

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MARKER KROMOZOMLU OLGULARIN İLERİ MOLEKÜLER GENETİK
ANALİZLERİ İLE GENOTİP - FENOTİP KORELASYONU

Dr. Yavuz BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2012

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MARKER KROMOZOMLU OLGULARIN İLERİ MOLEKÜLER GENETİK
ANALİZLERİ İLE GENOTİP - FENOTİP KORELASYONU

Dr. Yavuz BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Alikashiöđlu

ANKARA

2012

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında değerli zamanlarını ve bilimsel desteklerini hiç esirgemeyerek tezimin şekillenmesinde ve sonuçlanmasında büyük emek gösteren, akademik ve sosyal kişilikleriyle asistanlık eğitimim boyunca bana hep yol gösterici olan değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek Aktaş'a ve Prof. Dr. Mehmet Alikışıfoğlu'na teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik asistanlığım süresince gerek bilimsel alandaki gerekse sosyal ilişkiler ve ahlaki değerler açısından bilgi ve deneyimlerini büyük bir içtenlikle aktararak eğitim sürecime katkılar sağlayan başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Nurten Akarsu olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Koray Boduroğlu, Doç. Dr. Eda Utine ve kendisiyle 2 yıl çalışma fırsatı bulabildiğim değerli hocam Doç. Dr. Yasemin Alanay'a teşekkür ederim.

Almanya'da gerçekleştirdiğim laboratuvar çalışmalarında beni bölümlerine kabul ederek her türlü desteği sağlayan Jena Üniversitesi İnsan Genetiği Bölümü Moleküler Sitogenetik Departmanı başkanı Prof. Dr. Thomas Liehr ve ekibine teşekkür ederim.

Aynı çatı altında çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Pelin Özlem Şimşek, Uzm. Dr. Esra Kılıç, Dr. Bilgin Kütükcü, Dr. Arda Çetinkaya, Dr. Yavuz Şahin ve Dr. Ahmet Cevdet Ceylan'a; tüm hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tez çalışmamın deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Serkan Kabaçam ve Deniz Ceylan başta olmak üzere tüm Genetik Laboratuvarı çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan kıymetli aileme gönülden teşekkür ederim.

ÖZET

BAYRAM, Y. Marker kromozomlu olguların ileri moleküler genetik analizleri ile genotip - fenotip korelasyonu. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2012. *Marker* kromozomlar, “tek başına konvansiyonel sitogenetik bantlama yöntemleri ile karakterize edilemeyen ve çoğunlukla aynı metafaz sahasındaki 20. kromozoma eşit büyüklükte ya da daha küçük olan yapısal olarak anormal kromozomlar” olarak tanımlanmakta ve sSMC (*small Supernumerary Marker Chromosomes*) olarak isimlendirilmektedirler. *Marker* kromozomların prenatal olarak saptanma sıklığı % 0.075, yenidoğanlarda görülme sıklığı %0.044’tür. Zihinsel yetersizliği bulunan hastalarda % 0.28 oranında gözlenirken infertilite olgularının %0.125’inde *marker* kromozom taşıyıcılığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada zihinsel yetersizliği ve dismorfik bulguları olan, sitogenetik analizlerinde *marker* kromozom saptanan 7 olgu ayrıntılı olarak incelendi. Hastaların Affymetrix® 250K SNP array ve SubcenM-FISH (*Subcentromer-specific multicolor FISH*) yöntemleri ile analizleri yapılarak *marker* kromozomların kökeni, yapısı ve başlangıç-bitiş noktaları tespit edildi. 4 olguda tetrazomi 18p, 2 olguda inv dup(15), 1 olguda da min(15) kuruluşuna sahip *marker* kromozom varlığı gösterildi. Tetrazomi 18p hastalarında zihinsel yetersizlik, gelişimsel gecikme, mikrosefali, strabismus, tipik dismorfik yüz görünümü (belirgin burun kökü, kulak anomalileri, mikrostomi) ortak klinik bulgularıdır. sSMC(15) hastalarında saptanan ortak klinik bulgular zihinsel yetersizlik, gelişimsel gecikme, nöbetler, davranış bozuklukları ve konuşmada geriliktir.

Bu çalışmada *marker* kromozomunun orijini belirlenen hastaların klinik bulguları daha önce literatürde sınırlı sayıda bildirilen olgular ile karşılaştırılarak literatüre katkı sağlandı. Tetrazomi 18p ve sSMC(15) hastalarının klinik takibi için önerilerde bulunuldu. 15. kromozom üzerindeki genlerin fonksiyonları incelendi ve sSMC(15) hastalarındaki klinik bulguların, *marker* kromozom üzerinde bulunan dozaj-duyarlı genlerdeki kopya sayısı artışı ile ilişkili olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Marker* kromozom, sSMC, tetrazomi 18p, inv dup(15), min(15)

ABSTRACT

BAYRAM, Y. Genotype-phenotype correlation of marker chromosome cases with advanced molecular genetic analyses. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Thesis, Ankara, 2012. Marker chromosomes are defined as “structurally abnormal chromosomes which cannot be identified unambiguously by conventional cytogenetics alone, and are equal in size to or smaller than a chromosome 20 of the same metaphase spread” and named as sSMC (small Supernumerary Marker Chromosomes). Marker chromosomes are present in 0.075% of unselected prenatal samples and in 0.044% of newborns. 0.125% of people with problems in conceiving are sSMC carriers and this rate is 0.28% in intellectually disabled patients.

Seven cytogenetically described marker chromosome cases with intellectual disability and dysmorphic findings are examined in detail. The origin, structure and start-end position of marker chromosomes determined with Affymetrix® 250K SNP array and SubcenM-FISH (Subcentromere-specific multicolor FISH) analyses. The structures of marker chromosomes are revealed as tetrasomy 18p in 4 patients, inv dup(15) in 2 patients and min(15) in 1 patient. Intellectually disability, microcephaly, strabismus, typical dysmorphic face appearance (prominent nasal root, ear anomalies, microstomia) were common clinical findings in tetrasomy 18p patients. In sSMC(15) patients the common clinical findings were determined as developmental delay, mild intellectually disability, seizures, behavioral disorders and speech delay.

Contribution to literature was made by comparing clinical findings of marker chromosome patients with the limited published cases in the literature. Follow-up protocols for patients with tetrasomy 18p and sSMC(15) were established. The functions of genes on chromosome 15 were investigated and we considered that the clinical findings of sSMC(15) patients are associated with copy number alteration of dosage-sensitive genes on marker chromosome.

Key Words: Marker chromosome, sSMC, tetrasomy 18p, inv dup(15), min(15)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER	XIV
TABLOLAR	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Marker</i> Kromozomların Tanımı ve Terminolojisi	3
2.2. <i>Marker</i> Kromozomların Oluşum Şekilleri	4
2.3. <i>Marker</i> Kromozomların Fenotip Üzerine Etkileri	5
2.3.1. Özel sSMC Sendromları	6
2.3.1.1. Emanuel Sendromu (ES) (OMIM#609029)	6
2.3.1.2. Cat Eye Sendromu (CES) (OMIM#115470)	7
2.3.1.3. Pallister-Killian Sendromu (PKS) (OMIM#601803)	8
2.3.1.4. Tetrazomi 18p Sendromu (OMIM#614290)	9
2.3.1.5. Turner Sendromu (TS)	10
2.3.2. sSMC'lerin Klinik Etkilerini Belirleyen Faktörler	11
2.3.2.1 Kopya Sayısı Kazanımı	11
2.3.2.2. Mozaisizm	13
2.3.2.3. Uniparental Dizomi (UPD)	13
2.4. sSMC Görülme Sıklığı	16
2.5. <i>Marker</i> Kromozomların Kökeni	18
2.6. <i>Marker</i> Kromozomlarda Kalıtım	19

2.7. <i>Marker</i> Kromozom Tanısına Yaklaşım	21
2.7.1. <i>Marker</i> Kromozom Tanısında Kullanılan Yöntemler	21
2.7.2. sSMC Karakterizasyon Aşamaları	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Seçilen Hastalar ve Klinik Değerlendirme	27
3.2. Periferik Kan Örneklerinden Kromozom Analizi	27
3.3. FISH Analizleri	29
3.4. Genomik DNA'nın İzolasyonu	31
3.5. SNP <i>Microarray</i> (Mikrodizin,Çip) Analizi	32
3.6. İleri FISH Yöntemleri	35
3.6.1. SubcenM-FISH	35
4. BULGULAR	39
4.1. Klinik Bulgular	39
4.1.1. Olgu 1	39
4.1.2. Olgu 2	39
4.1.3. Olgu 3	41
4.1.4. Olgu 4	41
4.1.5. Olgu 5	42
4.1.6. Olgu 6	43
4.1.7. Olgu 7	44
4.2. Laboratuvar Bulguları	45
4.2.1. Olgu 1	45
4.2.2. Olgu 2	48
4.2.3. Olgu 3	50
4.2.4. Olgu 4	52
4.2.5. Olgu 5	53
4.2.6. Olgu 6	55
4.2.7. Olgu 7	57

5. TARTIŞMA	59
5.1. 18. Kromozom Kökenli sSMC'ler	59
5.2. 15. Kromozom Kökenli sSMC'ler	62
6. SONUÇLAR	69
KAYNAKLAR	71
EK 1	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC,ACH	<i>Accessory Chromosome</i>
aCGH	<i>array Comparative Genomic Hybridization</i>
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AFG3L2	<i>ATPase FAMILY GENE 3-LIKE 2</i>
APBA2	<i>AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN-BINDING, FAMILY A, MEMBER 2</i>
APCDD1	<i>APC, DOWNREGULATED BY, 1</i>
ARHGAP11A	<i>RHO GTPase-ACTIVATING PROTEIN 11A</i>
ATP10A	<i>ATPase, CLASS V, TYPE 10A</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
Bkz.	Bakınız
bp	<i>base pair</i>
BP	<i>break point</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
°C	derece
caNC	<i>Cancer-associated neochromosome</i>
cc	<i>cubic centimeter</i>
cep	Sentromerik prob
CES	Cat Eye Sendromu
chr	chromosome
CHRFAM7A	<i>CHRNA7/FAM7A FUSION GENE</i>
CHRNA7	<i>CHOLINERGIC RECEPTOR, NEURONAL NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 7</i>
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
Cy5	<i>Cyanine 5</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEAC	<i>diethylaminocoumarin</i>

del	delesyon
der	derivatif
diğ	diğerleri
dk	dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
dup	duplikasyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EEG	Elektroensefalografi
EKO	Ekokardiyografi
ES	Emanuel Sendromu
ESAC	<i>Extra structurally abnormal chromosome</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GABA	Gamma aminobütirik asit
<i>GABRA5</i>	<i>GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, ALPHA5</i>
<i>GABRG3</i>	<i>GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, GAMMA3</i>
<i>GABRB3</i>	<i>GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, BETA3</i>
GCOS	GeneChip® Operating Software
gr	gram
GTPaz	Guanozin trifosfataz
GÜS	Genitoüriner sistem
HCl	Hidroklorik asit
hUPD	Heterodizomi
IQ	<i>Intelligence Quotient</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
idic	izodisentrik
inv dup	<i>inverted</i> duplikasyon

iUPD	İzodizomi
i(18)p	İzokromozom 18p
KBB	Kulak Burun Boğaz
KCL	Potasyum klorür
kg	kilogram
LCR	<i>Low Copy Repeat</i>
<i>LPIN2</i>	<i>LIPIN 2</i>
mar	<i>Marker</i>
<i>MAGEL2</i>	<i>MAGE-LIKE 2</i>
Mb	Mega baz
mbar	milibar
MC	<i>Marker Chromosome</i>
MCB	<i>Multicolor Banding</i>
<i>MC2R</i>	<i>MELANOCORTIN 2 RECEPTOR</i>
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
M-FISH	Multiplex FISH
mg	miligram
min	<i>Minute (ufak)</i>
<i>MKRN3</i>	<i>MAKORIN 3</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
ml	mililitre
mM	Milimolar
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	<i>messenger Ribonükleik Asit</i>
NaCl	Sodyum klorür
<i>NDN</i>	<i>NECDIN</i>
<i>NDUFV2</i>	<i>NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE FLAVOPROTEIN 2</i>
ng	nanogram
nl	Normal

NLB	<i>Nuclei lysis buffer</i>
NMC	<i>Neocentric marker chromosome</i>
NOR	<i>Nucleolar organizing region</i>
OCA2	<i>OCULOCUTANEOUS, TYPE II</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pan-cep	pan-sentromerik prob
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKS	Pallister-Killian Sendromu
POF	<i>Premature ovarian failure</i>
pter	p kolunun terminali
PWACR	Prader Willi / Angelman Sendromu kritik bölgesi
PW/AS	Prader Willi / Angelman Sendromu
qter	q kolunun terminali
r	<i>Ring kromozom</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (dakikadaki dönüş sayısı)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAC	<i>Small accessory chromosome</i>
SAPE	Streptavidin fikoeritin
SBAC	<i>Small bisatellited additional chromosome</i>
SD	Standart deviasyon
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SKY-FISH	Spectral Karyotyping-FISH
SMC	<i>Supernumerary marker chromosomes</i>
SMRC	<i>Supernumerary minute ring chromosome</i>
sn	saniye
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNRPN	<i>SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN POLYPEPTIDE N</i>
Spec.Green	<i>Spectrum Green</i>

Spec.Orange	<i>Spectrum Orange</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
sSMC	<i>Small supernumerary marker chromosomes</i>
sSRC	<i>Supernumerary ring chromosome</i>
SSS	Santral Sinir Sistemi
subcenM-FISH	<i>Subcentromer-specific multicolor FISH</i>
t	translokasyon
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
<i>TGIF1</i>	<i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-INDUCED FACTOR</i>
<i>THOC1</i>	<i>THO COMPLEX, SUBUNIT 1</i>
TMACL	<i>Tetramethylammonium chloride</i>
TREX	<i>Transcription/export</i>
TS	Turner Sendromu
Tw	<i>Tween</i> solüsyonu
U	Ünite
<i>UBE3A</i>	<i>UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE E3A</i>
UPD	Uniparental dizomi
US	Ultrasonografi
vb.	ve benzeri
VSD	Ventriküler Septal Defekt
VUR	Vezikoüreteral reflü
WCP	<i>Whole Chromosome Painting</i>
<i>XIST</i>	X-inaktivasyon merkezi
µl	mikrolitre
µM	mikromolar

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 <i>Marker</i> kromozomların oluşum şekilleri	5
2.2 Emanuel sendromunda gözlenen t(11;22)(q23;q11.2) translokasyonundaki mayotik segregasyonun şematik gösterimi	7
2.3 Kromozomlar üzerinde sSMC'lerin köken aldığı bölgeler ve klinikle ilişkilendirilen bölgeleri	12
2.4 UPD mekanizması ile sSMC oluşumunun şematik sunumu	15
2.5 McClintock mekanizması ile sSMC aktarımı sonucu hastalık oluşan bir olgu örneği	21
2.6 sSMC karakterizasyonunda takip edilmesi önerilen basamaklar	26
3.1 FISH yönteminin ana basamakları	30
3.2 SubcenM-FISH yöntemini gösteren şema	36
4.1 Olgu 2'nin fotoğrafları	40
4.2 Olgu 4'ün fotoğrafları	42
4.3 Olgu 5'in fotoğrafları	43
4.4 Olgu-1'in karyotip analizi ve WCP18 probu ile FISH analizi sonucu	46
4.5 Olgu 1'in 18. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu	46
4.6 Olgu 1'in array analizi sonucu	47
4.7 Olgu 2'nin karyotip analizi sonucu	48
4.8 Olgu 2'nin 18. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu	49
4.9 Olgu 2'in array analizi sonucu	49
4.10 Olgu 3'ün karyotip analizi sonucu ve subtelomerik 18p probu ile FISH analizi sonucu	50
4.11 Olgu 3'ün 18. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu	51
4.12 Olgu 3'ün array analizi sonucu	51
4.13 Olgu 4'ün karyotip analizi ve WCP18 probu ile FISH analizi sonucu	52

4.14	Olgu 4'ün array analizi sonucu	53
4.15	Olgu 5'in karyotip analizi ve WCP15, 22 problemleri ile FISH analizi sonucu	54
4.16	Olgu 5'in 15. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu	54
4.17	Olgu 5'in array analizi sonucu	55
4.18	Olgu 6'nın karyotip analizi sonucu	56
4.19	Olgu 6'nın array analizi sonucu	56
4.20	Olgu 7'nin karyotip analizi sonucu	57
4.21	Olgu 7'nin 15. kromozom için subcenM-FISH analizi ve PW/AS FISH probu ile analiz sonucu	58
4.22	Olgu 7'nin array analizi sonucu	58
5.1	Proksimal 15q bölgesindeki önemli genlerin ve kırık noktalarının (BP1-BP6) şematik gösterimi	66

TABLÖLAR

		Sayfa
2.1	Farklı alışma gruplarında belirlenen sSMC görülme sıklığı	17
2.2	Ailesel kalıtılan sSMC'lerin kromozomal ve paternal kökenine göre oranları	20
5.3	Tetrazomi 18p sendromu klinik bulgularının olgularımız ile karşılaştırılması	61
5.4	sSMC(15) klinik bulguların çalışmamızdaki hastalar ile karşılaştırılması	63
5.5	sSMC 15 hastalarının klinik bulguları	64

1. GİRİŞ

Marker kromozomlar, sSMC (*small Supernumerary Marker Chromosomes*) olarak tanımlanmakta ve prenatal taramalar ile postnatal tanı amaçlı yapılan sitogenetik analiz çalışmalarında saptanabilmektedir. *Marker* kromozomların prenatal olarak belirlenme sıklığı %0.075, yenidoğanlarda belirlenme sıklığı %0.044'tür. Zihinsel yetersizlik hastalarında %0.28 oranında gözlenirken; infertilite olgularının %0.125'inde *marker* kromozom taşıyıcılığı gösterilmiştir (1). Dünya üzerinde yaklaşık olarak 3.1 milyon kişinin sSMC taşıyıcısı olduğu düşünülmektedir. sSMC'lerin büyük bir kısmı (%70) *de novo* olarak oluşmakta ve %30'u ailesel kalıtım göstermektedir. *De novo* olguların yaklaşık % 70'i, kalıtım gösteren olguların tamamına yakını klinik olarak normal olduğundan birçok sSMC taşıyıcısı saptanamamaktadır (2).

Marker kromozomların fenotipe etkisi içerdikleri gen dozajıyla ilişkilidir. Kromozomların transkripsiyon açısından zengin bölgelerinden (ökromatin) köken alan *marker* kromozomlar, heterokromatin içerikli olanlara göre daha yüksek oranda klinik bulgu oluştururlar. Mozaisizm ve uniparental dizomi (UPD) *marker* kromozomların fenotipe etkisini belirleyen diğer iki önemli faktördür (3).

Marker kromozomlu hastalar, aynı kromozomdan kaynaklandığı halde farklı klinik bulgular sergileyebilmektedir. Bunun nedeni *marker* kromozomların farklı kırık noktalarından kırılıp oluşmuş olmaları ve dolayısıyla farklı gen içeriği taşımalarıdır. Yapılan çalışmalarda, *marker* kromozoma sahip bireylerin hafif öğrenme güçlüğünden ağır zihinsel yetersizliğe kadar değişen klinik bulgular sergileyebildikleri gösterilmiştir (4). Özellikle prenatal dönemde saptanan ve fenotipik özellikleri tam olarak bilinmeyen *marker* kromozomlar, genetik danışmanlık verilmesinde ve ailelerin bilgilendirilmesinde sorunlar oluşturmaktadır.

Marker kromozomlarla birlikte özel sendromlar tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları Pallister-Killian sendromu, Tetrazomi 18p sendromu, Cat-eye sendromu ve Emanuel sendromudur (5). Bu sendromların iyi tanımlanmasına karşın bunların dışında kalan *marker* kromozom olgularının çoğunda veri yetersizliği ve olgu azlığı nedeniyle fenotip-genotip korelasyonu yapılması zordur.

Konvansiyonel sitogenetik yöntemler *marker* kromozomların yapısının belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Günümüzde moleküler sitogenetik alandaki gelişmeler sayesinde *marker* kromozomların oluşum şekilleri ve ayrıntılı yapıları daha iyi analiz edilebilmektedir. Geliştirilen ileri FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) yöntemleri ile *marker* kromozomların kökenleri hızlı bir şekilde belirlenebilmekte ve mikroarray teknolojileri kullanılarak gen içerikleri incelenebilmektedir (6, 7).

Bu çalışmada zihinsel yetersizliği, dismorfik bulguları olan ve sitogenetik analizlerinde *marker* kromozom saptanmış 7 olgu yer almaktadır. İleri moleküler genetik analiz yöntemleri kullanılarak *marker* kromozomların kökenlerinin araştırılması, yapılarının daha ayrıntılı analizi yapılarak gen içeriklerinin ortaya çıkartılması ve genotip-fenotip ilişkisi kurulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Marker* Kromozomların Tanımı ve Terminolojisi

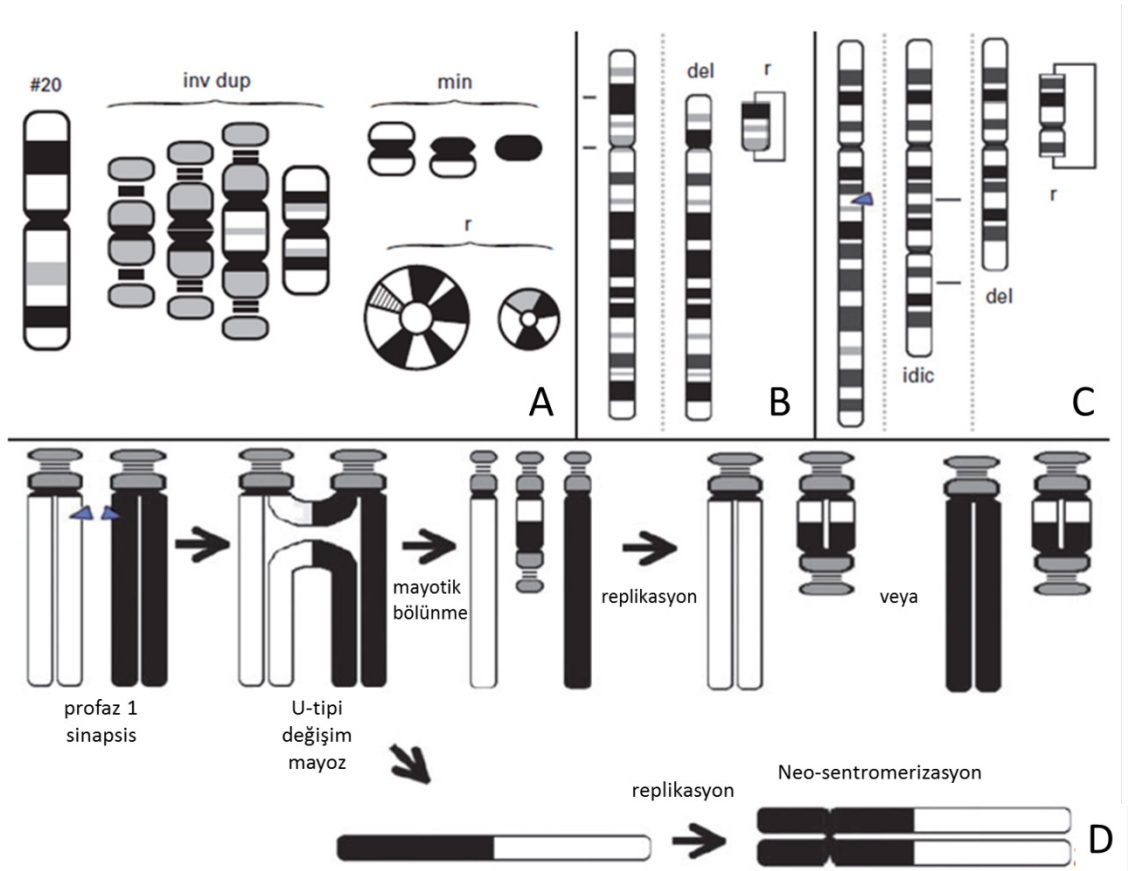
Marker kromozom, Uluslararası İnsan Sitogenetiği Adlandırma Sistemi'nde (ISCN = *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) "Sıklıkla kanser hastalarının karyotipinde, yapısal genetik bozukluğu olan hastalarda bulunan ve kaynağı bilinmeyen anormal kromozom" şeklinde tanımlanmaktadır (8). Ancak bu tanımlama "*marker* kromozom" olarak nitelendirilen kromozomları tam olarak açıklamadığı için son yıllarda daha farklı ve belirleyici bir isimlendirmeye gidilmiştir. *Marker* kromozomlar, ismine "küçük" ve "fazlalık" nitelendirmeleri eklenerek "tek başına konvensiyonel sitogenetik bantlama yöntemleri ile karakterize edilemeyen ve çoğunlukla aynı metafaz sahasındaki 20. kromozoma eşit büyüklükte ya da daha küçük olan yapısal olarak anormal kromozomlar" (*small Supernumerary Marker Chromosomes* = sSMC) olarak tanımlanmışlardır (3). Yirminci kromozomdan daha büyük *marker* kromozomlar, kromozom bantlarına bakılarak ayırt edilebileceğinden bu tanımlama içerisinde yer almamakta ve bunlar SMC olarak adlandırılmaktadır.

Literatürde sSMC'leri tanımlayan ve en sık kullanılan diğer isimler ESAC (*extra structurally abnormal chromosome* = ilave yapısal anomali içeren kromozomlar) ve sSRC (*supernumerary ring chromosome* = ilave *ring* kromozom)'dir (9-11). Bunlara ek olarak kullanılan diğer isimlendirmeler aksesuar kromozom (*accessory chromosome* = AC veya ACH), küçük aksesuar kromozom (*small accessory chromosome* = SAC), *marker* kromozom (*marker chromosome* = MC), ekstra veya ilave *marker* kromozom, fazlalık veya ekstra mikrokromozom, ilave veya metasentrik kromozom parçası, küçük bisatellit ilave kromozom (*small bisatellited additional chromosome* = SBAC), neo-sentromerik *marker* kromozom (*neocentric marker chromosome* = NMC), ilave minik *ring* kromozom (*supernumerary minute ring chromosome* = SMRC) ve kanser-ilişkili neokromozom (*cancer-associated neochromosome* = caNC) dur (8).

2.2. Marker Kromozomların Oluşum Şekilleri

sSMC'ler 3 farklı şekilde oluşmaktadır: 1) *Inverted* duplikasyon (inv dup) sonucu oluşan sSMC'ler 2) *Ring* kromozom (r) oluşumuyla ortaya çıkan sSMC'ler 3) Ufak (min) sentrik yapıda sSMC'ler (Şekil 2.1-A). Bu oluşumlardan *inverted* duplikasyon izlenen sSMC'ler %63, ufak sentrik yapıda olanlar %26, *ring* kromozom yapısında olanlar %11 sıklıkta görülmektedir (2). Diğer bir sınıflandırma şekli de *marker* kromozomları sentromerik veya neo-sentromerik olarak sınıflandırmaktır. Sentromerik olanlarda sSMC'nin köken aldığı kromozomun sentromeri korunurken neo-sentromeriklerde alfa-satellit DNA içeriği bulunmayan yeni bir sentromer oluşumu söz konusudur. *Analphoid marker*lar olarak tanımlanan bu kromozomlar interstisyel kromozom fragmanlarından oluşmakta ve daha önceden fonksiyonu gösterilmemiş sentromerler içermektedir (12).

Literatürde sSMC oluşum mekanizmaları ile ilgili çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Trizomiden kurtulma, monozomiden kurtulma, fertilizasyon sonrası hatalar ve gamet komplementasyonu bu mekanizmalardan bazılarıdır (13). Akrosentrik *inverted* duplike kromozom oluşumu ile ilgili de birçok mekanizma bildirilmiştir. Bunlardan en çok kabul göreni "U-tipi değişim" mekanizmasıdır. Bu mekanizma mayoz bölünme esnasında iki homolog kromozomun kromatidleri arasında hatalı *crossover* meydana gelmesi ile oluşur (Şekil 2.1-D). Neo-sentromerik sSMC'lerin de büyük bir çoğunluğu U-tipi değişim mekanizması ile oluşmaktadır (Bkz. Şekil 2.1-D). U-tipi değişim mekanizması aynı zamanda non-akrosentrik kromozomlardan izokromozom oluşumundan da sorumlu tutulmaktadır. Burada farklı olarak sentromerik DNA'da kırık meydana gelir. Bu mekanizma izokromozomların oluşumu için genel bir mekanizma olup, sadece germ hücrelerinde değil tümör hücrelerinde de meydana gelmektedir (8).



Şekil 2.1: A) *Marker* kromozomların (sSMC) 3 farklı tipi: *inverted* duplike kromozomlar (inv dup), minik kromozomlar (min), *ring* kromozomlar (r). B) İnterstisyel delesyon sonucu *ring* kromozom oluşumu C) *Inverted* duplikasyon sonrası *ring* kromozom oluşumu D) U-tipi değişim mekanizması sonucu *inverted* duplike ve neo-sentromerik kromozom oluşumları (Liehr ve diğ. 'nden alınmıştır) (8).

2.3. *Marker* Kromozomların Fenotip Üzerine Etkileri

Marker kromozomların fenotipe etkileri normal fenotipten ağır klinik bulgulara kadar değişkenlik göstermektedir. *Marker* kromozomların farklı fenotipik etki göstermelerinin nedenleri şunlardır:

- *Marker* kromozomların boyutu ve ökromatin materyal içeriği
- Mozaik formda olması
- *Marker* kromozomların farklı oluşum şekilleri
- Bir hastada farklı kromozomlardan köken alan birden fazla *marker* kromozom bulunması (14).
- *Marker* kromozomlarla birlikte aynı hastada farklı kromozomal değişikliklerin bulunması ve saptanan bir klinik bulgunun sSMC hastasının kliniği ile kesin olarak ilişkilendirilememesi (15).
- Heterokromatin/ökromatin oranındaki değişikliğe bağlı susturulma (*genetic silencing*) mekanizmaları (16, 17)

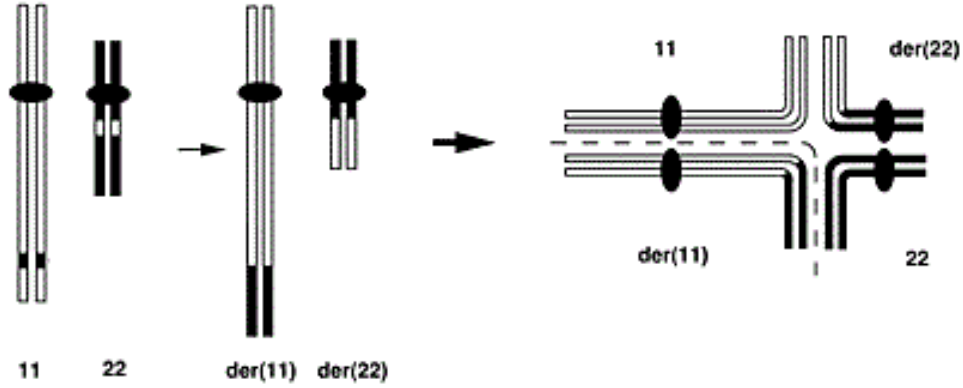
2.3.1. Özel sSMC Sendromları

Marker kromozom olgularının ancak %34'ünün klinik bulguları tanımlanmış ve özel sendromlar olarak isimlendirilmişlerdir (8). Bu sendromlar Emanuel sendromu, Cat Eye sendromu, Pallister-Killian sendromu ve tetrazomi 18p sendromudur. Ayrıca özel sendromlar arasında mozaik 45,X/46,X,+mar karyotipine sahip Turner sendromlu hastalar da yer almaktadır.

2.3.1.1. Emanuel Sendromu (ES) (OMIM#609029)

Derivatif 22. kromozom sendromu olarak da isimlendirilir. Çalışmalarda *marker* kromozomun 11. ve 22. kromozomların dengeli translokasyonu sonucu oluştuğu görülmüş ve karyotipi t(11;22)(q23;q11.2) olarak belirtilmiştir. Bu translokasyon insanlardaki en sık resiprokal translokasyondur (18). ES'li hastalarda 11. kromozomdan yaklaşık olarak 12 Mb'lık (11q23→11qter), 22. kromozomdan da yaklaşık 20 Mb'lık (22q11.2→22qter) bir bölgenin parsiyel trizomisi bulunmaktadır. Etkilenmiş birey, anne veya babasındaki dengeli 11;22 translokasyonunun 3:1 oranda mayotik segregasyona

uğraması sonucu aktarılan dengesiz kromozom yapısını taşımaktadır (Şekil 2.2) (19). Bu dengeli translokasyonun taşıyıcısı olan bireyler fenotipik olarak normaldir, ancak %2-6 oranında ES'li bebek sahibi olma olasılıkları vardır (20).



Şekil 2.2: Emanuel sendromunda gözlenen t(11;22)(q23;q11.2) translokasyonundaki mayotik segregasyonun şematik gösterimi. Kromozomlar 11, 22, der(11), ve der(22) olarak gösterilmiştir. Noktalı çizgi 3:1 mayotik segregasyonu göstermektedir.

Klinik bulgular olarak şiddetli gelişimsel gecikme ve/veya hafif-ağır zihinsel yetersizlik (%100), mikrosefali (%100), kardiyak malformasyonlar (%60), yarı damak (%50), renal malformasyonlar (%30), anal atrezi/stenoz (%20), yutma güçlüğü, *preauricular skin tag* veya sinüs, kulak anomalileri, mikrognati, gastroözofageal reflü, işitme kaybı, kırma kusuru, strabismus gibi göz bulguları, inguinal herni ve nöbetler görülebilmektedir (20).

2.3.1.2. Cat Eye Sendromu (CES) (OMIM#115470)

Bu sendrom Cat Eye Sendromu, Schmid-Fraccaro sendromu, 22. kromozomun parsiyel tetrazomisi ve inv dup (22)(q11) sendromu olarak farklı isimlerde

tanımlanmaktadır. Bu hastalarda bulunan iris kolobomu kedi gözüne benzer görüntü oluşturduğundan “*Cat eye* = Kedi gözü” sendromu olarak isimlendirilir. CES’e neden olan sSMC *de novo* bulunabileceği gibi ebeveynlerin birinden de kalıtılmış olabilir (21). Mozaik asemptomatik olgular da bulunabileceğinden şu ana kadar bildirilmiş yaklaşık 200 olgudan daha fazla CES-sSMC taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (2). *De novo* vakaların büyük bir çoğunlukla oogenez sırasındaki mayoz bölünme hatalarından kaynaklandığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (22).

Anal atrezi (%80), aşağı eğimli palpebral aralıklar, *preauricular skin tag* ve/veya *pit* (%85), iris kolobomu (%60), kardiyak malformasyonlar (%60), renal malformasyonlar (%70) ve hafif/orta zihinsel yetersizlik (%30) bu hastalığın klinik bulgularıdır. Görme kaybı, mikroftalmi ve yarı damak daha nadir görülebilecek diğer anomalilerdir (23).

CES ile ilişkili sSMC her zaman disentrik özellikte ve konvansiyonel bantlama/boyama yöntemleri ile tespit edilebilecek büyüklüktedir. CES kritik bölgesi DiGeorge sendromu kritik bölgesinin proksimalinde yer almaktadır. Bu sendroma yol açan sSMC interkromozomal U-tipi değişim mekanizması ile oluşmaktadır (22, 24). Yapılan çalışmalarda 22q proksimal bölgesi üzerinde farklı sSMC büyüklüklerine yol açabilecek dört farklı *crossing-over* bölgesi saptanmıştır (Tip 1, 2a, 2b ve 3). Bu bölgeler 22. kromozom üzerindeki *Low Copy Repeat* (LCR) bölgeleridir ve kromozomal değişiklikler açısından instabiliteye yol açmaktadır. *Marker* kromozomun büyüklüğü ile yol açtığı klinik bulgular arasında bir ilişki olmadığından CES-sSMC tipini belirlemenin prognostik bir değeri yoktur (25, 26). Nadir de olsa bazı hastalarda intrakromozomal duplikasyonlar görülebilmektedir (27).

2.3.1.3. Pallister-Killian Sendromu (PKS) (OMIM#601803)

İlk kez 1977 ve 1981 yıllarında birbirinden bağımsız iki yayında Pallister ve diğ. ile Teschler-Nicola ve Killian tarafından tanımlanmıştır (28, 29). Bu sendromda belirlenen *marker* kromozom tetrazomi 12p, heksazomi 12p veya izokromozom 12p

olarak da isimlendirilmektedir. PKS hastalarında 12p tetrazomisi genellikle fibroblastlarda veya bukkal epitel hücrelerinde mozaik olarak saptanmaktadır (30, 31).

Hafiften-ağıra kadar değişen zihinsel yetersizlik (%100), şiddetli hipotoni (%52), gelişimsel gecikme (%39), kaba yüz görünümü (%57), belirgin alın (%52), özellikle ön tarafta seyrekleşen saçlar ve seyrek kirpikler (%34), düşük yerleşimli kulaklar (%61), brakisefali, hipertelorizm, kısa ve ucu kalkık burun, basık burun kökü (%54), kısa boyun, nöbetler (%42) ve ciltte hipopigmente veya hiperpigmente lekeler (%58) bu sendromun klinik bulgularıdır (32). Prenatal dönemde saptanan omfalosel bulgusu PKS'nin bir belirtisi olabilir (33).

PKS'li hastalarda *marker* kromozom genellikle periferik kan haricindeki dokularda düşük yüzdeli mozaisizm olarak bulunduğundan sitogenetik olarak tanı konmasında zorluk yaşanabilmektedir. Prenatal veya postnatal herhangi bir dokuda sitogenetik olarak saptandığında, 12. kromozomun kısa koluna özel FISH probu ile *marker* kromozomun kökeni doğrulanabilir. PKS-sSMC oluşumu ile ilgili maternal mayoz II esnasında oluşan ayrılmama (*nondisjunction*) mekanizması sorumlu tutulmaktadır (34). Literatürde bir olguda paternal 12. kromozomun trizomiden kurtulma mekanizması ile izokromozom 12p oluşumu gösterilmiştir (2). Literatürde ayrıca üç olguda neo-sentromerik *marker* kromozomların varlığı tespit edilmiştir. Bu olgularda *marker* kromozomlar 12p11.22→12pter, 12p12.3→12pter, 12p13.31→12pter şeklinde farklı bölgelerden kırılarak tetrazomik yapı oluşturmaktadır (35-37). Bu bulgular PKS kritik bölgesinin 12p12.31 ile 12pter arasında yer aldığını göstermektedir.

2.3.1.4. Tetrazomi 18p Sendromu (OMIM#614290)

Tetrazomi 18p olarak tanımlanan *marker* kromozomlar; 18. kromozomun kısa kolunun dört kopya olarak bulunmasına yol açar ve izokromozom 18p [i(18p)] şeklinde de ifade edilebilir. Orta/ağır zihinsel yetersizlik, yenidoğan döneminde beslenme sorunları, pre/postnatal büyüme geriliği, kas tonusunda anormallik, yenidoğan sarılığı, tekrarlayan otitis media, mikrosefali, strabismus, işitme kaybı, gözde kırma kusurları, nöbetler, konstipasyon hikayesi, gastroözofageal reflü, kalp defektleri, skolyoz/kifoza,

pes planus ve beyin MRG'sinde değişiklikler bu sendromun en sık karşılaşılan klinik bulgularıdır. Dismorfik yüz bulguları düşük yerleşimli kulaklar, küçük burun, yüksek damak, küçük ağız, prognatizm ve mikrognatidir. Daha nadir olarak böbrek anomalileri, herniler, boy kısalığı ve büyüme hormonu uyarı testlerine cevapsızlık görülebilir (38). Şu ana kadar 250'nin üzerinde hasta bildirilmiştir ve görülme sıklığı canlı doğumlarda 1/140.000 olarak tahmin edilmektedir.

Tetrazomi 18p sendromu büyük çoğunlukla *de novo* olarak görülür. Ancak literatürde i(18p) taşıyıcısı annelerden çocuklarına aktarılan tetrazomi 18p olguları da gösterilmiştir (39-41). Ayrıca bir ailede de karyotipi normal olan annenin her iki kızında da tetrazomi 18p saptanmış ve bu bulgu annenin germ hücre dizisinde i(18p) mozaisizmi taşıdığı şeklinde yorumlanmıştır (42). Literatürde 18p11.21 ile 18q10 bölgeleri için tetrazomik olan bir olguda bu sendromun klinik bulguları gözleendiğinden, tetrazomi 18p sendromunun kritik bölgesinin bu aralık olabileceği düşünülmektedir (2).

2.3.1.5. Turner Sendromu (TS)

Turner Sendromu insanlarda en sık görülen anöploidilerden birisidir. Dişi fenotipli yenidoğanlarda yaklaşık olarak 1/2000-4000 oranında görülür. İlk kez 1938 yılında Henry Turner tarafından primer amenoresi ve boy kısalığı olan bir grup adölesan kızda klinik olarak tanımlanmıştır (43). TS'li bir hastanın ilk karyotip analizi ise 1959 yılında Ford ve diğ. tarafından yapılmış ve X kromozomunun monozomisi gösterilmiştir (44). TS en sıklıkla (yaklaşık %60) gonozomların tam monozomisi şeklinde (45,X) görülmektedir. TS hastalarının yaklaşık olarak %40'ında ise mozaisizm görülmektedir. 45,X/46,X,+mar karyotipine sahip bu hastalarda 45,X karyotipine ek olarak bir veya daha fazla hücre dizisinde yapısal olarak anormal X ya da Y kromozomu bulunmaktadır (45).

TS hastalarının klinik bulguları büyüme geriliği, kardiyovasküler hastalıklar (en sıklıkla biküspit aorta, aort koarktasyonu ve VSD), öğrenme güçlüğü, gonadal yetmezlik, kubitus valgus, yele boyun, ayırık yerleşimli meme uçları, düşük ense saç çizgisi ve el ya da ayak sırtında lenfödemdir. Karakteristik yüz görünümü olarak aşağı

eğimli palpebral aralıklar, internal epikantal katlantılar, yüksek damak ve retrognati görülür. Renal malformasyonlar (atnalı böbrek, üretral duplikasyon, böbrek agenezisi vb.), vücutta yaygın nevüsler, dördüncü metakarp ya da metatars kısalığı görülebilecek diğer anomalilerdir. TS hastalarda hipotiroidizm, çölyak hastalığı, diyabet gibi otoimmün hastalıklar sık görülmektedir (46, 47).

Karyotipi 45,X/46,X,+der(X) olan bireylerde derivatif X kromozomunun inaktif olup olmaması hastanın kliniği açısından önemlidir. Bu özellik X kromozomu üzerindeki X-inaktivasyon merkezi (*XIST*) geni ile kontrol edilir. Bu inaktivasyon merkezinin işlev görmemesi durumunda özellikle zihinsel yetersizlik başta olmak üzere farklı klinik bulgular ortaya çıkabilir. Bu nedenle X kromozomundan köken alan *marker* kromozomların *XIST* geni içerip içermediğinin araştırılması klinik açıdan önemlidir (45).

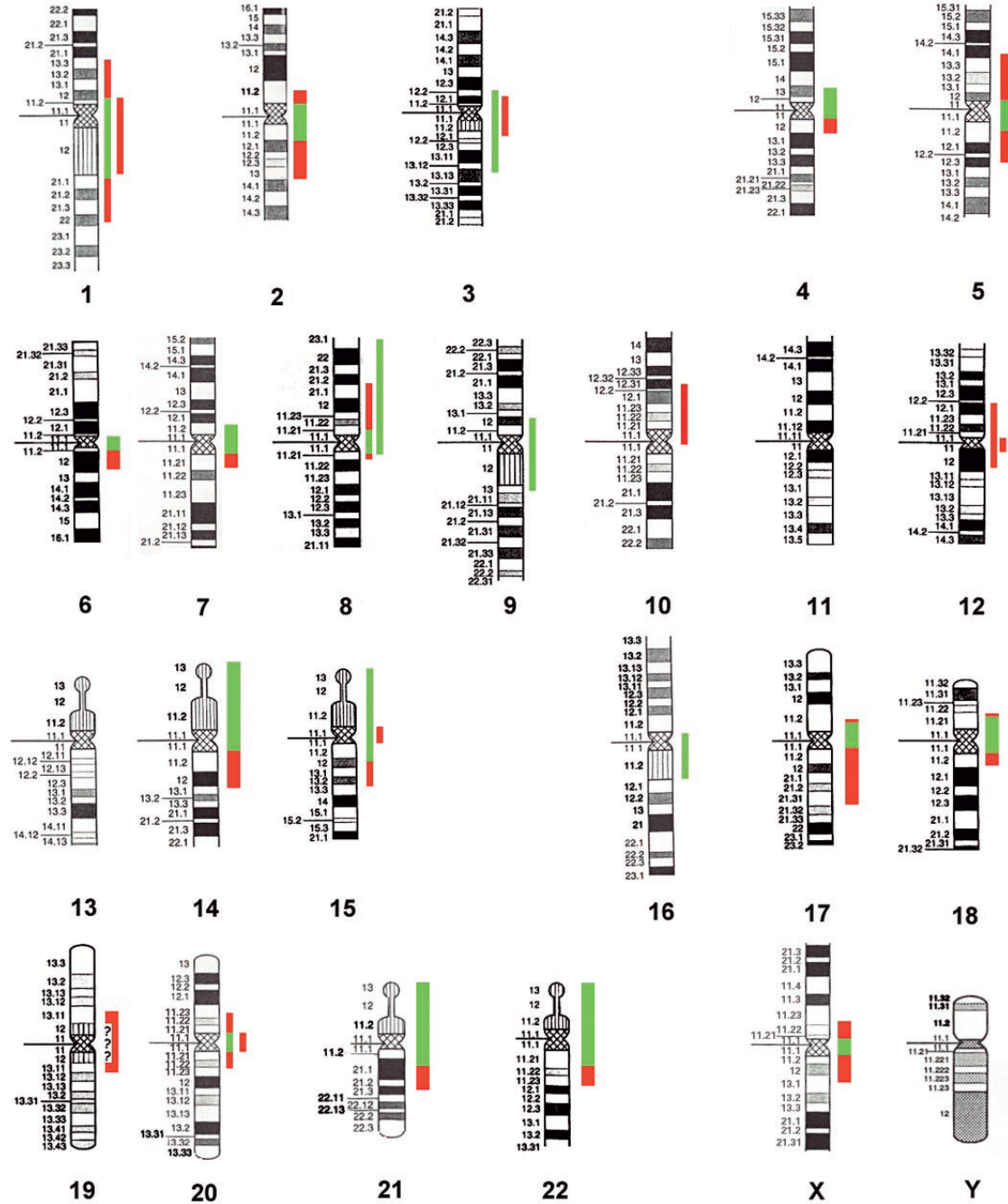
2.3.2. sSMC'lerin Klinik Etkilerini Belirleyen Faktörler

Marker kromozomların fenotip üzerine etkisini belirleyen faktörler; 1) Kopya sayısı kazanımı 2) Mozaisizm 3) Uniparental dizomi (UPD)'dir (3).

2.3.2.1 Kopya Sayısı Kazanımı

Marker kromozom tanısında en önemli basamak *marker* kromozomun kökeninin tespit edilmesidir. Köken belirlendikten sonraki kritik basamak ise *marker* kromozomun perisentrik bölgesinin içeriğinin belirlenmesidir. Eğer bu bölge genetik olarak anlamlı materyal içermiyorsa, çok büyük bir olasılıkla *marker* kromozomun fenotip üzerine direkt bir etkisi olmayacaktır (3). *Marker* kromozomun genetik dengesizliğe yol açabilecek ökromatin ve heterokromatin içeriğinin belirlenmesi bu yüzden önemlidir. Literatürde şu ana kadar saptanan *marker* kromozom olgularında ayrı ayrı tüm kromozomlar üzerinde perisentrik içerik ile fenotip etki arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır (Şekil 2.3). Bazı olgularda *marker* kromozomların ökromatin içerik taşısa bile normal fenotip sergileyebileceği gösterilmiştir (4, 48). Bu yüzden her bir perisentrik bölge için klinik etki göstermeyecek özel kromozomal bölge aralığı

bulunmaktadır (bkz. Şekil 2.3). Bununla birlikte klinik anormalliklere yol açabilen ve sentromerin belirli bir uzaklığından başlayan dozaj-duyarlı bölgeler bulunmaktadır.



Şekil 2.3: Kromozomlar üzerinde sMC'lerin köken aldığı bölgeler ve klinikle ilişkilendirilen bölgeleri. Yeşil renk ile gösterilen bölgeler klinik bulgu görülmeyen,

kırmızılar ise klinik bulgu bildirilmiş bölgelerdir. Farklı bildirimler için yan yana iki şerit kullanılmıştır. Net olarak tanımlanamamış bölgeler soru işareti (?) ile gösterilmiştir (Liehr ve diğ.'nden alınmıştır) (4).

Kromozomal dengesizliğe yol açan materyalin büyüklüğü önemli olduğu gibi, kaç kopya bulunduğu da önemlidir. Literatürde bazı olgularda aynı bölgenin üç kopya bulunması klinik bulgu göstermezken dört kopya bulunmasının spesifik bir sendroma yol açtığı gösterilmiştir (trizomi 18p - tetrazomi 18p) (49, 50). *Marker* kromozomlarda kopya sayısı kazanımı üç kopya ile altı kopya arasında değişebilmektedir (51).

2.3.2.2. Mozaisizm

Marker kromozomlu olgularda yaklaşık %50 oranında mozaisizm olduğu bilinmektedir. Emanuel sendromu, Cat Eye sendromu ve tetrazomi 18p sendromu hastalarında mozaisizm nadir görülürken; Pallister-Killian sendromu hastalarında özellikle periferik kanda mozaisizm çok daha yüksek oranda görülür. Akrosentrik kromozomlardan köken alan sSMC olgularında %28 oranında mozaisizm saptanırken, bu oran non-akrosentrik kromozom kökenli sSMC'lerde %82'dir (52). Neosentrik sSMC'lerde de bu oran non-akrosentrik kökenli sSMC lehine daha sıktır (%58-%24). Turner sendromu karyotipine sahip sSMC olgularında mozaik karyotip (45,X/46,X,+mar) saptanma yüzdesi %76'dır (52, 53).

Somatik mozaisizm görülen olguların büyük çoğunluğunda belirgin bir klinik bulgu saptanamamaktadır. Bunun nedeni farklı dokulardaki mozaisizm oranının pratik olarak saptanamıyor oluşu ve bu oranın değişkenlik göstermesidir. Nadir olarak birkaç olguda mozaikliğe bağlı olarak değişen klinik özellikler bildirilmiştir (52). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde sSMC olgularında mozaisizmin araştırılması klinik izlemin değerlendirilmesi ve özellikle de prenatal tanıda genetik danışmanlık verilmesi açısından önemlidir (52, 53).

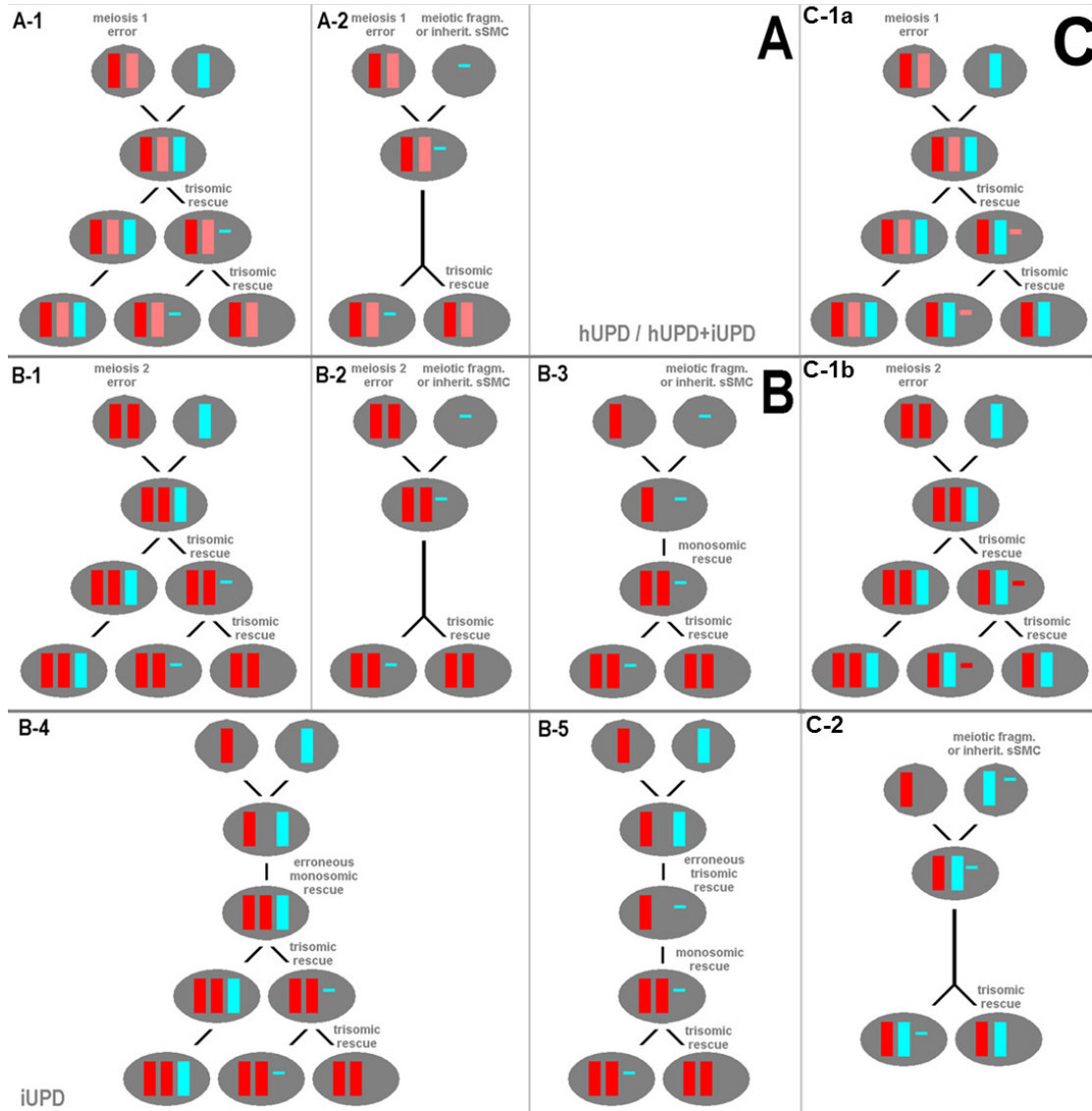
2.3.2.3. Uniparental Dizomi (UPD)

UPD, bir homolog kromozom çiftinin tamamının veya bir parçasının tek ebeveynden aktarılmasıdır. İlk kez Engel tarafından 1980 yılında tanımlanmış ve 1987 yılında moleküler yöntemler ile gösterilmeye başlanmıştır (54, 55). Günümüzde UPD'ye sebep olan birçok mekanizma tanımlanmıştır. En yaygın bilinen mekanizma mayotik hatalardır (Şekil 2.4). Mayoz I'de oluşan hata heterodizomi, mayoz II'de oluşan hata izodizomiye sebep olmaktadır. Heterodizomi (hUPD), homolog kromozom çiftinin aynı ebeveynden aktarılmasıdır. İzodizomi (iUPD) ise ebeveynlerden birinden bir kromozomun birbirinin aynısı olan iki kopyasının aktarılması olarak tarif edilir. Kromozom bütünlüğü açısından incelendiğinde ise tüm kromozom UPD' si (komplet UPD) ya da kromozomun bir parçasına ait UPD (segmental UPD) olarak sınıflandırılabilir.

Diğer nadir UPD mekanizmaları; monozomik homologun kendini eşlemesi (monozomiden kurtulma), trizomik homologlardan birinin kaybedilmesi (trizomiden kurtulma), *marker* kromozomun mitotik düzeltmeleri, Robertsonian tipi translokasyonlara bağlı trizomilerin düzeltilmesidir (56). Bu mekanizmalar gametogenez ve erken embriyogenez safhalarında sSMC oluşumuna yol açabilmektedir.

Günümüzde UPD ile bazı spesifik sendromlar ilişkilendirilmiştir. Bu sendromlardan bazıları geçici neonatal diabet (paternal UPD6), Silver-Russell sendromu (maternal UPD7), Beckwith-Wiedemann sendromu (paternal UPD11), Prader-Willi sendromu (maternal UPD15), Angelman sendromu (paternal UPD15) dur (56, 57).

Marker kromozom olgularında en sık hUPD ve iUPD birlikteliği görülürken bunu komplet iUPD, komplet hUPD ve segmental iUPD izlemektedir. En sık 6,7,14,15,16 ve 20. kromozomların UPD'si bildirilmiştir. Ancak bunun nedeni yukarıda belirtilen UPD ile ilişkilendirilmiş sendromların daha sık araştırılması olabilir. Çalışmalar maternal UPD'nin paternal UPD'den 9 kat daha sık olduğunu göstermektedir. *Marker* kromozom ve UPD birlikteliği nadir olarak görülmektedir (56-59). Literatürde yaklaşık 50 olguda UPD ile birlikte görülen sSMC varlığı bildirilmiştir (2).



Şekil 2.4: UPD mekanizması ile sSMC oluşumunun Şematik sunumu. Kırmızı ve pembe renkler anneye, mavi renk babaya ait kromozomları gostermektedir. **A)** Heterodizomik ve izo/heterodizomik UPD'li sSMC oluşum mekanizmaları. **B)** İzodizomik UPD'li sSMC oluşum mekanizmaları. **C)** UPD'siz sSMC kalıtımı.

Meiosis 1 error: mayoz 1 hatası, *meiosis 2 error:* mayoz 2 hatası, *meiotic fragm. or inherit. sSMC:* mayotik fragman veya kalıtılan sSMC, *monosomic rescue:* monozomiden kurtulma, *erroneous monosomic rescue:* monozomiden hatalı kurtulma, *trisomic rescue:* trizomiden kurtulma (Liehr ve diğ'nden alınmıştır) (57).

2.4. sSMC Görülme Sıklığı

Yapılan prenatal tanı girişimlerinde sSMC saptama sıklığı %0.075, herhangi bir USG anomalisi bulunan prenatal olgularda sSMC sıklığı %0.204 olarak bulunmuştur (1). Yenidoğanlarda ise bu oran %0.044'tür (1). Prenatal dönem ile yenidoğanlar arasındaki bu farkın nedeninin sSMC saptanan gebeliklerin %30-50 oranında sonlandırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (60, 61). Sağlıklı anne veya babadan kalıtılan *marker* kromozomun tespit edildiği gebelikler genellikle devam ettirilirken, *de novo* sSMC tespit edilen gebeliklerin %50'ye yakını sonlandırılmaktadır. İleri anne yaşı *marker* kromozomlu çocuk sahibi olmak için bir risk faktörüdür ve fetal USG'de saptanan patolojiler nedeniyle yapılan invazif prenatal tanı işlemleri sonrası *marker* kromozomlar saptanabilmektedir (62). Etkilenmiş fetüslerin terminasyonu veya *marker* kromozomlu gebeliklerde %4.4 oranında spontan düşük gelişmesi prenatal ile postnatal sSMC saptanma yüzdeleri arasındaki farkı açıklamaktadır (63).

Çalışmalar *marker* kromozomların yaklaşık %30 oranında bir ebeveyninden kalıtıldığını, %70 oranında ise *de novo* olarak saptandığını göstermektedir. Kalıtılan olguların %98'inin, *de novo* olguların ise yaklaşık %70'inin klinik olarak normal olduğu gösterilmiştir. *de novo* sSMC'nin fenotipi etkileme riski eğer 13, 14, 21 veya 22. kromozomlardan kaynaklanıyorsa %7, non-akrosentrik kromozomlardan kaynaklanıyorsa %28'dir (9, 64). Prenatal saptanan sSMC olgularının ise yaklaşık olarak %16'sı fenotipi etkilemektedir (61, 65). Bu bulgular ışığında yeryüzünde 7 milyar insan yaşadığını varsayarsak yaklaşık 3 milyon kişi sSMC taşıyıcısıdır ve bunların içerisinde çoğu klinik olarak normal olan yaklaşık 2.4 milyon bireyin böyle bir genetik durumun taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Bu bireylerin ailede başka bir kromozom anomalisi taşıyıcılığı endikasyonu ile karyotip analizi yapıldığında tanı alma olasılıkları vardır (2). Farklı çalışma gruplarında tespit edilen sSMC görülme sıklığı tablo 2.1' de sunulmuştur.

Tablo 2.1: Farklı çalışma gruplarında belirlenen sSMC görülme sıklığı (Liehr ve Weise'nin 2007'de yaptığı çalışmadan derlenmiştir) (1).

Çalışılan popülasyon	Olgu sayısı	sSMC'li olgu	Yüzdesi
Prenatal tanı (genel)	688.030	514	0.075
USG anomali+prenatal tanı	4.409	9	0.204
Yenidoğan dönemi	121.694	54	0.044
Sağlıklı erişkinler	1.405	1	0.071
İnfertilite			
Erkekler	21.841	36	0.165
Kadınlar	9.165	2	0.022
Gelişimsel gecikme / Zihinsel yetersizlik	69.332	200	0.288

İnfertilite sorunu olan bireylerde %0.125 oranında *marker* kromozom taşıyıcılığı olduğu bilinmektedir (66, 67). Bu oran infertilite olgularında sSMC taşıyıcılığı olasılığının topluma göre 3 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Liehr ve Weise'nin 30.510 infertilite olgusu üzerinde yaptıkları çalışmada sSMC taşıyıcılığının erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 7.5 kat daha fazla (%0.165 / %0.022) olduğu gösterilmiştir (1).

Marker kromozomların başka klinik bulgu oluşturmadan yalnızca infertiliteye neden oluş mekanizması tam olarak aydınlanmamıştır. sSMC'lerin spermatogenez ve fetal gelişimin üzerine etki ettiği ile ilgili hipotezlerde bulunmaktadır (63, 66, 68). Oracova ve arkadaşlarının periferik kanında %100 sSMC taşıyan normal sperm sayılı bir erkek olgu üzerinde yaptıkları çalışmada, sperm hücrelerinin %26'sında ve fertilize embriyonun %42'sinde sSMC varlığı gösterilmiştir (69). Bu bulgu erkek germ hücrelerinde *marker* kromozomlara karşı evrimsel bir koruma mekanizması hipotezini desteklemektedir (70). Erkek infertilite olguları üzerinde yapılan çalışmalarda oligospermisi olan olgularda %7 oranında *marker* kromozoma rastlanırken, azospermi olgularında bu oran %1'dir (71). sSMC taşıyıcısı kadın infertilite olgularında ise

tekrarlayan düşükler ve primer ya da sekonder amenore (prematür overyan yetmezlik-POF) izlenmektedir (67, 72). İnfertilite olgularında *marker* kromozom kökeninin %78 oranında akrosentrik kromozomlar olduğu ve bunların içerisinde de en sıklıkla 14. ve 15. kromozomların yer aldığı belirlenmiştir (67).

Gelişimsel gecikme ve zihinsel yetersizlik olan hastalarda da *marker* kromozom varlığı tanımlanmıştır. Toplam 69.332 gelişimsel gecikme ve/veya zihinsel yetersizliği olan hastanın değerlendirildiği bir çalışmada yaklaşık olarak %0.3 oranında sSMC varlığı gösterilmiş ve bu oran genel popülasyondaki sSMC taşıyıcılığının yaklaşık 7 katı olduğu saptanmıştır (1).

2.5. Marker Kromozomların Kökeni

Marker kromozom olgularının birçoğunun klinik bulgu göstermemesi nedeniyle tüm sSMC'lerin kromozomal kökenleri hakkında net bir bilgiye ulaşmak mümkün değildir. Ancak şimdiye kadar yapılan birçok çalışmadan elde edilen veriler *marker* kromozomların en sıklıkla 15. kromozom (%30) ve 22. kromozomdan (%20) köken aldığını göstermektedir. Genel olarak *marker* kromozomlar en sıklıkla akrosentrik kromozomlardan köken almaktadır (%60). Non-akrosentrik kromozomlar içerisinde 12. kromozom (%9) ve 18. kromozom (%7) ilk sıralarda yer alırlar. Kalan %34'lük kısım diğer kromozomlar arasında dağılmaktadır. Literatürde her kromozom için bildirilmiş *marker* kromozomlar bulunmaktadır (2).

sSMC olguları içerisinde özel bir grubu Turner sendromu karyotipli (46,X,+mar) olgular oluşturmaktadır. Bu hastalarda *marker* kromozomlar %69 X, %30 Y kromozomundan kaynaklanmaktadır. sSMC(X)'ler genellikle *ring* kromozom yapısında bulunurken sSMC(Y)'ler *inverted* duplike ya da izodisentrik yapıda bulunmaktadır (45). Çok nadir olarak da (%1) Turner sendromu karyotipine ek olarak diğer otozomlardan kaynaklanan sSMCler gösterilmiştir (73-75).

Literatürde bazı hastalarda birden çok *marker* kromozom varlığı da gösterilmiştir. En sıklıkla iki farklı sSMC'ye sahip olgular (48,XN,+mar1,+mar2) bildirilmekle birlikte yedi farklı *marker* kromozoma kadar olan olgular (53,XN,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7) da bildirilmiştir (76, 77). Genel olarak çoklu sSMC olgularında diğer sSMC olgularına göre kromozom kökeni ve oluşum şekilleri olarak farklı bir dağılım söz konusudur. Bu hastalarda sSMC kaynağı olarak 15. ve 22. kromozomlar yerine 6. kromozom öne çıkmaktadır ve *ring* kromozom yapısı daha sık görülmektedir (78). Birden çok *marker* kromozom oluşumu hakkında, gametogenez veya embriyogenez sırasında farklı kromozomlardan kaynaklanan parçaların tek sSMC şeklinde değişim geçirmesi veya normalde degrade olması gereken artık haploid pronükleustan zigot içerisine transfeksiyon olması şeklinde hipotezler bulunmaktadır (65, 79).

2.6. *Marker* Kromozomlarda Kalıtım

sSMC'lerin büyük bir kısmı (%70) *de novo* olarak oluşmakla birlikte %30'u ailesel kalıtım gösterirler (2). Bu nedenle sSMC oluşumunun büyük oranda gametogenez veya erken embriyogenez safhasında meydana geldiği düşünülmektedir. Prenatal dönemde saptanan *marker* kromozomların çoğu ileri anne yaşı olan gebeliklerde saptanmıştır. Bunun nedeni mayotik ayrılmama olayının ileri anne yaşı olan gebeliklerde artış göstermesidir (80).

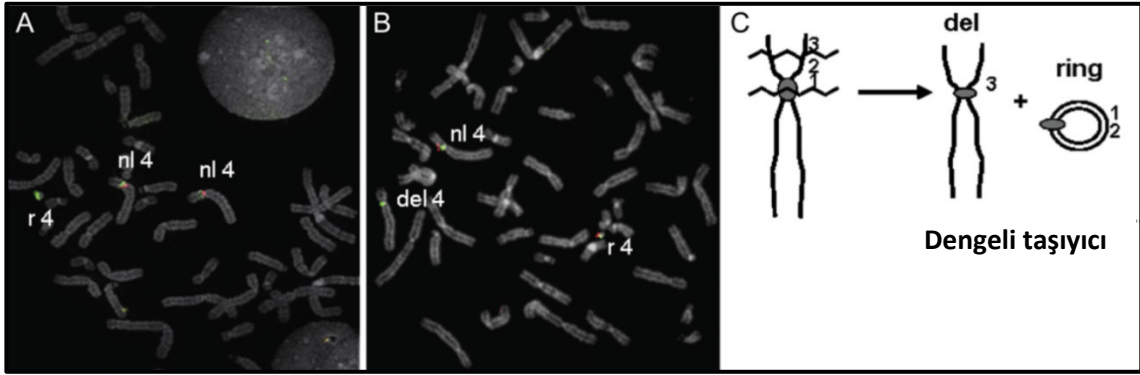
Marker kromozomların ağırlıklı olarak (2/1 oranında) maternal kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Bu oran non-akrosentrik kromozomlardan kaynaklanan *marker* kromozomlarda biraz daha yüksektir (Tablo 2.2). Diğer bir deyişle akrosentrik kaynaklı *marker* kromozomlar erkek ve dişi mayoz aşamalarında kaybolmadan kalmayı ve bir sonraki nesle aktarılmayı daha iyi başarırlarken, non-akrosentrik kaynaklı olanlar bu aşamalarda daha fazla problemle karşılaşmaktadır (58). Ailesel veya *de novo marker* kromozomların infertiliteye yol açabileceği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sSMC varlığında gametlerde anöploidilere karşı evrimsel seçilimin infertilite sorununa yol açabileceğini düşündürmektedir. *Marker* kromozomlar veya başka herhangi bir

kromozomal dengesizlik bulunması mayoz I safhasında kromozomal eşleşme hatalarına, bu da fertilité sorunlarına yol açmaktadır (81). Spermatogenez sırasında ana mekanizma fazla kromozomlu olmayan gametlerin seçilimi yönündedir (67). Ayrıca öngörülen diğér bir mekanizma da sSMC taşıyan spermin ağırlık etkisinden dolayı normal sperme göre yavaş kalması ve fertilizasyon başarısının daha düşük olmasıdır. Buna benzer bir etki gebeliklerdeki cinsiyet yüzdeleri üzerinde yapılan bir kohort çalışmasında öne sürülmüş ve Y kromozomu taşıyan spermin, X kromozomu taşıyan spermden daha hızlı hareket etmesine bağılı olarak fertilizasyon oranlarının değıştiğı düşünölmüştür (82).

Tablo 2.2: Ailesel kalıtılan sSMC'lerin kromozomal ve parental kökenine göre oranları. Liehr (*Small Supernumerary Marker Chromosomes*)'den alınmıştır (3).

Kromozom kökeni	Maternal kökenli	Paternal kökenli	Oran
1-12; 16-20; X, Y	37	14	2.6/1
13-15; 21-22	116	71	1.6/1
Toplam	153	85	1.8/1

Ailesel sSMC'ler genellikle fenotipe etki etmezler. Fakat nadir de olsa belirli mekanizmalar ve değışiklikler sonucunda bir sonraki kuşığı etkileme ihtimalleri vardır. Bu mekanizmalardan birincisi "McClintock mekanizması" olarak bilinen mekanizma ile meydana gelen sSMC'lerin aktarılmasıdır. Bu mekanizma ile bir bireyde *ring* kromozomu oluşurken, *marker* kromozomun köken aldığı kromozomun bir homologunda delesyon oluşur. *Ring* kromozom ve delesyonlu homolog kromozom dengeli taşıyıcılık yaratır. Eğer bu birey çocuğına *ring* kromozomla beraber iki normal homolog kromozom aktarırsa denge bozulur ve klinik bulgular ortaya çıkabilir (5) (Şekil 2.5). İkinci mekanizma sSMC mozaizminin kaybıdır. Babada mozaik olarak bulunan ve fenotipe etki etmeyen sSMC'nin çocuğında mozaikliğın kaybı sonucu klinik bulguların ortaya çıktığını gösteren yayınlar bulunmaktadır (83). Ailesel sSMC aktarımında fenotipi etkileyen diğér mekanizmalar, aktarılan sSMC'nin kopya sayısında artış (duplikasyon) olması ve aktarım sırasında sSMC'de ikincil yeniden düzenlemelerin oluşabilmesidir (84, 85).



Şekil 2.5: McClintock mekanizması ile sSMC aktarımı sonucu hastalık oluşan bir olgu örneği. **A)** Klinik bulgular gösteren olguda iki normal 4. kromozom (nl 4) ve anneden aktarılan 4. kromozom kökenli bir *ring* kromozom (r 4) tespit edilmiştir. **B)** Olgunun annesinde normal bir 4. kromozom (nl 4), delesyon içeren bir 4. kromozom (del 4) ve bu delesyonlu 4. kromozomdan köken alan bir *ring* kromozom (r 4) tespit edilmiştir. Annede böylelikle dengeli taşıyıcılık bulunmaktadır. **C)** McClintock mekanizması ile dengeli taşıyıcılığın şematik gösterimi (Baldwin ve diğ.'nden alınmıştır) (5).

2.7. Marker Kromozom Tanısına Yaklaşım

2.7.1. Marker Kromozom Tanısında Kullanılan Yöntemler

Marker kromozomun ilk tespiti genellikle sitogenetik bantlama yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. En sık kullanılan bantlama yöntemleri G-bantlama (tripsin kullanılarak Giemsa ile boyanan G bantları), C-bantlama (baryum oksit kullanılarak Giemsa ile boyanan C bantları) ve gümüş boyama (NOR-*Nucleolar organizing region*) yöntemleridir. İlk basamak olarak kullanılan G-bantlama yöntemi ile sSMC varlığı tespit edildikten sonra *marker* kromozomun heterokromatin içeriğini belirlemek ya da akrosentrik ve non-akrosentrik kaynaklı sSMC'lerin ayrımını yapmak amacıyla C-bantlama ve gümüş boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bantlama yöntemleri ile mozaizme rastlanması durumunda, mozaizmin gerçek oranını tespit etmek amacıyla farklı dokulardan örnek alınarak incelenmelidir. Pratikte postnatal olgular için en sık

kullanılan doku örneği fibroblast kültürüdür. Ayrıca bir olguda sSMC saptanması halinde ailenin diğer bireyleri (anne, baba, kardeşler) de incelenerek sSMC taşıyıcılığı belirlenebilmektedir.

Sitogenetik analizler ile sSMC varlığı tespit edildikten sonra *marker* kromozomun kaynağını, ökromatin içeriğini ve oluşum şeklini belirlemek amacıyla moleküler sitogenetik yöntemler uygulanmaktadır. sSMC karakterizasyonu için moleküler sitogenetik analizlerde kullanılan FISH yöntemleri; *whole chromosome painting* (WCP), multipleks FISH (M-FISH), spektral karyotipleme (SKY-FISH), mikrodiseksiyon ve *reverse* FISH, interfaz FISH, (sub)sentromer-spesifik *multicolor* FISH (subcenM-FISH) ve *multicolor banding* (MCB) dir.

Moleküler sitogenetik yöntemler içerisinde kullanılmakta olan en güncel yöntem *array* temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH - *array comparative genomic hybridization*)'dur. Bu teknik, genom boyu oluşmuş kopya sayısı değişikliklerinin yüksek çözünürlük ile analizini sağlamaktadır. Farklı floresan boyalar ile boyanmış hasta ve referans DNA örnekleri özel hazırlanmış cam slaytlar (çip) üzerindeki DNA fragmanlarına hibridize edilerek karşılaştırmalı olarak genomdaki kayıp ve kazançlar belirlenir. aCGH analizinde kullanılan DNA fragmanları bakteri yapay kromozomu (*Bacterial Artificial Chromosome*-BAC) ya da sentetik oligonükleotidler kullanılarak hazırlanır. Diğer bir *array* temelli yöntem SNP *array* yöntemidir. Bu teknikte kullanılan mikrodizin çipleri DNA dizileri arasındaki tek nükleotid farklılıklarına (SNP-*single nucleotide polymorphism*) özgün probların düzenlenmesi ile oluşturulmuştur. Analiz edilen örnek ile referans hibridizasyonlar arasındaki sinyal yoğunlukları karşılaştırılarak kayıp kazançlar tespit edilir. SNP arrayler, polimorfik alele özgün prob kullanılarak hazırlandığından kopya sayısı değişikliklerini saptamanın yanı sıra genotipleme ve UPD tespitine de olanak sağlamaktadır.

Array temelli yöntemler konvansiyonel sitogenetik yöntemlerden ve FISH analizlerinden daha yüksek çözünürlükte analiz olanağı sağlamaktadır. Bazı merkezlerde kromozomal anomalilerin tespitinde ilk basamak tanı yöntemi olarak kullanılmaya

başlanmıştır (86). Ancak kromozomal anomalilerin tespiti ve *marker* kromozomların karakterizasyonunda bazı dezavantajlar içermektedir. Öncelikle *array* yöntemlerinde, belirlenen kopya sayısı artışının sSMC varlığına bağlı mı yoksa genom içerisindeki herhangi bir duplikasyona, insersiyona ya da dengesiz translokasyona mı bağlı olduğu ayırt edilemez. Ayrıca düşük yüzdeli mozaizmin ve mozaiklik oranının saptanmasında da *array* yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Diğer bir dezavantajı da zengin heterokromatin içerikli sSMC'lerin karakterize edilmesinde problem yaşanabilmesidir (3). Bu nedenlerle sSMC tespitinde ve karakterizasyonunda konvensiyonel sitogenetik yöntemler, FISH analizleri ve *array* yöntemleri belirli bir sistematik içerisinde birlikte kullanılmalıdır.

Marker kromozomunun kökeni ve ayrıntılı yapısı tespit edildikten sonra uygulanabilecek bir diğer basamak UPD testidir. UPD testi için mikrosatellit analizi, metilasyona spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (*methylation-specific PCR*) veya MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) gibi moleküler genetik yöntemler uygulanmaktadır (87).

2.7.2. sSMC Karakterizasyon Aşamaları

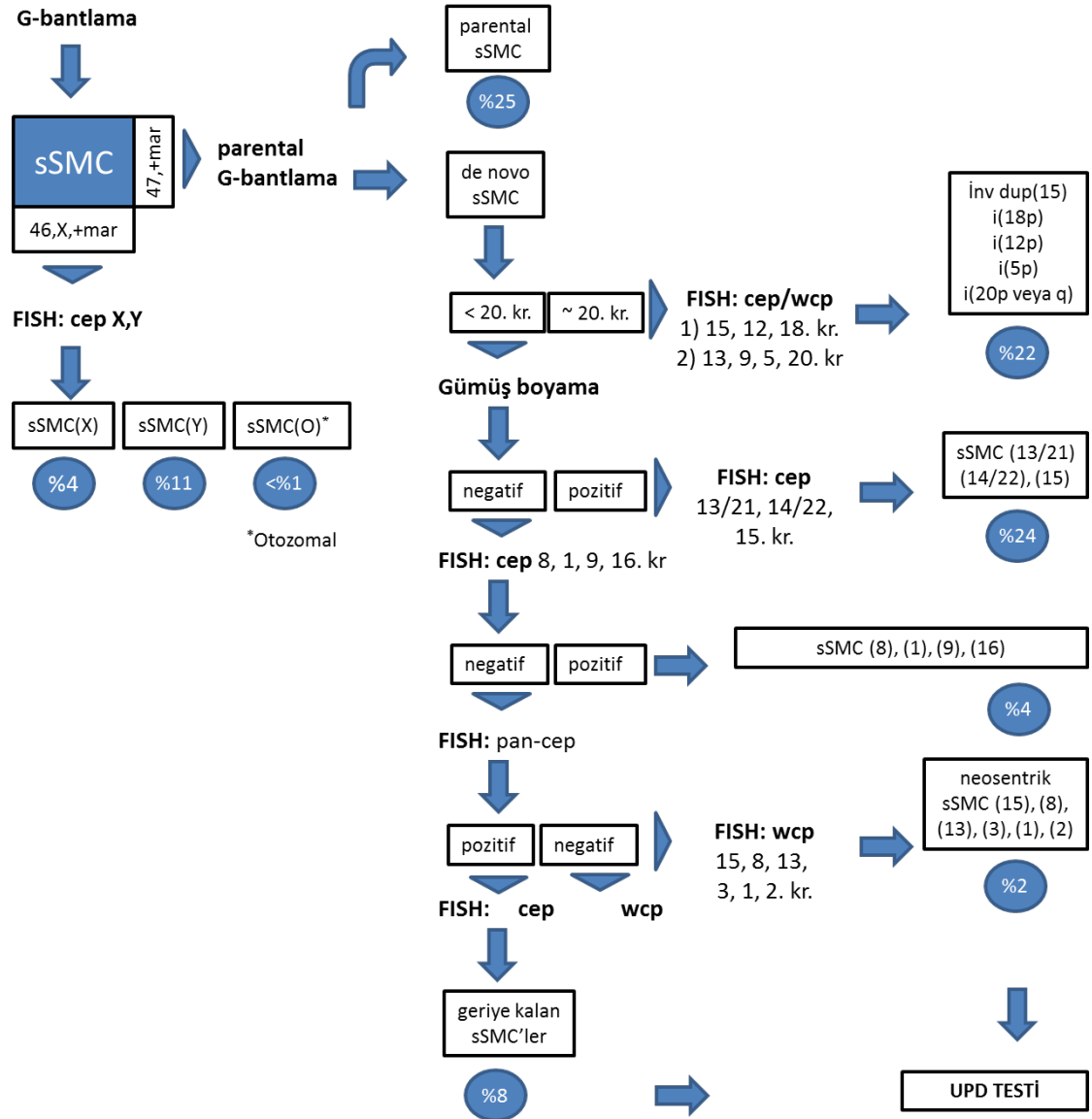
Rutin bir moleküler sitogenetik laboratuvarında aşağıdaki basamaklar izlenerek *marker* kromozomların önemli bir kısmının karakterizasyonu yapılabilmektedir. Şekil 2.6'da sSMC karakterizasyonu için önerilen basamaklar yer almaktadır. Bu basamaklar şunlardır:

- 1) G-bantlamada 45,X/46,X,+mar karyotipi saptanırsa X ve Y kromozomlarının sentromerleri için spesifik problemler ile FISH analizi uygulanmalıdır. Bu sSMC'lerin %99.5'inden fazlası bu şekilde karakterize edilir. Eğer sSMC X kromozomundan kaynaklanıyorsa XIST bölgesine spesifik problemler kullanılarak klinik süreç değerlendirilebilir. Y kromozomundan kaynaklanan sSMC varlığında ise gonadoblastom riski araştırılmalıdır. 47,XN,+mar karyotipi saptanırsa 2. basamağa geçilir.

- 2) sSMC'nin *de novo* olup olmadığı araştırılmak üzere parental G-bantlama uygulanır. sSMC'nin kalıtıldığı saptanırsa 3. basamağa, *de novo* olduğu saptanırsa ya da parental kaynağı belirlenemezse 4. basamağa geçilir.
- 3) Kalıtılan sSMC'ler için genetik danışma verilmeli ve prenatal olgular ayrıntılı USG ile takip edilmelidir. Kalıtılan olgular çok yüksek olasılıkla normal fenotipe sahiptir ancak nadir de olsa klinik bulgu gözlenebilir. Bu nedenle sSMC kaynağının belirlenmesi önerilmektedir ve 4. basamaktan devam edilir.
- 4) Saptanan sSMC aynı metafaz sahasındaki 20. kromozoma yakın büyüklükte ise ilk önce *inv dup(15)*, izokromozom 18p ve izokromozom 12p incelenmelidir. Bunun için ilgili kromozomlara özgün sentromerik proplar (cep) veya *whole chromosome painting* (WCP) probları kullanılır. sSMC kaynağı belirlenirse 10. basamağa geçilir; belirlenemezse 13, 9, 5 ve 20. kromozomlar test edilir. Eğer bunların sonucu da negatifse 5. basamağa geçilir.
- 5) Gümüş boyama pozitif sonuçlanırsa akrosentrik kromozomların sentromerlerine özgün cep13/21, cep14/22 ve cep15 probları kullanılarak sSMC'nin kökeni araştırılır. Köken belirlenirse 10. basamağa, belirlenemezse 6. basamağa geçilir.
- 6) En sıklıkla görülen non-akrosentrik kromozom kaynaklı sSMC'ler olan 8, 1, 9 ve 16. kromozomlar için sentromerik proplar uygulanır. Köken saptanırsa 10. basamağa, saptanamazsa 7. basamağa geçilir.

- 7) Bu basamağa kadar köken belirlenemediyse sSMC neo-sentromerik olabilir. Bu aşamada pan-sentromerik (pan-cep) problemler kullanılır. sSMC olguların yaklaşık %3'ünde alfa-satellit DNA bulunmaz, bu nedenle test sonucu negatif bulunabilir. Alfa-satellit DNA saptandıysa 8. basamağa, saptanamadıysa 9. basamağa geçilir.
- 8) Alfa-satellit DNA içeren sSMC'ler 11 farklı kromozomdan köken alıyor olabilir. İlk önce 19. kromozom için WCP probe uygulanır. Daha sonra sırasıyla 2, 3, X, 17, 7, 4, 6, 11, 10 ve Y kromozomları için sentromerik problemler uygulanır ve 10. basamağa geçilir.
- 9) Neo-sentromerik sSMC'nin kökenini belirlemek için bu basamakta sırasıyla 15, 8, 13, 3, 1, ve 12. kromozomlar için WCP problemleri ile FISH analizi yapılır. Olguların yaklaşık %75'inde neo-sentromerik sSMC'nin kökeni bu basamak itibarıyla belirlenmiş olur. Eğer köken belirlenemediyse 10. basamağa geçilir.
- 10) *De novo* sSMC olgularının %5-10 kadarında UPD bildirildiğinden bu son basamakta UPD testi uygulanmalıdır.

Yapılan çalışmalar bu basamaklar sırasıyla uygulandığında sSMC'lerin %92'sinin karakterize edilebildiğini göstermektedir. Daha ayrıntılı analiz için ileri FISH yöntemleri ve array analizleri uygulanmaktadır (3). Yukarıda belirtilen basamaklar rutin moleküler sitogenetik laboratuvarlarında uygulanması için önerilen karakterizasyon basamaklarıdır. Çalışmamızda bu basamaklardan bazıları atlanarak ileri analiz yöntemleri uygulanmıştır.



Şekil 2.6: sSMC karakterizasyonunda takip edilmesi önerilen basamaklar. Mavi daireler içerisinde ilgili basamakta karakterize edilmesi beklenen sSMC yüzdesi gösterilmiştir Liehr (*Small Supernumerary Marker Chromosomes*)’den derlenmiştir (3).

pan-cep: pan-sentromerik prob, cep: sentromerik prob, wcp: *whole chromosome painting*.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Hastalar ve Klinik Değerlendirme

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2002-2008 yılları arasında başvuran ve çeşitli endikasyonlarla periferik kanından kromozom analizi yapılan 6045 hasta arasından “*marker* kromozomu varlığı” tanısı alan olgularda gerçekleştirilmiştir. *Marker* kromozom varlığı gösterilmiş toplam 17 hastadan, yapılması planlanan analizler için genetik materyaline ulaşabildiğimiz 7 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'mızda görülen ve gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, dismorfik bulgular gibi özellikleri olan bu hastaların ayrıntılı muayeneleri gerçekleştirildi, aile ağaçları çizildi ve fotoğrafları çekildi. Hastaların anne ve babaları da değerlendirildi ve kromozom analizleri yapıldı.

Hastalarımızda kromozom analizi sonucu ortaya konan *marker* kromozomların orijininin belirlenmesi amacıyla FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) ve SNP array (*Single Nucleotide Polymorphism* array) analizleri yapıldı. Kromozom analizleri, FISH analizleri (*Whole Chromosome Painting* - WCP) ve SNP array analizleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda; subcenM-FISH (*Subcentromer-specific multicolor* FISH) analizi Almanya'da Jena Üniversitesi İnsan Genetiği Bölümü, Moleküler Sitogenetik Departmanı'nda yapıldı.

Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve tıbbi etik açısından uygun bulunmuştur:

(Proje No: LUT 12/124, Karar No: LUT 12/124 – 15).

3.2. Periferik Kan Örneklerinden Kromozom Analizi

Klinik muayene ve değerlendirmeleri yapılan hastalardan ve anne-babalarından sitogenetik analiz için sodyum heparinli tüplere 3-5 cc kan alındı. Alınan kan örnekleri kültüre edildi, elde edilen metafaz plakları değerlendirildi. G-bantlamanın ardından kromozom analizi gerçekleştirildi ve karyotipleme yapıldı.

Kromozom analizi ve G-Bantlama Uygulaması

1. Periferik kan kültür ortamı hazırlanışı: RPMI-1640 Medium 100 ml içerisine Fetal Bovine Serum (25 ml), Fitohemaglutinin (2 ml), L-Glutamin (2 ml), Gentamisin (0,2 ml) eklenerek oda sıcaklığına getirilir.

2. Oda sıcaklığına gelen RPMI-1640 steril kültür tüplerine 10'ar ml koyulur. Bu tüplere 0,6-0,8 cc periferik kan örneğinden eklenir ve tüpler ağızları kapatılarak 37 °C'deki etüve yerleştirilerek 72 saat bekletilir.

3. Harvesting işlemi: 72 saat sonra etüvden çıkartılan tüpler hafifçe karıştırılır ve tüplere oda sıcaklığında 100 µl colcemid ilave edilir. Tüpler tekrar karıştırılarak 37 °C'deki etüve yerleştirilir. 30 dakika sonra tüpler 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

4. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve vortekste tüplere 37 °C ısıya getirilmiş 10 ml KCl eklenerek tüpler tekrar etüve yerleştirilir. 25 dakika etüvde tutulan tüpler 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılarak çökelti üzerine vortekte 10 ml, -20 °C bekletilmiş fiksatif damla damla eklenir. 1 gece 2-8 °C bekletilen tüpler ertesi gün 10 dakika santrifüj edilirler. Süpernatant atılır ve çökelti üzerine 7 ml fiksatif vortekste eklenir. Daha sonra bir kez daha santrifüj işleminden geçen tüplerden süpernatant atılır ve 5 ml fiksatif eklenir. Son santrifüj işlemi ile tüpler yayma aşamasına hazır hale gelirler.

5. Son fiksatif ekleme işleminden sonra tüpler santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve tüplerin içinde kalan çökeltiyeye birkaç damla fiksatif vortekste eklenir. Pipet yardımıyla tüp içerisinden alınan 1-2 damla materyal, kuru ve temiz bir lam üzerine damlatma veya püskürtme yöntemi ile yayılır. Kurumaya bırakılan preparatlar kuruduktan sonra 1 gece 60 C° de pasteur fırınında bekletilirler. Lama fikse olan kromozomlar boyama aşaması için hazır hale gelirler.

6. Bantlama: 0,4 gr tripsin 10 ml distile suda eritilerek 50 ml DB Buffer ile karıştırılır. Hazırlanan karışım şaleye aktarılır. 0,2 g/100 ml Metanol, Leishman Boyasından 1 birim, Gurr Buffer'dan 3 birim olacak şekilde karıştırılır. Hazırlanan boya bantlama işleminde kullanılır. Eskitme işlemi tamamlanmış preparatlar 6-10 sn şale

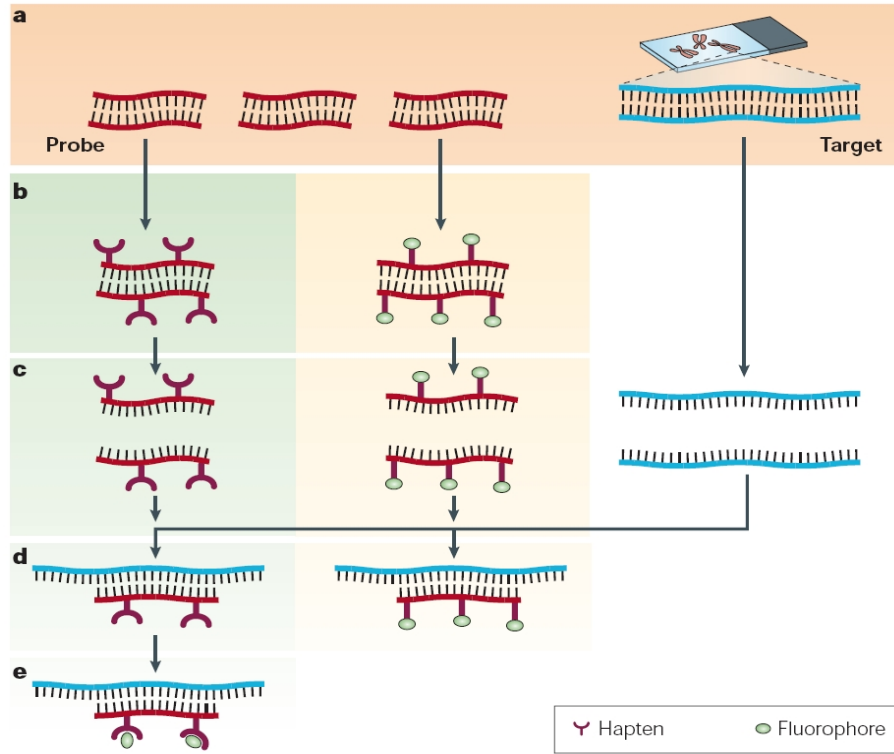
içindeki tripsinde bekletilir. Hızlı bir şekilde distile sudan geçirilen preparatlar üzerine 2-3 ml Lesihman boyasından dökülür. 3 dk boya ile muamele edilen preparatlar, distile sudan geçirilip, kurumaya bırakılır. Kuruyan preparatların bant kalitesi ışık mikroskopuyla kontrol edildikten sonra, preparatlar ksilen dolu şaleye konur. Preparatlar kuruduktan sonra, üzerine birkaç damla Entellan damlatılır ve lamel ile kapatılıp, yapıştırılır. Preparatlar karyotiplendirme için hazır hale gelir.

3.3. FISH Analizleri

Normal ve yüksek çözünürlüklü bantlama tekniklerinin geliştirilmesiyle kromozomlarda yaklaşık olarak 5 Mb'dan büyük olan delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon gibi kromozomal anomaliler belirlenebilir. Bununla birlikte kromozomal anomalilerin bantlama teknikleri ile tespit edilemeyecek kadar küçük olduğu durumlarda da FISH analizleri yapılmaktadır. FISH tekniği aynı anda hem hücresel, hem de moleküler düzeyde bilgi sağlayan bir tekniktir.

FISH analizi genel olarak şu basamakları içermektedir:

- Hedef DNA'nın bir slayt üzerine fiksasyonu. Hedef DNA hücre, nükleus, metafaz kromozomu veya sadece DNA olabilir.
- Prob DNA'nın işaretlenmesi: Direkt veya indirekt olabilir. Direkt işaretlemede kullanılan flörokromlar (Cy3, Cy5, Texas Red, FITC) mikroskop altında direkt görüntülenebilirken; indirekt işaretlemede kullanılan haptenlerin (biotin, digoxigenin) flöresan mikroskop altında görünür olabilmesi için bir antikor (anti-digoxigenin-rhodamine) ile tespit edilmesi gerekir (Şekil 3.1).
- Hedef ve prob DNA denatüre edilir. Probun kendisine homolog olan DNA sekansına hibridizasyonu sağlanır.
- Hedef ve prob DNA renatüre edilerek hibridizasyon sonrası yıkama aşamaları uygulanır.
- Karşıt boya (DAPI) ile kromozomlar görüntülenebilir hale getirilir ve coverslip ile slayt kapatılarak analize hazır hale getirilir.



Şekil 3.1: a) FISH yönteminin ana elemanları: DNA probu (*probe*) ve hedef sekansı (*target*). b) Hibridizasyon öncesi DNA probunun indirekt (sol panel) veya direkt (sağ panel) yöntem ile işaretlenmesi. c) İşaretlenmiş problemlerin ve hedef DNA'nın denatürasyonu. d) Hibridizasyon. e) İndirekt işaretlenmiş problemlerin tespit edilmesi. (Speicher ve diğ.'nden alınmıştır) (88).

FISH metodunun klinikte birçok uygulama alanı vardır. Kromozomal patolojilerinin belirlenmesi ve karakterize edilmesi (mikrodelesyon sendromları, subtelomerik delesyonlar, *marker* kromozomlar vb.), prenatal anöploidi taraması, preimplantasyon genetik tanı ve kanser dokusu çalışmaları en yaygın kullanıldığı alanlardır.

Bu çalışmaya alınan hastalara G-bantlama yöntemi ile *marker* kromozom tanısı konduktan sonra, öncelikle çeşitli WCP problemleri uygulanarak *marker* kromozomun kökeni araştırıldı. WCP, hangi kromozom için prob uygulanıyorsa o kromozomun

tamamını boyayarak analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Literatürde en sık görülen *marker* kromozomlar 15 ve 22'nci kromozomlardan köken aldığı için öncelikle bu kromozomların WCP'si uygulandı.

3.4. Genomik DNA'nın İzolasyonu

Marker kromozomu varlığı saptanan hastalara SNP mikroarray analizi yapılması planlandı. EDTA'lı tüplere 5-10 cc miktarında alınan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Amonyum Asetat (Tuzla çöktürme) yöntemi ile DNA izolasyonu:

1. 10 cc'lik EDTA'lı tüplerde gelen kan 50 ml'lik falcon tüpüne boşaltılır. Üzerine otoklavlanmış soğuk distile su eklenerek 50 ml'ye tatamamlanır ve elde kuvvetlice çalkalanır.
2. 1750 rpm'de 20 dk santrüfjüj edilen tüplerin dibinde oluşan süpernatant dökülür. Üzerine otoklavlanmış soğuk distile su eklenerek 45 ml'ye tamamlanır ve tüpün dibindeki pelet hafifçe çalkalanarak çözdürülür.
3. Tüpler 1900 rpm'de santrüfjüj edildikten sonra oluşan süpernatant dökülür. Her bir tüpe NLB (*Nuclei lysis buffer*) solüsyonu eklenir. Tüplerin kapakları kapatılarak kuvvetlice çalkalanır.
4. Tüplerin her birine 150 µl Proteinaz-K ve 200 µl %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ilave edilir. Tüpler vortekslenerek 16 saat süreyle 37 °C'deki etüvde bekletilir.
5. Etüvden çıkartılan tüplerin her birine 3 ml amonyum asetat eklenerek tüpler kuvvetlice çalkalanır ve 20 dk oda sıcaklığında bekletilir.
6. Tüpler 4000 rpm'de 20 dk santrüfjüj edilir. İçerisinde DNA olan süpernatant dipteki pelete dokunmadan pastör pipeti yardımı ile steril olan ikinci falcon tüpüne alınır, üzerine alkol eklenir ve çalkalanır.
7. DNA gözle görünür hale gelir ve pipet ucu yardımıyla toplanan DNA, içerisinde 400 µl TE Buffer (Tampon çözeltisi) bulunan ependorf tüplerine aktarılır.
8. Elde edilen DNA'lar, çözünmesi için bir gece daha 37 °C'lik etüvde bekletildikten sonra -20 °C'deki derin donduruculara kaldırılır.

3.5. SNP *Microarray* (Mikrodizin, Çip) Analizi

Microarray teknolojisi özel dizayn edilmiş çipler aracılığı ile tüm genomu görüntülemeyi ve analiz etmeyi sağlayan bir analiz yöntemidir. DNA *microarray*'i cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Yüzeye tutturulan bu DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanır. Analiz edilecek hasta örneklerinin bu problara hibridize edilerek flöresan yöntem ile taranması bu yöntemin temelini oluşturur. Spotlu çipler, oligonükleotid çipler, SNP çipler gibi farklı *microarray*'ler bulunmaktadır.

Bu çalışmada genom üzerindeki polimorfizm gösteren tek nükleotid (*single nucleotide polymorphism*; SNP) değişikliklerini taramaya yarayan Affymetrix® 250K SNP çip teknolojisi kullanıldı. Bu çiple genomda önceden tanımlanmış 250.000 tek nükleotid değişikliği tarandı. Eş zamanlı olarak hastaların anne ve babaları da SNP çipler ile analiz edilerek hastaların sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

SNP çip analizinde aşağıda belirtilen, Affymetrix şirketinin sağladığı protokol takip edildi.

a. Genomik DNA'nın hazırlanışı ve kesimi:

Kullanılacak genomik DNA, konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde seyreltilir. Seyreltilen DNA örneğinden 5 µl alınarak ependorf tüpüne aktarılır. Üzerine 9,75 µl deiyonize su, 2 µl NE tampon çözeltisi (10X), 2 µl BSA (Bovine Serum Albumin) (1mg/ml) ve 1 µl Nsp I kesim enziminden oluşan 14,75 µl'lik karışım eklenir. Thermal *cycler*da 37 °C→120 dk, 65 °C→20 dk, 4 °C→∞ programına konur. Bölümümüzde thermal *cycler* olarak Geneamp® PCR system 9700 cihazı kullanılmaktadır.

b. Ligasyon:

0,75 µl adaptör Nsp I (50 µM), 2,5 µL T4 DNA ligaz tamponu (10X) ve T4 DNA ligaz enziminden (400 U/µl) oluşan ligasyon karışımı kesimi tamamlanmış DNA örneğinin üzerine eklenir. Son hacim 25 µl (19,75+5,25) olur. Thermal *cycler*da 16 °C→180 dk, 70 °C→20 dk, 4 °C→∞ programına konur. Ligasyon sonrası her örneğin üzerine 75 µL deiyonize su eklenir.

c. PCR:

Kesimi ve adaptör ligasyonu yapılmış DNA ürününden 10 µl alınır. Üzerine 39,5 µl deiyonize su, 10 µl Taq PCR tamponu (10X), 20 µl GC-Melt (5M), 14 µl dNTP (her birinden 2,5 mM), 4,5 µl PCR primeri (100 µM) ve 2 µl Taq DNA polimeraz enziminden oluşan 90 µl'lik PCR karışımı eklenir. Her bir örnek için 3 ayrı PCR tüpü hazırlanır. Toplam 100 µl'lik karışım thermal *cycler*da 94 °C→3dk sonrası 94 °C→30sn, 60 °C→45 sn, 68 °C→15 sn (toplam 30 döngü), 68 °C→7dk, 4 °C→∞ PCR programına konarak amplifikasyon sağlanır. Elde edilen PCR ürününden 3 µl alınarak %2'lik TBE agoroz jelde 120 Volt'da bir saat yürütülür. Jelde yaklaşık olarak 200-1100 bp arasında ürün yığılımı olması beklenir.

d. PCR ürünlerinin saflaştırılması ve miktarının ölçümü:

Saflaştırma işlemi Qiagen MinElute® 96 UF plate kullanılarak yapılır. Her bir PCR tüpünün üzerine 50 µl deiyonize su eklenir. Tüpler üçe bölünerek *plate* üzerindeki kuyucuklara yüklenir (her kuyucuğa yaklaşık 50 µl). Vakum cihazı 800 mbar'a ayarlanarak plate 15 dk vakumlanır. Vakum sonrası tekrar her bir kuyucuğa 50 µl deiyonize su eklenerek aynı vakum işlemi tekrarlanır. Akabinde kuyucuklara 35'er µl su eklenerek *plate* 5 dk vortekslenir. Vorteks sonrası kuyucuklardaki PCR ürünleri 0.5 cc'lik ependorf tüplerine alınır. Her örnek için 9x35 µl saflaştırılmış PCR ürünü elde edilmiş olur. PCR ürünlerinin miktar ölçümü spektrofotometre ile yapılır. Bölümümüzde NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılmaktadır. OD ölçümü 90 µg/µl'nin üzerinde olmalıdır. Her bir örnek için elde edilen 315 µl PCR ürününün

Vacuum Drier'da suyu uçurularak fragmentasyon basamağı için gerekli olan 45 µl ürün elde edilir.

e. Fragmentasyon

Öncelikle purifiye edilmiş 45 µl PCR ürününün üzerine 5 µl 10X fragmentasyon tamponu eklenir. Daha sonra konsantrasyonu 2,5 U/µl olan fragmentasyon enzimi 0,05 U/µl'ye seyreltilir. Seyreltilmiş enzimden 5 µl karışıma eklenerek termal cyclera yüklenir ve 37 °C'de 35 dk, 95 °C'de 15 dk tutulur. Elde edilen üründen 4 µl alınarak %4'lük TBE agaroz jelde 120 Volt'da 30 dk yürütülür. Jelde ortalama 180 bp'ın altında ürün yığılımı olması beklenir.

f. İşaretleme

14 µl 5X TdT tamponu, 2 µl GeneChip® DNA labeling reagent ve 3,5 µl TdT enzimi (30 U/µl) karıştırılarak elimizdeki 50,5 µl'lik fragmente DNA'nın üzerine eklenir. Termal cyclarda 37 °C'de 4 saat, 95°C'de 15 dk tutulduktan sonra 4 °C'de bekletilir. Bir sonraki aşamaya hemen geçilmeyecekse işaretlenmiş örnekler -20 °C'de saklanır.

g. Hibridizasyon

İşaretleme sonrası elde edilen örneğe 12 µl MES (12x, 1,22 M), 13 µl DMSO (%100), 13 µl Denhardt's solüsyonu (50X), 3 µl EDTA (0,5 M), 3 µl HSDNA (10 mg/ml) ve 2 µl OCR 0100'den oluşan 190 µl'lik hibridizasyon karışımı eklenir. Toplam 260 µl'lik karışım 99 °C'de 10 dk ve 49 °C'de 1 dk bekletildikten sonra içerisinden 200 µl alınarak çipe yüklenir. 49 °C'deki hibridizasyon fırınına yerleştirilen çiplerin 60 rpm dönme hızında 16-18 saat süreyle hibridizasyonları sağlanır.

Hibridizasyon sonrası işlemler için *array holding* tamponu, streptavidin fikoeritin (SAPE) boyama ve antikor boyama çözeltileri hazırlanır. *Array holding* buffer için 8,3 ml MES stock buffer (12X), 18,5 ml 5M NaCl, 0,1 ml Tween-20 (%10) ve

73,1 ml distile su karıştırılır. SAPE ve antikor boyama çözeltileri için 800,04 µl su, 360 µl SSPE, 3,96 µl %3'lük Tween-20, 24 µl Denhardt's solüsyonu karıştırılıp 2 ayrı tüpe 594 µl konur. SAPE tüpüne 6 µl 1mg/ml'lik SAPE, antikor tüpüne ise 6 µl 0,5 mg/ml'lik biyotinlenmiş antikor eklenir. Hazırlanan bu çözeltiler fluidics yıkama istasyonuna yerleştirilerek sırasıyla yıkama, boyama ve tarama aşamalarına geçilir.

h. Yıkama, boyama ve tarama

Hibridizasyon fırınından alınan çiplerin içlerindeki solüsyon boşaltılarak 270 µl *array holding* tamponu yüklenir. Yıkama işlemi, Fluidics Station 450'de *GeneChip® Operating Software* (GCOS) 1.4 yazılımı kullanılarak yapılır. Çipler Fluidics cihazına yerleştirilir. GCOS programında sırasıyla her bir çipin kaydı yapılır, yıkama ve boyama basamaklarına geçilir. Ardından çipler GENEChip Scanner 3000 7G tarayıcısına yerleştirilir. Sonuçlar “.CEL” formatında otomatik olarak dosyalanır. Veri dosyaları daha sonra Genotyping Console yazılımına aktarılır ve “.CHP” dosyası haline çevrilir. Tarama sonucunda mikrodizin elde edilen SNP sinyal alımı yüzdesi hesaplanır. SNP *call rate* değerleri %80'in üzerindeyse analiz başarılı sonuç vermiştir ve yorumlanmaya hazırdır.

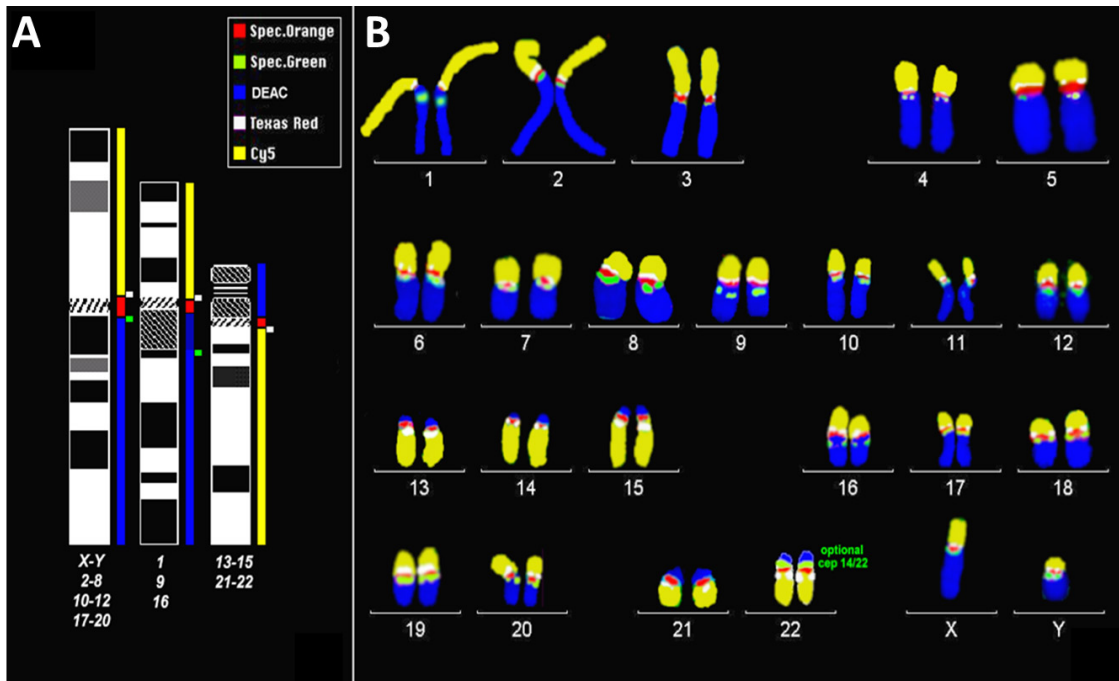
3.6. İleri FISH Yöntemleri

Bu çalışmaya alınan hastalarda SNP *array* ile *marker* kromozomların hangi kromozomlardan köken aldığı ayrıntılı bir şekilde gösterildikten sonra *marker* kromozomların yapısal organizasyonunun belirlenmesi için subcenM-FISH yöntemi kullanıldı. Ancak, 2 olgudan (olgu 4 ve olgu 6) yeterli örnek temin edilemediğinden bu hastalarda FISH ile konfirmasyon yapılamadı.

3.6.1. SubcenM-FISH

Kromozomların tamamını veya belirli bölgelerini analiz etmeye yarayan birçok FISH tekniği geliştirilmiş olmakla birlikte özellikle sentromerik ve perisentrik bölgeler teknik nedenlerle analizi zor bölgelerdir. Bunun nedeni DNA üzerinde bulunan ardışık tekrar sekanslarının özellikle bu bölgelerde yoğunlaşmasıdır. SubcenM-FISH yöntemi,

özellikle sentromer yakınındaki ökromatin materyali boyamak üzere geliştirilmiş bir tekniktir. Sentromere en yakın BAC (*bacterial artificial chromosome*) problemleri ve mikrodiseksiyon yöntemi ile elde edilmiş kromozom kollarına spesifik problemler birleştirilerek her kromozom için ayrı prob karışımları hazırlanır (Şekil 3.2) (7). Bu çalışmada 15 ve 18'inci kromozomlar için subcenM-FISH problemleri kullanıldı.



Şekil 3.2: A) SubcenM-FISH problemlerinin işaretlenmesini gösteren şema. Non-akrosentrik kromozomların p kolu *cyanine 5* (Cy5) ile, q kolu *diethylaminocoumarin* (DEAC) ile işaretlenir. Kromozomun uzun kolundaki sentromere yakın bölgenin probu *SpectrumGreen* (Spec.Green), kısa kolunun sentromere yakın bölgesi *Texas Red* ile işaretlenir. Akrosentrik kromozomlarda uzun kol Cy5 ile, kısa kol DEAC ile, uzun kolun sentromere yakın bölgesi *Texas Red* ile boyanır. Tüm kromozomların sentromerleri *SpectrumOrange* (Spec.Orange) ile işaretlenir. B) Tüm kromozomların subcenM-FISH problemleri ile boyanışının şematik gösterimi (Bu analiz her kromozom için ayrı ayrı uygulanmaktadır) (Starke ve diğ.'nden alınmıştır) (7).

a. Slaytların önhazırlığı:

1. Hastalardan sodyum heparinli tüplere alınan periferik kan örnekleri yukarıda bahsedilen “Periferik Kan Örneklerinden Kromozom Analizi” basamaklarından preparasyon aşamasına kadar getirilip örneklerin slaytları hazırlanır.

2. Bir şale içerisine 100 ml 10 mM HCl solüsyonu konulur ve 37 °C’ye getirilmiş sıcak su banyosuna yerleştirilir. Solüsyonun sıcaklığı 37 °C’ye geldiğinde içerisine 500 µl pepsin (20 mg/ml) solüsyonu eklenir.

3. Slaytlar bu karışım içerisinde 5 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonrası 1xPBS içerisinde oda sıcaklığında 5 dk yıkanır.

4. Oda sıcaklığında lamel altında 100 µl postfiks-solüsyonunda (%1’lik formaldehit) 10 dk inkübe edilir.

5. Lamel uzaklaştırılarak slaytlar 100 ml’lik 1xPBS içerisinde oda sıcaklığında 5 dk yıkanır.

6. Slaytlar %70, %95, %100’lük etanol serilerinden her birinde 3’er dk bekletilerek geçirilir ve kurumaya bırakılır.

b. Kullanılacak problemlerin denatürasyonu ve prehibridizasyonu:

0,5 ml’lik tüpte 5 µg’lık cot-1 DNA hazırlanır. Tüpün içerisine her bir örnek için 3 µl prob ve 2 µl dekstran sülfat (hibridizasyon tamponu) eklenerek tüpler 37°C’deki termal karıştırıcıda 10 dk çalkalanır. Tüpler “*thermocycler*” içerisine prehibridizasyon programı yazılarak yerleştirilir (75 °C’de 5 dk → 4 °C’de 2 dk → 37 °C’de 30 dk).

c. Slaytların Denatürasyonu:

7. Slaytların üzerine 100 µl %70’lik formamid damlatılır. Lamel ile kapatılan slaytlar 72-73 °C’lik sıcak yüzey üzerinde 3 dk tutularak denatüre edilir.

8. Lamel uzaklaştırılır ve slaytlar -20 °C’deki %70’lik etanolde 3 dk bekletilir.

9. Ardından %95 ve %100’lük etanollerden 3’er dk geçirilerek kurumaya bırakılır.

10. Denatüre edilmiş slaytların üzerine hazırlanmış prob karışımından 10’ar µl damlatılır. Lamelle örtüldükten sonra çevresi yapıştırıcı ile kapatılarak 37 °C’de nemli bir ortam içerisinde bir gece bekletilir.

d. Slaytların yıkanması:

11. Slaytlar 37 °C'den çıkartılarak üzerindeki yapıştırıcı ve lamel uzaklaştırılır.
12. Seramik bir kap içerisinde 62-63 °C'ye ısıtılmış 100 ml 1xSSC'de 5 dk bekletilir.
13. Oda sıcaklığında 100 ml 4xSSC/%0,2 Tween'de 5 dk bekletilir.
14. Slaytların üzerine 100 µl marvel solüsyonu (0,1 gr süt+2ml) damlatılarak lamelle kapatılır. 37 °C'de 15 dk bekletilir.
15. Lamel uzaklaştırılır ve slaytlar çalkalayıcı üzerinde 100 ml'lik 4xSSC/Tw içerisinde 2 dk yıkanır.
16. Probların florokromlar ile işaretlenebilmesi için 100 µl'lik antikor solüsyonu (Örn. 4 µl SA-Cy5 + 96 µl Marvel) ile lamel altında muamele edilerek 37 °C'de 35-45 dk bekletilir.
17. Lamel uzaklaştırılır ve slaytlar çalkalayıcı üzerinde 100 ml'lik 4xSSC/Tw içerisinde 5 dk yıkanır. Bu basamak yeni solüsyonla bir kez daha tekrarlanır.
18. Slaytlar 100 ml'lik 1xPBS içerisinde oda sıcaklığında 5 dk yıkanır. Bu basamak yeni solüsyonla bir kez daha tekrarlanır.
19. Slaytlar %70, %95, %100'lük etanol serilerinden her birinde 3'er dk bekletilerek geçirilir ve karanlık bir ortamda yaklaşık 30 dk kurumaya bırakılır.
20. Kurumanın ardından *antifade*-DAPI solüsyonu damlatılarak kapatılan slaytlar analize hazır hale gelirler.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Olgu 1

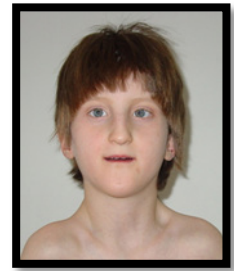
Gelişimsel gecikme nedeniyle 6 aylıkken bölümümüzde görüldü. Öyküsünden 35 yaşındaki annenin ikinci gebeliğinden ve ikinci yaşayan olarak sezaryen ile 3100 gr doğduğu, 2 günlükken sarılık nedeniyle fototerapi aldığı, kilo alımının normalin altında olduğu, prenatal/natal bir probleminin olmadığı ve motor gelişim basamaklarının yaşına göre uygun olduğu öğrenildi. Anne-baba arasında akrabalık yoktu ve soygeçmişinde özellik saptanmadı. Altı aylık iken yapılan fizik muayenesinde vücut ağırlığı 4940 gr (<3p), boyu 63 cm (10-25p) ve baş çevresi 39 cm (3p) idi. Mikrosefali, derin yerleşimli gözler, strabismus, hipertelorizm, yukarı eğimli palpebral aralıklar, iç epikantal katlantılar, düşük yerleşimli kulaklar, belirgin burun kökü, yukarı kalkık burun ucu, mikrostomi, yüksek/dar damak ve ince parmaklar dismorfik özellikler olarak saptandı. Üç yaş 6 aylık iken tekrar değerlendirilen hastamızın vücut ağırlığı 10 kg (<3p), boyu 90 cm (3-10p) ve baş çevresi 44,5 cm (<3p) olarak ölçüldü. Psikometrik değerlendirmesinde ağır zihinsel yetersizlik tespit edildi. Kronik konstipasyon hikayesinin olduğu ve infantil ezotrophia nedeniyle ameliyat edildiği öğrenildi. Abdomino-renal US, EKO, beyin BT incelemeleri normaldi.



3^{6/12} yaş

4.1.2. Olgu 2

Bölümümüzde 8 yaş 5 aylık iken zihinsel yetersizlik nedeniyle değerlendirilen hastamızın öyküsünden 39 yaşında annenin beşinci gebeliğinden ve beşinci yaşayan olarak 2300 gr ağırlığında sezaryen ile doğduğu, 1 yaşından sonra başını dik tutmaya, 1,5 yaşında desteksiz oturmaya, 4 yaşında yürümeye başladığı, nöbet, neonatal diş, gastroözofageal reflü ve vezikoureteral reflü (VUR) öykülerinin olduğu öğrenildi. Soygeçmişinden 20



8^{5/12} yaş

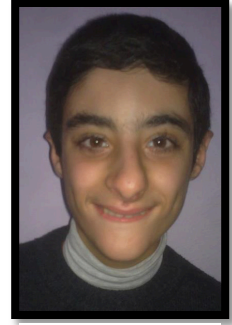
yaşındaki ablasında zor doğum hikayesi, gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, nöbet hikayesi olduğu ve bu ablasına daha önceden yapılan kromozom analizinde 46,XX,dup(6)(p23p25) anomalisi saptandığı öğrenildi. Anne babası arasında akrabalık yoktu. Sekiz yaş 5 aylık iken yapılan fizik muayenesinde vücut ağırlığı 24 kg (25p), boyu 126cm (25-50p) ve baş çevresi 47cm (<-2SD) idi. Diğer fizik muayene bulguları mikrosefali, trigonosefali, ince uzun yüz, belirgin alın, strabismus, düşük yerleşimli kulaklar, antiheliks anomalisi, belirgin burun kökü, mikrostomi, prognatizm, dar omuzlar, kifoskolyoz, iki skapula arasında orta hatta 2x2 cm mor maküler lezyon, geniş parmaklar, uzun orta falankslar, 2 ve 3. parmaklarda orta falanksta ilave fleksiyon çizgileri, tenar/hipotenar hipoplazi, bacaklarda ksenotik egzema ve pes plano valgus olarak belirlendi (Şekil 4.1). Psikometrik değerlendirmesinde ağır zihinsel yetersizlik tespit edildi. Hastamızın daha sonraki değerlendirmelerinde kifoskolyoz ve vesikoureteral reflü nedeniyle ameliyat olduğu öğrenildi. Beyin MRG'sinde korpuz kallozumun posterior kısmında incelmeye saptanan hastamızın EEG'sinde yavaş ve düzensiz zemin aktivitesi tespit edildi.



Şekil 4.1: Olgu 2'nin fotoğrafları (8^{5/12} yaş)

4.1.3. Olgu 3

İlk kez 5 yaşında iken gelişimsel gecikme ve dirençli nöbetler nedeni ile bölümümüze başvuran erkek hastamızın alınan öyküsünden 31 yaşında annenin ikinci gebeliğinden prematür doğum ile dünyaya geldiği, 3 yıldır nöbet geçirdiği, 2 yaşında desteksiz oturmaya, 5 yaşında yürümeye başladığı öğrenildi. Birkaç kelimenin dışında konuşması yoktu. Anne ve babası akraba değildi ve soygeçmişinde herhangi bir bulguya rastlanmadı. Beş yaşında iken yapılan fizik muayenesinde boyu 108 cm (50p), vücut ağırlığı 14700 gr (10-25), baş çevresi 47 cm (<3p) idi. Yapılan muayenesinde mikrosefali, üçgen yüz, strabismus, kulağında antiheliks anomalisi ve ayaklarında 2-3. parmaklar arasında kutanöz sindaktilinin varlığı saptandı. Psikometrik değerlendirmesinde ağır zihinsel yetersizlik tespit edildi.



12 yaş

4.1.4. Olgu 4

Zihinsel yetersizlik ve gelişimsel gecikme nedeniyle 8 yaşında bölümümüze başvuran hastamızın alınan öyküsünden 32 yaşındaki annenin üçüncü gebeliğinden ikinci yaşayan olarak, miadında ve sezaryenle 2800 gr doğduğu, prenatal bir probleminin olmadığı, 7 aylıkken baş kontrolüne, 2 yaşında desteksiz oturmaya ve 5 yaşında yürümeye başladığı, birkaç kelime ile konuşabildiği, hiperaktif olduğu, tuvalet eğitiminin henüz olmadığı, 1 yaşından beri özel eğitim aldığı ve fayda gördüğü öğrenildi. Soygeçmişinde bir özelliği yoktu. Sekiz yaşındaki fizik muayenesinde vücut ağırlığı 14500 gr (<3p), boyu 116 cm (3-10p) ve baş çevresi 47,3 cm (<-2SD) olarak ölçüldü. Diğer fizik muayene bulguları olarak el sallama hareketleri, mikrosefali, uzun ince yüz, strabismus, belirgin burun kökü, hipoplazik burun kanatları, mikrostomi, dar ve yüksek damak, maksiller hipoplazi, sağda aksesuar meme başı, proksimal çıkışlı ve addüksiyonda başparmaklar (fleksiyon kontraktürü), araknodaktili, hipoplazik skrotum ve bilateral kriptorşidizm saptandı (Şekil 4.2).



8 yaş

Psikometrik değerlendirmesinde ağır zihinsel yetersizlik tespit edildi. Kranial MRG'sinde normalden kısa ve ince korpus kallozum, ekokardiyografik incelemesinde sol ventrikül çıkışında minimal fokal hipertrofi, abdominal ve renal US'si normal olarak saptandı.



Şekil 4.2: Olgu 4'ün fotoğrafları (8 yaş)

4.1.5. Olgu 5

Öğrenme güçlüğü nedeniyle 15 yaşında kliniğimizde değerlendirilen erkek hastanın 29 yaşında annenin ilk gebeliğinden miadında ve normal spontan vajinal yol ile 3200 gr doğduğu, 6 aylıkken başını dik tuttuğu, 10 aylıkken desteksiz oturduğu, 15 aylıkken yürüdüğü, 18 aylıkken konuşmaya başladığı, okumayı hala öğrenemediği, 13 yaşında bir kez nöbet geçirdiği öğrenildi. Akraba olmayan anne babanın ilk çocuğu olan hastamızın aile hikayesinde bir özelliği yoktu. On beş yaşında ölçülen vücut ağırlığı 83,7 kg (97p), boyu 168 cm (25-50p), baş çevresi 57 cm (%50 – +2SD) olan hastanın çok hareketli ve sinirli tavrı dikkat çekiciydi. Fizik muayenesinde hemihiperplazi (sağ > sol), gövdede yaygın pigmenter mozaizm, öne rotasyonlu kulaklar, el eklemlerinde hiperlaksite, trunkal obezite, sağ gluteal bölgenin üstünde arka aksiller hatta 1x0,5 cm hiperpigmente alan, sol ayak ikinci parmağın diğer parmakların üstüne bindiği belirlendi



15 yaş

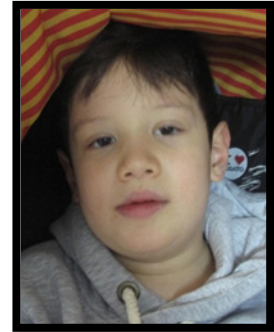
(Şekil 4.3). Psikometrik değerlendirmesi hafif/orta derece zihinsel yetersizlik olarak saptandı. Kranial MRG'sinde bilateral lateral ventrikül oksipital hornlarında hafif genişleme izlendi. Abdomino-renal US incelemesinde sağ böbrek parankim ekojenitesinde artış ve splenomegali saptandı. EEG incelemesi normal bulundu.



Şekil 4.3: Olgu 5'in fotoğrafları (15 yaş)

4.1.6. Olgu 6

Gelişimsel gecikme nedeniyle 13 aylık iken bölümümüzde görülen erkek hastamızın ailenin ikinci çocuğu olduğu ve anne-babasının akraba olmadığı öğrenildi. Prenatal ve natal özelliği bulunmayan hastamızın postnatal hikayesinden 10 aylıkken desteksiz oturduğu ve henüz anlamlı kelime kullanmadığı görüldü. On üç aylıkken yapılan fizik muayenesinde mikrosefali, hipertelorizm, epikantal katlantılar, belirgin alın ve kalın dudaklar mevcuttu. Sekiz yaşında tarafımızdan tekrar değerlendirilen hastamızın 22 aylıkken yürümeye başladığı, birkaç kelimeyle konuştuğu ancak cümle kuramadığı, 6 yaşında başlayan miyoklonik kasılmalar şeklinde dirençli nöbetlerinin olduğu, geç yürümeye başladığı, yürümede dengesizliğinin olduğu ve 7 yaşında uygulanan psikometrik değerlendirme testinde genel gelişimsel gecikme (18-19 ay)

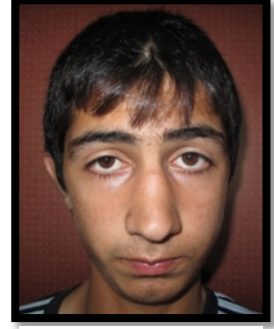


8 yaş

saptandığı öğrenildi. Fizik muayenesinde vücut ağırlığı 22 kg (10-25p), boyu 118,5 cm (3-10p) ve baş çevresi 50 cm (-2SD – %50) olarak ölçüldü. EEG’inde uykuda jenaralize olan epileptiform aktivite (sol>sağ) saptandı. İşitme testi, EKO ve kraniyal MRG incelemeleri normaldi.

4.1.7. Olgu 7

Gelişimsel gecikme ve davranış problemleri nedeniyle 15 yaşında bölümümüzde değerlendirildi. Prenatal ve natal dönemde herhangi bir problemi olmadığı öğrenilen erkek hastamızın postnatal öyküsünden yenidoğan döneminde 6 kez nöbeti olduğu ve herhangi bir tedavi uygulanmadığı öğrenildi. 3 yaşında yürümeye, 5 yaşında konuşmaya başladığı, intihar eğiliminde olduğu ve başkalarına zarar verme gibi agresif davranışlarının olduğu bildirildi. Anne babası arasında akrabalık yoktu ve hastamızın sağlıklı iki erkek kardeşi vardı. On beş yaşındaki fizik muayenesinde kekemelik ve patlar tarzda konuşması, heyecanlı yapısı, zeka geriliği, belirgin burun kökü, retrognati, kubitüs valgus ve hafif pektus karinatum saptandı. Psikometrik değerlendirmesinde orta derece zihinsel yetersizlik tespit edildi. Beyin BT ve EEG incelemeleri normaldi.



19 yaş

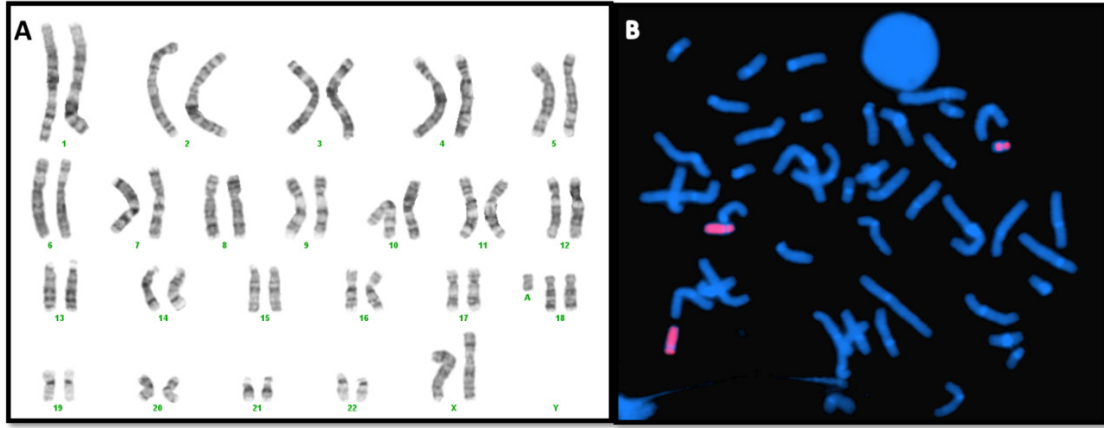
4.2. Laboratuvar Bulguları

G-Bantlama yöntemi ile kromozom analizi sonucu *marker* kromozom saptanan hastalarımıza FISH (WCP) analizi, subcenM-FISH analizi ve SNP-array analizleri yapıldı. SNP-array analizleri için 250K array platformu kullanıldı ve elde edilen sonuçlar *Affymetrix Genotyping Console* programında analiz edilerek *marker* kromozomların daha ayrıntılı yapıları ortaya kondu.

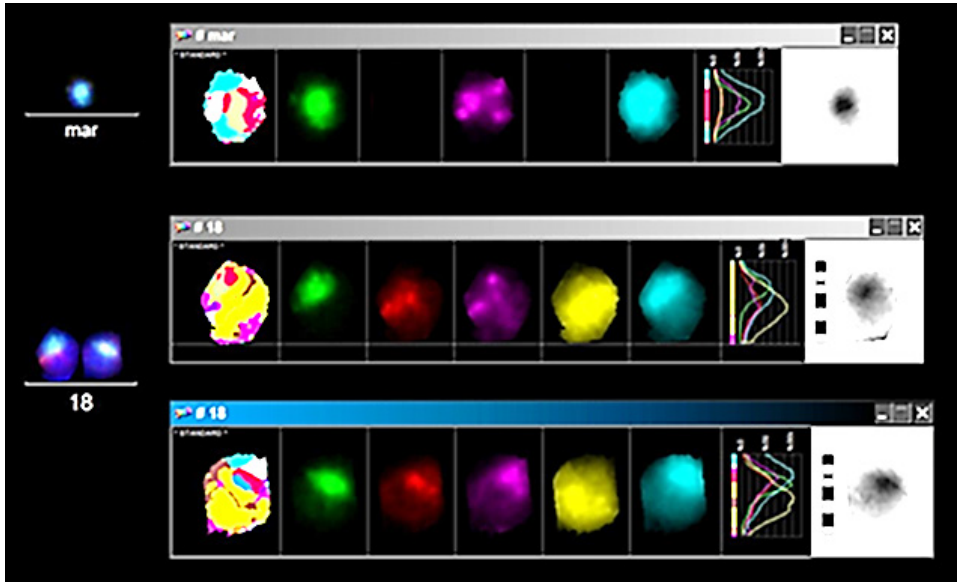
4.2.1. Olgu 1

Karyotip analizi sonucu 47,XX,+mar saptanan hastamızın WCP18 probu ile analizi yapılarak *marker* kromozomun 18. kromozomdan köken aldığı belirlendi (Şekil 4.4). İleri FISH yöntemi olarak hastamıza 18. kromozom için dizayn edilmiş subcenM-FISH analizi yapıldı. Bu analizde *marker* kromozomun 18p problemleri (18p, BAC18p11.21:RP11-411B10) ve 18. kromozomun sentromerini içeren prob (CEP 18) ile boyandığı, q kolunu içeren problemler (18q, BAC18q11.2:RP11-10G8) ile boyanmadığı görüldü (şekil 4.5). Bu sonuçlarla *marker* kromozomun izokromozom 18p oluşumuna sahip olduğu tespit edildi. Anne ve babanın kromozom analizleri normaldi.

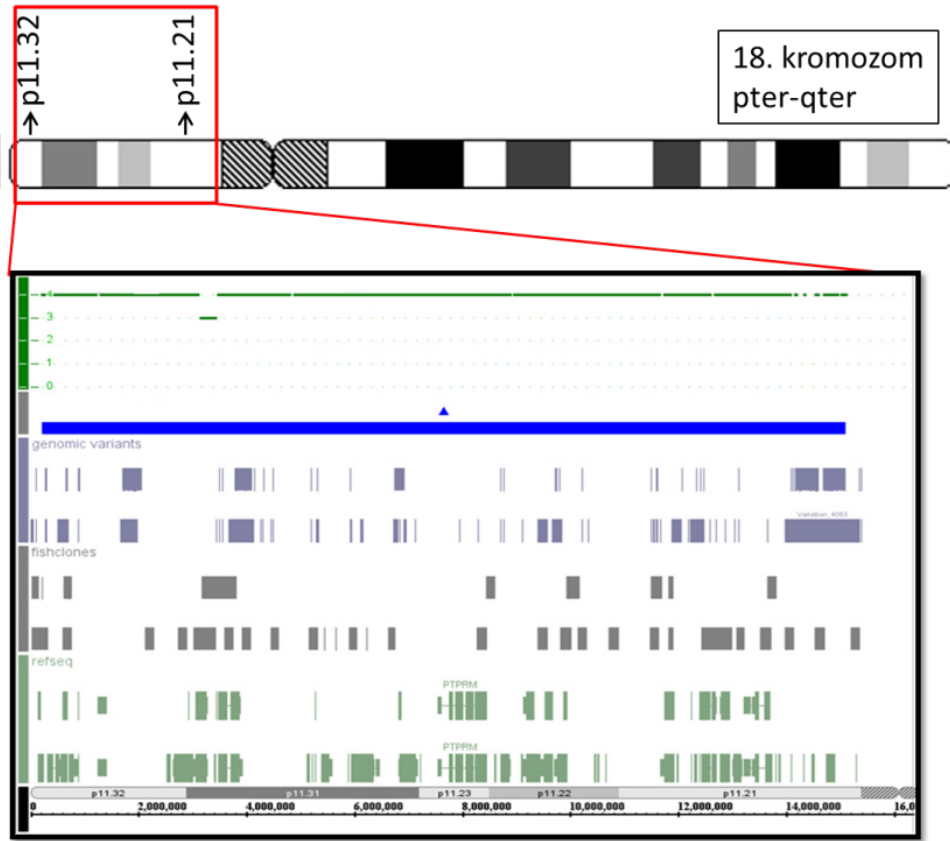
Yapılan array analizinde 18. kromozomun p11.21 ile p11.32 bölgeleri arasında 14.887 kilobazlık bir alanda 4 kopyalık bir kazanım olduğu tespit edildi. İzokromozom 18p yapısına sahip olan *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr18:210071-15096727 bp) (SNP *marker* no:1878089-4194211) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi. (Şekil 4.6).



Şekil 4.4: A) Olgu-1'in karyotip analizi B) WCP18 probu ile FISH analizi sonucu



Şekil 4.5: Olgu 1'in 18. kromozom için subcentM-FISH analizi sonucu (Yeşil: Sentromerik prob, kırmızı: 18q11.21 bölgesi BAC probu, mor: 18p11.21 bölgesi BAC probu, sarı: 18q, aqua: 18p).

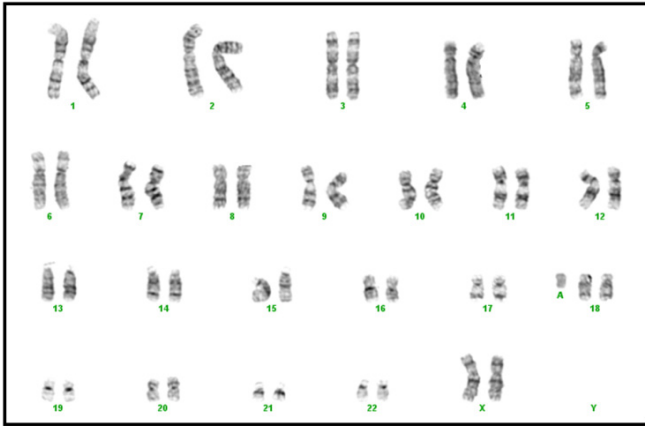


Şekil 4.6: Olgu 1'in array analizi sonucu. Kırmızı kare içerisinde alınmış kısım ilgili kromozomdaki kopya sayısı artışı gösteren bölgeyi ve hangi kromozom bantları arasında olduğunu göstermektedir. Altta siyah dikdörtgen şekil içerisinde en üstte kopya sayısı değişiklikleri rakamsal olarak gösterilmektedir. İki kopya normali, ikinin üzeri değerler artışları ve ikinin altındaki değerler kayıpları göstermektedir. Mavi şerit ilgili bölgedeki kopya sayısı kazanımını göstermektedir. Daha sonra sırasıyla ilgili bölgedeki genomik varyantlar (*genomic variants*), FISH klonları (*fish clones*) ve gen içeriği (*refseq*) şematize edilmiştir. En altta kopya sayısı artışı gösteren bölgenin kromozom bantları ve baz uzunluğu cinsinden değeri yer almaktadır.

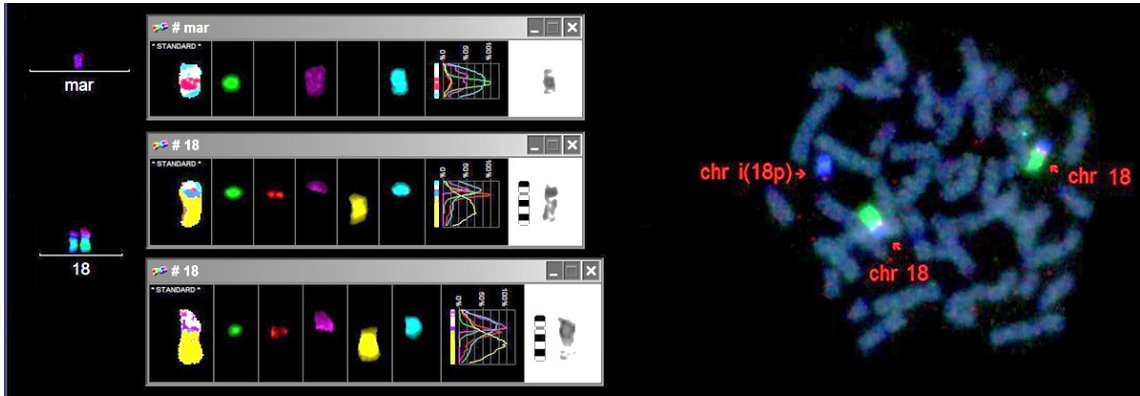
4.2.2. Olgu 2

Kromozom analizi sonucu 47,XX,+mar saptanan (Şekil 4.7) hastamızın ablasında daha önceden 46,XX,dup(6)(p23p25) karyotipi saptanmış olduğundan öncelikle 6. kromozom için WCP6 analizi uygulandı. Bu analiz ile *marker* kromozomun kökeni belirlenemeyince ileri FISH yöntemi olarak hastamıza subcenM-FISH analizi yapıldı. *Marker* kromozomun 18p probları (18p, BAC18p11.21:RP11-411B10) ve 18. kromozomun sentromerini içeren prob (CEP 18) ile boyandığı, q kolunu içeren proplar (18q, BAC18q11.2:RP11-10G8) ile boyanmadığı görüldü (Şekil 4.8). Bu sonuçlarla *marker* kromozomun izokromozom 18p oluşumuna sahip olduğu tespit edildi. Anne ve babanın karyotip analizleri normal olarak rapor edildi.

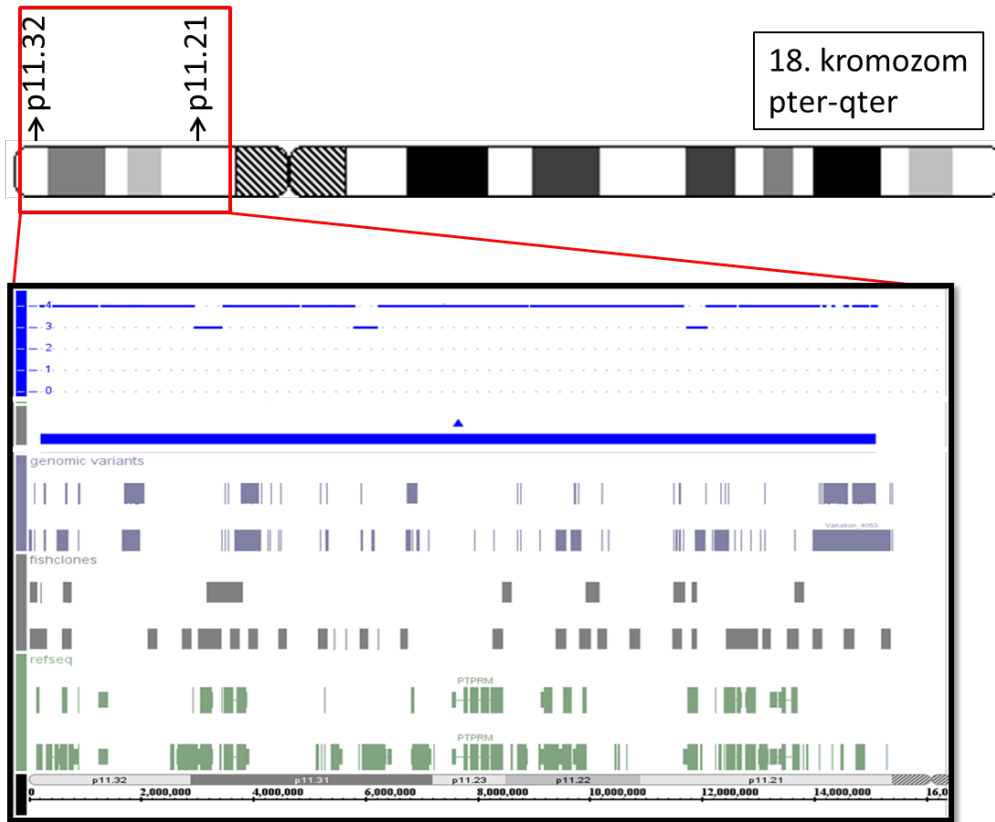
Yapılan array analizinde 18'inci kromozomun p11.21 ile p11.32 bölgeleri arasında 14.886 kilobazlık bir alanda 4 kopyalık bir kazanım olduğu tespit edildi. İzokromozom 18p yapısına sahip olan *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr18:210341-15096727 bp) (SNP *marker* no: 2057202-4194211) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.7: Olgu 2'nin karyotip analizi sonucu



Şekil 4.8: Olgu 2'nin 18. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu (Yeşil: Sentromerik prob, kırmızı: 18q11.21 bölgesi BAC probu, mor: 18p11.21 bölgesi BAC probu, sarı: 18q, aqua: 18p).

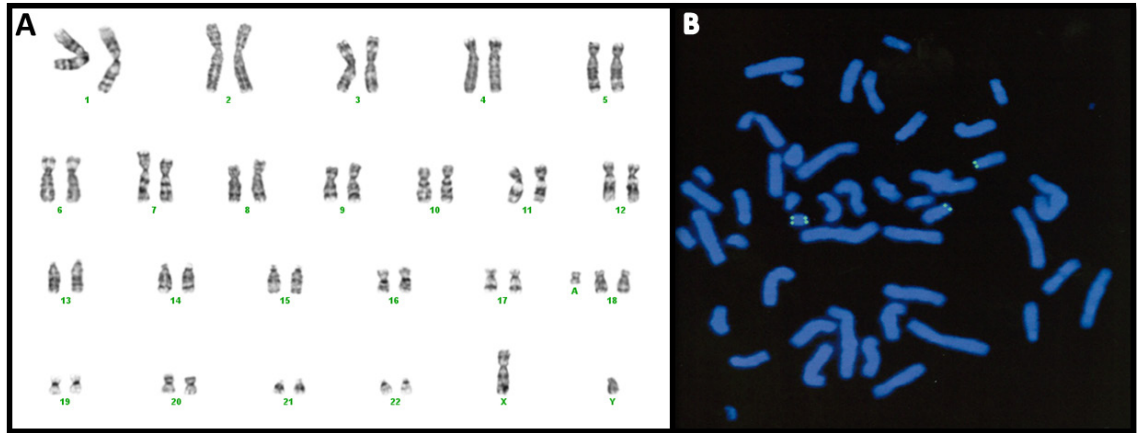


Şekil 4.9: Olgu 2'in array analizi sonucu

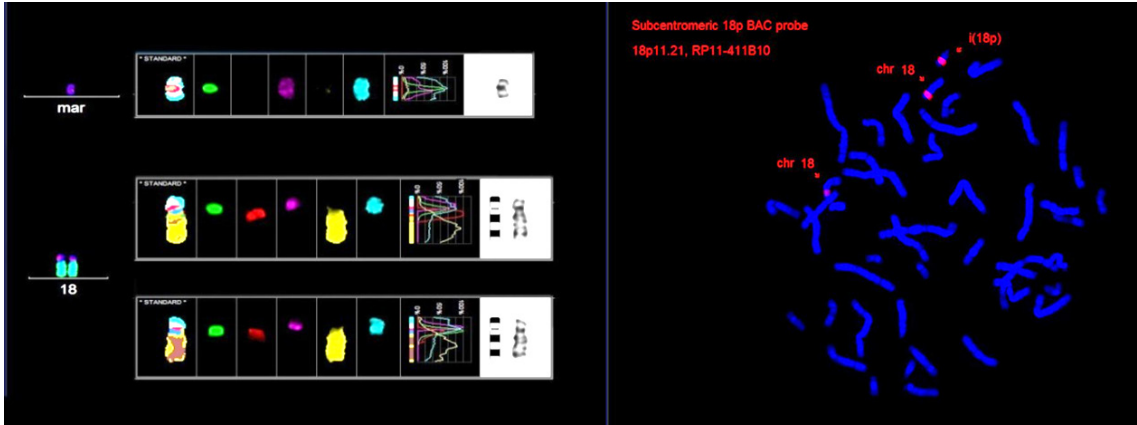
4.2.3. Olgu 3

Kromozom analizi sonucu 47,XY,+mar olan hastamıza subtelomerik 18p FISH problemleri uygulandı (Şekil 4.10). Analiz sonucu 47,XY,i(18)(p10),ish.18ptel(D18S1244x4) olarak rapor edilerek *marker* kromozomun 18. kromozomdan köken aldığı tespit edildi. Hastamıza uygulanan subcenM-FISH analizinde *marker* kromozomun 18p problemleri (18p, BAC18p11.21:RP11-411B10) ve 18. kromozomun sentromerini içeren prob (CEP 18) ile boyandığı, q kolunu içeren problemler (18q, BAC18q11.2:RP11-10G8) ile boyanmadığı görüldü (şekil 4.11). Bu sonuçlarla *marker* kromozomun izokromozom 18p oluşumuna sahip olduğu tespit edildi. Anne ve babanın karyotip analizi normal bulundu.

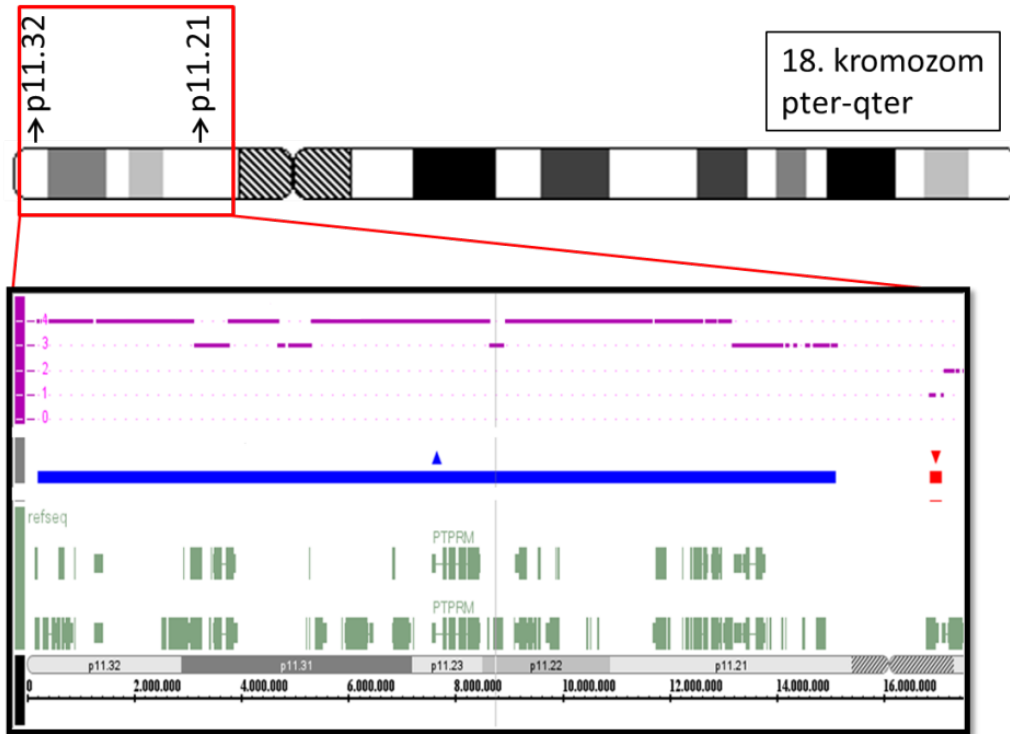
Yapılan array analizinde 18. kromozomun p11.21 ile p11.32 bölgeleri arasında 14.887 kilobazlık bir alanda 4 kopyalık bir kazanım olduğu tespit edildi. İzokromozom 18p yapısına sahip olan *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr18: 210071-15096727 bp) (SNP *marker* no: 1878089-4194211) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.10: A) Olgu 3'ün karyotip analizi sonucu. B) Subtelomerik 18p probe ile FISH analizi sonucu.



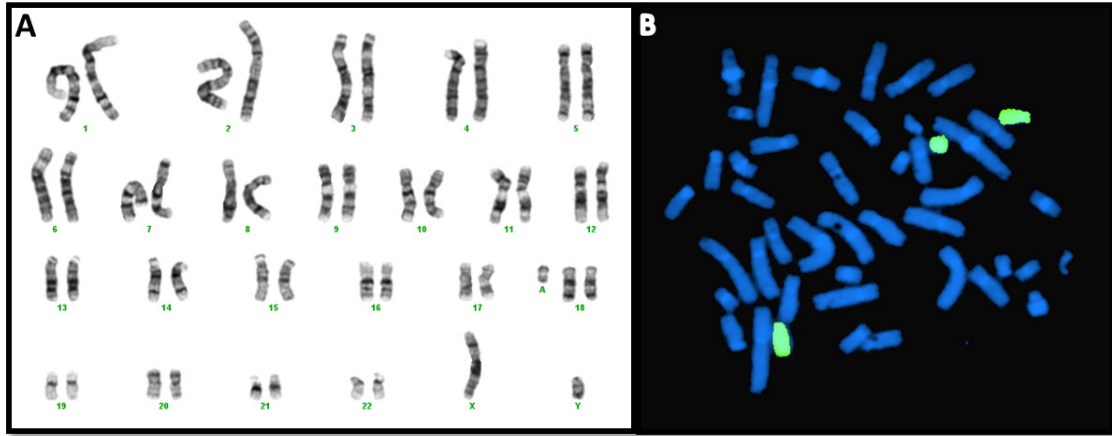
Şekil 4.11: Olgu 3'ün 18. kromozom için subcentromerik FISH analizi sonucu (Yeşil: Sentromerik prob, kırmızı: 18q11.21 bölgesi BAC probu, mor: 18p11.21 bölgesi BAC probu, sarı: 18q, aqua: 18p).



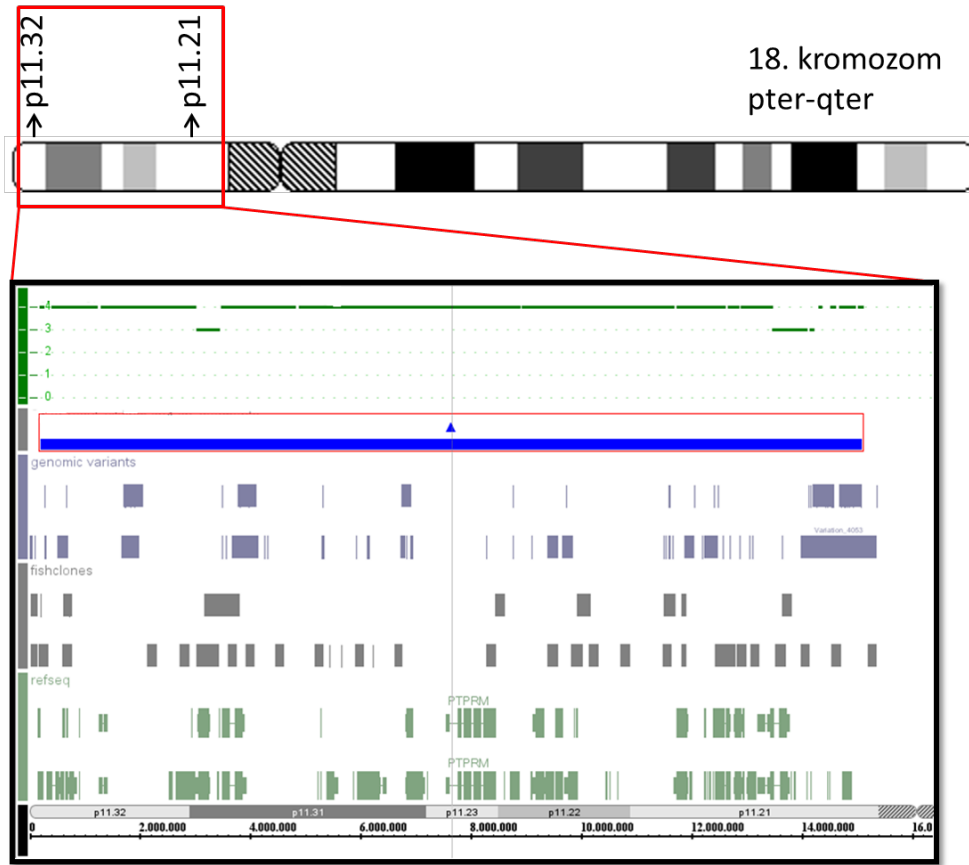
Şekil 4.12: Olgu 3'ün array analizi sonucu

4.2.4. Olgu 4

Karyotip analizi sonucu 47,XY,+mar saptanan hastamızın WCP18 probe ile analizi yapılarak *marker* kromozomun 18. kromozomdan köken aldığı belirlendi (Şekil 4.13). Daha sonra yapılan array analizinde 18. kromozomun p11.21 ile p11.32 bölgeleri arasında 14.887 kilobazlık bir alanda kazanım olduğu tespit edildi. Bu olgumuzda materyal yetersizliği nedeniyle subcenM-FISH analizi gerçekleştirilemedi. İzokromozom 18p yapısına sahip olan *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr18: 210071-15096727 bp) (SNP *marker* no: 1878089-4194211) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.14). Hastamızın anne ve babasının kromozom analizleri normaldi.



Şekil 4.13: A) Olgu 4'ün karyotip analizi sonucu. B) WCP18 probe ile FISH analizi sonucu

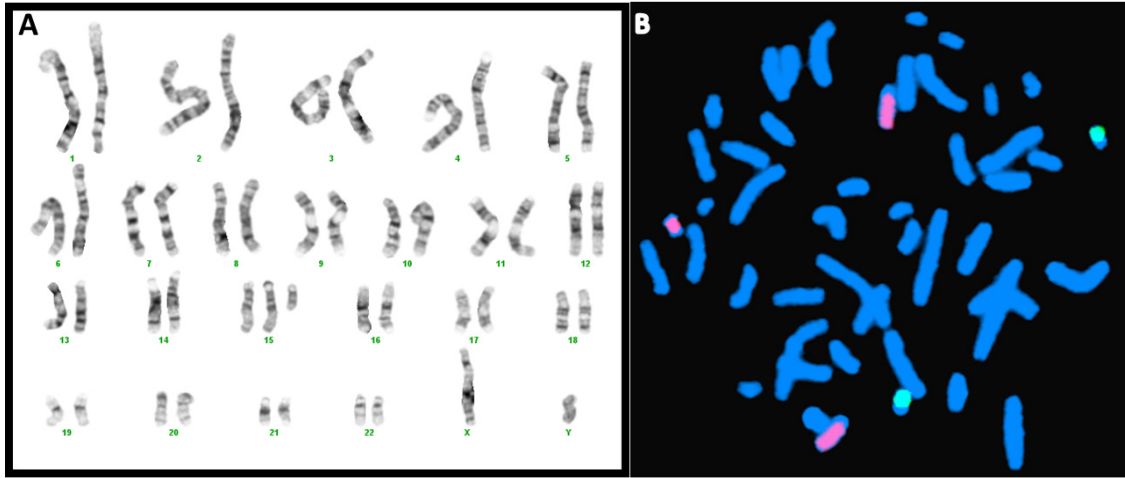


Şekil 4.14: Olgu 4'ün array analizi sonucu

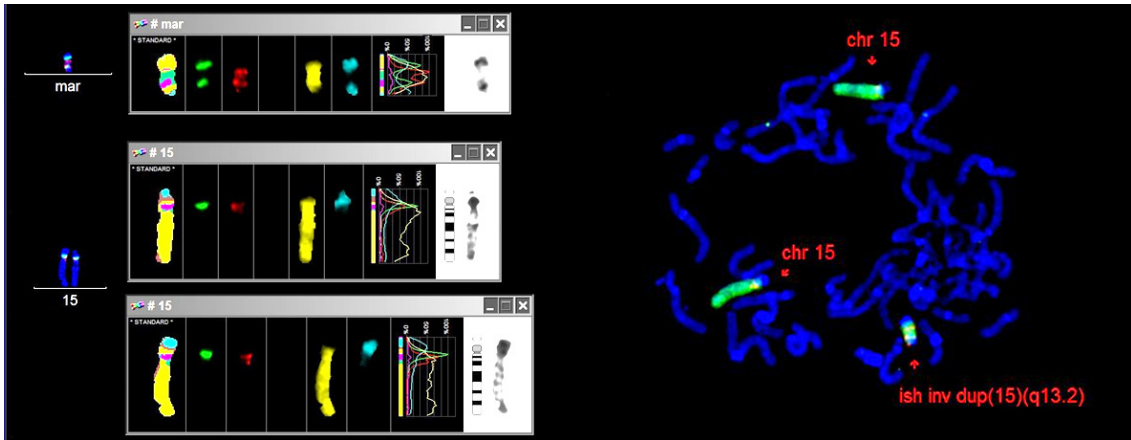
4.2.5. Olgu 5

Kromozom analizi sonucu 47,XY,+mar (%80)/46,XY(%20) saptanan hastamızın öncelikle WCP15, 22 probları ile analizi yapıldı ve *marker* kromozomun 15. kromozomdan köken aldığı belirlendi (Şekil 4.15). Daha sonra 15. kromozom için yapılan subcenM-FISH analizinde *marker* kromozomun p kolunu (MD 54), sentromer bölgesini (CEP 15) ve q kolunu (15q, BAC15q11.2:RP11-307C10) işaretleyen problardan ikişer kopya içerdiği gösterildi (Şekil 4.16). Bu sonuçlarla *marker* kromozomun yapısı incelendiğinde inv dup (15q) oluşumuna sahip olduğu görüldü. Hastamızın anne ve babasının kromozom analizleri normaldi.

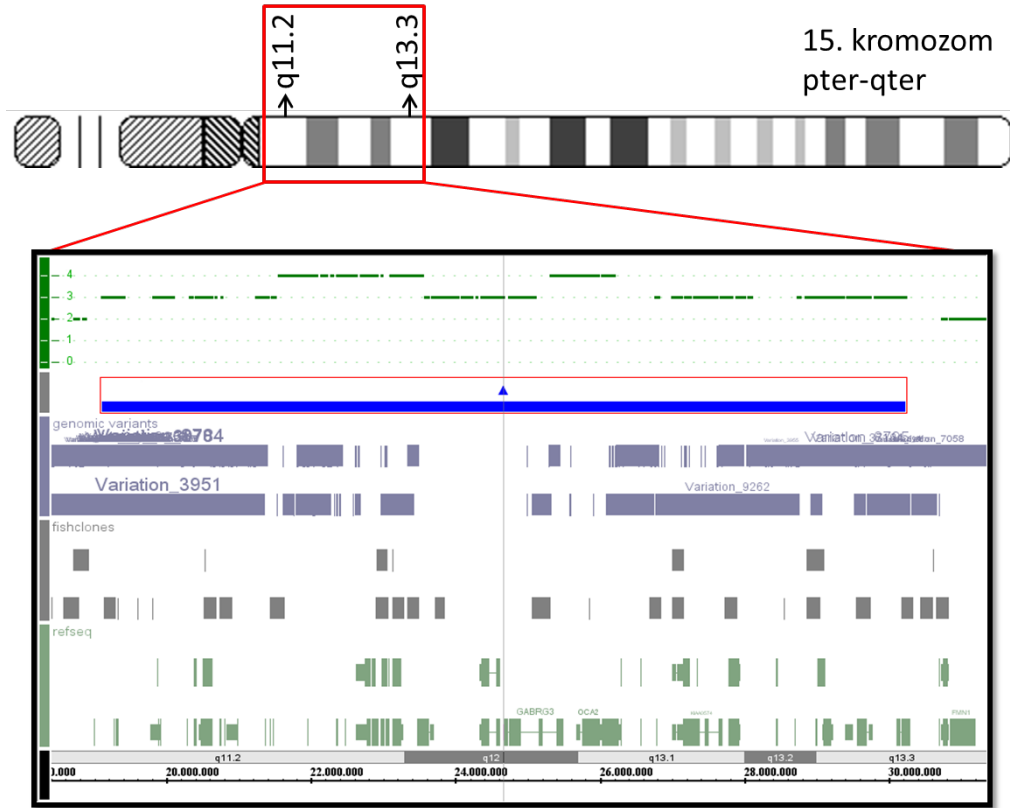
Daha sonra yapılan *array* analizinde 15. kromozomun q11.2 ile q13.3 bölgeleri arasında 11.119 kilobazlık bir alanda kazanım olduğu tespit edildi. Bu kırık noktalarının tespiti ile inv dup (15)(q13.3) yapısına sahip olduğu belirlenen *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr15:19112164-30231488 bp) (SNP *marker* no: 1836922-2022976) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.15: A) Olgu 5'in karyotip analizi sonucu B) WCP15, 22 problemleri ile FISH analizi sonucu (Kırmızı: WCP15, yeşil: WCP22)



Şekil 4.16: Olgu 5'in 15. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu (Yeşil: Sentromerik prob, kırmızı: 15q11.2 bölgesi BAC probu, sarı: 15q, aqua: 15p).

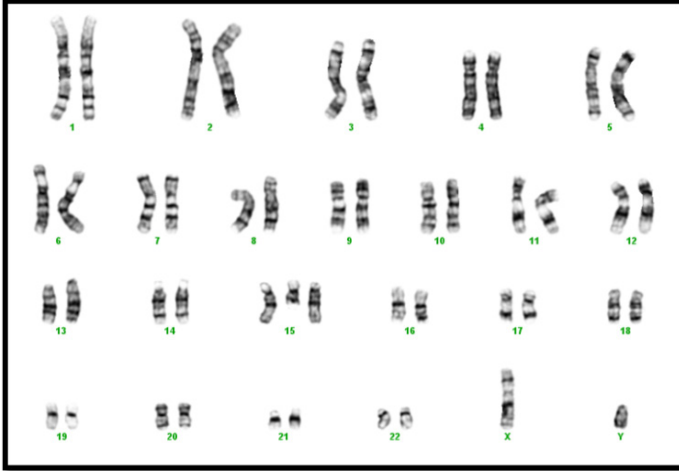


Şekil 4.17: Olgu 5'in array analizi sonucu

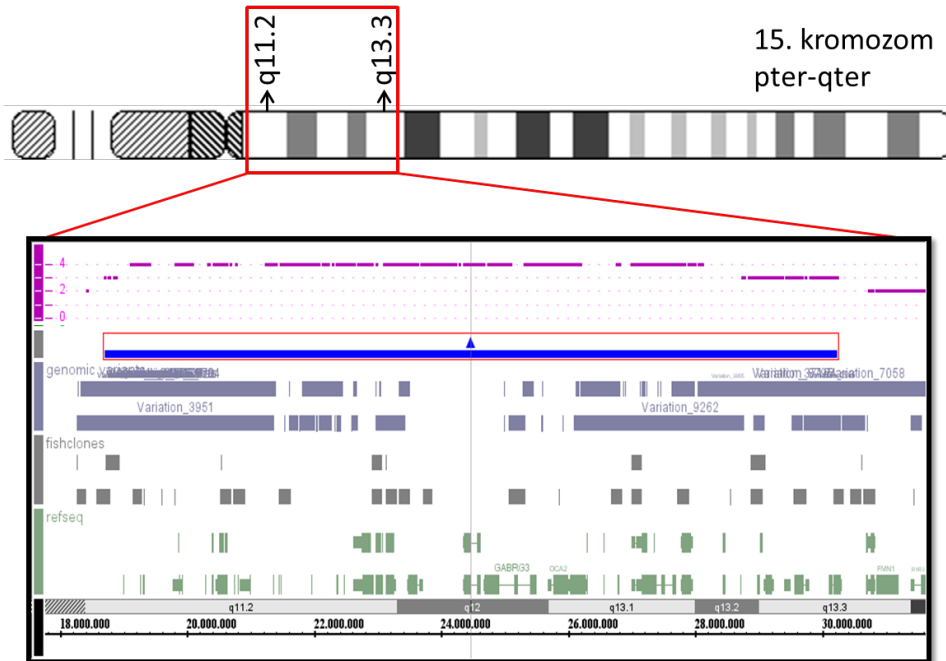
4.2.6. Olgu 6

Kromozom analizinde *marker* kromozom saptanan (Şekil 4.18) hastamıza Prader Willi/Angelman Sendromu (PW/AS) FISH probe uygulandı. 47,XY,+mar.ish idic(15)(q13)(SNRPN++) karyotipine sahip olduğu ve 15pter→15q13 bölgesi için tetrazomik olduğu tespit edildi. Bu olgumuzda materyal yetersizliği nedeniyle subcenM-FISH analizi gerçekleştirilemedi. Daha sonra uygulanan *array* analizinde 15. kromozomun q11.2 ile q13.3 bölgeleri arasında 11.520 kilobazlık bir alanda kazanım olduğu tespit edildi. Bu kırk noktalarının tespiti ile inv dup (15)(q13.3) yapısına sahip olduğu belirlenen *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr15:18711364-30231488 bp) (SNP *marker* no: 2235396-2022976) belirlendi ve

yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.19). Hastamızın anne ve babasının kromozom analizleri normal olarak rapor edildi.



Şekil 4.18: Olgu 6'nın karyotip analizi sonucu

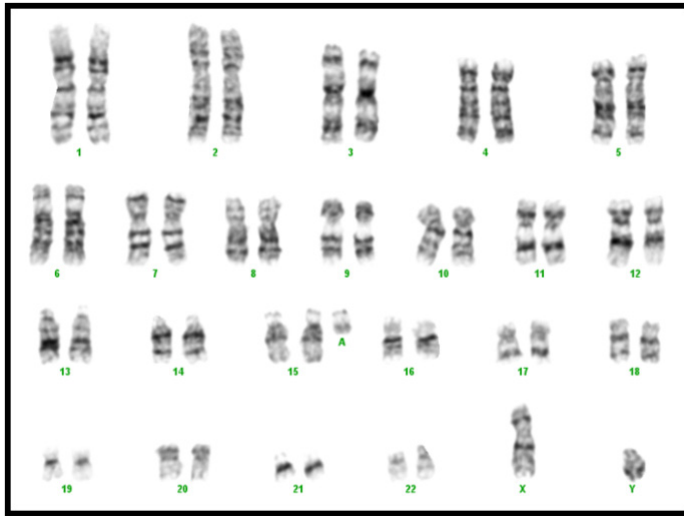


Şekil 4.19: Olgu 6'nın array analizi sonucu

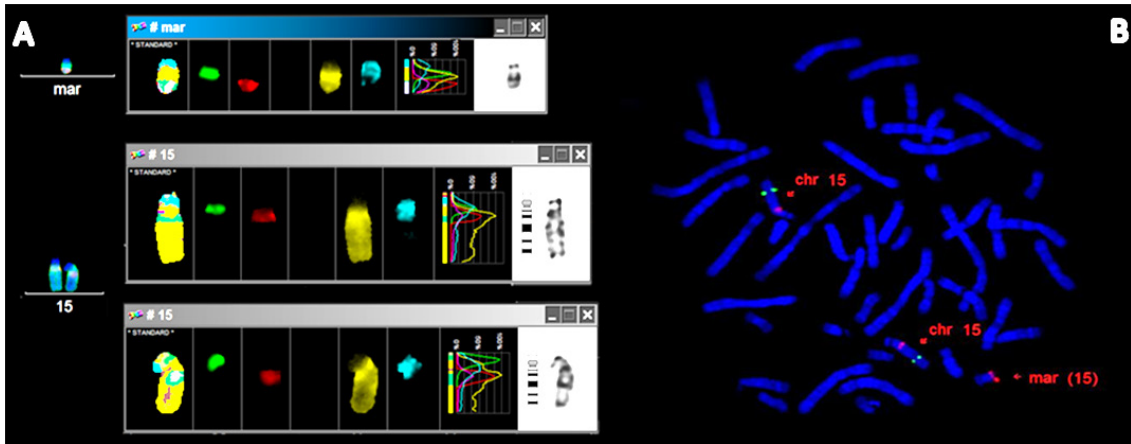
4.2.7. Olgu 7

Hastamıza konuşma geriliği ve davranış bozuklukları nedeniyle öncelikle Frajil-X Sendromu analizi uygulandı ve normal CGG tekrar sayısına sahip olduğu gösterildi. Daha sonra yapılan kromozom analizi sonucunda 47,XY,+mar saptanan (Şekil 4.20) hastamızın WCP22 probu ile analizi yapıldı fakat kökeni saptanamadı. 15. kromozom için yapılan SubcenM-FISH analizinde *marker* kromozomun p kolunu (MD 54), sentromer bölgesini (CEP 15) ve q kolunu (15q, BAC15q11.2:RP11-307C10) işaretleyen problardan birer kopya içerdiği gösterildi (Şekil 4.19). Bu sonuçlarla *marker* kromozomun yapısı incelendiğinde min(15q) oluşumuna sahip olduğu görüldü. Ayrıca hastamıza PWS/AS FISH probu uygulandı ve *marker* kromozomun bu bölgeyi içerdiği gösterildi (Şekil 4.21). Anne ve babasının kromozom analizleri normaldi.

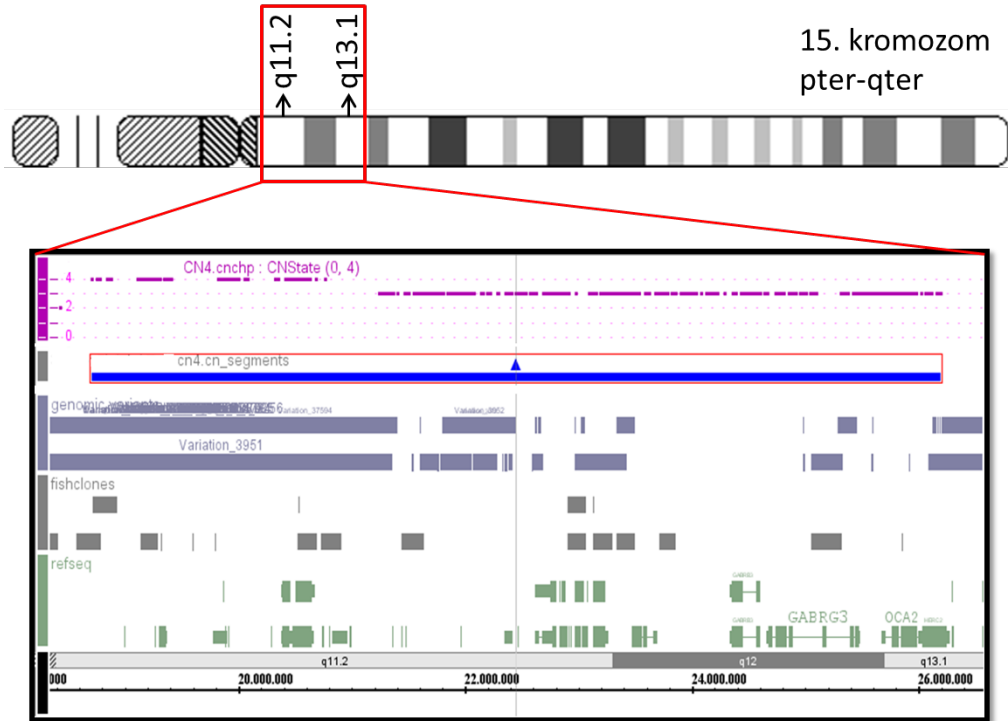
Marker kromozomun içeriğinin ve kırık noktalarının daha ayrıntılı belirlenmesi için uygulanan *array* analizinde 15. kromozomun q11.2 ile q13.1 bölgeleri arasında 7.485 kilobazlık bir alanda kazanım olduğu tespit edildi. Bu kırık noktalarının tespiti ile min(15)(pter→q13.1:) yapısına sahip olduğu belirlenen *marker* kromozomun başlangıç ve bitiş lineer pozisyonları (chr15:18711364-26196279 bp) (SNP *marker* no: 2235396-1886909) belirlendi ve yapısı ayrıntılı bir şekilde gösterildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.20: Olgu 7'nin karyotip analizi sonucu



Şekil 4.21: A) Olgu 7'nin 15. kromozom için subcenM-FISH analizi sonucu (Yeşil: Sentromerik prob, kırmızı: 15q11.2 bölgesi BAC probu, sarı: 15q, aqua: 15p). B) PW/AS FISH probu ile analiz sonucu.



Şekil 4.22: Olgu 7'nin array analizi sonucu

5. TARTIŞMA

Marker kromozomlar prenatal örneklerde ve postnatal tanı amaçlı yapılan sitogenetik incelemelerde saptanabilir. sSMC'ler genellikle konvansiyonel sitogenetik bantlama yöntemleri ile tanımlanamazlar ve yapılarının ayrıntılı incelenmesi için moleküler sitogenetik yöntemlere gereksinim duyulur. Bu çalışmamızda yapılan analizler sonucunda dört olguda sSMC(18) ve üç olguda sSMC(15) varlığı belirlendi. Tüm olguların parental karyotipleri normal bulundu ve belirlenen sSMC'lerin *de novo* olduğu saptandı.

5.1. 18. Kromozom Kökenli sSMC'ler

On sekizinci kromozomdan kaynaklanan *marker* kromozomların tüm sSMC'ler içerisinde görülme sıklığı yaklaşık %7'dir ve %80'den fazlası izokromozom 18p şeklinde bulunur. Diğer görülme şekilleri ufak sentrik, *ring* ve diğer kompleks yapıları sSMC(18)'lerdir (2). Neo-sentromer oluşumu sSMC(18) olgularında yalnızca bir olguda bildirilmiştir (89).

İzokromozom 18p oluşumuyla ilgili olarak iki moleküler mekanizma üzerinde durulmaktadır; ayrılmama (*nondisjunction*) ve sentromerik bölünme hatası (*centromeric misdivision*). Literatürdeki yayınlarda parental kalıtılan izokromozomun büyük bir çoğunlukla anneden kalıtıldığı gösterilmiştir. Maternal mayoz II sırasında ayrılmama mekanizmasını izleyen sentromerik bölünme hatasının gerçekleştiği, dolayısıyla anne yaşının izokromozom oluşumunda rol alabileceği ileri sürülmektedir (90). Bizim olgularımızın anne yaşları 31-39 (ortalama: 34,2) yaş arasında olması ileri anne yaşı olarak yorumlandı ve bu bulgunun maternal mayoz II hatalarını desteklediği düşünüldü.

İzokromozom 18p yapısı, p kolunun tetrazomisine yol açarak tetrazomi 18p olarak ifade edilirken; ufak sentrik ve *ring* kromozomlar 18. kromozomun parsiyel trizomisine neden olurlar. 18. kromozomun perisentrik bölgesinde kopya sayısı değişikliğinden etkilenmeyen ve klinik bulgu göstermeyen en küçük alan 18p11.22-18q11.1 aralığı olarak belirlenmiştir (3, 91). Trizomi 18p genellikle çok hafif klinik


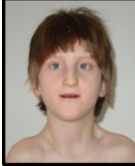
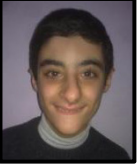
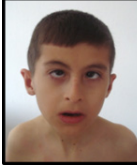
bulgular sergilerken, tetrazomi 18p olgularında daha şiddetli fenotipik özellikler gözlenmektedir. Tetrazomi 18p, klinik bulguları iyi belirlenmiş spesifik bir sendrom olarak literatürde tanımlanmıştır (OMIM#614290). Bu sendroma özgün klinik bulgular zihinsel yetersizlik, büyüme geriliği, yenidoğan döneminde beslenme problemleri, yenidoğan sarılığı, mikrosefali, strabismus, anormal kas tonusu, skolyoz/kifoz ve beyin MRG bulgularıdır. Dismorfik yüz bulguları olarak kulak malformasyonları, küçük burun, yüksek damak, mikrostomi, prognatizm ve mikrognati görülebilir (38, 92).

Çalışmamızda saptanan sSMC(18) olgularının tümü izokromozom 18p yapısına sahiptir ve olgular tetrazomi 18p sendromu olarak tanı aldılar. Tablo 5.3'te literatürdeki tetrazomi 18p hastaları ile çalışmamızdaki olguların klinik bulgularının karşılaştırılması yer almaktadır. Literatürde sıklıkla belirtilen bulgulara ek olarak hastalarımızda neonatal dişler, iki skapula arasında mor maküler lezyon, geniş parmaklar, uzun orta falankslar, 2 ve 3. parmaklarda orta falanksta ilave fleksiyon çizgileri, tenar/hipotenar hipoplazi, bacaklarda ksenotik egzema, aksesuar meme başı, proksimal çıkışlı ve addüksiyonda başparmaklar saptandı.

Onsekizinci kromozomun kısa kolunda p11.32→p11.21 bölgesinde 62 gen yer almaktadır. Birçok farklı fonksiyona sahip bu genlerden yalnızca 6 tanesi bir hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Bu genler *LPIN2* (Majeed sendromu- kronik tekrarlayıcı multifokal osteomyelit ve konjenital diseritropoetik anemi), *TGIF1* (Holoprozensefali-4), *NDUFV2* (Mitokondriyal kompleks I eksikliği), *APCDD1* (Hereditör hipotrikozis simpleks), *AFG3L2* (Spinocerebellar ataksi) ve *MC2R* (ACTH duyarsızlığına bağlı gelişen glukokortikoid eksikliği)'dir (93-98). Bu genlerde hastalığa yol açan mekanizmalar daha çok mutasyonlar veya delesyonlardır ve kopya sayısı artışı ile direkt olarak ilişkilendirilmemişlerdir. Çalışmamızda yapılan SNP-array analizlerinde tetrazomi 18p saptanan olguların üçünde (olgu 1, 3 ve 4) *marker* kromozomun aynı başlangıç ve bitiş noktalarından oluştuğu görüldü. Olgu 2'de saptanan *marker* kromozomun diğerlerinden farklı olarak yaklaşık 0.3 kb daha proksimalden başladığı ve *THOC1* genini içermediği belirlendi. *THOC1* geninin, transkripsiyonel uzama ve mRNA taşınmasında görev alan TREX kompleksindeki proteinleri kodladığı bilinmektedir (99).

Ancak bu genin herhangi bir hastalıkla ilişkisi henüz bilinmemektedir. Tetrazomi 18p sendromu klinik bulguları ile direkt ilişkilendirilmiş herhangi bir gen/genler henüz belirlenmemiştir. Bu çalışmada saptadığımız 4 tetrazomi 18p olgusunda klinik fenotipi oluşumunda bu bölge içerisinde yer alan genlerin dozaj ilişkisi olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 5.3. Tetrazomi 18p sendromu klinik bulgularının olgularımız ile karşılaştırılması (Sebold ve diğ.'nden derlenmiştir) (38).

Bulgular	Görülme yüzdesi	Çalışmamızdaki hastalar			
		Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3	Olgu 4
	(Sebold ve diğ.)				
Zihinsel yetersizlik	%100	+	+	+	+
SSS anomalileri (MRG)	%63	-	+	-	+
Mikrostomi	%55	+	+	-	+
Mikrosefali	%53	+	+	+	+
Göz bulguları (Strabismus)	%45	+	+	+	+
GÜS anomalileri	%39	-	-	-	+
Ayakta sindaktili	%38	-	-	+	-
Kifoz/skolyoz	%37	-	+	-	-
Konstipasyon	%32	+	-	-	-
Büyüme geriliği	%30	+	-	-	+
Heliks anomalileri	%29	-	+	+	-
Yenidoğan sarılığı	%28	+	-	-	-
Kardiyak anomali	%24	-	-	-	+
Nöbetler	%21	-	+	+	+
Gastroözofageal reflü	%14	-	+	-	-
Damak anomalileri	%6	+	-	-	+

5.2. 15. Kromozom kökenli sSMC'ler

Akrosentrik bir kromozom olması nedeniyle 15.kromozomun kısa kolu dozaj-duyarlı değildir. Ayrıca q kolunda da dozaj-duyarlı olmadığı gösterilen perisentrik bölge tarif edilmiştir ve kopya sayısı değişikliğinden etkilenmeyen en küçük alan 15pter - 15q11.2 aralığı olarak belirlenmiştir (3, 91). Literatürde bu bölgenin trizomisi, tetrazomisi ve hekzazomisini içeren olgularda klinik bulgu izlenmediği gösterilmiştir (2).

sSMC'lerin en sıklıkla köken aldığı kromozom 15. kromozomdur (%30). Oluşum şekli olarak en sık *inverted* duplikasyon görülür. Diğer sık görülen oluşum şekilleri sırasıyla ufak sentrik (min), neo-sentromerik ve *ring* şekilli sSMC(15)'lerdir (2). *Inverted* duplikasyon, içerdiği bölgenin tetrazomisine yol açarken ufak sentrik ve *ring* kromozomlar parsiyel trizomiye neden olurlar. Çalışmamızda 2 sSMC(15) olgusunun inv dup(15) yapısına, 1 sSMC(15) olgusunun da min(15) yapısına sahip olduğu gösterildi.

Inv dup(15) sendromu 15. kromozomun proksimalinin *inverted* duplikasyonudur ve idic(15) (izodisentrik 15. kromozom) olarak da gösterilebilir. Inv dup(15) sonucu 15p'nin tamamının ve 15q'nun parsiyel tetrazomisi oluşur. 15. kromozomun *inverted* duplikasyonu tüm sSMC'ler içerisinde en sıklıkla görülenidir (~ %17,5) (2). Santral hipotoni, gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, konuşma bozukluğu ve gecikmesi, epilepsi ve otistik davranışlar başlıca klinik bulgularıdır. Minör dismorfik bulgular olarak aşağı eğimli palpebral aralıklar, epikantal katlantılar, ptosis, kalın dudaklar, geniş burun ve belirgin burun kökü görülebilir (100). Inv dup(15) hastalarında daha çok davranış bozuklukları ön plandadır. Hiperaktivite, sinirlilik, psikomotor ajitasyon, kısa dikkat süresi, ritualistik davranışlar ve stereotipik hareketler öne çıkan diğer bulgulardır. Görülme sıklığının 1/30.000 olduğu düşünülmektedir (101).

Inv dup(15)'ten sonra en sık görülen sSMC(15) oluşum şekli min(15)'tir. Literatürde sınırlı sayıda bildirilen min(15) olgularında normalden şiddetli klinik bulgulara kadar değişen farklı fenotipler gözlemlendiğinden kesin bir klinik korelasyon

yapılamamıştır. Klinik bulgu gösteren olguların büyük bir kısmında 15pter-q13 bölgesinin triplikasyonu gözlenmektedir. Bu olgularda en sıklıkla gözlenen klinik bulgular zihinsel yetersizlik, nöbetler, kardiyak malformasyonlar ve dismorfik yüz görünümüdür (102). Klinik bulguların şiddeti min(15)'in büyüklüğüne göre değişmektedir. Eggerman ve arkadaşlarının 32 sSMC(15) hastası üzerinde yaptıkları bir çalışmada sSMC(15)'in anormal fenotipe yol açması için 15q12 bölgesi veya daha distalini içermesi gerektiği gösterilmiştir (103). Literatürde şu ana kadar saptanmış en büyük min(15) olgusu 15pter-15q21.2 bölgesinin trizomisini içermektedir (102). Zihinsel yetersizlik, gelişimsel gecikme ve birçok organ malformasyonu bulunan bu olgu aritmiler nedeniyle yapılan kardiyak operasyon sonrası 20 aylıkken kaybedilmiştir.

Tablo 5.4'te çalışmamızdaki sSMC(15) hastalarının klinik bulgularıyla literatürdeki bulgular karşılaştırılmıştır.

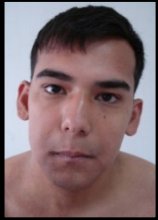
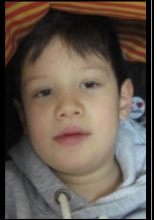
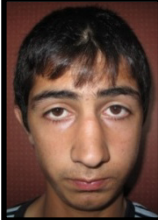
Tablo 5.4: sSMC(15) klinik bulguların çalışmamızdaki hastalar ile karşılaştırılması. Bulgular sSMC(15)'in içerdiği kromozom bölgelerine göre sınıflandırılmıştır. [Liehr (*Small Supernumerary Marker Chromosomes*)'den derlenmiştir] (3).

Literatürdeki Klinik Bulgular	Kromozom Bölgesi		Hastalarımız		
	15pter→15q12	15pter→15q14	Olgu5 (inv dup) 15pter→15q13.3	Olgu6 (inv dup) 15pter→15q13.3	Olgu7 (min) 15pter→15q13.1
ZY *	%95	%100	+	+	+
Nöbetler	%7	%36	+	+	+
Otistik bulgular	%0	%43	-	+	+
Dismorfik yüz	%18	%6	+	+	+
Hipotoni	%7	%5	-	-	-
Büyüme geriliği	%3	%3	-	-	-
Mikrosefali	%0	%2	-	-	-
Hipermelanozis	%0	%3	+	-	-
Kalp defekti	%1	%1	-	-	-

*Zihinsel Yetersizlik

Çalışmamızda yer alan sSMC(15) olgularında zihinsel yetersizlik, nöbet geçirme, davranış bozuklukları ve konuşma geriliği ortak klinik bulgular olarak saptandı. Literatürde belirtildiği üzere bizim olgularımızda da nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgular ön plandaydı (Tablo 5.5).

Tablo 5.5: sSMC 15 hastalarının klinik bulguları

Olgu 5		Olgu 6		Olgu 7	
inv dup (15)(q13.3) 15pter→15q13.3		inv dup (15)(q13.3) 15pter→15q13.3		min(15) 15pter→15q13.1	
Zihinsel yetersizlik		Zihinsel yetersizlik		Zihinsel yetersizlik	
Nöbet öyküsü		Dirençli nöbetler		Yenidoğan döneminde nöbetler	
Davranış bozukluğu (hiperaktivite, sinirlilik)		Konuşma geriliği		Davranış bozukluğu (intihar eğilimi, anksiyete)	
Gövdede pigmenter mozaizm		Mikrocefali		Konuşma geriliği, kekemelik	
Hemihiperplazi		Yüksek ve belirgin alın		Belirgin burun kökü	
Trunkal obezite		Hipertelorizm		Retrognati	
Öne rotasyonlu ve belirgin kulaklar		Epikantal katlantılar		Hafif pektus karinatum	
El eklemlerinde hiperlaksite		Kalın dudaklar		Kubitus valgus	

Sitogenetik olarak tanımlanan iki farklı inv dup(15) *marker* kromozomu vardır:

a) Metasentrik ya da submetacentrik olan ve yalnızca 15q11 bölgesine kadar olan heterokromatin bölgeyi içerip, Prader Willi Sendromu/Angelman Sendromu kritik bölgesini (PWACR) içermeyen *marker* kromozom. Bu kromozom yapısına sahip bireyler genellikle normal fenotipe sahiptirler. Ancak bazı infertilite olgularında bu

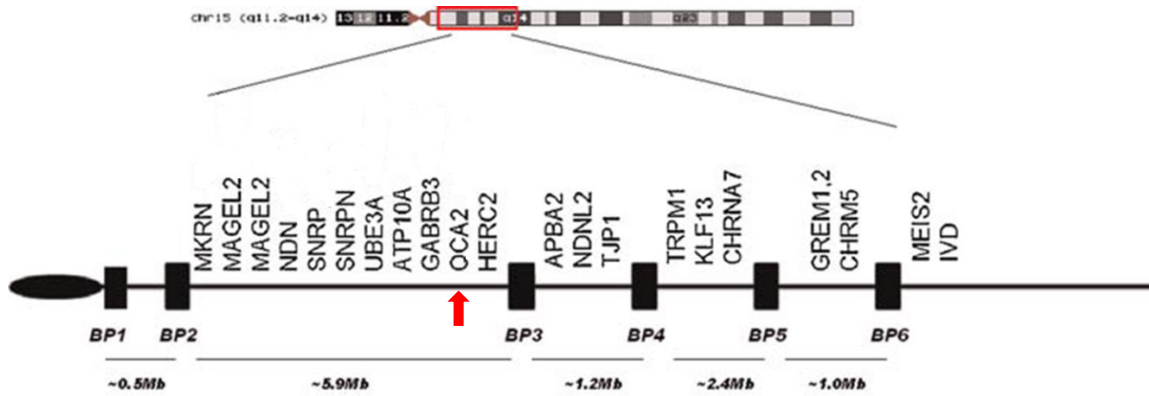
küçük sSMC(15) varlığı gösterilmiştir (103). **b)** PWACR'yi de içeren ve 15q ökromatin bölgelerini içine alan daha büyük *marker* kromozom. Bu kromozom yapısına sahip bireylerde inv dup(15) sendromunun klinik bulguları görülmektedir. Çalışmamızda yer alan iki inv dup(15) olgusunda ikinci tip büyük sSMC(15) varlığı gösterilmiştir.

Literatürde Prader Willi Sendromu ve Angelman Sendromu (PWS/AS) ile birlikte sSMC(15)'nin görüldüğü 44 tane olgu bildirilmiştir (2). Bu yüzden özellikle prenatal dönemde saptanan sSMC15 olgularında PWS/AS için FISH analizinin mutlaka uygulanması önerilmektedir. Çalışmamızda olgu 6 ve 7'ye PWS/AS FISH analizi uygulanmıştır. PWACR'yi içeren bir sSMC(15) ve iki normal 15. kromozom taşıdıkları ve bu bölge için delesyon içermedikleri belirlenmiştir.

15q11-13 kromozom bölgesi tekrar eden DNA bölgeleri içerdiğinden instabil özelliği ile bilinmektedir. Bu bölgede bulunan geniş tekrar sekanslı alanlar (*Low Copy Repeats-LCR*), mayoz bölünme sırasında yanlış hizalanmaya ve hatalı rekombinasyona yol açmaktadır. Bu yüzden bu bölgede birçok kromozom yeniden düzenlenmesi (delesyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar, interstisyel duplikasyonlar triplikasyonlar ve sSMC oluşumu) meydana gelebilmektedir. Bu kromozom yeniden düzenlenmeleri içerisinde hastalık oluşturanlar genellikle kopya sayısı azalmasına neden olanlardır. Bu bölgede meydana gelen delesyon veya UPD sonucu Prader-Willi sendromu (OMIM#176270) ya da Angelman sendromu (OMIM#105830) görülür. Prader-Willi sendromu babadan kalıtılan 15. kromozomun 15q11-q13 bölgesinin delesyonu, maternal UPD15 sonucu ya da PWACR'de lokalize olan *SNRPN* geninde mutasyon olması sonucu oluşur. Angelman sendromu anneden kalıtılan 15. Kromozomun 15q11-q13 bölgesinin delesyonu, paternal UPD15 sonucu veya yine PWACR'de lokalize olan *UBE3A* geninde mutasyon nedeniyle meydana gelir.

15. kromozomun proksimal bölgesi genomik yeniden düzenlenmelerin en sık rastlandığı altı farklı kırık noktası (*breakpoint-BP*) içermektedir. BP1-BP5 15q11-13 bölgesinde, BP6 15q14'te bulunur (Şekil 5.1). En proksimalde bulunan BP1 ve BP2 fenotipi normal olan küçük sSMC(15)'lerin oluşumundan sorumludur. PWACR'yi

içeren 4-Mb'lık segment BP2 ile BP3 arasında yer almaktadır. BP3, BP4 ve BP5 fenotipik bulgu gösteren daha büyük sSMC'lerin oluşumuna yol açmaktadır. BP6'nın sorumlu olduğu sSMC henüz bildirilmemiştir. Çalışmamızda elde edilen array analizi sonuçları olgu 5 ve olgu 6'nın BP5, olgu 7'nin BP3'ten kırılma gösteren sSMC(15) taşıdıklarını göstermektedir.



Şekil 5.1: Proksimal 15q bölgesindeki önemli genlerin ve kırık noktalarının (BP1-BP6) şematik gösterimi. (Kleefstra ve diğ.'nden alınmıştır) (104).

sSMC(15) hastalarında öne çıkan bulgular olan zihinsel yetersizlik, epilepsi ve otizm anormal beyin gelişimi ve/veya fonksiyonu sonucu oluşur. Literatürde otizm benzeri davranış bozuklukları 15q11.2q13 bölgesinin duplikasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Buna yol açan mekanizmanın 15q11.2q13 bölgesinde lokalize olan dozaj-duyarlı genlerdeki kopya sayısı artışı olduğu düşünülmektedir. PWACR'da lokalize olan imprinted genlerden *MKRN3*, *NDN*, *MAGEL2*, *SNRPN* paternal kaynaklı eksprese edilirken; *UBE3A* ve *ATP10A* maternal kaynaklı eksprese edilir ve bu genler nörolojik/nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkilendirilmişlerdir (104, 105). Bu bölge ayrıca GABA_A reseptör genlerini (*GABRB3*, *GABRA5*, ve *GABRG3*) içermektedir. Bu genler otistik bulgulardan sorumlu aday genler olarak gösterilmektedir (106). Gama-

aminobutirik asit (GABA) beyindeki primer inhibitör nörotransmitterdir. Otizmlilerde beyin dokusunda GABRB3 protein düzeyinin azalmış olduğu gösterilmiş ve GABA inhibisyon yolağının disregülasyonunun otizmin oluşmasında rol alabileceği düşünülmüştür (107).

PWACR'de lokalize bir diğer önemli gen *OCA2* genidir. Bu genin mutasyonunda okülökutanöz albinizm tip-2 görülür. *P* geni olarak da isimlendirilen bu gen melanozomal membran proteinini kodlamaktadır. Bu protein iris, deri ve saç pigmentasyonunda rol alır. Protein ekspresyonunun azalması hipopigmentasyona yol açar (108). Literatürde iki mozaik sSMC(15) olgusunda *OCA2* geninde kopya sayısı artışıyla birlikte deride pigmenter displazi varlığı gösterilmiştir (109, 110). Bizim çalışmamızda da mozaik sSMC(15) [47,XY,+mar (%80)/46,XY(%20)] saptanan olgu 5'te ciltte yaygın pigmenter mozaikizm saptanmıştır. Bu bulgu literatürdeki bulguları desteklemektedir ve diğer yayınlarda da belirtildiği gibi *OCA2*'nin kopya sayısındaki artışın hiperpigmentasyon ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Literatürde *OCA2* geninin duplikasyonunun görüldüğü mozaik olmayan olgularda deride yaygın hiperpigmentasyon olduğu saptanmıştır (111, 112). Bizim olgumuzda ve daha önceki iki mozaik olguda hipo/hiperpigmente alanların birlikte görülmesi sSMC(15)'in mozaik formda görülmesi ile açıklanabilir.

PWACR'nin distalinde sSMC(15) hastalarının klinik bulgularıyla ilişkili olabileceği düşünülen, fonksiyonları iyi tanımlanmış bazı önemli genler bulunmaktadır. Bu genlerden kırk noktası 3 ile 5 arasında yer alanlar *APBA2*, *CHRFAM7A*, *CHRNA7*, *ARHGAP11A*'dir. *APBA2* geni, sinaptik veziküllerin ekzositozunda rol alan bir protein kodlar ve bu protein nörotransmitterlere doğrudan bağlanır. Erişkinlerde ve fare embryolarında santral sinir sisteminden eksprese edildiği gösterilmiştir (113). *CHRNA7*, ligand kapılı iyon kanalları ailesinin bir üyesi olan nikotinik alfa 7 kolinerjik reseptördür. Sinapslardaki hızlı sinyal iletiminde görev alır ve nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Yeni tanımlanmış bir gen olan *FAM7A* geni ile birlikte *CHRFAM7A* hibrid genini oluşturur. Protein bu hibrid gen tarafından kodlanmaktadır. Literatürde kırk noktası 4 ile 5 arasında kopya sayısı artışı olan olgularda bipolar bozukluk, kendine

zarar verme ve otistik davranışlar gibi psikiyatrik hastalıklar saptanmıştır (114). Bizim çalışmamızda da bu gen bölgelerini içeren sSMC(15)'e sahip olgu 7'de intihar eğilimi ve çevreye zarar verme gibi psikiyatrik bulgulara rastlanmıştır. *ARHGAP11A* geni, Rho GTPaz aktive edici protein 11A'yı kodlar ve bu protein ile zihinsel yetersizlik arasında güçlü bir ilişki kurulmuştur. Bu gendeki ve ilgili sinyal yolağındaki mutasyonlar ile nörolojik hastalıklar ilişkilendirilmiştir (115).

Çalışmamızda 15. kromozomun q kolunda bulunan dozaj duyarlı genler ile hastalarımızdaki klinik bulgular arasında korelasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Genel olarak tüm kopya sayısı değişikliklerinde olduğu gibi bu bölgede bulunan genlerin de daha çok kopya sayısı kaybında klinik bulgular görülmektedir. Ancak kopya sayısı artışı ile ilişkilendirilmiş genler de mevcuttur ve çalışmamızdaki hastalarda bunu destekleyici klinik bulgulara rastlanmıştır. Literatürde PWACR'de lokalize genlerin kopya sayısı artışı ile nöropsikiyatrik bulgular ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızdaki sSMC(15) olgularında tespit edilen konuşma bozuklukları ve davranış problemleri gibi klinik bulguların *marker* kromozomun içerdiği genlerin kopya sayısı artışı sonucu meydana geldiği düşünülmektedir.

Marker kromozomlar konvansiyonel sitogenetik ve rutin moleküler sitogenetik yöntemler kullanılarak karakterize edilebilmektedir. Ancak hastalardaki klinik bulgular ile marker kromozomların oluşum şekli ve gen içeriği arasında daha detaylı bir ilişki kurabilmek amacıyla ileri analiz yöntemlerine başvurulmaktadır. Çalışmamızda kullanılan *array* analizi ile marker kromozomların kırık noktaları ve gen içerikleri tespit edilerek subcenM-FISH analizi sonuçları ile konfirme edilmiştir. SubcenM-FISH'in *array* analizine göre üstünlüğü marker kromozomların oluşum şeklini net olarak göstermesidir. Çalışmamızda olgu 5 ve olgu 7'nin sahip olduğu marker kromozomların şekli *array* analizi ile ayırt edilemezken, subcenM-FISH analizi ile bu iki hastanın farklı şekillerde marker kromozomlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden *marker* kromozom hastalarında tespit edilen sSMC'lere *array* analizi uygulanması halinde elde edilen sonuçlar subcenM-FISH gibi ileri bir FISH analizi ile konfirme edilmelidir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada;

1. Kromozom analizlerinde *marker* kromozomu belirlenen 7 olguda subcenM-FISH ve SNP array analizleri ile sSMC karakterizasyonu yapıldı. 4 hastada tetrazomi 18p, 2 hastada inv dup(15) ve 1 hastada da min(15) saptandı. Hastalar sahip oldukları sSMC türüne göre sınıflandırıldı ve ortak klinik bulguları tespit edildi.

2. Tetrazomi 18p yapısında sSMC'ye sahip hastalarda literatürde belirtilen ortak bulgularla örtüşen klinik bulgular saptandı. Zihinsel yetersizlik, mikrosefali, strabismus, mikrostomi, nöbetler, büyüme geriliği, heliks anomalisi, yüksek damak ve beyin MRG bulguları hastalarımızda saptanan klinik bulgulardı. Ayrıca literatürde spesifik olarak belirtilmeyen belirgin burun kökü, neonatal diş öyküsü, aksesuar meme başı, proksimal çıkışlı başparmaklar ve el falankslarında ilave fleksör çizgi varlığı belirlendi.

3. 15. kromozom kökenli sSMC hastalarında saptanan ortak klinik bulgular zihinsel yetersizlik, nöbet geçirme, davranış bozuklukları ve konuşma geriliğiydi. Literatürdeki sSMC olguları ile uyumlu olarak bizim olgularımızda da nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgular ön plandaydı. Olgularımızda tespit edilen sSMC(15)'lerin içerdiği dozaj-duyarlı ve imprinted genler ile hastalarımızın klinik bulguları ilişkilendirildi. PWACR'de lokalize *MKRN3*, *NDN*, *MAGEL2*, *SNRPN*, *UBE3A* ve *ATP10A* genlerinde; GABA_A reseptör genlerinde (*GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*) ve BP3-BP5 arasında yer alan *ABPA2*, *CHRFAM7A*, *CHRNA7* ve *ARHGAP11A* genlerinde meydana gelen dozaj değişikliğinin hastalarımızın nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgularından sorumlu olduğu düşünüldü.

4. Mozaik sSMC(15)'e sahip olgu 5'te diğer sSMC(15) olgularımızdan farklı olarak ciltte pigmenter mozaisizm saptandı. Bu bulgunun literatürde daha önce iki olguda *OCA2* geninin tetrazomisi ve heksazomisi ile ilişkilendirildiği görüldü. Bizim olgumuzda da ciltte görülen bu hipo/hiperpigmente alanların *OCA2* genindeki kopya sayısı artışı ile ilişkili olduğu düşünüldü.

5. Elde edilen klinik ve laboratuvar bulguları ile literatür bilgilerinin karşılaştırılması sonucunda tetrazomi 18p ve sSMC(15) hastalarının takip süreci için şu basamakların izlenmesi önerilir:

- Ayrıntılı klinik değerlendirme ve genetik danışmanlık
- Parental kromozom ve/veya FISH analizi
- Periyodik göz muayenesi
- Kronik otitis media açısından KBB takibi
- Kardiyolojik değerlendirme
- Renal US incelemesi
- Ayak anomalileri ve skolyoz/kifoz açısından ortopedik değerlendirme
- Nöbetler ve zihinsel yetersizlik açısından nörolojik ve psikometrik değerlendirme
- Davranış bozuklukları açısından çocuk ruh sağlığı değerlendirmesi
- Yutma güçlüğü, gastroözofageal reflü ve konstipasyon açısından gastroenteroloji takibi
- Büyüme geriliği açısından endokrinoloji değerlendirmesi

6. Prenatal ve postnatal saptanan sSMC'lerin karakterizasyonu, *marker* kromozomun yol açabileceği fenotipi belirlemek açısından kritik bir aşamadır. Bu çalışmada belirtilen karakterizasyon basamakları takip edilerek sSMC'li olguların büyük bir kısmına tanı konulması mümkündür. Elde edilen veriler literatür bilgileri ile karşılaştırılarak hastalarda genotip-fenotip ilişkisi kurulmalı, özellikle prenatal olgularda mümkün olduğunca hızlı ve detaylı analizler yapılarak ayrıntılı genetik danışma verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Liehr, T.,Weise, A. (2007) Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med*, 19 (5), 719-731.
2. Liehr, T. (2012). The sSMC homepage. Erişim: 10 Ekim 2012,<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START>.
3. Liehr, T. (2012). Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). Almanya: Springer.
4. Liehr, T., Mrasek, K., Weise, A., Dufke, A., Rodriguez, L., Martinez Guardia, N. ve diğerleri. (2006) Small supernumerary marker chromosomes--progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res*, 112 (1-2), 23-34.
5. Baldwin, E.L., May, L.F., Justice, A.N., Martin, C.L.,Ledbetter, D.H. (2008) Mechanisms and consequences of small supernumerary marker chromosomes: from Barbara McClintock to modern genetic-counseling issues. *Am J Hum Genet*, 82 (2), 398-410.
6. Sheth, F., Andrieux, J., Ewers, E., Kosyakova, N., Weise, A., Sheth, H. ve diğerleri. (2011) Characterization of sSMC by FISH and molecular techniques. *Eur J Med Genet*, 54 (3), 247-255.
7. Starke, H., Nietzel, A., Weise, A., Heller, A., Mrasek, K., Belitz, B. ve diğerleri. (2003) Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet*, 114 (1), 51-67.
8. Liehr, T., Claussen, U.,Starke, H. (2004) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*, 107 (1-2), 55-67.
9. Crolla, J.A., Long, F., Rivera, H.,Dennis, N.R. (1998) FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases. *Am J Med Genet*, 75 (4), 355-366.

10. Hook, E.B., Cross, P.K. (1987) Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age. *Am J Hum Genet*, 40 (2), 83-101.
11. Blennow, E., Bui, T.H., Kristoffersson, U., Vujic, M., Anneren, G., Holmberg, E. ve diğeri. (1994) Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn*, 14 (11), 1019-1028.
12. Choo, K.H. (1997) Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet*, 61 (6), 1225-1233.
13. Bartels, I., Schlueter, G., Liehr, T., von Eggeling, F., Starke, H., Glaubitz, R. ve diğeri. (2003) Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: trisomy rescue due to marker chromosome formation. *Cytogenet Genome Res*, 101 (2), 103-105.
14. Maurer, B., Haaf, T., Stout, K., Reissmann, N., Steinlein, C., Schmid, M. (2001) Two supernumerary marker chromosomes, originating from chromosomes 6 and 11, in a child with developmental delay and craniofacial dysmorphism. *Cytogenet Cell Genet*, 93 (3-4), 182-187.
15. Nelle, H., Schreyer, I., Ewers, E., Mrasek, K., Kosyakova, N., Merkas, M. ve diğeri. (2010) Presence of harmless small supernumerary marker chromosomes hampers molecular genetic diagnosis: a case report. *Mol Med Report*, 3 (4), 571-574.
16. Stephane, P., Genevieve, L. (1999) Prenatal supernumerary r(16) chromosome characterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 19 (2), 181-182.
17. Hahn, M., Dambacher, S., Schotta, G. (2010) Heterochromatin dysregulation in human diseases. *J Appl Physiol*, 109 (1), 232-242.

18. Zackai, E.H., Emanuel, B.S. (1980) Site-specific reciprocal translocation, t(11;22) (q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. *Am J Med Genet*, 7 (4), 507-521.
19. Carter, M.T., St Pierre, S.A., Zackai, E.H., Emanuel, B.S., Boycott, K.M. (2009) Phenotypic delineation of Emanuel syndrome (supernumerary derivative 22 syndrome): Clinical features of 63 individuals. *Am J Med Genet A*, 149A (8), 1712-1721.
20. Medne L, Z.E., Emanuel BS. (2010). Emanuel syndrome Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K (ed) GeneReviews University of Washington, Seattle.
21. Schachenmann, G., Schmid, W., Fraccaro, M., Mannini, A., Tiepolo, L., Perona, G.P. ve diğerleri. (1965) Chromosomes in Coloboma and Anal Atresia. *Lancet*, 2 (7406), 290.
22. Magenis, R.E., Sheehy, R.R., Brown, M.G., McDermid, H.E., White, B.N., Zonana, J. ve diğerleri. (1988) Parental origin of the extra chromosome in the cat eye syndrome: evidence from heteromorphism and in situ hybridization analysis. *Am J Med Genet*, 29 (1), 9-19.
23. Gentile, M., De Sanctis, S., Cariola, F., Spezzi, T., Di Carlo, A., Tontoli, F. ve diğerleri. (2005) FISH approach to determine cat eye syndrome chromosome breakpoints of a patient with cat eye syndrome type II. *Eur J Med Genet*, 48 (1), 33-39.
24. Liehr, T., Pfeiffer, R.A., Trautmann, U. (1992) Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH. *Clin Genet*, 42 (2), 91-96.
25. Belien, V., Gerard-Blanluet, M., Serero, S., Le Du, N., Baumann, C., Jacquemont, M.L. ve diğerleri. (2008) Partial trisomy of chromosome 22 resulting from a supernumerary marker chromosome 22 in a child with features of cat eye syndrome. *Am J Med Genet A*, 146A (14), 1871-1874.

26. Mears, A.J., Duncan, A.M., Budarf, M.L., Emanuel, B.S., Sellinger, B., Siegel-Bartelt, J. ve diğerleri. (1994) Molecular characterization of the marker chromosome associated with cat eye syndrome. *Am J Hum Genet*, 55 (1), 134-142.
27. Turleau, C. (2005) Orphanet cat-eye syndrome, Erişim 10 Ekim 2012, ORPHA195.http://www.orpha.net/consor/cgibin/Disease_Search.php?Ing=EN&Expert=195&data_id=246&addSigns=1.
28. Pallister, P.D., Meisner, L.F., Elejalde, B.R., Francke, U., Herrmann, J., Spranger, J. ve diğerleri. (1977) The pallister mosaic syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 13 (3B), 103-110.
29. Teschler-Nicola M, K.W. (1981) Case report 72: mental retardation, unusual facial appearance, abnormal hair. . *Syndr Identif*, 7, 6-7.
30. Choo, S., Teo, S.H., Tan, M., Yong, M.H., Ho, L.Y. (2002) Tissue-limited mosaicism in Pallister-Killian syndrome -- a case in point. *J Perinatol*, 22 (5), 420-423.
31. Velagaleti, G.V., Tapper, J.K., Rampy, B.A., Zhang, S., Hawkins, J.C., Lockhart, L.H. (2003) A rapid and noninvasive method for detecting tissue-limited mosaicism: detection of i(12)(p10) in buccal smear from a child with Pallister-Killian syndrome. *Genet Test*, 7 (3), 219-223.
32. Bielanska, M.M., Khalifa, M.M., Duncan, A.M. (1996) Pallister-Killian syndrome: a mild case diagnosed by fluorescence in situ hybridization. Review of the literature and expansion of the phenotype. *Am J Med Genet*, 65 (2), 104-108.
33. Chen, C.P. (2007) Chromosomal abnormalities associated with omphalocele. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46 (1), 1-8.
34. Cormier-Daire, V., Le Merrer, M., Gigarel, N., Morichon, N., Prieur, M., Lyonnet, S. ve diğerleri. (1997) Prezygotik origin of the isochromosome 12p in Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet*, 69 (2), 166-168.

35. Huang, X.L., Isabel de Michelena, M., Leon, E., Maher, T.A., McClure, R., Milunsky, A. (2007) Pallister-Killian syndrome: tetrasomy of 12pter-->12p11.22 in a boy with an analphoid, inverted duplicated marker chromosome. *Clin Genet*, 72 (5), 434-440.
36. Dufke, A., Walczak, C., Liehr, T., Starke, H., Trifonov, V., Rubtsov, N. ve diğeri. (2001) Partial tetrasomy 12pter-12p12.3 in a girl with Pallister-Killian syndrome: extraordinary finding of an analphoid, inverted duplicated marker. *Eur J Hum Genet*, 9 (8), 572-576.
37. Vermeesch, J.R., Melotte, C., Salden, I., Riegel, M., Trifonov, V., Polityko, A. ve diğeri. (2005) Tetrasomy 12pter-12p13.31 in a girl with partial Pallister-Killian syndrome phenotype. *Eur J Med Genet*, 48 (3), 319-327.
38. Sebold, C., Roeder, E., Zimmerman, M., Soileau, B., Heard, P., Carter, E. ve diğeri. (2010) Tetrasomy 18p: report of the molecular and clinical findings of 43 individuals. *Am J Med Genet A*, 152A (9), 2164-2172.
39. Taylor, K.M., Wolfinger, H.L., Brown, M.G., Chadwick, D.L. (1975) Origin of a small metacentric chromosome: familial and cytogenic evidence. *Clin Genet*, 8 (5), 364-369.
40. Takeda, K., Okamura, T., Hasegawa, T. (1989) Sibs with tetrasomy 18p born to a mother with trisomy 18p. *J Med Genet*, 26 (3), 195-197.
41. Abeliovich, D., Dagan, J., Levy, A., Steinberg, A., Zlotogora, J. (1993) Isochromosome 18p in a mother and her child. *Am J Med Genet*, 46 (4), 392-393.
42. Boyle, J., Sangha, K., Dill, F., Robinson, W.P., Yong, S.L. (2001) Grandmaternal origin of an isochromosome 18p present in two maternal half-sisters. *Am J Med Genet*, 101 (1), 65-69.
43. Classic pages in obstetrics and gynecology by Henry H. Turner. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*, vol. 23, pp. 566-574, 1938. (1972) *Am J Obstet Gynecol*, 113 (2), 279.
44. Ford, C.E., Jones, K.W., Polani, P.E., De Almeida, J.C., Briggs, J.H. (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, 1 (7075), 711-713.

45. Liehr, T., Mrasek, K., Hinreiner, S., Reich, D., Ewers, E., Bartels, I. ve diğeri. (2007) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar karyotype - 17 new cases and a review of the literature. *Sex Dev*, 1 (6), 353-362.
46. Oliveira, R.M., Verreschi, I.T., Lipay, M.V., Eca, L.P., Guedes, A.D., Bianco, B. (2009) Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J*, 127 (6), 373-378.
47. Davenport, M.L. (2010) Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (4), 1487-1495.
48. Mrasek, K., Starke, H., Liehr, T. (2005) Another small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 2: towards a genotype/phenotype correlation. *J Histochem Cytochem*, 53 (3), 367-370.
49. Niksic, S.B., Deretic, V.I., Pilic, G.R., Ewers, E., Merkas, M., Ziegler, M., Liehr, T. (2010) Trisomy 21 with a small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 13/21 and 18. *Balk J Med Genet*, 13, 55-58.
50. Rivera, H., Moller, M., Hernandez, A., Enriquez-Guerra, M.A., Arreola, R., Cantu, J.M. (1984) Tetrasomy 18p: a distinctive syndrome. *Ann Genet*, 27 (3), 187-189.
51. Nietzel, A., Albrecht, B., Starke, H., Heller, A., Gillessen-Kaesbach, G., Claussen, U. ve diğeri. (2003) Partial hexasomy 15pter-->15q13 including SNRPN and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. *J Med Genet*, 40 (3), e28.
52. Liehr, T., Karamysheva, T., Merkas, M., Brecevic, L., Hamid, A.B., Ewers, E. ve diğeri. (2010) Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. *Curr Genomics*, 11 (6), 432-439.
53. Fickelscher, I., Starke, H., Schulze, E., Ernst, G., Kosyakova, N., Mkrtchyan, H. ve diğeri. (2007) A further case with a small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 1--evidence for high variability in mosaicism in different tissues of sSMC carriers. *Prenat Diagn*, 27 (8), 783-785.

54. Engel, E. (1980) A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet A*, 6, 137-143.
55. Creau-Goldberg, N., Gegonne, A., Delabar, J. et al. (1987) Maternal origin of a de novo balanced t(21q21q) identified by ets-2 polymorphism. *Hum genet*, 76, 396-398.
56. Liehr, T. (2010) Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet*, 3, 8.
57. Liehr, T., Ewers, E., Hamid, A.B., Kosyakova, N., Voigt, M., Weise, A. ve diğeri. (2011) Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*, 59 (9), 842-848.
58. Liehr, T. (2006) Familial small supernumerary marker chromosomes are predominantly inherited via the maternal line. *Genet Med*, 8 (7), 459-462.
59. Kotzot, D. (2002) Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence? *J Med Genet*, 39 (10), 775-778.
60. Shaffer, B.L., Caughey, A.B., Norton, M.E. (2006) Variation in the decision to terminate pregnancy in the setting of fetal aneuploidy. *Prenat Diagn*, 26 (8), 667-671.
61. Warburton, D. (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet*, 49 (5), 995-1013.
62. Crolla, J.A., Youings, S.A., Ennis, S., Jacobs, P.A. (2005) Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet*, 13 (2), 154-160.
63. Kumar, C., Kleyman, S.M., Samonte, R.V., Verma, R.S. (1997) Marker chromosomes in fetal loss. *Hum Reprod*, 12 (6), 1321-1324.
64. Graf, M.D., Christ, L., Mascarello, J.T., Mowrey, P., Pettenati, M., Stetten, G. ve diğeri. (2006) Redefining the risks of prenatally ascertained supernumerary marker chromosomes: a collaborative study. *J Med Genet*, 43 (8), 660-664.

65. Daniel, A., Malafiej, P. (2003) A series of supernumerary small ring marker autosomes identified by FISH with chromosome probe arrays and literature review excluding chromosome 15. *Am J Med Genet A*, 117A (3), 212-222.
66. Chandley, A.C., Edmond, P., Christie, S., Gowans, L., Fletcher, J., Frackiewicz, A. ve diğeri. (1975) Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet*, 39 (2), 231-254.
67. Manvelyan, M., Riegel, M., Santos, M., Fuster, C., Pellestor, F., Mazaurik, M.L. ve diğeri. (2008) Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *Int J Mol Med*, 21 (6), 705-714.
68. Friedrich, U., Nielsen, J. (1974) Bisatellited extra small metacentric chromosome in newborns. *Clin Genet*, 6 (1), 23-31.
69. Oracova, E., Musilova, P., Kopecna, O., Rybar, R., Vozdova, M., Vesela, K. ve diğeri. (2009) Sperm and embryo analysis in a carrier of supernumerary inv dup(15) marker chromosome. *J Androl*, 30 (3), 233-239.
70. Liehr, T., Mrasek, K., Kosyakova, N., Ogilvie, C.M., Vermeesch, J., Trifonov, V. ve diğeri. (2008) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans; are there B chromosomes hidden among them. *Mol Cytogenet*, 1, 12.
71. Mau-Holzmann, U.A. (2005) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*, 111 (3-4), 317-336.
72. Bertini, V., Viola, D., Vitti, P., Simi, P., Valetto, A. (2012) An idic(15) associated with POF (premature ovarian failure): molecular cytogenetic definition of a case and review of the literature. *Gene*, 503 (1), 123-125.
73. Gray, B.A., Bent-Williams, A., Wolff, D.J., Zori, R.T. (2001) A non-sex chromosome marker in a patient with an atypical Ullrich-Turner phenotype and mosaicism of 46,X,mar/46,XX. *Clin Genet*, 60 (1), 73-76.
74. Wiktor, A., Van Dyke, D.L. (2004) FISH analysis helps identify low-level mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Genet Med*, 6 (3), 132-135.

75. Sheth, F., Ewers, E., Kosyakova, N., Weise, A., Sheth, J., Desai, M. ve diğerleri. (2009) A small supernumerary marker chromosome present in a Turner syndrome patient not derived from X- or Y-chromosome: a case report. *Mol Cytogenet*, 2, 22.
76. Ulmer, R., Pfeiffer, R.A., Wiest, E., Goelz, R., Trautmann, U. (1997) Multiple (up to seven) different accessory small marker chromosomes: prenatal diagnosis and follow-up. *Ann Genet*, 40 (2), 109-114.
77. Chen, M., Chang, S.P., Yin, P.L., Sapeta, M., Barringer, S., Kuo, S.J. ve diğerleri. (2006) Prenatal identification of small supernumerary marker chromosomes by FISH in an infant born with mild congenital anomalies. *Prenat Diagn*, 26 (4), 383-387.
78. Liehr, T., Starke, H., Senger, G., Melotte, C., Weise, A., Vermeesch, J.R. (2006) Overrepresentation of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) from chromosome 6 origin in cases with multiple sSMC. *Am J Med Genet A*, 140 (1), 46-51.
79. Beverstock, G.C., Bezrookove, V., Mollevanger, P., van de Kamp, J.J., Pearson, P., Kouwenberg, J.M. ve diğerleri. (2003) Multiple supernumerary ring chromosomes of different origin in a patient: a clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 122A (2), 168-173.
80. Nicolaidis, P., Petersen, M.B. (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, 13 (2), 313-319.
81. Shah, K., Sivapalan, G., Gibbons, N., Tempest, H., Griffin, D.K. (2003) The genetic basis of infertility. *Reproduction*, 126 (1), 13-25.
82. Smits, L.J., de Bie, R.A., Essed, G.G., van den Brandt, P.A. (2005) Time to pregnancy and sex of offspring: cohort study. *BMJ*, 331 (7530), 1437-1438.
83. Anderlid, B.M., Sahlen, S., Schoumans, J., Holmberg, E., Ahsgren, I., Mortier, G. ve diğerleri. (2001) Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am J Med Genet*, 99 (3), 223-233.

84. Mears, A.J., el-Shanti, H., Murray, J.C., McDermid, H.E., Patil, S.R. (1995) Minute supernumerary ring chromosome 22 associated with cat eye syndrome: further delineation of the critical region. *Am J Hum Genet*, 57 (3), 667-673.
85. Ing, P.S., Lubinsky, M.S., Smith, S.D., Golden, E., Sanger, W.G., Duncan, A.M. (1987) Cat-eye syndrome with different marker chromosomes in a mother and daughter. *Am J Med Genet*, 26 (3), 621-628.
86. Tabor, H.K., Cho, M.K. (2007) Ethical implications of array comparative genomic hybridization in complex phenotypes: points to consider in research. *Genet Med*, 9 (9), 626-631.
87. Weise, A., Gross, M., Mrasek, K., Mkrtychyan, H., Horsthemke, B., Jonsrud, C. ve diğeri. (2008) Parental-origin-determination fluorescence in situ hybridization distinguishes homologous human chromosomes on a single-cell level. *Int J Mol Med*, 21 (2), 189-200.
88. Speicher, M.R., Carter, N.P. (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6 (10), 782-792.
89. Rauch, A., Pfeiffer, R.A., Trautmann, U., Liehr, T., Rott, H.D., Ulmer, R. (1992) A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet*, 42 (2), 84-90.
90. Kotzot, D., Bundscherer, G., Bernasconi, F., Brecevic, L., Lurie, I.W., Basaran, S. ve diğeri. (1996) Isochromosome 18p results from maternal meiosis II nondisjunction. *Eur J Hum Genet*, 4 (3), 168-174.
91. Kosyakova, N., Weise, A., Mrasek, K., Claussen, U., Liehr, T., Nelle, H. (2009) The hierarchically organized splitting of chromosomal bands for all human chromosomes. *Mol Cytogenet*, 2, 4.
92. Swingle, H.M., Ringdahl, J., Mraz, R., Patil, S., Keppler-Noreuil, K. (2006) Behavioral management of a long-term survivor with tetrasomy 18p. *Am J Med Genet A*, 140 (3), 276-280.

93. Ferguson, P.J., Chen, S., Tayeh, M.K., Ochoa, L., Leal, S.M., Pelet, A. ve diğerleri. (2005) Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J Med Genet*, 42 (7), 551-557.
94. Aguilera, C., Dubourg, C., Attia-Sobol, J., Vigneron, J., Blayau, M., Pasquier, L. ve diğerleri. (2003) Molecular screening of the TGIF gene in holoprosencephaly: identification of two novel mutations. *Hum Genet*, 112 (2), 131-134.
95. Benit, P., Beugnot, R., Chretien, D., Giurgea, I., De Lonlay-Debeney, P., Issartel, J.P. ve diğerleri. (2003) Mutant NDUFB2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat*, 21 (6), 582-586.
96. Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A. ve diğerleri. (2010) APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature*, 464 (7291), 1043-1047.
97. Pierson, T.M., Adams, D., Bonn, F., Martinelli, P., Cherukuri, P.F., Teer, J.K. ve diğerleri. (2011) Whole-exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases. *PLoS Genet*, 7 (10), e1002325.
98. Artigas, R.A., Gonzalez, A., Riquelme, E., Carvajal, C.A., Cattani, A., Martinez-Aguayo, A. ve diğerleri. (2008) A novel adrenocorticotropin receptor mutation alters its structure and function, causing familial glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (8), 3097-3105.
99. Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S. ve diğerleri. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, 417 (6886), 304-308.
100. Dennis, N.R., Veltman, M.W., Thompson, R., Craig, E., Bolton, P.F., Thomas, N.S. (2006) Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11-q13. *Am J Med Genet A*, 140 (5), 434-441.

101. Battaglia, A. (2008) The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis*, 3, 30.
102. Pacanaro, A.N., Christofolini, D.M., Kulikowski, L.D., Belangero, S.I., da Silva Bellucco, F.T., Varela, M.C. ve diğerleri. (2010) A rare case of trisomy 15pter-q21.2 due to a de novo marker chromosome. *Am J Med Genet A*, 152A (3), 753-758.
103. Eggermann, K., Mau, U.A., Bujdoso, G., Koltai, E., Engels, H., Schubert, R. ve diğerleri. (2002) Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet*, 62 (1), 89-93.
104. Kleefstra, T., de Leeuw, N., Wolf, R., Nillesen, W.M., Schobers, G., Mieloo, H. ve diğerleri. (2010) Phenotypic spectrum of 20 novel patients with molecularly defined supernumerary marker chromosomes 15 and a review of the literature. *Am J Med Genet A*, 152A (9), 2221-2229.
105. Kitsiou-Tzeli, S., Tzetis, M., Sofocleous, C., Vrettou, C., Xaidara, A., Giannikou, K. ve diğerleri. (2010) De novo interstitial duplication of the 15q11.2-q14 PWS/AS region of maternal origin: Clinical description, array CGH analysis, and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 152A (8), 1925-1932.
106. Kim, S.A., Kim, J.H., Park, M., Cho, I.H., Yoo, H.J. (2006) Association of GABRB3 polymorphisms with autism spectrum disorders in Korean trios. *Neuropsychobiology*, 54 (3), 160-165.
107. Samaco, R.C., Hogart, A., LaSalle, J.M. (2005) Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet*, 14 (4), 483-492.
108. Donnelly, M.P., Paschou, P., Grigorenko, E., Gurwitz, D., Barta, C., Lu, R.B. ve diğerleri. (2012) A global view of the OCA2-HERC2 region and pigmentation. *Hum Genet*, 131 (5), 683-696.
109. Akahoshi, K., Spritz, R.A., Fukai, K., Mitsui, N., Matsushima, K., Ohashi, H. (2004) Mosaic supernumerary inv dup(15) chromosome with four copies of the P gene in a boy with pigmentary dysplasia. *Am J Med Genet A*, 126A (3), 290-292.

110. Kraoua, L., Chaabouni, M., Ewers, E., Chelly, I., Ouertani, I., Ben Jemaa, L. ve diğerleri. (2011) Hexasomy of the Prader-Willi/Angelman critical region, including the OCA2 gene, in a patient with pigmentary dysplasia: case report. *Eur J Med Genet*, 54 (4), e446-450.
111. Akahoshi, K., Fukai, K., Kato, A., Kimiya, S., Kubota, T., Spritz, R.A. (2001) Duplication of 15q11.2-q14, including the P gene, in a woman with generalized skin hyperpigmentation. *Am J Med Genet*, 104 (4), 299-302.
112. Viersbach, R., Engels, H., Gamerdinger, U., Hansmann, M. (1998) Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am J Med Genet*, 76 (4), 351-358.
113. Sutcliffe, J.S., Han, M.K., Amin, T., Kesterson, R.A., Nurmi, E.L. (2003) Partial duplication of the APBA2 gene in chromosome 15q13 corresponds to duplicon structures. *BMC Genomics*, 4 (1), 15.
114. van Bon, B.W., Mefford, H.C., Menten, B., Koolen, D.A., Sharp, A.J., Nillesen, W.M. ve diğerleri. (2009) Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet*, 46 (8), 511-523.
115. van Galen, E.J., Ramakers, G.J. (2005) Rho proteins, mental retardation and the neurobiological basis of intelligence. *Prog Brain Res*, 147, 295-317.

EK 1 Hastaların Dökümü

Sıra No	Hasta Adı	Dosya No	Genetik No	Başvuru Yaşı	Cins	Karyotip	sSMC
1	AK	2815101	45268	6/12	K	47,XX,+mar	İzokromozom 18p
2	KY	1609791	41608	8 ^{5/12}	K	47,XX,+mar	İzokromozom 18p
3	AA	2686193	43044	5	E	47,XY,+mar	İzokromozom 18p
4	RY	2848811	49011	8	E	47,XY,+mar	İzokromozom 18p
5	CU	3254909	46816	15	E	47,XY,+mar (%80)/46,XY(%20)	inv dup (15)(q13.3)
6	EÖ	2676905	42244	13/12	E	47,XY,+mar	inv dup (15)(q13.3)
7	BT	2606087	48406	15	E	47,XY,+mar	min(15)(pter→q13.1:)