



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

***KANSLI GEN DELESYONUNUN SAPTANMASINDA ACGH VE
MLPA YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI***

Selin AKAD
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2018



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

***KANSLI GEN DELESYONUNUN SAPTANMASINDA ACGH
VE MLPA YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELİN AKAD

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ZERRİN YILMAZ ÇELİK

ANKARA, 2018

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Selin Akad tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2018

Tez Konusu :“*KANSLI* Gen Delesyonunun Saptanmasında aCGH ve MLPA Yönteminin Karşılaştırılması”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Zerrin YILMAZ ÇELİK

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün

Gazi Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun .22. / Ocak / 2018 tarih ve ...1-2... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 18 / 01 / 2018

Öğrencinin Adı, Soyadı : Selin Akad

Öğrencinin Numarası : 21520134

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik

Programı : Tıbbi Genetik Tezli Yüksek lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik


Tez Başlığı : *KANSLI* GEN DELESYONUNUN SAPTANMASINDA ACGH VE MLPA YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 44 sayfalık kısmına ilişkin, 18 / 01 / 2018 tarihinde tez danışmanım tarafından “Turnitin” adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2’dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası: 

Onay

18 /01/2018

Prof.Dr.Zerrin Yılmaz Çelik

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu özveriyle büyük emek sarfeden, hiçbir zaman yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik' e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bilgi birikimi, vizyoner kişiliği ile gerek derslerde gerekse ders dışında, her konuda desteğini bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Feride İffet Şahin ve Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerde bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan hocalarım Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri ve Doç. Dr. Özgür Kütük' e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar ile ilgili birçok şeyi öğrenip, tecrübe sağlamamı sağlayan başta Uzm. Dr. Aslı Belen Sağlam, Uzm. Bio. Sema Akgümüş ve Uzm. Kim. Esra Başyigit olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek lisans programının ilk mezunu olmanın büyük onur ve mutluluğunu yaşıyorum.

ÖZET

Kromozomlarda belirlenen mikrodelsiyon ve mikroduplikasyonlar, DNA' daki kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) patolojik bir alt grubudur. Bir kilobazdan birkaç megabaza kadar büyüklükleri değişebilmektedir. Dizin karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) teknolojisinin kullanılmaya başlamasından sonra bu tür kromozom dengesizliklerinin belirlenmesi kolaylaşmıştır. Bunlardan biri de 17q21.31 mikrodelsiyon ve mikroduplikasyon sendromudur.

17q21.31 bölgesinde bulunan 500-650 kb büyüklüğündeki kopya kayıpları, Koolen-de Vries Sendromu (KdVS) olarak tanımlanır, zihinsel kısıtlılık, hipotoni ve belirgin yüz özellikleriyle birlikte. Daha sonraki çalışmalar, bu bölgede yerleşik *KANSL1* geninin haplo-yetersizliğinin, 17q21.31 mikrodelsiyon sendromu bulgularının oluşması için yeterli olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma ile aCGH sonucunda 17q21.31 mikrodelsiyon bölgesinde *KANSL1* genini içeren kopya sayısı kaybı saptanan 30 hasta, MLPA yöntemi ile yeniden incelenmiştir. Bu karşılaştırma sonucunda 30 hastadan sadece 3' ünde *KANSL1* geninin delesiyonu bulunurken, 1 hastada duplikasyon saptanmıştır. Bir hastanın sonucu ise yonteme bağlı nedenlerden dolayı değerlendirilememiştir.

Yapılan bu çalışma ile aCGH ile *KANSL1* genini içeren kopya kaybı saptanması durumunda, klinik değerlendirme ve başka bir yöntemle doğrulama yapılmadan rapor verilmesinin yanlış olacağı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: CNV, *KANSL1*, aCGH, MLPA, 17q21.31, KdVS

ABSTRACT

Microdeletion and microduplications are detected on chromosomes as a pathological subgroup of copy number variants (CNV) of DNA. Sizes can change from one kilobase to several megabases. It has become easier to identify such chromosomal syndromes after use of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) technology. One of them is 17q21.31 microdeletion and microduplication syndrome. Copy loss in size of 500-650 kb in the regions 17q21.31 which is describe as Koolen-de Vries Syndrome (KdVS) includes mental retardation, epilepsy, hypotonia and characteristic facial features. Novodays, we know that haplo-insufficiency of *KANSL1* gene in this region is sufficient for occure of theses 17q21.31 microdeletion syndrome findings.

In this study, 30 patients with a loss of copy number including the *KANSL1* gene in 17q21.31 microdeletion region as a result of aCGH were examined by MLPA method again. As a result of this comparison, only three of the 30 patients had a deletion of the *KANSL1* gene and duplication was found in one patient. The outcome of a patient can not be assessed due to procedural reasons.

This study was show that if *KANSL1* gene loss were detected by aCGH, it would be wrong to report it without being validated by clinical evaluation and another method.

Keywords: CNV, *KANSL1*, aCGH, MLPA, 17q21.31, KdVS

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kopya Sayısı Değişiklikleri ve Kromozomal Sendromlar	3
2.2. Koolen-de Vries Sendromu	4
2.3. KANSLI Geni ve Komşu Genler.....	5
2.4. Histon Asetiltransferaz (H4K16).....	7
2.5. aCGH Yöntemi.....	8
2.5.1. aCGH avantajları	9
2.5.2. aCGH dezavantajları.....	10
2.6. MLPA Yöntemi.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Etik Kurul Onayı.....	13
3.2. Hasta Grubu	13
3.3 Yöntem	16
3.3.1. DNA örnekleri	16
3.3.2. DNA'nın konsantrasyon ve saflığının ölçümü.....	16
3.3.3. Kullanılan gereçler	16
3.3.4. Kullanılan kimyasal malzemeler	17
3.3.5. MLPA reaksiyonu.....	17
3.3.5.1. Çalışmaya başlamadan önce yapılması gerekenler.....	19
3.3.5.2. DNA denatürasyonu.....	19
3.3.5.3. Hibridizasyon reaksiyonu	19
3.3.5.4. Ligasyon reaksiyonu	20
3.3.5.5. PCR reaksiyonu	20
3.3.5.6. ABI 3500 cihazına yükleme	20
3.3.5.7. Analiz.....	21
3.3.5.7.1. Çalışmada kullanılan referanslar.....	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. MLPA Çalışmasının Sonuçları	24
4.1.1. Birinci grup.....	24
4.1.2. İkinci grup	24

4.1.3. Üçüncü grup.....	25
4.2. MLPA Sonuçlarına Göre Delesyon ve Duplikasyon Bulunan Hastalar.....	27
4.2.1. Hasta 4.....	27
4.2.2. Hasta 13.....	29
4.2.3. Hasta 16.....	30
4.2.4. Hasta 18.....	32
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

- CNV: Kopya sayısı değişiklikleri
aCGH: Dizin karşılařtırılmalđ genomic hibridizasyon
KdVS: Koolen-de Vries Sendromu
Mb: Megabaz
MLPA: Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu
FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon
QF-PCR: Kantitatif Floresan Polimer Zincir Reaksiyonu
NAHR: Nonallel Homolog Rekombinasyon
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
JHM: Eklem Hiper mobilitesi
HAT: Histon Asetiltransferaz
PCR: Polimer Zincir Reaksiyonu
NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Arama Veritabanı
H4K16: Histon H4 lizin 16 Asetilasyonunu
KAT 8: Lizin Asetiltransferaz 8
Kb: Kilobaz
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA: Ribo Nükleik Asit
MR: Mental Retardasyon
MMR: Motor Mental Retardasyon
CP: Serebral Parsi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Genomda kopya sayısı değişiklikleri.....	4
Şekil 2. <i>KANSL1</i> gen bölgesinin kromozom üzerindeki yeri 17q21.31	6
Şekil 3. <i>KANSL 1</i> geni aktif bölgesi	6
Şekil 4. <i>KANSL1</i> geninin moleküler düzeyde bulunma yeri ve komşu genleri	7
Şekil 5. MLPA basamakları.....	12
Şekil 6. A1-1213 lot numaralı salsa MLPA probemix P443-A1 <i>KANSL1</i> kiti	18
Şekil 7. Referanslardan birine ait kontrol MLPA sonuç grafiği	21
Şekil 8. Hasta 4 MLPA sonuç grafiği	28
Şekil 9. Hasta 13 MLPA sonuç grafiği	29
Şekil 10. Hasta 16 önden ve yandan yüz görüntüsü	31
Şekil 11. Hasta 16 MLPA sonuç grafiği	32
Şekil 12. Hasta 18 önden ve yandan yüz görüntüsü	33
Şekil 13. Hasta 18 MLPA sonuç grafiği	34

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Kopya sayısı değişikliklerini saptama yöntemleri ve özellikle.....	9
Tablo 2. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu.....	14
Tablo 3. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu	14
Tablo 4. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu.....	15
Tablo 5. MLPA sonuçlarını değerlendirirken kullanılan referans aralıklar.....	21
Tablo 6. MLPA çalışması ile bulgu saptanan delesyon ve duplikasyon bölgeleri....	23
Tablo 7. Hastaların KANSL1 geni ile ilişkili aCGH ve MLPA sonuçları	24
Tablo 8. Hastaların KANSL1 geni ile ilişkili aCGH ve MLPA sonuçları	25
Tablo 9. Hastaların KANSL1 geni ile ilişkili aCGH ve MLPA sonuçları	26
Tablo 10. MLPA çalışması ile delesyon ve duplikasyon saptanan hastaların fenotip karşılaştırılması	35

1. GİRİŞ

Mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromları, mayotik hatalı homolog kromozom eşleşmeleri ile gerçekleşen kopyasayısı değişiklikleriyle oluşmaktadır (1). Mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromları 200'den fazla entelektüel ve gelişimsel gerilik sendromları ile ilişkilidir. Yapılan son çalışmalarda mikrodelesyon sendromlarının görülme sıklığı 10.000 doğumda 1.99 şeklindeyken, mikroduplikasyon sendromlarında 0.7 şeklindedir (2). Işık mikroskopu ile 5-10 Mb altındaki değişiklikler tespit edilemediğinden bu hastaların konvensiyonel karyotip bulgusu normal olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle genetik tanı için çözünürlüğü daha yüksek olan dizin karşılaştırmalı genom hibridizasyon (aCGH), hedefe yönelik olarak floresan in situ hibridizasyon (FISH), kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) veya çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) yöntemleri kullanılmaktadır (3).

aCGH' nin uygulanmasından sonra tespit edilen sendromlardan birisi de 17q21.31 mikrodelesyon ve mikroduplikasyonudur (Koolen-de Vries sendromu) (4). Koolen-de Vries sendromu (KdVS), %95 KAT8 düzenleyici NSL kompleks ünitesi 1 (*KANSL1*) gen delesyonu/duplikasyonu ile oluşurken, vakaların %5 'inde *KANSL1* geninde mutasyon bildirilmiştir (5). 17q21.31 mikrodelesyonu 16.000 doğumda 1 insidansa sahipken, 17q21.31 mikroduplikasyon şimdiye kadar sadece 5 hastada bildirilmiştir (6). 17q21.31 gen bölgesinde meydana gelen bir mikrodelesyon rutin olarak yapılan sitogenetik G-bantlama yöntemi ile belirlenemez (7). MLPA, aCGH ya da *KANSL1* geni dizi analizi ile tanı konulabilir (5).

Bu çalışmada, geriye dönük olarak Ocak 2013-Aralık 2015 tarihleri arasında bölümümüze karyotip anomalisi olmayan, nedeni açıklanamamış gelişimsel gerilik, epilepsi ve dismorfik yüz görünümü nedeni ile aCGH analizi için başvuran hastalar *KANSL1* genini içeren kopya sayısı kaybı açısından tekrar değerlendirilmiştir. *KANSL1* delesyonuna sahip olan hastaların bazılarında benzer dismorfik yüz görüntülerine sahip olmalarından dolayı Koolen-de Vries sendromu tanısı koyabilmek için ortak bir fenotipik özelliğe sahip olabilecekleri düşünülmüştür. Delesyon saptanan hastalar ikinci bir yöntem olarak MLPA ile incelenmiştir.

Çalışma sonucunda hastaların aCGH, MLPA sonuçları ve fenotip özellikleri karşılaştırılarak, KdVS tanısında genetik yaklaşım açısından bir algoritma oluşturulması amaçlanmıştır.



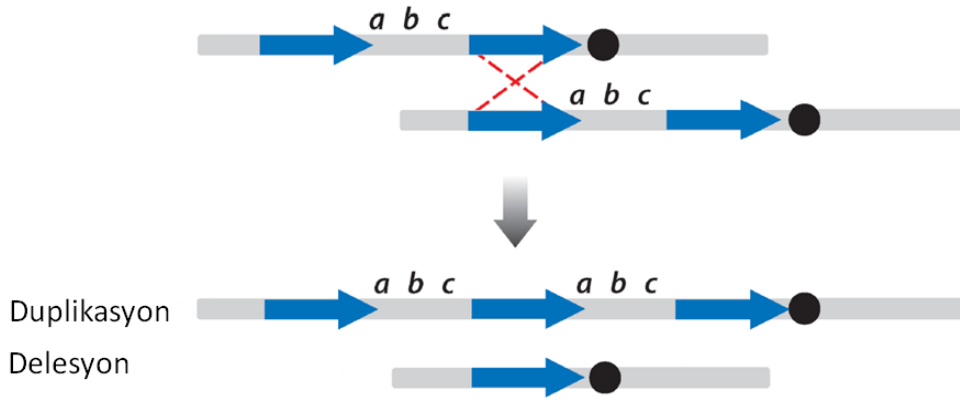
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kopya Sayısı Değişiklikleri ve Kromozomal Sendromlar

İnsan genomu, her bir ebeveynden bir set aktarılan 23 çift kromozomdan oluşmaktadır. DNA yaklaşık 30.000 adet geni kodlamaktadır. Günümüzde, genomda DNA'nın kopya sayısında değişiklikler olabileceği bilinmektedir (8). Kopya sayısı değişiklikleri (CNV), referans insan genomuyla karşılaştırıldığında DNA'nın bir kısmının artışı veya kaybı olarak tanımlanır; bir kilobazdan birkaç megabaza hatta bütün bir kromozoma (trisomiler ve monozomiler) kadar değişebilmektedir (1).

Oluşum mekanizması açısından iki büyük CNV sınıfı vardır: tekrarlayan(*recurrent*) ve tekrarlamayan (*nonrecurrent*). Tekrarlayan CNV'ler genel olarak mayoz bölünme esnasında allelik olmayan homolog rekombinasyon (*NAHR*) ile ortaya çıkarlar (Şekil 1) ve kırık noktaları, CNV bölgesini çevreleyen büyük duplike dizilerin sınırında bulunur. Kırık noktaları, tanımlanan bölgelerde kümelendiği için, tekrarlayan CNV'lerin kapsamı ilgisiz bireylerde bile esasen özdeştir. Diğer grup CNV'ler ise, genellikle benzersiz bir dizi içinde uzanan ve hazırlayıcı bir genomik yapıdan kaynaklanmayan bölgelerde kırık noktalarına sahiptir (1). Bu CNV'ler, homolog olmayan uç birleştirme (*NonHEJ*) ve replikasyon durdurma (*Frog stalling*) ve kalıp kaydırmayı (*template switching*) içeren birkaç farklı mekanizma ile ortaya çıkabilir. Sonuç olarak, bu şekilde oluşan CNV'ler iki ilgisiz bireyde çakışabilmesine rağmen, aynı kırık noktalarını paylaşma olasılığı düşüktür (1).

CNV'ler, bir veya daha fazla gen içerebilir ya da hiç gen içermeyebilir. Bazı CNV'ler hastalığa neden olsa da birçoğu sağlıklı bireylerde benign varyantlar olarak bulunmaktadır. Moleküler genetik yöntemler geliştikçe patojenik kopya sayısı varyantları oluşturan mikrodelsiyon ve mikroduplikasyon sendromlarının belirlenmesi kolaylaşmıştır (9).



Şekil 1. Genomda kopya sayısı değişikliklerinin oluşumunu açıklayan hatalı eşleşme ve sonuçları Referans 1' den modifiye edilmiştir. Bu şemada, yüksek dizi benzerliği olan iki büyük bölgesel duplikasyon (mavi ok) a, b ve c genlerini içeren bir bölgeyi içermektedir. Homologların yanlış eşleşmesini takiben, bu tekrarlar, mayoz sırasında, allelik olmayan, segmental duplikasyonlar yerine paralog geçişli olaya yardım ederek NAHR' yi kolaylaştırır. Bu, karşılıklı iki ürüne neden olur: a, b ve c genlerinin ek bir kopyası taşıyan duplike kromozom ve aynı bölgenin delesyonunu taşıyan ikinci bir kromozom şeklindedir (1).

2.2. Koolen-de Vries Sendromu

Koolen-de Vries sendromu (KdVS) (OMIM# 610443) olarak da bilinen 17q21.31 mikrolelesyon sendromu ilk olarak 2006 yılında dismorfik bulgular, hipotoni, zihinsel kısıtlılık ve organ bozukluklarını içeren kişilerde tanımlanmıştır (10, 11, 12). Ayrıca olguların %50' sinden fazlası beyinde yapısal bozukluklar (korpus kallozum agenezisi, ventrikül genişlemesi), epilepsi, kardiyak (aortik veya pulmoner stenoza, ventriküler veya atriyal septal defektler) ve genitoüriner sistem bulguları ile ortaya çıkmaktadır (13, 14, 15). Konjenital kardiyak defekti olarak hastalarda pulmoner stenoza (%27), septal defektler (%18), bikuspid aort kapağı (%18), patent duktus arteriozus, foramen ovale veya aortik dilatasyon bildirilmiştir. Ürolojik anomali olarak kriptorşitizm, hipospadias, vezikoüreteral reflü %82 gibi, yüksek oranda hastalarda gözlenmiştir. Hastaların %58-73'ünde çocukluk döneminde eklem hipermobilitesi görülür ve bazen kalça çıkığı (konjenital veya

edinsel) veya pozisyon bozuklukları saptanabilir (15, 16). Daha nadir olarak işitme kaybı (%26), ektodermal anomaliler, hipermetropi ve diğer göz kusurları da bildirilmiştir (15, 17).

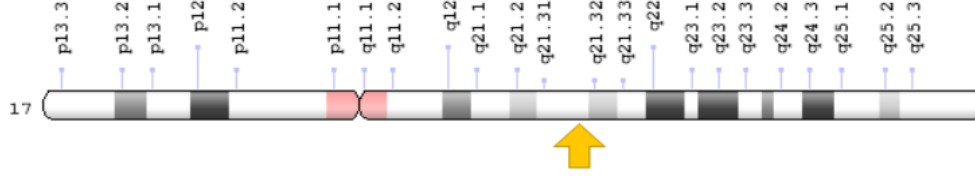
KdVS sendromu otozomal dominant kalıtım özelliğindedir. Genetik değişim genellikle üreme hücrelerinin (yumurta ve sperm) oluşumu sırasında veya erken fetal gelişim sırasında de-novo olarak gelişir. Etkilenen kişilerin genellikle ailelerinde benzer hastalık öyküsü yoktur (18,19).

Koolen-de Vries sendromu (KdVS), *KANSLI* gen bölgesini de içeren *CRHR1*, *MAPT*, *IMP5* ve *STH* gen bölgelerini kapsayan 17q21.31 bölgesinde 440-680 kb'lik bir kopya kaybı veya bir intragenik *KANSLI* mutasyonu nedeniyle oluşur (20). Delesyon bölgesinin kesin boyutu etkilenen kişiler arasında değişmekle birlikte yaklaşık 500 kb büyüklüğünde ortak delesyon bölgesi görülebilmektedir. Bununla birlikte, *KANSLI* gen mutasyonuna sahip bireylerin mikrodelesyon ile aynı fenotipe sahip olmaları nedeniyle, bu genin fenotipten sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (21).

2012' de KdVS klinik özelliklerini taşıyan dört bağımsız bireyde *KANSLI*'deki patojen tek nükleotid varyantları (SNP'ler) tanımlanmıştır ve bu, *KANSLI*' in haploetersizliğinin KdVS fenotipine neden olması için yeterli olduğu gösterilmiştir (22).

2.3. *KANSLI* Geni ve Komşu Genler

KANSLI geni 17. Kromozomun uzun kolunun (q) 21.31 [(GRCh38): 46,029,915_46,225,373] bölgesinde yer almaktadır. Şekil 2' de *KANSLI* geninin kromozom üzerindeki yeri gösterilmiştir (23). *KANSLI* geni 15 ekzondan oluşmaktadır, 202459 baz çifti içermekte ve 1105 protein kodlamaktadır (24). *KANSLI* gen ürünü, KAT8 düzenleyici NSL kompleksi adı verilen bir grup ile etkileşen protein kompleksinin bir üyesidir. Bu kompleks bir histon asetiltransferaz (HAT) kompleksi olarak sınıflandırılır ve kromatin modifikasyonunda rol oynar (21).



Şekil 2. *KANSL1* Gen bölgesinin kromozom üzerindeki yeri 17q21.31 (23)

KANSL1 geninden üretilen protein, doğumdan önce ve yaşam boyunca vücudun organ ve dokularında bulunur. Diğer genlerin aktivitesini kontrol altına alma konusundaki tutumu ile bu protein, vücudun birçok bölümünün gelişimi ve işlevinde önemli rol oynamaktadır. Bu genin bir kopyasının kaybedilmesi normal gelişimi ve fonksiyonu bozar, ancak *KANSL1* gen kaybının KdVS spesifik belirti ve semptomlarıyla olan ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır (21).

KANSL1 geninin 850-882 aminoasitleri arasında kalan bölge KAT8 histon asetiltransferaz aktivasyonunu sağlayan bölgesi Şekil 3’ de gösterilmiştir. Bu bölgede görülen bir mutasyon *KANSL1* proteininin aktivitesini engellemektedir (25).

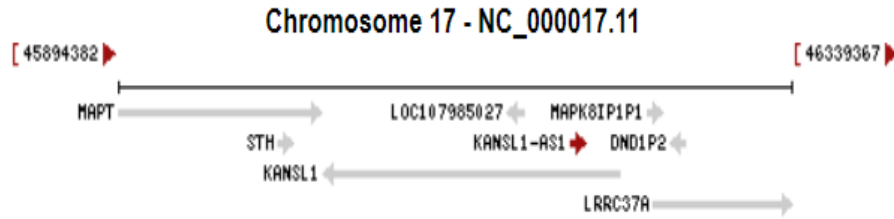
Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Region ¹	850 - 882	Required for activation of KAT8 histone acetyltransferase activity	Add BLAST		33
Region ¹	883 - 1105	Sufficient for interaction with KAT8	Add BLAST		223

Şekil 3. *KANSL 1* Geni aktif bölgesi (25)

KANSL1 geni ayrıca *CENP-36*, centromere protein 36, *DKFZP727C091*, *hMSL1v1*, *KANLI_HUMAN*, *KDVS*, *KIAA1267*, Male-specific lethal 1 homolog, *MLL1/MLL* complex subunit *KANSL1*, *MSL1* homolog 1, *MSL1v1*, non-specific lethal 1 homolog, *NSL* complex protein *NSL1*, *NSL1* şeklinde de isimlendirilmektedir (23).

KANSLI geni tespiti için farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan testler kantitatif PCR, MLPA, kromozomal mikrodizilim yöntemleridir. Bu yöntemlerle tanı şansı %95'tir (5). Ayrıca gen içi mutasyonların ve daha küçük intragenik delesyon/duplikasyon bölgelerinin tespiti için dizi analizi yapılabilir. Ancak bu çalışma ile gen bölgesinin tam delesyon/duplikasyon alanı tespit edilemez. Bu yöntemin çalışılması ile elde edilen başarı ise %5'tir (5). aCGH çalışmalarında görülen delesyon/duplikasyon farklılıkları ikinci bir yöntem olarak FISH veya MLPA yöntemi ile tekrar edilip doğruluğunun teyit edilmesi önerilmektedir (5).

KANSLI-AS1, *KANSLI* antisense RNA olarak adlandırılmaktadır ve 17. Kromozom üzerinde q21.31 bölgesinde bulunmaktadır. Long-noncoding RNA özelliğindedir. *KANSL-AS1* ayrıca LOC644246 şeklinde de isimlendirilir. *KANSLI* geninin moleküler düzeyde bulunma yeri ve komşu genler Şekil 4' deki gibidir (24).



Şekil 4. *KANSLI* Geninin moleküler düzeyde bulunma yeri ve komşu Genleri (24)

2.4. Histon Asetiltransferaz (H4K16)

KANSLI proteini, histon H4 lizin 16 (H4K16) asetilasyonu yoluyla gen ifadenmesini etkileyen, kromatin değiştirici K (lizin) asetiltransferaz 8 (KAT8)' in evrimsel olarak korunmuş bir regülatörüdür (26,27). KAT8, hücre proliferasyonu ve genom kararlılığının korunması da dahil olmak üzere önemli biyolojik işlemler için kritik öneme sahiptir (5). Spesifik olarak, histon H4 lizin 16' nın asetilasyonu, DNA replikasyonu, DNA onarımı, hücre döngüsü ve tümör oluşumu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol aldığı bildirilmektedir (28, 29, 30, 31).

2.5. aCGH Yöntemi

Moleküler karyotipleme olarak da adlandırılan dizin karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH), genomik kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) yüksek çözünürlükle genom taraması için geliştirilmiş bir tekniktir (32,33). Klinik olarak mevcut olan aCGH platformlarının çoğu, anöploidi, iyi tanımlanmış mikrodelyasyon / mikroduplicasyon sendromlarını ve subtelomerik veya diğer dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmeleri tespit etmek için tasarlanmıştır. Yöntem DNA kopya sayısı artışları ve azalışları için yüzlerce ayrı genomik lokusun kapsamlı olarak sorgulanmasını sağlar (34).

aCGH, segmental genomik CNV'lerle ilişkili mental retardasyon, otizm, çoklu konjenital anomaliler ve dismorfizm bulunan hastalarda tanı şansını artırmış ve hastalık geninin keşfi ve doğum öncesi tanısı için güçlü bir araç haline gelmiştir(9). Saptanan CNV' ler fenotipik etki olasılıkları açısından üç gruba ayrılmaktadır (9):

1. Benign (populasyonda normal kişilerde olan veya gen içermeyenler)
2. Patolojik (Bir sendroma neden olduğu bilinenler)
3. Önemi bilinmeyen varyasyon (VUS) (daha önce bildirilmemiş ve gen içerenler) (Genomik Varyantların Veritabanı, <http://projects.tcag.ca/variation>)

Klinik değerlendirme için varyasyonun kalıtsal ya da de novo olup olmadığını belirlemek önemlidir. Bunun için ebeveynlerin de eş zamanlı çalışılması önerilir (9). Ebeveynler asemptomatik olduğunda (çoğu vakada olduğu gibi), de novo bir varyasyon muhtemelen patojen olabilirken, kalıtsal bir varyasyon genellikle benign olarak değerlendirilir. Bununla birlikte de novo değişim tespit edildiğinde, bazen çocuğun fenotipine olan katkısını tahmin etmek güçtür ve prognoz belirsizliğini koruyabilir (9).

Genomik dengesizliklerin klinik etkisinin doğru değerlendirilebilmesi için, metafaz veya anafaz FISH analizleri, QF-PCR analizi, MLPA ve daha yüksek çözünürlüklü aCGH platformlarını içeren diğer sitogenetik ve moleküler yöntemlerle doğrulanması önerilir (Tablo 1) (35).

Tablo 1. Kopya sayısı değişikliklerini saptama yöntemleri ve özellikleri

Yöntem adı	Duyarlılık (bç)	Ölçek	Mutasyon
Sitogenetik	5-10x10 ⁶	Tüm genom	Anöploidi Poliploidi Dengeli ve dengesiz yapısal yeniden düzenlenmeler
FISH	1-10x10 ⁵	Hedef bölge	Delesyon Duplikasyon Amplifikasyon İnseriyon İnversiyon Translokasyon Anöploidi Poliploidi
CGH	6x10 ⁴ -10 ⁶	Tüm genom	Delesyon Duplikasyon Amplifikasyon
aCGH	8x10 ⁴ -10 ⁵	Tüm genom	Anöploidi Delesyon Duplikasyon Amplifikasyon
MLPA	150-200	Hedef bölge	Nokta mutasyon Küçük delesyon Küçük duplikasyon Amplifikasyon Metilasyon
Dizileme	1	Hedef bölge	Nokta mutasyon Küçük delesyon Küçük duplikasyon Küçük insersiyon

2.5.1. aCGH avantajları

Mikrodizilim tabanlı CGH, gen kopya değişikliklerinin analizi için kullanılan diğer mevcut yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır (36).

- Kromozom eldesine gereksinimi yoktur (37).
- BAC' ler (bakteriyel yapay kromozom) ve PAC'ler (P1'den türetilmiş yapay kromozom) gibi büyük ekleme genomik klonlarının kullanılması, tek kopya değişikliklerini saptamak ve sapma sınırlarını doğru bir şekilde tespit etmek için yeterli yoğun sinyalleri sağlar (37).

- Yüksek çözünürlükle bütün genomun tek bir deneyde analiz edilmesine olanak tanır. Diziyi ek klonlarla tamamlayarak çözünürlük yaklaşık 40 kb'e kadar yükseltilebilir (36). Standart çözünürlük 1- 5Mb arasında değişir (37, 38).
- Spesifikliğı ve hassaslığı yüksek bir tekniktir (37,38, 39).
- İşlemin bir kısmı yarı-otomatiktir, bu yöntemle hız avantajı sağlar (38).
- Array dizileri cDNA kullanılarak da yapılabilir (40).

2.5.2. aCGH dezavantajları

- Konvansiyonel CGH' de olduğu gibi, aCGH' in temel dezavantajı, kopya sayısının değişmesine neden olmayan anomalileri ve mozaizmi tespit edememesidir. Algılanabilecek mozaizm seviyesi, klonların duyarlılığına ve çözünürlüğüne bağlıdır (40).
- Genom üzerindeki tek kopya değişikliğinin tespiti zordur (41).
- Array CGH sonuçlarını, klon kalitesi ve cihaz sinyal kalitesi etkilemektedir (42).
- Popülasyondaki kopya sayısı polimorfizmleri aCGH analizlerinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (43).
- Ticari kitlerinin bulunmaması uygulamada sorun yaşatabilmektedir.

2.6. MLPA Yöntemi

MLPA (Çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyonu) farklı nükleik asit dizilerindeki (DNA ya da RNA) kopya sayısı değişikliklerini tek bir reaksiyonla saptamaya olanak sağlayan bir multipleks PCR metodudur. Tek nükleotid değişimleri bile ayırt edebilen güçlü bir tekniktir (44).

MLPA tekniğinin temeli, hedef sekansları çoğaltmak yerine, hedef sekanslarına bağlı olan MLPA problemleri ile amplifiye edilmesidir. Her MLPA probu, başarılı bir ligasyon için hedef DNA' ya bitişik hibridize olması gereken iki prob oligonükleotitten oluşur. Yalnızca bağlanmış problemler PCR ile üstsel olarak çoğaltılabilir (45).

MLPA testleri her bir amplifikasyon ürününün uzunluğu 120-500 nükleotid arasında birbirinden farklı olacak şekilde hazırlanırlar. Böylece amplifikasyon

sonrası ürünler, kapiller elektroforez ile ayrılır ve analiz edilirler (46). Amplifikasyon sonrası analize olanak tanıyan sinyal floresan işaretli PCR primerlerinden oluşmaktadır (44).

Sadece bir termal cyclus ve kapiller elektroforezine ihtiyaç duyulduğundan uygulaması kolay olup, dünya çapında birçok laboratuvarında tercih edilmektedir. Yöntem ayrıca, 24 saat içerisinde 96 örneğin aynı anda analizine olanak tanır (46). Geleneksel multipleks PCR, amplifiye edilecek her fragman için bir primer çifti gerektirirken, MLPA reaksiyonlarındaki tüm fragmanlar sadece bir PCR primer çifti kullanılarak amplifiye edilir. Tüm hedef sekanslar için tek bir primer çiftinin kullanılması, sıradan bir multipleks PCR' de çoklu primer çiftlerinin neden olduğu eşitsiz amplifikasyon verimliliği problemlerini ortadan kaldırır (47).

MLPA tekniği şuna dayanır. Belirlenmesi ve boyut tayini yapılmak istenen 50 farklı nükleik asit dizisinin amplifikasyonu için örneğe 50 farklı MLPA probu eklenir. Bu problemlerin her biri hedef dizinin komplementerdir. Her bir prob aslında PCR primer çiftlerinden birini tanıyacak dizileri taşıyan iki oligonükleotidden oluşur ve bu oligonükleotidler hedef dizi üzerinde birbirine bitişik bölgelere hibridize olurlar (46).

Hibridizasyondan sonra bu problemler, spesifik bir ligaz enzimi ile birbirine bağlanırlar. Bu ligaz reaksiyonu spesifiktir. Tek bir nükleotid değişikliği bile ayırt edilebilir. Ligasyon ürünü her iki PCR primerinin dizisini de taşıyacağından PCR boyunca eksponansiyel olarak amplifiye olacaktır (47).

Bunun aksine, ligasyonu gerçekleşmemiş problemlerin her biri tek bir primer dizisi içerdiğinden eksponansiyel olarak amplifiye edilemeyecek ve bir sinyal üretemeyeceklerdir. Bu yüzden MLPA, bağlanmamış problemlerin ortamdaki uzaklaştırılmasını gerektirmez (47).

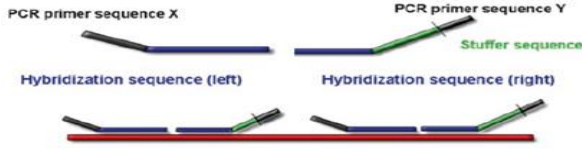
MLPA testlerinde bütün dizilerin amplifikasyon hızı birbirine eşit olmaz. Her zaman bazı dizilerin amplifikasyon hızları diğerlerine oranla yavaş olmaktadır. Buna bağlı olarak düşük bir pik alanı verebilmektedir. Bu yüzden tek bir MLPA amplifikasyon profili kopya sayısı değişikliği olup olmadığının saptanmasında yeterli değildir. Her zaman değerlendirme yapılırken çalışılan pik referans pik ile karşılaştırılır. Amplifikasyon ürünlerinin karşılaştırma sonucu elde edilen pik alanları, bu şekilde analiz edilebildiğinde hedef dizinin kopya sayısı değişikliği hakkında

yorum yapabilme fırsatı sağlar (46).

MLPA kullanım alanları, delesyon, duplikasyon analizi, metilasyon analizi, mRNA'ların relatif kantitasyonu ve bilinen mutasyonların tespitidir. Bir veya daha fazla ekzonun heterozigot delesyonları ve duplikasyonları, normal gen kopyası hâlâ mevcut olduğundan, sekanslama veya diğer tekniklerle tespit edilemez. Bu nedenle MLPA yöntemi birçok genetik hastalığın tanısında önemli bir rol oynamaktadır (46).

DNA denatürasyon, DNA ligasyon, polimer zincir reaksiyonu ve sonuçların değerlendirilmesinden oluşmaktadır. Bu basamaklar Şekil 5 üzerinde gösterilmiştir (46).

A. Denatürasyon ve Hibridizasyon



B. Ligasyon



C. Polimeraz Zincir Reaksiyonu



D. Fragment Analizi



Şekil 5. MLPA basamakları (A. Denatürasyon ve Hibridizasyon, B. Ligasyon, C. Polimer zincir reaksiyonu, D. Fragment analizi)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma (Proje No: KA 17/01) Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir. Geriye dönük yapılan çalışmada başka bir çalışma için onayı olan hasta bireyler incelenerek 40 hastadan bu onayı veren 30 hasta çalışmaya alınmıştır.

3.2. Hasta Grubu

Ocak 2013- Aralık 2015 yılları arasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesindeki Tıbbi Genetik Anabilim Dalına idiopatik mental retardasyon, dismorfik yüz görünümü, epilepsi, gelişimsel gerilik endikasyonları ile başvuran ve karyotip analizinde bulgu saptanmayan aCGH analizi yapılan hastalar geriye dönük olarak *KANSL1* delesyonu varlığı açısından değerlendirilmiştir.

Çalışma grubuna alınan hastaların aCGH analizleri Roche Nimblegen 6x720 K, 12x135K ve 3x1.4M Mikrodizilim platformu ile yapılmıştır. En az 5 proba hibridize olan, 50kb ve üzeri kopya sayısı değişiklikleri incelemeye alınmıştır.

Hasta grupları 17q21.31 delesyonu gen içeriğine göre üç gruba ayrılmıştır.

1. Sadece *KANSL1* genini içeren bölgede delesyon olan hastalar
2. *KANSL1* ve *KANSL1-AS1* genlerini içeren bölgede delesyon olan hastalar
3. *KANSL1* ve *KANSL1-AS1* dışında başka genleri de içeren bölgede delesyon olan hastalar

Yapılan array çalışması sonuçlarına göre 1. gruba 3 hasta, 2. gruba 16 hasta ve 3. gruba 11 hasta dahil edilmiştir.

Çalışılan gruplarda bulunan hastalara ait (1, 2, 3) cinsiyet, yaş, endikasyon bilgileri ve aCGH sonuçları Tablo 2, 3 ve 4 ile verilmiştir.

Tablo 2. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu (Birinci Grup)

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	ENDİKASYON	a-CGH sonucu
1	E	3	Dismorfik Yüz	arr[hg19] 17q21.31(44,209,537-44,270,054) X1
2	K	11	Epilepsi	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
3	K	10	Mental Retardasyon, Dismorfik Yüz	arr[hg19] 17q21.31(44,209,537-44,264,622) X1

Tablo 3. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu (İkinci Grup)

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	ENDİKASYON	a-CGH sonucu
4	E	15	MR, Minör Malformasyonlar	arr[hg18] 17q21.31(41,541,432-41,631,306) X1
5	K	8	MMR, Dismorfik Yüz	arr[hg18] 17q21.31(41,541,432-41,631,306) X1
6	E	4	Dismorfik Yüz	arr[hg18] 17q21.31(41,541,432-41,631,306) X1
7	K	6	Dismorfik Yüz, Epilepsi	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
8	K	6	Orta-Ağır Gelişimsel Gerilik	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
9	K	9	Dismorfik Yüz, Gelişimsel Gerilik	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
10	K	16	Epilepsi, MMR, Mikrosefali	arr[hg18] 17q21.31(41,541,432-41,631,306) X1
11	E	5	Ağır Gelişimsel Gerilik, Polidaktili	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
12	K	7	Epilepsi	arr[hg18] 17q21.31(41,571,777-41,631,306) X1
13	K	8	Hafif Zekâ Geriliği, Dismorfik Yüz	arr[hg18] 17q21.31(41,541,432-41,631,306) X1
14	E	3	Gelişme Geriliği, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,216,580-44,348,898) X1
15	E	18	Dismorfik Yüz, Epilepsi, MMR	arr[hg19] 17q21.31(44,205,685-44,301,891) X1
16	K	9	MMR, Multiple Minör Malformasyon	arr[hg19] 17q21.31(44,240,510-44,361,066) X1
17	E	18	Dismorfik Yüz, Hipotoni	arr[hg19] 17q21.31(44,184,364-44,301,891) X1 17q21.31(44,324,742-44,781,666) X1

18	E	12	MR, Dismorfik Yüz, Hipotoni	arr[hg19] 17q21.31(44,198,755-44,301,891) X1
19	E	9	Epilepsi, Aort Koarktasyonu	arr[hg19] 17q21.31(44,184,364-44,348,898) X1 17q21.31(44,432,928-44,781,666) X3

Tablo 4. Hastaların cinsiyet, yaş, endikasyon ve aCGH sonuç tablosu (Üçüncü Grup)

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	ENDİKASYON	a-CGH sonucu
20	K	5	CP, Epilepsi, Mikrosefali, Dismorfik Yüz	arr[hg19] 17q21.31(44,216,580-44,408,700) X1 17q21.31(44,408,700-44,565,031) X0 17q21.31(44,612,859-44,781,666) X0
21	E	3	Dismorfik Yüz, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,240,510-44,781,666) X1
22	K	8	Hafif Gelişimsel Gerilik, Multiple Minör Malformasyon	arr[hg19] 17q21.31(44,216,580-44,781,666) X1
23	E	7	Atipik Otizm, Kortikal Displazi	arr[hg19] 17q21.31(44,201,418-44,781,666) X1
24	E	10	Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31 (44,205,685-44,697,027) X1
25	K	7	Dismorfik Yüz, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,165,941-44,372,408) X3 17q21.31(44,420,441-44,565,031) X1 17q21.31(44,637,217-44,781,666) X1
26	E	8	Dismorfik Yüz, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,301,891-44,781,666) X1
27	E	13	Dismorfik Yüz, Epilepsi, Davranış Bozukluğu	arr[hg19] 17q21.31(44,301,891-44,697,027) X1
28	K	4	SSS anomalisi, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,301,891-44,781,666) X1
29	E	4	DismorfikYüz, Gelişimsel Gerilik	arr[hg19] 17q21.31(44,302,715-44,756,486) X1
30	K	12	MR, Epilepsi	arr[hg19] 17q21.31(44,301,891-44,408,700) X1 17q21.31(44,408,700-44,781,666) X0

3.3 Yöntem

3.3.1. DNA örnekleri

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 'nda planlanmış ve yürütülmüştür. Hasta grubunun seçimi Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana Hastanesi Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı ile ortak olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada genetik çalışmalar için rıza-onay formu imzalanarak periferik kan materyalleri gönderilmiş 30 hastanın arşiv DNA'ları kullanılmıştır.

3.3.2. DNA'nın konsantrasyon ve saflığının ölçümü

Eppendorf marka 10 µl'lik pipet ile hastaların daha önceden izole edilip -20 °C'de saklanan DNA örneklerinden 2µl alınarak hasta DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA) spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. DNA konsantrasyonları 50-100 ng olan örnekler kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyona sahip DNA' lar 50 ng olacak şekilde sulandırılmıştır.

3.3.3. Kullanılan gereçler

- Kapiller Elektrophorez Cihazı (ABI 3500 Series Genetic Analyzer)
- Mikro Pipet takımı (Eppendorf)
- Thermal cycler (Applied biosystems GeneAmp Pcr System 9700 marka)
- Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA)
- Buz makinesi (Elektrolux)
- Mini santrifüj (Biosan combispin FVL-2400N)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)
- PCR tüpleri (0,2 ml)
- ABI 3500 96 well plate (ABI)

3.3.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Probemix P245-B1 Mikrodelesyon Sendromları-1 (MRC-Holland, HOLLANDA)
- SALSA MLPA Buffer (MRC-Holland, HOLLANDA)
- Ligase Buffer A (MRC-Holland, HOLLANDA)
- Ligase Buffer B (MRC-Holland, HOLLANDA)
- Ligase-65-Buffer enzim (MRC-Holland, HOLLANDA)
- SALSA PCR-Primer Mix FAM (MRC-Holland, HOLLANDA)
- SALSA Polimeraz (MRC-Holland, HOLLANDA)
- Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)
- Hi-Di Formamide (ABI)
- LİZ 500 (ABI)
- 1 X TBE Buffer

3.3.5 MLPA reaksiyonu

MLPA reaksiyonu için MRC-Holland marka A1-1213 lot numaralı Salsa MLPA probemix P443-A1 *KANSL1* kit kullanılmıştır. MLPA kitinde çalışılacak gen bölgelerinin bilgileri Şekil 6'deki gibidir.

Salsa MLPA P443-A1 *KANSL1* kiti 128 ile 373 nükleotid arasında amplifikasyon ürünleri içeren 33 MLPA probu içerir. Bunlardan ikisi *MAPT* geni (Ekn 13 ve 3), diğer ikisi *CRHCR1* geni (Ekn 11 ve 1) içindir. Prob içerisinde 120 nükleotidden az 9 prob bulunur.

Bu problar kontrol fragmentleri olarak adlandırılır. DNA miktarının belirlenmesi için 64, 70, 76 ve 82 nükleotidden oluşan Q-fragmentleri bulunur. Denatürasyon kontrolü için 88, 92, 96 nükleotidden oluşan fragmenleri bulunur. Bunlar dışında cinsiyet kontrolü için kullanılan 100 nükleotidden oluşan X-fragmenti ve 105 nükleotidden oluşan Y-fragmenti bulunur.

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob	Referans	Chromosomal position
64-70-76-82	Q-fragmanları: DNA miktarı; sadece 100 ng'dan az DNA		KANSL1 17q21.31
88-92-96	D-fragmanları: 88 veya 96 nt'lik fragmanın düşük sinyali, eksik denatürasyon		
100	X-fragmanları: X kromozomu spesifik		
105	Y-fragmanları: Y kromozomu spesifik		
128	Referans prob 00797-L00093	5q31	
133 «	KANSL1 prob S0991-L26452		Ekson 1
139	KANSL1 prob S0992-L26451		Ekson 4
144	KANSL1 prob S0993-L26450		Ekson 3
148	Referans prob 17032-L20095	10p11	
154	KANSL1 prob 19200-L25250		Ekson 6
160 ↯	CRHR1 prob 08369-L14410		Sentromerik
166	KANSL1 prob 19201-L25921		Ekson 2
173	KANSL1 prob 19202-L25252		Ekson 5
181 Ж	KANSL1 prob 19203-SP0769-L25733		Ekson 14
188 Ж	KANSL1 prob 19204-SP0770-L25254		Ekson 8
202 ↯	MAPT prob 08353-L08206		Sentromerik
211	KANSL1 prob 19206-L25256		Ekson 15
219	KANSL1 prob 19207-L25257		Ekson 7
226	Referans prob 08957-L09052	4q32	
232 ↯	CRHR1 prob 08367-L25922		Sentromerik
238	KANSL1 prob 19208-L25258		Ekson 2
245	Referans prob 14028-L15626	7q36	
252	KANSL1 prob 19209-L25766		Ekson 11
274 Ж	KANSL1 prob 19211-SP0772-L25261		Ekson 15
283	Referans prob 10285-L10797	2q14	
291	KANSL1 prob 19212-L25262		Ekson 9
301 Ж	KANSL1 prob 19213-SP0773-L25263		Ekson 3
310	Referans prob 11316-L12042	12p13	
319 « +	KANSL1 prob 19214-L25264		Başlangıç bölgesi
--	Referans prob 10711-L24066	6p12	
331 Ж	KANSL1 prob 19215-SP0774-L25734		Ekson 10
337	Referans prob 05219-L23367	13q14	
345	KANSL1 prob 19216-L25266		Ekson 4
351 ↯	MAPT prob 07857-L25765		Sentromerik
359 Ж	KANSL1 prob 19217-SP0775-L26250		Exon 13
364	Referans prob 16232-L24272	1p32	
373	Referans prob 03919-L03374	15q21	

Ж Bu prob üç kısımdan oluşur ve bağlantı yeri vardır.

↯ Ekson sonu probu. Bir delesyon/duplikasyon kapsamının belirlenmesini kolaylaştırmak için dahil edilmiştir. Kopya sayısı değişiklikleri test edilen koşullara bağlıdır.

« Bu prob CpG adası veya yakını içerir. Bu probun düşük bir sinyali, eksik DNA denatürasyonunu ifade eder.

+ Bu prob, KANSL1' in ekson 1' in 0.5 kb yukarısındaki transkript variant 2' nin (NM_015443.3) ilk ekzonunda bulunur.

Şekil 6. A1-1213 lot numaralı salsa MLPA probemix P443-A1 KANSL1 kit içeriği (46)

3.3.5.1. Çalışmaya başlamadan önce yapılması gerekenler

- Isıtmalı kapaklı (99-105⁰C) kalibre edilmiş termal döngülü PCR cihazı kullanılmalıdır.
- Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan tampon, enzim, probemix gibi karışımlar kısa süreli vortex, spin yapılmalıdır. Bu maddelerin iyi bir şekilde karışması ve kapakta örnek kalmaması için bu işlem önemlidir.
- DNA örneklerinin konsantrasyonları genellikle 50-100 ng olacak şekilde hazırlanmalıdır. Yüksek konsantrasyonlar TE buffer ile seyreltilmelidir.
- Kullanılacak olan 0.2'lik PCR tüpleri üzerine hasta isimleri ve numaraları eksiksiz olarak yazılmalıdır.
- Negatif kontrol için TE buffer kullanılmalıdır.

3.3.5.2. DNA denatürasyon

- 0.2'lik PCR tüpleri üzerine gerekli hasta isimleri yazılır.
- Konsantrasyonu 50 ng olacak şekilde ayarlanan örneklerden her hasta örneği için Eppendorf marka 10 µl'lik pipet ile 5 µl alınarak PCR tüpleri içine konulur.
- Tüpler ağzı kapatılarak termal döngülü Applied biosystems GeneAmp Pcr System 9700 marka PCR cihazına yerleştirildi. Örnek DNA'lar 5 dakika 98 ° C'de denatüre edildi. Tüpler PCR cihazından çıkarmadan önce örnekler 25 ° C'ye soğutuldu ve bu sıcaklıkta durduruldu.

3.3.5.3. Hibridizasyon reaksiyonu

- Kullanmadan önce MLPA tamponu ve MLPA probemix vorteks, spin yapılması önemlidir.
- Her reaksiyon için, hibridizasyon master karışımı Eppendorf marka 100µl'lik pipet ile 10 örnek çalışılacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım 1.5 µl MLPA tampon + 1.5 µl probemix' den oluşmaktadır. Hibridizasyon master karışımını vorteksenerek iyice karıştırıldı ve spin yapılarak kapakta karışımın kalmaması sağlandı.
- DNA denatürasyonundan sonra, her numune tüpüne Eppendorf Marka 10µl'lik pipet yardımıyla 3 µl hibridizasyon master karışımı eklendi. Pipetleme ile yukarı ve aşağı karıştırarak iyice karışması sağlandı.
- PCR cihazında reaksiyon 95 ° C'de 1 dakika inkübe edildi, sonra 60 ° C'de 16-20 saat inkübe olması için bırakıldı.

3.3.5.4. Ligasyon reaksiyonu

- Kullanmadan önce iki Ligaz Tamponu iyice vortekslenir.
- Her reaksiyon için Ligase-65 karışımını Eppendorf marka 1000 µl'lik ve 100 µl'lik pipetler kullanılarak hazırlandı. Ligasyon tamponu 25 µl dH₂O + 3 µl Ligaz Tamponu A + 3 µl Ligaz Tamponu B ve 1 µl Ligase 65 enziminden oluşmaktadır. Reaksiyonda enzim bulunduğu için sadece hafifçe pipet ile aşağı yukarı yapılarak karıştırılması sağlandı.
- PCR cihazı 54 ° C'ye getirildi ve bu sıcaklıkta duraklatıldı.
- Örnekler 54 ° C olduğunda, 32 µl ligaz master karışımı her tüpe eppendorf marka 100 µl'lik pipet ile eklendi. Yavaşça yukarıya ve aşağı pipetle karıştırıldı.
- 54 ° C'de 15 dakika ligasyon için inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Ligaz-65 enziminin ısı inaktivasyonu için 98 ° C'de 5 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra sıcaklık 20 ° C 'ye getirildi ve bu sıcaklıkta bekletildi.

3.3.5.5. PCR reaksiyonu

- SALSA PCR primer karışımı hazırlandı. Viskoziteyi azaltmak için Polimeraz karışımını 10 saniye elde ısıtıldı.
- Her reaksiyon için polimeraz karışımını Eppendorf marka 100 µl'lik pipet yardımı ile hazırlandı. 7.5 µl dH₂O + 2 µl SALSA PCR primer karışımı + 0.5 µl SALSA Polimeraz eklendi. Pipetleme ile yukarı ve aşağı karıştırarak iyice karıştırıldı.
- 20° C'de, her tüpe 10 ul polimeraz karışımı Eppendorf marka 10µl'lik pipet ile eklendi. Pipetleme ile hafifçe aşağı yukarı karıştırıldı. PCR koşulları şu şekildedir.
- 95° C'de 30 saniye; 60° C'de 30 saniye; 72° C 'de 60 saniye şeklinde 35 tekrar yaparak çalıştırıldı. 72° C'de 20 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 15° C'de duraklatıldı.

PCR ürünleri 4° C'de buzdolabında saklamaya bırakıldı. PCR ürünleri floresan boya içerdiği için ışığa duyarlıdır. Bu nedenle ürünler ışık geçirmeyen kaplar içinde muhafaza edildi.

3.3.5.6. ABI 3500 cihazına yükleme

- Amplifikasyonu gerçekleşen örnekleri fragment analizi için kapiller jel elektroforez cihazına aşağıda verilen yol izlenerek yüklemesi yapılmıştır.
- İnternal size standart (Liz 500) ve formamidden oluşan karışım hazırlandı. 9 µl formamid ve 0,2 µl internal size standart (Liz 500) ependorf tüpüne konuldu, pipetaj

yapıp 9,2 µl şeklinde ABI 3500 cihazı) 96 well plate içerisine dağıtıldı.

- MLPA tekniğinin son basamağından elde edilen her hastaya ait PCR ürünlerden 0,7 µl alınarak ABI 3500 cihazı 96 well plate içerisine her hasta için bir kuyucuk içerisine konuldu.
- Formamid ve LİZ 500 karışımı ile iyice homojenize olabilmesi için pipetaj yapıldı.
- Daha sonra örnekler 72°C’ de 2 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı. Daha sonra 4°C’ de 5 dakika beklendi.
- ABI 3500 cihazına yerleştirildikten sonra Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
- Sonuçları değerlendirmek için Coffalyser MLPA analiz programı kullanıldı.

3.3.5.7. Analiz

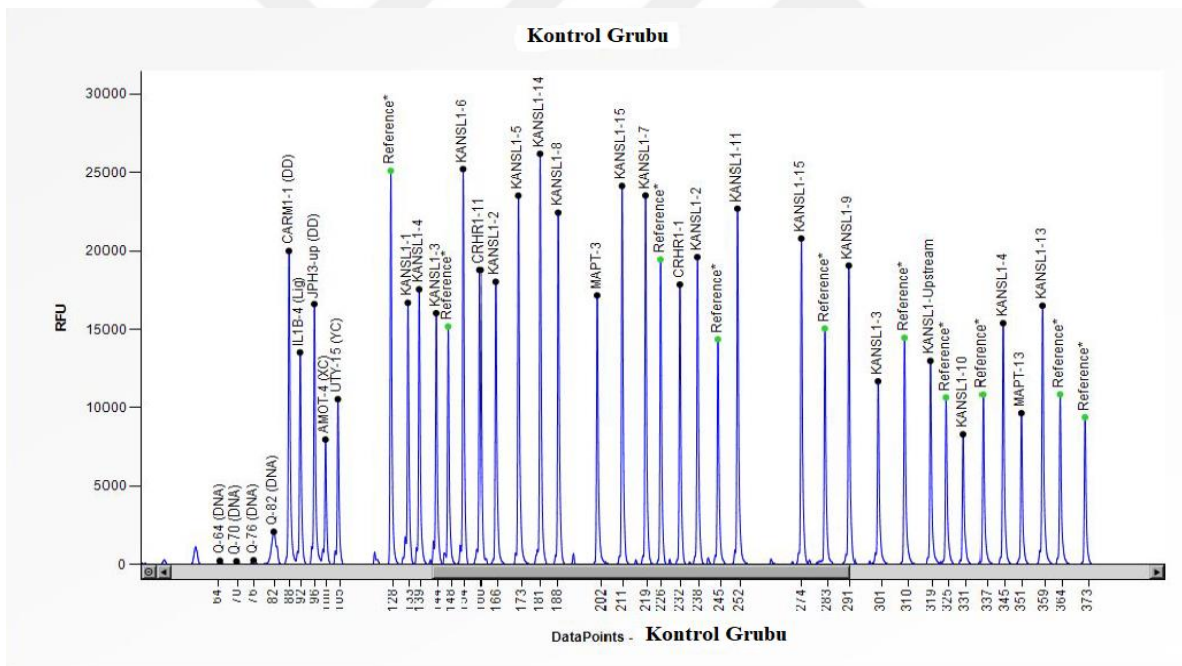
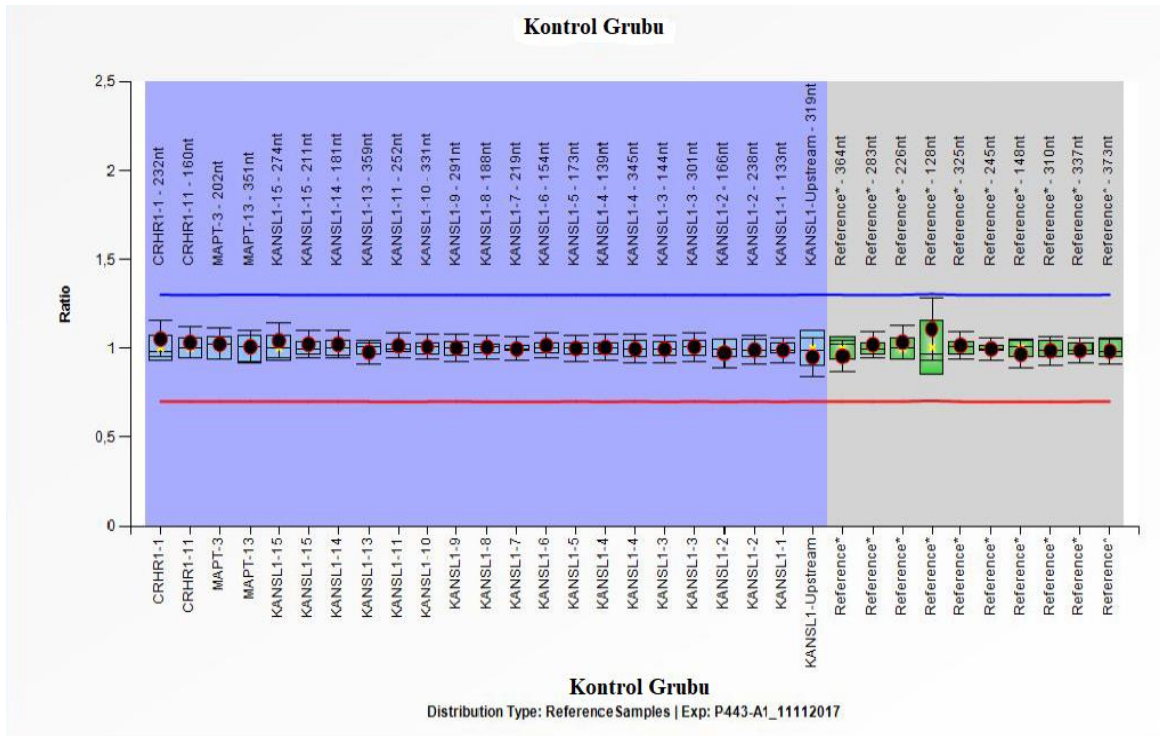
Çalışma sonucunda analiz Coffalyser veri tabanında kontrol grubuna göre hasta grubunun verdiği pik değerlerine göre analiz edilmiştir. Analiz yapılırken değerler Tablo 5’ de verilen oranlar dikkate alınarak yapılmıştır (46).

Tablo 5. MLPA sonuçlarını değerlendirirken kullanılan referans aralıklar (46)

Ratio Değerleri	Kopya sayısı
DQ= 0	0 kopya (homozigot delesyon)
0.40< DQ< 0.65	2 ⇔ 1kopya (heterozigot delesyon)
0.80<DQ<1.20	Normal (referans)
1.30< DQ<1.65	2 ⇔ 3 kopya (heterozigot duplikasyon)
1.75<DQ<2.15	2 ⇔ 4 kopya (iki kopya)
Diğer Değerler	Değerlendirilemeyen sonuç

3.3.5.7.1. Çalışmada kullanılan referanslar

MLPA çalışması için hasta grubu kontrol grubu örneklere göre karşılaştırılmaktadır. Bu nedenle MLPA çalışması için üç kontrol hasta örneği kullanılmıştır. Bu hastalar daha önceden bölümümüze başvuran, dismorfik bulgusu, zihinsel engellilik gibi endikasyonları bulunmayan array çalışması sonrasında 17q21.31 delesyonu bulunmayan hastalar çalışma için kontrol grubu olarak alınmıştır. Kontrol olarak kullanılan örneklerden birisi Şekil 7’ deki gibidir.



Şekil 7. Referanslardan birine ait kontrol MLPA sonuç grafiği

4. BULGULAR

Çalışılan hastaların; 16' sı erkek, 14' ü kadındı. Yaş aralığı 3 ile 18 arasında değişiyordu. Hastalardan biri, DNA kalitesinin düşük olması nedeniyle sonucu değerlendirilemediği için çalışmadan çıkarıldı (Hasta 10).

İncelenen 29 hastadan 3' ünde (%10,3) *KANSLI* geninin delesyonu bulunurken (Hasta 4, 13, 16), *MAPT* ve *CRHR1* genlerinin incelenen bölgelerinde MLPA ile bulgu saptanmamıştır. Bir hastada *KANSLI* geninin duplikasyonu (%3,4) saptanmıştır (Hasta 18). aCGH sonucuna göre delesyon saptanan 25 hastada *KANSLI* geninde, *MAPT* ve *CRHR1* genlerinin incelenen bölgelerinde MLPA ile bulgu saptanmamıştır (%86.2). *MAPT* ve *CRHR1* genlerinde delesyon veya duplikasyon hastaların hiçbirinde saptanmamıştır.

Delesyon saptanan hastaların hepsi ikinci grupta yer alırken, duplikasyon saptanan hasta da ikinci grupta bulunmaktaydı. aCGH ile saptanan delesyon büyüklüğü 55,09- 580,249 arasında değişmekteydi. aCGH ile saptanan delesyonun büyüklüğü ile MLPA da delesyon saptama arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. İstatistik değerlendirme One Way ANOVA ile yapılmıştır.

Bulgu saptanan hastaların etkilenen ekzon bölgeleri tabloda verilmiştir (Tablo 6). MLPA sonuçları hastaların kendi grupları içerisinde aCGH sonuçları ile beraber verilmiştir (Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9). MLPA çalışması sonrasında Hastaların fenotiplerine ait karşılaştırma Tablo 10 ile verilmiştir.

Tablo 6. MLPA çalışması ile bulgu saptanan hastaların delesyon (kırmızı alanlar) ve duplikasyon (mavi alanlar) bulunan ekzon bölgeleri

Hasta No	upst ream	Ekson 1	Ekson 2a	Ekson 2b	Ekson 3	Ekson 4	Ekson 8	Ekson 10	Ekson 14	Ekson 15a	Ekson 15b
4							-	-	-		-
13	-			-	-			-	-	-	
16				-	-	-		-			
18	+	+	+	+							
Baz çifti	319	133	238	166	301	345	188	331	188	211	274

4.1. MLPA Çalışmasının Sonuçları

4.1.1. Birinci grup

Bu grupta 17q21.31 bölgesinde tek başına *KANSLI* genini içeren büyüklüğü 55,09 ile 60,518 kb arasında değişen delesyon içeren 3 hasta incelenmiştir. Bu grupta MLPA yöntemi ile incelen bölgelere ait anormallik saptanmamıştır.

Tablo 7. Hastaların *KANSL1* geni ile ilişkili aCGH ve MLPA sonuçları

Hasta No	a-CGH Başlangıç-Bitiş	Uzunluk (kb)	Prob Sayısı	İlgili Bölgedeki Genler	MLPA
1	44,209,537_44,270,054	60,518	13	<i>KANSLI</i>	<i>NORMAL</i>
2	41,571,777_41,631,306	59,53	11	<i>KANSLI</i>	<i>NORMAL</i>
3	44,209,537-44,264,622	55,09	10	<i>KANSLI</i>	<i>NORMAL</i>

4.1.2. İkinci grup

Bu grupta 17q21.31 bölgesinde *KANSLI* ve *KANSLI-AS1* genini içeren büyüklüğü 59,53 ile 164,535 kb arasında değişen delesyon içeren 16 hasta incelenmiştir. Hastalardan biri, DNA kalitesinin düşük olması nedeniyle sonucu değerlendirilemediği için çalışmadan çıkarılmıştır (Hasta 10). Üç hastada (Hasta No: 4, 13 ve 16) MLPA yöntemi ile *KANSLI* geninde yamalı tarzda bir delesyon tespit edilmiştir.

Hasta 4 ve Hasta 13 'ün aCGH ile delesyon büyüklüğü 89,87 kb' dır. Bu iki hastadan birinde 4 ekzon (Hasta 4, Ekn: 8, 10, 14, 15b), diğesinde 6 ekzon (Hasta 13, Ekn: upstrem, 2b, 3, 10, 14, 15a) delesyonu bulunduğu saptanmıştır.

Hasta 16 aCGH ile 120,557 kb büyüklüğünde delesyona sahiptir. Bu hastada 4 ekzon (Ekn: 2b, 3, 4, 10) delesyonu bulunduğu saptanmıştır. Bu gruba ait hastalarda delesyon bulma olasılığı %18,75'tir.

Hasta 18 aCGH ile 103,14 kb büyüklüğünde delesyona sahipken, bu hastada 4 ekzonu kapsayan (Ekn: upstrem, 1, 2a, 2b) duplikasyon saptanmıştır (%6,25).

Tablo 8. Hastaların KANSL1 geni ile ilişkili aCGH ve MLPA Sonuçları

Hasta No	a-CGH Başlangıç-Bitiş	Uzunluk (kb)	Prob Sayısı	İlgili Bölgedeki Genler	MLPA
4	41,541,432-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>DELESYON</i>
5	41,541,432-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
6	41,541,432-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
7	41,571,777-41,631,306	59,53	11	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
8	41,571,777-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
9	41,571,777-41,631,306	59,53	11	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
10	41,541,432-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
11	41,571,777-41,631,306	59,53	11	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
12	41,571,777-41,631,306	59,53	11	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
13	41,571,777-41,631,306	89,87	15	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>DELESYON</i>
14	44,216,580-44,348,898	132,319	30	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
15	44,205,685-44,301,891	96,207	23	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
16	44,240,510-44,361,066	120,557	29	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>DELESYON</i>
17	44,184,364-44,301,891	117,528	29	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>
18	44,198,755-44,301,891	103,14	25	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>DUPLİKASYON</i>
19	44,184,364-44,348,898	164,535	38	<i>KANSL1, KANSL1-ASI</i>	<i>NORMAL</i>

4.1.3. Üçüncü grup

Bu grupta 17q21.31 bölgesinde KANSL1 geni dışında başka genleri içeren büyüklüğü 395,137 ile 580,249 kb arasında değişen 11 hasta incelenmiştir. Bu grupta MLPA yöntemi ile incelen bölgelere ait anormallik saptanmamıştır.

Tablo 9. Hastaların KANSL1 geni ile ilişkili aCGH ve MLPA Sonuçları

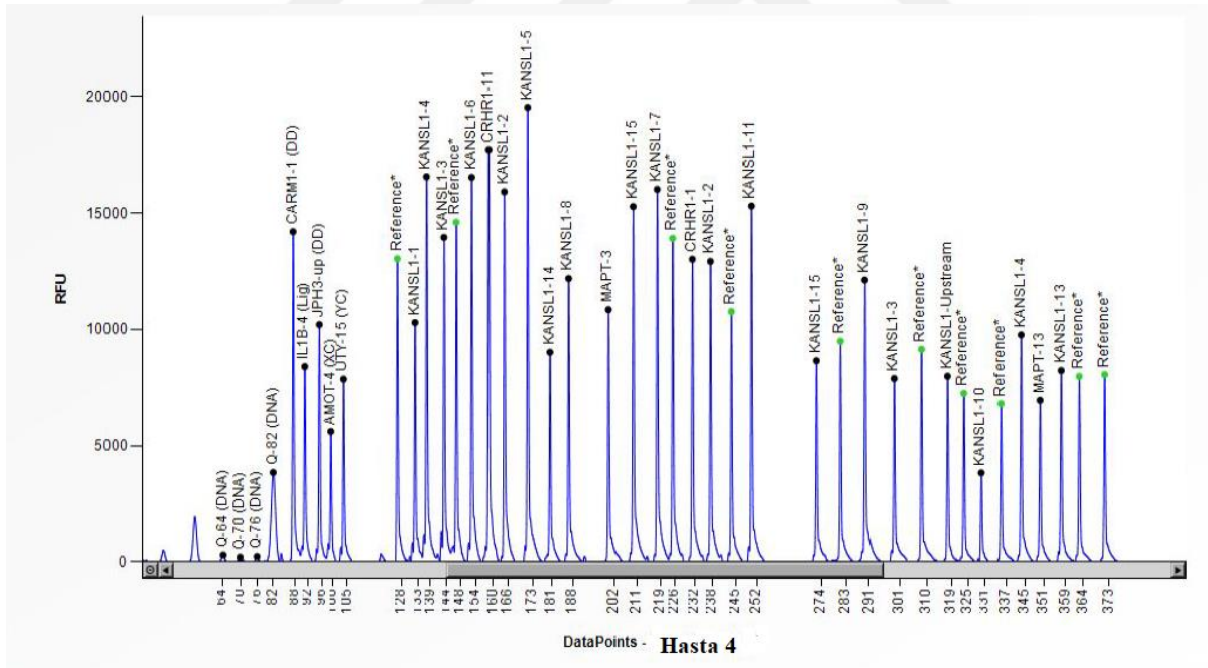
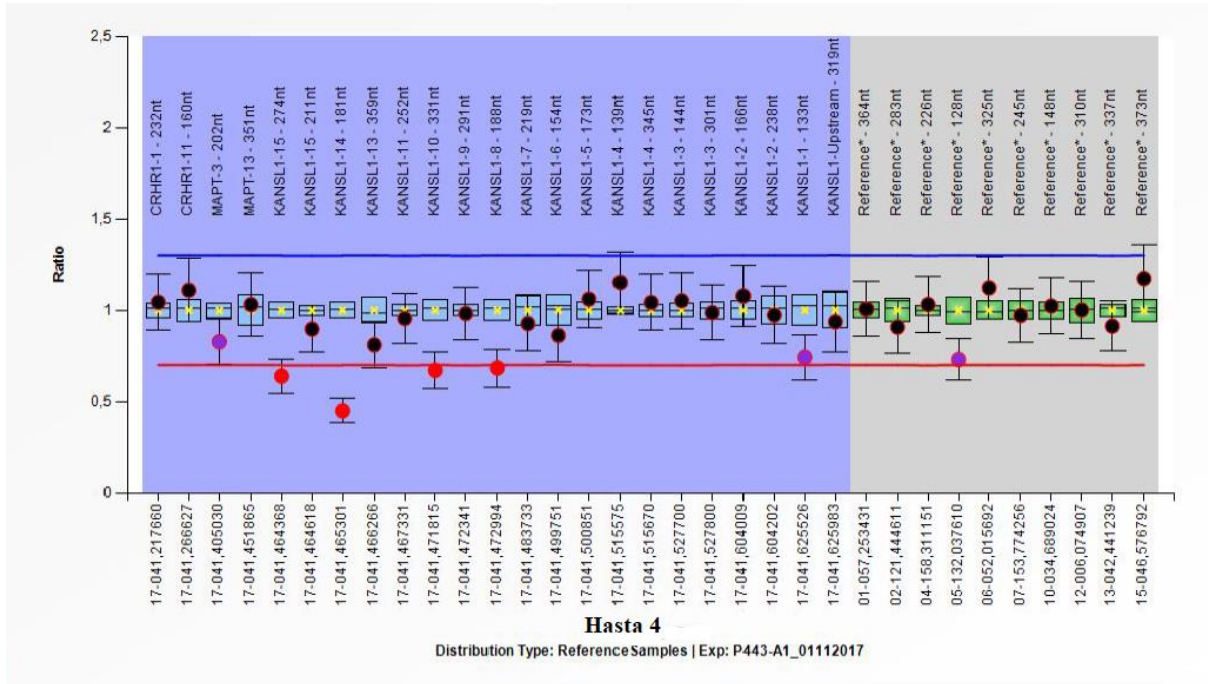
Hasta No	a-CGH Başlangıç-Bitiş	Uzunluk (kb)	Prob Sayısı	İlgili Bölgedeki Genler	MLPA
20	44,216,580-44,781,666	517,26	62	KANSL1, KANSL1-ASI, LOC644172, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
21	44,240,510-44,781,666	541,157	64	KANSL1, KANSL1-ASI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
22	44,216,580-44,781,666	565,09	66	KANSL1, KANSL1-ASI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
23	44,201,418-44,781,666	580,249	69	KANSL1, KANSL1-ASI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
24	44,205,685-44,697,027	491,343	61	KANSL1, KANSL1-ASI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
25	44,216,580-44,781,666	484.601	52	KANSL, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
26	44,301,891-44,781,666	479.776	45	KANSL1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL
27	44,301,891-44,697,027	395,137	38	KANSL1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF	NORMAL

28	44,301,891-44,781,666	479,776	45	<i>KANSLI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF</i>	<i>NORMAL</i>
29	44,302,715-44,756,486	453,772	42	<i>KANSLI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF</i>	<i>NORMAL</i>
30	44,301,891-44,781,666	479,777	45	<i>KANSLI, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, ARL17A, NSFP1, NSF</i>	<i>NORMAL</i>

4.2. MLPA sonucuna göre delesyon ve duplikasyon bulunan hastalar

4.2.1. Hasta 4

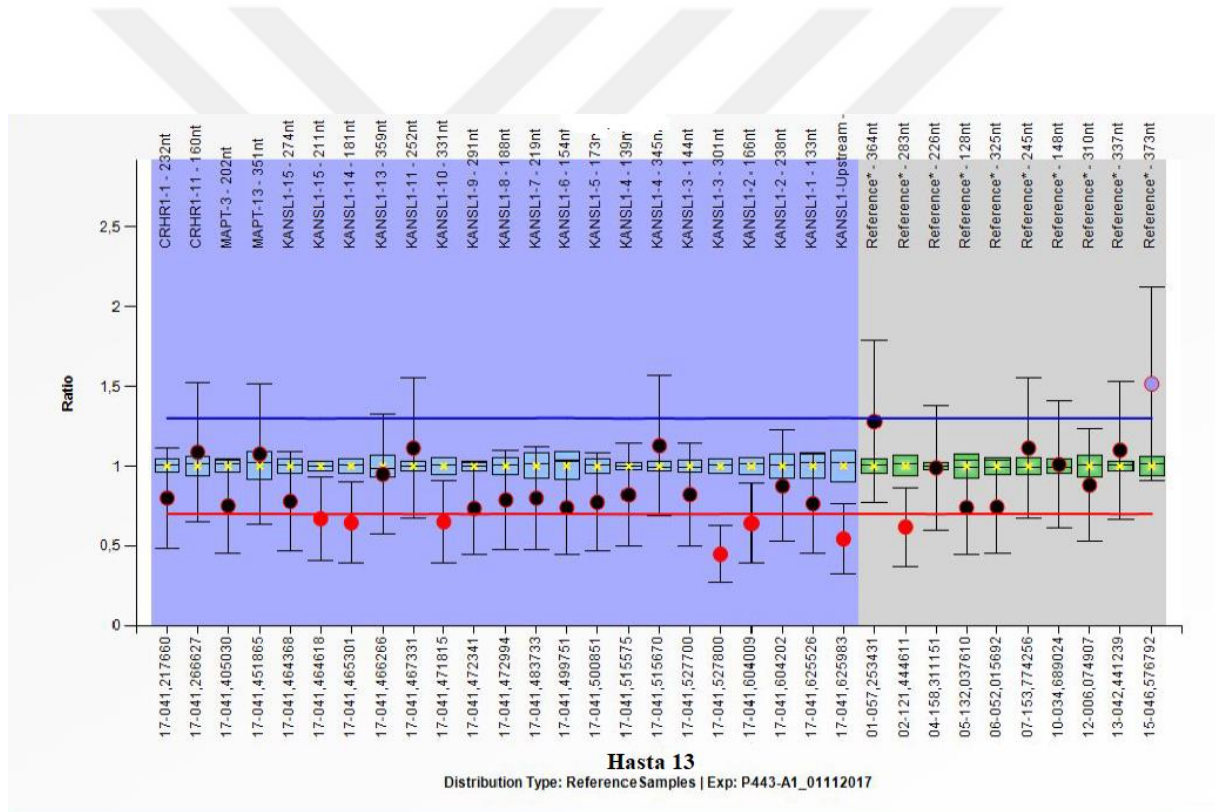
Onbeş yaşında erkek hasta; Hafif- orta MR, minör malformasyonlar ve epilepsi tanısı almıştır. Anne babası 3. derece kuzen olduğu ve halasının kızında MR tanısı konulduğu öyküden öğrenilmiştir. Klinik muayenesinde hafif-orta MMR, hipotoni, trunkal obesite, mikrognati, çekik göz şekli, belirgin burun ucu, bifrontal darlık, strabismus ve yüksek damak görülmüştür. FISH analizi ile del(15q11-13) normal olarak değerlendirilmiştir. aCGH analizinde klinik bulguları ile doğrudan ilişkili kopya kaybı veya artışı saptanmamakla birlikte, 17q21.31 gen bölgesinde 89,87 kb büyüklüğünde *KANSLI* ve *KANSLI-AS1* genlerini kapsayan bölgede bir delesyon olduğu görülmüştür ve Koolen-de Vries sendromu tanısı almıştır. Yapılan MLPA çalışmasında hastanın *KANSLI* geninde ekzon 8, 10, 14 ve 15 üzerinde delesyon bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 8 üzerinde gösterilmiştir. Klinik değerlendirmede bulgular sendromla uyumlu bulunmuştur.

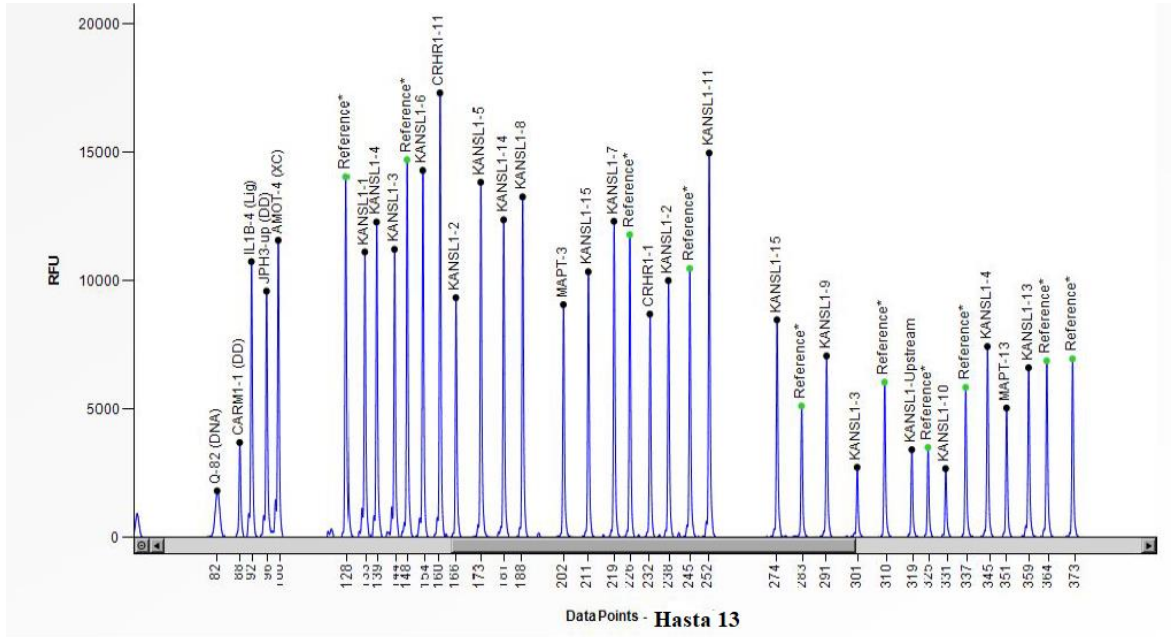


Şekil 8. Hasta 4 MLPA sonuç grafiği. Kırmızı noktalar delesyon bölgelerini göstermektedir.

4.2.2. Hasta 13

Hasta 8 yaşında bir kız çocuğu, hafif zekâ geriliği, dismorfik yüz tanıları ile başvurmuştur. Dismorfik bulgu olarak, hipertelorizm ve burun kökü basıklığı saptanmış, hastanın geniş tabanlı yürüme özelliği olduğu görülmüştür. aCGH analizinde klinik bulguları ile doğrudan ilişkili kopya kaybı veya artışı saptanmamakla birlikte, 17q21.31 gen bölgesinde 89,87 kb büyüklüğünde *KANSL1* ve *KANSL1-AS1* genlerini kapsayan bölgede bir delesyon olduğu görülmüştür. Yapılan MLPA çalışmasında hastanın *KANSL1* geninin upstream bölgesi, ekzon 2, 3, 10, 14, 15 bölgelerinde delesyon bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 9 üzerinde gösterilmiştir. Klinik değerlendirmede hipotoni, mental yetersizlik bulguları sendromla uyumlu bulunmuştur, ancak fenotipik bulguları uyumlu bulunmamıştır.





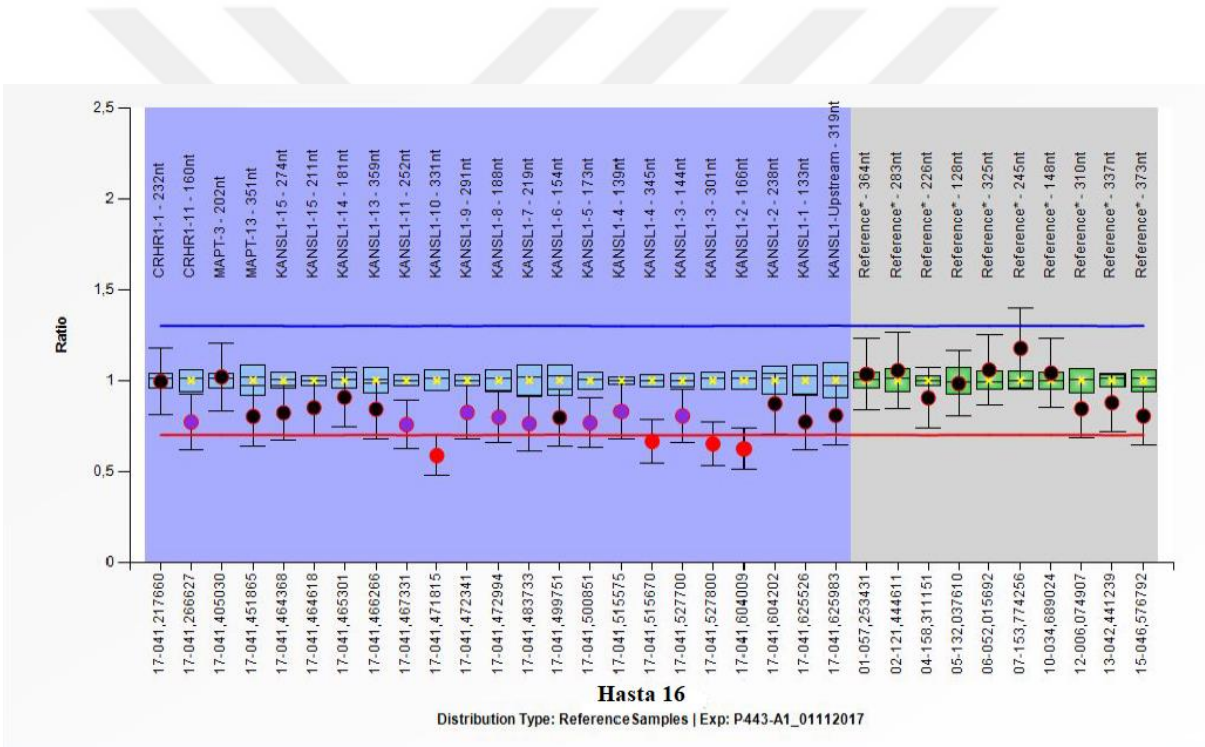
Şekil 9. Hasta 13 MLPA sonuç grafiği. Kırmızı noktalar delesyon bölgelerini göstermektedir.

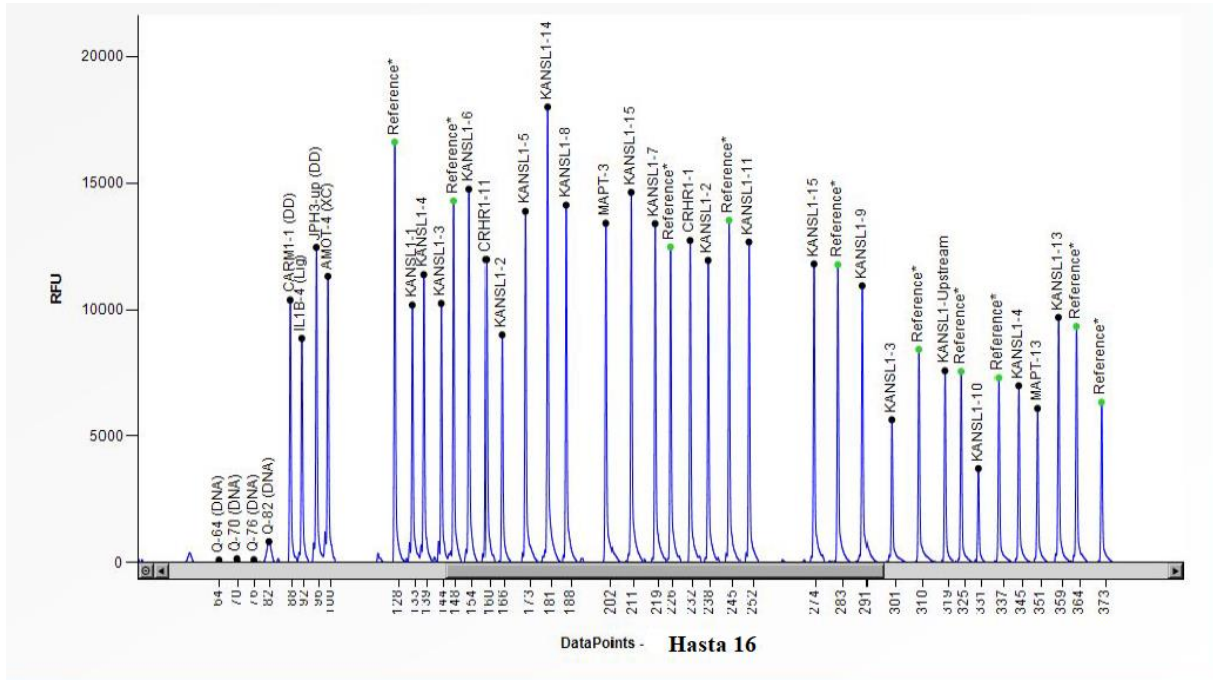
4.2.3. Hasta 16

Hasta 9 yaşında ve kız çocuğu; MMR, multiple minör malformasyon, epilepsi, hipotoni bulguları ile Cornelia De Lange Sendromu öntanısı almıştır. İnceleme sırasında dikkat dağınıklığı ve çok hareketli olduğu görülmüştür. Hastanın fenotip görüntüsü Şekil 10 ile gösterilmiştir. aCGH analizinde klinik bulguları ile doğrudan ilişkili kopya kaybı veya artışı saptanmamakla birlikte, 17q21.31 bölgesinde 120,557 kb büyüklüğünde *KANSLI* ve *KANSLI-AS1* genlerini kapsayan bölgede bir delesyon olduğu görülmüştür. Yapılan MLPA çalışmasında hastanın *KANSLI* geninde ekzon 2, 3, 4 ve 10 bölgelerinde delesyon bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 11 üzerinde gösterilmiştir. Klinik değerlendirmede bulgular sendromla uyumlu bulunmuştur.



Şekil 10. Hasta16 önden ve yandan yüz görüntüsü





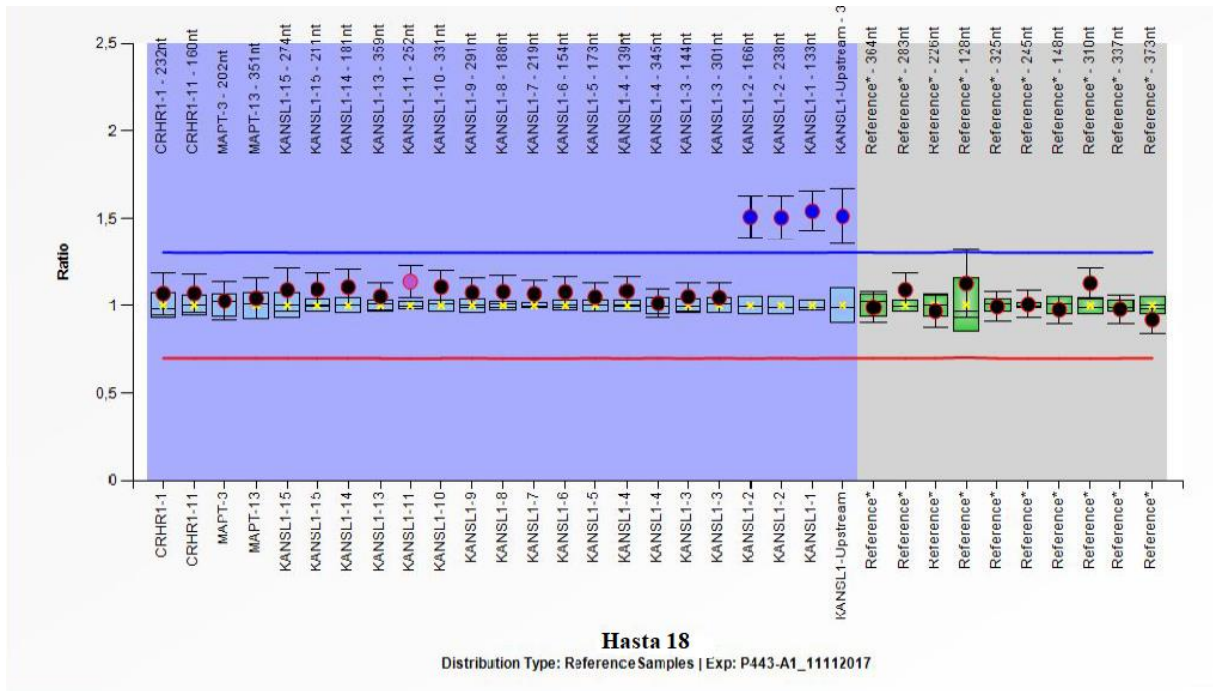
Şekil 11. Hasta 16 MLPA sonuç grafiği. Kırmızı noktalar delesyon bölgelerini göstermektedir.

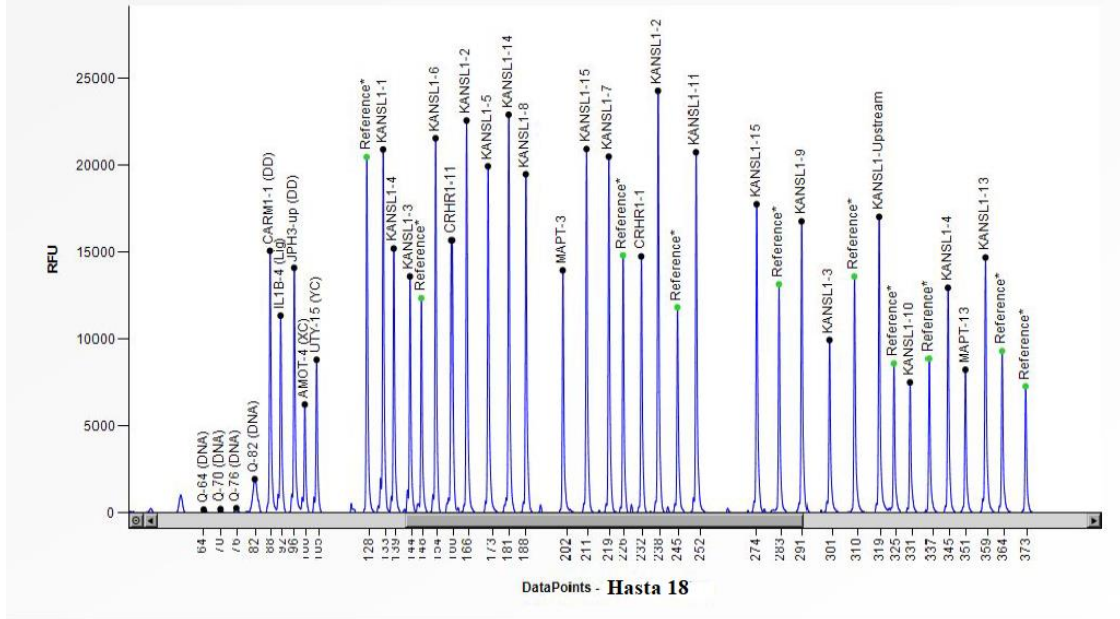
4.2.4. Hasta 18

MR, dismorfik yüz ve hipotoni bulguları ile başvuran 12 yaşında erkek hasta. Yapılan fizik muayenede çekik göz, balık ağız, belirgin kulaklar, makro penis görülmüştür. Organomegali, üfürüm, nörokutan bulgu bulunmamıştır. Bilateral içe şaşlık görülmüştür. Hastanın fenotip görüntüsü Şekil 12’ de gösterilmektedir. MECP2 mutasyonu, 22q11 delesyonu ve Frajil X açısından incelenmiş ve negatif bulunmuştur. aCGH analizinde klinik bulguları ile doğrudan ilişkili kopya kaybı veya artışı saptanmamakla birlikte 17q21.31 gen bölgesinde 103,14 kb büyüklüğünde *KANSL1* ve *KANSL1-AS1* genlerini kapsayan bölgede bir delesyon olduğu görülmüştür. Ancak yapılan MLPA çalışmasında hastanın *KANSL1* geninin upstream bölgesi ve ekzon 1, ekzon 2 bölgelerini kapsayan alanda duplikasyon olduğu görülmüştür. İkinci bir çalışma ile hastanın MLPA sonucu doğrulanmıştır. Sonuçlar Şekil 13 ile gösterilmiştir. Dismorfik yüz bulguları sendromla uyumlu bulunmuştur ancak klinik tablonun tam olarak uymadığı düşünülmüştür.



Şekil 12. Hasta 18 önden ve yandan yüz görüntüsü.





Şekil 13. Hasta 18 MLPA sonuç grafiği. Mavi noktalar duplikasyonu göstermektedir.

Tablo 10. MLPA çalışması ile delesyon ve duplikasyon saptanan hastaların fenotip karşılaştırılması

KdVS bulguları	Hasta 4	Hasta 13	Hasta 16	Hasta 18
Dismorfik Bulgular	+	+	+	+
	Mikrognati, çekik göz, belirgin burun ucu, strabismus, düşük yerleşimli büyük malforme kulaklar, bifrontal darlık	Hipertelorizm ve burun kökü basıklığı	Hipertelorizm, belirgin çene, düşük yerleşimli büyük malforme kulaklar, belirgin alın	Çekik göz, balık ağız, düşük yerleşimli büyük malforme kulaklar
Hipotoni	+	-	+	+
Epilepsi	+	-	+	-
Zihinsel Engellilik	+	+	+	+
Konjenital Kardiyak Defekt	-	-	-	-
Beyinde Yapısal Bozukluklar	-	-	-	-
Ürolojik Anormallikler	+	-	-	-
Sempatik davranış	+	-	+	-

5. TARTIŞMA

Mikrodizilim teknolojisinin kullanılmaya başlamasından itibaren kopya sayısı varyantları, mikrodelsyon ve mikroduplikasyon bölgeleri genomik düzeyinde incelenmeye başlamıştır (48).

Array çalışmaları ile birlikte tespit edilmeye başlayan sendromlardan birisi de 17q21.31 mikrodelsyon olan Koolen de Vries Sendromudur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu bölgedeki *KANSLI* geninin kaybının bu sendroma sebep olduğunu göstermiştir (10).

Türkiye’ de bu zamana kadar bu sendromun belirlenmesinde *KANSLI* geninin kaybı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda aCGH ile *KANSLI* genini içeren delesyona sahip 30 hasta MLPA yöntemi ile ekzonik delesyonun varlığı açısından incelenerek, delesyona sahip hastaların klinik verilerinin KdVS sendromu fenotipine uygunluğu değerlendirilmiş ve KdVS için tanısal yaklaşımda bir algoritma oluşturulması planlanmıştır.

aCGH çalışması Nimblegen marka mikroarray platformu ile çalışılmıştır. Nimblegen array platformu diğer array platformlarına göre 15 kb’ lık değişikliklerin %95’ ini saptayabilme özelliğine sahiptir. Birçok array yöntemine göre daha başarılı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (49). Array çalışmaları değerlendirilirken kullanılan array kiti dikkate alınmaktadır. Kullanılan her platform içeriği bakımından farklı prob yoğunluğuna sahiptir. Çalışma verileri platform içeriğine göre analiz edilmektedir (49).

Hastalarımıza yapılan aCGH çalışmasında Nimblegen 6x720K, 12x135K veya 3x1.4M platformları kullanılmıştır. Kullanılan platforma göre en az 5 prob ile belirlenen ve 100-250 kb arasında değişen sınır değer üzerindeki kopya sayısı değişiklikleri analiz edilmiştir. Yapılan çalışma sonrasında 30 hastadan 1’ i çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışılan 29 hastanın 4’ünde bulgu görülmüştür. Üç hastada *KANSLI* delesyonu görülürken (ikisi 12x135K ile biri 6x720K ile çalışılmıştır), 1 hastada duplikasyon saptanmıştır (6x720K ile çalışılmıştır).

Hastalar kopya sayısı değişikliğinin büyüklüğüne göre üç grupta değerlendirilmiştir. Birinci grup hastalar sadece *KANSLI* delesyonu olan hastalardan seçilmiştir. Bu grupta bulunan hastaların aCGH ile saptanan delesyon büyüklüğü yaklaşık olarak 55,09 ile 60,518 arasında değişmektedir. İkinci grup hastalar ise *KANSLI* ve *KANSLI-AS1* delesyonuna sahiptir. Bu hastaların aCGH ile saptanan delesyon büyüklüğü yaklaşık olarak 59,53 ile 164,535 kb arasında değişmektedir. Üçüncü grup hastalarımız ise 17q21.31 bölgesinde *KANSLI* ve diğer genleri içeren yaklaşık 395-580 kb

arasında değişen kopya kaybı bölgesine sahiptir. Yapılan MLPA sonucunda *KANSL1* delesyonu saptanan iki hastada delesyon büyüklüğü 100 kb' ın altındadır. Array CGH ile delesyonu saptama oranı çalışmamızda, 100kb ve üzeri sınır değerde ~3.45 iken, 50kb sınır değerde 10.34' e yükselmektedir. Bu nedenle değerlendirme kullanılan büyüklüğe bağlı eşik değerin bu hastaların tanısını koymak için uygun olmadığı görülmüştür.

Sadece *KANSL1* delesyonu bulunan 3 hastanın yapılan MLPA çalışmasında *KANSL1* bölgesinde hastaların hiçbirinde MLPA ile *KANSL1* bölgesinde delesyon ya da duplikasyon saptanmamıştır. *KANSL1* ve *KANSL1-AS1* delesyonuna sahip 16 hastadan 3 hastada MLPA ile delesyon bulunmuştur. Bir hastanın ise sonucu duplikasyon olarak belirlenmiştir. *KANSL1* ve diğer genleri içeren daha büyük bölgede delesyon bulunan 11 hastanın yapılan MLPA çalışmasında hastaların hiçbirinde delesyon ya da duplikasyon saptanmamıştır. Delesyon ve duplikasyon bulunan hastalar *KANSL1* ve *KANSL-AS1* delesyonuna sahip hasta grubunda yer almaktadır. Bu nedenle aCGH ile saptanan kopya sayısı değişikliğinin boyutları ve gen içeriğinin MLPA ile delesyon saptama oranı arasında ilişkili olmadığı görülmüştür.

İkinci gruba ait bir hastamızda (Hasta 18) aCGH bulgusunun aksine duplikasyon saptanmıştır. Yöntem ikinci kez tekrarlanmış ve aynı sonuç bulunmuştur. Bu sonuçlar *KANSL1* delesyon/duplikasyon analizi için MLPA yönteminin daha güvenilir olduğunu düşündürmektedir. MLPA ve aCGH ile pozitif bulunan 13 numaralı hasta ve aCGH ile delesyon saptanırken MLPA ile duplikasyon saptanan 18. Hasta klinik değerlendirmede KdVS olarak tanı almamıştır. Bu nedenle MLPA ile bulgu bulunması da tek başına tanı için yeterli bulunmamıştır. Ayrıca klinik tanısı olan ve her iki yöntemle de delesyon ya da duplikasyon olmayan hastalarda *KANSL1* geni mutasyonları bu yöntemler tarafından saptanamadığından dizi analizi ile inceleme yapılması gerektiği unutulmamalıdır.

Çalışma dışı bırakılan hastanın DNA kalitesi düşük olduğu için çalışma sırasında *KANSL1* geni üzerinde hem delesyon hem duplikasyon olduğu görülmüştür. Çalışma tekrarlanmıştır ancak sonuç yine aynı bulunmuştur. Bu hastanın DNA örneğinin düşük kalitede olması nedeniyle problara bağlanama sorunu yaşandığı düşünölmektedir. Bulgumuz DNA kalitesinin hastaya MLPA yöntemi ile sonuç verme başarısı açısından önemli olduğunu göstermektedir.

MLPA çalışması sonucunda *KANSL1* delesyonuna sahip hastaların ortak ekzon bölgesi ekzon 10 olarak saptanmıştır. *KANSL1* proteininin 850-882 aminoasit arasında kalan bölgesinin protein aktivitesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Nökleotid dizisine bakıldığında buranın, genin 11. ekzonuna denk geldiği görülmüştür. *KANSL1* geni protein ürününün aktif olduğu bölge 2549-2648

nükleotid arasını kapsamaktadır. Ekzon 11 probu 2656 nükleotid ve devamını içermektedir. Ekzon 10 probu ise 2441 nükleotid ve devamını içermektedir. *KANSLI* aktive bölgesi öncesinde olduğu için bu bölgeyi de kopyasabileceği ihtimali düşünülebilir. Ancak bu bölgenin bağlanmadan sonra ne kadar bir alanı taradığı bilinmemektedir. Çalışmamızda ortak bulgu olarak ekzon 10 bölgesinde delesyon olması bu bölgenin önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu bulgunun daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir.

MLPA panelinde *KANSLI* geninin aktif bölgesine ait bir prob bulunmaması yöntemin eksikliği olarak görülmüştür. Ayrıca gende delesyon/duplikasyon saptanmaması durumunda fenotipik bulgulara sahip hastalara dizi analizi ile *KANSLI* mutasyon taraması önerilmelidir.

KdVS olan hastalar fenotipik olarak çeşitlilik göstermektedir. Sendrom 59 gen bölgesini içeren otozomal dominant mental retardasyon fenotipik serisinin bir üyesidir (50). Klinik olarak tanımlanmış belirgin bulguları gelişimsel gerilik, hafif-orta mental reterdasyon, dismorfik yüz ve hipotonidir. Dismorfik yüz bulguları tipik olarak; uzun hipotonik yüz, pitoz, çekik gözler, bleferofimozis, büyük ve düşük yerleşimli kulaklar, belirgin burun ucu, hipoplastik burun kanatları ile birlikte uzun kolumella ve belirgin çenedir ancak bu bulgular çeşitlilik göstermektedir (50). Delesyon bulunan 4 ve 16 numaralı hastalarda KdVS fenotipine benzer yüz bulguları saptanmıştır ancak hasta 13' ün bulguları diğerlerine göre daha hafiftir. Duplikasyon bulunan hasta 18 ise dismorfik yüz bulguları sendromla uyumlu olmasına karşın klinik değerlendirmede KdVS tanısı almamıştır. Tüm hastalarda hafif-orta MR ve hipotoninin ortak bulgu olduğu dikkati çekmektedir. Dismorfik yüz bulgusunun varlığı hastaların hepsinde saptanmış ancak, bulguların farklı tipte olması nedeniyle ayırt edici özelliğinin yüksek olmadığı görülmüştür. Ürogenital ve diğer sistemik bulgular hastalarda farklılık göstermektedir.

Hastalarımızın hiçbirinde 17q21.31 bölgesinde bulunan ve KdVS tanısında etkinliği daha açıklanamamış olan *MAPT* ve *CRHR1* genlerinde delesyon/duplikasyon bulunmamıştır. Klinik bulgusu olan hastalarımızda bu genlerin kopya sayısı değişikliği ile ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle fenotipik farklılıkların, *KANSLI* genini düzenleyen diğer genler ve hastaların kendi genomik içeriklerinin etkileşimine bağlı olarak gelişebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamız sonucunda, MLPA yönteminin *KANSLI* geni delesyon/duplikasyonunun tanısında güvenilir bir yöntem olabileceği, aCGH ile yanlış pozitifliğin bizim hasta grubumuz içinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Tanı aşamasında klinik görüşün alınması ve aCGH sonucunun ek bir yöntemle doğrulanmasının hastaların atlanmaması ve yanlış pozitifliğin azaltılması açısından yardımcı olacağı

görüşüne varılmıştır.

Sonuç olarak bizim bulgularımıza göre: KdVS için tanısal yaklaşımda, fenotipik benzerlik gösteren diğer sendromlardan ayrılması açısından aCGH yönteminin birincil test olarak seçilmesi, 17q21.31 delesyon/duplikasyonu saptanması durumunda MLPA ile doğrulanması ve sonuç raporunun takip eden klinisyen ile tartışılarak verilmesi önerilir. Ayrıca, klinik bulguları ile tanısı desteklenen ancak delesyon/duplikasyon saptanmayan hastalarda *KANSLI* gen mutasyonlarının dışlanması gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. aCGH çalışmasında *KANSLI* kopya sayısı değişikliklerinin yanlış pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur.
2. aCGH sonuçları bu ikinci bir yöntemle doğrulanarak raporlanmalıdır.
3. Fenotipik çeşitlilik nedeniyle diğer mikrolelesyon sendromlarının detaylı incelenmesine olanak sağlaması nedeniyle birincil test olarak uygulanması uygundur.
4. aCGH çalışmasında delesyon bölgesinin büyüklüğü ve gen içeriği delesyon bulma olasılığı ile ilişkili değildir.
5. MLPA delesyon ve duplikasyonların saptanmasında güvenilir ve uygulanabilir bir yöntemdir.
6. MLPA çalışması yapılırken kullanılan DNA' nın kalitesi önemlidir. Uygun DNA kullanılmadığı takdirde çalışma doğru sonuçlar vermemektedir.
7. *aCGH ile KANSLI* kopya sayısı değişikliklerinin saptanması durumunda, MLPA ile doğrulama ve bu açıdan klinik değerlendirme aşamaları ile tanı konulmalıdır.
8. Klinik bulgusu olan ancak delesyon/duplikasyon saptanmayan vakalarda *KANSLI* gen mutasyon taraması yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Watson CT et al. The genetics of microdeletion and mikroduplication syndromes: an update. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014; 15: 215–244.
2. Menten, B. et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J. Med. Genet.* 2006; 43, 625–633.
3. Gouas L, Goumy C. Et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie* 56 (2008) 345–353.
4. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004; 41 (4): 241–248.
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK24676/>
6. Koolen DA, Kramer JM, Neveling K et al: Mutations in the chromatin modifier gene *KANSL1* cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet* 2012; 44: 639–641.
7. Ciaccio, C. et al. Koolen-de Vries Syndrome: Clinical Report of an Adult and Literature Review. *Cytogenet Genome Res.* 2016;150(1):40-45.
8. Daar AS, Scherer SW, Hegele RA. Implications for copy-number variation in the human genome: a time for questions. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7:414.
9. Reiff M, Bernhardt BA, et al. What does it mean?": Uncertainties in understanding results of chromosomal microarray testing. *Genet Med* 2012;14(2):250–258.

10. Zollino M, Orteschi D, Murdolo M et al: Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* 2012; 44: 636–638.
11. Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R et al: A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006; 38: 999–1001.
12. Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L et al: Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 2006; 38: 1032–1037.
13. Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, Giannikou K et al: Microdeletion and microduplication 17q21.31 plus an additional CNV, in patients with intellectual disability, identified by array-CGH. *Gene* 2012; 492: 319–324.
14. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR et al: Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006; 38:1038–1042.
15. Terrone G, D'Amico A, Imperati F et al: A further contribution to the delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome: central nervous involvement in two Italian patients. *Eur J Med Genet* 2012; 55: 466–471.
16. Koolen DA, Pfundt R, Linda K, Beunders G, Veenstra-Knowl HE, Conta JH, de Vries BBA. The Koolen-de Vries syndrome: A phenotypic comparison of patients with a 17q21.31 microdeletion versus a KANSL1 sequence variant. *Eur J Hum Genet* 2016; 24:652–659.
17. Tan TY, Aftimos S, Worgan L et al: Phenotypic expansion and further characterisation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 2009; 46: 480–489.

18. Zollino M, Marangi G, Ponzi E, Orteschi D, Ricciardi S, Lattante S, Zackai E. Intragenic KANSL1 mutations and chromosome 17q21. 31 deletions: Broadening the clinical spectrum and genotype-phenotype correlations in a large cohort of patients. *J Med Genet* 2015; 52:804–814.
19. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/koolen-de-vries-syndrome>
20. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/koolen-de-vries-syndrome#synonyms>
21. Koolen DA, Vries BA. *KANSL1*-Related Intellectual Disability Syndrome. *GeneReviews* (2010) [Internet].
22. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/koolen-de-vries-syndrome#genes>
23. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KANSL1#sourcesforpage>
24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=644246>
25. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z3B3>
26. Koolen DA, Pfundt R et al. The Koolen-de Vries syndrome: a phenotypic comparison of patients with a 17q21.31 microdeletion versus a KANSL1 sequence variant. *Eur J Hum Genet*. 2016 May;24(5):652-9.
27. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KANSL1#synonyms>
28. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S et al: A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011; 43: 838–846.
29. Cao Z, et al. Maternal histone acetyltransferase KAT8 is required for porcine preimplantation embryo development. *Oncotarget*. 2017 Oct 27; 8(52): 90250–90261.

30. Taipale M, Rea S, Richter K, Vilar A, Lichter P, Imhof A, Akhtar A. hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:6798-6810.
31. Li X, Corsa CA, Pan PW, Wu L, Ferguson D, Yu X, Min J, Dou Y. MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Mol Cell Biol.* 2010; 30:5335-5347.
32. Solinas-Toldo, S. et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997; 20, 399–407.
33. Pinkel, D. et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* 1998; 20, 207–211.
34. Shinaw M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today* Volume 13, Numbers 17/18 September 2008.
35. Lee, C. et al. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet.* 2007; 39, S48–54.
36. <http://www.rochediagnostics.com.tr/home/diagnostik2/nimblegen-ms-200-mikroarray-tarayc.html>
37. Bruder CE, Hirvela C, Tapia-Paez I et al. High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *HumMol Genet* 2001; 10 (3): 271–282.
38. Vissers LE de Vries BB, Osoegawa K et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003; 73 (6): 1261–1270.

39. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70 (5): 1269–1276.
40. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23 (1): 41–46.
41. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36 (4): 361–374.
42. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004; 66: 488–495.
43. Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M et al. A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 2002; 11 (25): 3221–3229.
44. Schouten J.P, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12): e57.
45. 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.
46. <http://www.mlpa.com>
47. MLPA Cost-Effective and sensitive genomic and methylation profiling. MRC Holland Description version 27, 03-06-2010. <http://www.mlpa.com>

48. Coe BP, Ylstra B, et al. Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89 (2007) 647–653.
49. NimbleGen CGH/CNV Microarrays *Discover more variants.*
50. <http://omim.org/phenotypicSeries/PS156200>

