

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İDYOPATİK BOY KISALIĞINDA SHOX GENİ
DEĞİŞİKLİKLERİ**

Dr. Kenan DELİL

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT

ANKARA

2012

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İDYOPATİK BOY KISALIĞINDA SHOX GENİ
DEĞİŞİKLİKLERİ**

Dr. Kenan DELİL

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT

ANKARA

2012

ÖNSÖZ

Boy kısalığı güçlü genetik komponenti olan, multifaktöriyel gelişimsel bir durumdur. Boy kısalığına neden olabilecek birçok gen tanımlanmıştır. Bunların en önemlilerinden bir tanesi SHOX genidir ve SHOX genine bağlı boy kısalığında büyüme hormonu tedavisinin oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle SHOX geni değişikliklerinin analizi bu teze konu olmuştur.

Tıbbi genetik uzmanlığımı Türkiye'nin en iyi tıbbi genetik bölümlerinden biri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tamamlamış olmaktan büyük kıvanç duymaktayım. Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi başta olmak üzere çok kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Ajlan Tükün, Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut, Yrd. Doç. Dr. Timur Tuncalı, Yrd. Doç. Dr. Nüket Yürür Kutlay'a bilimsel ve mesleki gelişimime kıymetli katkılarından ve emeklerinden ötürü sonsuz şükranlarımı sunarım.

Kıymetli hocam tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut'a, tezimin konusunun belirlenmesinden, laboratuvardaki en ufak probleme kadar birçok zorlukta bilimsel yaklaşımı ve tecrübesiyle bana yol gösterdiğinden ve katkılarını esirgemediğinden ötürü şükranım. Türkiye'nin önde gelen tıbbi genetikçilerinden çok kıymetli hocam Prof. Dr. Ajlan Tükün'e engin teorik ve pratik bilgisini benimle paylaştığı ve laboratuvarında karşılaştığım problemlerde vermiş olduğu değer biçilemez desteği nedeniyle ayrıca teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı / Çocuk Endokrinolojisi ve Metabolizma Bilim Dalı öğretim üyelerine çok kıymetli katkılarından ve paylaşımlarından dolayı başta Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gönül Öcal ve Prof. Dr. Merih Berberoğlu, Prof. Dr. Zeynep Şıklar'a, ayrıca Uz. Dr. Bülent Hacıhamdioğlu'na,

Çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Arzu Vicdan, Dr. Sevgi Başer, Dr. Cemal Ekici, Dr. Sadiye Ekinci ve Dr. Burak Mutlu'ya, bölümümüzden yeni mezun olan Uz. Dr. Vehap Topçu'ya,

Bana her konuda destek olan bölümümüzün tüm çalışanlarına,

Emekleri ve fedakarlıklarını esirgemeyen canım anneme-babama ve kardeşlerime,

Her zaman yanımda ve bana destek olan, hayatımı güzelleştiren ve anlam katan sevgili eşim Işıl'a,

Saygı ve sevgi dolu içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İBK Tanımı	2
2.2. PAR (Pseudo-Autosomal Region) Bölgeleri	4
2.3. PAR Bölgelerinde Bulunan Genler	6
2.4. SHOX Geni ile İlişkili Klinik Durumlar	7
2.5. SHOX Geni	8
2.6. İBK’da SHOX Geninin Önemi	13
2.7. SHOX Mutasyonu Saptanmış İBK Olgularında Klinik Belirteçler	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma Grubu	20
3.2. Gerçekleştirilen Antropometrik Ölçümler ve Hesaplamalar	20
3.3. Mutasyon Analizi	23
3.3.1. DNA izolasyonu	23
3.3.2. MSM Analizi	23
3.3.3. FISH Analizi	26
3.3.4. Dizi Analizi	29
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR DİZİNİ	60
EKLER	
Ek 1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararı	70
Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	: Baz Çifti
BH	: Büyüme Hormonu
BK	: Boy Kısılığı
°C	: Santigrat Derece
CNE	: Conserved Noncoding Elements
ddH₂O	: Deiyonize-Distile H ₂ O
dH₂O	: Distile H ₂ O
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
EMA	: European Medicines Agency
EtBr	: Etityum Bromid
FDA	: Food and Drug Administration
FGFR3	: Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
gr	: Gram
HOXD13	: HMeoboX D13
IGF1	: Insuline-like Growth Factor 1
IGF-1R	: Insuline-like Growth Factor 1 Receptor
IGFALS	: IGF Acid-Labil Sununit
İAY	: İdeal Ağırlık Yüzdesi
İBK	: İdyopatik Boy Kısılığı
kb	: Kilo Baz
kg	:Kilogram
LMD	: Langer mezomelik displazisi
LWD	: Leri-Weill Diskondrosteozu
Mb	: Mega Baz
MgCl₂	: Magnezyum Klorid
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre

MLPA	:Multiple Ligation Probe Amplification
mmol	:Milimol
mRNA	: Messenger RNA
MSM	: Mikrosatellit Marker
ng	: Nanogram
NPPB	: Natriuretic Peptide Precursor B
NPR2	: Natriuretic Peptide Receptor B
OAR	: Otp, Aristaless, Rax
p	: Kromozom Kısa Kolu
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PAR	: Pseudo-Autosomal Region
PAR1	: Pseudo-Autosomal Region 1
PAR2	: Pseudo-Autosomal Region 2
PAX3	: PAired boX gene 3
PAX6	: PAired boX gene 6
PHOG	: Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogenic Gene
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
q	: Kromozom Uzun Kolu
SHOX	: Short Stature HOmeoboX
SHOXa	: SHOX geni protein a
SHOXb	: SHOX geni protein b
SH3	: Src Homology 3
sn	: Saniye
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SSC	: Saline / Sodium / Citrate
SSCP	: Single-Strand Conformation Polymorphism
SSD	: Standart Sapma Değeri
SPRY3	: SPRoutY-homolog 3
SYBL1	: SYnaptoBrevin-like 1
TBE	: Tris / Borik asit / EDTA
TGİÇ	: Tüm Genom İlişkilendirme Çalışmaları

U	: Unit
V	: Volt
VKi	: Vücut Kitle İndeksi
Xpter	: X Kromozomu Kısa Kolu Terminal Kısmı
Ypter	: Y Kromozomu Kısa Kolu Terminal Kısmı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PAR bölgeleri	5
Şekil 2.2. PAR1 ve PAR2 bölgelerinde bulunan genler	7
Şekil 2.3. SHOX geni kromozomal lokalizasyonu, genomik yapısı ve cDNA formları	10
Şekil 2.4. <i>Homeodomain</i> , SH3 bağlanma bölgesi, OAR domaini yerleşimi	11
Şekil 2.5. Madelung deformitesi radyolojik görüntüsü	17
Şekil 2.6. Ekstremité-gövde oranı çizelgesi	19
Şekil 3.1. SHOX geni FISH probu, SHOX geni, MSM DXYS10092 ve MSM DXYS10093 yerleşimleri	29
Şekil 4.1. Tüm olgulara ait boy, üst/alt segment oranı, kulaç-boy farkı ve ekstremité-gövde oranlarının SSD aralıklarındaki gösterimleri	38
Şekil 4.2. Tüm olgulara ait İAY değerlerinin SSD aralıklarındaki gösterimleri	39
Şekil 4.3. DXYS10092 MSM'si PAGE görüntüleri	44
Şekil 4.4. DXYS10093 MSM'si PAGE görüntüsü	45
Şekil 4.5. Olgu 20'ye ait FISH görüntüsü	47
Şekil 4.6. Olgu 28'e ait FISH görüntüsü	47
Şekil 4.7. Olgu 12'ye ait FISH görüntüsü	48
Şekil 4.8. İntron 2, c.277+17 pozisyonuna (rs140970936) ait sekans görüntüsü	49
Şekil 5.1. Olgu 12'ye ait el-bilek grafisi	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. İBK’da SHOX geni mutasyonlarının dağılımı	15
Tablo 3.1. MSM’lerin çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları	22
Tablo 3.2. MSM’lerin çoğaltılmasında kullanılan primerler	22
Tablo 3.3. Besiyeri içeriği	26
Tablo 3.4. Egzon 2 ve 6’nın çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları	30
Tablo 3.5. Egzon 3 ve 4-5’in çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları	30
Tablo 3.6. Sekans PZR’ı kimyasalları	31
Tablo 3.7. Sekans PZR’si koşulları	31
Tablo 3.8. Dizi analizinde kullanılan primerler	32
Tablo 4.1 Tüm olgulara ait gerçekleştirilen antropometrik ölçümler ve hesaplamalar	34
Tablo 4.2. Orantısız BK saptanan olgular	36
Tablo 4.3. Ekstremit-gövde oranı anormal olan olgular	37
Tablo 4.4. Anormal ekstremit uzunlukları saptanan olgular	40
Tablo 4.5. Baş-boyun muayenesinde saptanan bulgular	41
Tablo 4.6. İskelet sistemi ve diğer vücut bölgelerinin muayenesinde saptanan bulgular	42
Tablo 4.7. MSM analizi sonucunda homozigot saptanan olgular ve FISH yapılan olgular	46

1. GİRİŞ

Boy kısalığı (BK) güçlü genetik komponenti olan, multifaktöriyel gelişimsel bir durumdur. BK'ya neden olabilecek birçok gen tanımlanmıştır. Bunların en önemlilerinden biri SHOX (Short Stature HOrmeoboX) genidir. SHOX geni mutasyonunun idyopatik boy kısalığı (İBK), Leri-Weill diskondrosteozu (LWD), Langer mezomelik displazisi (LMD) ve Turner sendromundaki BK ve ek iskelet bulgularına neden olduğu gösterilmiştir. SHOX geni mutasyonu saptanan İBK'lı olgularda büyüme hormonu (BH) tedavisinin oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Kullanılan tarama yönteminin ve hasta seçim kriterlerinin farklılığına göre İBK'da SHOX geni mutasyonları %2-15 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmaya, klinik ve laboratuvar olarak İBK tanısı almış, sitogenetik olarak normal bulunmuş pediatrik yaş grubu hastalar dahil edilmiştir. SHOX geni delesyonlarının incelenmesinde öncelikle biri SHOX geni içinde, diğeri genin 5' bölgesinde yer alan iki mikrosatellit marker (MSM) heterozigotluk açısından değerlendirilmiş, her iki lokusta homozigot saptanan olgularda FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) analizi yapılmıştır. FISH analizi ile delesyon saptanmayan olgularda dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma ile;

1. İBK'da BH tedavisine yanıt veren alt grup olan SHOX geni mutasyonuna sahip olguları saptamak,
2. Ülkemizdeki İBK olgularında SHOX geni mutasyonlarının sıklığı ve dağılımının tespitine olanak sağlamak,
3. SHOX geni mutasyonu saptama ihtimali yüksek olan hasta alt gruplarını belirlemek,
4. Bu bilgilere dayanılarak mutasyon sıklığı ve hasta gruplarına göre genetik test algoritması geliştirmek,
5. SHOX geni analizi için ülke genelinde hizmet verebilecek alt yapı ve deneyime sahip bir merkez oluşumunu sağlamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İBK Tanımı

Pediyatrik endokrinolojide İBK tanımı hakkında farklı düşünce ve tartışmalar bulunmaktadır. Bunun nedeni birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen deneysel ve gözlemsel bilgilerin eksikliğidir (Wit ve Dunkel, 2011).

Kısa ve kısa olmayan bireyleri ayırmakta kullanılan tanım açıktır. Kısa; boyun aynı yaş, cinsiyet ve popülasyon grubu için verilen boy ortalamasının -2 standart sapma değeri (SSD)'nin altında olması şeklinde tanımlanmıştır. Bu tanıma göre kısalık tamamen istatistiksel bir durumdur ve direkt olarak patolojik bir durumu belirtmez (Ranke, 1996). Çoğu klinik çalışmada BK tanımı için bu alt limit kullanılmıştır (Bryant ve ark., 2007).

2008 yılında yapılan İBK konsensüs toplantısında (Cohen ve ark., 2008) İBK tanımı şu şekilde kabul edilmiştir: 'İBK bilinen sistemik, endokrin, nutrisyonel ve kromozomal bir hastalık olmadan boyun aynı yaş, cinsiyet ve popülasyon grubu için verilen boy ortalamasının -2 SSD'nin altında olmasıdır'. İBK tanımının kullanılabilmesi için anamnez, fizik muayene, laboratuvar tetkikleri ve görüntüleme yöntemleri ile BK nedeninin saptanamamış olması gerekir (Ranke, 1996). Hastaların BH eksikliği ve direnci, düşük doğum ağırlığı, kötü kalori alımı ve psikiyatrik problemlerinin olmaması gereklidir (Rosenfeld, 2005). İskelet displazileri ve Turner sendromu gibi dismorfik fenotiplere sahip çocuklar İBK tanımı dışında tutulmalıdırlar. İBK tanımı dışında tutulması gereken diğer bir grup çölyak hastalığı, inflamatuvar barsak hastalığı, juvenil kronik artrit, hipotiroidizm ve Cushing's sendromu gibi açık olarak tanımlanmış hastalıklardır (Cohen ve ark., 2008). İBK tanısı diğer tanımlanabilir durumların dışlanmasına bağlı bir tanımdır, İBK'ya özgü bir pozitif bulguya dayanmaz (Wit ve ark., 2008).

Tüm BK olgularının %60-80'inin İBK olgusu olduğu tahmin edilmektedir. (Lindsay ve ark., 1994). BK erkeklerde daha rahatsız edici bir durumdur. Olguların kliniklere başvurmaları sosyoekonomik durumları ile ilişkilidir (Cohen ve ark., 2008).

Geçtiğimiz birkaç yılda BK'nın birçok nedeni keşfedilmiştir ve tüm genom ilişkilendirme çalışmaları (TGİÇ) sonucunda normal popülasyonda boyda varyasyona neden olan birçok gen bulunmuştur. Ayrıca büyümenin zamanlamasının yani matürasyonun genetik olarak belirlendiği fikri benimsenmiştir. İBK'nın aşağıda verilen 3 gen grubundan biri ya da daha fazlasının varyasyonlarına bağlı olarak geliştiği bildirilmektedir (Wit, 2011).

1. Tek ya da birkaç genin varyasyonu.

Bu gruptaki genlerin mutasyonlarının boya olan etkilerinin diğerlerine göre daha fazla olması beklenir ancak rölatif olarak daha nadir olduklarından TGİÇ'te saptanamayabilirler. Örnek olarak heterozigot SHOX geni mutasyonları, IGF1 (Insuline-like Growth Factor 1) ve IGF-1R (Insuline-like Growth Factor 1 Receptor), IGFBP3 (IGF Acid-Labile Subunit), NPR2 (Natriuretic Peptide Receptor B), 22q11 delesyonları, sex kromozomu mozaiklikleri ve uniparental dizomiler verilebilir (Walenkamp ve Wit, 2006, Lettre ve ark., 2008).

2. TGİÇ'te gösterilen ve erişkin boyu üzerine etkili genler.

Bu grup, boyun poligenik özellik gösterdiğinin kanıtıdır. Bu grupta boy üzerine daha az etkili ama daha sıklıkla görülen polimorfizmler yer alır. Yapılan farklı çalışmaların kombinasyonu erişkin boyu üzerine etkili 40'tan fazla genin varlığını göstermiştir (Gudbjartsson ve ark., 2008, Lettre ve ark., 2008, Weedon ve ark., 2008). Bu gruptaki her bir genin boy üzerine olan etkisi azdır ancak birçok polimorfizmin kümülatif etkisi önemli rol oynayabilir (Wit, 2011).

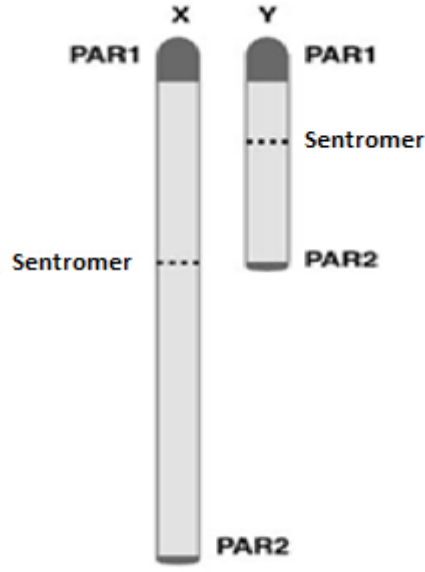
3. Büyümenin zamanlaması yani matürasyon ile ilişkili genler.

TGİÇ daha çok erişkin bireyler üzerinde yapılmıştır. Çocukluktaki boy SSD'leri erişkin boy SSD'leri ile korelasyon gösterdiğinden sonuçlar çocuklar için de yorumlanabilir ancak boy yorumlanırken üzerinde düşünülmesi gereken diğer bir faktör matürasyondur. Matürasyon tek boyutlu bir olgu değildir. Matürasyon epifiz plaklarındaki büyümenin derecesi ve pubertenin başlangıcı ve zamanlaması ile değerlendirilir. Epifiz plaklarındaki büyümenin derecesi el-bilek radyografileri ile gösterilebilir. Pubertenin başlangıcı ve zamanlaması ile ilişkili genler hakkında bilgi toplamak, iskelet matürasyonu ile ilişkili genleri göstermek oldukça zordur (Wit, 2011). Finlandiya'da yapılmış güncel bir çalışmada infant ve puberte dönemindeki büyüme hızı pikinin genetik varyasyonlarla ilişkisi incelenmiş, infant dönemi büyüme hızı piki ile ilişkili 7 SNP (Single Nucleotide Polymorphism), puberte dönemi büyüme hızı piki ile ilişkili 5 SNP bulunmuştur (Sovio ve ark., 2009). Menarş başlangıç yaşı ile ilişkili genlerin tespitini amaçlayan çalışmalar şu ana kadar pozitif bir sonuç vermemiştir (Gajdos ve ark., 2009).

2.2. PAR (Pseudo-Autosomal Region) Bölgeleri

Erkek mayoz bölünmesi sırasında kromozom eşleşmesinin olabilmesi için X ve Y kromozomlarının yeterli oranda homoloji göstermesi gerekir. Bu kromozomların mayozdaki eşleşmesi sekans özdeşliği gösteren PAR bölgelerinde gerçekleşmektedir (Graves ve ark., 1998).

PAR bölgeleri X ve Y kromozomlarının kısa kollarının distal uç bölgelerinde bulunan yaklaşık 2.7 Mb'lık (PAR1) ve uzun kollarının distal uç bölgelerinde bulunan yaklaşık 0.33 Mb'lık (PAR2) alanı kapsar (Blaschke ve Rappold, 2006). PAR bölgeleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Flaquer ve ark., 2008).



Şekil 2.1. PAR bölgeleri-Flaquer ve ark. (2008)'dan değiştirilerek alınmıştır.

X kromozomunun ökromatik bölgelerinin %99.3'ünün ve PAR2 bölgesinin tamamının sekansı belirlenmiş olmasına rağmen PAR1 bölgesinin yaklaşık %80'i sekanslanmıştır. Bu farklılık PAR1 sekansında bulunan 7 *gap* bölgesinden kaynaklanır. Toplamda yaklaşık olarak 600 kb'den oluşan bu bölge mevcut genomik klonlarla doldurulamamaktadır (Ross ve ark., 2005).

PAR1 bölgesi yapısal özellikleri bakımından PAR2 bölgesi ve PAR dışındaki X kromozomu sekansından oldukça farklılık gösterir. PAR1 bölgesinin GC içeriği %48 iken geri kalan X kromozomu sekansının GC oranı %39'dur (Ciccodicola ve ark., 2000). Bu oran subtelomerik bölgelerinde GC oranları yüksek kromozomlardan bile daha fazladır (Humphray ve ark., 2004).

GC-zengin bölgelerin, yüksek orandaki minisatellit tekrarların ve diğer çeşitli duplike yapıların varlığı PAR1 bölgesinin klonlanmasında ve sekanslanmasında karşılaşılan zorlukları açıklayabilir (Ross ve ark., 2005).

PAR1 sekansında L1 tekrar ailesi belirgin olarak az olmasına rağmen Alu tekrarları X kromozomunun geri kalanına oranla 4-5 kat fazladır (Blaschke ve Rappold, 2006). Bir çalışmada tekrar dizilerinin PAR1 bölgesindeki oldukça yüksek olan rekombinasyon oranına etkisi araştırılmış ancak rekombinasyon bölgelerinin tekrar dizileri yerleşimi ile paralellik göstermediği, rekombinasyon bölgelerinin PAR1 bölgesi boyunca oldukça eşit bir şekilde dağıldığı gösterilmiştir (Lien ve ark., 2000).

PAR sekansları X kromozomunun %2'sini, Y kromozomunun %5'ini oluşturmaktadır. Erkek mayozunda gerekli olan X-Y kromozom eşleşmesi esnasında bir *crossing over* olayı gerçekleşmektedir (Cooke ve ark., 1985, Rouyer ve ark., 1986, Lien ve ark., 2000). Bu nedenle PAR bölgesindeki rekombinasyon oranı geri kalan genomun rekombinasyon ortalamasından 20 kat daha fazladır (Rouyer ve ark., 1986).

2.3. PAR Bölgelerinde Bulunan Genler

PAR1 bölgesinde 24 ve PAR2 bölgesinde 5 adet gen bulunmaktadır (Şekil 2.2). PAR bölgeleri X ve Y kromozomunun geri kalan sekansı ile karşılaştırıldığında Mb başına daha fazla gen bulundurulur. Mb başına PAR1 bölgesi 10 gen, PAR2 bölgesi 15 gen, X kromozomunun geri kalan sekansı 7 gen (Ross ve ark., 2005), Y kromozomunun geri kalan sekansı 3 gen (Skaletsky ve ark., 2003) içermektedir.

PAR1 bölgesinde bulunan tüm genler X inaktivasyonundan kaçarak. PAR2 bölgesinin en proximal bölgesinde bulunan SPRY3 (SPRoutY-homolog 3) ve SYBL1 (SYnaptoBrevin-Like 1) genleri X inaktivasyonuna uğrar (Ciccodicola ve ark., 2000). Sonuç olarak PAR1 bölgesinde bulunan tüm genler bireyde 2 adet fonksiyonel kopyaya sahiptir ve psödootozomal kalıtım paterni gösterirler (Cooke ve ark., 1985, Rouyer ve ark., 1986). PAR bölgelerinde hastalıkla ilişkisi gösterilmiş tek gen SHOX genidir (Blaschke ve Rappold, 2006).

Bölge	Xp Telomerden Uzaklık (Mb)	Genler
PAR1	0.15	cU136G2.1 (<i>PLCXD1</i>)
	0.17	cU136G2.2 (<i>GTPBP6</i>)
	0.25	cM56G10.2§
	0.29	cM56G10.1 (<i>PPP2R3B</i>)
	0.57	<i>SHOX</i>
	0.92	bA309M23.1§
	1.31	<i>CRLF2</i>
	1.38	<i>CSF2RA</i>
	1.52	<i>IL3RA</i>
	1.55	<i>SLC25A6</i>
	1.56	bA261P4.5§
	1.57	bA261P4.6 (<i>CXYorf2</i>)
	1.59	<i>ASMTL</i>
	1.66	bA261P4.4 (<i>P2RY8</i>)
	1.76	<i>DXYS155E (CXYorf3)</i>
	1.79	<i>ASMT</i>
	1.79	bB297E16.3§
	1.91	bB297E16.4§
	1.93	bB297E16.5§
	2.37	<i>DHRSX</i>
PAR2	2.41	<i>ALTE (ZBED1)</i>
	2.54	Em:AC097314.2§
	2.53	Em:AC097314.3§
	2.63	<i>CD99</i>
	154.57	<i>SPRY3</i>
PAR2	154.71	<i>SYBL1</i>
	154.81	<i>IL9R</i>
	154.81	Em:AJ271736.5§
	154.82	Em:AJ271736.6 (<i>FAM39A</i>)§

Şekil 2.2. PAR1 ve PAR2 bölgelerinde bulunan genler. Ross ve ark. (2005)'dan değiştirilerek.

2.4. SHOX Geni İle İlişkili Klinik Durumlar

İBK (Ellison ve ark., 1997, Rao ve ark., 1997), LWD (Shears ve ark., 1998) ve LMD (Belin ve ark., 1998) SHOX geni mutasyonları ile genotip-fenotip korelasyonu bakımından açık bir bağlantı saptanan klinik durumlardır. Bu 3 klinik durum da SHOX geninin fonksiyonel kaybına bağlı olarak hafif klinik tablodan (İBK) ağır klinik tabloya doğru (LMD) bir spektrum şeklinde ortaya çıkar (Munns ve Glass, 2005). Ayrıca SHOX geninin, 45,X Turner sendromundaki BK ve ek kemik bulgularından sorumlu olduğu da gösterilmiştir (Rao ve ark., 1997, Blaschke ve Rappold, 2000, Clement-Jones ve ark., 2000).

LWD belirgin mezomelik ekstremite kısalığı, orantısız boy kısalığı ve Madelung deformitesinin olduğu iskelet displazisidir (Langer, 1965). SHOX geni heterozigot mutasyonuna bağlı gelişir ve psödootozomal dominant kalıtım paternine sahiptir (Belin ve ark., 1998, Cormier-Daire ve ark., 1999, Spranger ve ark., 1999, Munns ve

Glass, 2005). LWD hastalarında SHOX geni mutasyonu saptama oranı %60-100 arasında değişmektedir (Cormier-Daire ve ark., 1999, Schiller ve ark., 2000). Her iki cinsiyette de görülmesine karşın kız çocuklarında östrojenin olası etkisine bağlı olarak genellikle daha ağır seyreder (Fukami ve ark., 2004).

LMD SHOX geni homozigot delesyonu ya da *null* alele neden olan SHOX geni bileşik heterozigot mutasyonu sonucunda ortaya çıkar (Belin ve ark., 1998, Shears ve ark., 1998, Ogata ve ark., 2002, Shears ve ark., 2002, Zinn ve ark., 2002). Her iki üyesinin de LWD'li olduğu çiftlerin çocuklarında LMD hastalığı ortaya çıkar (Shears ve ark., 2002, Thomas ve ark., 2004). LMD çok daha ağır bir iskelet displazisidir. Tipik olarak hedef boyun 130 cm olduğu ağır BK gelişir. Özellikle kemiklerin proksimalinde belirgin olmak üzere uzun tubuler kemiklerde kısalma meydana gelir. LMD ulna ve fibulada aplazi ya da ağır hipoplazi, tibia ve radiusta kalınlaşma ve yassılaşma ile karakterize bir iskelet displazisidir. Tipik olarak LMD hastalarında Madelung deformitesi görülmez (Langer, 1967, Munns ve Glass, 2005).

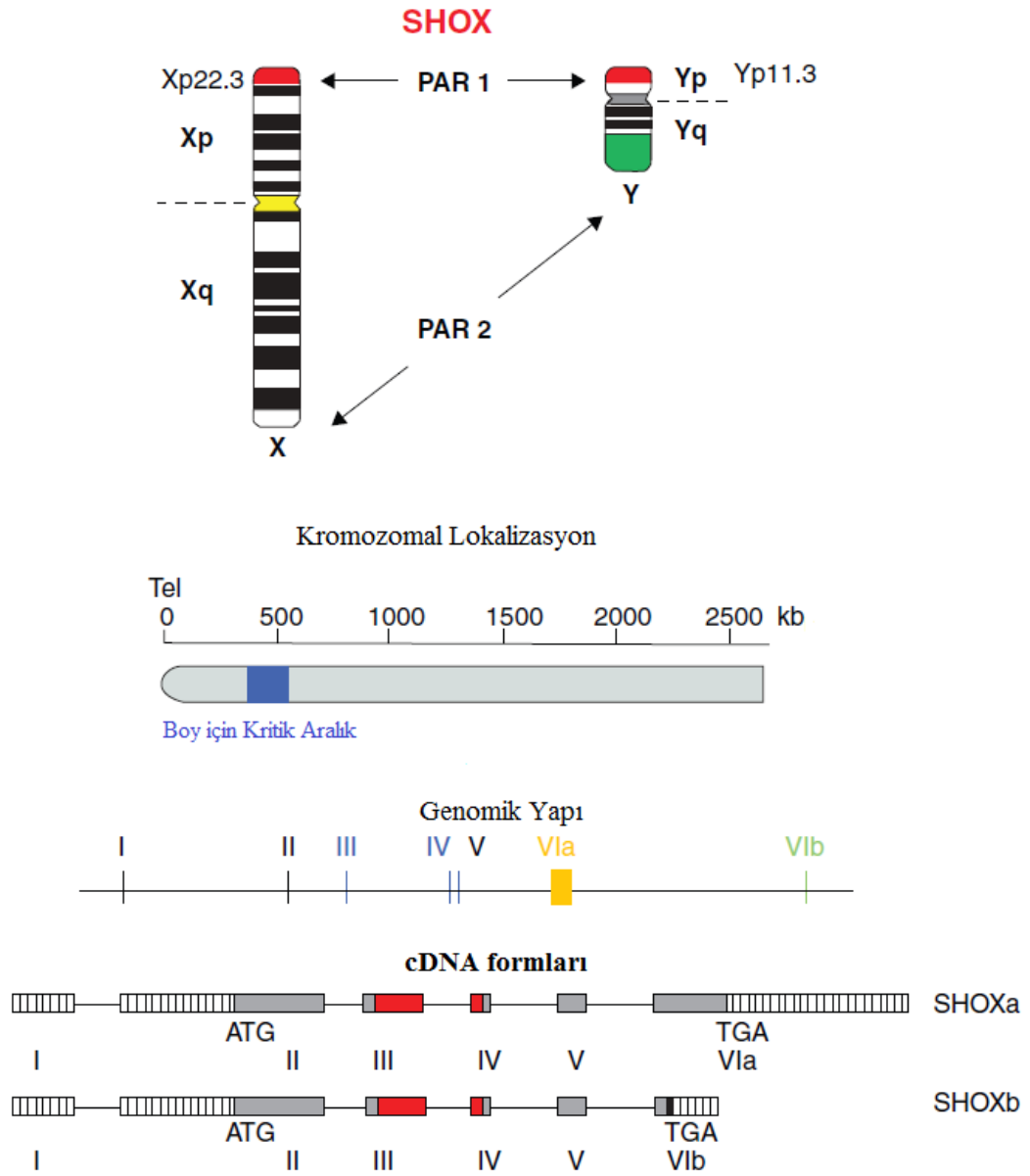
2.5. SHOX Geni

SHOX geni ilk olarak Rao ve ark. tarafından X kromozomu kısa kolu distal uç bölgesinde delesyon haritalama yöntemi kullanılarak bulunmuştur (Rao ve ark., 1997). Aynı gen bu gruptan bağımsız olarak Ellison ve ark. tarafından da bulunmuş ve PHOG (Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogenic Gene) olarak isimlendirilmiştir (Ellison ve ark., 1997). SHOX geninin kromozomal lokalizasyonu, genomik yapısı ve cDNA formları şekil 2.3'te gösterilmiştir (Oliveira ve Alves, 2011).

SHOX geni (NCBI Gene ID: 6473) Xpter-p22.32 ve Ypter-p11.2'de lokalize PAR1 bölgesinde yer alan, Xp22.33 ve Yp11.3 yerleşimli, 35.067 bp uzunluğunda bir gendir. Yedi egzona sahip bu genin ilk egzonu kodlamayan egzondur ve 3' ucundaki egzonun alternatif ayıklanması ile sırasıyla 292 ve 225 aminoasit uzunluğundaki SHOXa ve SHOXb proteinlerini kodlar. SHOX geni mRNA transkriptleri transkript varyant 1; SHOXa'yı kodlar ve transkript varyant 2; SHOXb'yi kodlar. Transkript

varyant 1 (3757 bç, NCBI Reference Sequence: NM_000451.3) ve transkript varyant 2 (1951 bç, NCBI Reference Sequence: NM_006883.2) mRNA transkriptlerinde ilk 5 egzon aynı olmasına karşın son egzon sırasıyla 6a ve 6b olarak birbirinden farklıdır. SHOXa proteini *homeodomain*, SH3 (Src Homology 3) bağlanma bölgesi ve OAR (Otp, Aristaless, Rax) bölgesi olmak üzere 3 önemli domaine sahiptir. SHOXb proteininde SH3 bağlanma bölgesi ve OAR bölgesi bulunmaz. Bu nedenle SHOXa proteini transkripsiyon faktörü olarak görev yaparken, SHOXb proteininin transkripsiyonel aktivatör özelliği bulunmaz (Ellison ve ark., 1997, Rao ve ark., 1997).

Enkondral kemikleşmenin önemli düzenleyicisi olan *brain natriuretic peptide* proteinini kodlayan NPPB (Natriuretic Peptide Precursor B) geninin SHOX geninin transkripsiyonel hedeflerinden biri olduğu gösterilmiştir (Marchini ve ark., 2007a). Kondrojeniziste rol alan transkripsiyon faktörleri olan SOX5 ve SOX6 genlerinin de SHOX geni tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Aza-Carmona ve ark., 2011). Ayrıca, Dicker ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada SHOX geninin ekstremitte gelişimi üzerine etkisi olan FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) genine güçlü pozitif etkide bulunduğu gösterilmiştir (Decker ve ark., 2011).



Şekil 2.3. SHOX geni kromozomal lokalizasyonu, genomik yapısı ve cDNA formları. cDNA formlarında kırmızı boyalı alanlar *homeodomain* bölgesini, gri alanlar egzonların kodlayan bölgelerini, çizgili alanlar kodlamayan bölgeleri göstermektedir-Olivere ve Alves (2011)’ten değiştirilerek alınmıştır.

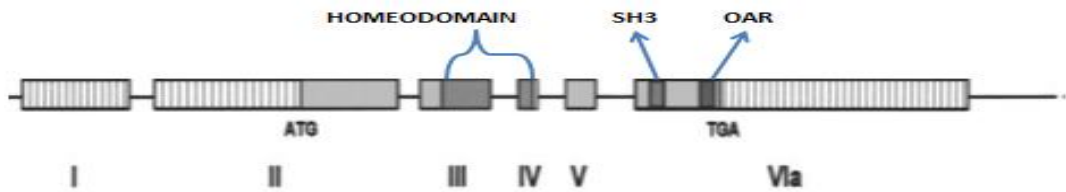
SHOX geninde bulunan *homeobox* bölgesi egzon 3 ve egzon 4’te bulunur ve SHOX proteininin *homeodomain* bölgesini kodlar. Bu bölge sayesinde protein, spesifik DNA bölgelerine bağlanarak gen transaktivasyonunu gerçekleştirebilir (Ellison ve ark., 1997, Rao ve ark., 1997). Ayrıca bu protein bölgesinin nükleer translokasyon

(Sabherwal ve ark., 2004) ve dimerizasyon (Schneider ve ark., 2005) ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Homeobox 180 bç DNA dizisidir ve 60 aminoasit uzunluğunda DNA bağlanma özelliği olan *homeodomain* bölgesini kodlar. *Homeodomain* ökaryotlarda transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma motifidir. *Homeobox* içeren genler (*homeobox* gen ailesi) embriyonun uzamsal ve zamansal olarak gelişimini düzenleyerek çok önemli etkilere sahiptir (Gehring ve ark., 1994, Krumlauf, 1994, Boncinelli, 1997).

SHOX ile ilişkili klinik durumlarda olduğu gibi Waardenburg sendromu tip 1’de PAX3 (PAired boX gene 3) geni (Baldwin ve ark., 1992), aniridide PAX6 (PAired boX gene 6) geni (Glaser ve ark., 1992), sinpolidaktilide HOXD13 (HOMeoboX D13) geni (Muragaki ve ark., 1996) gibi birçok kalıtsal hastalıkta *homeobox* genlerinin mutasyonu neden olarak gösterilmiştir.

SHOX geninde C-terminal yerleşimli OAR bölgesi transaktivasyonel fonksiyondan sorumludur (Rao ve ark., 2001). SH3 bağlanma bölgesi prolinden zengin bir dizidir ve protein-protein interaksiyonu ile sitoplazmik sinyal iletiminde görev alır (Koch ve ark., 1991). SHOXa egzonları, *homeodomain*, SH3 bağlanma bölgesi, OAR domaini şekil 2.4’te gösterilmiştir (Rappold ve ark., 2002).



Şekil 2.4. *Homeodomain*, SH3 bağlanma bölgesi, OAR domaini yerleşimi. SHOXa kodlayan egzonları açık gri renkte boyanmıştır. Çizgili bölgeler kodlamayan bölgeleri göstermektedir-Rappold ve ark.(2002)’dan değiştirilerek alınmıştır.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizi ile LWD hastalarında, SHOX geninin birkaç yüz kb *downstream* yönünde bulunan evrimsel olarak korunmuş CNE'ler (Conserved Noncoding Elements) gösterilmiştir (Benito-Sanz ve ark., 2005, Fukami ve ark., 2006, Huber ve ark., 2006, Rappold ve ark., 2007). Bu elementlerden 3 tanesinin tavuk ekstremite tomurcuğunda ve 5 tanesinin nöral tüpte *enhancer* olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Sabherwal ve ark., 2007).

SHOX geni şempanze, köpek, kedi gibi vertabralı türlerindeki ortologları ile yüksek oranda sekans homolojisi gösterirken (Blaschke ve Rappold, 2006), rodentlerde (kemirgenler) homoloji bulunmaz (Rappold ve ark., 2002).

SHOX geninin önemi şu şekilde sıralanabilir; 1) Fetal yaşam esnasında gelişen iskelet dokusunda, özellikle kemik iliği fibroblastlarında ve prolifer-hipertrofik kondrositlerde eksprese olur (Ellison ve ark., 1997, Rao ve ark., 1997, Clement-Jones ve ark., 2000, Marchini ve ark., 2004, Munns ve ark., 2004), 2) Büyüme plağındaki SHOX proteini eksikliği, belirgin kondrosit disorganizasyonu ile birliktelik gösterir (Munns ve ark., 2001), 3) SHOX geni aktif kopya sayısı ve boy arasında doz bağımlı ilişki görülür (Ogata ve ark., 2001).

SHOXa ve SHOXb farklı dokularda farklı derecelerde eksprese olurlar. SHOXa ekspresyonu iskelet kası, plasenta, pankreas, kalp, kemik iliği fibroblastları, fetal beyin gibi birçok dokuda olurken, SHOXb ekspresyonu fetal böbrek, iskelet kası ve kemik iliği fibroblastlarında -daha sınırlı dokuda- meydana gelir. Her iki protein de en fazla kemik iliği fibroblastlarında eksprese olurlar (Rao ve ark., 1997). Birinci ve 2. embriyonik ark, ulna, radius, dirsek, el bileği ve bacakta bulunan kemiklerdeki SHOX ekspresyon paterni LWD hastalarındaki mezomelik BK ve Madelung deformitesini açıklamaktadır.

Turner sendromundaki karakteristik iskelet sistemi özellikleri olan kısa boyun, skolyoz, genu valgum, Madelung deformitesi ve hipoplastik metakarpalar, SHOX geni anomalisine sahip kısa boylularda da bulunabilmektedir (Clement-Jones ve ark., 2000). Hintz tarafından yazılan bir derlemede Turner sendromu ya da

diskondroosteozise özgü bir ya da birkaç iskelet bulgusu bulunan hastalarda SHOX geni çalışılması önerilmiştir (Hintz, 2002).

2.6. İBK’da SHOX Geninin Önemi

BK vakalarının yaklaşık 1/40-1/150’sinde, genel popülasyonun 1/2000-1/5000’inde SHOX geni mutasyonu olduğu tahmin edilmektedir (Leka ve ark., 2006, Marchini ve ark., 2007b).

SHOX geninde saptanan mutasyonun tipi ve konumu ile fenotip arasında korelasyon kurulamamıştır. Tüm gen delesyonu ile intragenik *null* alel arasında da fenotipik farklılık gözlenmemiştir. SHOX geninin neden olduğu BK’da moleküler mekanizmaya bir alelin fonksiyon kaybetmesinin (haploinsufficiency) neden olduğu bildirilmiştir (Rappold ve ark., 2002).

Kullanılan tarama yönteminin ve hasta seçim kriterlerinin farklılığına göre İBK’da SHOX geni mutasyonları %2-15 olarak bulunmuştur (Binder ve ark., 2000, Rappold ve ark., 2002, Stuppia ve ark., 2003, Huber ve ark., 2006, Jorge ve ark., 2007, Rappold ve ark., 2007).

En sık görülen mutasyonlar SHOX genini kapsayan ve birkaç kb’dan birkaç yüz kb’ya kadar değişen boyutlardaki delesyonlardır. SHOX genine ait delesyonlar, SHOX geni mutasyonlarının yaklaşık %80’ini kapsamaktadır. Mutasyonların geri kalan kısmı nokta mutasyonlarından oluşmaktadır (Rappold ve ark., 2002, Blaschke ve Rappold, 2006, Huber ve ark., 2006, Sabherwal ve ark., 2007, Binder, 2011). Öte yandan genin 50-250 kb *downstream* yönünde bulunan düzenleyici *enhancer* bölgesinin delesyonlarının da sık görüldüğü ve SHOX geni mutasyonuna bağlı fenotipe neden olduğu bildirilmiştir (Benito-Sanz ve ark., 2005, Benito-Sanz ve ark., 2006, Fukami ve ark., 2006, Sabherwal ve ark., 2007).

SHOX genini kapsayan delesyonların karakterizasyonunu belirlemek amacıyla Benito-Sanz ve ark. tarafından yapılmış olan bir çalışmada (Benito-Sanz ve ark.,

2006), delesyon taşıyan 47 LWD ve 1 LMD toplam 48 hastada delesyonlar ilk olarak MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) ve MSM'ler (DXYS10092, DXYS201, DYS290, DXYS10093, DXYS233, ve DXYS234) ile gösterilmiş, daha sonra çok sayıda SNP ve MSM kullanılarak daha ayrıntılı bir şekilde kırık noktaları belirlenmiştir. Sonuç olarak SHOX genini içeren delesyonların oldukça heterojenite gösterdiği ortaya konmuştur (en az 8kb-en çok 38Mb). Bu 48 hastanın 44 tanesinde (yaklaşık %91.6) SHOX genini tamamen içine alan delesyonlar saptanırken, 4 tanesinde (yaklaşık %8.4) parsiyel delesyonlar tespit edilmiştir. Dört hastada saptanan parsiyel delesyonların minimum ve maksimum boyutları:

1. Egzon 4-6a'yı kapsayacak şekilde 8-21 kb,
2. Egzon 1-2'yi kapsayacak şekilde 21-56 kb,
3. Egzon 1-2-3-4-5-6a'yı kapsayacak şekilde 70-100 kb,
4. Egzon 2-3-4-5-6a-6b'yi kapsayacak şekilde 28-83 kb olarak tespit edilmiştir.

Missense ve *nonsense* mutasyonlar tüm gen boyunca görülmesine rağmen *homeobox* bölgesinin bulunduğu 3. ve 4. egzonda daha fazla bulunmaktadır. Bu mutasyonların proteinin inaktivasyonuna veya nükleer translokasyon ya da dimerizasyonunun engellenmesine neden olduğu belirtilmiştir (Schneider ve ark., 2005).

Niesler ve ark. tarafından yayınlanan *SHOX Allelic Variant Database* veritabanında hastalıkla ilişkili alelik varyantlar ve polimorfizmler gösterilmiştir. Bu veritabanı sadece SHOX geninin etkilendiği mutasyonları içermekte, düzenleyici *enhancer* bölgesindeki delesyonları içermemektedir. 185 adet hastalıkla ilişkili alelik varyant bildirilmiştir. Bunlardan 159'u SNP, 19'u delesyon, 7'si duplikasyondan oluşmaktadır. 159 SNP'den 104'ü (%65.4) *missense* mutasyon iken, 33 tanesi (%20.8) *nonsense* mutasyonlardır. En sık rastlanan *nonsense* mutasyon c.674C>T (R195*) olarak 12 bağımsız hastada saptanmıştır. 19 küçük delesyon (%10.3) 1 ile 12 bç arasında değişmektedir ve hastaların büyük çoğunluğunda *frameshift* mutasyona neden olmaktadır. SH3 bağlanma bölgesinde *missense* mutasyon bildirilmemiştir (Niesler ve ark., 2007).

Rappold ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada İBK nedeniyle başvuran 900 hasta incelenmiştir. 750 hastada SHOXa kodlayan egzonlar (egzon 2-6a) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonrasında SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) yöntemi ile taranmış, anormal bant paterni bulunan olgularda dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Geri kalan 150 hastada FISH yöntemi kullanılarak delesyonlar açısından taranmıştır. Sonuç olarak SSCP yöntemi ile %0.4 oranında, FISH yöntemi ile %2 oranında mutasyon tespit edilmiştir (Rappold ve ark., 2002).

Huber ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada önce 4 polimorfik MSM kullanılarak delesyon analizi yapılmış, delesyon saptanmayan olgularda SHOXa'yı kodlayan egzonlar sekans yöntemi ile taranmış, her iki analizde de normal sonuç veren olgular PAR1'i kapsayan 20 MSM ve 49 SNP kullanılarak ayrıntılı delesyon taraması yapılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada %15 oranında mutasyon tespit edilmiştir (Huber ve ark., 2006).

İBK'da %2-15 oranında saptanan SHOX geni mutasyonlarının dağılımı tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. İBK'da SHOX geni mutasyonlarının dağılımı.

Mutasyon Tipi		Sıklığı (yaklaşık olarak)
Delesyonlar	SHOX geninin bir kısmının etkilendiği parsiyel delesyonlar	%7
	SHOX geninin tamamının etkilendiği delesyonlar	%73
Nokta Mutasyonları		%20

SHOX geni *enhancer* bölgesindeki delesyonların sıklığını belirlemek ve LWD ve kontrol grubu ile karşılaştırmak amacıyla 740 İBK ve 67 LWD olgusu ve 100 kontrolde SHOX geni mutasyonları araştırılmıştır. Sekans analizi sonrasında intragenik nokta mutasyonları 5 İBK ve 9 LWD hastasında saptanmış ve bu hastalar dışlanmıştır. 735 İBK olgusunda saptanan 31 delesyondan 8'inin (%26) sadece *enhancer* bölgesinde olduğu, 58 LWD olgusunda saptanan 29 delesyonun 13 tanesinin (%45) sadece *enhancer* bölgesini kapsadığı belirlenmiştir. Bu delesyonlar 100 kontrolde çalışılmış ve normal bulunmuştur (Chen ve ark., 2009).

Geniş ölçekli, çok merkezli, randomize, prospektif bir çalışmanın 2 yıllık sonuçlarının değerlendirildiği bir yayında SHOX geni mutasyonuna bağlı BK olgularında BH tedavisinin büyüme hızı ve boy SSD değerlerini belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca SHOX geni mutasyonuna bağlı BK olguları ile Turner sendromu olgularının BH tedavisine yanıtı benzer bulunmuştur (Blum ve ark., 2007). Bu çalışmaya dayanılarak FDA (Food and Drug Administration) ve EMEA (European Medicines Agency) tarafından SHOX geni mutasyonuna bağlı BK olgularında BH tedavisi onaylanmıştır (Binder, 2011).

2.7. SHOX Mutasyonu Saptanmış İBK Olgularında Klinik Belirteçler

SHOX geni mutasyonlarının ortaya çıkarttığı fenotipler oldukça değişkendir. Fenotipin ana karakteristiği olan ekstremitelerin mezomelik orantısızlığı ve Madelung deformitesi zamanla gelişir ve daha çok ikinci dekatta ortaya çıkar. Bu nedenle okul öncesi çocuklarda fenotip sıklıkla nonspesifiktir (Ross ve ark., 2001, Binder ve ark., 2003, Jorge ve ark., 2007).

Kız çocuklarında daha sık ve daha şiddetli bir fenotip izlenir. Bu durumdan östrojen etkisi sorumlu tutulmuştur (Ogata ve ark., 2001).

SHOX geni mutasyonunun neden olduğu Madelung deformitesi ilk olarak Alman cerrah Dr. Otto Wilhelm Madelung tarafından 1878 yılında tanımlanmıştır.

Madelung tanımını ‘distal ulnanın öne spontan subluksasyonu’ şeklinde yapmıştır (Binder, 2011).

Radyolojik tanımlama ilk olarak Langer tarafından gerçekleştirilmiştir. Langer el-bilek grafisinde 3 ana bulgu tanımlamıştır; (i) distal radial epifizin triangular şekilde kalması, (ii) karpal kemiklerin lunatum en tepede kalacak şekilde piramidalizasyonu, (iii) radius distalinin ulna tarafında kalan bölgesinin daha az yoğun görülmesi (*radylucency*’nin daha az yoğun olması) (Langer, 1965). Madelung deformitesi radyolojik görüntüsü şekil 2.5’te gösterilmiştir (Binder, 2011).

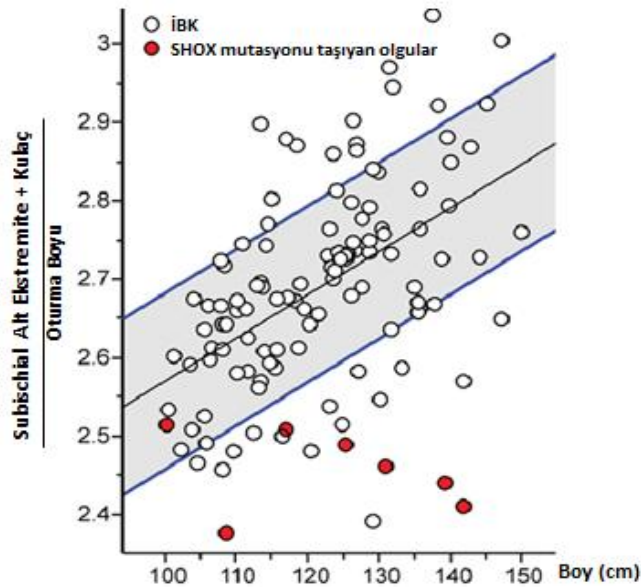


Şekil 2.5. Madelung deformitesi radyolojik görüntüsü. Üstteki resimler normal alttaki resimler Madelung deformitesi olan hastanın el-bilek grafileri. A. Distal radial epifizin triangular şekilde kalması, B. Karpal kemiklerin lunatum en tepede kalacak şekilde piramidalizasyonu, C. Radius distalinin ulna tarafında kalan bölgesinin daha az yoğun görülmesi (*radylucency*’nin daha az yoğun olması)-Binder (2011)’den değiştirilerek alınmıştır.

SHOX mutasyonuna bağı fenotipte, BK'ya büyük ölçüde ekstremitelereki kısıalık neden olur (Ross ve ark., 2001, Binder ve ark., 2003, Jorge ve ark., 2007). Bu bulgunun klinik olarak değerlendirilebilmesi için kulaç, oturma boyu, üst segment, alt segment, subischial alt ekstremitte boyunun belirlenmesi gereklidir. Ekstremitte kısıalığı kulaç ve alt ekstremitte uzunluğunu azaltmaktadır. Kulaç-boy farkı, üst/alt segment oranı, orantısızlığı göstermek için kullanılmaktadır (Turan ve ark., 2005). Altı yaşından küçük çocuklarda orantısızlık olmayabilir (Binder, 2011). Binder ve ark. tarafından kulaç, oturma boyu ve subischial alt ekstremitte boyu kullanılarak ekstremitte-gövde oranını hesaplayan bir formül önerilmiştir:

$$\text{Ekstremitte-Gövde Oranı} = (\text{Subischial Alt Ekstremitte} + \text{Kulaç}) / \text{Oturma Boyu}$$

Yazarlar SHOX geni mutasyonu taşıyan olgularda ekstremitte-gövde oranının kontrole göre belirgin düşük olduğunu saptamışlardır. Bu oranın normal olarak saptandığı çocuklarda SHOX geni mutasyonunun neredeyse %100'lük bir negatif prediktif değer ile dışlanabileceğı belirtilmiştir (Şekil 2.6) (Binder ve ark., 2003).



Şekil 2.6. Ekstremitte-gövde oranı çizelgesi. Orta değer ve artı-eksi 1 SSD'leri çizgilerle gösterilmiştir. İçi boş daireler İBK olgularını, içi kırmızı ile boyanmış daireler SHOX geni mutasyonu olan olguları göstermektedir.-Binder ve ark. (2011)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Rappold ve ark.'nın yayınlamış oldukları geniş katılımlı bir çalışmada klinik olarak İBK tanısı almış ve SHOX mutasyonu saptanan olgularda ön kolda eğrilme, ön kol kısalığı, ulna dislokasyonu, tibia'da eğrilme ve musküler hipertrofi görünümü bulgularının daha sık görüldüğü ve bu nedenle bu bulguların SHOX anomalileri için klinik belirteçler olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca vücut kitle indeksi (VKİ) değerinin SHOX mutasyonu olan olgularda olmayanlara göre daha yüksek çıktığı gösterilmiştir (Rappold ve ark., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada etik kurul kararı alındıktan sonra (EK 1): 2010-2011 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine İBK nedeniyle başvuran hastalar incelenmiştir. Hastalar bilgilendirilmiş gönüllü oluru (EK 2) alındıktan sonra araştırmaya dahil edilmiştir.

Dahil edilme kriterleri

1. Boyun -2 SSD'nin altında olması
2. Normal karyotipe sahip olması

Dahil edilmeme kriterleri

1. Kronik hastalık öyküsü (kronik böbrek yetmezliği, malabsorbsiyon, çölyak hastalığı, kronik karaciğer hastalığı, iskelet displazisi, siyanotik kalp hastalığı, dismorfik sendrom, kronik steroid kullanımı, obstruktif akciğer hastalığı, kronik anemi, kronik asidoz)
2. Düşük doğum ağırlığı
3. BH eksikliği ya da BH direnci olması
4. Anormal karyotipe sahip olması

3.2. Gerçekleştirilen Antropometrik Ölçümler ve Hesaplamalar

Hastalar;

1. BK'nın derecesi,
2. İdeal ağırlık yüzdeleri,
3. Ekstremit-gövde oranları
4. Kulaç boyu-boy farkı,
5. Üst segment/alt segment oranı,
6. BK'nın orantılı olup olmadığı,
7. Kol, ön kol, el, ayak uzunlukları,

8. Ek bulguların (musküler hipertrofi görünümü, kubitüs valgus, ön kolda eğrilme, ulna dislokasyonu...) varlığına göre değerlendirilmiştir.

Boy: Hasta ayakta, dik, karşısına bakar pozisyonda iken başın en üst seviyesi ile yer arasındaki mesafe.

Alt segment: Hasta ayakta, dik, karşısına bakar pozisyonda iken simfizis pubis üst seviyesi ile yer arasındaki mesafe.

Oturma boyu: Hasta dik bir şekilde oturur, baş ve gözler tam karşıya bakar pozisyonda. Başın arkası, sırt, kalçalar ve omuzlar duvara yaslar pozisyonda iken oturulan yer ile başın en üst noktası arasındaki mesafe.

Kol Uzunluğu: Omuz ekleminin postero-lateralinin en belirgin kısmı acromion çıkıntısından dirsek postero-lateralinde olecranon distaline kadar olan mesafe.

Ön kol Uzunluğu: Dirsek postero-lateralinde olecranon distalinden el bileğinde radius kemiğinin distaline kadar olan mesafe.

El Uzunluğu: El ve parmaklar düz iken el bileğindeki en distal kalın çizgiden orta parmağın en ucuna kadar olan mesafe.

Ayak Uzunluğu: Ayak düz zemine basıyorken topuktan baş parmak uç kısmına kadar olan mesafe.

Kulaç: Kolların bedenden horizontal olarak tamamen uzatıldığında her iki orta parmak arasındaki mesafe.

İdeal Ağırlık Yüzdesi (İAY): Hastanın boy yaşına göre ideal ağırlığı. Mevcut ağırlığa, boy yaşına göre ideal ağırlığı bölünüp 100 ile çarpılarak hesaplanır. İAY %120-140 arasında bulunanlar obez, %60-80 arasında bulunanlar orta zayıf olarak değerlendirilmiştir.

Boy Yaşı: Ölçülen boy uzunluğunun orta değeri gösterdiği yaş.

Üst Segment: Boy uzunluğundan alt segment uzunluğunun çıkarılması ile elde edilen mesafe.

Subischial Alt Ekstremité Uzunluğu: Boy uzunluğundan oturma boyunun çıkarılması ile elde edilen uzunluk.

Üst Segment/Alt Segment Oranı: Üst segmentin alt segmente bölünerek elde edilen oran.

Kulaç Uzunluğu-Boy Farkı: Kulaç uzunluğundan boy uzunluğunun çıkarılması ile elde edilen fark.

Ölçümler için 2007 yılında Hall ve ark. tarafından yayımlanan kitaptan yararlanılmıştır (Hall, 2007).

Ekstremité-Gövde Oranı ve SSD'leri: (Subischial Alt Ekstremité + Kulaç)/Oturma Boyu, Binder ve ark.'nın yayınlamış oldukları yayın referans olarak alınmıştır (Binder ve ark., 2003).

Boy SSD'leri: Neyzi ve ark.'nın Türk çocuklarında gerçekleştirdikleri çalışma referans olarak alınmıştır (Neyzi ve ark., 1978).

Üst segment/alt segment oranı SSD'leri: Turan ve ark.'nın Türk çocuklarında gerçekleştirdikleri çalışma referans olarak alınmıştır (Turan ve ark., 2005).

Kulaç uzunluğu-boy farkı SSD'leri: Turan ve ark.'nın Türk çocuklarında gerçekleştirdikleri çalışma referans olarak alınmıştır (Turan ve ark., 2005).

Boy kısalıklarının orantılı ya da orantısız olduklarına üst segment/alt segment oranı ve kulaç uzunluğu-boy farkı ile karar verilmiştir. Her 2 gösterge için hastaların 2

SSD'nin dışında kalan olgular orantısız kabul edilmiştir. Alt ekstremitayı değerlendirmek için üst segment/alt segment oranı kullanılırken, üst ekstremitenin değerlendirilmesinde kulaç uzunluğu-boy farkından faydalanılmıştır. Ayrıca ekstremit-gövde oranları ekstremit kısılalığını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Dismorfik bulguları açısından değerlendirmek üzere fizik muayene gerçekleştirilmiştir.

3.3. Mutasyon Analizi

3.3.1. DNA İzolasyonu

Genomik DNA, EDTA'lı tüpe alınmış 1 ml periferik kandan, *Magna Pure LC Instrument (Roche Applied Science)* cihazı kullanılarak izole edilmiştir.

3.3.2. MSM Analizi

SHOX geni delesyonları, öncelikle MSM'lerdeki heterozigotluğun kaybı ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla SHOX geninin 5' ucuna yaklaşık 3.500 bp uzaklıkta bulunan DXYS10092 ve intragenik DXYS10093 MSM'leri (Şekil 3.1) kullanılmıştır. 2005 yılında 100 kişilik kontrol grubunda yapılan bir çalışmada DXYS10092 (GA tekrarı) ve DXYS10093 (CT tekrarı) MSM'lerinin heterozigosite değerleri sırasıyla 0.96 ve 0.69, gözlenen alel sayıları da sırasıyla 18 ve 14 olarak bulunmuştur (Benito-Sanz ve ark., 2005).

MSM analizi için her bir markera uygun primerlerden 20 pmol, uygun tamponda (2 U DNA polimeraz, 10 pmol dNTP, 75 mmol MgCl₂) 100 ng genomik DNA ile birlikte karıştırılarak, tablo 3.1'de belirtilen koşullarda *Mastercycler Gradient (Eppendorf)* cihazında PZR gerçekleştirilmiştir. MSM analizi için kullanılan primerler tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. MSM'lerin çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları.

		Sıcaklık °C	Süre
1		94	7 dk
40 Döngü	2	94	30 sn
	3	56	30 sn
	4	72	40 sn
5		72	7 dk
6		4	Beklet

Tablo 3.2. MSM'lerin çoğaltılmasında kullanılan primerler.

MSM	Primer Nükleotit Dizisi	Ürün Uzunluğu
DXYS10092 -F	TTC GTG ACA AAG GCC TTT GC	317 -367 bç
DXYS10092 -R	CTA CAA GTC CTA GTA CCT AC	
DXYS10093 - F	GCC CGT GAT CCC AGT ACT G	233-259 bç
DXYS10093 - R	CAA CTT CCT TGG AAA TCT TC	

PZR ürünleri önce agaroz jelde görüntülenmiştir.

Agaroz Jel Elektroforezi

%2'lik jel hazırlanması için 30 ml 1 x TBE (Tris / Borik asit / EDTA) içine 0.6 gr agaroz eklenmiştir. Çözelti mikrodalga fırında orta ayarda 1.5 dk ısıtılıp içine 0.5 µl EtBr (Ethidium Bromide eklenerek karıştırılmıştır. Jel elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Elektroforez tankı 1 x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirilmiştir.

PZR sonrasında 5 µl PZR ürünü, 1 µl, 6 x yükleme tamponu ile karıştırılıp, karışımın 6 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 V (Volt)'de 30 dk elektroforez uygulanmıştır. Jel *Kodak Gel 200* jel görüntüleme cihazında görüntülenerek *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların bç uzunluğu *pUC Mix Marker, 8 (Catalog No. SM0301, Fermentas)* kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu marker ürününde 17 fragman (1118, 881, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 11, 110, 67, 34, 34, 26, 19) bulunmaktadır.

Agaroz jel elektroforezi sonrasında PZR ürünleri %8'lik poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılarak değerlendirilmiştir.

PAGE

%40 akrilamid-bisakrilamid (38:2) stok solüsyonu hazırlamak için 38 gr akrilamid ve 2 gr N-N-metilen bisakrilamid ve toplam hacim 100 ml olana kadar dH₂O içinde çözülmüştür.

Daha sonra 10 ml stok solüsyon üzerine 10 ml 5 X TBE buffer, 2 ml gliserol, 32.25 ml dH₂O, 400 µl %10'luk amonyum persülfat ve 20 µl TEMED eklenerek jel hazırlanmıştır. Örnekler ve marker, 300 V'de 3 saat yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel 1 µg/ml EtBr'li solüsyon içinde 25 dk bekletilmiştir. *Jel Kodak Gel 200* jel görüntüleme cihazında görüntülenip *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların uzunluğu *pUC Mix Marker, 8 (Catalog No. SM0301, Fermentas)* veya *20 bp DNA Ladder (Catalog No.SM1323, Fermentas)* kullanılarak belirlenmiştir.

Her iki MSM'de de homozigotluk saptanan ve bir MSM'de homozigotluk diğesinde ise homozigot-heterozigot ayrımı yapılamayan olgularda FISH analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. FISH Analizi

Periferik kandan lenfosit hücre kültürü

Besiyerinin Hazırlanışı: Besiyeri içeriği Tablo 3.3'te gösterilmiştir (inaktif hale gelmesi için *fetal bovine serum* 65 °C'de 30 dk (dakika) bekletilmiştir). Hazırlanan besiyeri 5 ml'lik alikotlara ayrılmış ve -20 °C'de bekletilmiştir.

Tablo 3.3. Besiyeri içeriği.

Besiyeri İçeriği	Hacim (ml)
<i>RPMI-1640-Medium (Cat.No: 31870-025)</i>	100
<i>FETAL BOVINE SERUM (Cat.No: 50113, BIOCHROM)</i>	20
<i>Phytohemagglutinin M (Cat.No: 50113, BIOCHROM)</i>	2.5
L-Glutamin (200mM) (Cat.No: 25030-024, GIBCO)	1
Antibiyotik solüsyonu: 10.000U/ml Penicilline G (İE), 10 µg/ml Streptomisin Sulfat (İE)	1

Hipotonik Solüsyonunun Hazırlanması: 0.56 gr KCl 100 ml dH₂O içinde çözülmüştür. Solüsyon 37 °C'de bekletilmiştir.

Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması: 25 ml asetik asit, 75 ml metenol ile karıştırılmış, solüsyon -20 °C'de bekletilmiştir.

Sitogenetik Ekim ve Çıkarım Aşamaları:

1. 5 ml besiyeri içeren tüpe 0,8 ml heparinli periferik kan eklenmiştir.
2. Tüpler etüvde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir.
3. Çıkarımdan 1 saat önce 10 µg/ml'lik kolşisininden 100 µl kolşisin (*Cat. No: C9754-G, Sigma Aldrich*) eklenmiştir.
4. Kolşisin eklendikten 1 saat sonra tüpler 900 devirde 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet homojenize edilmiştir.

5. Tüplere yeni hazırlanıp 37 °C’de bekletilen hipotonik solüsyonundan 5 ml eklenmiş ve 37 °C’de 40 dk bekletilmiştir.
6. Tüpler 900 devirde 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra peletleri homojenize edilmiştir.
7. Tüpler 6 ml’ye kadar yeni hazırlanıp -20 °C’de bekletilen fiksatif solüsyonu ile doldurulmuştur.
8. Altıncı ve 7.basamak 3 kez daha tekrarlanmış son basamakta tüpler +4 °C’ye kaldırılmıştır.

FISH Protokolü

Preparatların hazırlanması;

- Temiz lam yüzeyine 3-4 damla hücre örnekleri damlatılmıştır.
- Lamlar 2 x SSC (Saline / Sodium / Citrate) solüsyonunda 2 dk,
- %70, %85 ve %100 etanolde 2 dk,
- 37 °C’de 5 dk bekletilmiştir.

Pre-denatürasyon;

- -20 °C’de saklanan SHOX probundan 3 µl lamların üzerine eklenmiştir.
- 24 mm-24 mm boyutlarındaki lamel ile probun eklendiği bölge kapatılmıştır.
- Lamelin çevresi yapıştırıcı solüsyon ile kapatılmıştır.

Denatürasyon;

- Lamlar *hotplate* üzerinde 75 °C’de 2 dk bekletilmiştir.

Hibridizasyon;

- Lamlar 37°C, nemli, karanlık ortamda bir gece tutulmuştur.

Hibridizasyon sonrası yıkama;

- Lamel ve yapıştırıcı solüsyon dikkatlice çıkarılmıştır.
- Lamlar 0.4 x SSC solüsyonunda 72 °C’de 2 dk,
- Kuruduktan sonra 2 x SSC, %0.05 tween20 solüsyonunda 1 dk bekletilmiştir.

- Bu aşamadan sonra 4 µl DAPI boyası damlatılan lamel, lamın üzerine kapatılarak +4 °C’de beklemeye alınmıştır.

Değerlendirme;

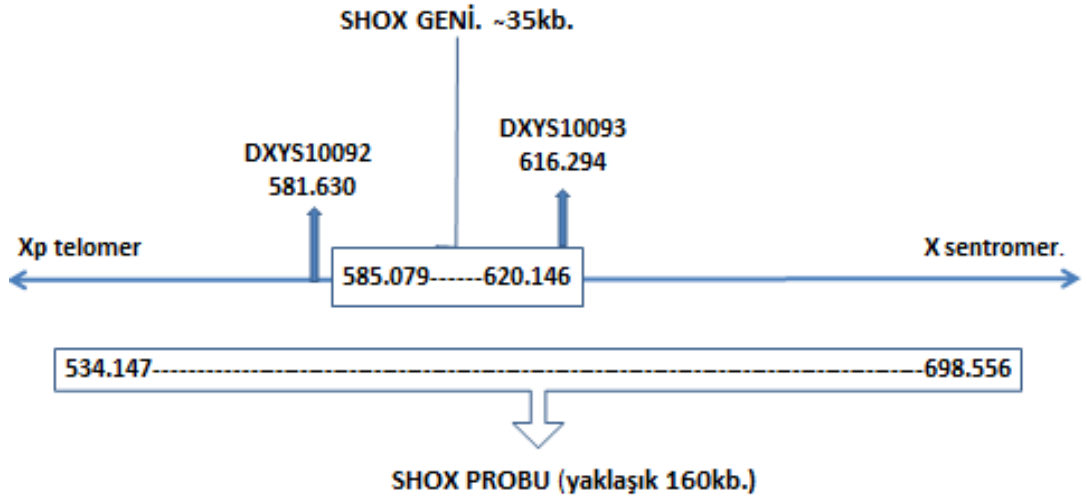
Aquarius SHOX (Catalog No: LPU 025, Cytocell) probu kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir. Prob, SHOX geninini tamamen kapsayan yaklaşık 160 kb uzunluğunda bir diziyi göstermektedir (Şekil 3.1).

Her hasta için 20 metafaz değerlendirilmiştir. Analiz *BX61 fully automated microscope (OLYMPUS)* mikroskobu ve *ER-3339 (Applied Imaging) CCD* kamera ile yapılmıştır. Değerlendirmede *CytoVision Version 3.00 Build 61(Applied Imaging)* yazılımı kullanılmıştır.

Y kromozomu heterokromatin bölgesine özgün DYZ1 probu (yeşil floresan işaretli), X kromozomu sentromerine özgün DXZ1 probu (mavi floresan işaretli), SHOX genini içine alan 160 kb’lık diziyi özgün SHOX probu (kırmızı floresan işaretli) kullanılmıştır. DYZ1, DXZ1 ve SHOX problemleri sırasıyla FITC, AQUA ve Texas Red filtrelerinde analiz edilmiştir. Tüm kromozomlar DAPI II kullanılarak DAPI filtresinde görüntülenmiştir.

Normal kadın bireyde 2K, 2M, normal erkek bireyde 2K, 1Y, 1M sinyallerinin bulunması gerekmektedir (K: kırmızı sinyal, Y: yeşil sinyal, M: mavi sinyal).

SHOX geni FISH probu, SHOX geni, MSM DXYS10092 ve MSM DXYS10093 yerleşimleri şekil 3.1’de gösterilmiştir. X kromozomu PAR1 bölgesi sekans bilgilerine güncel *NCBI/Map Viewer Built 37.3 (Current)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>) kullanılarak ulaşılmıştır. SHOX geni (*Chromosome: X; NC_000023.10 (585079..620146), Gene ID: 6473*) sekans bilgileri *NCBI / Gene* kaynağından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=6473) alınmıştır.



Şekil 3.1. SHOX geni FISH probu, SHOX geni, MSM DXYS10092 ve MSM DXYS10093 yerleşimleri.

FISH analizi sonrasında delesyon saptananların dışındaki tüm olgularda dizi analizi ile SHOX geni mutasyonları araştırılmıştır.

3.3.4. Dizi Analizi

SHOX genine ait egzon 2, 3, 4, 5 ve 6a (4.ve 5. egzon tek bir reaksiyonda çoğaltılmıştır) egzon-intron birleşme (junction) bölgelerini kapsayacak şekilde uygun primerler kullanılarak *Mastercycler Gradient (Eppendorf)* cihazında PZR ile çoğaltılmıştır. Bunun için her bir egzona uygun primerlerden 20 pmol, uygun tamponda (2 U DNA polimeraz, 10 pmol dNTP, 75 mmol $MgCl_2$) 100 ng genomik DNA ile birlikte karıştırılarak, tablo 3.4 ve tablo 3.5'te belirtilen koşullarda PZR gerçekleştirilmiştir. Egzon 2 ve 6 *touch down* PZR ile çoğaltılmıştır.

Tablo 3.4. Egzon 2 ve 6'nın çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları.

		Sıcaklık (°C)	Süre
	1	94	7 dk
14 Döngü	2	94	30 sn
	(Her adımda 0,5 °C azalarak) 3	72	30 sn
	4	72	40 sn
26 Döngü	5	94	30 sn
	6	65	30 sn
	7	72	40 sn
	8	72	5 dk
	9	4	Beklet

Tablo 3.5. Egzon 3 ve 4-5'in çoğaltılmasında uygulanan PZR koşulları.

		Sıcaklık (°C)	Süre
	1	94	7 dk
38 Döngü	2	94	30 sn
	3	65	30 sn
	4	72	40 sn
	5	72	7 dk
	6	4	Beklet

PZR sonucu agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. 5 µl PZR ürünü, 1 µl, 6 x yükleme tamponu ile karıştırılıp, karışımın 6 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 V'de 30 dk elektroforez uygulanmıştır. *Jel Kodak Gel 200 jel görüntüleme cihazında* görüntülenerek *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların uzunluğu *pUC Mix Marker, 8*

(Catalog No. SM0301, Fermentas) kullanılarak kontrol edilmiştir. PZR ürünü değerlendirmesi sonrasında geri kalan PZR ürünleri kullanılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Sekans PZR'si öncesinde PZR ürünlerini temizlemek için 2 µl *ExoSAP-IT (GML)* ile 5 µl PZR ürünü karıştırılarak 37 °C'de 15 dk, 80 °C'de 15 dk bekletilmiştir.

Her bir temizlenmiş PZR ürünü için için *forward* ve *reverse* primerlerle iki yönlü sekans PZR'si gerçekleştirilmiştir. PZR kimyasalları ve sekans PZR koşulları sırasıyla tablo 3.6 ve 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Sekans PZR'ı kimyasalları.

Kimyasal	Hacim
<i>ABI Prism ® Bigdye™ Terminator (Product P/N: 4336923, Applied Biosystems)</i>	2 µl
<i>ABI Prism ® Bigdye™ Terminator v1.1, v3.1 5 X Sequencing Buffer (Applied Biosystems)</i>	1 µl
<i>Forward veya reverse primer (1 pmol/µl)</i>	1.6 µl
Temizlenmiş PZR ürünü	1 µl
ddH ₂ O	4.4 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.7. Sekans PZR'si koşulları.

		Sıcaklık (°C)	Süre
1		96	1 dk
25 Döngü	2	96	10 sn
	3	50	5 sn
	4	60	4 dk
5		4	Beklet

Sekans reaksiyon ürünlerini saflaştırmak için *SEPHADEX G-50 Medium (Product Number:S6022 , Sigma Aldrich)* kiti kullanılmıştır.

Denatürasyon amacıyla sekans reaksiyonu ürünü 10 µl *Hi-Di™ Formamide (P/N No: 4311320, Applied Biosystems)* ile karıştırılarak 94 °C’de 3 dk bekletilmiş ve ardından hızlıca buz üzerine aktarılmıştır. Bu ürünlerin tüm hacmi *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* cihazına yüklenerek dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans sonuçlarının değerlendirilmesi için *SeqScape version 2.7 (Applied Biosystems)* ve *Sequencing Analysis version 5.1(Applied Biosystems)*, *Windows XP (Microsoft)* yazılımları kullanılmıştır.

Dizi analizi için kullanılan primerler tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8. Dizi analizinde kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Nükleotit Dizisi	Ürün Uzunluğu
Egzon 2 - F	CGC GGG GAG ACG CGC GCA TCC	387 bç
Egzon 2 - R	GGC GCC GAA CCC CAG GAG GGC	
Egzon 3 - F	GCC ACG TTG CGC AAA ACC TC	320 bç
Egzon 3 - R	CCC GAG GAC CAG GCG ATG	
Egzon 4-5 - F	GGG AGG CTG GGC TGG GTT C	376 bç
Egzon 4-5 - R	GGA AGG GAG CAG CAG GTC C	
Egzon 6 - F	GTC CCC ATC CTG CGC CCT CAC CC	334 bç
Egzon 6 - R	GCG CGG AGC CCG GGA GTC CG	

4. BULGULAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve İBK tanısı alan 4 tanesi erkek (olgu 11, 28, 33 ve 35), 34 tanesi kız olmak üzere toplam 38 çocuk hasta çalışmaya alınmıştır. İncelemeye alınan 38 hastanın yaşları 6.5 ile 17 arasında bulunmuştur. Olgu 1 ve olgu 2 tek yumurta ikizi iken olgu 33 ve olgu 34'ün kardeş oldukları öğrenilmiştir. Olgu 1, 2, 6, 9, 11 postpubertal diğer olgular prepubertal olarak değerlendirilmiştir. Yedi olgunun (7, 10, 11, 12, 13, 17, 19) 6 ay ile 2 yıl arasında değişen sürede BH kullandığı belirlenmiştir. Tüm olgulara ait antropometrik ölçümler ve hesaplamaların sonuçları tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tüm olgulara ait antropometrik ölçümler ve hesaplamalar. Açık gri renkle boyalı alanlar alt sınırın altında, koyu renkle boyalı alanlar üst sınırın üstünde olduğu anlamına gelmektedir. * Doğumda kol kırığı mevcut.

Olgu No.	Cinsiyet	Takvim Yaşı (yıl)	Ağırlık (kg)	iAY (%)	BOY (cm)	BOY SSD	Boy Yaşı (yıl)	Anne boyu (cm)	Baba Boyu (cm)	Hedef Boy (cm)	Hedef Boy SSD	Boy SSD-Hedef Boy SSD	Olgu No.	Kulaç (cm)	Kulaç-Boy Farkı (cm)	Oturma Boyu (cm)	Üst segment (cm)	Alt Segment (cm)	Üst/Alt Ektremite Oranı	Subsial Alt Ektremite (cm)	Ektremite-Gövde Oranı	Kol (cm)	Ön Kol (cm)	El (cm)	Ayak (cm)
1	K	14	33,1	78,5	143	-2,61	11	167	166	160	0	-2,61	1	140	-3	76	71	72	0,986	67	2,72	29-29	22-22	16,5-16,5	22,5-22,5
2	K	14	33,1	76,88	144,5	-2,36	11	167	166	160	0	-2,36	2	144	-1	76,5	71,5	73	0,979	68	2,77	29-29	22-22	17-17	23-23
3	K	12,5	46,5	128,61	137	-2,46	10	148	162	148,5	-2,17	-0,29	3	142	5	73	65	72	0,903	64	2,82	30-30	22-22	16-16	23-23
4	K	13,5	33	82,7	140	-2,78	10,5	156	172	157,5	-0,47	-2,31	4	140	0	74	66,5	73,5	0,904	66	2,78	30-30	21,5-21,5	16,5-16,5	21-21
5	K	13	35	92,4	139	-2,87	10,5	158	157	151	-1,7	-1,17	5	141	2	71	67	72	0,931	68	2,94	30-30	21-21	15,5-15,5	22-22
6	K	13	43,5	112,28	139	-2,87	10,5	145	159	145,5	-2,74	-0,13	6	140	1	78	68	71	0,958	61	2,57	29-29	22-22	17,5-17,5	22-22
7	K	13,5	27	70,66	137	-3,25	10	160	165	156	-0,75	-2,5	7	135	-2	72	65	72	0,902	65	2,77	28-28	21-21	15,5-15,5	22-22
8	K	11	24	75,81	129	-2,7	9	160	164	155,5	-0,85	-1,85	8	122	-7	67	64	65	0,985	62	2,74	24-24	20-20	15-15	20-20
9	K	15,5	37,5	85,87	143	-2,8	11	141	155	141,5	-3,46	0,66	9	139	-4	80	71	72	0,986	63	2,52	28-28	22-22	15-15	22-22
10	K	11,5	24,5	75,91	130	-3,2	9	160	163	155	-0,94	-2,26	10	134	4	70,5	64	66	0,969	59,5	2,74	28-28	20,5-20,5	15-15	20-20
11	E	17	42,7	81,87	154	-3,1	13	147	170	165	-1,35	-1,75	11	160	6	81	79	75	1,068	73	2,87	32-32	25-25	18-18	25-25
12	K	11,5	45,2	126,1	137	-2,02	10	153	178	159	-0,19	-1,83	12	130	-7	75	65,5	71,5	0,916	62	2,56	29-29	19,5-19,5	17-17	23-23
13	K	12	29,3	85,99	133	-3,1	9,5	154	161	151	-1,7	-1,4	13	130	-3	73	58	75	0,773	60	2,6	27-27	21-21	16-16	21-21
14	K	12	29,5	81	137,5	-2,38	10,5	154	157	149	-2,08	-0,3	14	134	-4	71	62	75,5	0,821	66,5	2,82	28-28	21-21	16-16	21,5-21,5
15	K	10,5	26,5	86,23	128,5	-2,25	9	149	168	152	-1,51	-0,74	15	128	-1	68,5	60,5	68	0,889	60	2,73	*26,5-27,5	19,5-20	15-15	19,5-19,5
16	K	9	21,2	86,72	119	-2,22	7	143	170	150	-1,89	-0,33	16	119	0	66	59,5	59,5	1	53	2,6	24-24	19-19	14-14	19-19
17	K	12,5	34,5	91,08	139	-2,61	10,5	164	168	159,5	0,09	-2,7	17	144	5	71,5	64,5	74,5	0,865	67,5	2,8	31-31	24-24	17-17	24-24
18	K	11,5	29,5	85,29	134	-2,94	10	153	165	152,5	-1,42	-1,52	18	133	-1	71	62	72	0,861	63	2,76	27-27	21,5-21,5	15,5-15,5	22-22
19	K	14	37	91,55	140	-3,12	10,5	165	175	163,5	0,66	-3,78	19	144	4	75	67	73	0,918	65	2,78	30-30	22-22	16,5-16,5	23-23

Tablo 4.1'in devamı.

Olgu No.	Cinsiyet	Takvim Yaşı (yıl)	Ağırlık (kg)	İYAY (%)	BOY (cm)	BOY SSD	Boy Yaşı (yıl)	Anne boyu (cm)	Baba Boyu (cm)	Hedef Boy (cm)	Hedef Boy SSD	Boy SSD-Hedef Boy SSD	Olgu No.	Kulaç (cm)	Kulaç-Boy Farkı (cm)	Oturma Boyu (cm)	Üst segment (cm)	Alt Segment (cm)	Üst/Alt Ektremite Oranı	Subischial Alt Ektremite (cm)	Ektremite-Gövde Oranı	Kol (cm)	Ön Kol (cm)	El (cm)	Ayak (cm)
20	K	6,5	13,8	80,29	104,5	-2,79	4,5	155	158	150	-1,89	-0,9	20	99	-6	57	52,5	52	1,009	47,5	2,56	19,5-19,5	15-15	11,5-11,5	17-17
21	K	13,5	28	71,19	139	-2,94	10,5	154	160	151	-1,79	-1,15	21	141	2	71	63	76	0,829	68	2,94	28-28	21-21	16,5-16,5	22-22
22	K	10,5	23,7	80,21	126	-2,7	8,5	153	157	148,5	-2,17	-0,53	22	120	-6	68	60,5	65,5	0,924	58	2,61	24-24	19-19	14-14	21-21
23	K	12,5	26,5	72,54	136,5	-3,04	10	155	165	153,5	-1,23	-1,81	23	141	5	70	64,5	72	0,9	66,5	2,96	27-27	22-22	16-16	22-22
24	K	10,5	41,3	134,39	128,5	-2,25	9	144	167	149	-2,08	-0,17	24	124	-5	69	61,5	67	0,918	59,5	2,65	24-24	19-19	14-14	21-21
25	K	8	17,5	82,77	114,5	-2,3	6,5	158	170	157,5	0,47	-2,77	25	117	3	57	52,5	62	0,847	57,5	3,06	24-24	18-18	13-13	18-18
26	K	11	23	74,95	127	-3,04	8,5	150	162	149,5	-1,98	-1,06	26	130	3	67	60	67	0,895	60	2,83	26-26	20-20	15-15	21-21
27	K	10	18,5	66,42	124	-2,34	8	162	175	162	0,38	-2,72	27	121	-3	64	60	64	0,938	60	2,82	24-24	18-18	14-14	20-20
28	E	11,5	25,2	82,19	127	-2,92	8	152	168	166,5	-1,11	-1,81	28	130	3	67	60	67	0,895	60	2,83	27-27	20-20	15-15	21-21
29	K	10,5	21,5	75,93	122	-3,88	7,5	155	167	154,5	-1,04	-2,84	29	126	4	65	58	64	0,906	57	2,81	25-25	20-20	15-15	21-21
30	K	12	34,3	97,7	135	-2,78	10	148	170	152,5	-1,42	-1,36	30	135	0	72	66	69	0,956	63	2,75	28-28	20-20	15,5-15,5	23-23
31	K	11,5	20,1	64,24	128	-3,54	8,5	150	178	157,5	-0,47	-3,07	31	130	2	66	61	67	0,91	62	2,9	26-26	21-21	14,5-14,5	21-21
32	K	12,5	32,4	86,78	138	-2,78	10,5	148	168	151,5	-1,6	-1,18	32	133	-5	74	69	69	1	64	2,66	28-28	20,5-20,5	15,5-15,5	22-22
33	E	11	23,8	80,18	126	-2,78	8	155	165	166,5	-1,11	-1,67	33	126	0	66	62	64	0,968	60	2,81	26-26	19,5-19,5	15-15	22-22
34	K	13	26,9	86,58	127	-4,05	8,5	155	165	153,5	-1,23	-2,82	34	126	-1	68	62	65	0,953	59	2,72	26-26	20-20	15-15	21-21
35	E	13	29,8	77,08	140	-2,01	10,5	158	173	172	-0,24	-1,77	35	141	1	72	66	74	0,892	68	2,9	30-30	22-22	17-17	23-23
36	K	10,5	22,7	76,83	126	-2,7	8,5	148	165	150	-1,89	-0,81	36	120	-6	67	62	64	0,968	59	2,67	26-26	19,5-19,5	13,5-13,5	20-20
37	K	12	30,7	82,48	139	-2,14	10,5	158	161	152,5	-1,42	-0,72	37	136	-3	73	68,5	70,5	0,971	66	2,76	28-28	21-21	15,5-15,5	23-23
38	K	8,5	18,8	85	115	-2,34	6,5	156	185	164	0,75	-3,09	38	114	-1	61	58	57	1,02	54	2,75	23-23	18-18	13-13	17,5-17,5

Hastaların boy uzunlukları 104.5 cm ile 154 cm arasındaydı. Tüm hastaların boyları normal popülasyona göre -2 SSD'nin altında saptanmıştır. Boyları -3 SSD'nin altında olan 10 olgu (7, 10, 11, 13, 19, 23, 26, 29, 31 ve 34) tespit edilmiştir. Olgu 34'te boy -4.05 SSD olarak saptanmıştır.

Üst segment/alt segment oranları 0.773-1.068 arasında iken kulaç uzunluğu-boy farkı -7 cm ile +6 cm arasında hesaplanmıştır. Üst ekstremité açısından orantısızlık sadece olgu 12'de saptanmıştır. Orantısız BK saptanan hastalar tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Orantısız BK saptanan olgular.

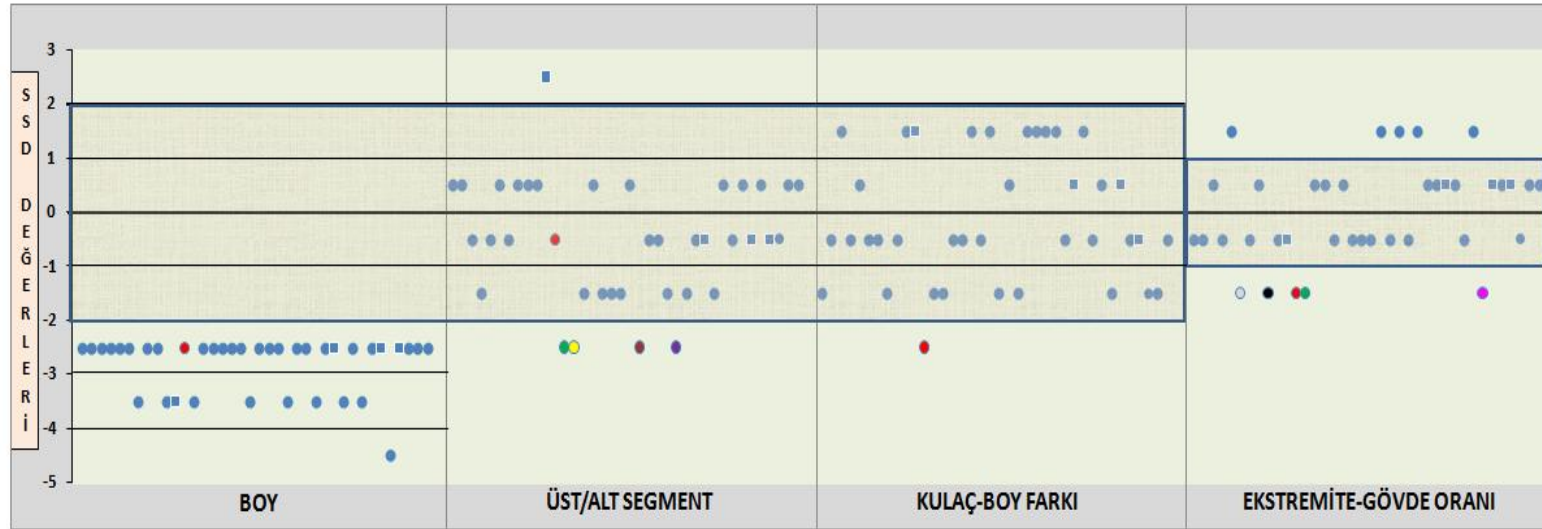
Olgular	Üst/alt segment oranı	Kulaç-boy farkı
11	1.068 (+2 SSD'nin üzerinde)	Normal
12	Normal	-7 cm (-2 SSD'nin altında)
13	0.773 (-2 SSD'nin altında)	Normal
14	0.821 (-2 SSD'nin altında)	Normal
21	0.829 (-2 SSD'nin altında)	Normal
25	0.847 (-2 SSD'nin altında)	Normal

Ekstremité-gövde oranı olgu 6, 9, 12, 13 ve 32'te -1 SSD'nin altında iken olgu 5, 21, 23, 25 ve 31'de +1 SSD'nin üstünde saptanmıştır. (Tablo 4.3). Diğer 28 olguda normal aralıkta bulunmuştur.

Tablo 4.3. Ekstremit -gövde oranı anormal olan olgular.

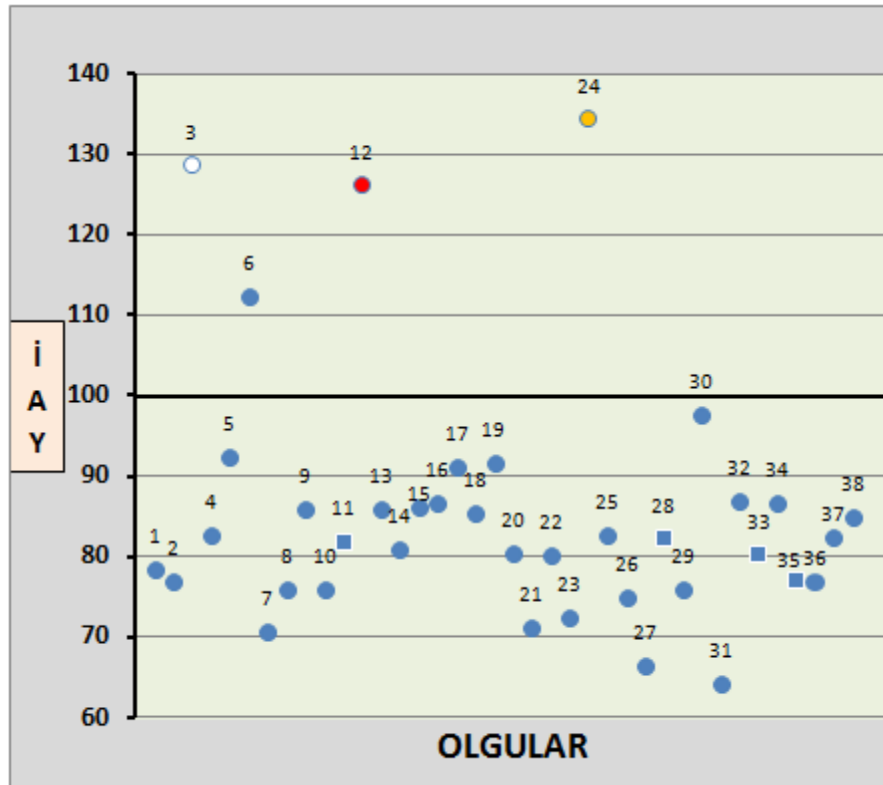
Olgu	Ekstremit�-Gövde Oranı	
	-1SSD'nin Altı	+1 SSD'nin üstü
5		☒
6	☒	
9	☒	
12	☒	
13	☒	
21		☒
23		☒
25		☒
31		☒
32	☒	

Hastaların boy, üst/alt segment oranı, kulaç-boy farkı ve ekstremit -gövde oranı değerlerinin SSD aralıklarındaki dağılımı  ekil 4.1'de birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Tüm olgulara ait boy, üst/alt segment oranı, kulaç-boy farkı ve ekstremit-e-gövde oranlarının SSD aralıklarındaki gösterimleri. Erkekler kare, kızlar daire şekliyle gösterilmiştir. Her bir değer için olguların hangi SSD aralığında olduğu soldan sağa doğru olgu numaralarına göre sıralanmıştır. Normal olarak kabul edilen aralıklar desenli olarak gösterilmiştir. Kırmızı; olgu 12, yeşil; olgu 13, açık sarı; olgu 14, kahverengi; olgu 21, mor; olgu 25, gri; olgu 6, siyah; olgu 9, pembe; olgu 32'yi göstermektedir.

İAY'ye göre hastalar incelendiğinde olgu 3, 12, 24'te obezite saptanırken, olgu 1, 2, 7, 8, 10, 21, 23, 26, 27, 29, 31, 35 ve 36'da orta derecede zayıflık olduğu anlaşılmıştır. İAY anormal saptanan olgular ve olguların İAY değerleri dağılımları sırasıyla şekil 4.2 gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Tüm olgulara ait İAY değerlerinin SSD aralıklarındaki gösterimleri. Erkekler kare, kızlar daire şekliyle gösterilmiştir. Her bir değer için olguların hangi SSD aralığında olduğu soldan sağa doğru olgu numaralarına göre sıralanmıştır. Olgu numaraları simgelerinin üstünde belirtilmiştir. Olgu 3 (beyaz), 12 (kırmızı) ve 24 (turuncu) obez olarak değerlendirilmiştir.

Kol uzunluğu olgu 8, 22, 24'te 5 persantilin altında iken olgu 17'de 95 persantilin üstünde saptanmıştır.

Ön kol uzunluğu olgu 12 ve olgu 27'te 5 persantilin altında saptanmıştır.

El uzunluğu olgu 6'da 97 persantilin üstünde saptanmıştır.

Olgu 33'te ayak uzunluğu 97 persantilin üzerinde saptanmıştır. Anormal ekstremite uzunlukları saptanan olgular tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Anormal ekstremite uzunlukları saptanan olgular.

Olgu	Kol	Ön kol	El	Ayak
6	Normal	Normal	Uzun	Normal
8	Kısa	Normal	Normal	Normal
12	Normal	Kısa	Normal	Normal
17	Uzun	Normal	Normal	Normal
22	Kısa	Normal	Normal	Normal
24	Kısa	Normal	Normal	Normal
27	Normal	Kısa	Normal	Normal
33	Normal	Normal	Normal	Uzun

Dismorfolojik Muayene Bulguları

Dismorfolojik muayene bulguları tablo 4.5 ve tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Baş-boyun muayenesinde saptanan bulgular.

Olgu No.	Yüksek Damak	Çukur Damak	Mikrognati	Düşük Ense Saç Çizgisi	Hafif Yele Boyun	Kısa Boyun	Hirsutismus	Kulak Anomalisi	Kalkık Burun Kökü	Hipertelorizm	Epikantus	Derin Yerleşimli Göz	Uzun Burun	Düzensiz Diş	Dar Maksilla	Birleşik Kaşlar	Basık Burun Kökü	Geniş Burun Kökü	Geniş Burun	Kısa Filtum	Belirgin Kaşlar	Güçsüz ve İnce Saçlar
1	+	+										+	+									
2	+	+										+	+									
3																						
4										+												
5	+	+																				
6	+	+						+						+	+							
7	+		+																			
8	+		+																			
9	+		+																			
10			+																			
11	+								+													
12	+		+								+											
13																						
14																						
15						+																
16				+	+		+															
17	+				+	+																
18			+																			
19	+	+	+																			
20				+			+	+														
21																						
22		+		+										+								
23	+			+	+				+							+						
24			+	+		+	+															
25	+	+	+																			
26	+	+																				
27	+	+															+					
28	+								+													
29	+	+		+			+															
30	+	+					+										+	+				
31	+						+		+											+	+	
32	+		+																			
33	+	+																				
34	+	+																				
35	+	+																				
36	+			+				+														
37	+																					
38		+	+					+														+

Tablo 4.6. İskelet sistemi ve diğer vücut bölgelerinin muayenesinde saptanan bulgular.

Olgu No.	Madelung Deformitesi	Kubitus Valgus	Kısa Önkol	Ön Kolda Yassılaşma	Muskuler Hipertrofi Görünümü	Hafif Skolyoz	Genu Valgus	Üst Ekstremit Eklemlerinde Hiperekstensibilite	El Parmaklarında Klinikte	El Parmaklarında Kısıklık	El Parmaklarında, Derin yerleşimli tırnak	Ayak p2 ile p3 arasında Parsiyel Sindaktili	Ayak p1 ile p2 Arasında Gap	Ayak Parmakların Derin Yerleşimli Tırnaklar	Halluks Valgus	Ayrık Meme Uçları	Hiperpigmente Lekeler	Koyu Ten Rengi
1		+							p4, p5	p5		+						
2		+							p4, p5	p5		+						
3		+																
4		+						+		p4								
5		+																
6		+					+		p4, p5						+	+	+	
7		+							p5								+	
8																		
9		+							p3, p4, p5									
10		+																
11		+							p5		+							
12	+	+	+	+	+		+				+			+	+			
13																		
14																		
15							+											
16		+					+											
17		+																
18		+																
19		+																
20																		
21		+							p5									
22		+																
23		+							sağ p3, p4									
24		+					+											
25		+							p5								+	
26		+																
27		+	+						p5	p5							+	
28		+															+	
29																	+	
30																	+	
31		+							p2, p4, p5			+						
32		+						+										
33																		+
34		+																+
35																		
36		+								p5							+	
37																		
38													+					

Baş boyun muayenesinde; mikrognați 12 olguda, yüksek damak 25 olguda, çukur damak 15 olguda saptanmıştır. Ayrıca baş boyunda diğer ek bulgular; 2 olguda derin yerleşimli gözler, 1 olguda hipertelorizm, 1 olguda epikantus, 1 olguda birleşik kaşlar, 1 olguda belirgin kaşlar, 2 olguda uzun burun, 1 olguda geniş burun ve geniş burun kökü, 4 olguda kalkık burun kökü, 1 olguda basık burun kökü, 4 olguda kulak anomalisi, 7 olguda düşük ense saç çizgisi, 3 olguda kısa boyun, 3 olguda hafif yele boyun, 1 olguda kısa filtrum, 2 olguda düzensiz dişler, 1 olguda dar maksilla, 1 olguda ince ve güçsüz saçlar, 6 olguda hirsutismus izlenmiştir.

El- ayak muayenesinde olgu 4'te el 4. parmağı bilateral kısa, olgu 1, 2, 27, 36'da 5. el parmağı bilateral kısa ve toplam 9 olguda el parmaklarında klinodaktili saptanmıştır. Olgu 11 ve 12'de derin yerleşimli el tırnakları gözlenmiştir. Olgu 1, 2 ve 31'de ayak 2. parmak ile 3. parmak arasında parsiyel sindaktili, olgu 38'de ayak 1. parmak ile 2. parmak arasında *gap* izlenmiştir. Olgu 6 ve 13'te hallux valgus saptanmıştır. Olgu 12'de ayakta derin yerleşimli tırnaklar saptanmıştır.

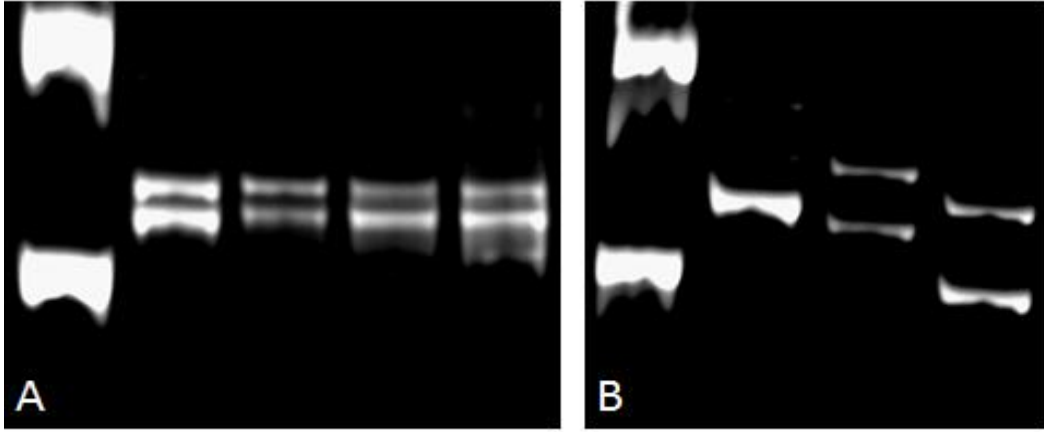
Diğer iskelet sistemi bulguları; olguların 27'sinde kubitus valgus, olgu 12 ve 27'de ön kolda kısıalma saptanmıştır. Sadece olgu 12'de ön kolda yassılaşma ve musküler hipertrofi görünümü izlenmiştir. Üç olguda (6, 12, 24) genu valgus gözlenmiştir. Ulna dislokasyonuna ait bulguya hiçbir olguda rastlanmamıştır. Olgu 15 ve 16'da hafif skolyoz gözlenmiştir. Olgu 4 ve 32'de üst ekstremit eklemlerinde hiperekstansibilite saptanmıştır.

Diğer vücut bölgelerinde; olgu 6'da ayrık meme uçları, toplam 8 olguda (6, 7, 25, 27, 28, 29, 30, 36) 1 mm ile 5 mm çapında değişen boyutlarda vücudun değişik bölgelerinde hiperpigmente lekeler izlenmiştir. 2 kardeş olguda (33, 34) annelerinde de bulunan koyu ten rengi saptanmıştır.

MSM Analizi

MSM DXYS10092

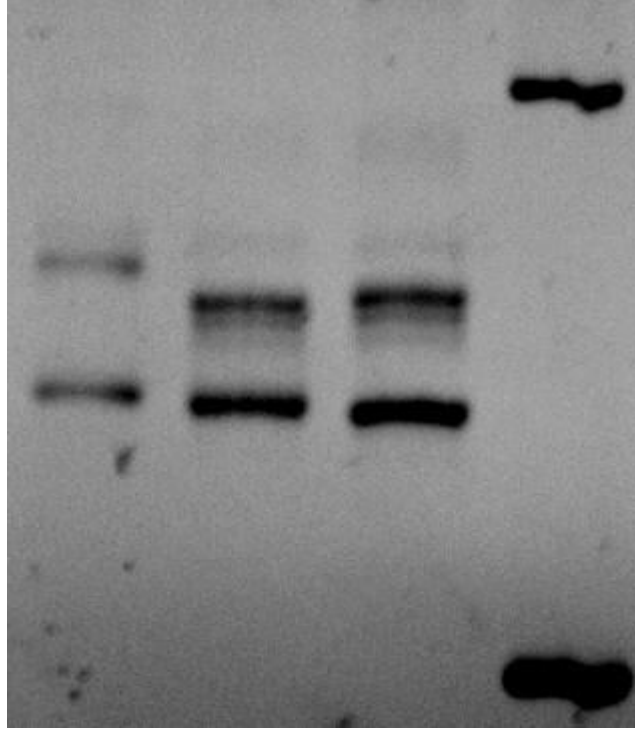
DXYS10092 MSM'si (Şekil 4.3 A ve B.) için olgu 12, 17, 18, 20, 28, 31 ve 35 homozigot diğer olgular heterozigot saptanmıştır.



Şekil 4.3. DXYS10092 MSM'si PAGE görüntüleri. A. DXYS10092 MSM'si için heterozigot olgulardan bazıları, soldan sağa doğru ilk kuyucuk; marker 2.-5. kuyucuklar; sırasıyla olgu1-4. B. Soldan sağa ilk kuyucuk; marker, 2. kuyucuk olgu 12, 3. kuyucuk; olgu 11, 4. kuyucuk; olgu 10. Olgu 10 ve 11 heterozigot, olgu 12 homozigot olarak saptanmıştır.

MSM DXYS10093

DXYS10093 MSM'si için olgu 3, 12, 15, 20, 21, 23, 24, 27, 34 ve 37 homozigot saptanmıştır. Olgu 4, 6, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 25, 30, 32, 33, 36 ve 38 heterozigot tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Olgu 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 17, 26, 28, 29, 31 ve 35'de heterozigot-homozigot ayrımı gerçekleştirilemedi.



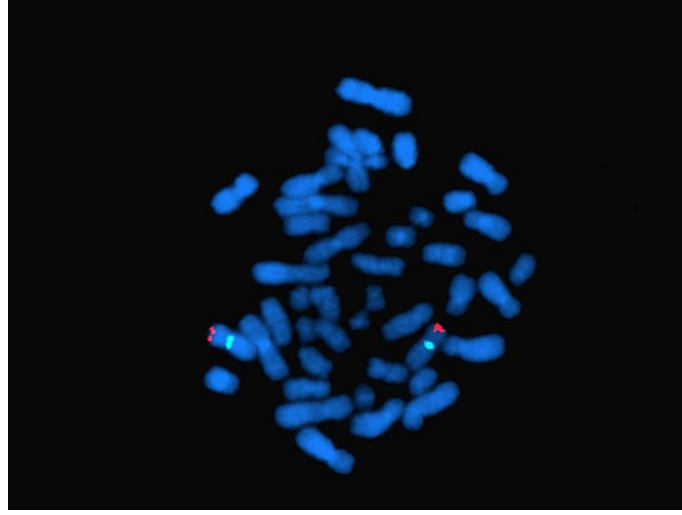
Şekil 4.4. DXYS10093 MSM'si PAGE görüntüsü. Soldan sağa doğru; ilk kuyucuk; olgu 6, 2. kuyucuk; olgu 14, , 3. kuyucuk; olgu 4, 4. kuyucuk; marker.

Her iki MSM'de de homozigotluk saptanan (olgu 12 ve 20) ve bir MSM'de homozigotluk diğerinde ise homozigot-heterozigot ayrımı yapılamayan olgularda (olgu 17, 28, 31 ve 35) FISH analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.7).

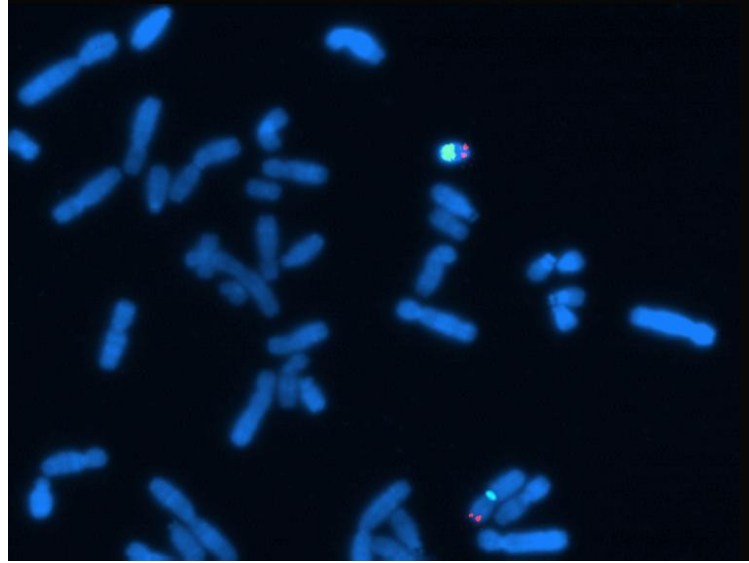
Tablo 4.7. MSM analizi sonucunda homozigot saptanan olgular ve FISH yapılan olgular.

Olgular	MSM'ler		FISH yapılan olgular
	DXYS10092	DXYS10093	
3	Heterozigot	Homozigot	
12	Homozigot	Homozigot	☑
15	Heterozigot	Homozigot	
17	Homozigot	?	☑
18	Homozigot	Heterozigot	
20	Homozigot	Homozigot	☑
21	Heterozigot	Homozigot	
23	Heterozigot	Homozigot	
24	Heterozigot	Homozigot	
27	Heterozigot	Homozigot	
28	Homozigot	?	☑
31	Homozigot	?	☑
34	Heterozigot	Homozigot	
35	Homozigot	?	☑
37	Heterozigot	Homozigot	

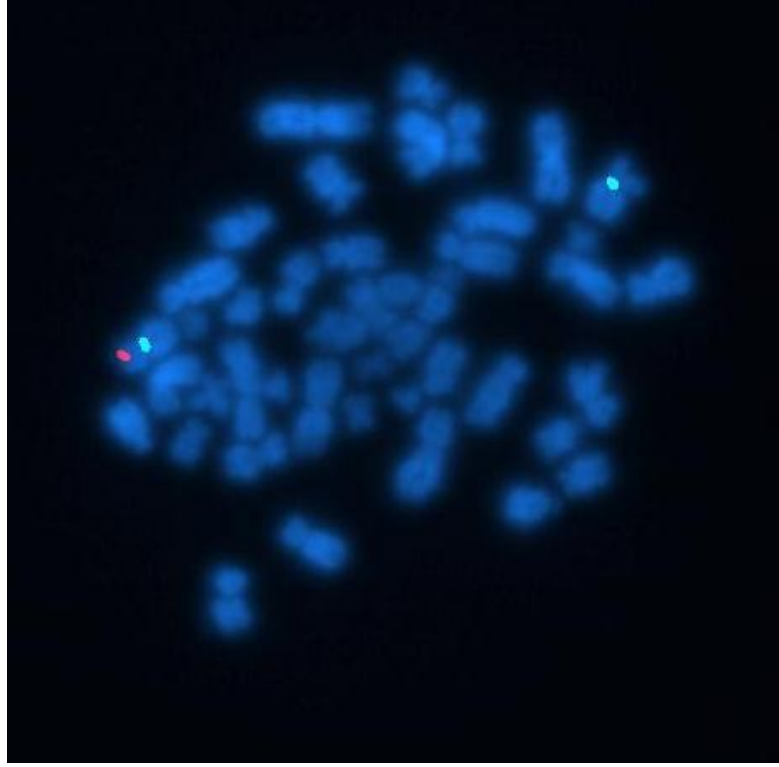
FISH analizi gerçekleştirilen olgu 17, 20 (Şekil 4.5), 28 (Şekil 4.6), 31 ve 35'te SHOX geni delesyonu saptanmamıştır. Olgu 12 de heterozigot SHOX geni delesyonu saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.5. Olgu 20'ye ait FISH görüntüsü. 2K, 2M sinyal kız için normal FISH görüntüsü anlamına gelmektedir.

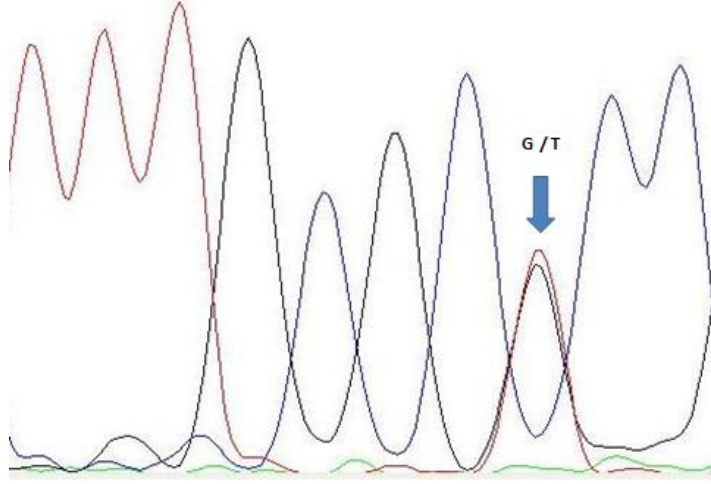


Şekil 4.6. Olgu 28'e ait FISH görüntüsü. 2K, 1Y, 1M sinyal erkek için normal FISH görüntüsü anlamına gelmektedir.



Şekil 4.7. Olgu 12'ye ait FISH görüntüsü. 1K, 2M sinyal kırmızı için heterozigot SHOX geni delesyonu anlamına gelmektedir.

Delesyon saptanmayan diğer 37 olguda dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. İntron 2'de c.277+17 G/T polimorfizmi (rs140970936) açısından olgu 9, 13, 18, 24, 32 ve 38 olmak üzere toplam 6 olguda G/T heterozigotluğu saptanmıştır (şekil 4.8). Tek olgu (olgusu 35) homozigot T/T olarak değerlendirilmiştir. Diğer 30 olguda G/G homozigotluğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. İntron 2, c.277+17 pozisyonuna (rs140970936) ait sekans görüntüsü. Olgu 9’da T/G heterozigotluğu saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda 38 İBK olgusundan 1’inde (yaklaşık %2.6) SHOX geni mutasyonu saptanmıştır. Diğer 37 olguda SHOX geni mutasyonu saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

İBK, SHOX geni mutasyonları ile genotip-fenotip korelasyonu bakımından açık bir bağlantı saptanan klinik bir durumdur (Ellison ve ark., 1997, Rao ve ark., 1997). BK vakalarının yaklaşık 1/40-1/150'sinde, genel popülasyonun 1/2000-1/5000'inde SHOX geni mutasyonu olduğu tahmin edilmektedir (Leka ve ark., 2006, Marchini ve ark., 2007b). SHOX geni mutasyonu saptanan İBK'lı olgularda BH tedavisinin oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Blum ve ark., 2007). Bu nedenle İBK olarak takip edilen hastalarda asıl etyolojinin aydınlatılması gerekmektedir.

Kullanılan SHOX geni analizi yöntemi ve hasta seçim kriterlerinin farklılığına göre İBK'da SHOX geni mutasyonlarının sıklığı oldukça farklılık gösterir (Binder ve ark., 2000, Rappold ve ark., 2002, Stuppia ve ark., 2003, Huber ve ark., 2006, Jorge ve ark., 2007, Rappold ve ark., 2007). SHOX geni taraması ile ilgili tam olarak fikir birliği bulunan bir tarama testi bulunmamaktadır. 2011 yılında Conceicao ve ark.'nın yayınlamış oldukları derlemede SHOX geni tarama algoritması için ilk olarak konvansiyonel sitogenetik analiz önerilmiştir. Sonrasında delesyon incelemesi için FISH analizinin başlangıç testi olabileceği belirtilmiştir. FISH analizinde delesyon saptanmayan olgularda bilinen en sık mutasyonların çalışılması veya sekans analizi yapılması önerilmiştir (Oliveira ve Alves, 2011).

Funari ve ark.'nın 8 LWD olgusu ve 36 orantısız İBK olan olguda yapmış oldukları bir çalışmada MLPA, FISH ve MSM analizi karşılaştırılmış ve MLPA daha duyarlı bulunmuştur. Yazarlar tarafından SHOX geni analizi için başlangıç testi olarak MLPA önerilmiştir (Funari ve ark., 2010).

D'haene ve ark. tarafından 2010 yılında yayınlanan bir makalede kantitatif PZR yönteminin güvenilir, kesin, maliyeti az olan bir test olarak SHOX geni taramasında kullanılabileceği önerilmiştir (D'haene ve ark., 2010).

Çalışmamıza sitogenetik olarak normal bulunan hastalar dahil edilmiştir. Delesyonların tespiti için MSM ve FISH analizi gerçekleştirilmiştir. MSM analizi

FISH testi yapılacak hastaların seçilmesi amacıyla kullanılmıştır. MSM analizinde heterozigotluk saptanması o bölge için delesyonu dışlarken, homozigotluk tespit edilmesi delesyon lehine kabul edilmiştir.

Çalışmamıza katılan 38 hastadan heterozigozite değeri yüksek 2 MSM kullanılarak 6 olgu FISH analizi için seçilmiştir. FISH analizinde bu 6 olgunun 1 tanesinde (yaklaşık %16.6) delesyon saptanmıştır. Delesyon saptanmayan tüm olgularda nokta mutasyonlarının saptanması için dizi analizi gerçekleştirilmiştir, ancak herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır. Altı olguda (9, 13, 18, 24, 32 ve 38) intron 2'de c.277+17 G/T polimorfizmi (rs140970936) heterozigot olarak saptanmıştır.

Delesyon saptanan olgu 12'ye ait detaylı klinik bilgiler aşağıda verilmiştir.

Olgu 12

Çalışmaya alındığında 10 yaş 4 aylık olan kız hasta Şubat 2000 tarihinde 3450 gr ve 49 cm olarak, miadında, ters geliş nedeniyle C/S yöntemi ile doğmuştur. Prenatal, natal, postnatal öyküsünde sorun olmadığı öğrenilen hasta 18 ay anne sütü ile beslenmiş, aşıları tam ve zamanında yapılmıştır.

Olgu ilk kez Aralık 2008 tarihinde 8 yaş 10 aylık iken BK şikayetiyle üniversitemiz dışındaki bir dış merkezin pediatri bölümüne başvurmuş. Hastanın sistemik muayenesinin normal olduğu ve herhangi bir ilaç kullanım öyküsünün olmadığı not edilmiştir. Hemogram, tiroid hormon testleri, kan lipid profili, karaciğer fonksiyon testleri, böbrek fonksiyon testleri, serum çinko, serum bakır, serum demir, serum magnezyum değerleri normal aralıkta saptanmış. Ocak 2009 tarihinde 8 yaş 11 aylık iken aynı dış merkezin pediatrik endokrin bölümüne boy 116 cm (-2.79 SSD) olarak ölçülmüş ve istenen IGF1: 217.11 ng/ml (yaşa ve cinsiyete göre normal değer: 22.1-383 ng/ml), IGFBP3: 4329.52 ng/ml (yaşa ve cinsiyete göre normal değer: 2560-5530 ng/ml) olarak normal sınırlar arasında bulunmuş. Kronik hastalık bulgusuna rastlanılmamış. Muayene esnasında Madelung deformitesinden

şüphelenilen hastanın el-bilek grafisinde Madelung deformitesine özgü radyolojik bulgu saptanmamış. Kemik yaşı 6 yaş ile uyumlu bulunmuştur.

Hasta Mayıs 2010 tarihinde 10 yaş 3 aylık kendi isteğiyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Endokrinolojisi Bilim Dalı'na başvurmuştur. BK açısından araştırılan hastada, BH'ya yönelik yapılan insülin uyarı testi sonrasında BH düzeyi 11.8 ng/ml (10 ng/ml'den düşük olması BH eksikliği lehine değerlendirilir) bulunmuş ve BH eksikliği dışlanmıştır. Ancak BH eksikliği bulunmamasına rağmen, IGF1 düzeyinin düşük ve büyüme hızının yetersiz olması nedeniyle IGF1 jenerasyon testi yapılmıştır. Bu testle %145'lik bir artış saptanması üzerine hastaya BH bağımlılığı tanısı konmuş ve BH tedavisi başlanmıştır. Hasta BK açısından genetik değerlendirme için bölümümüze gönderilmiştir.

Olgu bölümümüze Haziran 2010 tarihinde 10 yaş 4 aylık iken BK şikayeti nedeniyle başvurmuştur. Hastanın boyu 126 cm (-2.7 SSD) ve ağırlığı 36 kg, VKİ 22.29 (90-95persantil), İAY %123 olarak bulunmuştur.

Hastanın anne-babası arasında akraba evliliği (teyze çocukları) olduğu öğrenilmiştir. Anne 42 yaşında boyu 153 cm (-1.18 SSD), baba 42 yaşında ve boyu 178 cm (+0.71 SSD) olarak saptanmıştır. Hastanın boyları normal olan bir kız, iki erkek kardeşi olduğu anlaşılmıştır. BK bulgusunun hastanın ayrıca anneannesinde (148 cm) ve halasının iki çocuğunda da bulunduğu öğrenilmiştir. Hastanın yapılan fizik muayenesinde; yüzde; mikrogati, çukur damak, bilateral epikantus saptanırken, ekstremitelerinde kubitus valgus, ön kolda hafif eğrilik, musküler hipertrofi görünümü, genu valgus ve derin yerleşimli tırnakların olduğu görülmüştür. Hastadan konvansiyonel sitogenetik inceleme gerçekleştirilmiş ve 46,XX karyotipi saptanmıştır.

Hasta bir sene sonra Haziran 2011 tarihinde 11yaş 4 aylık iken tekrar değerlendirilmiş ve SHOX geni analizi için onam alınarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Hasta bir yıldır BH tedavisi aldığı anlaşılmıştır. Yapılan fizik muayenede boyu; 137 cm (-2.02 SSD), ağırlığı; 42.2 kg, VKİ; 24.08, İAY; %126.1,

oturma boyu; 75 cm, üst segment; 65.5 cm, alt segment; 71.5 cm, baş çevresi; 52.5 cm, kol uzunlukları; 29 cm-29 cm, ön kol uzunlukları; 19.5 cm-19.5 cm (kısa ön kol), el uzunlukları; 17 cm-17 cm, ayak uzunlukları; 23 cm-23 cm, kulaç uzunluğu; 130 cm, interpupiller mesafe; 5 cm olarak ölçülmüştür. Üst/alt segment oranı; 0.916 (normal), kulaç uzunluğu-boy farkı; -7 cm (-2 SSD'nin altında) olarak hesaplanmıştır. Hasta üst ekstremité açısından orantısız olarak kabul edilmiştir. Ekstremité-gövde oranı -1 SSD'nin altında bulunmuştur. Hastanın puberte evresi menarş yok, P4T4 olarak belirlenmiştir. Hastanın bir sene önce saptadığımız dismorfik bulguları taşıdığı belirlenmiştir. Bu tarihte çekilen el-bilek grafisinde Madelung deformitesi saptanmıştır (Şekil 5.1).

BH tedavisi altındaki hastamızın Aralık 2011 tarihinde 11 yaş 10 aylık iken boyu; 140 cm (-1.98 SSD) ve ağırlığı 46 kg olarak ölçülmüştür. Hastada ölçülen boy uzunlukları kronolojik sırasıyla;

- 8 yaş 11 aylık iken 116 cm (-2.79 SSD)
- 10 yaş 3 aylık iken BH tedavisi başlanmıştır.
- 10 yaş 4 aylık iken 126 cm (-2.7 SSD)
- 11 yaş 4 aylık iken 137 cm (-2.02 SSD)
- 11 yaş 10 aylık iken 140 cm (-1.98 SSD) olarak belirlenmiştir.

Olgunun BH tedavisi almadığı dönemde 17 ayda 10 cm uzadığı ve boy SSD'sinin -2.79'dan -2.7'ye çıktığı görülmüştür. BH tedavisi ile olgunun 18 ayda 14 cm uzadığı ve SSD'nin -2.7'den -1.98'e yükseldiği tespit edilmiştir. Olgunun BH tedavisinden fayda gördüğü sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 5.1. Olgu 12'ye ait el-bilek grafisi. Haziran 2011'de çekilmiş, kemik yaşı 10.5 yıl. Hastada triangularizasyon, piramidalizasyon ve radius distalinde ulnaya bakan yüzde *radylucency* kaybı mevcut (ok).

SHOX geni mutasyonu ihtimalini artıran klinik belirteçler; orantısız BK, ekstremit-e-gövde oranının -1 SSD'nin altında olması (Binder ve ark., 2003), İAY'de artış, Madelung deformitesi, ön kolda eğrilme, ön kol kısalığı, tibia'da eğrilme, musküler hipertrofi görünümü, ulna dislokasyonu olarak sayılabilir. Turner sendromunda görülen 4. ve 5. parmaklarda kısalık, yüksek damak, kubitüs valgus, skolyoz ve mikrognati gibi bulgulara daha az sıklıkla rastlanır. Ancak tüm bu klinik belirteçlerin yokluğu SHOX geni mutasyonu ihtimalini ortadan kaldırmaz (Rappold ve ark., 2007).

Çalışmamızda üst/alt segment oranı ve kulaç-boy farkı kullanılarak alt ve üst ekstremiteler uzunlukları boy ile kıyaslandığında olgu 13, 14, 21 ve 25'te alt ekstremiteler, olgu 12'de üst ekstremiteler boya göre kısa olarak değerlendirilmiştir. Sadece delesyon saptanan olgu 12'de kulaç-boy farkı normal SSD'nin altında bulunmuştur. Bu sonuç, SHOX geni eksikliğine bağlı BK vakaları için özellikle üst ekstremiteleri içeren orantısız boy kısalığının çok önemli bir klinik gösterge olduğunu göstermektedir.

Madelung deformitesi SHOX geni mutasyonunun çok önemli bir belirticidir (Rappold ve ark., 2007). Ancak bu deformitenin zamanla ortaya çıkan bir bulgu olduğu unutulmamalıdır. (Binder, 2011). Hastalarımızdan sadece olgu 12'de ön kol anomalileri olarak Madelung deformitesi, ön kolda yassılaşma ve musküler hipertrofi görünümü tespit edilmiştir. Olgu 12'nin kol, el ve ayak uzunlukları normal aralıkta bulunmuştur. Baş boyun muayenesinde olgu 12'ye özgü olarak epikantus görülmüştür. Ön kol kısalığı olgu 12 ve olgu 27'de saptanmıştır. Genu valgus olgu 12 ile birlikte olgu 6 ve 24'te görülmüştür. Olgu 12 ile birlikte birçok olguda saptanan mikrognati (12 olguda), yüksek damak (25 olguda) ve kubitus valgus (27 olguda) gibi dismorfik bulguların SHOX geni eksikliğine bağlı BK vakaları için spesifik bulgular olmadığı, buna karşılık özellikle ön kolu içeren üst ekstremiteler anomalilerinin daha ayırıcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamızda İAY'ler kullanılarak VKİ verileri değerlendirilmiştir. İAY'nin %120-140 olması obezite anlamına gelmektedir. Çalışmamızda 3, 12 ve 24 nolu olgularda İAY sırasıyla %128.6, %126.1 ve %134.3 olarak saptanmış ve bu olgular obez olarak değerlendirilmiştir.

Okul çağı çocukları için hastaların seçiminde ekstremiteler-gövde oranının -1 SSD'nin üzerinde olmasının SHOX geni mutasyonuna bağlı fenotipi neredeyse %100'lük bir negatif prediktif değer ile dışladığını gösteren çalışmalarla (Binder ve ark., 2003, Binder, 2011) kıyaslandığında bizim çalışmamızda 38 hastanın 5'inde ekstremiteler-gövde oranı -1 SSD'nin altında bulunmuştur. Bu değer dikkate alınarak hasta seçimi gerçekleştirilseydi 5 olguda SHOX geni analizi gerçekleştirilecekti.

Sonuç olarak çalışmamızda 38 hastada gerçekleştirilen delesyon ve sekans analizleriyle olguların birinde (yaklaşık %2.6) heterozigot delesyon saptanmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalarda, kullanılan tarama yöntemi ve hasta seçim kriterlerinin farklılığına göre İBK’da SHOX geni mutasyonları %2-15 olarak bildirilmektedir (Binder ve ark., 2000, Rappold ve ark., 2002, Stuppia ve ark., 2003, Huber ve ark., 2006, Jorge ve ark., 2007, Rappold ve ark., 2007). Bu çalışmada saptamış olduğumuz mutasyon oranı literatürdeki çalışma sonuçları ile uyumlu görülmüştür.

Çalışmamızda MLPA yöntemi kullanılmamıştır, bu nedenle delesyonların saptanmasında yöntem olarak MLPA ile FISH kullanımının karşılaştırmasını bu çalışma sonuçları ile yapmak mümkün değildir. Ancak hem kendi çalışma sonuçlarımız hem de literatürdeki bilgileri birlikte değerlendirdiğimizde İBK’da SHOX geni mutasyonlarının araştırılmasında gerek mutasyonların saptanma gücü, gerekse maliyet-uygulama kolaylığı dikkate alındığında ilk olarak MLPA yöntemi ile delesyon araştırılması, sonrasında delesyon saptanmayan olgularda dizi analizinin gerçekleştirilmesinin en uygun yaklaşım olacağı düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda İBK hastalarında SHOX geni mutasyonu oranı yaklaşık %2.6 olarak bulunmuştur. Bu oran, literatürdeki çalışmalarla uyumlu gözlenmiştir.

İBK olgularında SHOX geni mutasyonu saptama ihtimali yüksek hastaların seçiminde SHOX geni eksikliğine özgü Madeleng deformitesi yanında, ön kol kısalığı, kulaç-boy farkı, İAY ve ekstremit-gövde oranının kullanılması faydalı olacağı sonucuna varılabilir.

SHOX geni mutasyonu saptanan olgumuzun BH tedavisi ile 18 ayda 14 cm uzadığı ve SSD'nin -2.7'den -1.98'e yükseldiği tespit edilmiştir. Olgunun BH tedavisinden fayda gördüğü sonucuna ulaşılmıştır.

İBK olgularında genetik etyolojinin belirlenmesi hastaların tedavileri ve genetik danışmanlık almaları açısından oldukça önemlidir.

ÖZET

İdyopatik Boy Kısallığında SHOX Geni Değişiklikleri

Boy kısallığı (BK) güçlü genetik komponenti olan, multifaktöriyel gelişimsel bir durumdur. Çocukluk çağında en sık görülen klinik durumlardan biridir. BK'ya neden olabilecek birçok gen tanımlanmıştır ve bunların en önemlilerinden bir tanesi SHOX genidir. SHOX geni mutasyonunun idyopatik boy kısallığı (İBK), Turner sendromu, Leri-Weill diskondrosteozu ve Langer mezomelik displazisine neden olduğu gösterilmiştir.

Kullanılan tarama yönteminin ve hasta seçim kriterlerinin farklılığına göre İBK'da SHOX geni mutasyonları %2-15 olarak bulunmuştur. SHOX geni mutasyonlarının yaklaşık %80'ini delesyonlar, geri kalan kısmını nokta mutasyonları oluşturur. İBK'da büyüme hormonu tedavisine yanıt veren alt grup olan SHOX geni mutasyonuna sahip olguları saptamak önemlidir.

Bu çalışma ile;

1. İBK'da BH tedavisine yanıt veren alt grup olan SHOX geni mutasyonuna sahip olguları saptamak,
2. Ülkemizdeki İBK olgularında SHOX geni mutasyonlarının sıklığı ve dağılımının tespitine olanak sağlanmak,
3. SHOX geni mutasyonu saptama ihtimali yüksek olan hasta alt gruplarını belirlemek,
4. Bu bilgilere dayanarak mutasyon sıklığı ve hasta gruplarına göre genetik test algoritması geliştirmek,
5. SHOX geni analizi için ülke genelinde hizmet verebilecek alt yapı ve deneyime sahip bir merkez oluşumunu sağlamak hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, klinik ve laboratuvar olarak İBK tanısı almış, sitogenetik olarak normal bulunmuş, pediatrik yaş grubu hastalar incelemeye alınmıştır. Delesyonların tespiti için mikrosatellit marker analizi ve FISH analizi gerçekleştirilmiştir. Delesyon saptanmayan olgularda dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 38 hastada gerçekleştirilen delesyon ve sekans analizi sonucunda bir (yaklaşık %2.6) hastada heterozigot delesyon saptanmıştır. Sekans analizinde mutasyon tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda İBK hastalarında saptanan SHOX geni mutasyon oranı daha önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

İBK olgularında SHOX geni mutasyonu saptama ihtimali yüksek hastaların seçiminde SHOX geni eksikliğine özgü Madeleng deformitesi yanında, ön kol kısallığı, kulaç-boy farkı, İAY ve ekstremit-gövde oranının kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: SHOX geni, idyopatik boy kısallığı, mikrosatellit marker analizi, FISH analizi, dizi analizi

SUMMARY

SHOX Gene Variations in Idiopathic Short Stature

Short stature (SS) is a multifactorial developmental condition and has a strong genetic component. SS is one of the most frequent clinical condition in childhood. A lot of genes have been reported to cause short stature and one of the most important of these genes is SHOX gene. Loss of SHOX gene has been shown to result in idiopathic short stature (ISS), Turner syndrome, Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia.

Depending on the methods used in mutation screening, SHOX gene mutations vary from %2-15. About %80 of SHOX mutations consist of deletions and the remaining mutations are point mutations. It is important to detect ISS patients with SHOX gene mutations since these patients respond to growth hormone therapy.

In this study, it is aimed;

1. to determine ISS patients with SHOX mutations who respond well to growth hormone therapy
2. to determine the frequency and distributions of SHOX gene mutations in our country,
2. to determine sub-group of patients clinically who may have a high probability of having SHOX gene mutations,
3. to perform genetic test algorithm according to mutation frequency and patient sub-group,
4. to constitute an experienced genetic centre which can serve as a center for SHOX gene mutation analysis country-wide.

38 cytogenetically normal patients diagnosed with idiopathic short stature after clinical and laboratory examination were included in this study . Microsatellite marker and FISH analysis were performed to detect deletions and then sequence analysis was performed in patients with no deletion.

In our study group, heterozygous deletion was dedected in one patient (about%2.6). Sequence analysis performed in remaining 37 patients showed no mutation. The ratio of SHOX gene mutations were found to be about %2.6 which is in accordance with other studies in the literature.

In addition to Madelung deformity which is specific for SHOX deficiency, use of short forearm, armspan-height difference, % body-mass index and extremity-trunk ratio were suggested to be useful in determining sub-group of patients who may have a high probability of having SHOX gene mutations.

Key Words: SHOX gene, idiopathic short stature, microsatellite analysis, FISH analysis, sequence analysis.

KAYNAKLAR

Aza-Carmona, M., Shears, D.J., Yuste-Checa, P., Barca-Tierno, V., Hisado-Oliva, A., Belinchon, A., Benito-Sanz, S., Rodriguez, J.I., Argente, J., Campos-Barros, A., Scambler, P.J., Heath, K.E. (2011). Shox interacts with the chondrogenic transcription factors sox5 and sox6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet*, **20**, 1547-1559.

Baldwin, C.T., Hoth, C.F., Amos, J.A., Da-Silva, E.O., Milunsky, A. (1992). An exonic mutation in the hup2 paired domain gene causes waardenburg's syndrome. *Nature*, **355**, 637-638.

Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (1998). Shox mutations in dyschondrosteosis (leri-weill syndrome). *Nat Genet*, **19**, 67-69.

Benito-Sanz, S., Gorbenko Del Blanco, D., Huber, C., Thomas, N.S., Aza-Carmona, M., Bunyan, D., Maloney, V., Argente, J., Cormier-Daire, V., Campos-Barros, A., Heath, K.E. (2006). Characterization of shox deletions in leri-weill dyschondrosteosis (lwd) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet*, **79**, 409-414; author reply 414.

Benito-Sanz, S., Thomas, N.S., Huber, C., Gorbenko Del Blanco, D., Aza-Carmona, M., Crolla, J.A., Maloney, V., Rappold, G., Argente, J., Campos-Barros, A., Cormier-Daire, V., Heath, K.E. (2005). A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of shox is associated with leri-weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet*, **77**, 533-544.

Binder, G. (2011). Short stature due to shox deficiency: Genotype, phenotype, and therapy. *Horm Res Paediatr*, **75**, 81-89.

Binder, G., Ranke, M.B., Martin, D.D. (2003). Auxology is a valuable instrument for the clinical diagnosis of shox haploinsufficiency in school-age children with unexplained short stature. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 4891-4896.

Binder, G., Schwarze, C.P., Ranke, M.B. (2000). Identification of short stature caused by shox defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 245-249.

Blaschke, R.J., Rappold, G. (2006). The pseudoautosomal regions, shox and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 233-239.

Blaschke, R.J., Rappold, G.A. (2000). Shox: Growth, leri-weill and turner syndromes. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 227-230.

Blum, W.F., Crowe, B.J., Quigley, C.A., Jung, H., Cao, D., Ross, J.L., Braun, L., Rappold, G. (2007). Growth hormone is effective in treatment of short stature

associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 219-228.

Boncinelli, E. (1997). Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 331-337.

Bryant, J., Baxter, L., Cave, C.B., Milne, R. (2007). Recombinant growth hormone for idiopathic short stature in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004440.

Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W.F., Rappold, G. (2009). Enhancer deletions of the shox gene as a frequent cause of short stature: The essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet*, **46**, 834-839.

Ciccodicola, A., D'esposito, M., Esposito, T., Gianfrancesco, F., Migliaccio, C., Miano, M.G., Matarazzo, M.R., Vacca, M., Franze, A., Cuccurese, M., Cocchia, M., Curci, A., Terracciano, A., Torino, A., Cocchia, S., Mercadante, G., Pannone, E., Archidiacono, N., Rocchi, M., Schlessinger, D., D'urso, M. (2000). Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced xq/yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet*, **9**, 395-401.

Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., Lindsay, S., Rappold, G.A. (2000). The short stature homeobox gene shox is involved in skeletal abnormalities in turner syndrome. *Hum Mol Genet*, **9**, 695-702.

Cohen, P., Rogol, A.D., Deal, C.L., Saenger, P., Reiter, E.O., Ross, J.L., Chernausk, S.D., Savage, M.O., Wit, J.M. (2008). Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: A summary of the growth hormone research society, the lawson wilkins pediatric endocrine society, and the european society for paediatric endocrinology workshop. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 4210-4217.

Cooke, H.J., Brown, W.R., Rappold, G.A. (1985). Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature*, **317**, 687-692.

Cormier-Daire, V., Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A. (1999). Shox gene mutations and deletions in dyschondrosteosis or leri-weill syndrome. *Acta Paediatr Suppl*, **88**, 55-59.

D'haene, B., Hellemans, J., Craen, M., De Schepper, J., Devriendt, K., Fryns, J.P., Keymolen, K., Debals, E., De Klein, A., De Jong, E.M., Segers, K., De Paepe, A., Mortier, G., Vandesompele, J., De Baere, E. (2010). Improved molecular diagnostics of idiopathic short stature and allied disorders: Quantitative polymerase chain

reaction-based copy number profiling of shox and pseudoautosomal region 1. *J Clin Endocrinol Metab*, **95**, 3010-3018.

Decker, E., Durand, C., Bender, S., Rodelsperger, C., Glaser, A., Hecht, J., Schneider, K.U., Rappold, G. (2011). Fgfr3 is a target of the homeobox transcription factor shox in limb development. *Hum Mol Genet*, **20**, 1524-1535.

Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M., Chiong, W. (1997). Phog, a candidate gene for involvement in the short stature of turner syndrome. *Hum Mol Genet*, **6**, 1341-1347.

Flaquer, A., Rappold, G.A., Wienker, T.F., Fischer, C. (2008). The human pseudoautosomal regions: A review for genetic epidemiologists. *Eur J Hum Genet*, **16**, 771-779.

Fukami, M., Kato, F., Tajima, T., Yokoya, S., Ogata, T. (2006). Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the shox 3' region: Implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet*, **78**, 167-170.

Fukami, M., Nishi, Y., Hasegawa, Y., Miyoshi, Y., Okabe, T., Haga, N., Nagai, T., Tanaka, T., Ogata, T. (2004). Statural growth in 31 japanese patients with shox haploinsufficiency: Support for a disadvantageous effect of gonadal estrogens. *Endocr J*, **51**, 197-200.

Funari, M.F., Jorge, A.A., Souza, S.C., Billerbeck, A.E., Arnhold, I.J., Mendonca, B.B., Nishi, M.Y. (2010). Usefulness of mlpA in the detection of shox deletions. *Eur J Med Genet*, **53**, 234-238.

Gajdos, Z.K., Hirschhorn, J.N., Palmert, M.R. (2009). What controls the timing of puberty? An update on progress from genetic investigation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **16**, 16-24.

Gehring, W.J., Affolter, M., Burglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*, **63**, 487-526.

Glaser, T., Walton, D.S., Maas, R.L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human pax6 gene. *Nat Genet*, **2**, 232-239.

Graves, J.A., Wakefield, M.J., Toder, R. (1998). The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet*, **7**, 1991-1996.

Gudbjartsson, D.F., Walters, G.B., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Halldorsson, B.V., Zusmanovich, P., Sulem, P., Thorlacius, S., Gylfason, A., Steinberg, S., Helgadóttir, A., Ingason, A., Steinthorsdóttir, V., Olafsdóttir, E.J., Olafsdóttir, G.H., Jonsson, T., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., Pedersen, O., Aben, K.K., Witjes, J.A., Swinkels, D.W., Den Heijer, M., Franke, B., Verbeek, A.L., Becker, D.M., Yanek, L.R., Becker, L.C., Tryggvadóttir, L., Rafnar, T.,

Gulcher, J., Kiemeney, L.A., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K. (2008). Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*, **40**, 609-615.

Hall, J.G. (2007). *Handbook of physical measurements*, New York, Oxford University Press.

Hintz, R.L. (2002). Shox mutations. *Rev Endocr Metab Disord*, **3**, 363-367.

Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2006). High incidence of shox anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet*, **43**, 735-739.

Humphray, S.J., Oliver, K., Hunt, A.R., Plumb, R.W., Loveland, J.E., Howe, K.L., Andrews, T.D., Searle, S., Hunt, S.E., Scott, C.E., Jones, M.C., Ainscough, R., Almeida, J.P., Ambrose, K.D., Ashwell, R.I., Babbage, A.K., Babbage, S., Bagguley, C.L., Bailey, J., Banerjee, R., Barker, D.J., Barlow, K.F., Bates, K., Beasley, H., Beasley, O., Bird, C.P., Bray-Allen, S., Brown, A.J., Brown, J.Y., Burford, D., Burrill, W., Burton, J., Carder, C., Carter, N.P., Chapman, J.C., Chen, Y., Clarke, G., Clark, S.Y., Clee, C.M., Clegg, S., Collier, R.E., Corby, N., Crosier, M., Cummings, A.T., Davies, J., Dhami, P., Dunn, M., Dutta, I., Dyer, L.W., Earthrowl, M.E., Faulkner, L., Fleming, C.J., Frankish, A., Frankland, J.A., French, L., Fricker, D.G., Garner, P., Garnett, J., Ghorri, J., Gilbert, J.G., Glison, C., Grafham, D.V., Gribble, S., Griffiths, C., Griffiths-Jones, S., Grocock, R., Guy, J., Hall, R.E., Hammond, S., Harley, J.L., Harrison, E.S., Hart, E.A., Heath, P.D., Henderson, C.D., Hopkins, B.L., Howard, P.J., Howden, P.J., Huckle, E., Johnson, C., Johnson, D., Joy, A.A., Kay, M., Keenan, S., Kershaw, J.K., Kimberley, A.M., King, A., Knights, A., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leongamornlert, D.A., Leversha, M., Lloyd, C., Lloyd, D.M., Lovell, J., Martin, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Matthews, L., McLaren, S., Mclay, K.E., McMurray, A., Milne, S., Nickerson, T., Nisbett, J., Nordsiek, G., Pearce, A.V., Peck, A.I., Porter, K.M., Pandian, R., Pelan, S., Phillimore, B., Povey, S., Ramsey, Y., Rand, V., Scharfe, M., Sehra, H.K., Shownkeen, R., Sims, S.K., Skuce, C.D., Smith, M., Steward, C.A., Swarbreck, D., Sycamore, N., Tester, J., Thorpe, A., Tracey, A., Tromans, A., Thomas, D.W., Wall, M., Wallis, J.M., West, A.P., Whitehead, S.L., Willey, D.L., Williams, S.A., Wilming, L., Wray, P.W., Young, L., Ashurst, J.L., Coulson, A., Blocker, H., Durbin, R., Sulston, J.E., Hubbard, T., Jackson, M.J., Bentley, D.R., Beck, S., Rogers, J., Dunham, I. (2004). DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature*, **429**, 369-374.

Jorge, A.A., Souza, S.C., Nishi, M.Y., Billerbeck, A.E., Liborio, D.C., Kim, C.A., Arnhold, I.J., Mendonca, B.B. (2007). Shox mutations in idiopathic short stature and leri-weill dyschondrosteosis: Frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **66**, 130-135.

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T. (1991). Sh2 and sh3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252**, 668-674.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, **78**, 191-201.

Langer, L.O., Jr. (1965). Dyschondrosteosis, a hereditary bone dysplasia with characteristic roentgenographic features. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, **95**, 178-188.

Langer, L.O., Jr. (1967). Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type. *Radiology*, **89**, 654-660.

Leka, S.K., Kitsiou-Tzeli, S., Kalpini-Mavrou, A., Kanavakis, E. (2006). Short stature and dysmorphology associated with defects in the shox gene. *Hormones (Athens)*, **5**, 107-118.

Lette, G., Jackson, A.U., Gieger, C., Schumacher, F.R., Berndt, S.I., Sanna, S., Eyheramendy, S., Voight, B.F., Butler, J.L., Guiducci, C., Illig, T., Hackett, R., Heid, I.M., Jacobs, K.B., Lyssenko, V., Uda, M., Boehnke, M., Chanock, S.J., Groop, L.C., Hu, F.B., Isomaa, B., Kraft, P., Peltonen, L., Salomaa, V., Schlessinger, D., Hunter, D.J., Hayes, R.B., Abecasis, G.R., Wichmann, H.E., Mohlke, K.L., Hirschhorn, J.N. (2008). Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet*, **40**, 584-591.

Lien, S., Szyda, J., Schechinger, B., Rappold, G., Arnheim, N. (2000). Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: High resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping. *Am J Hum Genet*, **66**, 557-566.

Lindsay, R., Feldkamp, M., Harris, D., Robertson, J., Rallison, M. (1994). Utah growth study: Growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr*, **125**, 29-35.

Marchini, A., Hacker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M., Rappold, G. (2007a). Bnp is a transcriptional target of the short stature homeobox gene shox. *Hum Mol Genet*, **16**, 3081-3087.

Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R.J., Hacker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M., Richter, W., Tommasino, M., Rappold, G.A. (2004). The short stature homeodomain protein shox induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem*, **279**, 37103-37114.

Marchini, A., Rappold, G., Schneider, K.U. (2007b). Shox at a glance: From gene to protein. *Arch Physiol Biochem*, **113**, 116-123.

Munns, C., Glass, I. (2005). Shox-related haploinsufficiency disorders. *GeneReviews*.

Munns, C.F., Glass, I.A., Labrom, R., Hayes, M., Flanagan, S., Berry, M., Hyland, V.J., Batch, J.A., Philips, G.E., Vickers, D. (2001). Histopathological analysis of leri-weill dyschondrosteosis: Disordered growth plate. *Hand Surg*, **6**, 13-23.

Munns, C.J., Haase, H.R., Crowther, L.M., Hayes, M.T., Blaschke, R., Rappold, G., Glass, I.A., Batch, J.A. (2004). Expression of shox in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 4130-4135.

Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J., Olsen, B.R. (1996). Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in hoxd13. *Science*, **272**, 548-551.

Neyzi, O., Binyıldız, P., Alp, H. (1978). Türk çocuklarında büyüme ve gelişme normları. I-tartı ve boy değerleri. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, **41**, 1-22.

Niesler, B., Roth, R., Wilke, S., Fujimura, F., Fischer, C., Rappold, G. (2007). The novel human shox allelic variant database. *Hum Mutat*, **28**, 933-938.

Ogata, T., Matsuo, N., Nishimura, G. (2001). Shox haploinsufficiency and overdosage: Impact of gonadal function status. *J Med Genet*, **38**, 1-6.

Ogata, T., Muroya, K., Sasaki, G., Nishimura, G., Kitoh, H., Hattori, T. (2002). Shox nullizygosity and haploinsufficiency in a japanese family: Implication for the development of turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1390-1394.

Oliveira, C.S., Alves, C. (2011). The role of the shox gene in the pathophysiology of turner syndrome. *Endocrinol Nutr*, **58**, 433-442.

Ranke, M.B. (1996). Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm Res*, **45 Suppl 2**, 64-66.

Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M., Rappold, G.A. (2001). The leri-weill and turner syndrome homeobox gene shox encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet*, **10**, 3083-3091.

Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., Nordsiek, G., Heinrich, U., Breuning, M.H., Ranke, M.B., Rosenthal, A., Ogata, T., Rappold, G.A. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and turner syndrome. *Nat Genet*, **16**, 54-63.

Rappold, G., Blum, W.F., Shavrikova, E.P., Crowe, B.J., Roeth, R., Quigley, C.A., Ross, J.L., Niesler, B. (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: Clinical indicators of shox haploinsufficiency. *J Med Genet*, **44**, 306-313.

Rappold, G.A., Fukami, M., Niesler, B., Schiller, S., Zumkeller, W., Bettendorf, M., Heinrich, U., Vlachopapadopoulou, E., Reinehr, T., Onigata, K., Ogata, T. (2002).

Deletions of the homeobox gene *shox* (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1402-1406.

Rosenfeld, R.G. (2005). The molecular basis of idiopathic short stature. *Growth Horm IGF Res*, **15 Suppl A**, S3-5.

Ross, J.L., Scott, C., Jr., Marttila, P., Kowal, K., Nass, A., Papenhausen, P., Abboudi, J., Osterman, L., Kushner, H., Carter, P., Ezaki, M., Elder, F., Wei, F., Chen, H., Zinn, A.R. (2001). Phenotypes associated with *shox* deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5674-5680.

Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., Mclay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., Frankish, A., Lovell, F.L., Howe, K.L., Ashurst, J.L., Fulton, R.S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M.C., Hurler, M.E., Andrews, T.D., Scott, C.E., Searle, S., Ramser, J., Whittaker, A., Deadman, R., Carter, N.P., Hunt, S.E., Chen, R., Cree, A., Gunaratne, P., Havlak, P., Hodgson, A., Metzker, M.L., Richards, S., Scott, G., Steffen, D., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Worley, K.C., Ainscough, R., Ambrose, K.D., Ansari-Lari, M.A., Aradhya, S., Ashwell, R.I., Babbage, A.K., Bagguley, C.L., Ballabio, A., Banerjee, R., Barker, G.E., Barlow, K.F., Barrett, I.P., Bates, K.N., Beare, D.M., Beasley, H., Beasley, O., Beck, A., Bethel, G., Blechschmidt, K., Brady, N., Bray-Allen, S., Bridgeman, A.M., Brown, A.J., Brown, M.J., Bonnini, D., Bruford, E.A., Buhay, C., Burch, P., Burford, D., Burgess, J., Burrill, W., Burton, J., Bye, J.M., Carder, C., Carrel, L., Chako, J., Chapman, J.C., Chavez, D., Chen, E., Chen, G., Chen, Y., Chen, Z., Chinault, C., Ciccocioppa, A., Clark, S.Y., Clarke, G., Clee, C.M., Clegg, S., Clerc-Blankenburg, K., Clifford, K., Cobley, V., Cole, C.G., Conquer, J.S., Corby, N., Connor, R.E., David, R., Davies, J., Davis, C., Davis, J., Delgado, O., Deshazo, D., Dhami, P., Ding, Y., Dinh, H., Dodsworth, S., Draper, H., Dugan-Rocha, S., Dunham, A., Dunn, M., Durbin, K.J., Dutta, I., Eades, T., Ellwood, M., Emery-Cohen, A., Errington, H., Evans, K.L., Faulkner, L., Francis, F., Frankland, J., Fraser, A.E., Galgoczy, P., Gilbert, J., Gill, R., Glockner, G., Gregory, S.G., Gribble, S., Griffiths, C., Grocock, R., Gu, Y., Gwilliam, R., Hamilton, C., Hart, E.A., Hawes, A., Heath, P.D., Heitmann, K., Hennig, S., Hernandez, J., Hinzmann, B., Ho, S., Hoffs, M., Howden, P.J., Huckle, E.J., Hume, J., Hunt, P.J., Hunt, A.R., Isherwood, J., Jacob, L., Johnson, D., Jones, S., De Jong, P.J., Joseph, S.S., Keenan, S., Kelly, S., Kershaw, J.K., Khan, Z., Kioschis, P., Klages, S., Knights, A.J., Kosiura, A., Kovar-Smith, C., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leversha, M., Lewis, L., Liu, W., Lloyd, C., Lloyd, D.M., Loulseged, H., Loveland, J.E., Lovell, J.D., Lozado, R., Lu, J., Lyne, R., Ma, J., Maheshwari, M., Matthews, L.H., McDowall, J., McLaren, S., McMurray, A., Meidl, P., Meitinger, T., Milne, S., Miner, G., Mistry, S.L., Morgan, M., Morris, S., Muller, I., Mullikin, J.C., Nguyen, N., Nordsiek, G., Nyakatura, G., O'dell, C.N., Okwuonu, G., Palmer, S., Pandian, R., Parker, D., Parrish, J., Pasternak, S., Patel, D., Pearce, A.V., Pearson, D.M., Pelan, S.E., Perez, L., Porter, K.M., Ramsey, Y., Reichwald, K., Rhodes, S., Ridler, K.A., Schlessinger, D., Schueler, M.G., Sehra, H.K., Shaw-Smith, C., Shen, H., Sheridan, E.M., Shownkeen, R., Skuce, C.D., Smith, M.L., Sotharan, E.C., Steingruber, H.E., Steward, C.A., Storey, R., Swann, R.M., Swarbrick, D., Tabor, P.E., Taudien, S., Taylor, T., Teague, B., Thomas, K.,

Thorpe, A., Timms, K., Tracey, A., Trevanion, S., Tromans, A.C., D'urso, M., Verduzco, D., Villasana, D., Waldron, L., Wall, M., Wang, Q., Warren, J., Warry, G.L., Wei, X., West, A., Whitehead, S.L., Whiteley, M.N., Wilkinson, J.E., Willey, D.L., Williams, G., Williams, L., Williamson, A., Williamson, H., Wilming, L., Woodmansey, R.L., Wray, P.W., Yen, J., Zhang, J., Zhou, J., Zoghbi, H., Zorilla, S., Buck, D., Reinhardt, R., Poustka, A., Rosenthal, A., Lehrach, H., Meindl, A., Minx, P.J., Hillier, L.W., Willard, H.F., Wilson, R.K., Waterston, R.H., Rice, C.M., Vaudin, M., Coulson, A., Nelson, D.L., Weinstock, G., Sulston, J.E., Durbin, R., Hubbard, T., Gibbs, R.A., Beck, S., Rogers, J., Bentley, D.R. (2005). The DNA sequence of the human x chromosome. *Nature*, **434**, 325-337.

Rouyer, F., Simmler, M.C., Johnsson, C., Vergnaud, G., Cooke, H.J., Weissenbach, J. (1986). A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Nature*, **319**, 291-295.

Sabherwal, N., Bangs, F., Roth, R., Weiss, B., Jantz, K., Tiecke, E., Hinkel, G.K., Spaich, C., Hauffa, B.P., Van Der Kamp, H., Kapeller, J., Tickle, C., Rappold, G. (2007). Long-range conserved non-coding shox sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet*, **16**, 210-222.

Sabherwal, N., Schneider, K.U., Blaschke, R.J., Marchini, A., Rappold, G. (2004). Impairment of shox nuclear localization as a cause for leri-weill syndrome. *J Cell Sci*, **117**, 3041-3048.

Schiller, S., Spranger, S., Schechinger, B., Fukami, M., Merker, S., Drop, S.L., Troger, J., Knoblauch, H., Kunze, J., Seidel, J., Rappold, G.A. (2000). Phenotypic variation and genetic heterogeneity in leri-weill syndrome. *Eur J Hum Genet*, **8**, 54-62.

Schneider, K.U., Marchini, A., Sabherwal, N., Roth, R., Niesler, B., Marttila, T., Blaschke, R.J., Lawson, M., Dumic, M., Rappold, G. (2005). Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of shox homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and leri-weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat*, **26**, 44-52.

Shears, D.J., Guillen-Navarro, E., Sempere-Mirallas, M., Domingo-Jimenez, R., Scambler, P.J., Winter, R.M. (2002). Pseudodominant inheritance of langer mesomelic dysplasia caused by a shox homeobox missense mutation. *Am J Med Genet*, **110**, 153-157.

Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J., Winter, R.M. (1998). Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene shox cause leri-weill dyschondrosteosis. *Nat Genet*, **19**, 70-73.

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A.,

Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., Mcpherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S., Page, D.C. (2003). The male-specific region of the human y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, **423**, 825-837.

Sovio, U., Bennett, A.J., Millwood, I.Y., Molitor, J., O'reilly, P.F., Timpson, N.J., Kaakinen, M., Laitinen, J., Haukka, J., Pillas, D., Tzoulaki, I., Hoggart, C., Coin, L.J., Whittaker, J., Pouta, A., Hartikainen, A.L., Freimer, N.B., Widen, E., Peltonen, L., Elliott, P., McCarthy, M.I., Jarvelin, M.R. (2009). Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern finland birth cohort 1966. *PLoS Genet*, **5**, e1000409.

Spranger, S., Schiller, S., Jauch, A., Wolff, K., Rauterberg-Ruland, I., Hager, D., Tariverdian, G., Troger, J., Rappold, G. (1999). Leri-weill syndrome as part of a contiguous gene syndrome at xp22.3. *Am J Med Genet*, **83**, 367-371.

Stuppia, L., Calabrese, G., Gatta, V., Pintor, S., Morizio, E., Fantasia, D., Guanciali Franchi, P., Rinaldi, M.M., Scarano, G., Concolino, D., Giannotti, A., Petreschi, F., Anzellotti, M.T., Pomilio, M., Chiarelli, F., Tumini, S., Palka, G. (2003). Shox mutations detected by fish and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet*, **40**, E11.

Thomas, N.S., Maloney, V., Bass, P., Mulik, V., Wellesley, D., Castle, B. (2004). Shox mutations in a family and a fetus with langer mesomelic dwarfism. *Am J Med Genet A*, **128A**, 179-184.

Turan, S., Bereket, A., Omar, A., Berber, M., Ozen, A., Bekiroglu, N. (2005). Upper segment/lower segment ratio and armspan-height difference in healthy turkish children. *Acta Paediatr*, **94**, 407-413.

Walenkamp, M.J., Wit, J.M. (2006). Genetic disorders in the growth hormone - insulin-like growth factor-i axis. *Horm Res*, **66**, 221-230.

Weedon, M.N., Lango, H., Lindgren, C.M., Wallace, C., Evans, D.M., Mangino, M., Freathy, R.M., Perry, J.R., Stevens, S., Hall, A.S., Samani, N.J., Shields, B., Prokopenko, I., Farrall, M., Dominiczak, A., Johnson, T., Bergmann, S., Beckmann, J.S., Vollenweider, P., Waterworth, D.M., Mooser, V., Palmer, C.N., Morris, A.D., Ouwehand, W.H., Zhao, J.H., Li, S., Loos, R.J., Barroso, I., Deloukas, P., Sandhu, M.S., Wheeler, E., Soranzo, N., Inouye, M., Wareham, N.J., Caulfield, M., Munroe, P.B., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., Frayling, T.M. (2008). Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet*, **40**, 575-583.

Wit, J.M. (2011). Definition and subcategorization of idiopathic short stature: Between consensus and controversy. *Horm Res Paediatr*, **76 Suppl 3**, 3-6.

Wit, J.M., Clayton, P.E., Rogol, A.D., Savage, M.O., Saenger, P.H. ,Cohen, P. (2008). Idiopathic short stature: Definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res*, **18**, 89-110.

Wit, J.M. ,Dunkel, L. (2011). Overview: Developments in idiopathic short stature. *Horm Res Paediatr*, **76 Suppl 3**, 1-2.

Zinn, A.R., Wei, F., Zhang, L., Elder, F.F., Scott, C.I., Jr., Marttila, P. ,Ross, J.L. (2002). Complete shox deficiency causes langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet*, **110**, 158-163.

EK 1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararı

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU DEĞERLENDİRME FORMU				
DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu			
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara			
TELEFON	0312 310 30 10/227			
FAKS	0312 310 63 70			
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İdyopatik boy kısalığında SHOX geni değişiklikleri		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Halil G.Karabulut		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
FAZ 3		☐		
FAZ 4		☐		
BE/BY		☐		
	DİĞER	☐	DİĞER ise belirtiniz:	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	İLAC DİŞİ ARAŞTIRMA	☐	Belirtiniz:	
	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐ ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	09.06.2010	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	09.06.2010	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER	☐		




19 Ekim 2010
ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

1

EK 1'in devamı:

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:16-338	Tarih: 04 Ekim 2010
	Yrd.Doç.Dr.Halil G.Karabulut'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Mehmet Mellî	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>A. Demirkazık</i>
Prof.Dr.Ajlan Tükün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Şehirdışında
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>N. Puralı</i>
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>H.Serdar Öztürk</i>
Prof.Dr.Bülent Gümüşel	Eczacı-Öğr.Üyesi	Hacettepe Üni. Ecz. Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>B. Gümüşel</i>
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>H.Serap Sivri</i>
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Toplantıda
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Banu Çakır</i>
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>V. Kavas</i>
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>G. Aslan</i>

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

EK2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu:

Versiyon No : 01
Versiyon Tarihi : 09.06.2010

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU
(HASTA GRUBU)**

Araştırmanın Adı: İdyopatik boy kısalığında SHOX geni değişiklikleri

Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı: Sebebi saptanamayan boy kısalığı vakalarında SHOX genindeki değişikliklerin tespiti

Sorumlu Araştırmacı: Yrd.Doç.Dr. Halil G. KARABULUT

Boy kısalığı, boyun aynı yaş, cinsiyet ve populasyon grubu için verilen boy ortalamasının -2 standart sapma değerinin altında olması şeklinde tanımlanır. Tüm çocukların %3'ünü etkiler ve çocukluk çağında en sık görülen klinik durumlardan biridir. İdyopatik boy kısalığı; bilinen bir hastalığı olmayan, aynı yaş, cinsiyet ve populasyon grubu için verilen boy ortalamasının -2 standart sapma değerinin altında olmasıdır. İdyopatik boy kısalığı tanımlamasının kullanılabilmesi için anamnez, fizik muayene, laboratuvar tetkikleri ve görüntüleme yöntemleri ile boy kısalığı nedeninin saptanamamış olması gerekir.

Boy kısalığı, genetik etkinin güçlü olduğu, bir çok farklı nedeni olan, gelişimsel bir durumdur. Boy kısalığına neden olabilecek çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bunların en önemlilerinden bir tanesi SHOX genidir. SHOX geni hem X hem de Y kromozomunun kısa kolunun uç kısmında bulunan PAR1 içinde bulunur. Kullanılan tarama yönteminin farklılığına göre idyopatik boy kısalığında SHOX geni değişiklikleri % 2.4 ile %15 arasında bulunmuştur. SHOX geni tek doz yetmezliği geniş bir klinik spektrum gösterir; idyopatik boy kısalığı, Turner sendromu ve Leri-Weill diskondrosteozisi. Çift doz SHOX geni kayıpları daha şiddetli bir klinik tabloya, Langer mezmelik displaziye neden olur.

Bu çalışmaya idyopatik boy kısalığı ön tanılı 100 birey alınacaktır. Bu çalışmaya siz idyopatik boy kısalığı ön tanısı konulan kişilerden olduğunuz için davet edildiniz. Araştırmada, sitogenetik analiz amacıyla sizden alınmış olan periferik kandan artan materyal kullanılarak, standart metotlar ile periferik kan lökositlerinden genomik DNA izole edilecektir. Elde edilecek olan DNA'dan SHOX genindeki genetik değişiklikler analiz edilecek ve bu incelemenin sonuçları kaydedilecektir. Bu şekilde size ait genetik bilgi elde edilecektir. Sonuçlar araştırmanın bilimsel verisinde kullanılacaktır.

Bu çalışma sırasında size yapılacak muayene, laboratuvar tetkiki vs. gibi işlemler ÜCRETSİZ OLUP SİZDEN VEYA BAĞLI BULUNDUĞUNUZ SİGORTA KURUMUNDAN HİÇBİR ÜCRET TALEP EDİLMEMEYECİTİR.

Çalışma kapsamında gönüllülere verilecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları siz ve hekiminizle paylaşılacaktır.

Çalışmaya bilgilendirilmiş olur veren kişiler dahil edilecektir. Çalışmaya katıldığınız takdirde herhangi bir zamanda hiçbir mazeret bildirmeden olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz ve bundan dolayı sonraki tıbbi takip ve tedavi esnasında mevcut haklardan herhangi bir kayba uğramanız söz konusu değildir.

Kaydedeceğimiz size ait veriler gizlilik kurallarına uygun olarak saklanacak ve sonuçlar yayımlandığında kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. İsminiz gizli tutulacak ve hastane dışında açıklanmayacaktır. Bu belgeyi imzalayarak tıbbi bilgilerinizin bu şartlar altında kullanılmasına izin vermektedir.

Eğer çalışma ile ilgili daha detaylı bilgi almak isterseniz veya çalışma süresince aklınıza takılan bir soru olursa, çalışmanın sorumlu yürütücüsü/yardımcı araştırmacısı olan olan **Yrd. Doç. Dr. Halil G. Karabulut ya da Dr. Kenan Delil**' e danışabilirsiniz.

Tel: (0 312) 310 30 10/363-327-252 GSM: 0 530 527 64 22

Gönüllü Oluru

Bu sayfayı imzalamakla gönüllü olarak bu çalışmaya katılmayı kabul etmiş olacağım konusunda bilgilendirildim. Yukarıdaki bilgileri okudum. Aynı zamanda bana sözlü açıklama da yapıldı. Bu koşullar altında, kendi rızam ile bu çalışmaya katılmayı kabul ediyorum. Bana ait tıbbi kayıtların sağlık otoritelerince incelenebileceğini anladım ve bu kişilere izin veriyorum.

Alınan kan örneğimin aşağıdaki koşullarda kullanılmasına izin veriyorum. (Aşağıdaki şıklardan yalnız birini seçiniz)

- ☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin önerilen çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. Gelecekte yapılması olası her türlü çalışmada da isimleştirilerek kullanılmasını onaylıyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin araştırma konusu ile bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum. Ancak, farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Gönüllünün adı soyadı:	Tarih:...../...../.....
Adresi :	İmza:
Tel :	
Gönüllünün yasal temsilcisinin adı soyadı: (gerekli ise)	Tarih:...../...../.....
Adresi :	İmza:
Tel :	
Açıklama yapan araştırmacının adı soyadı:	Tarih:...../...../.....
.....	İmza:

Bu formun imzalı bir kopyası gönüllüye verilecek, bir kopyası araştırma ana dosyasına konulacak, bir kopyası da araştırmacıda kalacaktır.