



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**NÖRAL TÜP KAPANMA HASTALIĞI OLAN HASTALARDA
KARYOTİP ANALİZİ**

Dr. Akif YILDIRIM

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

**SİVAS
2013**



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**NÖRAL TÜP KAPANMA HASTALIĞI OLAN HASTALARDA
KARYOTİP ANALİZİ**

Dr. Akif YILDIRIM
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Yard.Doç. Dr. Fatih BAYRAKLI
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

**SİVAS
2013**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010/1-2 sayılı kararı ile kabul edilen tez yazım yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye

Prof. Dr. Özen Karadağ

Üye

Prof. Dr. Mustafa Gürelik

Üye

Yard. Doç. Dr. Fatih Bayraklı

Bu tez, 04/10/2012 tarih ve 2012/1 sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gökhan KÖYLÜOĞLU

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim dalı bölümünde uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini bizlere aktaran değerli hocalarım, başta anabilim dalı başkanımız Prof. Mustafa Gürelık olmak üzere, Prof. Dr. H. Zafer Kars , Prof. Dr. Özen Karadağ, Doç. Dr. Ünal Özüm ve Yard. Doç. Dr. Fatih Bayraklı'ya teşekkür ederim. Tezimin konu seçiminden itibaren her aşamasında, oluşumunda ve yönlendirilmesinde yardım eden değerli tez hocam Yard. Doç. Dr. Fatih Bayraklı'ya teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı, Beyin ve Sinir Cerrahisi Bölümündeki bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tüm eğitimim boyunca bana destek olan sevgili aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Nöral tüp kusuru (NTK) nöral tüpün kapanmasındaki yetersizliğe ikincil oluşan santral sinir sisteminin (SSS) konjenital malformasyonunu belirten genel bir terimdir. Tüm dünyadaki insidansı her 1000 doğumda 1 ila 10 arasında değişmektedir. Olguların büyük kısmı anensefali veya spina bifida (SB) olarak sınıflandırılabilir ve bu iki grup doğumda aynı sıklıkta görülür. Gelişen tıbbi tedavi yöntemleri sonucunda SB'lı hastaların daha uzun yaşamasına olanak vermiştir. SB grubunun altında meningomyelosel (MM), meningoşel ve lipomeningoşel gibi alt gruplar incelenir.

Bazı gözlemler NTK oluşumunda genetik faktörlerin rol oynadığını düşündürmüştür. Öncelikli olarak bazı etnik/ırk (İrlanda'lı ve Meksika'lı) gruplarında daha yüksek görülmesi, ikinci olarak birinci derece akrabalarında NTK olan ailelerde bu hastalığın ortaya daha sık çıkması, üçüncü olarak 200'den fazla NTK fare modelinde bir kısmında kendiliğinden, bir kısmında ise genetik mühendislik sonucunda bu hastalığın ortaya çıkmasıdır. Bunların dışında NTK tek gen bozuklukları ve aynı zamanda kromozomal bozukluklarla beraber seyreden bazı sendromların fenotipik bir özelliği olarak karşımıza çıkması genetik tabanlı bir patogenezi düşündürmektedir. Fakat rutin olarak kullanılan pozisyonel klonlama ve bağlantı analizi gibi hastalığa yol açan geni ortaya çıkarma yöntemleri genellikle bir ailede bir etkilenmiş birey olduğundan dolayı uygulanabilir görülmemektedir.

İnsan genomundaki yapısal değişkenler, genomun bir parçasını içeren mikroskobik veya submikroskobik olabilen genellikle 1 kilobazdan daha geniş değişimler olarak tariflenir. Bu yapısal değişkenler kopya sayısı değişkenliği, kopya sayısı polimorfizmi, segmental duplikasyon veya düşük kopya sayısı tekrarı, inversiyon, translokasyon ve segmental uniparental dizomi olarak alt gruplara ayrılabilir. Son yıllarda hem deneysel hem de hesaplama stratejilerindeki gelişmeler insanın yapısal genetik değişikliklerinin daha yüksek çözünürlükte analize edilmesine izin vermiş ve insan genomundaki yapısal değişkenliklerin hastalıklar ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada, karyotipleme tekniği kullanılarak tüm genomda varolabilecek olası bir yapısal varyasyonun nöral tüp defekt ile ilişkisini ortaya koymaya çalıştık.

Anahtar Kelimeler: Nöral tüp, karyotip, Nöral tüp kapanma defekti, Kromozom analizi

SUMMARY

Neural tube closure defects secondary to insufficient closure of the central nervous system with congenital malformation is a general term indicating. The incidence of all over the world every 1000 births ranged from 1 to 10. The majority of cases can be categorized as anencephaly or spina bifida at birth, but are seen equal in these two groups. As a result of developments in medical treatment, the patients with spina bifida cases can live longer. Spina bifida subgroups are examined such as meningocele, meningocele, and lipomenocele. Some observations suggest a role of genetic factors in the development of neural tube defects. Firstly, some of the ethnic / race (Irish and Mexican) groups, second part a higher occurrence of neural tube defects as the first-degree relatives in families ,third part as a result of genetic engineering more than 200 spontaneous mouse model of neural tube defects are made. Addition of single gene disorders, neural tube defects, as well as a phenotypic characteristic of some syndromes associated with chromosomal abnormalities seen the emergence suggests a genetically based pathogenesis. However, as a routine use, such as positional cloning and linkage analysis methods to reveal the disease is not applicable, because causing gene in a family affected by an individual patient.

Human genome structural variables, including a part of the genome can be microscopic or submicroscopic, often described as the changes are wider than 1 kilobase. These structural variables, the variability of the number of copies, copy number polymorphism, segmental duplications or low copy number repeat, inversion, translocation, and may be subdivided into segmental uniparental disomy. In recent years, developments in both experimental and computational strategies allow human structural genetic changes and gave a higher resolution analysis of the human genome is associated with the structural variations shown diseases.

In our study we have tried to show the relationship between neural tube defect and possible structural variations exist in the genome by using the technique of karyotyping .

Keywords: Neural tube, karyotyping, neural tube closure defects, chromosomal analysis

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik asit
NTK	: Nöral Tüp Kusuru
MM	: Meningomyelosel
SB	: Spina Bifida
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSS	: Santral Sinir Sistemi
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
STR	: Kısa tandem tekrar
CNV	: Kopya sayısı varyantı
DİZİ-CGH	: Dizi bazlı karşılaştırmalı genom hibridizasyonu
IDS	: İduronat 2 sülfataz
UPD	: Uniparental dizomi
ARK	: Arkadaşları

TABLolar VE ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1: Nöral tüpün embriyoda çok merkezli kapanması.	4
Şekil 2: NTK'larının embriyolojik sınıflandırılması	5

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Teşekkürler	i
Özet	ii
İngilizce özet	iv
Simgeler ve kısaltmalar	v
Şekiller ve Tablolar	vi
1. Giriş ve amaç	1
2. Genel bilgiler	2
2.1.Nöral tüp kusurları	2
2.1.1 Nöral Tüp ve Aksiyel İskeletin Gelişimi	2
2.1.1.1 Nörilasyon	2
2.1.1.2 Aksiyel skeletogenez	3
2.1.1.3 Kuyruk tomurcuğu gelişimi	4
3. NTK'larının sınıflaması	5
3.1 Açık Kusurlar	5
3.1.1 Anensefali	5
3.1.2 Meningomyelosel (açık spina bifida)	5
3.1.3 Kranyorışısis	6
3.2 Fıtıklaşma kusurları	6
3.2.1 Ensefalosel	6
3.2.2 Meningosel	6
3.3 Kapalı kusurlar	6
4. İnsan genom yapısal değişkenliği	7
5. Karyotipleme	8
6. İnsan genomundaki yapısal varyasyonlar ve önemi	9
6.1 Mikroskobik yapısal varyasyon	11
6.2 Sub-mikroskobik yapısal varyantların belirlenmesi	12
3. Gereç ve yöntem	17
3.1 Hasta Grubu	17
3.2.1 Karyotip İçin Medium'un Hazırlanması	17
3.2.2 Kan Kültürü Çıkarımı	18
3.2.3 Preparat Hazırlanması ve G Bantlama	18

4. Bulgular	20
5. Tartışma	21
6. Sonuçlar	25
7. Kaynaklar	26

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöral tüp kusuru (NTK) nöral tüpün kapanmasındaki yetersizliğe ikincil oluşan santral sinir sisteminin (SSS) konjenital malformasyonunu belirten genel bir terimdir. Tüm dünyadaki insidansı her 1000 doğumda 1 ile 10 arasında değişmektedir. Vakaların büyük kısmı anensefali veya spina bifida (SB) olarak kategorize edilebilir ve bu iki grup doğumda aynı sıklıkta görülür. Gelişen tıbbi tedavi yöntemleri sonucunda SB'lı hastaların daha uzun yaşamasına olanak vermiştir. SB grubunun altında meningo-myelosele (MM), meningocele ve lipomeningocele gibi alt gruplar incelenir (1, 2).

Bazı gözlemler NTK oluşumunda genetik faktörlerin rol oynadığını düşündürmüştür. Öncelikli olarak bazı etnik/ırk (İrlanda'lı ve Meksika'lı) gruplarında daha yüksek görülmesi, ikinci olarak birinci derece akrabalarında NTK olan ailelerde bu hastalığın ortaya daha sık çıkması, üçüncü olarak 200'den fazla NTK fare modelinde bir kısmında kendiliğinden, bir kısmında ise genetik mühendislik sonucunda bu hastalığın ortaya çıkmasıdır (1, 3, 4). Bunların dışında NTK tek gen bozuklukları ve aynı zamanda kromozomal bozukluklarla beraber seyreden bazı sendromların fenotipik bir özelliği olarak karşımıza çıkması genetik tabanlı bir patogenezi düşündürmektedir. Fakat rutin olarak kullanılan pozisyonel klonlama ve bağlantı analizi gibi hastalığa yol açan geni ortaya çıkarma metodları genellikle bir ailede bir etkilenmiş birey olduğundan dolayı uygulanabilir görülmemektedir (1).

İnsan genomundaki yapısal değişkenler, genomun bir parçasını içeren mikroskobik veya submikroskobik olabilen genellikle 1 kilobazdan daha geniş değişimler olarak tariflenir (5). Bu yapısal değişkenler kopya sayısı değişkenliği, kopya sayısı polimorfizmi, segmental duplikasyon veya düşük kopya sayısı tekrarı, inversiyon, translokasyon ve segmental uniparental dizomi olarak alt gruplara ayrılabilir (5). Son yıllarda gelişmeler insanın yapısal genetik değişikliklerinin daha yüksek çözünürlükte analize edilmesine izin vermiş ve insan genomundaki yapısal değişkenliklerin hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5-7).

Bu çalışmamızda, NTK olan hastalarda karyotipleme tekniğini kullanarak, insan genomunda bu hastalıkla ilişkilendirebileceğimiz geniş yapısal değişkenlerin varlığı varlığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖRAL TÜP KUSURLARI

NTK'ları prenatal gelişmenin erken zamanlarında meydana gelen santral sinir sisteminin ve aksiyel iskeletin malformasyonlarıdır (2). NTK'larının en şiddetlileri anensefali ve açık spina bifidadır. Bunlar sık görülen malformasyonlar olup prevalansları 1000 doğumda 0.5-2 dir. Bu oran spontan abort olan fetüslerde daha çoktur. Prevelans coğrafi bölge ve etnisite ile belirgin değişim gösterir (1, 2).

2.1.1 Nöral Tüp ve Aksiyel İskeletin Gelişimi

NTK'larının embriyonik gelişimini anlamak için, normal gelişimin basamakları olan, nöral tübün oluştuğu nörilasyon (primer nörilasyon), kafatası ve vertebral kolonun farklılaştığı ve nöral tüpün etrafında modellendiği aksiyel skeletogenez ve post-lomber seviyede tüm vücut yapılarının oluşumundan sorumlu kuyruk tomurcuklanması (sekonder nörilasyon) basamaklarını bilmemiz gerekir.

2.1.1.1 Nörilasyon

Bu embriyolojik süreç beyin ve omuriliğin oluşumundan sorumludur ve dorsal orta hatta kalınlaşmış bir ektoderm alanı olan nöral plağın görünmesine yol açan indüksiyon ile başlar. Fertilizasyon sonrası 17-18. günlerde nöral plağın kenarları dorsale doğru katlanmaya başlar. Bu katlanma boylamasına olan nöral yarığı belirler ki, bu yarık nöral plağın artan bir şekilde yükselmesi sonucunda derinleşir. Nöral katlantılar ortaya doğru yönelerek birbirlerine yapışırlar ve nöral tüpü oluştururlar.

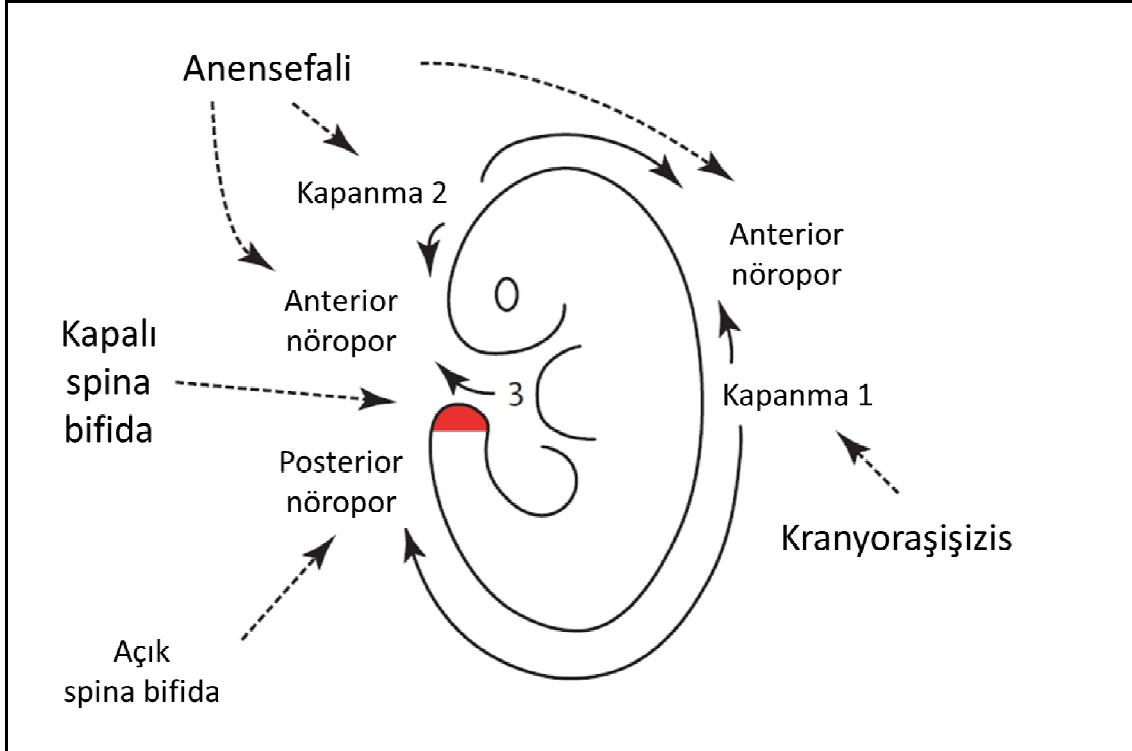
İlk kapanma olayı (kapanma 1) insan embriyolarında fertilizasyon sonrası 22. günde olur ve gelecekte servikal/oksipital sınırı oluşturacak bölgede olur. Birleşme bu seviyeden rostral ve kaudal yönlerde doğru olur. Fare embriyolarında bu başlangıç kapanma olayından hemen sonra, yapışma gelişen beyinde iki yerde ayrı olarak başlatılır. Kapanma 2 ortabeyin ve önbeyin arasındaki sınırdır, kapanma 3 ise önbeyinin ileri derece rostralinde oluşur. Kapanma sonrasında iki yönlü olarak işler ve kapanma önbeyindeki nöroporlarda tamamlanır (2) (Şekil 1).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu kapanmanın farelerle insanlarda farklı olduğunu göstermiştir. Beyin gelişimi insanda kapanma 1 ve 3 bölgelerinin arasındaki direk ilerlemeyle tek rostral nöroporun birleşmesiyle oluşmaktadır. Kapanma 1'in oluşmamasında kranyoraşışizis, kapanma 3'ün olmamasında ise yarık yüzle birlikte anensefali oluşmaktadır (2, 8).

Posterior nöroporun üst sakral bölgede fertilizasyon sonrası 26.-28. günlerde kapanması primer nörilasyonun sonunu belirler.

2.1.1.2 Aksiyel skeletogenez

Gastrulasyonu takiben, kapanan oksipital ve spinal nöral tüpün yanında duran paraaksiyel mezoderm segmental olarak yerleşen epitelyal somitleri oluşturmak için alt bölümlere ayrılır. Her somit kendi ventromedial duvarının yıkılması ile sklerotom oluşturmak üzere farklılaşır. Somitlerin dorsolateral duvarları epitelyal kalıp dermomyotomu içerir. Dermomyotom daha sonra epitelyomezenkimal transformasyona uğrar ve bazı hücreleri myotomu oluşturur. Aksiyel skeletal gelişme mezodermal somitlerin sklerotomal kısmının henüz kapanmış nöral tüpü çevrelemek için göç etmesiyle başlar. Bunlar daha sonra kırkıdak ve kemik farklılaşmasına uğrayarak tüm vertebrayı oluştururlar.



Şekil 1. Nöral tüpün embriyoda çok merkezli kapanması.

Kranyal bölgede spinal seviyelerin aksine kemik yapılar tamamıyla mezodermden oluşmazlar. Yapılan çalışmalar, kafatası ve yüz iskeletinin büyük bölümünün nöral krest hücrelerinden oluştuğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak bugün için genel kabul, yüksek seviye vertebralıların kranyal iskeletinin hem mezoderm hem nöral krest kaynaklı hücrelerden oluştuğudur (2).

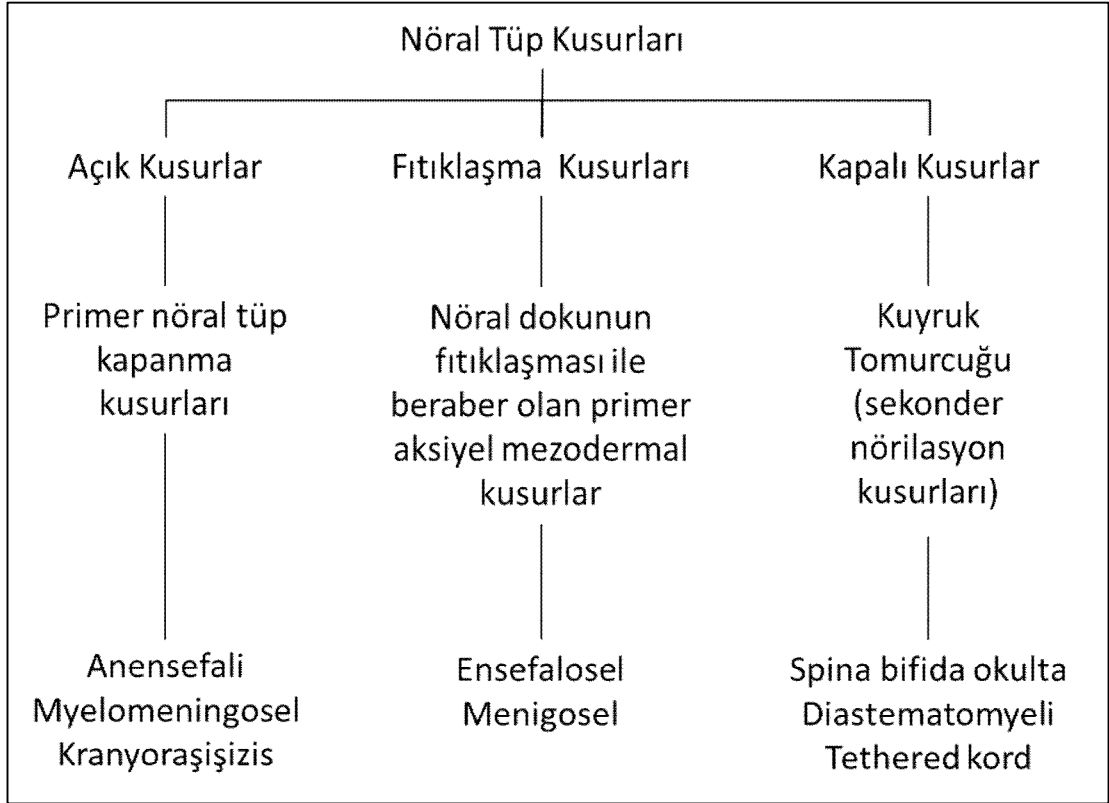
Kranyal nöral tüp kapanmasındaki bir sorunun anensefaliye yol açtığı gibi, kafa kubbesi oluşumunda da yetersizliğe yol açacağı aşıkardır.

2.1.1.3 Kuyruk tomurcuğu gelişimi

En aşağı spinal seviyelerde, kuyruk tomurcuğu ilkel yarığın kalıntısını temsil eder ve aynı zamanda nöral tüp (sekonder nörilasyon yoluyla) ve vertebraları da içeren tüm epidermal olmayan dokuların tek kaynağıdır. Kuyruk tomurcuğu kendini yenileyen kök hücre popülasyonuna sahiptir ki bunlarda üreyen hücreler hızla çoğalarak vücut aksının longitudinal olarak büyümesini sağlar.

3. NTK'larının sınıflaması

NTK'ları embriyolojisine göre, açık, fıtıklaşma ve kapalı kusurlar olarak alt gruplara ayrılabilirler (Şekil 2).



Şekil 2. NTK'larının embriyolojik sınıflandırılması

3.1 Açık Kusurlar

Açık NTK'ları nöral tüpün orta hattının kusurlu kapanmasını içerir. Bu kranyal bölgede olursa anensefali, alt spinal bölgede olursa spina bifida oluşur (1, 2).

3.1.1 Anensefali

Bu hastalıkta kranyal nöral tüp kapanması tamamlanamamıştır ve sonuç olarak beyinde ve kafa tasında kalıcı dorsal açıklık oluşur.

3.1.2 Meningomyelosel (açık spina bifida)

Posterior nöropor kapanmasında problem vardır ve açık NTK oluşur. Genellikle lumbosakral bölgede görülmesine rağmen omuriliğin diğer seviyelerini de etkileyebilir.

3.1.3 Kranioraşişizis

Bu hastalık tüm beyin ve spinal kordun açıkta kaldığı en şiddetli disrafizm şeklidir.

3.2 Fitiklaşma kusurları

Bu lezyonlar muhtemelen embriyonik gelişimin açık kusurların oluşumundan sonraki evresinde ortaya çıkarlar. Bu kusurlarda beyin ve omurilik kapanmıştır, fakat beyin veya meninkslerin vertebral kolon veya kafatasındaki kemik defektinden sekonder fitiklaşması söz konusudur.

3.2.1 Ensefalosel

Bu kusur beyin dokusunun sıklıkla oksipital bölgede, daha nadiren parietal veya frontoetmoidal bileşkede var olan kafatasındaki bir açıklıktan fitiklaşmasını içerir. Fitiklaşan kitle çok büyük olabilir. Fitiklaşan beyin dokusu normal gelişim göstermiş olabileceği gibi, gelişimin bir basamağında durmuş ta olabilir. Ensefaloselin gelişiminin sebebi halen bilinmemektedir.

3.2.2 Meningosel

Bu sıklıkla spina bifida sistikanın bir varyantı olarak sınıflandırılır. Fakat embriyolojik olarak ensefalosele daha yakın benzerlik göstermektedir. Omurilik kapalıdır ve vertebral kanalda normal pozisyonundadır. Beraberinde diastometamyeli veya tethering gibi anomaliler olabilir. Vertebraların nöral arklarında bu hastalıkla ilişki bir kusur söz konusudur ve bu bölgeden meninksler fitiklaşır. En sık lumbosakral bölgede bulunurlar. Patogenezinde somitlerden oluşan sklerotomal hücrelerin organizasyonundaki bir hatanın olduğu düşünülmektedir.

3.3 Kapalı kusurlar

Bu kusurlar NTK'larının en hafif grubudur ve okult spina bifida veya disrafik bozukluk terimlerine eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Omurilik anomalileri santral kanalın aşırı genişlemesi (hidromyeli), omuriliğin longitudinal yarıklanması veya duplikasyonu (diplomiyeli, diastematomyeli) ve omuriliğin aşağı ucunun gerilmesini içerir. Sıklıkla kemik gelişim anomalileri ve beraberinde lipom ve eşlik eden anorektal ve ürogenital anormallikler vardır.

Kusurlar sıklıkla aşağı lomber ve sakral bölgede yerleşirler ki bu kabaca sekonder nörilasyon bölgesine tekabül eder. Bu seviyede nöral katlanma olmadığından kusurlar genellikle kapalı tiptedirler. Kapalı kusurlar embriyonik kuyruk tomurcuğu gelişimindeki hatalar neticesinde oluşur.

4. İnsan genom yapısal değişkenliği

Dizileme teknolojisi ortaya çıkmadan önce, genetik materyalimizde gözlemleyebildiğimiz farklılıklar genellikle kromozomların yapı ve sayısında nadir görülen değişimlerdi. Bunlar anöploidi, yeniden düzenlemeler (rearrangements) ki bunlar sıklıkla hastalıkla ilişkilidirler, heteromorfizmler ve fragil bölgelerdi. Bu değişikliklerin hepsi mikroskop ile farkedilebilecek kadar büyüktü. Kabaca bu değişimlerin boyutları 3Mb (1 Mb= 1000000 baz) idi. Zamanla moleküler biyolojideki gelişmeler ve DNA dizileme tekniğinin gelişmesi ile daha küçük boyuttaki değişimler görülebilir hale geldi. Bunlar tek nükleotid polimorfizm (SNP), değişik tekrarlayan elemanlar, küçük insersiyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve duplikasyonları içermektedir. İnsan genetik farklılığının ortaya konmasında karyotip ve nükleotid seviyesinde çok çaba sarf edilmiştir. Fakat bu iki uç metotla genetik farklılığın oluşumu ile ilgili ulaşılabilen bilgi o kadarda fazla değildi. Geçtiğimiz on yıl içerisinde insan genomunun tamamının dizileme analizinin bitirilmesi ile genomun bileşiminin daha etkin bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan yeni stratejiler ve araçlar ortaya konmuştur. Özellikle genomu tarayan aray teknolojileri ve mukayeseli DNA dizi analizi yöntemleri mikroskop seviyesinde fark edilebilenden daha küçük fakat konvansiyonel dizileme analizinde ortaya konulanlardan daha büyük DNA farklılıkları/değişimleri açığa çıkmaya başladı. Bu değişiklikler 1kb ile 3 Mb büyüklükler arasında değişmektedir (1kb= 1000 baz). Daha sonra yapılan çalışmalarda yüzlerce submikroskopik yapısal değişkenliğin ve inversiyonların tarifi edilmesi genomik değişimlerin en az tek nükleotid değişimler, kısa tandem tekrarlar ve diğer küçük değişimler kadar önemli olduğunu göstermiştir. Bu tür değişimler tüm bir geni veya onun düzenleyici bölgeleri içeren milyonlarca DNA bazını barındırabilir. Genom üzerinde bazı bölgelerdeki yapısal değişiklikler apaçık fenotipik değişikliklere yol açmasalar da, diğerleri gen dozajını etkileyerek genetik hastalıklara yol açarlar (5-7, 9-11).

Son yıllarda hem deneysel hem de hesaplama stratejilerindeki gelişmeler insanın yapısal genetik değişikliklerinin daha yüksek çözünürlükte analize edilmesine izin vermiştir. Yeni olan bu metotlarda genomun ya tamamı ya da hedeflenen bir bölümü incelenir.

Tüm genomu inceleme metotları aray tabanlı analizler. PCR tabanlı incelemeler ve karyotiplemedir.

5. Karyotipleme

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafından görülmüş, fakat kromozom sözcüğü 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmıştır. Wieman 1917 yılında X ve Y kromozomlarını tanımlamıştır (12).

Tijo ve Levan 1956 yılında insan fetal akciğer fibroblastları ile yaptıkları çalışmada insan kromozom sayısının o güne kadar düşünüleninden farklı olarak $2n=46$ olduğunu ortaya koymuştur (12, 13).

Bu bulgulardan sonra, insan kromozomları farklı büyüklüklerine göre 7 gruba (A'dan G'ye) sınıflandırılmıştır (13). 1959 yılında Trizomi 21'in Down Sendromu'na yol açtığı ve cinsiyet kromozomlarındaki sayısal düzensizliklerin de Turner ve Klinefelter sendrom'larına neden olduğu bulunmuştur. 1960 yılında sitogenetikçiler Philedephia kromozomunun kronik myeloid lösemi'nin nedeni olduğunu fark etmişler, bundan 13 yıl sonra Janet Rowley bu kromozomun kromozom 9 ile 22 arasındaki translokasyonun ürünü olduğunu göstermişlerdir (13).

Torbjorn ve Caspersson'un 1960'ların sonunda her kromozomun uzunluğu boyunca açık ve koyu bantlar oluşturan kromozom boyama protokollerini geliştirmesi ile sitogenetik analizin gücü artmıştır. Bu bantlama örnekleri sitogenetikçiler için kolaylıkla kromozomları ve bunlarla ilişkili delesyon ve translokasyon gibi yapısal ve sayısal değişiklikleri tanıyabilecekleri kalıplar olmuştur. Bantlar en iyi metafaz kromozomlarında incelenir ve bu nedenle değerlendirme için mitotik hücrelere gereksinim vardır (13).

Kromozom bantlama tekniği, kromozomları denatürasyon ve enzimatik sindirmeyi takip eden DNA'ya özgün boyaların kullanıldığı tekniklerin uygulanması ile elde edilir. Bu işlem sonrasında insan ve diğer mitotik kromozomlarda açık ve koyu boyanan bant serileri oluşur. G-bantlama tekniğinde kromozomlar Giemsa ile boyanmadan önce tripsin ile kontrollü sindirilmeye tabi tutulur. Pozitif olarak boyanan koyu bölgeler (bantlar) S fazının geç dönemlerinde replike olurlar ve daha yoğun kromatin içerirler. Açık boyanan bölgeler ise S fazının erken dönemlerinde replike olurlar ve daha az yoğun kromatin içerirler. Genler genellikle açık boyanan bant bölgelerinde bulunurlar. Koyu bant bölgelerindeki DNA ise transkripsiyonel olarak daha az aktiftir (14).

Kromozomların, adenin ve timinden zengin DNA bölgelerine öncelikle bağlanan kinakrin, DAPI gibi floresan boyalar ile bantlanmasına Q-bantlama denilir. Floresan bantlar Q bantlar olarak isimlendirilir ve G bantlarla aynı bölgeleri işaretlerler (14).

R-bantlama, temel olarak G-bantlama şeklinin tersidir. Kromozomlar Giemsa ile boyanmadan önce salin içerisinde ısıtılarak denatüre edilir. Isıtma adenin ve timin'den zengin DNA'yı denatüre eder ve bundan dolayı R-bantları Q-negatiftir. Aynı boyama şekli guanin ve sitozin için spesifik olan kromomisin A3, olivomisin ve mitramisin gibi boyalar ile oluşturulabilir (14).

T-bantlamada, R-bant bölgelerinin içinde bulunan telomerler hedef alınır. T-bantlar, R-bantların en yoğun boyanan bölgeleridir. Giemsa ile boyanmadan önce kromozomları çok şiddetli ısıya maruz bırakarak görünür hale getiriler (14).

C-bantlamanın, özellikle kromozomların sentromerik bölgelerini gösterdiği düşünülür. Kromozomlar, Giemsa ile boyanmadan önce baryum peroksidin doymuş çözeltisi ile denatürasyona maruz bırakılırlar (14).

Sitogenetik bilgi, 1960'lı yılların sonunda amniosentez ile elde edilen fetal hücrelerin kromozomal anomali yönünden araştırılmasından sonra sitogenetik laboratuvarlarından, klinik uygulamaya geçiş göstermiştir. Bugün de bu yöntem prenatal teşhiste yaygın olarak kullanılmaktadır (13).

6. İnsan genomundaki yapısal varyasyonlar ve önemi

İnsan genom analizlerinden elde edilen çarpıcı bir gözlem dünya üzerindeki bireyler arasında DNA dizisi benzerliğinin büyüklüğüdür (15, 16). Herhangi iki insanda yaklaşık %99,9 oranında eşit olduğu düşünülmektedir (17, 18). Bu yüzden bireyler arasında genetik varyasyonu oluşturan genomun küçük parçalarına ilişkin çalışmalar ile fenotipik varyasyonlara ve hastalık duyarlılığına ilişkin bilgiler elde edilebilir.

Gen dizisi belirleme tekniklerinin ortaya çıkmasından on yıllar önce bizim genetik bileşenimizde gözlenen ilk farklılık büyük oranda kromozom miktarı ve yapısında nadir görülen değişikliklerden oluşuyordu. Bunlar bir mikroskop yardımı ile belirlenebilecek kadar büyük olan anöploidi, yeniden düzenlenmeler (sıklıkla hastalıkla ilişkili olan), heteromorfizm ve kırılmalı bölgelerden oluşuyordu (5). Biz yaklaşık 3 Mb veya daha büyük boyuttaki bu tür varyantları mikroskobik yapısal varyantlar olarak tanımlarız. Ardından, moleküler biyoloji ve DNA dizilemesinin keşfi ile birlikte daha küçük ve çok sayıda değişimler izlenmiştir. Bu değişimler

görece olarak küçük DNA dizilerinin tekrarlayan çeşitli öğelerini içeren SNP'leri (örneğin mikro ve mini-satelitler) ve küçük (genellikle <1kb) delesyonları, inversiyonları ve duplikasyonları içerir (5). İnsan genomun oluşturan yaklaşık 3 milyar nükleotid bazı çiftindeki ortalama her 300 nükleotidde bir olmak üzere insan popülasyonunda en az 10 milyon tek nükleotid polimorfizm olduğu tahminine dayanarak bu küçük ölçekli varyantların çoğunun genetik varyasyonu oluşturduğu varsayılmaktadır.

Karyotip ve nükleotid düzeyinde insan genetik varyasyonunun özelliklerinin ortaya konabilmesi için dikkate değer çaba harcanmıştır (5, 7, 19). Fakat bu iki uç arasındaki varyasyonlara ilişkin bilgi sınırlıdır. Bununla birlikte, son birkaç yılda, insan genomunun primer dizisinin etkin bir şekilde tamamlanması genom bileşiminin etkin bir şekilde değerlendirmesi için yeni stratejiler ve araçların yaratılmasını desteklemektedir. Genom tarayıcı dizi teknolojileri (20) ve karşılaştırmalı DNA-dizisi analizleri (21) konvansiyonel dizi analizleri hâlihazırda tespit edilmiş olanlardan ziyade mikroskop ile fark edilenlerden daha küçük segmentleri tutan DNA varyasyonlarını ortaya koymaya başlamıştır. Biz yaklaşık 1 kb ile 3 Mb aralığında değişen bu varyasyonları submikroskopik varyantlar olarak tanımlarız.

İki devrim niteliğinde çalışma (20, 22) insan genomunda yüzlerce submikroskopik kopya-sayısı varyantı (CNV) ve inversiyon tanımlamıştır. Bu gözlemler yapısal genomik varyantların genom varyasyonuna katkı anlamında SNP'ler, kısa tandem tekrarlar (STR) ve diğer küçük değişiklikler kadar önemli olduğunu öngörmemize neden olmuştur. Bunun ötesinde, bu varyant tipleri tüm geni ve düzenleyici bölgelerini içeren milyonlarca DNA bazı içerebilir (20, 22). Bazı genom bölgelerindeki yapısal varyasyonlar aşikâr fenotipik sonuçlara sahip olmasa da, diğerleri tek başlarına veya diğer genetik ve çevresel faktörlerle kombinasyonda genetik hastalıklara neden olabilen gen dozunu etkiler (5, 20, 22).

Küçük boyutlarına karşın, insan genetik varyasyonunda ve hastalıklarına toplam potansiyel katkıları sıklıkla oluşmalarından dolayı mikroskopik varyantlarından daha yüksek olması beklenebilir.

6.1. Mikroskobik yapısal varyasyon

İnsan genetik varyasyonlarının temeline ilişkin kanıtlar kromozomların mikroskop altında görülebilmesi ile başlamıştır. En eski bantsız karyotipler bir diğerinden güçlükle ayırt edilebilen görece olarak kısa, yoğunlaşmış kromozomlardan oluşuyordu. Ancak anöploidiler, marker kromozomlar ve büyük yeniden düzenlemeler fark edilebilmiş ve Y-kromozom varyasyonları kaydedilmiştir (5). Solid boyalı (bantsız) kromozomlarda, sekonder konstriksiyonlar, akrosentrik kromozomlarda satellit-böge varyantları, kırılğan bölgeler ve belirli heterokromatik bölgelerdeki boyut varyasyonları dahil bazı heteromorfizmler fark edilebilmiştir (5). Çeşitli kromozom bantlama tekniklerinin keşfi ve uzamış prometafaz kromozomları ile çalışabilme becerisi ile birlikte en çok hasta örneklerinde olmak üzere daha farklı yapısal anormallikler ortaya çıkmıştır. Resiprokal translokasyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, insersiyonlar ve inversiyonlar fark edilebilmiştir ve FISH analizindeki gelişmeler bu varyasyonların yaygınlığına ilişkin daha rafine tanımlamalarına imkân vermiştir (5, 21). Bantlama aynı zamanda 1,3,4,9,13,16,21,22. kromozomlar ve Y kromozomundaki örnekler dahil olmak üzere heteromorfizmlerde daha önce şüphe edildiğinden daha büyük bir değişkenlik ortaya çıkarmıştır.

Karyotip düzeyinde translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar ve duplikasyonlar dahil yapısal açıdan anormal varyantlar anöploidilerden daha az sıklıkta belirlenmektedir. Ancak bu durum, özellikle de aşağıda bahsettiğimiz sub-mikroskobik varyantlar bağlamında sayılarının küçümsenmesine neden olan belirleme eğilimini yansıtabilir. Bu durum akılda tutularak, tipik olarak atıfta bulunulan veriler dörtte biri dengesiz olmak üzere yapısal anormalliklerin yaklaşık 375 canlı doğumda bir meydana geldiğini işaret eder (5, 21). Bu tür varyantlar ile ilişkili konjenital anomaliler için risk resiprokal translokasyonlar ve inversiyonlar için %6,7 ve marker kromozomların tüm tipleri için %25,6 idi (23). Aksine, normal varyantlar (heteromorfizmler dahil hastalıkla ilişkisi olmadığı aşikar) kişi başına 4 ila 6 aralığında saptanır (5, 21).

6.2 Sub-mikroskobik yapısal varyantların belirlenmesi

Son yıllarda, hem deneysel hem de bilgisayar stratejilerinin gelişimi insan yapısal genetik varyasyonlarının yukarıda bahsedilen çalışmalardan daha yüksek

çözünürlüklerde analiz edilmesine imkân vermiştir. Bu yöntemler, çeşitli çözünürlük düzeylerinde genomu global veya hedefe yönelik tarzda test edebilir (24).

Günümüzde, dengesiz yapısal varyantların belirlenmesindeki temel yaklaşımlar dizi-bazlı analizler ve kantitatif PCR bazlı testlerdir (5, 21). Dizi bazlı karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (dizi-CGH) yaklaşımları [25,61] yeni CNV'lerin bulunmasında genom çapında taramaların gerçekleştirilmesi için en güçlü yöntemdir (25). Bu yaklaşımlar ilgilenilen genom için klonlu DNA fragmanları ile lekelenmiş dizileme için farklı bir şekilde işaretlenmiş ve iki genom arasındaki kopya sayısı farkını ortaya çıkaran bir genomla birlikte yarışmalı şekilde hibridize edilen işaretlenmiş fragmanlar kullanır. Genomik klonlar (örneğin BAC'lar) cDNA'lar, PCR ürünleri ve oligonükleotidlerin tümü dizi hedefleri olarak kullanılabilir. Sağladığı genomun yaygın kapsamı, güvenilir haritalama verilerinin varlığı ve klonlara kolay erişim nedeniyle BAC ile birlikte dizi-CGH kullanımı özellikle popülerdir. Bu faktörlerin sonuncusu hem dizi deneylerinin kendisi hem de doğrulayıcı FISH deneyleri için önemlidir.

CGH'nin uzun oligonükleotidlerden oluşan diziler (60-100 bp) ile birlikte kullanımı ile saptama çözünürlüğü BAC kullanılarak elde edilenlerin üzerine çıkarabilir ve ilk olarak ROMA (temsili oligonükleotid mikro-dizi analizi) olarak bilinen bir test formatında kullanılmıştır (5). ROMA'nın prensibi BAC dizileri kullanımında uygulananlar ile benzerdir, ama sinyal-gürültü oranını artırmak için temsil veya tüm-genom örnekleme denenen bir yöntemle girdi DNA'nın kompleksliği düşürülmüştür (26). Burada DNA'nın restriksiyon sindirimi ile muamele edilen ve daha sonra adaptörle bağlanarak spesifik boyut aralığındaki fragmanlarda PCR-bazlı amplifikasyonu ile sonuçlanan diziler ile hibridize edilmesi gerekir. Sonuç olarak, amplifiye edilen DNA tüm genomik dizinin bir fraksiyonunu oluşturur ki, bu arka plan gürültüsünden azalmaya yol açacak şekilde kompleksliği önemli bir biçimde azaltan girdi DNA'nın bir örneğidir. NimbleGen ve Agilent Technologies gibi firmalar direkt CGH (temsili olmayan) için kullanılabilecek başka uzun nükleotid dizileri geliştirmektedir (27). En çok bulunan oligonükleotid dizilerinin çözünürlüğü daha yüksek çözünürlüklü testler ortaya çıktıkça artacak olan 30-50 kb aralığında değişir.

Dizi-bazlı yaklaşımda bir başka varyasyonda Affymetrix SNP dizilerindeki oligonükleotidlerden elde edilen hibridizasyon sinyal yoğunluklarının kullanılmasıdır

(5, 28). Burada hibridizasyon yoğunlukları kontrollerden elde edilen ortalama değerler ile karşılaştırılır ve bu ortalamadan sapmalar kopya sayısındaki değişikliklere işaret eder. Kopya sayısına ilişkin bilgi sağlamanın yanı sıra SNP serileri genotip bilgisi sağlama avantajını da eklemiştir. Örneğin, bir delesyonun varlığına ilişkin destekleyici kanıt sağlayan heterozigotite kaybını ortaya koyabilirler [66,67] veya segmental tek ebeveynden kaynaklanan dizomiyi işaret edebilirler (bir yapısal varyasyon formu olarak değerlendirilebilir).

Hedefe yönelik PCR bazlı deneysel yaklaşımlar genomun hedeflenen bölgelerinin taranmasında en güçlü testlerdir. Belki de bunlardan en iyi bilineni gerçek zamanlı kantitatif PCR'dır (qPCR). Bununla birlikte, bu yöntemin birçok protokolü münferit delesyon ve duplikasyonların puanlanmasında iyi çalışırsa da, genellikle çoğaltma için uygun değildirler. Bir başka yaklaşımda özel olarak bilinen segmental duplikasyonları barındıran ve sıklıkla kopya sayısı varyasyonlarını içeren bölgelerin hedef alınmasıdır. Segmental duplikasyonun iki kopyası arasında değişken nükleotidleri hedef alarak ve iki allel için bağımsız flüoresan yoğunlukları sağlayabilen bir SNP-genotipleme yöntemi kullanarak bir allelin diğerine kıyasla artan yoğunluğunu saptamak mümkündür (5, 21).

Yapısal varyantlar farklı kaynaklardan gelen DNA dizilerini in silico olarak karşılaştırarak da belirlenebilir. En basit yaklaşımda, benzersiz insan DNA kaynaklarından iki eleman farklılıkların tespiti için bir hizaya getirilir. Bu yöntemin bir avantajı dengeli varyantlar dahil tüm varyant tiplerini saptayabilmesidir. Ayrıca, çözünürlük için bir limit yoktur ve belirlenebilen varyantlar nükleotid düzeyinde tanımlanabilir ve basit karşılaştırmalı analizlere imkan verir (5, 7, 21).

Bir başka hesaplama yaklaşımı da seçilen bir genomun genomik kitaplığından gelen klonların sonlarındaki dizilerden (fosmidler) türetilen çapa noktalarıdır [28]. Bu çapa noktaları daha sonra referans topluluk olarak diziler ve aralarındaki mesafe klonunun beklenen boyutu ile karşılaştırılır. Herhangi bir farklılık potansiyel insersiyon veya delesyon varyantlarına işaret eder. Eşlenmiş-son dizi yaklaşımı olarak adlandırılan bu yaklaşım aynı zamanda bazı inversiyonların saptanması için de uygundur, çünkü son diziler referans topluluk bağlamında yanlış yönelimde de olabilir. Bu yaklaşım dizi topluluklarının karşılaştırılmasındakine benzer çözünürlük sağlamasa da, yüksek doğruluklar ile genom topluluklarının üretilmesinde maliyet

düşüşü sağlanana dek canlı bir seçenek olmaya devam edecektir. Alternatif olarak, shotgun dizileme verilerinin dizi okuma derinliklerinin analizi ve bunun referans genom ile karşılaştırılması ile yapısal varyantlar belirlenebilir, bu yöntem insan genomundaki segmental duplikasyonların açıklanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (29). Bu yöntemin varyasyonları birden çok insan genomunun tüm genom shotgun dizilemesi ucuzladığında ya da maliyeti azaldığında daha önemli hale gelecektir. Son olarak insan ve primatlardan elde edilen toplulukların karşılaştırılması türler arası yapısal varyantlara ışık tutabilir ve bazı olgularda bu genom bölgeler tür için polimorfizm de sergileyebilir (21).

2004 yılından önce insan genomunda sadece bir düzine iyi tanımlanmış, hastalıkla ilişkili olmayan, sub-mikroskobik yapısal varyant ve heteromorfizm ortaya konmuştu. Bunlar büyük çoğunlukla insersiyon-delesyon polimorfizmleri (30-32) ve subtelomerik kriptik translokasyonlardır (5). 2004 yılından bu yana yaklaşık 100 insan genomundan oluşan bir veri tabanı (Database of Genomic Variants) temelinde en az 104 Mb DNA oluşturan, 600'den fazla submikroskobik yapısal varyant tanımlanmıştır (5). Bu varyantların çoğu birden fazla örnekte gözlenmiştir ve birden fazla deneysel kanıt dizisi tarafından desteklenmektedir. Bununla birlikte bazı tekil varyantların doğrulanması gereklidir. Uluslararası HapMap Projesinden gelen verilerin analizi ile bir dizi delesyon CNV de saptanmıştır (33). Çeşitli online kaynaklar belirlenen yapısal varyantlar ve hastalıktaki rolü hakkında bilgi sağlamaktadır.

Yeni çalışmalar CNV'lere ilişkin verilerin büyük kısmını sağlamıştır. (20, 22). Tüm olgularda, açık bir şekilde hastalık dışı fenotipe sahip bireylerden gelen DNA incelenmiştir. İlk çalışma paralog dizi varyantlarındaki iki allelin oranlarının kopya sayısı değişikliklerini saptamak için kullanıldığı kantitatif SNP genotiplemesini kullanmıştır. Segmental duplikasyon içerdiği bilinen 17 bölge hedef alınmıştır ve bunların %28'inde ya kopya sayısı değişiklik göstermiştir ya da olası gen-konversiyon olayları suçlanmıştır. Bu durum segmental duplikasyonların allel dışı homolog rekombinasyonların yüksek oranları ile ilişkili olduğunu bildiren önceki gözlemler ile uyumlu olup bu dizileri genel olarak yeniden düzenlemelere daha duyarlı hale getirmiştir.

Yukarıda tanımlanan çalışmaların aksine, Tuzun ve arkadaşları (22) insan genomu referans dizisini fosmid eşlenmiş son dizi yaklaşımını kullanarak bir başka

genomun vekil fragmanları ile karşılaştırmıştır. Teknik kısıtlılıklar saptanabilir insersiyonların boyutunu 8-40 kb aralığına ve delesyonların boyutunu >8 kb ile sınırlamıştır, bu ise muhtemelen varyantların sayısının olduğundan az görülmesine neden olmuştur. Yine de, iki genom arasında 56 inversiyon kırılma noktası dahil 241 farklılık saptanmıştır.

İnversiyonlar, insan hastalıklarındaki rolü nedeniyle çeşitli inversiyonlar saptanmıştır. Örnekler hemofili A hastalarının %40'ında bulunan Faktör VII geninin 400 kb tekrarlayan inversiyonunun yanı sıra Hunter sendromunda iduronat 2 sülfataz (IDS) genini ve Emery-Dreifus kas distrofisindeki emerin etkileyen daha küçük inversiyonları içerir (7, 11, 21). Bununla birlikte, genel popülasyondaki inversiyon varyantlarına ilişkin bilgilerimiz daha azdır, çünkü yakın zamanda dek bu tipteki dengeli, sub-mikroskobik varyantları saptayacak güçlü yöntemlerimiz yoktu. Tanımlanan örnekler büyük kısmı, inversiyon varyantlarının ebeveynleri etkilemediği ama yavrularda hastalıkla ilişkili CNV riskini artıran olgulardaki insan hastalıklarına ilişkin araştırmalarda bulunmuştur. Genel popülasyonda bu varyantların sıklığı sırasıyla %5 ve %9'dur.

Haritalama ve dizileme çalışmaları 17q21.31 kromozomunda 900 kb inversiyon polimorfizmi belirlemiştir, bu inversiyon Avrupa popülasyonunda pozitif seçilim altındadır (34). Ayrıca, Tuzun ve arkadaşları (22) bir bireyde 56 varsayımsal inversiyon kırılma noktası belirlemiştir.

Diğer yapısal varyantlar, insan genomunda kriptik translokasyonlar ve segmental uniparental dizomi (UPD) dahil sub-mikroskobik yapısal varyantların diğer tipleri de mevcuttur (5, 7, 21).

Yapısal varyantlar çeşitli yollarla fenotipik varyasyona veya hastalığa yol açabilir. En basit olgularda, yapısal varyantlar gen dozunu direkt olarak etkileyebilir (CNV'de olduğu gibi) veya pozisyon etkisi üzerinden gen ekspresyonunu değiştirebilir. Gen ekspresyonunda hastalık oluşturma potansiyeline sahip değişikliklerin yanı sıra yapısal varyantların varlığı da inversiyonlar ve segmental duplikasyonlar için tanımladığımız gibi zararlı yapısal değişikliklere yatkınlık oluşturabilir.

Genomik bozukluklar için gösterildiği üzere (5, 35) normalde benign yapısal polimorfizm bir loküsü hastalıkla ilişkili yeniden düzenlemelere yatkın hale getirebilir. Polimorfik inversiyon durumunda, kromozomal segmentlerin farklı

yönelimleri nedeniyle azalan rekombinasyon sıklığı allelik olmayan segmental duplikasyonların yanlış sıralanma şansını artırabilir. Bu yüzden inversiyon taşıyıcıları mayoz sırasında de novo delesyon veya diğer kromozomal yeniden düzenlemeler açısından daha yüksek risk altındadır (35).

Direkt olarak hastalığa neden olmanın veya hastalığa yatkınlık oluşturmaının yanı sıra yapısal varyantlar kompleks genetik hastalıklarda duyarlılık allelleri olarak işlev görebilir. Bazı büyük varyantlar benign gibi görünse ve belirli popülasyonlarda yaygın olsa da, diğer genetik ve çevresel faktörler ile kombinasyonla hastalık fenotipine katkıda bulunabilirler.

Varyantların normal veya hastalık yapıcı olarak sınıflandırılması dikkat gerektirir. Moleküler sitogenetik uzmanları özellikle prenatal veya tanı koşullarında bu ikilem ile sürekli yüzleşmektedir. Fark edilmiş olan sub-mikroskobik varyasyonla birlikte benign ve hastalık yapıcı yapısal anormalliklerin nasıl ayırt edileceği sorusu giderek önemli hale gelmektedir. Genel olarak T kromozomu ve akrosentrik kromozomlar arasındaki çeşitli translokasyonlar gibi heterokromatik bölgelerdeki yeniden düzenlenmelerin klinik sonuçları olduğu saptanmışken, önkromatik bölgeleri tutanların genleri ve/veya düzenleyici öğeleri bozması muhtemeldir. Bununla birlikte, etkilenen spesifik bir bölgenin gen yoğunluğu değerlendirilmelidir [99]. Ayrıca, dengeli yeniden düzenlenmeler genellikle benign iken, gen kaybına neden olan dengesiz değişikliklerin bir fenotipik etkisi olacaktır.

Bunlar genomik bozukluklara neden olan doz ilişkili mikrolelesyonlar veya duplikasyonlar gibi yapısal varyantın direkt hastalıkla ilişkili olduğu örneklerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulunca 01/09/2010 tarih, 2010-17 numaralı toplantı sayısı ve 06 numaralı kararı ile onaylanmıştır. Tüm hastalardan ve bilinci kapalı hastaların yakınlarından bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.1 HASTA GRUBU

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalında orta hat kapanma defekti saptanan 54 hasta kullanılmıştır.

3.2 KARYOTİPLEME

3.2.1 KARYOTİP İÇİN BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

1-Laminafora çalıştırılır ve ortamın steril olması amacıyla çamaşır sulu bir bezle silinir, bir müddet beklenir.

2-Fitohemagglutinin, 20 ml Fotal Bovin Serum, 1 ml penisilin, 5 ml steril su, 7 ml kan örneği ve uygun ebatlarda steril enjektörler.

3-Toz halindeki Fitohemagglutinin içerisine 5 ml steril su ilave edilir ve Fitohemagglutinin çözünmesi sağlanır.

4-RPMI 1640 da 100 ml alınır, bunun içerisine 1 ml penisilin, 2.5 ml sulandırılmış fitohemagglutinin, 20 ml fotal Bovin serum birbiriyle karıştırılır. Karıştırılan karışım alt-üst edilerek karışması sağlanır ve mediumu elde etmiş oluruz.

5-10 ml steril enjektörlerle oluşan karışımdan 10 ml alınır ve ekim tüplerine ilave edilir.

6-Steril ekim tüplerine ilave edildikten sonra üzerilerine kan örneklerinden 3.5 ml kan ilave edilir. Ekim tüplerinin ağızları kapatılır ve alt üst edilerek karışması sağlanır.

7-Ekim yapılan tüpler 70 saat bekletilmek üzere Etüv'e alınır ve 36.5 santigrad derecede 70 saat beklenir.

8-70 saat sonra alınan ekim tüplerine Kolşisin eklenir.

3.2.2 KAN KÜLTÜRÜ ÇIKARIMI

1-70 saatin sonunda ekim yapılan tüplere kolşisin eklenir, alt üst edilir ve etüve kaldırılır.

2-30 dakika sonra tüpler etüvden çıkartılır, 2000 rpm de 4 dakika santrifüj edilir ve ekimdeki fazla süpernatant atılır.

3-Ekim tüplerindeki pellet resüspanse (karıştırılır), üzerine 37 santigrad derecelik etüvde ısıtılmış 7 ml hipotonik solüsyonu eklenir.

4-Ekim tüpü yine karıştırılır ve 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet resüspanse (karıştırılır) edilir.

5-Pellet üzerine oda ısısındaki bekletilmiş İbrainov solüsyonundan 5 ml eklenir. Hemen 2000 rpm de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant edilir. Pellet resüspanse edilir.

6-Pellet üzerine 5 ml metanol eklenir. Hemen 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant edilir. Pellet resüspanse edilir.

7-Pellet üzerine derin dondurucuda bekletilmiş fiksatiften 5 ml eklenir. Hazırlık aşamasına geçilir. (Hazırlık işlemine daha sonra geçilecekse hücre rezervleri -20 santigrad derecede bekletilir).

3.2.3 PREPARAT HAZIRLANMASI VE G-BANTLAMA

1-Çıkarım işleminden sonra -20 santigrad derecede saklanan rezervler çıkartılır ve 2000 rpm de 4 dakika santrifüj edilir.

2-Daha önceden hazırlamış olduğumuz (metanol içerisinde buzlukta saklanan) ıslak soğuk lamalar alınır ve üzeri soğuk fiksatif ile yıkanır. Farklı yerlere gelecek şekilde 2-3 damla hücre süspansiyonundan damlatılır. 2-3 saniye beklenir ve üzeri tekrar soğuk fiksatif ile yıkanır.

3-Hastanın adı, soyadı ve preparat numarası yazılır.

4-İnvert mikroskopta preparat incelenir. Metafaz alanı miktarı düzgün dağılıp dağılmadığı kontrol edilir.

5-Preparat kalitesi iyi ise aynı şekilde devam edilir ve bir hasta için metafaz miktarına göre 5-6 preparat hazırlanır ve hazırlanan preparatlar kurutulmaya bırakılır.

6-Bantlama işlemine geçeceğimiz zaman 65 santigrad derecelik etüvde 1 saat 40 dakika Eskitme işlemine tabi tutulur.

7-Tripsin-Sorenson Tamponu-yüzde 10'luk Giemsa-Distile su

8-Preparatların bir tanesi 1 dakika 30 saniye Tripsin solüsyonunda bekletilir. Sorenson tamponunda 2-3 sn yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra Giemsa içerisinde 7 dakika boyanır ve distile suyla yıkanır.

9-Bantlama ve boyama işleminin süresi ışık mikroskopunda kontrol edilir. İyi ise diğer preparatlarda aynı şekilde bantlama ve boyama yapılır.

4. BULGULAR

54 kişilik hasta grubundan yapılan G-Bantlama ile yapılan karyotip analizi sonucunda hastalarda bir karyotip bozukluğuna rastlanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Nöral tüp defekti nöral tüpün embriyonik gelişimin dördüncü haftasında tam olarak kapanmaması durumunu ifade eder (36). Sonuç olarak, bu orta hat anomalileri bulunan yapıların oluşumları tamamlanamaz. Nöral tüp defektlerinin nedenleri olarak pek çok teoriler ortaya atılmış ve pek çok çevresel ve besinsel etmenlerin nöral tüp defektlerine yol açtığı düşünülmüştür. Bunun yanında antikonvülzanlar gibi bazı ilaçlar nöral tüp defekti gelişme ihtimalini artırır. Bu çalışmalar aynı zamanda vitaminler ve folik asit desteği ile nöral tüp defekti gelişme şansının azaltılabileceğini önermiştir (37). Son olarak diğer çalışmalar da nöral tüp rüptürünün, nöral tüp defektleri ile birlikte diğer çeşitli konjenital anomalilerin nedeni olduğunu iddia etmiştir. Alfa fetoprotein düzeyinde bir artış saptanması durumunda rahim içi nöral tüp defekti tanısı düşünülmesi gerekir (36).

Oluşumdaki başarısızlık, bir omurganın yapısal elemanlarından birinin yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkar. Vertebral halkanın herhangi bir bölgesi etkilenebilir; anterior, posterior, posterolateral ve lateral. Deformitenin tipi vertebral halkanın hangi kısmının etkilendiğine bağlıdır. Bu yolla normal büyüme kalıbı değişir (36).

Oluşum veya segmentasyon anomalileri ile de tek başlarına bulunmaları gereken anomaliler değildir. Sıklıkla bir olguda, karmaşık yapısal anomalilere yol açan, bir formasyon ve bir segmentasyon defekti bir arada bulunur. Embriyolojik malformasyonların olasılığı ve mekanizması düşünüldüğünde, bu anomalilerin klinikte, çevre organların normal büyümelerinin bir görünümü olarak karşımıza çıktığına dikkat etmek önem taşır.

Sık görülen anomalilerin çoğunun birden çok etmen tarafından ortaya çıkarılması nedeni ile, sorumlu tutulacak bir tek etmen belirlemek zor olabilir. Ancak araştırmalar, bu anomalilerin önlenilmesine olanak sağlayacak çeşitli etmenleri ortaya çıkarmıştır.

Gelişimin kritik aşamalarında talidomide fetal maruziyet konjenital malformasyonların iyi bilinen bir nedenidir. Bunun yanında Ghidini ve ark(38), lovastatin alan bir anneden artmış konjenital malformasyon riskini gösterir bir olgu yayınlamıştır. Nora ve ark (39) tarafından yayınlanan başka çalışmalar bazı östrojen/progesteron bileşiklerinin bu anomalilerin insidansını artırdığını göstermiştir. Kısaca bir sağlık çalışanı bu anomalilerin birden çok etmene bağlı

olarak ortaya çıktığını ve çeşitli ajanların bu anomalilerin olası etyolojileri arasında yer aldığını unutmaması gerekir.

Spina bifida embriyolojik nöral arkların birleşmemesinden kaynaklanan ve en sık görülen nöral tüp defektidir. Spina bifidanın tipi vertebral ark, omurilik, meninksler ve üzerlerindeki dermisin anomaliye katılma kalıbına göre kararlaştırılır (36). Omurilik defekti en sık lomber bölgede olmakla birlikte herhangi bir seviyede olabilir. Lomber bölge nöral tüpün en uç kısmındaki kapanma defekti ile ilişkilidir (36). Bu yapısal anomaliye ek olarak hastada çeşitli başka nörolojik defektler de bulunabilir. Hidrosefali, diastematomiyeli, Arnold Chiari malformasyonu, hidromiyeli veya gergin omurilik bu durumlar içerisinde yer alır (36). Anomalilerin diğer işaretleri, kas dengesi, mesane ve bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler ve olası paraplejiyi içerir (36). Bunun dışında hastalar kalça çıkığı, clubfoot (çarpık ayak), skolyoz veya kifoz ile başvurabilir. Spina bifidanın tiplerini ve ciddiyetini daha iyi ortaya koymak için bir sınıflama sistemi oluşturulmuştur.

Spina bifida oklüta omurilik veya meninksleri içermeyen şekilde genellikle lamina olmak üzere vertebral arkın bir kısmının füzyon veya gelişimindeki yetersizlikten kaynaklanır. Çok çeşitli çalışmalar toplumda %10-24 arasında yaklaşık insidanslar vermektedir (36). Bu çalışmalarda bu defektin genellikle asemptomatik olduğu ve sadece çok az sayıdaki çocukta diğer omurilik defektleri ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir. Bu defekte sahip olan çocuklar genellikle deride bir çöküntü, veya lezyon alanında kıllanma gibi şikayetlerle gelirler [20]. Ancak bu defektin dış bir manifestasyonu olmaması nedeni ile, bu tip nöral tüp defektlerini doğrulamak için geçerli tek test direk grafilerdir (36). Hastanın birliktelik gösteren başka anomalileri yoksa, başka bir tedaviye gereklilik yoktur.

Spina bifida aperta ciddi kabul edilir çünkü meninksler ile birlikte omuriliği de içerebilir. Bu nedenle bu defektin çeşitli isimler verilmiş alt tipleri vardır. Kist meninksler ve BOS içeriyorsa, meningesel ile birlikte olan spina bifida olarak tanımlanır. Kist omurilik dokusu da içeriyorsa meningomiyelosel ile birlikte olan spina bifida olarak tanımlanır (36).

Nöral tüp defektlerinin doğasının multifaktöriyel olduğu düşünülür. Çeşitli çalışmalara göre genetik katkılar ihmal edilebilir düzeyde olduğunu belirtmekle beraber, güncel moleküler genetik tetkiklerle yapılacak çalışmalar nöral tüp defektlerinde kalıtımın rolünü ortaya koyabilir (36, 40). Kardeşler arasında nöral tüp

defekti açısından diğer akrabalara göre hafif bir risk artışı söz konusu ise de henüz ispatlanmayı beklemektedir. Bu defektin etyolojisinde çevresel faktörler çok daha büyük önem taşır. Çeşitli çevresel ve demografik değişkenler fetüs üzerinde nöral tüp defekti gelişimine predispozisyon yaratır. Mitchell'in epidemiyolojik incelemesine göre, bu değişkenler mevsimi, yöreyi, etnik kökeni, ekonomik durumu ve anne yaşını kapsar (40).

Folik asit çeşitli çalışmalarda nöral tüp defekti ile ilişkilendirilmiştir. Uygun şekilde folik asit alımının nöral tüp defekti gelişimini önlediği görülmektedir (40). Folik asit ve folik asit metabolizmasında yer alan pek çok madde ile yapılan çalışmalar, nöral tüp defektinin önlenmesi açısından umut vaat etmektedir. Destek tedavisinin başarısını belirleyen en önemli faktör zamanlamadır (41). Friel tarafından yapılan bir çalışma (42), nöral tüp defekli çocuk doğuran annelerin meyve ve sebze yönünden fakir bir beslenme alışkanlığına sahip olduklarını ve daha çok şeker ve diğer işlenmiş gıdaları tükettiklerini göstermiştir.

Folik asit ile nöral tüp defekti gelişimi arasında bağ kuran kanıtlardan birisi de Eskes ve ark (43) tarafından yapılan bir çalışmadan gelmektedir. Bu çalışmada nöral tüp defekti olan çocuklar doğuran kadınlarda hiperhomosisteinemi gözlenmiştir. Ancak yükselmiş homosistein seviyelerinin, kuş embriyoları dışında nöral tüp defektinin majör bir nedeni olduğu kanıtlanamamıştır. Yükselmiş homosistein seviyeleri belki de zayıf folik asit desteğinin veya 5,10-methlenetetrahydrofolate redüktaz genlerinde mutasyonun bir sonucu olabilir. Hiperhomosisteinemi'de folik asitin rolü, homosisteinin metiyonine dönüştürülmesini sağlamasıdır (44). Bu nedenle Eskes ve ark (43), yükselmiş homosistein seviyelerinin belki de nöral tüp defektindeki esas neden olduğu ve zayıf folik asit desteği olduğu zaman bu yükselmenin önlenemediği veya daha da fazlaştığı hipotezini kurmuşlardır.

Van Aerts ve ark (45) tarafından ikinci bir hipotez düşük metiyonin seviyelerinin de nöral tüp defektlerine katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir. DNA ve RNA sentezi metiyonin gerektirmektedir (45). Bu nedenle düşük seviyelerde fetüs gelişiminin ciddi şekilde bozulabileceği iddia edilmektedir.

Daha ileri incelemeler konversiyondan elde edilen metil gruplarının önemini ortaya çıkarmıştır. Bu metil grupları protein, karnitin, lipidler ve çeşitli başka moleküllerin sentezinde hayati önem taşır (43).

Harris ve Juriloff (46), nöral tüp kapanmasını başaramayan farelerde genetik işaretleri incelemişlerdir. İnsanlarda benzerleri olan, nöral tüp defektlerinden sorumlu olabilecek yaklaşık 40 mutasyon saptamışlardır. Bu çalışmanın sonucu bu lokuslar saptanmış olsa da pek çok başka mutasyonların muhtemelen var olduğu ve bu defektin oluşumundaki rollerinin henüz kesin olmadığı belirtilmiştir.

Morrison ve ark. (47) T lokusunun TIVS7-2 olarak bilinen bir allelik varyantının heterozigot ebeveynlerden nöral tüp hastalığı olan çocuklara geçtiğini göstermişlerdir. Shields ve ark. (48) da TIVS7-2 alleli ile nöral tüp defektleri arasında ilişki bulmuşlardır. Jensen ve ark (49) TIVS7-2 allelinin bir veya daha fazla kopyasını taşıyan bireylerde sipina bifida gelişme riskinin 1.6 kat arttığını gözlemlemişlerdir.

Volcik ve ark.(50) PAX ve HOX genlerinin nöral tüp defektleri ile ilişkisini bulamamışlardır.

Bu yapılan çalışmalar dışında bir çok gen ilişkilendirme çalışmalarında bazı bulgular edinilmiş fakat bu sonuçlar nöral tüp defektlerinin nedeni olabilecek şekilde yorumlanamamıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada, karyotipleme tekniği kullanılarak tüm genomda varolabilecek olası bir yapısal varyasyonun nöral tüp defekt ile ilişkisini ortaya koymaya çalıştık.

6. SONUÇLAR

1. Yaptığımız çalışmanın sonucunda nöral tüp defekti ile ilişkili herhangi bir yapısal genom varyantı saptamadık.
2. Bu çalışmamızda kullandığımız karyotiple yöntemi, ancak çok geniş segmentlerde olabilecek yapısal değişkenlikleri göstermeye muktedirdir. Bundan dolayı daha küçük ölçekte var olabilecek yapısal değişkenliklerin olabileceği gözardı edilemez.
3. Nöral tüp defektleri ile ilişkili genom üzerinde yapısal bir varyantın olup olmadığına, daha küçük genom parçalarına duyarlı olan tetkikler kullanılarak ve daha fazla sayıda birey değerlendirilerek karar verilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Dev Disabil Res Rev*, 16(1):6-15.2010
2. Copp AJ. *Encyclopedia of Life Sciences, Neural Tube Defects*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; September 2008
3. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 79(3):187-210.2007
4. Harris MJ. Insights into prevention of human neural tube defects by folic acid arising from consideration of mouse mutants. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 85(4):331-339.2009
5. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7(2):85-97.2006
6. Carson AR, Feuk L, Mohammed M, Scherer SW. Strategies for the detection of copy number and other structural variants in the human genome. *Hum Genomics*, 2(6):403-414.2006
7. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 1:R57-66.2006
8. O'Rahilly R, Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*, 65(4):162-170.2002
9. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W *et al*. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118):444-454.2006
10. Khaja R, Zhang J, MacDonald JR, He Y, Joseph-George AM, Wei J, Rafiq MA, Qian C, Shago M, Pantano L *et al*. Genome assembly comparison identifies structural variants in the human genome. *Nat Genet*, 38(12):1413-1418.2006

11. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME *et al.* Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*, 16(8):949-961.2006
12. Başaran N. *Tıbbi Genetik*, 9. Nobel&Güneş Tıp Kitapevi, Bursa, 140-172, 2003.
13. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*, 3(10):769-778.2002
14. Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics*, 3. Garland Science, New York, 48-49, 2004.
15. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860-921.2001
16. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304-1351.2001
17. Przeworski M, Hudson RR, Di Rienzo A. Adjusting the focus on human variation. *Trends Genet*, 16(7):296-302.2000
18. Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, Richter DJ, Lander ES, Altshuler D. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet*, 32(1):135-142.2002
19. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*, 307(5712):1072-1079.2005
20. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, 36(9):949-951.2004
21. Feuk L, MacDonald JR, Tang T, Carson AR, Li M, Rao G, Khaja R, Scherer SW. Discovery of human inversion polymorphisms by comparative analysis of human and chimpanzee DNA sequence assemblies. *PLoS Genet*, 1(4):e56.2005

22. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D *et al.* Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet*, 37(7):727-732.2005
23. Warburton D. 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):995-1013.1991
24. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6(10):782-792.2005
25. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20(2):207-211.1998
26. Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J *et al.* Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol*, 21(10):1233-1237.2003
27. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, Tsang P, Curry B, Baird K, Meltzer PS *et al.* Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(51):17765-17770.2004
28. Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C *et al.* An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*, 64(9):3060-3071.2004
29. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. Recent segmental duplications in the human genome. *Science*, 297(5583):1003-1007.2002
30. Robledo R, Orru S, Sidoti A, Muresu R, Esposito D, Grimaldi MC, Carcassi C, Rinaldi A, Bernini L, Contu L *et al.* A 9.1-kb gap in the genome reference map is shown to be a stable deletion/insertion polymorphism of ancestral origin. *Genomics*, 80(6):585-592.2002
31. Buckland PR. Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med*, 35(5):308-315.2003

32. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet*, 73(3):591-600.2003
33. Consortium TIH. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063):1299-1320.2005
34. Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG *et al*. A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet*, 37(2):129-137.2005
35. Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3:199-242.2002
36. Kaplan KM, Spivak JM, Bendo JA. Embryology of the spine and associated congenital abnormalities. *Spine J*, 5(5):564-576.2005
37. Csabay L, Szabo I, Papp C, Toth-Pal E, Papp Z. Central nervous system anomalies. *Ann N Y Acad Sci*, 847:21-45.1998
38. Ghidini A, Sicherer S, Willner J. Congenital abnormalities (VATER) in baby born to mother using lovastatin. *Lancet*, 339(8806):1416-1417.1992
39. Nora JJ, Nora AH, Blu J, Ingram J, Fountain A, Peterson M, Lortscher RH, Kimberling WJ. Exogenous progestogen and estrogen implicated in birth defects. *JAMA*, 240(9):837-843.1978
40. Mitchell LE. Genetic epidemiology of birth defects: nonsyndromic cleft lip and neural tube defects. *Epidemiol Rev*, 19(1):61-68.1997
41. Lewis DP, Van Dyke DC, Stumbo PJ, Berg MJ. Drug and environmental factors associated with adverse pregnancy outcomes. Part III: Folic acid: pharmacology, therapeutic recommendations, and economics. *Ann Pharmacother*, 32(10):1087-1095.1998
42. Friel JK, Frecker M, Fraser FC. Nutritional patterns of mothers of children with neural tube defects in Newfoundland. *Am J Med Genet*, 55(2):195-199.1995
43. Eskes TK. Open or closed? A world of difference: a history of homocysteine research. *Nutr Rev*, 56(8):236-244.1998
44. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*, 1(5):228-237.1990

45. Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology*, 50(5):348-360.1994
46. Harris MJ, Juriloff DM. Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. *Teratology*, 56(3):177-187.1997
47. Morrison K, Papapetrou C, Attwood J, Hol F, Lynch SA, Sampath A, Hamel B, Burn J, Sowden J, Stott D *et al.* Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet*, 5(5):669-674.1996
48. Shields DC, Ramsbottom D, Donoghue C, Pinjon E, Kirke PN, Molloy AM, Edwards YH, Mills JL, Mynett-Johnson L, Weir DG *et al.* Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *Am J Med Genet*, 92(3):206-211.2000
49. Jensen LE, Barbaux S, Hoess K, Fraterman S, Whitehead AS, Mitchell LE. The human T locus and spina bifida risk. *Hum Genet*, 115(6):475-482.2004
50. Volcik KA, Blanton SH, Kruzel MC, Townsend IT, Tyerman GH, Mier RJ, Northrup H. Testing for genetic associations with the PAX gene family in a spina bifida population. *Am J Med Genet*, 110(3):195-202.2002