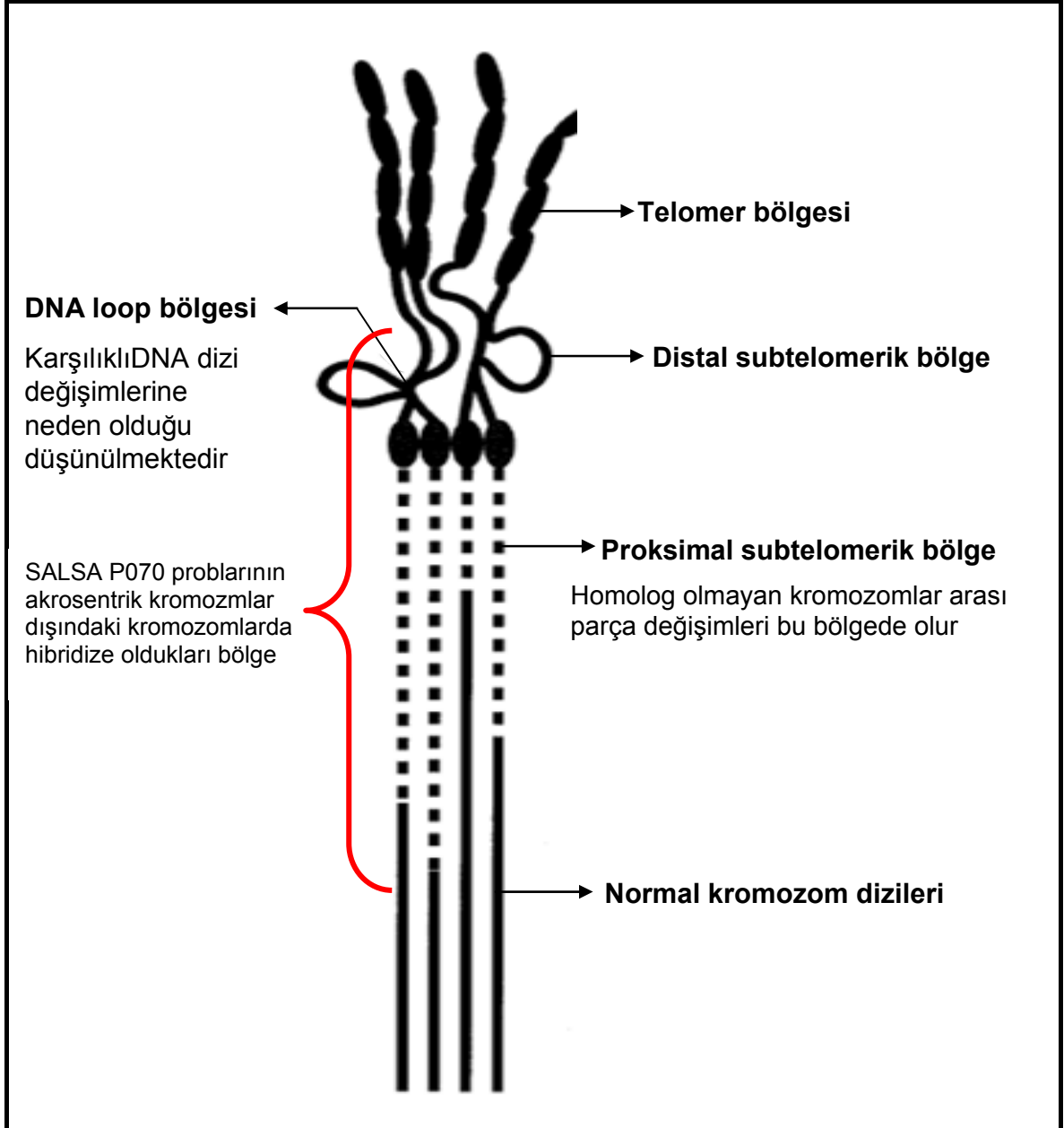
Subtelomerik bölgeleri önemli kılan özelliği zengin gen içeriği olması ve patolojik kromozomal yeniden düzenlenmelerin, kromozomun diğer kısımlarına nazaran buralarda daha sık meydana gelmesidir (14,15). Daha önce de belirtildiği üzere subtelomerik yeniden düzenlenmelerin klasik sitogenetik yöntemlerle yakalanması oldukça zordur. Bununla birlikte subtelomerik submikroskopik değişikliklerin zamanla geliştirilen yeni moleküler sitogenetik yöntemlerle (fluorescent in situ hybridization (FISH), multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) ve array comparative genomic hybridization (aCGH)) saptanması gittikçe kolaylaşmaktadır.





**Şekil 2.6:** Kromozomun morfolojik şeması

(Demirsoy,1991, Yaşamın Temel Kuralları'ndan değiştirilerek alınmıştır (Ref. 86)).



**Şekil 2.7:** Telomerik ve subtelomerik bölgelerin şematik görünümü. Kırmızı ok ile işaretlenmiş bölge MLPA Salsa P070 problemlerinin akrosentrik olmayan kromozomlarda ağırlıklı olarak hibridize oldukları alanları göstermektedir.

(Flint J ve ark., 1997'den değiştirilerek alınmıştır (Ref. 87)).

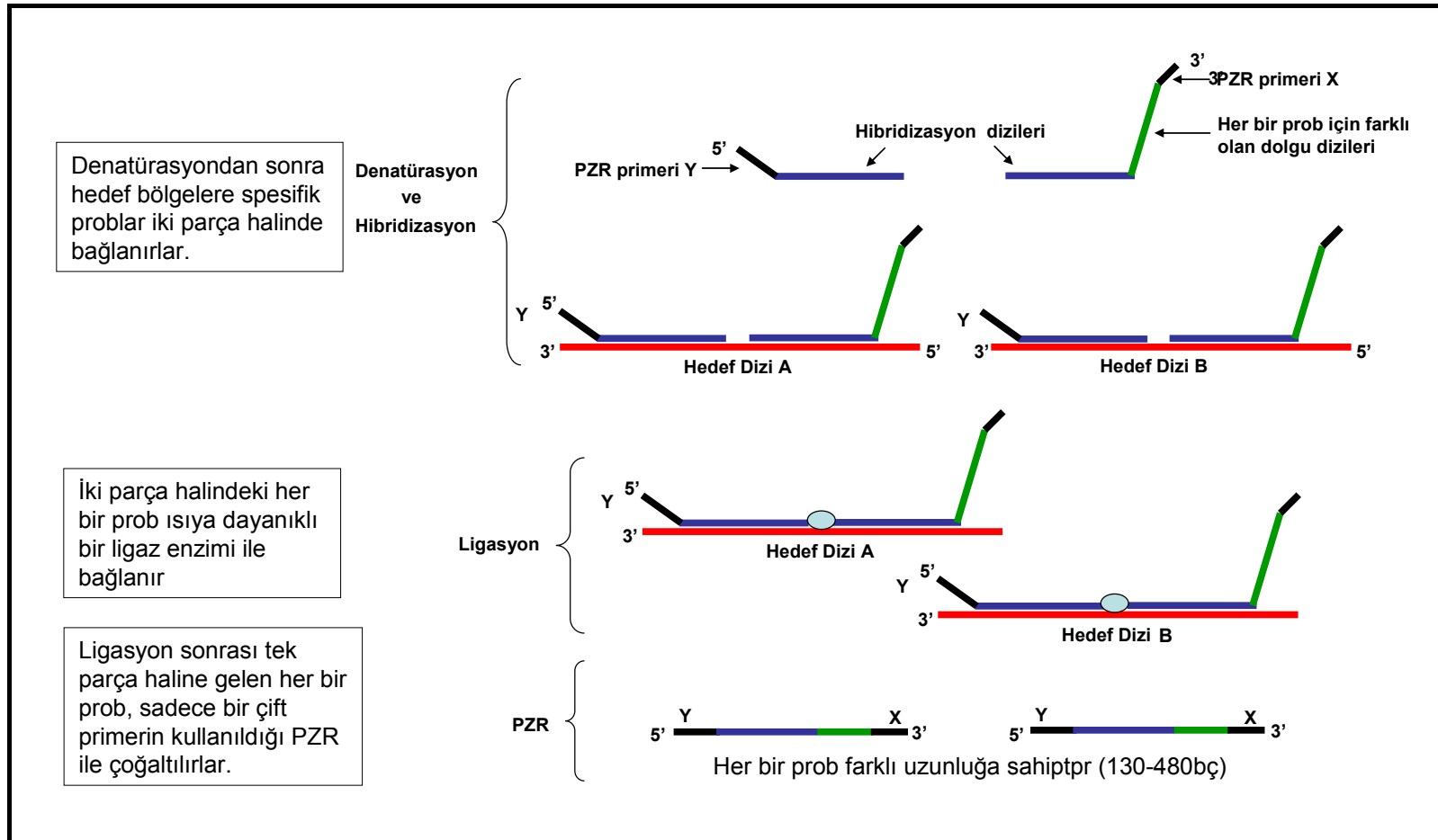
## 2.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

### 2.3.1 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)'nın Genel Özellikleri

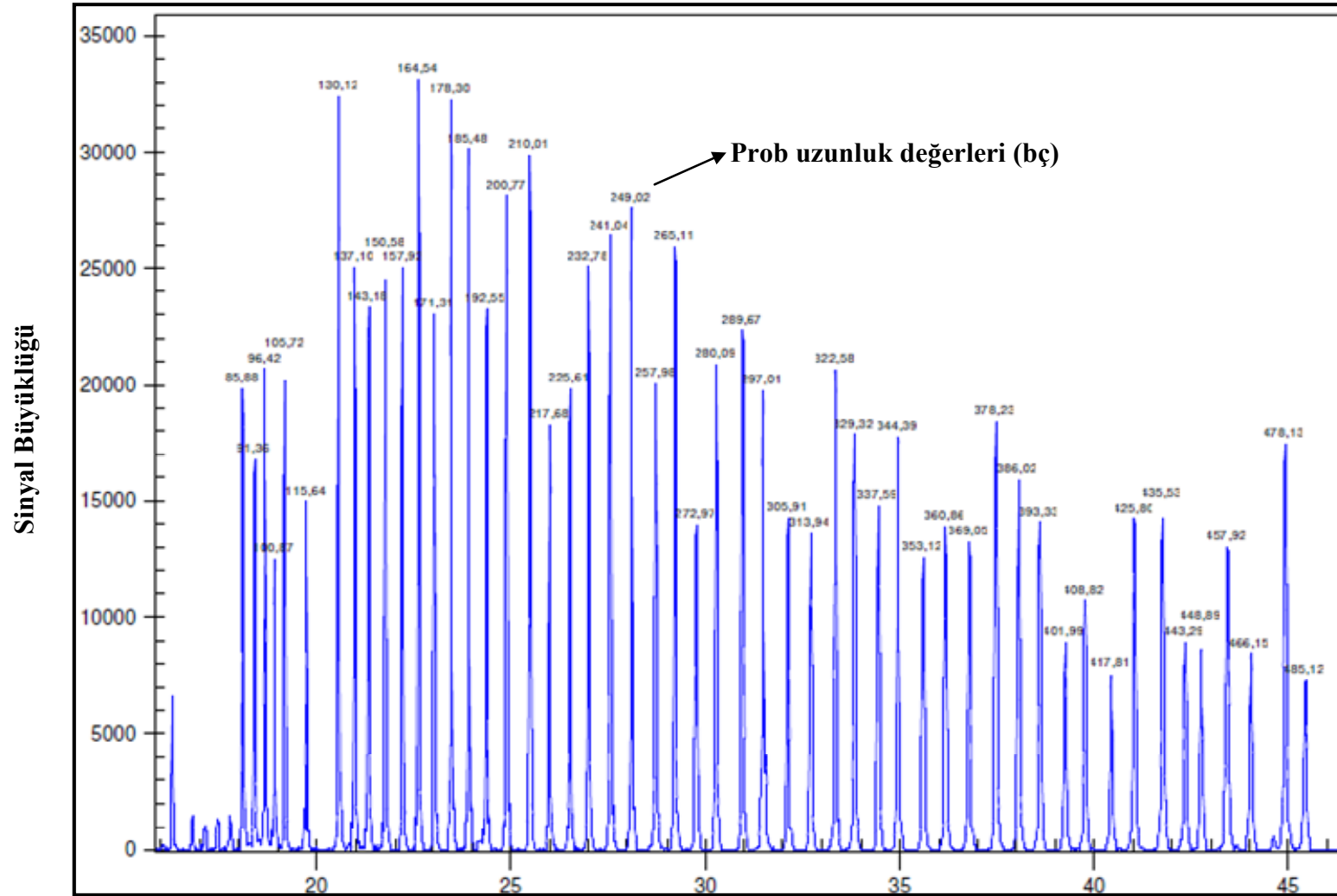
Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tanımlamışlar ve son haliyle relatif niceleyici (kantitatif) PZR yöntemi olarak tariflemişlerdir (88). MLPA; 45 taneye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PZR'dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir methodtur (**Şekil 1.8 ve 1.9**). Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130 - 490 baz çifti (bç) arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir. Tekniğe; kolay uygulanabilir, üretken, sensitif olması ve doğru multipleks analiz sonucu verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır (89). Her bir MLPA probu hedef diziyeye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış probalar 5' ve 3' uçlarında PZR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PZR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziyeye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PZR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı kullanılmıştır (88). M13 DNA'sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA'yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziyeye mükemmel bir komplementer olacak

şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle proplar arasında 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün proplar farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı propların birbirleri ile heterodubleks formasyonunu önlemek için propların sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotitler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki proplar amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid proplarının hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları farklı uzunlukta amplifikasyon ürünlerinin oluşturulmasında rol oynar. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (89).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PZR ile amplifikasyonda bütün proplar için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N- (3- fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (90). Genomik DNA' da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir. (91).



**Şekil 2.8:** MLPA'nın çalışma prensibi  
(Schouten ve ark., 2002'den faydalanılarak çizilmiştir)



Şekil 2.9: Amplifiye edilen MLPA problemlerinin kapiller jel elektroforezinde yürütülmesi ile elde edilen pikler.

(Schouten ve ark., 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

### 2.3.3 SUBTELOMERİK YENİDEN DÜZENLENMELERİN TESBİTİNDE MLPA TEKNİĞİNİN KULLANIMI

Çalışmamızda kullanılan MLPA Salsa P070 kiti, her bir subtelomerik bölge için bir prob içermektedir. Probların çoğu telomer komşuluğunda bulunan iyi karakterize edilmiş genlere hibridize edilecek şekilde tasarlanmışlardır. P070 kitinde, yine subtelomerik bölgeler için daha önce tasarlanmış olan P069 kitinden farklı olarak 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların subtelomerik bölgeleri için de prob tasarlanmıştır. Sonuç olarak P070 kitinde toplam 46 adet prob bulunmaktadır (**Tablo 2.2**).

Üretici firma, prob içeriği P070 ve P069 kitlerinden tamamen farklı olan ve yine subtelomerik bölgeler için tasarlanmış P036 kitinin, P070 ve P069 kitleri ile saptanan bulguların doğrulanmasında kullanılabileceğini önermektedir (92).

MLPA problemleri ile analizde dikkat edilmesi önerilen bir husus da, problemlerin hedef dizilerindeki mutasyon veya polimorfizmlerin, tam olarak bağlanma bölgesine denk gelmese dahi bağlı pik alanında azalmaya neden olabileceğidir (92). Buna ek olarak bazı problemlerin incelenen örneğin saflığına ve ortam koşullarına daha hassas olması nedeniyle bu yöntemin mutlaka diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiği önerilmektedir (93,94). Subtelomerik kromozomal yeniden düzenlenmeler bugüne kadar sıklıkla idiopatik zekâ geriliklerinde araştırılmıştır (95,96).

Yine farklı çalışmalarda spontan düşük olgularında altta yatan sebep olarak subtelomerik değişiklikler incelenmiştir (97).

Ancak bugüne kadar korpus kallozum gelişim kusuru bulunan hastalarda subtelomerik bölgelerin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamızın bu alanda bir ilk olduğunu söyleyebiliriz. Diğer yandan, incelenen hastaların hepsinde korpus kallozum anomalisi olmakla birlikte, hemen hepsinde mental retardasyon (hafif-orta-ağır mentar retardasyon), eşlik eden merkezi sinir sistemi anomalisi (pakigiri, heterotopi v.b.) ve kraniyofasial dismorfik bulgular da eşlik etmektedir.

**Tablo 2.2:** MLPA Salsa P070 subtelomerik Kiti Prob Bölgeleri

Uzunluk (bç)	Hibridize olunan genler	Kromozom Lokalizasyonu	Telomere olan mesafe (bç)
64-70-76-82	DQ-Kontrol fragmanları		
88-92-96	DD-Kontrol fragmanları		
118	DDX3Y	Yq11.21	
132	SH3BP5L	01q44	206,527
139	ATG4B	02q37.3	499,642
145	KIAA0226	03q29	1,668,619
152	FRG1	04q35.2	163,922
160	GNB2L1	05q35.3	235,982
166	TBP	06q27	411,721
172	VIPR2	07q36.3	193,433
179	RECQL4	08q24.3	566,131
186	EHMT1	09q34.3	496,218
193	ECHS1	10q26.3	348,315
202	IGSF9B	11q25	1,560,425
211	ZNF10	12q24.33	209,690
218	CDC16	13q34	100,461
226	MTA1	14q32.3	1,368,896
233	TM2D3	15q26.3	331,045
241	GAS8	16q24.3	184,569
250	SECTM1	17q25.3	2,878,463
258	CTDP1	18q23	541,302
265	CHMP2A	19q13.43	962,954
274	UCKL1	20q13.33	389,526
281	S100B	21q22.3	97,594
290	ARSA	22q13.33	178,105
298	VAMP7	Xq28	87,986
306	TNFRSF18	01p36.33	1,179,540
315	ACP1	02p25.3	267,173
323	CHL1	03p26.3	336,454
329	PIGG	04p16.3	321,690
337	CCDC127	05p15.33	258,985
346	IRF4	06p25.3	339,971
355	UNC84A	07p22	651,757
362	FBXO25	08p23.3	398,466
370	DOCK8	09p24.3	376,404
379	ZMYND11	10p15.3	216,058
387	BET1L	11p15.5	195,520
393	JARID1A	12p13.33	287,064
402	PSPC1	13q11	19,244,620
409	PARP2	14q11.2	20,811,773
418	NDN	15q11.2	23,930,562
427	DECR2	16p13.3	402,289
436	RPH3AL	17p13.3	177,326
444	THOC1	18p11.32	204,801
450	PPAP2C	19p13.3	232,498
459	ZCCHC3	20p13	218,304
466	HSPA13	21q11.2	15,743,439
478	IL17RA	22q11.1	16,601,309
484	SHOX	Xp22.33	571,796



## 2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

### 2.4.1. PZR Çeşitleri

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ilk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından kullanılmıştır (98). Günümüze kadar birçok tıbbi ve biyolojik araştırmanın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir (99). Bu başlık altında çalışmamızla ilgisi olan PZR çeşitleri hakkında genel bilgi verilecektir.

#### 2.4.1.a Klasik PZR:

Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü primerler kullanılarak ısıya dayanıklı DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PZR çeşididir. Dizi ve fragman analizi gibi analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir. Tipik bir PZR üç temel basamakta gerçekleşir. İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon) . Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır (ilk denatürasyon tek döngü olarak 15 dakikaya kadar uygulanır). Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn 'de gerçekleşir.(G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısı 68°C'ye kadar arttırılabilir). Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30sn ile 3 dakika arasında değişir.

Termal sayıklırın bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır. 25-40 döngü uygulanır. Klasik PZR normalde sayısal (kuantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir ancak yardımcı yöntemlerle kuantitatif bilgi elde edilebilir. Jel elektroforez'de ürünler karşılaştırılarak veya 'most probable number' (MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır. MNP yönteminde ardarda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır. Tercih edilmeyen bir yöntemdir. Bir diğer yöntem de karşılaştırmalı PZR'dir. Karşılaştırmada delesyon veya insersiyon taşıyan örneklerle (farklı uzunlukta bant oluştururlar) elde edilen ürün jel elektroforezde karşılaştırılır.

#### **2.4.1.b Multipleks PZR:**

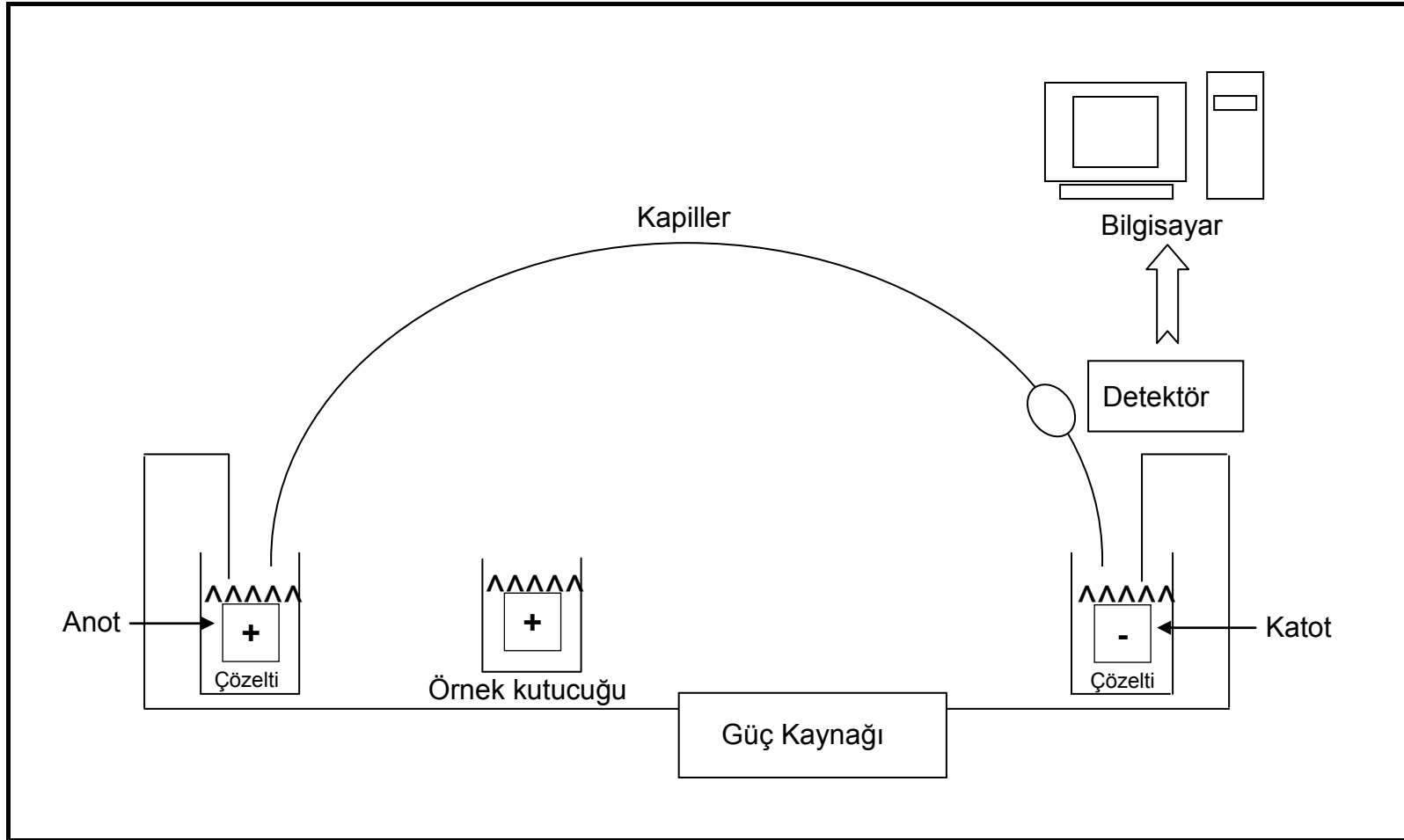
Klasik veya Real-time PZR'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PZR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır. Klasik PZR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Multiplex PZR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, bağlanma ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartların gerçekleştirilmesi gereklidir. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve non spesifik amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir.

#### **2.4.1.c Nested PZR:**

Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PZR yöntemleriyle bazen mümkün olmayabilir. Amplifikasyonda non-spesifik bölgelerin de çoğaltılabilmesi yanlış sonuçlara yol açabilmektedir. Bundan kaçınmak için Nested PZR yöntemleri uygulanır. Bu metod; klasik PZR'ye farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan ibarettir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PZR için kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı bu diziye özgüdür.

### **2.5. KAPİLLER JEL ELEKTROFOREZİ**

Genel anlamda elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesidir. Kapiller jel elektroforezinde ise temel ayırma mekanizması; jelle doldurulmuş kapillerde gözeneklerden geçerek göç eden moleküllerin büyüklükleri arasındaki farka dayanır (**Şekil 2.10**). DNA karışımları, oligonükleotidler, dizi oluşturan ürünler, restriksiyon parçacıkları ve PZR ürünlerini gibi yüklü polimerler bu şekilde uzun parçalar geride, kısa parçalar önde olacak şekilde bu kapillerin içinde yürürler. Kapiller jel elektroforezi ile ayırmada, metil sellüloz, hidroksi propil sellüloz, hidroksi etil sellüloz gibi birçok farklı polimer çözeltilerinin ayırıcı ortam olarak kullanılarak çok yüksek yüksek çözünürlükte analizlemede başarılı bir yöntemdir (100,101). Kapillerin bitimine yakın yerleştirilmiş bir detektörle kapillerin içindeki moleküllerden elde edilen floresan ışımalar algılanırlar. Elde edilen bilgi bir işlemci tarafından (bilgisayar) işlenerek monitöre aktarılır ve yorumlamaya hazır hale getirilir.



Şekil 2.10: Kapiller jel elektroforezin çalışma şeması.

### **3. BÖLÜM**

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### 3.1. GEREÇ (Hastalar)

Çalışmamıza Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda 2007-2011 yılları arasında takip ve tedavileri yapılmış, kranial MR görüntülemelerinde korpus kallozumda total-parsiyel agenezi ve hipoplazi gözlenen hastalardan, herhangi bir kromozomal anomali saptananlar, kliniği tanımlanmış bir sendromla ilişkilendirilmiş olanlar, metabolik testlerinde anormal sonuç elde edilenler; travma, pre-postnatal enfeksiyon, hipoksi sekeli (doğum öncesi takiplerde kallozal anomali saptanmaksızın) olanlar ve holoprozensefali bulunanlar dışlanarak oluşturulan 20'si erkek (ortalama yaş 7.15) ve 30'u kız (ortalama yaş 5.56) toplam 50 hasta dahil edilmiştir. Bütün hastaların ortalama yaşı 6.83 olup en küçüğü 1 ay ve en büyüğü 14 yaşında idi. Hastalardan 32'sinin ebeveynleri arasında akrabalık öyküsü mevcuttu. Öyküsü perinatal hipoksi yönünden kuşkulu olan iki hasta, korpus kallozum agenezisi ve eşlik eden merkezi isinir sistemi anomalilerinin doğum öncesi takiplerde saptanmış olması nedeniyle çalışmaya dâhil edildi. Hastaların, yaş cinsiyet ve ebeveynler arası akarabalık durumları tablo 3.1'de özetlenmiştir (**Tablo 3.1**). Tüm hastaların ailelerinden bilgilendirilmiş olur formu alındı. Hastalardan örnek alınımı ve analiz çalışmalarına Etik Değerlendirme Kurul'u onayı alındıktan sonra başlandı.

**Tablo 3.1:** Hastaların yaş, cinsiyet ve ailede akrabalık öyküsü özellikleri

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Akrabalık
H01	8 <sup>5/12</sup>	K	Var
H02	12 <sup>3/12</sup>	E	Var
H03	6 <sup>10/12</sup>	K	Var
H04	7	E	Var
H05	1 ay	K	Var
H06	6 <sup>7/12</sup>	E	Var
H07	5 <sup>9/12</sup>	K	Var
H08	4 <sup>11/12</sup>	K	Var
H09	6 <sup>5/12</sup>	K	Var
H10	6	K	Var
H11	7	K	Var
H12	7 <sup>8/12</sup>	E	Var
H13	5 <sup>6/12</sup>	E	Var
H14	8 <sup>10/12</sup>	E	Var
H15	6 <sup>4/12</sup>	K	Var
H16	5 <sup>2/12</sup>	K	Var
H17	6 <sup>7/12</sup>	E	Yok
H18	2 <sup>6/12</sup>	K	Var
H19	3 <sup>3/12</sup>	E	Yok
H20	3 <sup>11/12</sup>	K	Var
H21	3 <sup>8/12</sup>	K	Yok
H22	4 <sup>5/12</sup>	K	Var
H23	6	K	Yok
H24	6 <sup>3/12</sup>	E	Var
H25	4 <sup>9/12</sup>	E	Var
H26	5 <sup>2/12</sup>	K	Var
H27	4 <sup>4/12</sup>	E	Yok
H28	10 <sup>7/12</sup>	K	Var
H29	5 <sup>6/12</sup>	E	Yok
H30	4 <sup>3/12</sup>	K	Yok
H31	4 <sup>5/12</sup>	K	Var
H32	7 <sup>2/12</sup>	K	Var
H33	7 <sup>3/12</sup>	E	Var
H34	3 <sup>10/12</sup>	E	Yok
H35	14	K	Var
H36	6	K	Yok
H37	2 <sup>11/12</sup>	K	Yok
H38	2 <sup>2/12</sup>	E	Var
H39	7 ay	K	Yok
H40	7 <sup>4/12</sup>	K	Var
H41	8 <sup>7/12</sup>	K	Var
H42	2 <sup>5/12</sup>	K	Yok
H43	5 <sup>1/12</sup>	E	Yok
H44	2 <sup>11/12</sup>	K	Yok
H45	12	E	Yok
H46	10 ay	E	Var
H47	4 <sup>2/12</sup>	K	Yok
H48	9 ay	E	Var
H49	5	K	Var
H50	8 <sup>7/12</sup>	E	Var

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

- Buzdolabı (Vestel)
- Derin Dondurucu (-20°C) (Arçelik)
- Nanodrop spektrofometre (Thermo Scientific-NanoDrop 2000c)
- Laminar air-flow (Heal Force)
- Mikropipet (Thermo Scientific)
- Mini Santrifüj (Thermo Scientific)
- Santrifüj (Hettich Retina 420R)
- Etüv (Shel Lab)
- Termal döngü cihazı (PZR) (Techne-TC 5000)
- Vortex (WiseMix-VM10)
- Genetik Analiz Sistemi (ABI 310-Genetic Analyzer)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche DNA Isolation Kit For Mammalian Blood)
- MLPA Salsa P070 Subtelomerik Prob Kiti (MRC-Holland)
- Moleküler Genetik uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeleri

### 3.2.2. DNA izolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu için Roche yarı manuel DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi:

- Her bir hastanın 2cc kan örneği 15ml'lik falkon tüplere alındı
- Her bir flakon tüpe daha sonra 6ml Red Blood Lysis Buffer (RBLB) eklendi
- Kan ve RBLB karışımı içeren flakon tüpler 10 dakika (dk) boyunca elde nazikçe karıştırıldı
- Takiben tüpler 900rcf'te 10 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı
- Santrifüjden sonra, sıvı kısım nazikçe boşaltıldı ve yerine her bir tüpe 1ml White Cell Lysis Buffer eklendi ve saydam bir karışım elde ediceye kadar pipetaj yapıldı.
- Takiben falkon tüpler 37°C'de 15 dakika bekletildi
- Her bir tüpe 500ul protein precipitation buffer eklendikten sonra 30sn boyunca vorteklendi
- Örnek bu haliyle 1.5ml'lik tüplere aktarıldı

- 12000 rcf'te 10 dk santrifüj edildi
- Sıvı şeffaf kısım 15ml'lik flakon tüpe alındı
- Sıvı üzerine iki katı kadar soğuk %100 etil alkol eklendi ve tüp yüzen DNA'lar gözlenene kadar kısaca çalkalandı
- Elde edilen DNA mikropipet aracılığıyla 1.5ml'lik tüplere alındı
- DNA üzerindeki sıvı atılarak yerine 1ml soğuk %70 etanol eklendi
- Örnek bu şekliyle 875rcf'te 5dk santrifüje tabi tutuldu
- Dibe çöken DNA'ya zarar vermeyecek şekilde üstteki sıvı kısım atıldı
- Kurutma işlemi için ağzı açık haldeki tüpler önceden ısıtılmış 37°C'deki etüve yerleştirildi ve tam kuruma elde edilinceye kadar 3'er dk aralıkla kontrol edildi
- Kurutma işleminin ardından fazla beklenmeden DNA'ların 200 mikrolitre DNaz'sız suda çözünmesi gerçekleştirildi

### **3.2.3. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi:**

#### **3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P070 Prob Miks İle Hibridizasyonu:**

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (50-100ng/µl DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98°C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25°C'ye soğutuldu.
- 25°C'deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P070) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Daha sonra 95°C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60°C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

#### **3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu:**

- Hibridizasyon reaksiyonunun bitimine yakın her bir örnek için 3µl Ligase-65 buffer A + 3 µl Ligase-65 buffer B + 25µl su ve 1 µl Ligase-65 enzimi olacak şekilde ligaz miks (ana karışım) hazırlandı ve örneklerle ekleme işlemine kadar (ve ekleme esnasında) buz üzerinde muhafaza edildi.
- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54°C ye indirildi.
- Her bir hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edildi.
- 54°C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98°C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.



### 3.2.3.3. PZR

- Ligasyon reaksiyonu devam ederken PZR işlemi için gerekli olan ana karışımlar hazırlandı

- Bunlardan ilki her bir tüpe,

- 4 µl SALSA PZR Buffer

- 26 µl distile su

Olacak şekilde hazırlanarak yeni hazırlanmış 200 µl'lik PZR strip tüplerine eşit şekilde (30 µl) dağıtıldı

- Ligasyon işlemi takiben örnekler termo saykıldan çıkarıldı

- Her bir ligasyon ürününden 10 µl alınarak yeni hazırlanan tüplerdeki SALSA PZR Buffer ve su karışımına eklendi ve pipetajla homojonize edildi.

- Örnekleri içeren yeni tüpler termosayklıra yerleştirilerek termosayklır 60°C'ye ısıtıldı.

- Örnekler bu sıcaklıkta ike üzerlerine işlem öncesinde hazırlanan Polimeraz karışımından her bir tüpe 10 µl olacak şekilde eklendi ve iyice pipetaj yapıldı

- Polimeraz karışımı şu şekilde hazırlandı:

- Her bir tüp için 2 µl SALSA PCR-primer + 2 µl SALSA Enzyme Dilution buffer + 5.5 µl Su ve 0.5 µl SALSA Polymerase enzimi

- PZR işlemi başlatıldı

-PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 35 döngü
Bağlanma	30 sn	60 °C	
Uzama	60 sn	72 °C	
En son uzama	20 dk	72 °C	

**3.2.3.4. PZR ürünlerinin ABI 310 Genetic Analyzer cihazına yüklenmesi ve analizi**

- PZR bitimine yakın her bir tüp için 20 µl deiyonize formamid ve 0.3 µl Liz Size Standart olacak şekilde ana karışım hazırlandı
- Bu karışım ABI 310 yükleme tüplerine eşit bir şekilde dağıtıldı
- PZR bitiminde elde edilen ürünlerden 1.5 µl alınarak yükleme tüplerindeki karışıma eklendi ve pipetajla homojonize edildi
- Örnekler 95°C de 2 dk Thermal Cyler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.
- Devamında örnekler buz üzerine alındı.
- ABI 310 cihazında; 15 kV de 10 saniye injeksiyon zamanı, 60°C ve 15 kV de 35 dakika yürütme zamanı, filitre C şartları sağlandı.
- Daha sonrasında örnekler ABI cihazına yüklendi ve Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

**3.2.4.5. Değerlendirme:**

Okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Coffalyser 4.0 programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontrol olarak kaydedildi. Coffalyser 4.0 programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranlar, pik alanları normal karyotipe sahip olduğu bilinen ve hasta örnekleri ile aynı testte çalışılmış 3 sağlıklı örneğin DNA'larından elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.

## **4. BÖLÜM**

### **BULGULAR**

#### 4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Beş yaşı üstündeki hastaların zekâ testi değerlendirmelerinin hepsinde değişen derecelerde (hafif-orta-ağır) zekâ geriliği (mental retardasyon) saptandı. Bunlardan 19'u (%38) ağır, 18'i (%36) orta ve 10'u (%20) hafif derecede idi. Diğer 3 hastada yapılan gelişim testinde hepsinin motor (kaba-ince), dil ve sosyal becerilerin en az ikisinde gerilik bulunduğu belirtildi (gelişim geriliği). Hastaların 5'inde (%10) yaygın gelişimsel bozukluk, 18'inde (%36) epileptik nöbetler, 19'unda (%38) mikrosefali, 2'sinde (%4) prematür doğum öyküsü, 29'unda (%58) fasiyal dismorfik bulgular mevcuttu. Hastaların tümünde motor gelişim geriliği gözlemlendi veya anamnezlerinde motor gelişim geriliği öyküsü pozitif. Tüm hastaların beyin MRG, mental retardasyon/gelişim geriliği dereceleri ve diğer eşlik eden bulgular **tablo 4.1**'de sunulmuştur. Yine klinik muayene ve anamnez özellikleri ve bunların kallozal anomaliye göre dağılımı ise yüzdeleriyle birlikte **tablo 4.2**'de verilmiştir.

**Tablo 4.1:** Hastaların beyin MR görüntüleme bulguları, mental retardasyon/gelişim geriliği dereceleri ve eşlik eden majör klinik özellikler

Hasta no	Beyin MRG	MR/GG	Eşlik eden majör bulgu(lar)
H01	KK'da Total agenezi, kolposefali dilate lateral ventriküller	Ağır MR	Mikrosefali, strabismus, hipoplastik dişler, düşük kulak, düşük ense saç çizgisi
H02	KK gövde posterior ve spleniumu agenezik, mevcut kısımlar hipoplazik, sınırları düzensiz ve genişlemiş lateral ventriküller	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, eğimli alın, periorbital dolgunluk, antimongoloid göz aksı, desteksiz yürüme ve oturma yok
H03	Hipoplastik KK, sınırları düzensiz lateral ventriküller	Orta MR	Desteksiz yürüme ve oturma yok
H04	Genu-rostrum ve splenium son ucu daha az tutulmakla birlikte yaygın hipoplastik KK, PVL	Hafif MR	Motor gelişim geriliği, epilepsi, strabismus
H05	Total agenezi, serebellar vermis hipoplazisi, mega sisterna magna	Gelişim geriliği	Trigonosefali, metopik stür, mongoloid göz aksı, dolgun yanaklar
H06	İleri derece hipoplastik KK	Hafif MR	Ptozis
H07	Gövde posterioru ve splenium'da daha belirgin olacak şekilde hipoplastik KK	Orta MR	Mikrosefali, mongoloid göz aksı, küçük ağız, yüksek damak, kısa boyun
H08	Hipoplastik KK	Orta MR	Strabismus
H09	Hipoplastik KK	Orta MR	Mikrosefali
H10	Hipoplastik KK	Hafif MR	Bilateral epikantus, hipoplastik dişler, el 5. parmaklarda klinodaktili
H11	Hipoplastik KK, gecikmiş miyelinizasyon	Orta MR	Yaygın gelişimsel bozukluk, prognatizm, pektus ekskavatus, pes planus
H12	Hipoplastik KK	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme yok
H13	Total agenezi	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, yüksek damak, retrognati, desteksiz yürüme ve oturma yok
H14	Hipoplastik KK	Hafif MR	Strabismus, yüksek damak
H15	Hipoplastik KK, dilate 3. ve bilateral lateral ventriküller	Ağır MR	Hafif kaba yüz görünümü, kamptodaktili, diz eklemlerinde kontraktür, arka-aşağı yerleşimli kulaklar, idrarda MPs (-)
H16	Hipoplastik KK, kalposefali	Orta MR	Epilepsi, 5. el parmalarında klinodaktili, 2-3. ayak parmaklarında üst üste binme
H17	KK spleniumu agenezik	Hafif MR	Yaygın gelişimsel bozukluk, geniş burun kökü, uzun filtrum, düşük kulaklar, bilateral kriptorşizm, hipospadias
H18	Hipoplastik KK	Orta MR	Yaygın gelişimsel bozukluk, pektus ekskavatus, pes planus
H19	Hipoplastik KK	Orta MR	Genu rekurvatum, belirgin alın, seyrek kaşlar, simian çizgileri
H20	Hipoplastik KK, ensefalomalazi	Hafif MR	Yürüme destekli, mongoloid göz aksı, telekantus, basık burun kökü, düşük kulaklar
H21	Total agenezi	Ağır MR	Brakisefali, yüksek damak, belirgin kulak heliksleri, sakral gamze
H22	Total agenezi, pakigri	Orta MR	Mikrosefali, düşük alın saç çizgisi, bitemporal darlık, hipersalivasyon
H23	Hipoplastik KK	Orta MR	Mikrosefali
H24	Hipoplastik KK, dilate sol lateral ventrikül	Ağır MR	Epilepsi, pektus ekskavatus, ekstremitelerde tonus artışı

H25	Hipoplastik KK, dilate sol lateral ventrikül	Ağır MR	Epilepsi, pektus ekskavatus, ekstremitelerde tonus artışı
H26	Hipoplastik KK	Orta MR	Yaygın gelişimsel bozukluk, bilateral telekantus, geniş aralıklı dişler, PDA
H27	Hipoplastik KK	Orta MR	Epilepsi, sağ ingiünal herni
H28	Hipoplastik KK	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok
H29	Hipoplastik KK	Hafif MR	İki taraflı strabismus, epikantus, geniş burun kökü, ald dudak dışa everte, kriporşitizm
H30	Hipoplastik KK	Orta MR	Desteksiz yürüme ve oturma yok
H31	Hipoplastik KK, miyelinizasyonda gecikme	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok
H32	Hipoplastik KK, pakigri	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok
H33	Hipoplastik KK	Orta MR	Mikrosefali, epilepsi, eğimli alın, antimongoloid göz aksı, geniş ve basık burun kökü, iki taraflı epikantus
H34	KK'da total agenezi, miyelinizasyonda gecikme, lateral ventriküllerde genişleme	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok,
H35	Hipoplastik KK, serebellar atrofi	Hafif MR	Mikrosefali, ataksik yürüyüş
H36	KK'da total agenezi, subependimal heterotopi, serebellar vermiş hipoplazisi, 3 ve 4. ventriküller geniş	Hafif MR	Yaygın gelişimsel bozukluk, kemik yaşı geri, el 5. ve ayak 3,4,5. parmaklarda klinodaktili, kliteromegali
H37	Hipoplastik KK	Ağır MR	
H38	KK'da parsiyel agenezi	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok
H39	Total agenezi, beyin sapı hipoplazisi	Ağır gelişim geriliği	Mikrosefali, epilepsi, spontan solunum güçlüğü
H40	Hipoplastik KK	Orta MR	Yaygın gelişimsel bozukluk
H41	KK istmus kısmında displazinin olduğu yaygın hipoplazi	Ağır MR	Epilepsi, ekstremitelerde tonus artışı, burun kökü basık ve geniş, iki taraflı epikantus
H42	Hipoplastik KK, PVL	Orta MR	VSD
H43	Hipoplastik KK	Orta MR	
H44	Hipoplastik KK	Orta MR	Basık ve geniş burun kökü, düşük kulaklar, ASD, PDA, ince yapılı el ve ayak parmakları, ayak parmaklarında overlap
H45	Total agenezi	Ağır MR	Desteksiz yürüme yok, hipertelorizm, burun kökü geniş
H46	Total agenezi, pakigri	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, göz takibi ve ışığa tepki yok
H47	Total agenezi, dilate lateral ventriküller	Ağır MR	Epilepsi, hipotoni
H48	Total agenezi, beyin sapı hipoplazisi, mega sisterna magna	Ağır gelişim geriliği	Mikrosefali, epilepsi, ASD, MY, sol ventriküler hipertrofi, maküla soluk
H49	Hipoplastik KK, dilate ventriküller	Hafif MR	Sağ böbrekte atrofi, sol böbrekte nefrokalsinozis
H50	Hipoplastik KK	Ağır MR	Mikrosefali, epilepsi, desteksiz yürüme ve oturma yok, ekstremitelerde tonus artışı

KK: Korpus kallozum, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, MR/GG: Mental retardasyon gelişim geriliği, PVL: Periventriküler lökomalazi, ASD: Atrial septal defekt, PDA: Patent duktus arteriosus, VSD: Ventriküler septal defekt

**Tablo 4.2:** Hastaların klinik muayene ve anamnez özellikleri ve bunların kallozal anomaliye göre dağılımı yüzdeleriyle birlikte verilmiştir.

Klinik ve anamnez bulguları	Agenezi* (%)	Hipoplazi (%)
Mental retardasyon/Gelişim Geriliği	14 (%100)	36 (%100)
Yaygın gelişimsel bozukluk	1 (%7)	4 (%8)
Gecikmiş motor beceriler	14 (%100)	36 (%100)
Nöbet	8 (%57)	10 (%27)
Mikrosefali	9 (%64)	10 (%27)
Prematurite	1 (%7)	1 (%2.7)
Fasiyal Dismorfizm	11 (%78)	18(%50)
Normal Karyotip	14 (%100)	36 (%100)
Anormal metabolik test	-	-

\* Total veya parsiyel

Kardiyovasküler sistemde 2 adet atrial septal defekt (ASD) (%4), 1 adet ventriküler septal defekt (VSD) (%2), 1 adet mitral yetmezlik (MY) (%2), 2 adet patent duktus arteriozus (PDA) (%4) saptandı. Kas-iskelet sisteminde 3 hastada klinodaktili (%6), 1 hastada kamptodaktili (%2), 3 hastada hiperekstansibilite (%6), 1 hastada eklem kontraktürü (%2), 4 hastada pektus ekskavatus (%8), 2 hastada pes planus (%4), 1 hastada genu rekurvatum (%2) tesbit edildi. Renal ve genitoüriner sistemde 3 hastada inmemiş testis (%6), 1 hastada hipospadias (%2), 1 hastada ingiüanal herni (%2), 1 hastada klitoromegali (%2), 1 hastada renal atrofi ve nefrokalsinozis (%2) belirlendi. Gastrointestinal sistem bulguları olarak hipersalivasyon 3 hastada (%6), hipoplazik dişler 3 hastada (%6) gözlemlendi. Oküler sistemde ise strabismus 5 hastada (%10), göz takibinin ve/veya ışık refleksinin olmaması 1 hastada (%2), makülada solukluk 1 hastada (%2) ve ptozis ise 1 hastada (%2) tesbit edildi.

Hastaların G bantlama ile yapılan kromozom analizlerinin hepsinde cinsiyete uygun karyotip saptandı. Kan aminoasit kromatografisi ve idrarda organik asit incelemeleri tüm hastalarda incelenmiş olup hiç birinde spesifik bir metabolik hastalığa işaret edecek bulgu saptanmadı. Yine doğumsal metabolik hastalık tarama analizi (Tandem MS) mevcut olan hastalarda da herhangi bir patolojik veriye rastlanmadı.

Eşlik eden kardiyovasküler sistem, iskelet-kas, renal/genitoüriner, vasküler, gastrointesitinal ve oküler sistem bulgusu olan hasta sayıları ve bunların mevcut kallozal anomaliye göre dağılımı yüzdeleriyle birlikte **tablo 4.3'te** verilmiştir.

**Tablo 4.3:** Hastalarda eşlik eden somatik bulgular ve bunların kallozal anomaliye göre dağılımı yüzdeleriyle birlikte verilmiştir.

Eşlik eden somatik bulgular	Agenezi* (%)	Hipoplazi (%)
Kardiyovasküler	1 (%7)	3 (%8)
Kas-İskelet	1 (%7)	9 (%25)
Renal/Genitoüriner	2 (%14)	3 (%8)
Gastrointestinal	2 (%14)	-
Oküler	1 (%7)	5 (%13)

\* Total veya parsiyel



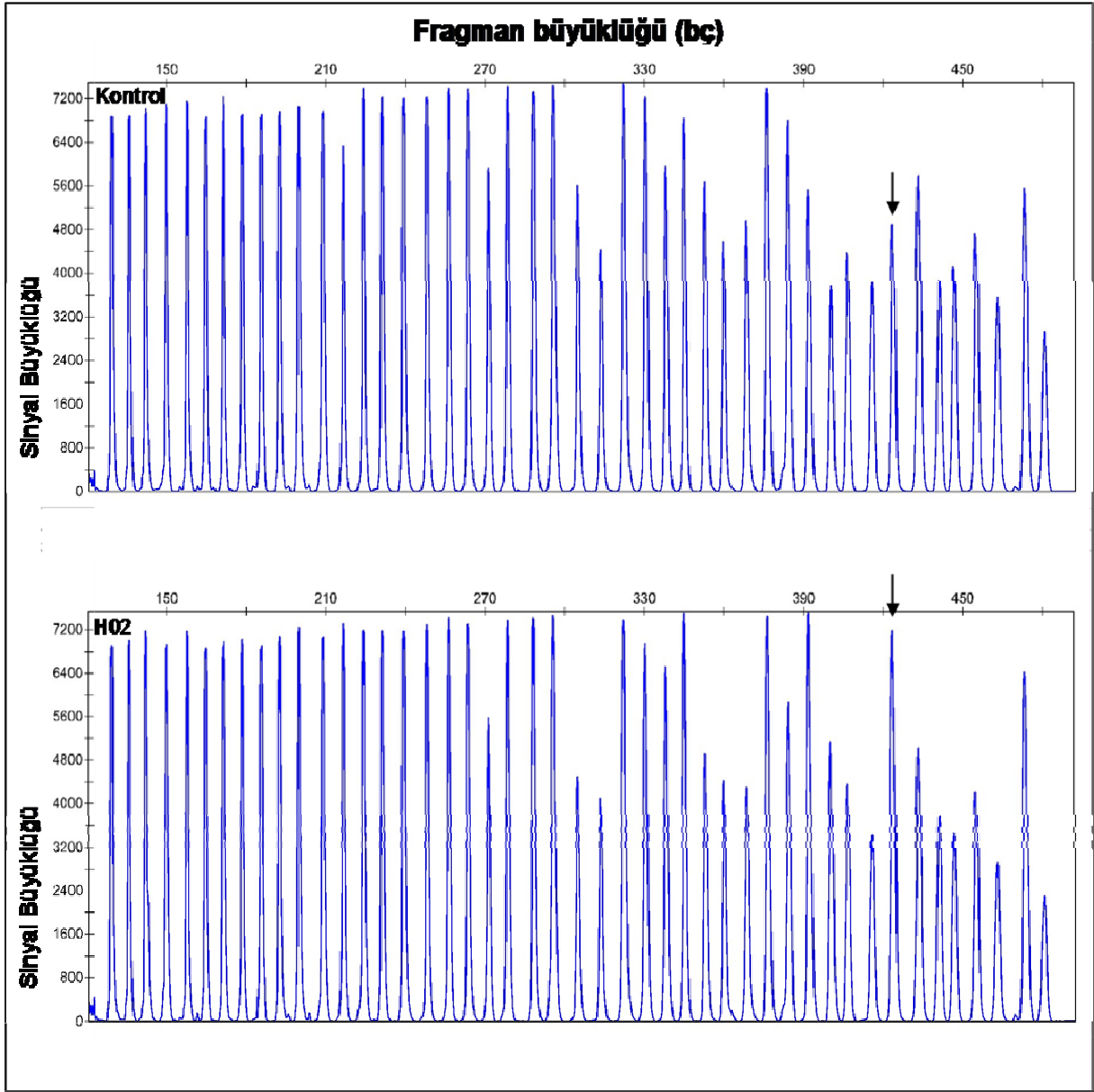
Hastalarda saptanan korpus kallozum anomalilerinin 12'si total agenezi (%24), 2'si parsiyel agenezi (%4) şeklindeydi. 36 hastada ise (%72) korpus kallozum agenezi olmaksızın değişen dercelerde hipoplazikti. Hastaların beyin MR incelemelerinde korpus kallozum anomalisi dışında toplam 3 hastada (%6) pakigri, 1 hastada (%2) heterotopi, 1 hastada (%2) periventriküler lökomalazi, 3 hastada (%6) gecikmiş miyelinizasyon, 2 hastada (%4) serebellar vermiş ve/veya hemisfer anomalisi ve 2 hastada (%4) da beyin sapı hipoplazisi saptanmıştır (**Tablo 4.4**). Hastalarda belirlenen diğer beyin MRG bulguları genişlemiş 3. ve 4. ventriküller, genişlemiş ve sınırları düzensiz lateral ventriküller, mega sisterna magna, ensefalomalazi ve kalposefali şeklindeydi (**Tablo 4.1**). Hastaların beyin MR görüntülemesinde korpus kallozum anomalisi dışında saptanan diğer merkezi sinir sistemi bulguları ve bunların mevcut korpus kallozum anomalisine göre dağılımı yüzdeleriyle birlikte **tablo 4.4**'te verilmiştir.

**Tablo 4.4:** Hastaların beyin MR görüntülemesinde saptanan merkezi sinir sistemi bulguları ve bunların mevcut korpus kallozum anomalisine göre dağılımı yüzdeleriyle birlikte verilmiştir.

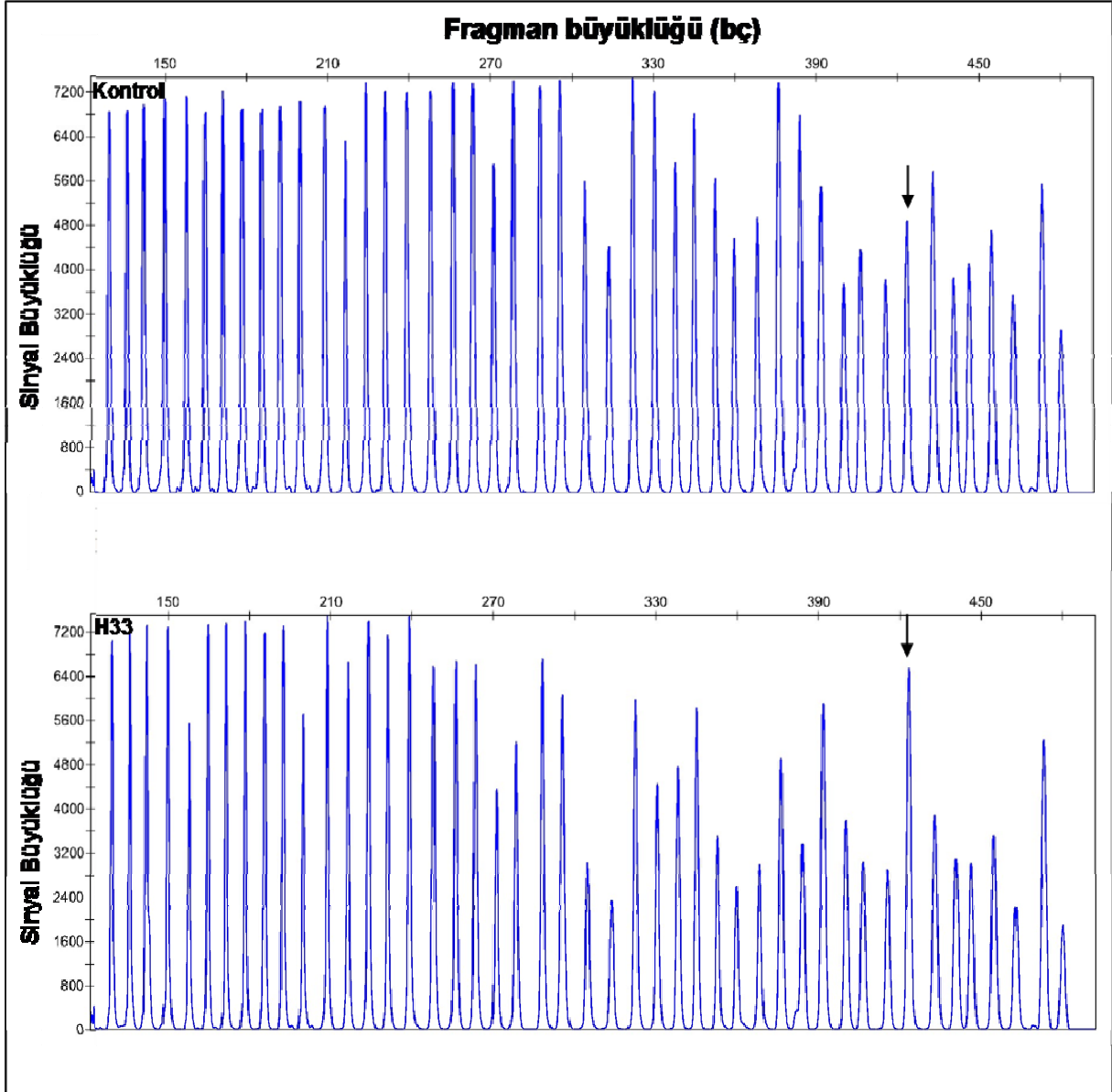
Eşlik eden merkezi sinir sistemi anomalileri		Agenezi* (%)	Hipoplazi (%)
<b>Gri madde patolojileri</b>	Pakigri	2 (%14)	1 (%7)
	Heterotopi	1 (%7)	-
<b>Ak madde Patolojileri</b>	Periventriküler lökomalazi	-	1 (%7)
	Gecikmiş myelinizasyon	1 (%7)	2 (%14)
<b>Posterior fossa anomalileri</b>	Serebellar vermiş ya da hemisfer	1 (%7)	1 (%7)
	Beyin sapı anomalileri	2 (%14)	-

\* Total veya parsiyel

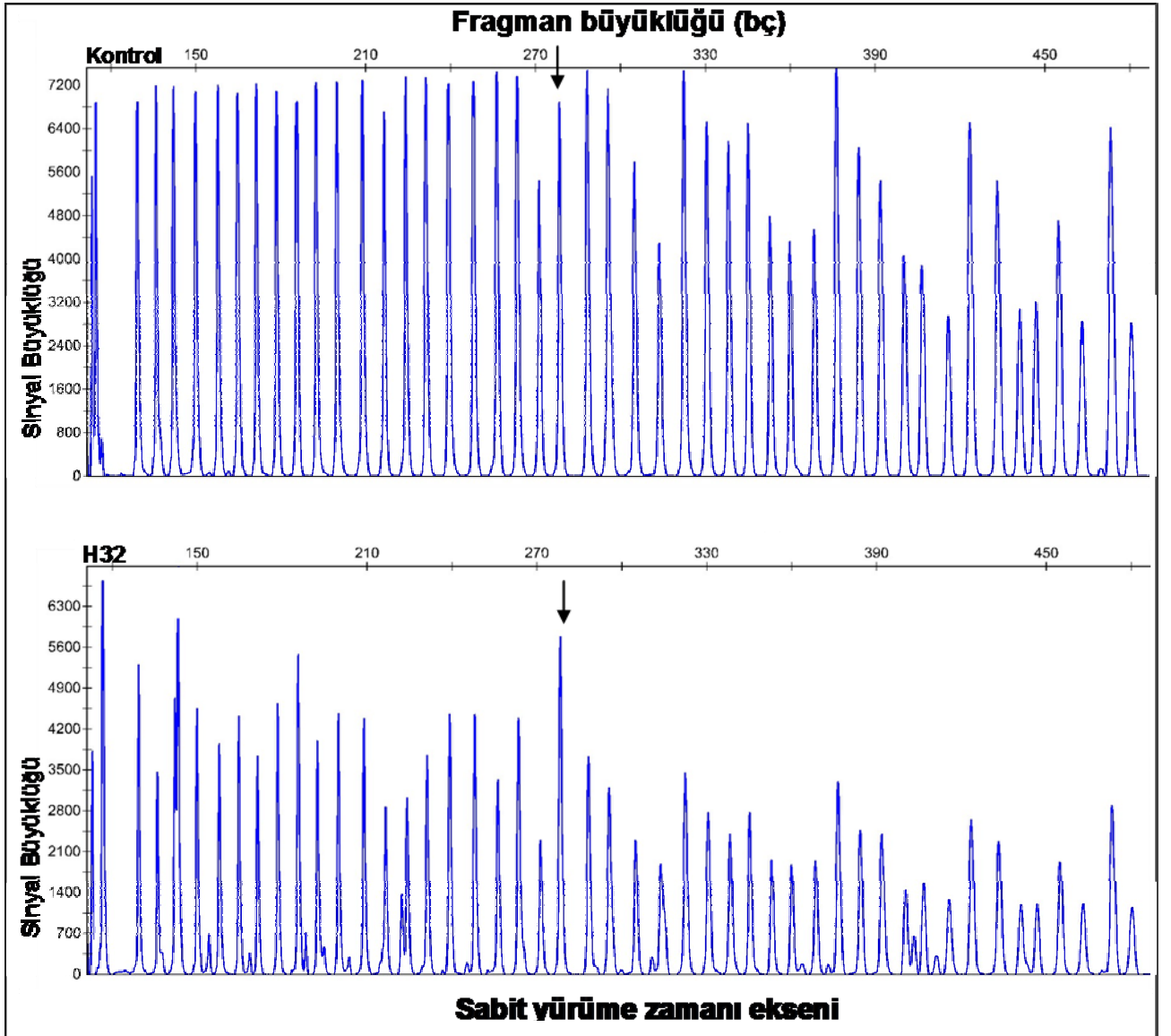
Toplam 4 hastanın analizlerinde subtelomerik yeniden düzenlenme saptandı. Bu değişiklikler 4 hastada da duplikasyon şeklinde gözlemlendi. İki hastada 16. kromozm kısa kolu (16p) subtelomerik bölgesine spesifik SALSA P070 DECR2 prob piki alanında artış saptanırken, diğer iki hastada 21. kromozom uzun kolu (21q) subtelomerik bölgesine spesifik SALSA P070 S100B prob piki alanı artış gösterdi (**Şekil 4.1a,b,c ve d**).



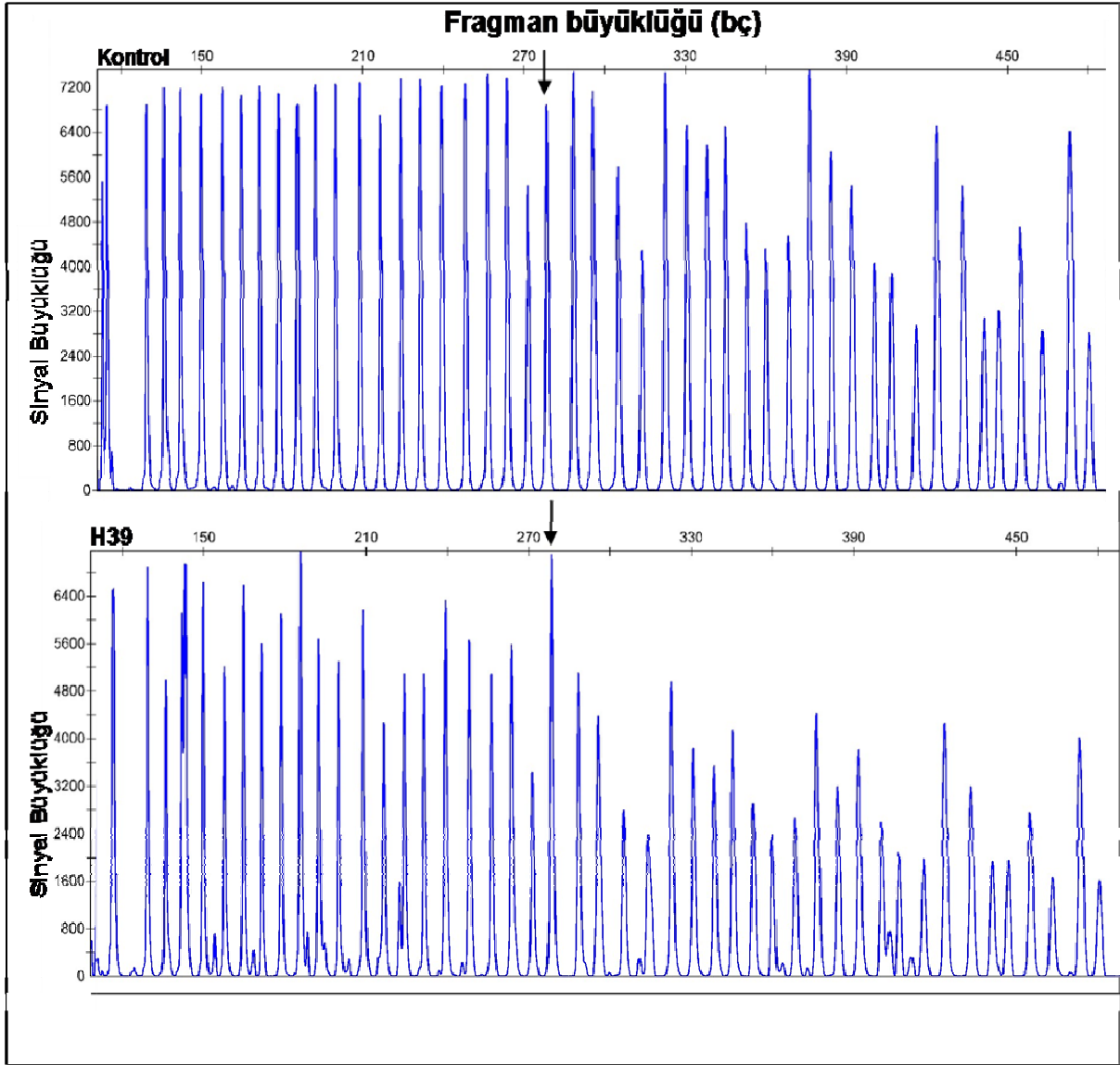
**Şekil 4.1a:** Kontrol (üstte) ve H02 numaralı hastanın (altta) MLPA analiz sonuçları. Hasta ve kontrolün SALSA P070 DECR2 prob pikleri siyah okla gösterilmiştir.



**Şekil 4.1b:** Kontrol (üstte) ve H33 numaralı hastanın (altta) MLPA analiz sonuçları. Hasta ve kontrolün SALSA P070 DECR2 prob pikleri siyah okla gösterilmiştir.



**Şekil 4.1c:** Kontrol (üstte) ve H32 numaralı hastanın (altta) MLPA analiz sonuçları. Hasta ve kontrolün SALSA P070 S100B prob pikleri siyah okla gösterilmiştir.



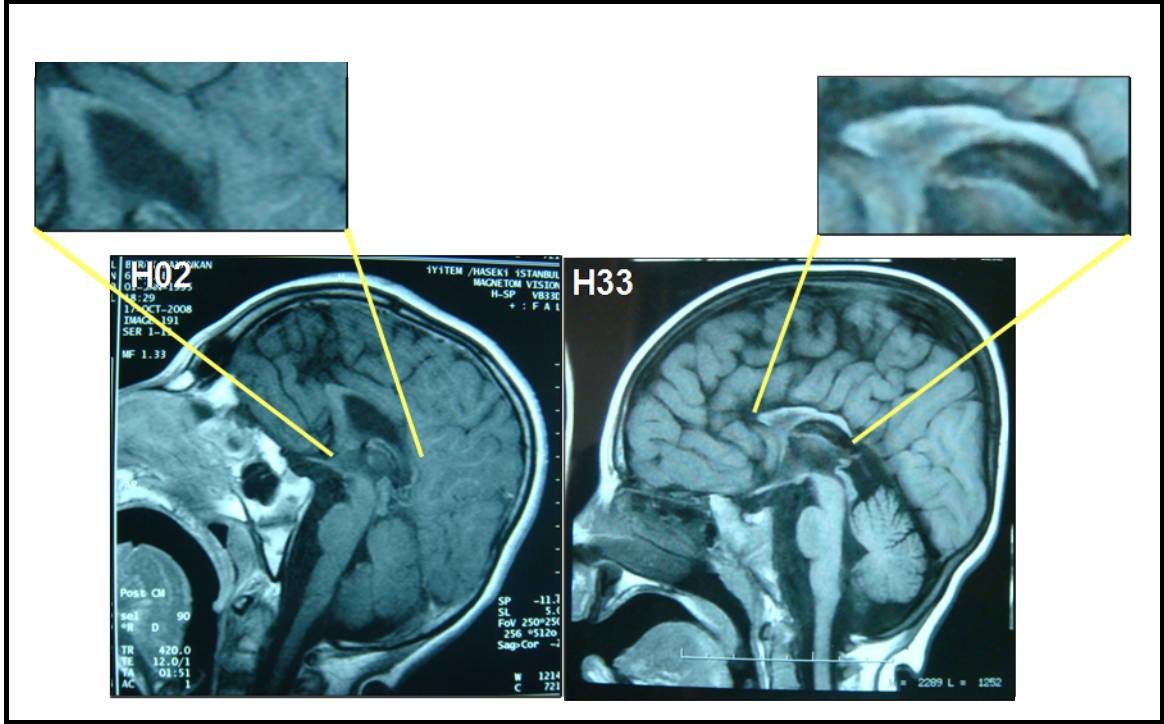
**Şekil 4.1d:** Kontrol (üstte) ve H39 numaralı hastanın (altta) MLPA analiz sonuçları. Hasta ve kontrolün SALSA P070 S100B prob pikleri siyah okla gösterilmiştir.

On altıncı kromozom kısa kolunda kopya sayısı artışı saptanan her iki hastada da mental retardasyon (H02’de ağır, H33’te orta derece), gecikmiş motor gelişim öyküsü, mikrosefali, yüzde benzer dismorfik özellikler (eğimli alın, aşağıya dönük palpebral fissürler, periorbital dolgunluk) ve korpus kallozum anomalisi mevcuttu. Hastaların klinik özellikleri **tablo 4.5**’da karşılaştırılmıştır.

Hastaların beyin MR orta sagittal kesitleri incelendiğinde H02 numaralı hastanın korpus kallozumunda rostrum ve gövde tam oluşmuşken, gövdenin anterior kısmının hipoplazik formasyonda olduğu ve gövdenin geri kalan kısmı ile spleniumun oluşmadığı gözlemlendi (parsiyel agenezi) (**Şekil 4.2**). Diğer hastada (H33) ise splenium hariç korpus kallozumun tüm kısımları diffüz şekilde hipoplazik olup gövdenin orta kısmında displazik bir alan mevcuttu (**Şekil 4.2**).

**Tablo 4.5:** 16p subtelomerik bölgede kopya sayısı artışı saptanan hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılması.

<b>Klinik Özellikler</b>	<b>H02</b>	<b>H33</b>
Gecikmiş motor beceriler	+	+
Mental Retardasyon	+	+
Mikrosefali	+	+
Korpus kallozum anomalisi	+	+
Benzer fasial dismorfizm	+	+
Nöbetler	+	+



**Şekil 4.2:** 16p subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların (**H02** ve **H33**) sagittal beyin MR kesitleri. H02 numaralı hastanın korpus kallozumunda rostrum ve gövde tam oluşmuşken, gövdenin anterior kısmının hipoplazik formasyonda olduğu ve gövdenin geri kalan kısmı ile spleniumun oluşmadığı görülmektedir (parsiyel agenezi). Diğer hastada ise splenium hariç korpus kallozumun tüm kısımları diffüz şekilde hipoplazik olup gövdenin orta kısmında displazik bir alan izlenmektedir.



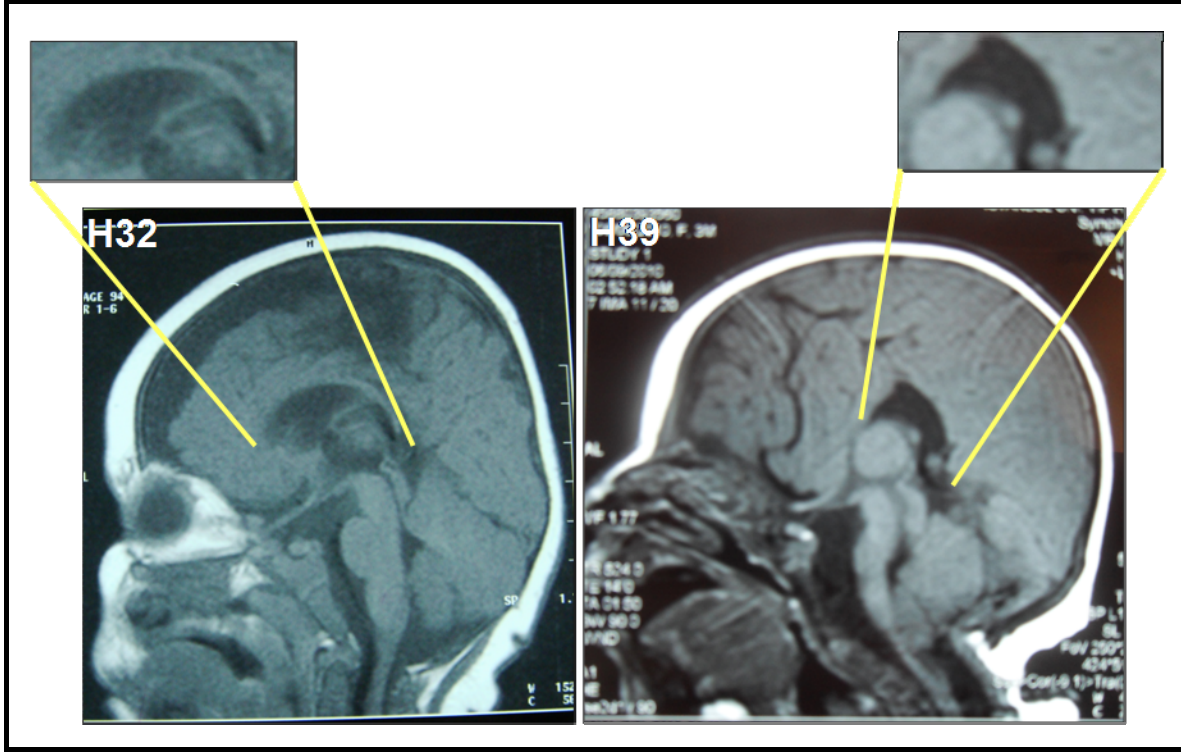
Yirmibirinci kromozom uzun kolunda kopya sayısı artışı saptanan hastalardan birinde (H32) zekâ testi uygulanmış ve ağır mental retradasyon olduğu rapor edilmiştir. Diğer hastada (H39) yaşının küçük olması nedeniyle zekâ testi uygulanamamış ancak gelişim testinde tüm alanlarda belirgin gerilik bulunduğu (gelişim geriliği) bildirilmiştir. Yine her iki hastada da belirgin mikrosefali, pakigri, yüzde benzer dismorfik özellikler (burun kökü belirgin, gaga burun, dolgun yanaklar) ve inatçı nöbet öyküsü mevcuttu. Hastaların klinik özellikleri **tablo 4.6**'de karşılaştırılmıştır.

H32'de korpus kallozum ileri derece hipoplazik iken H39'da total agenezi gözlemlendi (**Şekil 4.3**). H39'nun beyin MR raporunda ek olarak beyin sapının tam gelişmediği rapor edilmişti. Yine bu hastada muayene esnasında trakeostomi mevcuttu.

**Tablo 4.6:** 21q subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların klinik özelliklerinin karşılaştırılması.

Klinik Özellikler	H32	H39
Gecikmiş motor beceriler	++*	++
Mental Retardasyon	++	++
Mikrosefali	++	++
Pakigri	+	+
Korpus kallozum anomalisi	+	++
Beyin sapı anomalisi	-	+
Benzer fasial dismorfizm	+	+
Nöbetler	++	++

\*: Daha ağır kliniği göstermektedir.



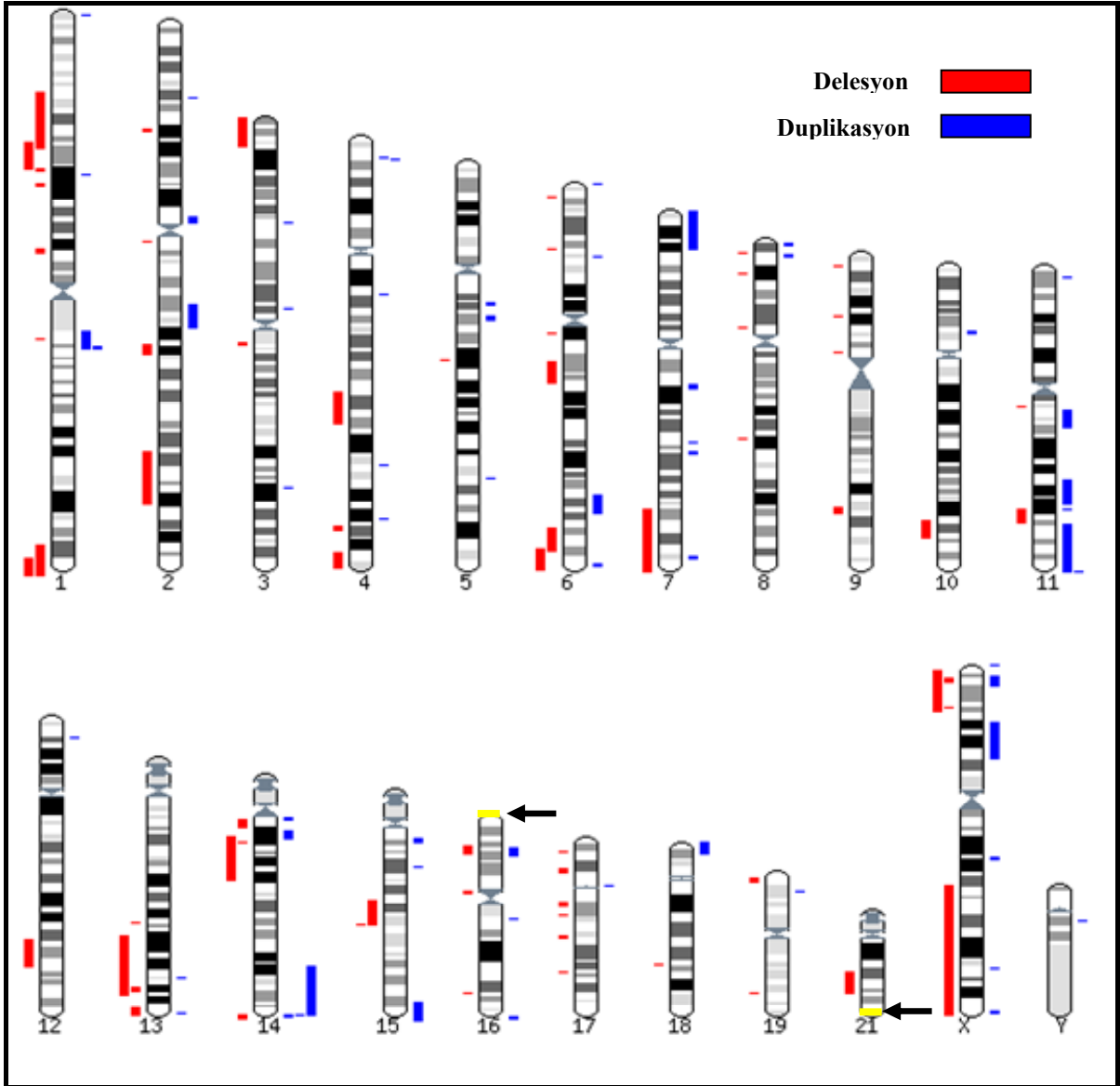
**Şekil 4.3:** 21q subtelomerik bölgesinde kopya sayısı artışı saptanan hastaların (H32 ve H39) sagittal beyin MR kesitleri. H32’de korpus kallozum ileri derece hipoplazik iken H39’da total agenezi görülmektedir. H39’da ayrıca beyin sapı hipoplazik olarak izlenmektedir.

## **5. BÖLÜM**

### **TARTIŞMA**

Korpus kallozumun doğumsal gelişim kusurları, bir diğer ifade ile anomalilerinin izole olarak karşımıza çıkması nadir bir durumdur (102). Günümüze kadar korpus kallozum anomalilerinin eşlik ettiği çok sayıda kromozomal yeniden düzenlenme ve sendrom bildirilmiş olup bunlara her sene yenileri de eklenmektedir (2,11,22) . Özellikle konvasiyonel sitogenetik analiz ile tesbit edilemeyecek kadar küçük kopya sayısı değişikliklerinin, son yıllarda kullanıma giren moleküler analiz yöntemleri ile saptanabilir hale gelmesi genomdaki sorumlu bölgelerin tesbitine büyük katkı sağlamaktadır. Genomdaki kopya sayısı değişikliklerini saptayan array temelli bu yöntemlerle saptanan bölgelerin derlendiği DECIPHER v5.1 veri tabanında ‘**korpus kallozum, korpus kallozum agenezisi ve korpus kallozum hipoplazisi**’ terimleri kullanılarak yapılan aramalarda 64’ü delesyon, 61’i duplikasyon olan toplam 125 farklı bölge bildirildiği gözlenmiştir (**Şekil 5.1**). KSD saptanan bölge sayısının çokluğu, korpus kallozum gelişim sürecinin karmaşıklığı ve çok sayıda farklı genin bu süreçte görevli olduğu fikrini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Diğer yandan hastalarımızda saptanan duplikasyon bölgeleri bildirilmiş bu bölgelerden farklı olup kısmen de olsa kesişen herhangi bir alan içermemektedir (**Şekil 5.1**).

Çalışmamızda, korpus kallozum anomalisi bulunan hastalarda subtelomerik KSD’lerini saptamak amacıyla Multipleks Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi kullanılmıştır. Subtelomerik değişiklik saptanan hasta sayısı 4’tür (%8). Subtelomerik bölge değişiklikleri daha önce spesifik olarak korpus kallozum anomalili hastalarda çalışılmamış olmakla birlikte, mental retardasyon/gelişim geriliği grubunda bu oran ortalama %5 olarak bildirilmektedir (24). Literatürde ise fenotipte korpus kallozum anomalisinin gözlendiği 30’dan fazla KSD bölgesi bildirilmiştir (22). Biz çalışmamızda 16p ve 21q subtelomerik bölgeleri olmak üzere toplam iki bölgede KSD (her iki kopya sayısı değişikliği de duplikasyon şeklinde idi) saptadık (**Şekil 5.1**). Bunlardan ilki olan 16p subtelomerik bölgesindeki değişikliklerde bilindiği kadarıyla korpus kallozum anomalisi bildirilmemiştir. Bu bölge MLPA P070 DECR2 probunun hibridize olduğu iyi karakterize edilmiş *DECR2* genini içermektedir. Burada yer alan başta *DECR2* geni ve komşu genlerin fonksiyonları ve ekspresyon oldukları dokularla ilgili UCSC Genome Browser, Ensemble ve OMIM’de yapılan incelemelerde duplikasyon saptanan iki hastanın korpus kallozum anomalilerini ve diğer merkezi sinir sistemi bulgularını açıklayacak spesifik bir veriye rastlanmadı. Örneğin *DECR2* geni, peroksizomal bir enzim olan 2 4-dienoil-CoA redüktaz enzimini kodlar. Bu enzim beta oksidasyonda görev alır ve en çok karaciğer ve böbrekte ekspresyonu saptandığı bildirilmektedir (103).



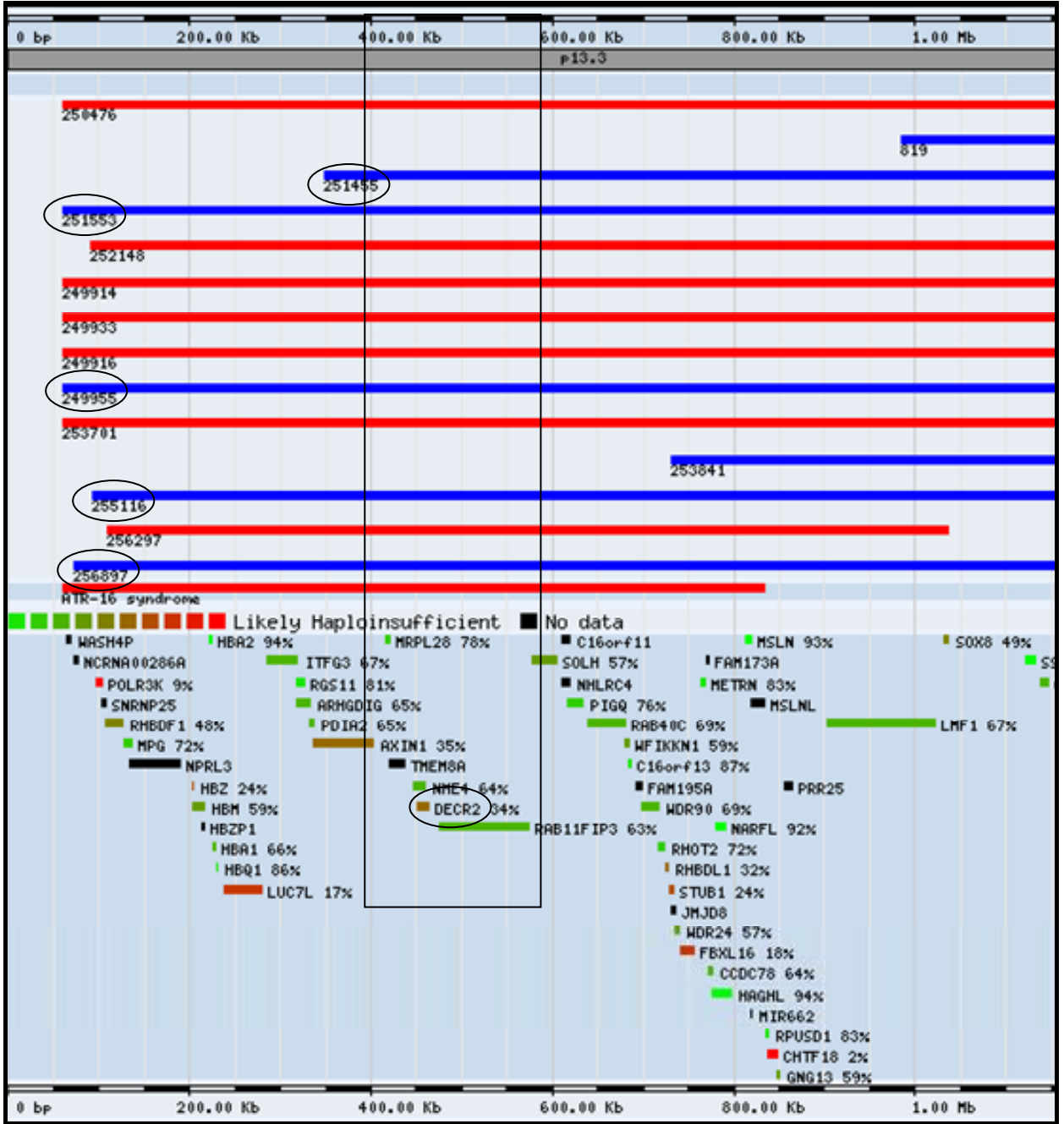
**Şekil 5.1:** DECIPHER veri tabanında korpus kallozum agenezisi ve hipoplazisi ile ilişkili olduğu bildirilen kopya sayısı değişiklikleri bölgeleri. Kırmızı kutucuklar delesyonu, maviler ise duplikasyonu göstermektedir. Çalışmamızda kopya sayısı değişikliği saptanan subtelomerik bölgeler kalın siyah oklarla ve sarı renkte gösterilmiş olup daha önce bildirilen bölgelerle örtüşmemektedir.

(<https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=corpus+callosum&x=0&y=0> internet adresinden değiştirilerek alınmıştır (Ref. 104))

*DECR2* geninin komşuluğunda bulunan genlerden *NME4* (Nonmetastatic Protein 23, Homolog 4) nm23 gen ailesinden olup temel hücre membranı proteinleri arasında yer alır (105). Bu proteinin ikili lipit katmanı içinde lipit transferinde görev aldığı düşünülmektedir (106). Fetal beyinde ve erişkin beyin dokularında ekspresyon verileri bu dokularda *DECR2* geninin yüksek miktarda eksprese edilmediğini göstermektedir. Bu hastalarda ayrıca beta oksidasyon defekti ile uyumlu bir kliniğe de rastlanmamıştır.

*DECR2*'nin hemen proksimalinde yerleşen *RAB11FIP3* (Rab11 Family-Interacting Protein 3) geni Rab GTPaz ailesinin bir üyesi olup hücre içi veziküllerin oluşumu, hedef bölgelere yönlendirilmesi ve füzyonu ile ilgili süreçlerde görev aldığı bildirilmektedir (107). Fetal beyinde düşük seviyede eksprese olan genin hipotalamus ve medulla oblongatada ekspresyonu diğer kısımlara nispeten fazladır. Bunlara ek olarak üç genin de özellikle fetal beyin dokusunda ekspresyonlarının az olması, hastalardaki korpus kallozum anomalileriyle ilişkilendirilmelerini güçleştirmektedir.

On altıncı kromozom p13.3 bölgesinde *DECR2* genini de içine alacak şekilde meydana gelen duplikasyonlar DECIPHER v5.1 veri tabanından incelendiğinde ise bu şekilde 5 adet KSA saptanmıştır (**Şekil 5.2**). Bu KSA'ların büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikler **tablo 5.1**'de verilmiştir. İlki (Decipher kodu 251455) yaklaşık 0.9Mb uzunluğunda olup fenotipte otistik davranış paterni, eklem laksitesisi, mental retardasyon, nistagmus ve mongoloid göz aksı gözlendiği bildirilmiştir. İkincisi (Decipher kodu 251553) 11.35Mb uzunluğunda olup ASD, yarı damak, infant dönemde beslenme güçlükleri, myopatik olmayan hipotoni, düşük doğum ağırlığı, düşük kulaklar, mikrosefali ve tek palmar çizgi bildirilmiştir. Üçüncüsü (Decipher kodu 249955) 14.03 Mb uzunluğunda olup ilişkili fenotip bildirilmemiştir. Dördüncüsü (Decipher kodu 255116) 2.57Mb uzunluğunda olup mental retardasyon/gelişim geriliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Beşincisi (Decipher kodu 256897) 10.68Mb uzunluğunda olup ebeveynlerdeki dengeli translokasyon sonucu oluşan dengesiz bir yeniden düzenlenme olduğu bildirilmiştir. Bu değişiklik ile ilgili de fenotip bildirilmemektedir.



**Şekil 5.2:** DECIPHER v5.1 veri tabanında *DEC2* genini içine alan kopya sayısı değişiklikleri. Mavi renkli çubuklar kopya sayısı artışını, kırmızılar ise kopya sayısı azalışını göstermektedir (<https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=decr2&x=0&y=0> internet adresinden değiştirilerek alınmıştır (Ref. 108)).

Belirtilen 5 bölgeden hiçbirisinin fenotipinde kallozal anomali yer almamaktadır. Ancak birinci (Decipher kodu 251455) ve dördüncü (Decipher kodu 255116) KSA'nın saptandığı hastalarda mental retardasyon/gelişim geriliği rapor edildiği bildirilmektedir. Bu fenotip hastalarımızda bulunan gelişim geriliği öyküsü ve mental retardasyon bulguları ile uyumludur. Diğer yandan DECIPHER v5.1 veri tabanındaki bu hastalarda korpus kallozum anomalisinin olmaması, hastalarımızdaki olası duplikasyon bölgesinin veri tabanındaki hastalardan farklı birtakım genleri içerebileceği ve duplikasyonun oluşması esnasında kırılan bölgelerin ve dolayısı ile etkilenen genlerin farklı olabileceği ile açıklanabilir. Bu konuda en doğru yorum ancak hastalarımızdaki duplikasyonun başlangıç ve bitiş noktalarının tesbiti ile mümkün olacaktır. Bu bağlamda tez çalışmasından sonraki aşamada farklı analiz metodlarıyla mevcut bilgilerin mutlaka doğrulanması ve KSA'larının kesin sınırlarının belirlenmesi hedeflenmektedir.



**Tablo 5.1:** DECIPHER v5.1 veri tabanındaki *DECR2* genini de içine alacak şekilde meydana gelen kopya sayısı artış bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikler.

<b><i>DECR2</i> genini de içeren kopya sayısı artış bölgeleri Decipher veri tabanı numaraları</b>	<b>Büyükük (Mb)</b>	<b>Fenotip</b>
<b>251455</b>	0.9	Otistik davranış paterni, eklem laksisitesi, mental retardasyon, nistagmus ve mongoloid göz aksı
<b>251553</b>	11.35	ASD, yarık damak, infant dönemde beslenme güçlükleri, myopatik olmayan hipotoni, düşük doğum ağırlığı, düşük kulaklar, mikrosefali ve tek palmar çizgi
<b>249955</b>	14.03	
<b>255116</b>	2.57	Mental retardasyon/gelişim geriliği
<b>256897</b>	10.68	

Diğer iki hastada artış gösteren 21q subtelomerik bölgesi ile ilgili yeniden düzenlenmelerde korpus kallozum anomalisi çoğu kez rapor edilmiştir (22,51). Ancak bu değişikliklerin büyük çoğunluğu kopya sayısındaki azalma şeklindedir. Bununla birlikte O'Driscoll ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları derlemede 21q11.21-q22.3 duplikasyonuna bağlı korpus kallozum anomalisi bildirilen 11 vaka olduğunu rapor etmişlerdir (22).

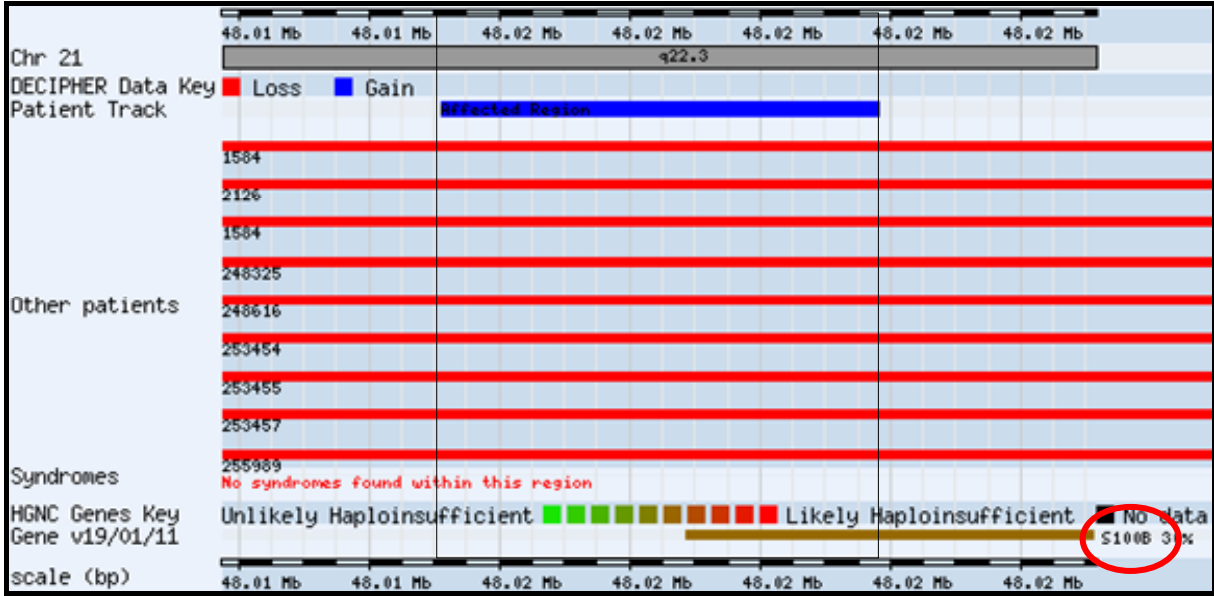
MLPA Salsa P070 kitinin bu bölgede hibridize olduğu gen *S100B* (S100 calcium-binding protein, beta) genidir. Bu genin nörogelişimsel süreçte rol oynadığını destekler nitelikte şizofreni, bipolar hastalık ve demans ile ilişkisine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (109-111). *S100B* geni proteini glia hücrelerinden derivate edilmiş bir protein olup merkezi sinir sisteminin gelişiminde nörotrofik faktör olarak görev yapmasının yanında nöronların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesinde de rol oynadığı bildirilmektedir (112). *S100B* geninin primer olarak astrosit hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir. *S100B* proteininin fonksiyonuna yönelik primer nöron ve glia hücre kültürlerinde yapılan in vitro deneylerde, bu proteinin akson uzamasını uyardığı ortaya konmuştur (113). Bu veriden hareketle akson uzantılarından oluşan korpus kallozum gelişiminde *S100B* geninin de etkili olabileceği söylenebilir. Yine parsiyel agenezi ve total agenezi bulunan iki hastamızda da bu geni içeren bölgede KSD saptanması da bu noktada anlamlıdır. Burada akla gelebilecek bir soru da *S100B* genindeki kopya sayısı artışının ekspresyonunu ne şekilde etkileyeceği konusudur. Genel olarak kopya sayısı artışının ekspresyonu da artıracağı düşünülebilir ancak tam tersine duplikasyon durumlarında bazı genlerin ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (114).

Diğer taraftan *S100B* proteininin aşırı ekspresyonunun sağlandığı farelerde, normal ekspresyonun olduğu farelere nispeten perinatal hipoksik iskemide belirgin artış bildirilmiştir (115). Bu bölgede artış saptanan hastalarımızdan birinde de doğumda cildin mor olması ve solunumun zayıf olması nedeniyle küveze alınma öyküsü mevcuttu. Hastamızdaki bu durum *S100B* duplikasyonuna bağlı ekspresyon artışını akla getirmekle birlikte doğum öncesi takiplerde saptanmış olan beyin sapındaki gelişim geriliğine de bağlı gerçekleşmiş olabilir.

*S100B* geninin komşuluğunda bulunan genlerden *PRMT2* (Protein Arjinin N-Metiltransferaz 2)'nin arjinin rezidülerinin metillenmesinde görevli olduğu düşünülmektedir (116). Arjinin rezidülerinin metilasyonu ilk etapta akla *PRMT2*'nin epigenetik düzenlemede rol oynadığını akla getirmekle birlikte *PRMT2*'nin nöron gelişimi, nöron-glia hücre etkileşimi ve akson uzaması gibi fizyolojik süreçlerle ilgili bildirilmiş herhangi bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Diğer taraftan bu genin UCSC Genome Browser hg19 programındaki ekspresyon verileri

incelendiğinde korpus kallozum ve merkezi sinir sisteminin diğerk bölgelerinde yüksek miktarda eksprese edilen genlerden olmadığı gözlenmiştir (117). *S100B* geninin hemen proksimalinde yerleşen *DIP2A* (Disco-Interacting Protein 2)'nin ise aksonların doğru yönde uzanım göstermeleri ve bunu uygun fizyolojik motifte gerçekleştirmelerinde görev aldığı belirtilmektedir (118). Bu yönü ile *DIP2A*'nın da kallozal gelişim sürecinde rol oynayabileceği öne sürülebilir.

*S100B* ve komşu bölgelerini içine alan bildirilmiş kopya sayısındaki artışlar DECIPHER v5.1 veri tabanından incelenmiş ve 0.1Mb uzunluğunda ve *S100B*'nin bir kısmını içeren bir adet artış bölgesi saptanmıştır (Decipher kodu 256644) (**Şekil 5.3**). Ancak bu hastada fenotipik özellik olarak obezite ve kaba ses rapor edilmiş olup herhangi bir merkezi sinir sistemi anomalisi veya mental retardasyon/gelişim geriliği bildirilmemiştir.



**Şekil 5.3:** DECIPHER v5.1 veri tabanında *S100B* geninin bir bölümünü içine alan 0.1Mb uzunluğunda 1 adet kopya sayısı artış bölgesi bulunmaktadır. Kopya sayısındaki artış mavi çubuk, azalış ise kırmızı çubuklarla gösterilmektedir.

(<https://decipher.sanger.ac.uk/patient/256644> internet adresinden yararlanılmıştır (Ref. 119))

Hastalarımızdaki korpus kallozum anomalisi dışındaki MSS ve diğer organ sistemleri anomalileri, bugüne kadar bildirilen kallozal anomalili olgulara benzer şekilde çok çeşitlilik göstermektedir (2,22). Örneğin bu çalışmada korpus kallozum anomalisine eşlik eden 4 çeşit (pakigri, heterotopi, beyin sapı ve cerebellum anomalileri) yapısal MSS anomalisi bulunmaktadır. Bu durum aynı genlerin korpus kallozum ve bu yapıların gelişim sürecinde görev alması ile açıklanabilir. Bu genlerin fonksiyonlarını etkileyen genomdaki herhangi bir değişiklik doğal olarak birçok MSS bölgesinin gelişimini de olumsuz etkileyecektir. Korpus kallozum anomalisi ile birliktelik gösteren farklı sistem ve organlardaki patolojiler de yine benzer şekilde açıklanabileceği gibi, çok sayıda farklı geni içine alan KSD'lerinin farklı sistem bulgularına yol açabileceği akılda tutulmalıdır.

İkibinli yılların başlarında kullanımı yaygınlaşan MLPA yöntemi, uygun prob karışımları kullanarak çok farklı uygulamalarda kullanılacak bir tekniktir (120,121). Tek bir reaksiyonla 45 farklı hedef bölge hakkında bilgi sağlayabilir. Bu yöntemde, benzer amaç için kullanılan multipleks PZR'dan farklı olarak tek çift primer kullanılması, aynı reaksiyonda farklı primer çiftlerinin kullanımı ile ortaya çıkabilecek sorunların da önüne geçmiştir. Analiz için 20ng'a kadar DNA'nın yeterli olacağı belirtilse de biz çalışmamızda en iyi sonucun 50-100ng'lık DNA miktarı ile sağlandığını gözlemledik.

**6. BÖLÜM**  
**SONUÇ VE ÇIKARIMLAR**

- ✓ Sonuç olarak daha önce subtelomerik bölgelerdeki değişikliklerin tek başına incelenmediği korpus kallozum agenezisi ve hipoplazisi bulunan hasta grubunda MLPA yöntemi ile %8 oranında (4/50) KSD saptadık.
- ✓ MLPA ile saptadığımız subtelomerik kopya sayısı artışları, FISH, uzun dizi PZR, nested PZR ve array CGH gibi farklı metodlarla daha ayrıntılı incelenecektir.
- ✓ Bu şekilde kırık bölgelerinin saptanarak önceden bildirilmiş kritik noktalarla benzerlik yönünden değerlendirilmesi hedeflenmektedir.
- ✓ Ancak hedeflenen bu araştırmalar mevcut çalışmanın kapsamı dışındadır. Bu amaçla mevcut çalışmamız belirlenen diğer hedeflere yönelik yapılacak çalışmalara öncülük edecektir.

## KAYNAKLAR

1. Tomasch, J. Size, distribution, and number of fibres in the human corpus callosum. *The Anat Rec* 1954; **119**(1), 119–35.
2. Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P ve ark. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**(4) : 287-99
3. Sperry, R. W. *The Neurosciences* (Schmitt, F. O. & Worden, F. G. editör) Cambridge, Massachusetts MIT Press, 1974:5-19.
4. Gazzaniga, M. S. Forty-five years of split-brain research and still going strong. *Nature Rev. Neurosci* 2005; **6**(8) : 653–59
5. Andermann E. Agenesis of the corpus callosum. İçinde: Vinken PJ, Bruyn GW editör. *Handbook of clinical neurology*. Vol 42. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981:6-9
6. Jeret JS, Serur D, Wisniewski E, Fisch C. Frequency of agenesis of the corpus callosum in the developmentally disabled population as determined by computerized tomography. *Pediatr Neurosci* 1986; **12**(2) :101-3.
7. Dobyms WB. Absence makes the search grow longer. *Am J Hum Genet* 1996; **58**(1) : 7-16.
8. Barkovich AJ. Anomalies of the corpus callosum and cortical malformations. İçinde: Barth PG, editör. *Disorders of neuronal migration*. London: Mac Keith Press, 2003:83-103.
9. Levy HL, Lobbregt D, Barnes PD, Poussaint TY. Maternal phenylketonuria: Magnetic resonance imaging of the brain in offspring. *J Pediatr* 1996; **128**(6) : 770–775.
10. Sowell ER, Mattson SN, Thompson PM, Jernigan TL, Riley EP ve ark. Mapping callosal morphology and cognitive correlates. Effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology* 2001; **57**(2) : 235–44
11. Schell-Apacik CC, Wagner K, Bihler M, Ertl-Wagner B, Heinrich U, Klopocki E ve ark. Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am J Med Genet Part A* 2008; **146A**(19): 2501–11.



12. Bedeschi MF, Bonaglia MC, Grasso R, Pellegrini A, Garghentino RR, Battaglia MA ve ark. Agenesis of the Corpus Callosum: Clinical and Genetic Study in 63 Young Patients. *Pediatr Neurol* 2006; **34**(3) : 186-93.
13. Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**(11) : 4913-7.
14. Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med* 2001; **7**(4) : 497-501.
15. Xu J, Chen Z: Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003; **117C**(1):15-24.
16. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 2007; **143A**(13) : 1431-41.
17. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; (1151):157-66.
18. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR ve ark. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A* 2008; **146A**(17) : 2242-51.
19. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Ende J Van ve ark. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004; **23**(1) : 17-21.
20. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, McGhie JD, Coffa J, Schouten J ve ark. Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Hum Mutat* 2005; **26**(5) : 477-86.
21. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A ve ark. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet* 2005; **48**(4) : 388-96.

22. O'Driscoll MC, Black GC, Clayton-Smith J, Sherr EH, Dobyns WB.: Identification of genomic loci contributing to agenesis of the corpus callosum. *Am J Med Genet A*. 2010; **152A**(9):2145-59.
23. Kleefstra T, Smidt M, Banning MJ, Oudakker AR, Van Esch H, de Brouwer AP ve ark. Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *J Med Genet* 2005; **42**(4) : 299-306.
24. Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J ve ark. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation *BMC Med Genet* 2010; 11:72
25. Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FD, Medne L ve ark, Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 2007; **81**(2) : 292-303.
26. Apak S. 'Korpus Kallozum' Beyindeki Gizemli Bölge. *Journal of Current Pediatrics* 2009; 7: 142-6.
27. <http://neuroquantology.com/journal/index.php/nq/article/viewFile/81/81> Erişim tarihi 17.03.2011.
28. Parent A. Félix Vicq d'Azyr: Anatomy, Medicine and Revolution. *Can J Neurol Sci* 2007; 34: 30-37.
29. Lindwall C, Fothergill T, Richards L. Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol* 2007; **17**(1) : 3–14.
30. Richards LJ, Plachez C, Ren T. Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin. Genet* 2004; **66**(4) : 276–89
31. Hatten ME. Central nervous system neuronal migration. *Ann Rev Neurosci* 1999; (22):511–39
32. Mhrshahi R. The corpus callosum as an evolutionary innovation. *J Exp Zool Mol Dev Evol* 2006; **306B**(1) : 8–17.
33. Holley JA. Early development of the circumferential axonal pathway in mouse and chick spinal cord. *J Comp Neurol* 1982; **205**(4) : 371–82.
34. Nordlander RH, Singer M. Spaces precede axons in *Xenopus* embryonic spinal cord. *Exp Neurol* 1982; **75**(1) : 221–28.

35. Norris CR, Kalil K. Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 1991; **11**(11) : 3481–92.
36. Silver J. Glia-neuron interactions at the midline of the developing mammalian brain and spinal cord. *Perspect Dev Neurobiol* 1993; **1**(4):227–36
37. Shu T, Richards LJ. Cortical axon guidance by glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* 2001; **21**(8) : 2749–58.
38. Lent R, Uziel D, Baudrimont M, Fallet C. Cellular and molecular tunnels surrounding the forebrain commissures of human fetus. *J Comp Neurol* 2005; **483**(4) : 375–82.
39. Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: Descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 1982; **210**(1) : 10–29.
40. Glass HC, Shaw GM, Ma C, Sherr EH. Agenesis of the Corpus Callosum in California 1983–2003: A Population-Based Study. *Am J Med Genet A*. 2008; **146A**(19): 2495–500.
41. Hanna RM, Marsh SE, Swistun D, Al-Gazali L, Zaki MS, Abdel-Salam GM ve ark. Distinguishing 3 classes of corpus callosal abnormalities in consanguineous families. *Neurology* 2011; **76**(4) : 373-82.
42. Roebuck TM, Mattson SN, Riley EP. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp Res* 1998; **22**(2) : 339–44.
43. Rubert G. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J. Neurosci Res* 2006; **84**(3) : 483–96.
44. Evrard SG. Altered neuron–glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. *Brain Res. Dev.* 2003; **147**(1-2) : 119–33.
45. Greenberg DA. Linking acquired neurodevelopmental disorders to defects in cell adhesion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; **100**(14) : 8043–44.
46. Minana, R. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J. Neurochem* 2000; **75**(3), 954–64.
47. Wilkemeyer MF. Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; **100**(14) : 8543–48.

48. Bahi-Buisson N, Guttierrez-Delicado E, Soufflet C, Rio M, Cormier Daire V, Lacombe D ve ark. Spectrum of epilepsy in terminal 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia* 2008; **49**(3) : 509–15.
49. Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG. Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C* 2007; **145C**(4) : 346–56.
50. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, ve ark. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: A recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 2008; **121**(2) : 404–10.
51. Dobyns WB, Mirzaa G, Christian SL, Petras K, Roseberry J, Clark GD ve ark. Consistent chromosome abnormalities identify novel polymicrogyria loci in 1p36.3, 2p16.1-p23.1, 4q21.21-q22.1, 6q26-q27, and 21q2. *Am J Med Genet Part A* 2008; **146A**(13) : 1637–54.
52. Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, McKee S, Manson FD, Medne L Ve ark. Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase *AKT3* in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 2007; **81**(2) : 292–303.
53. Merritt JL II, Zou Y, Jalal SM, Michels VV. Delineation of the cryptic 1qter deletion phenotype. *Am J Med Genet Part A* 2007; **143A**(6) : 599–603.
54. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T ve ark. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 2005; **132**(13) : 2943–54.
55. Gould DB, Jaafar MS, Addison MK, Munier F, Ritch R, MacDonald IM, ve ark. Phenotypic and molecular assessment of seven patients with 6p25 deletion syndrome: Relevance to ocular dysgenesis and hearing impairment. *BMC Med Genet* 2004; **5**:17.
56. Eash D, Waggoner D, Chung J, Stevenson D, Martin CL. Calibration of 6q subtelomere deletions to define genotype/phenotype correlations. *Clin Genet* 2005; **67**(5) : 396–403
57. Sherr EH, Owen R, Albertson DG, Pinkel D, Cotter PD, Slavotinek AM ve ark. Genomic microarray analysis identifies candidate loci in patients with corpus callosum anomalies. *Neurology* 2005; **65**(9) : 1496–98.

58. Ciccone R, Mattina T, Giorda R, Bonaglia MC, Rocchi M, Pramparo T, ve ark. Inversion polymorphisms and non-contiguous terminal deletions: The cause and the (unpredicted) effect of our genome architecture. *J Med Genet* 2006; **43**(5):e19.
59. Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K ve ark. Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 2003; **82**(2) : 238–44.
60. Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S ve ark. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet* 1998; **20**(2) : 180–83.
61. Ballarati L, Rossi E, Bonati MT, Gimelli S, Maraschio P, Finelli P ve ark. 13q Deletion and central nervous system anomalies: Further insights from karyotype-phenotype analyses of 14 patients. *J Med Genet* 2007; **44**(1) : e60.
62. Petek E, Plecko-Startinig B, Windpassinger C, Egger H, Wagner K, Kroisel PM. Molecular characterisation of a 3.5Mb interstitial 14q deletion in a child with several phenotypic anomalies. *J Med Genet* 2003a; **40**(4) : e47.
63. Schwarzbraun T, Vincent JB, Schumacher A, Geschwind DH, Oliveira J, Windpassinger C ve ark. Cloning, genomic structure, and expression profiles of TULIP1 (GARNL1), a brain-expressed candidate gene for 14q13-linked neurological phenotypes, and its murine homologue. *Genomics* 2004; **84**(3):577–86.
64. Shoichet SA, Kunde SA, Viertel P, Schell-Apacik C, von Voss H, Tommerup N ve ark. Haploinsufficiency of novel FOXG1B variants in a patient with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly. *Hum Genet* 2005; **117**(6) : 536–44.
65. Schinzel A. Acrocallosal syndrome. *Am. J. Med. Genet* 1982; **12**: 201-203.
66. Aykut A, Cogulu O, Ekmekci AY, Ozkinay F. An additional manifestation in acrocallosal syndrome: temporal lobe hypoplasia. *Genet Counsel* 2008; **19**(2) : 237-40.
67. Casamassima AC, Beneck D, Gewitz M H, Horowitz MA, Woolf PK, Pettersen IM ve ark. Acrocallosal syndrome: additional manifestations. *Am J Med Genet* 1989; **32**(3) : 311-17.
68. Elson E, Perveen R, Donnai D, Wall S, Black GCM. De novo GLI3 mutation in acrocallosal syndrome: broadening the phenotypic spectrum of GLI3 defects and overlap with murine models. *J Med Genet* 2002; **39**(11) : 804-6.

69. Berry-Kravis E, Israel J. X-linked pachygyria and agenesis of the corpus callosum: evidence for an X chromosome lissencephaly locus *Ann Neurol* 1994;**36**(2):229-33.
70. Bonneau D, Toutain A, Laquerrière A, Marret S, Saugier-veber P, Barthez MA. Ve ark. X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia (XLAG): clinical, magnetic resonance imaging, and neuropathological findings. *Ann Neurol* 2002; **51**(3) : 340–49.
71. Sherr, E. H. The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. *Curr. Opin. Pediatr.* 2003;(15):567–571
72. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, ve ark. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nature Genet* 2002; **32**(3) : 359–69.
73. Demyanenko GP, Tsai AY, Maness PF. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 1999; **19**(12) : 4907–20.
74. Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P ve ark. Brain development in mice lacking L1–L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 2004; **165**(1) : 145–54.
75. Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF. Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 2002; **22**(1) : 239–47.
76. Boettger T, Rust MB, Maier H. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 2003; **22**(20) : 5422–34.
77. Aicardi J, Chevrie JJ, Rousselle F. Le syndrome spasmes en flexion, agenesis calleuse, anomalies chorio-retiniennes. *Arch Franc Pediat* 1969; 26: 1103-1120.
78. Aicardi, J. Aicardi syndrome: old and new findings. *Int Pediat* 1999; 14: 5-8.
79. Curatolo P, Libutti G, Dallapiccola B. Aicardi syndrome in a male infant. *J Pediat* **96**(2): 286-287, 1980.
80. Williams CL, Li C, Kida K, Inglis PN, Mohan S, Semenc L ve ark. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis *J Cell Biol* 2011;**192**(6):1023-41

81. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD ve ark. A highly conserved repetitive DNA sequence, TTAGGGn, present at the telomers of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**(18) : 6622-26.
82. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 1997; **17**(2) : 231-35.
83. Macina RA, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA, Hu X-L, Riethman HC. Sequence organization of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet* 1994; **3**(10): 1847-53.
84. Macina RA, Morii K, Hu XL, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA ve ark. Molecular cloning and RARE cleavage mapping of human 2p, 6q, 8q, 12q, and 18q telomeres. *Genome Res* 1995; **5**(3) : 225-32.
85. Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U ve ark. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res* 2004; **14**(1): 18-28.
86. Demirsoy A. 1991. Yaşamın Temel Kuralları. Meteksan Matbaacılık ve Teknik Sanayi Tic. Ltd. Şti., Ankara, 560 s.
87. Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA ve ark. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 1997 ; **6**(8):1305-13.
88. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**(12) : e57.
89. Eijk-Van Os PG, Schouten JP. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol* 2011; 688 : 97-126.
90. Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. *Anal Chem* 2008; **80**(23):9363-8.
91. Ohnesorg T, Turbitt E, White SJ. The many faces of MLPA. *Methods Mol Biol* 2011; 687: 193-205
92. MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands; <http://www.mrc-holland.com>. Erişim 16.03.2011.
93. Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization

- and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A* 2005; **139**(3) : 231-3.
94. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A ve ark. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics* 2007 ;**8**(1) : 9.
  95. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GF, Knoers NV, Kets M ve ark. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; **41**(12) : 892-9.
  96. Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem* 2006; **39**(3) : 196-202.
  97. Bruno DL. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A* 2006; **140**(24) : 2786-93.
  98. Bartlett JM, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol* 2003; 226:3-6
  99. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA ve ark. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science* 1985; **230**(4732) : 1350-4.
  100. Barron AE, Soane DS, Blanch HW. Capillary electrophoresis of DNA in uncross-linked polymer solutions. *J Chrom A* 1993; **652**(1) : 3-16.
  101. Martinez R MC, Berka J, Belenkii A, Foret F, Miller W, Karger BL. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 1993; **65**(20): 2851-58.
  102. Hetts SW, Sherr EH, Chao S, Gobuty S, Barkovich AJ. Anomalies of the corpus callosum: An MR analysis of the phenotypic spectrum of associated malformations. *AJR Am J Roentgenol* 2006; **187**(5):1343-48.
  103. [http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg\\_gene=uc002chb.2&hgg\\_prot=Q9NUI1&hgg\\_chrom=chr16&hgg\\_start=451857&hgg\\_end=462486&hgg\\_type=knownGene&db=hg19&hgssid=193971783](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc002chb.2&hgg_prot=Q9NUI1&hgg_chrom=chr16&hgg_start=451857&hgg_end=462486&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgssid=193971783). Erişim 18.04.2011



104. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=corpus+callosum&x=0&y=0>Erişim 18.04.2011
105. Milon L, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J ve ark. nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Hum Genet* 1997; **99**(4): 550-557.
106. Epand RF, Schlattner U, Wallimann T, Lacombe ML, Epand RM. Novel lipid transfer property of two mitochondrial proteins that bridge the inner and outer membranes. *Biophys J* 2007; **92**(1) : 126-137.
107. Hales CM, Griner R, Hobdy-Henderson KC, Dorn MC, Hardy D, Kumar R ve ark. Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J Biol Chem* 2001; **276**(2): 39067-75.
108. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=decr2&x=0&y=0> Erişim 18.04.2011
109. Roche S, Cassidy F, Zhao C, Badger J, Claffey E, Mooney L ve ark. Candidate gene analysis of 21q22: support for S100B as a susceptibility gene for bipolar affective disorder with psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; **144B**(8) : 1094-6.
110. Lambert JC, Ferreira S, Gussekloo J, Christiansen L, Brysbaert G, Slagboom E ve ark. Evidence for the association of the S100beta gene with low cognitive performance and dementia in the elderly. *Mol Psychiatry* 2007; **12**(9) : 870-80.
111. Liu J, Shi Y, Tang J, Guo T, Li X, Yang Y ve ark. SNPs and haplotypes in the S100B gene reveal association with schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **328**(1) : 335-41.
112. Wainwright MS, Craft JM, Griffin WST, Marks A, Pineda J, Padgett K ve ark. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 2004; **56**(1) : 61-67.
113. Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P ve ark. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Pro. Nat Acad Sci* 1994; **91**(12): 5359-5363.
114. Liu P, Erez A, Sreenath Nagamani SC, Bi W, Carvalho CM ve ark. Copy number gain at Xp22.31 includes complex duplication rearrangements and recurrent triplications. *Hum Mol Genet* 2011; **20**(10) : 1975-88.
115. Wainwright MS, Craft JM, Griffin WST, Marks A, Pineda J, Padgett KR ve ark. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 2004; **56**(1): 61-67.

116. Katsanis N, Yaspo ML, Fisher EMC. Identification and mapping of a novel human gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene. *Mammalian Genome* 1997; **8**(7) : 526-529.
117. [http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg\\_gene=uc002zjx.2&hgg\\_prot=Q6FHF0&hgg\\_chrom=chr21&hgg\\_start=48055526&hgg\\_end=48084862&hgg\\_type=knownGene&db=hg19&hgsid=193971783](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc002zjx.2&hgg_prot=Q6FHF0&hgg_chrom=chr21&hgg_start=48055526&hgg_end=48084862&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgsid=193971783) Erişim 18.04.2011
118. Mukhopadhyay M, Pelka P, DeSousa D, Kablar B, Schindler A, Rudnicki MA ve ark. Cloning, genomic organization and expression pattern of a novel Drosophila gene, the disco-interacting protein 2 (dip2), and its murine homolog. *Gene* 2002; **293**(1-2) : 59-65.
119. <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/256644> Erişim 19.04.2011
120. Hermsen MA, Tijssen M, Acero IH, Meijer GA, Ylstra B, Toral JF. High resolution microarray CGH and MLPA analysis for improved genotype/phenotype evaluation of two childhood genetic disorder cases: ring chromosome 19 and partial duplication 2q. *Eur J Med Genet* 2005; **48**(3):310-8.
121. Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A* 2005; **139**(3) : 231-3.