



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YARIK DAMAK- DUDAK VAKALARINDA FENOTİP
GENOTİP İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

KORKUT ULUCAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI




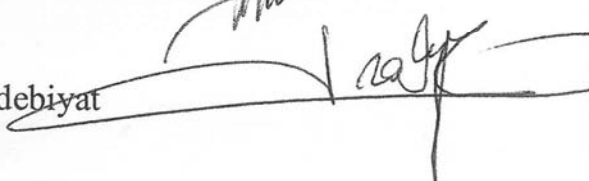
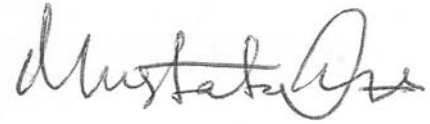
DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr. İlter GÜNEY

İSTANBUL-2009

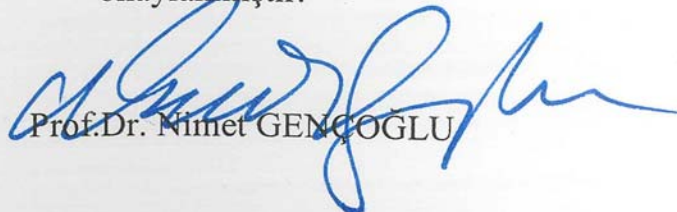
TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Korkut ULUCAN
Tez Başlığı : Yarık Damak-Dudak Vakalarında Fenotip Genotip İlişkisinin İncelenmesi
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 14.09.2009

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Yrd.Doç. Dr. İlter GÜNEY	M.Ü.Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	
Prof. Dr. Selma YILMAZER	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU	Acıbadem Ü. Fen Edebiyat Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ÖZEN	Yeditepe Ü. Tıp Fakültesi	

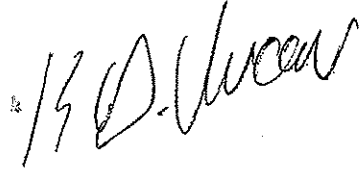
Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 01/10/2009 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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



10.09.2009

Korkut Ulucan

I. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana her türlü manevi, maddi destek ve yardımı özveriyle veren, eğitimimde ve sosyal yaşantımda büyük emekleri olan danışmanım Yrd.Doç.Dr.İlter Güney'e,

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinin her aşamasında destek olan ve yol gösteren hocam Doç.Dr.Özhan Çelebiler'e,

Paylaştığı bilgi ve deneyimleriyle, gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmam boyunca ilgi ve desteğini hep hissettiğim, değerli hocam Anabilimdalı Başkanımız Prof.Dr.Ayşe Özer'e,

Destek, anlayışı ve akademik yardımlarından dolayı dolayı halen çalışmakta olduğum Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesindeki hocam ve Anabilimdalı Başkanımız Prof. Dr.Tanju Kadir' e, değerli hocam Prof. Dr. Nesrin Emekli' ye ve Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu' na

Klinik verilerin ve örneklerin toplanmasındaki büyük katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'ndaki Bio. Mustafa Özyürek'e ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Bio. Şebnem Ergunsu' ya

Klinik değerlendirmelerimde ve medical konularda her zaman benim yanımda olan sevgili arkadaşım Dr. Teoman Akçay'a,

Eğitimim süresince bilgilerini ve sevgilerini benimle paylaşan Dr. Deniz Ergeç, Dr. Deniz Kıraç, Gülşah Koç, Dr. Mustafa Akkiprik ve Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri asistan arkadaşlarıma,

İstatistiksel analizlerimde yardımlarını aldığım Yeditepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Çiğdem Kaspar' a,

Çalışmalarım boyunca benden hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak yanımda olan İsmet Çetin' e ve Yük. Bio. Derya Kazancı' ya,

Hayatım boyunca sonsuz sevgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan aileme ve yakınlarıma,

Anlayışı, sabrı, özverisi, maddi- manevi desteği, yardımları ve sevgisi için hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım eşime,

TEŞEKKÜR EDERİM.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III. KISALTMALAR VE SİMGELER	IV
IV. ŞEKİL ve TABLOLAR.....	V
i. Şekiller	V
ii. Tablolar	V
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Damak ve Dudakların Embriyolojik Gelişimi.....	5
4.1.1. Damak Embriyolojik Gelişimi	8
4.1.2. Dudak Embriyolojik Gelişimi	11
4.2. Dudak ve Damak Yarıklarının Sınıflandırılması ve Embriyolojik Temeli	12
4.3. Dudak ve Damak Yarıklarının Etyolojisi ve Epidemiyolojisi.....	15
4.3.1. Dudak ve Damak Yarıklarının Etyolojisi.....	15
4.3.2. Dudak Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi	15
4.4. Nonsendromik Dudak ve Damak Yarıklarında Çevrenin ve Kalıtımın Rolü....	16
4.4.1. Çevrenin Rolü	16
4.4.2. Kalıtımın ve Genlerin DDY Oluşumundaki Rolü	19
4.5. DDY Oluşumunda MSX1 Geninin Rolü.....	22
4.5.1. MSX1 Geni	22
4.5.2. MSX1 Geninin Yapısı.....	22
4.5.3. MSX1 Proteini	23
4.5.4. MSX1 Gen Expresyonu	23
4.5.5. MSX1 Geni ve İzole DDY.....	24
4.6. DDY oluşumunda Çevresel Faktörlerin Genler Üzerine Etkisi	27
4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27

4.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
4.9. SSCP (Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi).....	28
4.10. DNA Dizi Analizi.....	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
5.1. Gereç	
5.1.1. Kullanılan aletler.....	33
5.1.2. Kimyasal maddeler	33
5.1.3. Kullanılan ticari kitler	34
5.1.4. Kullanılan primerler.....	34
5.1.5. Kimyasal çözeltiler	35
5.2. Yöntemler	37
5.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
5.2.2. Gümüş Boyama.....	37
5.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları	38
5.2.4. Hasta ve Kontrol Grubu	39
5.2.5. Kandan DNA İzolasyonu.....	39
5.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	41
5.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	41
5.2.8. SSCP	41
5.2.9. DNA Dizi Analizi	43
5.2.10. İstatistiksel Yöntemler	44
6. BULGULAR.....	45
6.1. MSX1 Geninin Amplifikasyon Sonuçları	45
6.2. MSX1 Ekzon Bölgelerinin SSCP Sonuçları	47
6.3. Dizi Analizi Sonuçları.....	48
6.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	50
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8. KAYNAKLAR	57
9. ÖZGEÇMİŞ.....	67
10. ETİK KURUL ONAYI.....	72

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

CLPED	Ektodermal Displazili Yarık Damak- Dudak
DDY	Dudak Damak Yarığı
ED	Embriyonik Gün
DY	Damak Yarığı
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
IRF6	Interferon Regüle- edici Faktörü
MSX1	Mouse Segment Homolog Proteini
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat Redüktaz
NTD	Nöral Tüp Defektleri
OD	Otozomal Dominant
OR	Otozomal Resesif
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PVRL1	Polivirüs Reseptör Benzeri Protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSCP	Tek Zincir Yapı Polimorfizmi
TGFA	Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
TGFB3	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

IV. ŞEKİL ve TABLOLAR LİSTESİ

i.Şekiller Listesi

Şekil 4.1: Yüz taslağındaki hücre çıkıntıları	6
Şekil 4.2: Yüzün gelişim haftaları	7
Şekil 4.3: İnsanda normal ve yumuşak damak yarığının karşılaştırılması	9
Şekil 4.4: Sekonder damak gelişiminin safhaları	10
Şekil 4.5: Primer ve sekonder damak gelişimi ve etkin olan genler	11
Şekil 4.6: Üst dudağın oluşumunda rol alan hücre hareketleri.....	12
Şekil 4.7: Primer ve sekonder damak yarıkları	14
Şekil 4.8: Folatın kimyasal yapısı	18
Şekil 4.9: 4p16.2 kromozom bölgesinde MSX1 geninin lokalizasyonu	19
Şekil 4.10: MSX1 proteinin şematik yapısı.....	23
Şekil 4.11: MSX1 mutasyonlarının etkileri	26
Şekil 4.12: SSCP metodunun şematize edilmiş şekli	29
Şekil 4.13: DNA dizi analizinde Maxam- Gilbert metodu.....	31
Şekil 4.14: Dizi analizi yöntemi	32
Şekil 5.1. Kandan DNA izolasyonu protokolü.....	40
Şekil 5.2: MSX1 geninin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgelerinin amplifikasyon şeması	41
Şekil 6.1: Ekzon1 bölgesinin amplifikasyon ürünleri	45
Şekil 6.2: Ekzon2.1 bölgesinin amplifikasyon ürünleri	46
Şekil 6.3: Ekzon2.2 bölgesinin amplifikasyon ürünleri	46
Şekil 6.4: Ekzon2.1' in SSCP bant profilleri.....	47
Şekil 6.5: Ekzon1' in SSCP bant profilleri.....	48
Şekil 6.6: Ekzon1 bölgesinin dizi analizinin bir bölümü	49
Şekil 6.7: Ekzon 2.1 bölgesinin dizi analizinin bir bölümü	49

ii.Tablolar Listesi

Tablo 4.1: Karanofasiyal gelişimde rol oynayan faktörler	5
Tablo 4.2: MSX1 genindeki önemli mutasyonlar	25

Tablo 4.3: Çevresel faktörlerin DDY oluşumunda genler üzerine etkisi	27
Tablo 5.1: MSX1 Geninin amplifikasyonu için kullanılan primerler, Tm değerleri ve amplicon uzunlukları	35
Tablo 6.1: Folik asit ve sigara kullanımının hasta ve kontrol gruplarındaki Ki- Kare analiz sonuçları	50
Tablo 6.2: Hasta ve kontrol gruplarında genetik danışma hakkında bilgilendirilmelerinin ve alkol kullanımının Fisher's Exact analiz sonuçları	50
Tablo 6.3: DDY oluşumunda cinsiyet dağılımının Fisher's Exact analizi	51

1. ÖZET

Yarık dudak ve/ veya damak (DDY) konjenital anomaliler arasında sık rastlanan gruptandır. Anomali çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile oluşur. Çevresel faktörlerin başında; maternal sigara ve alkol kullanımı, hamilelik sırasında kullanılan bazı ilaçlar, geçirilen enfeksiyonlar ve folik asit eksikliği gelir. Genetik faktörlerin başında ise MSX1 gibi fetal gelişimi regüle eden genler gelmektedir. Biz bu çalışmamızda; Türk toplumunda izole DDY oluşumunda MSX1 genindeki olası değişiklikler ve maternal sigara, alkol ve folik asidin bu anomalideki etkisini inceledik.

Çalışmamıza yaşları 4 ile 17 arasında 100 DDY' li birey ve yaşları 7 ile 23 arasında değişen sağlıklı 100 kontrol dahil edilmiştir. MSX1 geninin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgelerinin analizi için periferik kandan DNA izolasyonu yapıp PZR-SSCP- dizi analizi metodlarıyla incelenmiş, hasta ve kontrol gruplarında herhangi bir varyasyon saptanmamıştır.

Çevresel faktörleri incelemek amacıyla hasta ve kontrol gruplarının annelerine hamilelikleri sırasında sigara, alkol ve folik asit kullanıp kullanmadıkları sorgulanarak araştırma grupları oluşturulmuştur.

Hamilelikleri sırasında kontrol grubundaki annelerin %74' ü folik asit kullanırken, hasta grubundaki annelerin %22' si folik asit kullanmıştır. Alkol kullanımında ise kontrol grubundaki annelerin % 24' ü hamilelikleri sırasında kullanmış, hasta grubundaki annelerin hiçbiri kullanmamıştır. Hamilelikleri sırasında kontrol grubundaki annelerin %58' i sigara kullanmış, hasta grubunda ise bu oran %56' dır.

DDY oluşumu açısından folik asit kullanan ve kullanmayanlar karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Folik asit kullanımı DDY' nin önlenmesi açısından olumlu etkisi vardır. Ancak alkol ve sigarada benzer etki saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Folik asit, MSX1, sigara tüketimi, Türk popülasyonu, Yarık Damak- Dudak

2. SUMMARY

The survey of Genotype and Phenotype Relation in Cleft Lip with/ without Palate Patients

Cleft lip with/ without palate (CLP) is one of the major groups of congenital anomalies. This abnormality arise both with the combination of genetic and environmental factors. Environmental factors include maternal cigarette and alcohol consumption, some medicals used during pregnancy and folic acid deficiency. Genetic factors are the genes like MSX1, which takes place during embryological development. We examined the MSX1 gene variation and maternal cigarette and alcohol consumption and folic acid deficiency in Turkish non- syndromic CLP population.

100 patients with NSCLP whose ages are between 4- 17 and 100 controls aged between 7- 23 were recruited to the study. Inorder to examine the MSX1 gene variation, DNA was obtained from peripheral blood and PCR- SSCP- sequencing methodology was performed and no MSX1 gene variation was detected between control and patient groups.

Research groups were formed according to cigarette, alcohol and folic acid consumption during pregnancy, especially 1 month before conception and within the first trimester. 74% of the women in the control group used folic acid whereas 22% of the women in the patients group. 24% of the women in the control group consumed alcohol during their pregnancy as social-drinker and none of the mother consumed alcohol in the patients' group. 58% of the women in the contol group used cigarette during pregnancy and 56% of the women in the control group used cigarette.

Significant difference between two groups was found in the terms of folic acid consumption. This result confirmed the preventive effect of folic acid in CLP formation. But we couldn't detect similiar results in cigarette and alcohol consumption.

Key Words: Folic acid, Genetic counseling, Maternal smoking, MSX1, NS- CLP

3. GİRİŞ ve AMAC

Yarık damak ve/ veya dudak (DDY), ortalama 1/ 700' lük insidansı ile konjenital malformasyonlar arasında en sık rastlanan grubu oluşturur (58, 84). Oral yarıklar bazı hastalarda sadece yarık dudak bazı hastalarda sadece yarık damak (DY) bazı hastalarda da hem yarık dudak hem de yarık damak olarak görülür (DDY). Meydana gelen oral yarık eğer başka bir sendromla beraber görülüyorsa sendromik, görülüyorsa ise non- sendromik DDY (izole DDY) olarak adlandırılır.

Meydana gelen malformasyonun temel nedeni nazal kavite ile oral kavitenin gelişim sırasında tam olarak ayrılamamasıdır (16, 34). Bu hastalar doğumlarından hemen sonra konuşma, beslenme zorlukları, orta kulak enfeksiyonları gibi sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalmaktadırlar (66, 100). Tedavileri uzun ve genellikle multi- disiplinler olarak doğumdan sonra ergenliğe kadar devam eder ve şiddetli vakalar birden fazla cerrahi müdahale ile normale döndürülmeye çalışılır. Bazı hastalarda geniş çaplı dental bozukluklar görülmektedir ve birçoğu ortodonti tedavisi görmektedirler. Yapılan çalışmalarda oral yarıklı doğan çocukların yaşam sürelerinin normallere göre daha kısa olduğu ve psikiyatrik sorunlarla daha sık karşılaştıkları gösterilmiştir (22). Başka bir çalışma da ise DDY' li kadınların beyin ve meme kanserine, DDY' li erkeklerin de akciğer kanserine yakalanma sıklığının normallere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (11).

Günümüzde DDY' nin genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği veya her iki faktörün de DDY oluşumunda birlikte etkisinin olduğu kabul edilmektedir (69). Kimi vakalarda genetik faktörler ön plana çıkmış gibi gözükürken kimi vakalarda çevresel faktörler, kimi vakalarda ise hem genetik hem de çevresel faktörler birlikte DDY oluşumuna neden olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (16, 100). Farklı populasyonlarda yapılan çalışmalarda izole DDY' nin %20' sinin ailesel kökeni olduğu belirlenmiş ve böylelikle anomalinin oluşmasında genetik faktörlerin önemi ortaya konmuştur (16).

Embriyolojik ve anatomik çalışmalarla kraniyofasiyal gelişimin aşamaları daha iyi anlaşılmıştır. Fare ve sıçanlardaki kraniyofasiyal gelişimin, insan kraniyofasiyal gelişimine benzerlikler göstermesi model organizma olarak fare ve sıçanların kabul

edilmesini sağlamıştır. Knock- out fare modelleriyle, DDY ile ilişkili aday genler daha iyi anlaşılmıştır ve halen de yeni aday genler ortaya çıkmaktadır (11, 36).

Farklı çalışmalarda, gerek etnik gerekse değişik populasyonlara dayalı mutasyon taramaları yapılarak DDY' nin meydana gelme nedeni belirlenmeye çalışılmıştır. Sadece gen ve gen grupları değil aynı zamanda bağlantı çalışmaları yapılarak multi-genik bir kusur olan DDY için aday genlerin bulunduğu kromozom bölgeleri de belirlenmiştir (69, 100, 119).

DDY oluşumunu sağlayan genetik faktörlerin başında MSX1 geni gelmektedir. MSX1 geni ile farklı toplumlarda kusur oluşumu- gen varyasyonuna dayalı çalışmalar yapılmıştır. Biz de bu çalışmamızla Türk toplumundaki DDY' li bireylerdeki MSX1 gen varyasyonu ile kusur arasındaki ilişkiyi belirleyip çevresel faktörlerden maternal sigara, alkol ve folik asit eksikliğinin hastalığın oluşumundaki etkisini belirlemeyi amaçlamaktayız.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Damak ve Dudakların Embriyolojik Gelişimi

Kraniyofasiyal gelişim birçok sinyal iletim sistemini, büyüme faktörleri ve onların reseptörlerini, transkripsiyon faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks komponentlerini içine alan oldukça karmaşık bir metabolik gelişim sistemidir (Tablo 4.1) (100). İntrauterin yaşamın ilk haftalarında anterior nöral tüpün dorsalinden köken alan nöral krest hücreleri mezenşim hücreleri ile yüz taslağını (fasiyal primordia) oluşturmak üzere birleşirler. Yüz taslağında ileride burun, ağız, dudak ve damakları oluşturacak olan nazal, maksiller ve mandibular çıkıntılar (prominens) bulunmaktadır (Şekil 4.1). 4. Haftanın sonuna doğru nazal çıkıntılar medial ve lateral nazal yapılarını oluşturur, iki yapının ortasında ise ileride burun deliklerini ortaya çıkaracak olan nazal girintiler oluşur (65). Maksillar çıkıntılar ise mediale doğru ilerlerken medial ve lateral nazal çıkıntılar ile birleşerek burun, üst dudak ve damağın oluşumunu başlatır (Şekil 4.2A). Mediyal nazal çıkıntıdan burun ucu, filtrum ve Cupid yayı, premaksillar ve primer damak ortaya çıkar. Mandibular çıkıntılardan alt çene ve dudaklar, alt yanaklar oluşur, maksillar çıkıntılardan ise üst dudak ve yanaklar gelişir (Şekil 4.2 B ve C) (64, 65).

Sinyal Yolakları	Shh, Bmp2, Bmp4, Bmp7, Wnt5a, Smad2-4
Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri	Egf, Egfr, Tgf, Fgf2, Fgf8, Fgf1, Fgf1r, Fgf2r
Transkripsiyon Faktörleri	Ap2, Dlx1-6, Gli2-3, Hoxa2, Irf6, Lhx8, Pax9, Pitx2, Prx1, Msx1, Tbx1, Tbx22
Hücre Adezyon Molekülleri	Pvr11, Conn43, E- Kadherin
Ekstraselüler Matriks	Col2A1, Col11A1, Col11A2, Mmp2-3, Mmp9, Mmp13, Timp1-3, Fibronektin

Tablo 4.1: Kraniyofasiyal gelişimde rol oynayan faktörler

Frontonazal proses

Maksillar Çıkıntılar

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

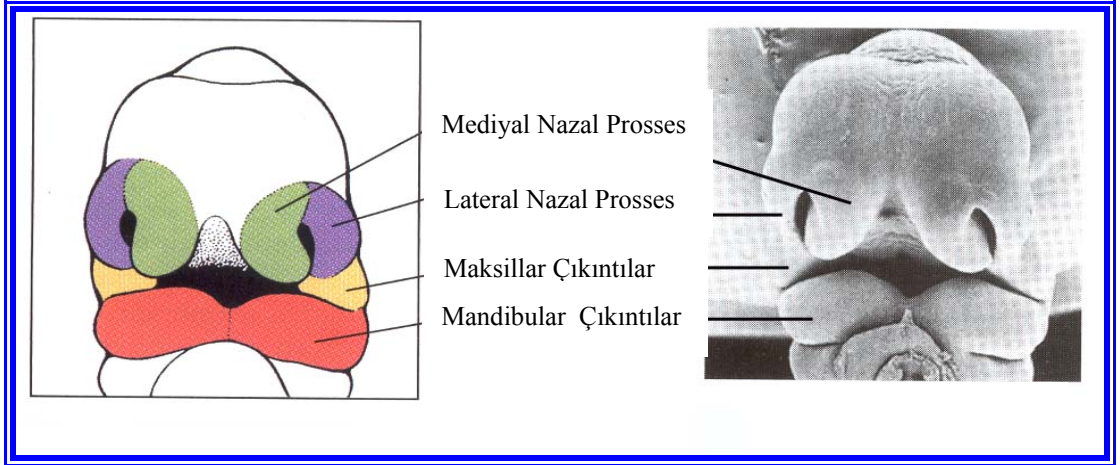
Mandibular Çıkıntılar

Primitif Ağız (Stomodeum)

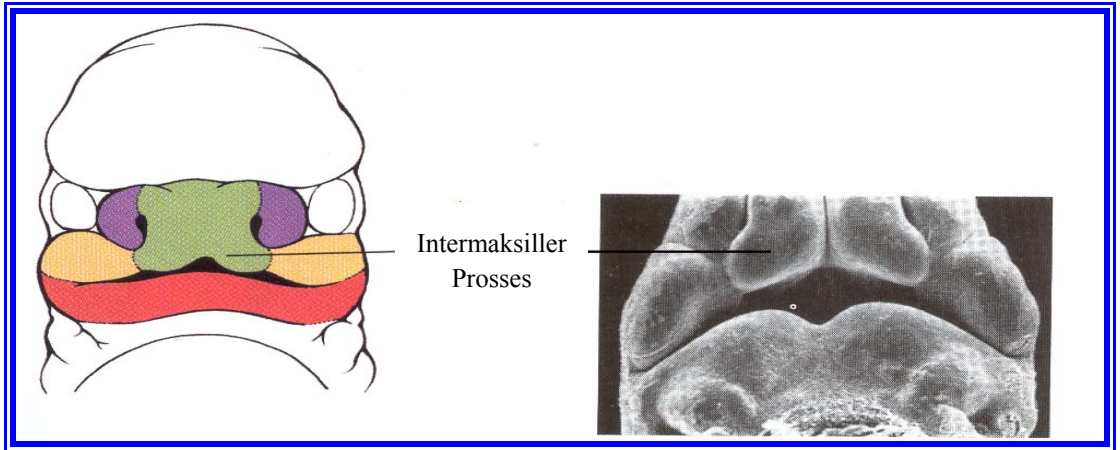
Kardia Bölgesi

Şekil 4.1: Yüz taslağındaki hücre çıkıntıları ([Http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98](http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98)' den modifiye edilerek, Erişim tarihi 04.05.2009)

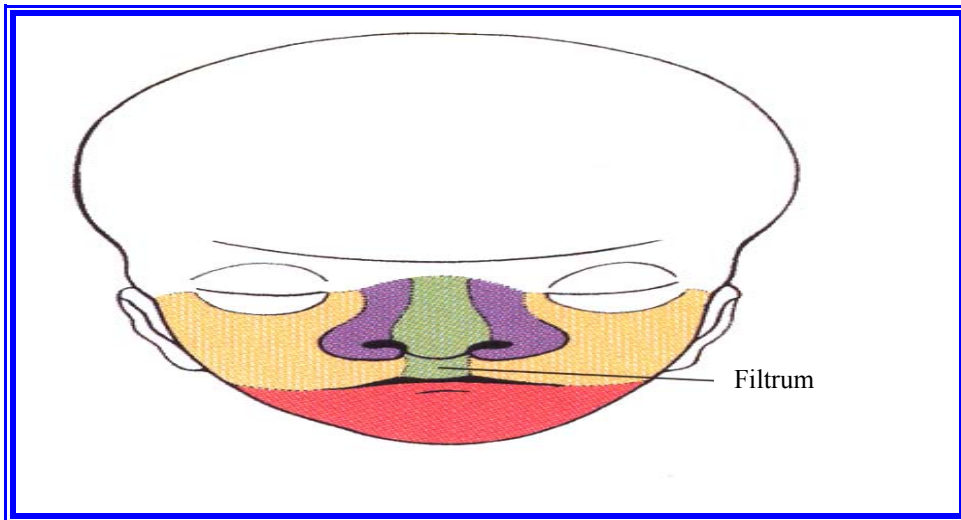
A.



B.



C.



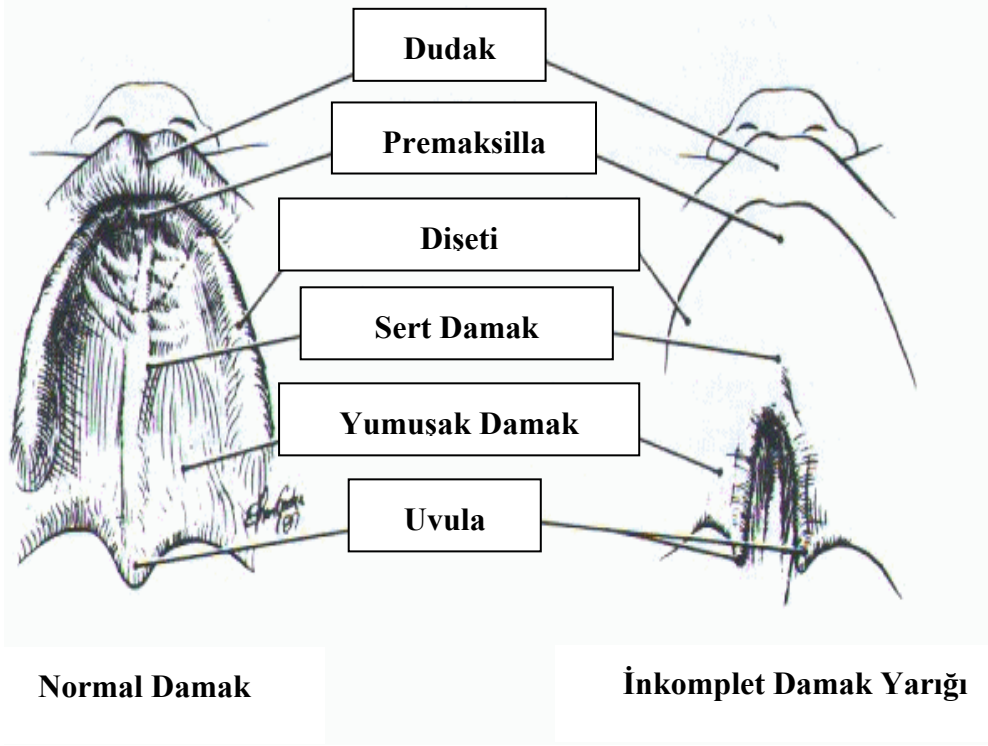
Şekil 4.2: Yüzün gelişim haftaları A. 6. Haftanın başında meydana gelen hücre çıkıntıları, B. 7. Haftanın sonunda intermaksiller proses sonucu nazal septumların oluşması, C. 10. Haftada filtrum ve üst dudakların oluşması ([Http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98](http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98)' den modifiye edilerek, Erişim tarihi 04.05.2009).

4.1.1. Damak Embriyolojik Gelişimi

Damak Gelişimi (Palatogenez) primer damak ve sekonder damak olarak üzere iki taslaktan gelişir.

Palatogenez intra- uterin hayatın 5. haftasının sonunda başlar ve yaklaşık 12. hafta da sona erer (49). En kritik dönem 6. haftanın sonundan 9. haftanın başına kadar olan zamandır. Oral dokuları oluşturacak olan dokuların farklılaşması, hareketlenmesi ve birleşmeleri ile damak, dudak ve nazal dokular meydana gelmektedir (7). Fibroblast büyüme faktörleri ve sonic hedgehog (shh) sinyal yolağı bu evrede oldukça etkilidir (7, 21).

Primer damak (foramen insizivum anterior) maksillanın kama şeklinde bir mezenşim kitlesi olan intermaksillar segmentinden gelişmeye başlar ve maksillanın premaksillar parçasını oluşturur. Primer damağın iki kısmı vardır, üst dudağın filtrumunu oluşturacak olan kısım ve 4 kesici dişi (insisor) tutan üçgen şeklindeki damak kemik kısmı (49). Sekonder damak, insanlarda sert ve yumuşak damağın %90' ını kapsar ve yumuşak damak yarıklarının tamamını içerir (Şekil 4.3). Sekonder damak gelişimi 3 evreye ayrılmıştır. I. evrede (6. gestasyonel hafta) maksillar çıkıntılardan uzanan iki mezenşim çıkıntısının- ki bunlara lateral palatin prosesleri denir- gelişen dilin her iki yanında dikey düzleme hareketleriyle başlar ve (Şekil 4.4). II. evrede (7 ve 8. gestasyonel haftalar) lateral çıkıntıların uzamasıyla dilin üzerinde yatay konuma çıkarlar. Bu hücre hareketleri muhtemelen birkaç saat içinde meydana gelmektedir (40, 58). III. evrede (9- 10. gestasyonel haftalar) yatay konuma gelen hücreler birbirine yaklaşarak birleşirler, ayrıca nazal septum ve primer damağın posterior parçalarıyla da birleşerek sekonder damağı (foramen insizivum posterioru) oluştururlar (Şekil 4.5). Bu birleşmeler desmozom ve keratin fibriller sayesinde olmaktadır. Bu sırada primer damak da gelişimine devam ederek kemik oluşumu başlar, kesici dişlerin (insisor) dişlerin gömüldüğü premaksillar parça oluşur. Lateral palatin prosesleri maksillar ve damak kemikleriyle birleşerek sert damağın oluşumunu başlatır. Bu çıkıntıların posterior parçaları kemikleşmez ve yumuşak damağı oluşturmak için kaynaşır (49, 65, 66).



Şekil 4.3: İnsanda normal damak ve yumuşak damak yarığının karşılaştırılması (49).

Lateral Palatin
Çıkıntılar

I. Evre

Dil

Lateral Palatin
Çıkıntılar

II. Evre

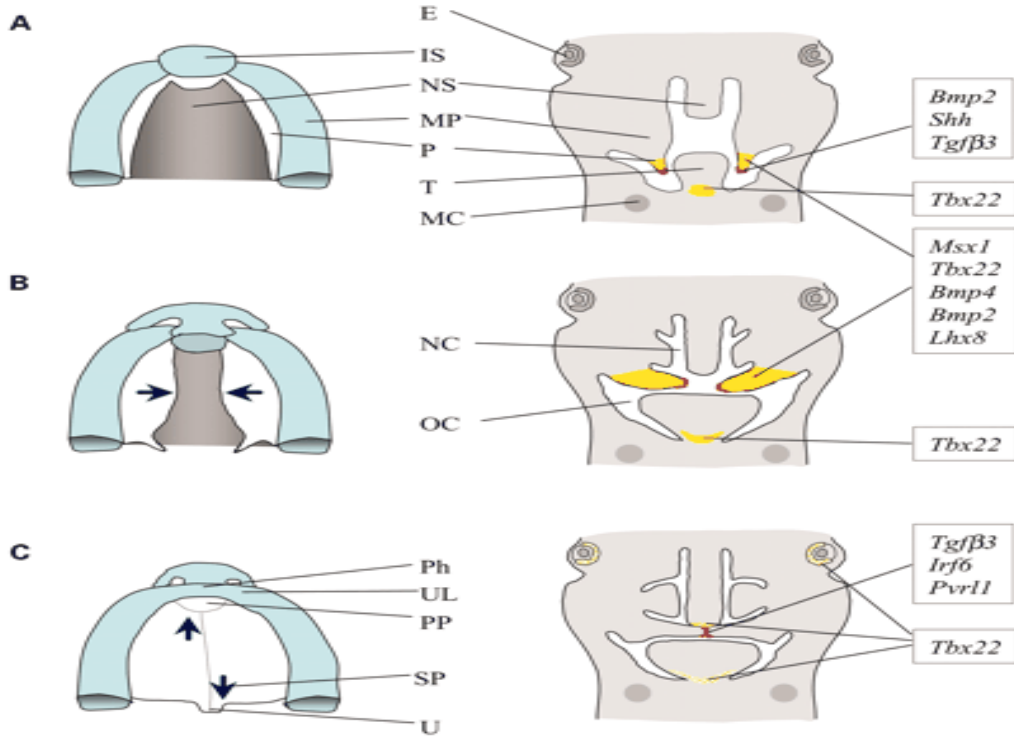
Dil

Lateral Palatin
Çıkıntılar

III. Evre

Dil

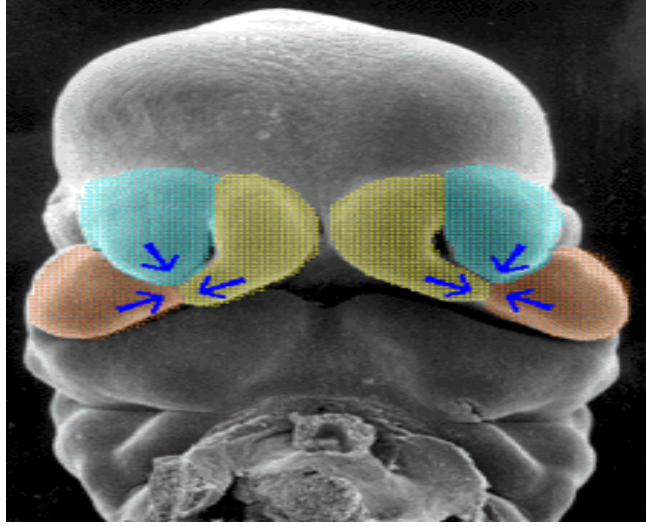
Şekil 4.4: Sekonder Damak Gelişiminin Evreleri (49).



Şekil 4.5: Primer ve sekonder damak gelişimi ve etkin olan genler, A. Damak oluşumunun başlangıcı (E: Göz, NS: Nazal septum, MP: Maksiller prozess, P: Palatal çıkıntılar, T: Dil) B. Maksiller hücre hareketleri (NC: Nazal boşluk, OC: Oral boşluk) C. Primer ve sekonder damak oluşumunun tamamlanması (Ph: Filtrum, UL: Üst dudak, PP: Primer damak, SP: Sekonder damak; U: Uvula) (100).

4.1.2. Dudak Embriyolojik Gelişimi

Dudağın embriyolojik gelişimi damağa kıyasla daha basittir. Alt dudaklar mandibular çıkıntılardan ve yaklaşık 11- 12. haftalarda meydana gelmektedir (69, 100). Üst dudak maksillar çıkıntı tarafından oluşturulur. Maksillar çıkıntılar mediyale göç ederken lateral ve mediyal nazal çıkıntıları da mediyale doğru iter (Şekil 4.6). Nazal çıkıntılar mediyalde birleşerek üst dudak filtrumu ve Cupid yayı, burun ucu ve ön kısmı meydana gelir. Aynı zamanda maksillar çıkıntılarının yardımıyla ve nazal çıkıntılarla birleşmesiyle premaksilla ve primer damak oluşur. Hareketlerine devam eden maksillar çıkıntılar üst dudak ve üst yanak gelişimini sağlar. Tek taraflı dudak yarığı mediyal nazal ve maksillar çıkıntılarının birleşme kusurlarından meydana gelir. Çift taraflı dudak yarığında da iki tarafta nazal çıkıntılar maksillar çıkıntılarla birleşmemektedir (46, 49, 66).



Şekil 4.6: Üst dudağın oluşumunda rol alan hücre hareketleri (Yeşil renkliler lateral nazal çıkıntılar, sarı renkliler mediyal nazal çıkıntılar, turuncu renkliler maksiller çıkıntılar) ([Http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98](http://ise.temple.edu/marino/embryology/Face98), Erişim tarihi 05.05.2009).

4.2. Dudak ve Damak Yarıklarının Sınıflandırılması ve Embriyolojik Temeli

Günümüze kadar birçok sınıflandırma yapılmış olmasına rağmen klasik bir sınıflandırma henüz tanımlanamamıştır. Ancak başka bir sendromla beraber görülüp görülmemesine göre oral yarıkları iki grupta toplayabiliriz:

İzole (Non- Sendromik) Oral Yarıklar: Bireylerde herhangi bir kusur bulunmadan sadece dudak ve/ veya damak yarıkları veya sadece damak yarığının bulunmasıdır.

İzole Olmayan (Sendromik) Oral Yarıklar: Bireylerde başka bir kusur ile ortaya çıkan dudak ve/ veya damak yarıkları veya damak yarıklarıdır.

İster izole olsun ister de sendromik olsun oral yarıklar:

- Primer (Ön) damak yarıkları
- Sekonder (Arka) damak yarıkları
- Hem primer hem de sekonder damak yarıkları
- Tek taraflı yarık dudak
- İki taraflı yarık dudak
- Medyan yarık dudak

şekline görülebilir (65, 66).

Primer Damak Yarıkları: Lateral damak çıkıntılarını oluşturan mezenşim hücrelerinin kendi aralarında ve primer damaktaki mezenşim hücreleri ile tam olarak birleşememesinden meydana gelir.

Sekonder Damak Yarıkları: Lateral damaktaki mezenşim hücrelerinin birbirleriyle ve nazal septumla birleşememesiye meydana gelmektedir (124).

Hem Primer hem de Sekonder Damak Yarıkları: Lateral damak çıkıntılarını oluşturan mezenşim hücrelerinin hem kendi aralarında, hem de primer damak mezenşimi ve nazal septum hücreleri ile birleşememesinden meydana gelirler (Şekil 4.7) (119, 124).

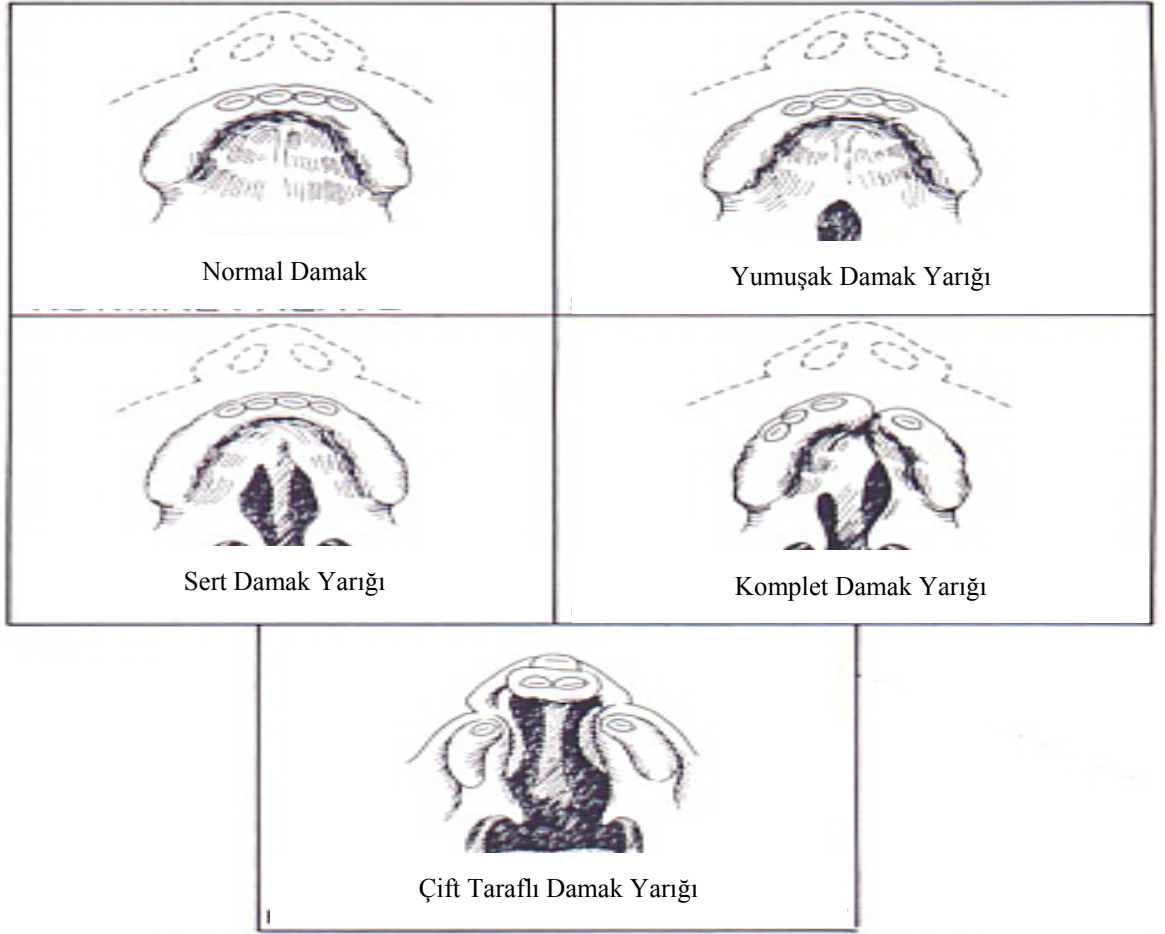
Üst Dudak Yarıkları (Fissio Labialis): Damak durumundan bağımsız olarak (ister sağlam damak ister yarıklı damak) üst dudakta meydana gelen yarıkları kapsar ve 1/1000 insidansında ortaya çıkar. Farklı etnik gruplarda bu oran değişebilir. Erkeklerde oluşma oranı daha yüksektir (65, 66, 119, 124).

Tek taraflı Yarık Dudak (Fissio Labialis unilateralis): Maksillar çıkıntının birleşen mediyal nazal çıkıntılar ile tam birleşememesinden kaynaklanır. Bu kusur mezenşim hücrelerin çoğalması ve üstündeki epitel dokunun düzgün hale gelememesiyle oluşur. Bazı durumlarda Simonart' ın Bandı adı verilen doku köprüsü dudak parçalarını birleştirir (65).

İki Taraflı Yarık Dudak (Fissio Labialis bileteralis): Maksillar çıkıntılardaki mezenşim hücrelerinin birleşip bunların kaynaşmış olan medial nazal çıkıntılar ile birleşememesinden kaynaklanır. İki taraftaki sorun simetrik olmayabilir, yarığın boyutu ve şiddeti farklı olabilir. Bazı durumlarda intermaksillar segment serbest asılı kalır ve dudak birleşmesi ve ağız kapanmasında sorunlara yol açabilir (66).

Medyan Yarık Dudak (Fissio Labialis mediana): Az görülen bir defektir. Mediyen nazal çıkıntılarının tam yada kısmi birleşmemesinden kaynaklanır ve intermaksillar segmentin oluşmamasına neden olabilir. Sendromik formlarda Mohr sendromunun bir özelliği olarak görülür ve otozomal çekinik olarak kalıtıldığı bildirilmiştir (65, 119).

Alt Dudak Yarıkları : Çok nadir görülür ve mandibular çıkıntılardaki mezenşim hücrelerinin birleşmemesi ile meydana gelir (65, 66).



Şekil 4.7: Primer ve sekonder damak yarıkları (119).

4.3. Dudak ve Damak Yarıklarının Etyolojisi ve Epidemiyolojisi

4.3.1. Dudak ve Damak Yarıklarının Etyolojisi

Oral yarıkların oluşumuyla ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen etyolojisi ve patojenitesi hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Ancak damak/dudak yarıklarının genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği bilinmektedir. Tek yumurta ikizlerinde yarık damak- dudak oluşumunun %100 uyumlu olmaması (diskordans) genetik faktörlerin tek başına etkili olmadığını göstermektedir (69, 119). Gebelik döneminde beslenme alışkanlığı, anti-epileptik ilaç, içki ve sigara kullanımı; folik asit ve multivitamin eksiklikleri, viral enfeksiyonlar gibi genetik olmayan çevresel faktörlerin etkisi araştırılmış olmasına rağmen sorunun genetik temeline dayanan çalışmalar ön plana çıkmıştır (124, 125). İzole damak yarıklı dominant kalıtım tipi gösteren aileler olmasına rağmen yarık damaklı vakaların çoğu Mendelyen kalıtım tipi (tek gen hastalıkları) göstermez (69, 124). Yapılan bir çalışmada bir çocukta yarık damak varsa diğer çocukta oluşma sıklığı %2, ebeveynlerden birinde varsa %6, hem ebeveynlerden biri hem de bir çocukta varsa oran %15 olarak bildirmiştir (25).

4.3.2. Dudak Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi

Damak dudak yarıklarının değişik ırklarda insidansları farklıdır ve ortalama olarak 1/700 olarak bildirilmiştir (69). Afrikalı ve Afrika kökenlilerde oran daha düşük, Amerikalı Hintliler, Japonlar ve Çinlilerde ise daha fazladır (67). İzole DDY beyaz ırkta 0,7- 1/ 1000, Çinlilerde 1,7/ 1000, Kore' de 1,87/ 1000, Japonlarda 2,1/ 1000, Türkiye'de 0,95/ 1000 olarak belirtilmiştir (51, 112, 115). Yarık dudak vakasının sıklığı ortalama 1/300, sadece yarık damak ortalama 1/ 1500 ve her iki vakanın birarada bulunma sıklığı da ortalama 1/ 2500' tür. Finlandiya' da yarık damak sıklığı 1/1000, kuzey-doğu Fransa'da 0,41/1000, İtalya'da 0,34/1000 olarak görülmüştür. Oranların bu kadar değişik olmasının nedenleri arasında coğrafi, etnik köken ve kalıtım kalıplarının farklılıkları olabileceği gibi oral yarığın tipine göre de

farklılık görülmektedir. Yarık dudaklı hastaların %50 sinde yarık damak bulunmaktadır (69, 100, 125).

4.4. Nonsendromik Dudak ve Damak Yarıklarında Çevrenin ve Kalıtımın Rolü

4.4.1. Çevrenin Rolü

DDY oluşumunda birçok teratojen etken ile ilgili çalışma yapılmıştır (Tablo 4.2). Bu faktörler arasında en fazla çalışılanlar gebelik sırasında maternal sigara ve alkol kullanımı, vitamin ve özellikle folik asit eksikliği, viral enfeksiyonlar ve bazı ilaçlardır (99). Bu faktörlere annenin gebeliği sırasında maruz kalma sıklığı, maruz kalınan faktörün dozajı ve gebelik süresi meydana gelebilecek fetal kusurların şiddetini değiştirebilmektedir.

Alkol: Alkolün fetus üzerindeki etkisi “fetal alkol sendromu” olarak bilinir (15). Maternal alkol kullanımının fetus üzerindeki etkileri arasında zeka geriliği, kraniyofasial sorunlar, kalp ve ürogenital sistem bozuklukları sayılabilir (46).

Alkol kullanan gebelerde alkol prenatal engeli aşım gelişmekte olan fetal doku ve organlara zarar verebilir. Bu organlar özellikle merkezi sinir sistemi organlarıdır (37). Alkolden etkilenen fetal yapıların ortak özelliği nöral krest hücrelerinden köken almalarıdır. Bugüne kadar alkol ile DDY arasında pozitif ilişki bulunan çalışmalar olmasına rağmen (6, 57, 68), tersine herhangi bir ilişkinin bulunmadığı çalışmalarda bildirilmiştir (91).

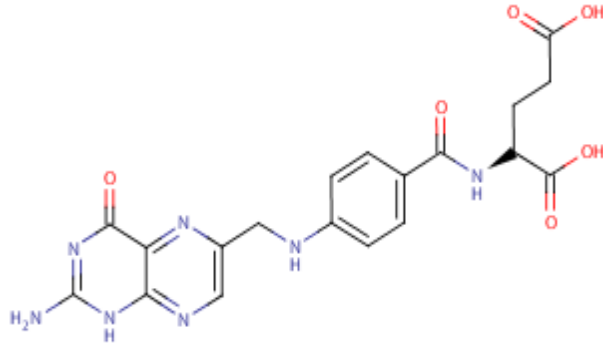
Sigara : Sigara içinde tanımlanan kimyasalların kanser ve birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir. DDY oluşumunda ise maternal sigara kullanımı en fazla çalışılmış olan teratojenik faktördür (122). Sigara kullanımının etkileri farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (11, 69, 100). Sigranın DDY oluşumunu etkilediğini bildiren çalışmalar olduğu gibi (24, 55, 125, 126) etkilemediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (54, 60). Yapılan bir araştırmada, sigara kullanımının DDY oluşumuna etkisi %4, çift taraflı DDY oluşumuna ise etkisinin %12 olduğu bildirilmiştir (41). Sigara içen gebelerdeki başlıca sorun kan karboksihemoglobin yükselmesine bağlı olarak fetüste hipoksinin görülmesidir. Bu vakalarda prematüre doğumlar olabileceği gibi düşük ağırlıklı doğumların da görülebileceği belirtilmiştir

(15). Ayrıca, yine gebeliklerinde sigara kullanan bireylerin çocuklarında serum alfafeto proteinlerde yükselme ve gelişim geriliği sorunları da bildirilmiştir (38). Tiryaki olan gebelerin genelde gebelikleri ilk trimesterde düşük ile sonlandığı için tiryaki gebeler ile yapılan çalışmalar sayısal olarak yeterli değildir.

Folik Asit Kullanımı: Folik asit (B₉ Vitamini) serum ve biyolojik sıvılarda bulunabilen ve hücrede tek karbonlu grupların taşınmasında rol oynayan moleküldür. Folik asit karaciğerde dihidrofolat ve tetrahidrofolata indirgenip hücrelerde metabolizmaya dahil olur. Biyolojik olarak aktif olan formu folik asidin indirgenmiş şeklidir (29). Temel görevleri histidin katabolizması, serinden glisin eldesi, nükleotid biosentezi, kan hücresi yapımı, S- adenzil- methionin sentezi, homosisteinin methionine remetilasyonu, DNA' nın, nörotransmitterlerin ve fosfolipitlerin metilasyonu, hücre bölünmesi ve oluşan hücrelerin sağkalımları, kalp hastalıkları sayılabilir (29, 48, 77). Pürin sentezindeki kilit rolünden dolayı folik asitin fonksiyonunu inhibe edici ilaçlar anti- kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. Aynı şekilde antibiyotik olarak da folat inhibe edici ilaçlar kullanılabilir. B₉ sentezi insanların aksine bakterilerde yapılabilmektedir ve bu sentezin durdurulması pürin metabolizmasını engelleyeceğinden bakterilerinde üremesine engel olacaktır. Folat eksikliği veya antifolat ilaç kullanımı yararlı etkileri görülen intestinal bakterilerin de üremesine olumsuz etki yapmaktadır.

Folat, metabolik etkisini siyanokobalamin (B₁₂) yardımıyla gösterir. Bu nedenle B₁₂ eksikliği de folat eksikliği ile benzer bulgular vermektedir. Bireylerde folat ve B₁₂ eksikliğinde, kan hücrelerinde gelişim bozukluğuna bağlı patolojiler görülmektedir (29).

İnsanlarda folat ihtiyacı 50 mikrogram civarındadır. Erişkinlerde 1 mg' a kadar günlük takviye normal karşılanmaktadır. Bu oran hamile ve süt veren annelerde 800 mikrogram olarak açıklanmıştır (4). Folat deposu ise yaklaşık 5 mg kadardır (29).



Şekil 4.8: Folatın kimyasal yapısı (<http://www.bmrw.wisc.edu/metabolomics/standards/Folate/lit/3787.png>’ den modifiye edilerek, Erişim tarihi:09.07.09)

Maternal folik asit eksikliği fetüste birçok sendromun oluşmasının teratojenik nedenlerinden biridir. Bu sendromlar arasında nöral tüp defektleri, Down sendromu, gelişim geriliği, hipodonti gibi kusurları sayabiliriz. Son yıllarda gebelerde folat eksikliği ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve özellikle NTD oluşumu ile ilgili önemli bağlantılar bulunmuştur (111). Bunu izleyen çalışmalarda maternal folat eksikliğinin giderilmesi ile NTD oluşumunun azaltılabileceği belirtilmiştir (79, 111).

Maternal folat eksikliğinin, sadece NTD ile değil, fetüste kol ve bacak anomalileri, üriner sistem anomalileri ve izole DDY ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (33, 123). Bu yüzden gebelerin hamile kalmaya karar verdikten sonra ve hamileliklerinin birinci trimesterinde günlük 800 mikrograma kadar folik asit takviyesi almalarının, fetüste olası anomali oluşumunu azaltılabileceği bildirilmiştir (33).

Folik asit metabolizmasında günümüze kadar bazı genlerdeki polimorfizmler ile çeşitli folik asit kükenli kusurlar ve hastalıklarla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Folik asit metabolizmasındaki önemli genler ve alleleri metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR C677T ve A1298C), methionin sentetaz (MTR A2756G), methionin sentetaz redüktaz (MTRR A66G), sistathionin sentetaz (CBS ekzon8’ de 68 bç lik insersiyon) ve timidilat sentetaz dır. Bu genlerdeki kusurlar bireylerde folat metabolizmasında bozukluklara yol açabileceğinden önemli roller üstlenmektedirler (88).

Folik asit ve kanser arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır. Folik asit metabolitlerinin DNA onarımında, yenilenmesinde ve fonksiyonunda önemli görevleri

bulunmaktadır (124). Bazı araştırmacılar bireyin doğru zamanda yeterli düzeyde folik asit kullanmasının kansere karşı direnç kazandıracağını , ancak risk taşıyan bazı bireylerde folik asit kullanımının tersine tümör oluşumunu tetikleyebileceğini bildirmişlerdir (52, 82).

İzole DDY ile özellikle MTHFR genotiplemesini içeren çalışmalar ön plana çıkmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda DDY oluşumu üzerinde folik asit eksikliğinin genotipten bağımsız önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir (56, 93, 108, 109).

İlaçlar: Özellikle antikonvülzan ilaç kullanan annelerin çocuklarında konjenital anomaliler oldukça sık görölmektedir. Yapılan çalışmalarla gebeliğin birinci trimesterinde fenitoin, karbamazepin gibi folik asit antogonisti olan ilaçların kullanımının DDY' li çocuk doğurma riskini artırdığını belirtilmiştir (73).

Steroid Kullanımı: Steroid kullanımı ile DDY arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılmış fazla çalışma yoktur. Ancak yapılan bazı çalışmalarda steroid takviyesi yapılan hayvanlarda DDY görülmesi gebelikte steroid kullanımının risk faktörleri arasında bulunmasına neden olmuştur (73).

4.4.2. Kalıtımın ve Genlerin DDY Oluşumundaki Rolü

İzole DDY oluşumunda genetik faktörlerin rollerine ilişkin çalışmaların çoğu hayvan modellerinde aday genlerin yapıları ve ekspresyon düzeylerinin araştırılması üzerine olmuştur. Ayrıca ilişki görölen aday genler ile DDY' li bireylerdeki bu gene ait mutasyonlarının saptanması da çalışmanın devamı niteliğindedir. DDY' nin çok etkenli bir sendrom olduğu bilinmektedir ve gerek etkin genetik faktörler gerekse teratojenlerin genetik yapı üzerindeki etkisi halen çalışılmaktadır. Aile hikayesi bulunan bireylerde yapılan bağlantı çalışmalarıyla da yeni bölgeler ile DDY arasındaki ilişkiler saptanmaya çalışılmaktadır. Bugüne kadar yapılan genetik çalışmalarda ön plana çıkan aday genler aşağıda verilmiştir:

MTHFR : Konjenital anomaliler ve nöral tüp defektleri ile belkide en fazla ilişkisi olan gen MTHFR dir. 1p36.3' te lokalize ve 11 ekzondan oluşan MTHFR geni 4,2 kb'dır. Genin ürünü olan enzim 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata katalizlenmesini sağlar ve methionin sentetaz ile homosisteinin metionine dönüşmesini sağlar (93, 115).

3 izotipi bulunur ve 677C-T izotipi en sık görülenidir (93). 677. nükleotidindeki nokta mutasyonu sitozinin timinle yer değiştirmesini sağlar ve bu değişim enzimde alanin amino asidi ile valinin değişimine neden olur. Yeni oluşan protein 37⁰C ve üstündeki sıcaklıklarda düşük aktivite gösterir (93). Prescott ve ark. 92 NS- DDY kardeş çiftlerinde yaptığı çalışmada MTHFR bu varyantının bulunduğu bölgenin DDY ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (110). Bir başka çalışmada 38 İtalyan ailede MTHFR gen bölgesi DDY oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (115). Arruda ve ark. (3) DDY'li olgularda TT genotipinin 3 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Farklı toplumlarda MTHFR TT alleli ile DDY arasında pozitif ilişki bulunmasına rağmen (3, 62, 115, 116) bazı çalışmalarda bu ilişki bulunamamıştır (12, 17).

Aynı gende ikinci en sık görülen polimorfizm 1298A-C dir. 1298. nükleotidindeki adenin- sitozin değişimi enzimde glutamin- alanin değişimine neden olur. Ancak bu polimorfizmde seyrek allel varyantı olan CC genotipinin, enzim üzerindeki etkisi çok fazla değildir ve bu yüzden bu polimorfizmi içine alan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada (97) araştırmacılar bu polimorfizm ile DDY arasında herhangi bir bağlantı saptayamamışlardır. Ancak A1298C ve C677T alleleri için bileşik heterozigot olan birey, C677T homozigotlarında olduğu gibi yüksek serum homosistein ve düşük serum folat seviyeleri göstermişlerdir (115).

3. prototip olan T1059C alleli için çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu varyantın A1298C ile geçiş göstermesi bu varyantın önemini belirtmektedir (93, 115).

BCL3 geni: 19. Kromozomda bulunmaktadır ve bu gen ile yapılan çalışmalarda BCL3 geninin NS-DDY ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

TGFA: TGFA C3 allelinin DDY oluşumu ile bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar, TGFA C3 allelinin risk faktörleri arasına alınması gerektiğini göstermiştir. (30, 47, 95)

TGFB3: DDY ile yapılan bağlantı analizlerinde TGFB3 gen lokusu ile DDY arasında anlamlı bir ilişki ortaya çıkmasından sonra bu gen ile ilgili çalışmalar hız

kazanmıştır (59). Viera (118), bu gen ile yarık damak, Jugessur (47) ise bu gen ile DDY arasında kuvvetli ilişki bulmuştur. Kim ve ark. (42) ise bu gendeki *SfaN1* polimorfizmi ile DDY arasındaki ilişkiyi Kore' li büyük bir populasyon üzerinde göstermiştir.

IRF6 : IRF6 viral enfeksiyondan sonra interferon alfa ve ve betanın ekspresyonunu regüle eden 9 transkripsiyon faktöründen biridir. DDY ile son yıllarda yapılan en etkili çalışmalar DDY ile IRF6 varyasyonları arasındaki ilişkinin saptanmasıdır (84, 131). IRF6 sadece izole DDY' nin oluşmasından değil aynı zamanda sendromik DDY' nin de oluşmasında etkin olan faktörlerden biridir (16). IRF6- DDY arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla farklı populasyonları içine alan birçok çalışma yapılmış ve IRF6' nın sadece DDY' nin değil, dış eksikliğinin de sorumlu genlerinden biri olduğu gösterilmiştir (120).

FGF : FGF genlerinin izole DDY oluşumunda en fazla %3' lük etkisi olduğu bildirilmiştir (78). Son yıllarda FGFR ile ilgili çalışmalar da önem kazanmaya başlamıştır.

PVRL1: PVRL1 geni nektin adı verilen ve hücre adezyonunda görev alan integrin membran proteini kodlar. Aynı zamanda nektin1 proteini alfa- herpes virüsleri için hücre yüzey reseptörüdür. Bugüne kadar 3 farklı CLPED1 vakasına neden olan PVRL1 gen mutasyonu tanımlanmıştır (85, 104). Başka bir çalışmada PVRL1 genindeki W185X mutasyonu kuzey Venezuelalı populasyonda oldukça yüksek çıkmış ve bu genin DDY için risk teşkil edebileceği bildirilmiştir (98). Yapılan benzer çalışma da İtalyan populasyonunda izole DDY için risk faktörü olmadığı belirtilmiştir (84), Bu gen üzerinde bulunan farklı bir mutasyonun da DDY nedeni olabileceği belirtilmiştir (86).

SUMO1 Geni: Sumo ve ubiquitin proteinleri birçok hücrel proteinini modifiye ederek onların metabolizmaları ve fonksiyonlarına etki ederler. Ubiquitin, proteinlerin yıkılmasını sağlarken sumo proteinleri etki ettikleri proteinlerin nüklear transport, transkripsiyon regülasyonu, apoptosis gibi hücrel fonksiyonlarını düzenler (86). Yapılan çalışmalarla SUMO genlerinin farelerde ED 13,5' ta üst dudak, primer ve sekonder damak dokularında ekspresse edilmesi SUMO1' in DDY oluşumundaki önemini artırmıştır (2). Sonraki çalışmalarda ise SUMO1' in MSX1 genini regüle ettiği bildirilmiştir (35).

4.5. DDY Oluşumunda MSX1 Geninin Rolü

4.5.1. MSX1 Geni

Kraniyofasiyal gelişimi regüle eden gen ailelerinin başında MSX gen ailesi gelmektedir. İlk kez farelerden klonlanmışlardır ve *Drosophila* segment homeobox genleri ile (*msh*) gösterdikleri homolojiden dolayı *msx* adını almışlardır. Daha sonraları deniz yıldızı (28), kurbağa (103), balık (1) ve insanlarda (72) izole edilmiştir. *Msx* gen ailesi MSX1, MSX2 ve MSX3 olmak tanımlanmış 3 genden meydana gelmiştir (27). MSX3 geni dorsal nöral tüpte, MSX2 ve MSX1 ise epitel-mezenşim etkileşiminin olduğu her dokuda, özellikle de kraniyofasiyal gelişim gösteren bölgelerde ifade edilir (26, 96).

Msx ailesinin protein üyelerinin başlıca sinir sistemi gelişimi, kraniyofasiyal gelişim, odontogenez, tümör büyüme inhibisyonu ve kol- bacak gelişimlerinde önemli modüle edici görevleri vardır (8, 9, 18). *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda transkripsiyonal repressor özellikleri bildirilmiştir (17, 19). Protein- protein etkileşimleri, *Msx* homeodomain bölgesinin genel transkripsiyon faktörü olan Tata' ya Bağlanan Protein (TBP)' e bağlanmasıyla gerçekleşir (17). Ayrıca *Dlx2*, *Dlx5*, *Lhx* ve *Pax3* gibi diğer homeodomain proteinlere de bağlanarak transkripsiyonu regüle etme özellikleri de vardır (9, 10, 129). *Msx1* proteininin *Msx2*' ye göre protein affinitesi daha yüksekken, DNA' ya olan affinitesi daha düşüktür. O yüzden *Msx1* proteininin modüle edici etkisini diğer homeodomain proteinler üzerinden sürdürdüğü belirtilmiştir (42).

4.5.2. MSX1 Geninin Yapısı

Msx1 geni 4p16.2 bölgesine lokalize 4272 bp uzunluğunda, 604 ve 1110 bp uzunluğunda 2 ekzon, 2332 bp uzunluğunda 1 introndan oluşan yapıya sahiptir. 1713 bp den oluşan iki primer transcript oluşturur (Şekil 4.8) (74).

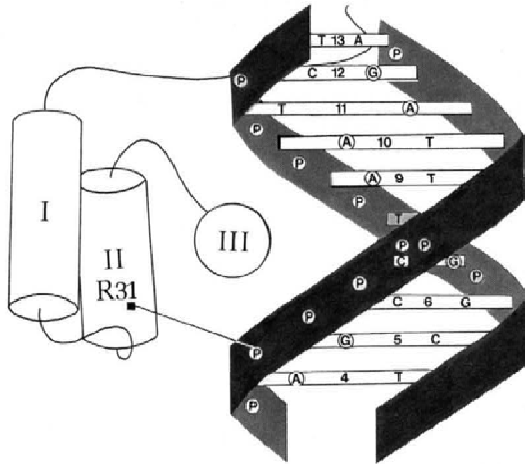
QuickTime™ and a decompressor are needed to see this picture.



Şekil 4.9: 4p16.2 kromozom bölgesinde MSX1 geninin lokalizasyonu (<http://www.genecards.org/pics/loc/GC04P004979.MSX1.png>' den midifiye edilerek, Erişim tarihi:09.08.2009)

4.5.3. MSX1 Proteini

MSX1 geninin ürünü olan proteinler 303 ve 297 amino asit içerirler. N- terminal domaini prolin tekrarları içerir ki bu da proteinin daha stabil yapısının olmasını sağlayarak DNA' nın minor oluşuna daha sıkı tutunmasını sağlar (42, 106). Ekzon 2 bölgesi, homeodomain bölgesini kodlar ve bu bölge proteinin diğer proteinlerle etkileşmesini sağlar (Şekil 4.9) (74).



Şekil 4.10: MSX1 proteinin şematik yapısı (117).

4.5.4. MSX1 Gen Expresyonu:

MSX1 gen expresyonunun kraniofasiyal gelişim bölgesinde, odontoblast ve ameloblast hücrelerinin proliferasyon evrelerinde, kafatası kemikleri ve meninks oluşumunu sağlayan nöral krest kökenli hücrelerde, damakta yapısını meydana getirecek olan hücrelerde yüksek olduğu gösterilmiştir (113, 130). Gen

regülasyonunun ise farklı mekanizmalarla olduğu gösterilmiştir. Bu regülasyon mekanizmaları retinoid, büyüme faktörü, diğer homeodomain proteinlerle etkileşimler ve antisens düzeyinde olduğu bildirilmiştir (14, 20, 71, 94).

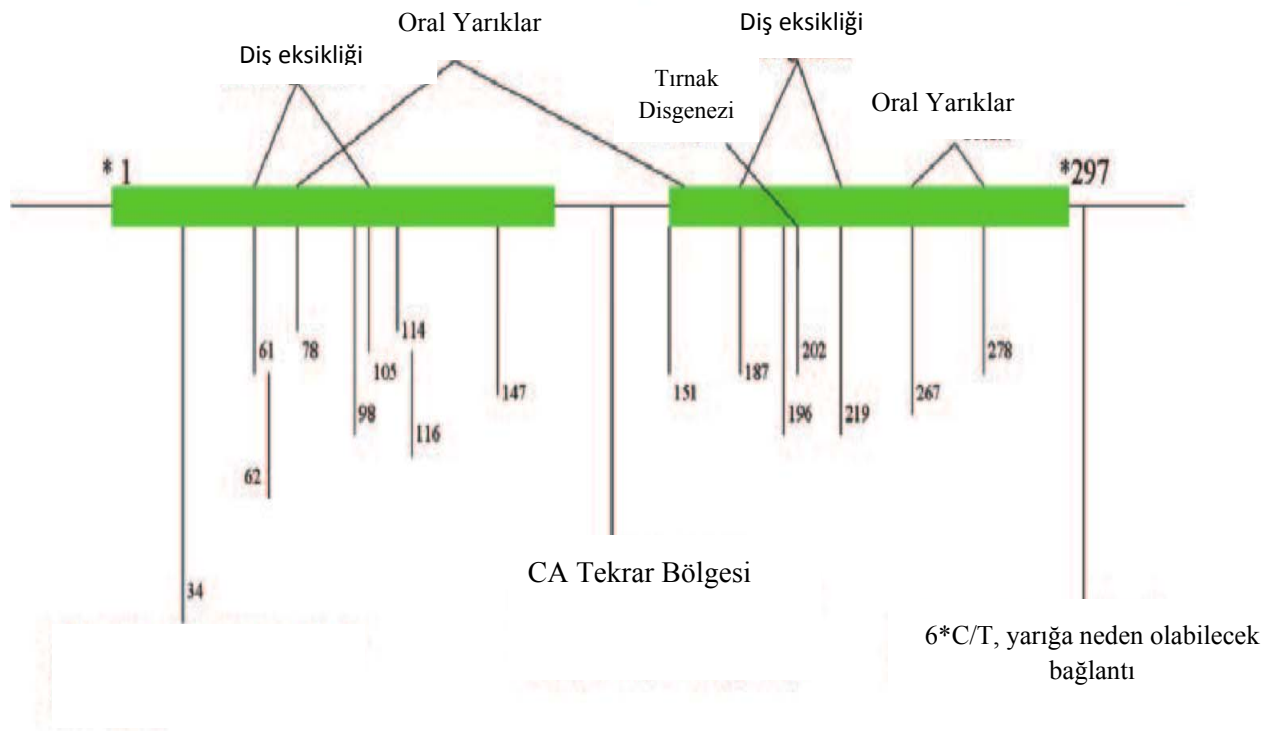
4.5.5. MSX1 Geni ve İzole DDY

İzole DDY ile MSX1 gen ilişkisini saptamaya yönelik çalışmalar ilk olarak Lidral ve ark. tarafından başlatılmıştır (53). Sonraki çalışmalar da MSX1 geni ve izole DDY oluşumu ile intron bölgesindeki CA tekrarlarının varlığına göre allelik varyasyon analizleri yapılmış ve aralarında ilişkiler bulunmuştur. Hamilelik sırasında sigara ve alkol kullanımı ile MSX1 gen polimorfizmine yönelik çalışmada pozitif ilişkiler bulunmuştur (80). Ayrıca bu çalışmalara ek olarak MSX1 mutasyonlarının diş kaybı (114, 117), izole yarı damak ve izole DDY (44) ile ilişkilendirilmesinden sonra gerek izole formlarda gerekse sendromik formlarda DDY oluşumunda MSX1' in önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir. Sadece insanlar üzerinde değil fareler üzerine yapılan knock-out çalışmalarda MSX1 -/- lerde şiddetli oral yarıklar gözlenmiştir (100). Jezewski (36) Filipin popülasyonunda, Suzuki (105) Vietnam popülasyonunda ve Vieira (121) Filipin popülasyonunda yaptıkları çalışmalarda MSX1 geninde missens mutasyonların varlığını saptamışlar ve genin önemini vurgulamışlardır (Tablo 3). Suzuki (105) ve Vieira (121) tarafından izole DDY oluşumuna neden olarak gösterilen P147Q polimorfizmi Tongkobetch (107) tarafından yapılan çalışmada Taiwan popülasyonunda etkili olmadığı saptanmıştır.

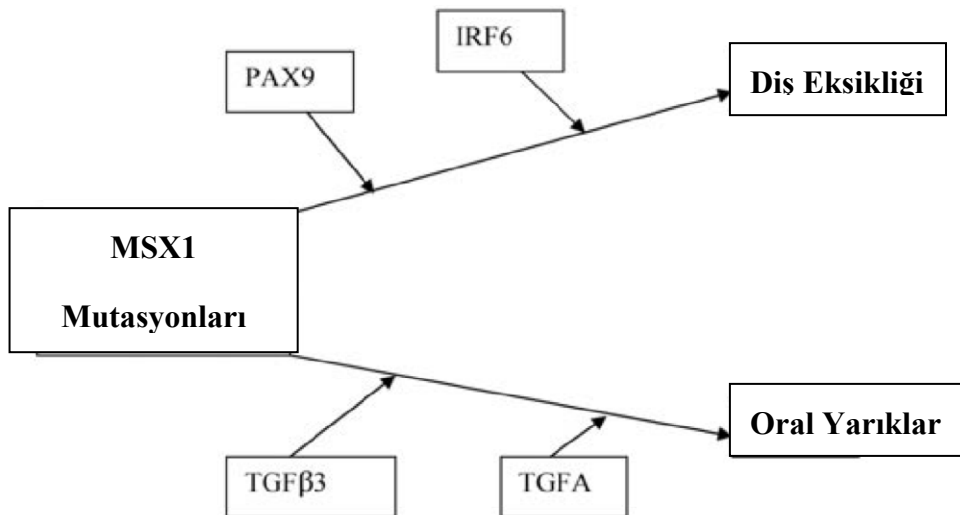
MSX1 geninin kraniyofasiyal gelişimindeki görevi diğer homeobox proteinlerini regüle etmektir. Bu regülasyon DNA düzeyinde olabileceği gibi protein düzeyinde de olabilir. Günümüzde halen MSX1 geninin rolü net olarak anlaşılmasa da izole DDY oluşumunda tek başına değil, diğer genler ile etkileşerek etki gösterdiği düşünülmektedir (121) (Sekil 4.10). İnsanlarda diş eksikliğinde, MSX1 geninin, bir homeobox geni olan Pax9 ve Van Der Woude sendromunun etmeni olarak bilinen IRF6 genleri ile beraber rol oynadığı bildirilmiştir (30, 72). Oral yarıklar düşünüldüğünde de MSX1 geninin TGF ailesinin üyeleri ile etkileşime girerek etkili olduğu gözlenmiştir (23, 30, 47, 53). Ancak hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu tetikleme fonksiyonları halen kesinlik kazanmamıştır.

Amino Asit Değişimi	Nükleotid Değişimi	Mutasyon Tipi	Fenotip	Kaynaklar
G16D	G47A	missens	Bilinen etkisi yok	36, 103
G21	62dupG	Çerçeve Kayması	O.D. Oligodonti	41
A30A	C90A	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	36
A34G	C101G	Missens	Bilinen etkisi yok	36
L53L	G159C	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	89
M61L	T182A	Missens	O.D. Oligodonti	43
E78V	A233T	Missens	İzole DDY	36
V80V	G240A	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	36
G91D	G272A	Missens	Izole DDY	89
G98E	G293A	Missens	Izole DDY	89
S105X	C314A	Nonsense	O.D. DDY/ oligodonti	96
G110G	C330T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	36
V114G	T341G	Missens	Izole DDY	36
G116E	G347A	Missens	Izole DDY	36
L118L	C354T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	36
P147Q	C440A	Missens	Bilinen etkisi yok	89, 103
R151S	G453T	Missens	Izole DDY	36
G187X	C559T	Nonsense	O.D. Oligodonti	43
R196P	G587C	Missens	O.D. Oligodonti	99
S202X	C605A	Nonsense	Witkop Sendromu	103
A219T	C655A	Missens	O.R. Oligodonti	36, 99, 43
G267C	G799T	Missens	Izole DDY	51
A275A	C825T	Sessiz mutasyon	Bilinen etkisi yok	36
P278S	C832T	missens	Izole DDY	99

Tablo 4.3: MSX1 genindeki önemli mutasyonlar (O.D: otozomal dominant, O.S: otozomal resesif) (117).



(<http://flipper.diff.org/app/items/info/1313>' den modifiye edilerek, Erişim tarihi: 09.08.2009)



Şekil 4.11: MSX1 mutasyonlarının etkileri ((<http://flipper.diff.org/app/items/info/1313>' den modifiye edilerek, Erişim tarihi: 09.08.2009)

4.6. DDY Oluşumunda Çevresel Faktörlerin Genler Üzerine Etkisi

Organizmalarda, genlerin regülasyonunda iç faktörlerin etkili olduğu kadar çevresel faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. Ancak günümüze kadar belirlenen birçok hastalık da dahil çevresel faktörlerin etkisi tam olarak bilinmemektedir. DDY oluşumunda çevre- genotip etkileşimiyle ilgili az çalışma olsa da, etyolojisi ile ilgili umut verici sonuçlar çıkmaktadır (Tablo 4.4).

Gen/ Çevre	Literatür
TGFA/ Sigara	6, 59, 80, 90
TGFA/ Alkol	59
TGFA/ Vitamin	90, 93
MSX1/ Sigara	59, 80, 116
MSX1/ Alkol	59, 80
TGFB3/ Sigara	59, 80
TGFB3/ Alkol	59, 80
RARA/ Sigara	59
MTHFR/ Vitamin	62, 93
P450/ Sigara	116
GST/ Sigara	116
HPX1/ Sigara	116

Tablo 4.4: Çevresel Faktörlerin DDY Oluşumunda Genler Üzerine Etkisi

4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kry Mullis tarafından 1988’de geliştirilmiş olan polimeraz zincir reaksiyonu, bir DNA dizisinin tamamen *in vitro* koşullarda oluşturulan kimyasal reaksiyonlar ile milyonlarca miktarlarda çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlar.

PZR analizindeki 3 ana basamaklar şunlardır:

1- Denatürasyon: Çift iplikli kalıp DNA’ya ait baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları yüksek ısıda (94- 95°C) etkileşimlerini kaybederek denature olurlar ve tamamlayıcı iplikler birbirinden ayrılır.

2- Eşleşme (Annealing): 18- 24 bp uzunluğundaki istenilen DNA bölgesine spesifik olan primerler, çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgü dizileri tanıyarak uygun sıcaklıkta hidrojen bağları ile bağlanırlar ve replikasyonun başlatılabilmesi için gerekli serbest 3'-OH grubunu oluştururlar.

3- Uzama (Extensiyon): PZR'nun üçüncü basamağı olan primerlerin uzatılması aşamasında sıcaklık 70- 72°C'de kalır. Bu sıcaklık DNA polimeraz enzimi aracılığı ile yeni DNA ipliklerinin sentezlenmesi için en uygun sıcaklıktır.

Bu üç basamağın bitiminde bir döngü tamamlanır; 35- 40 döngü sonunda milyonlarca kopya DNA molekülü üretilmiş olur (81).

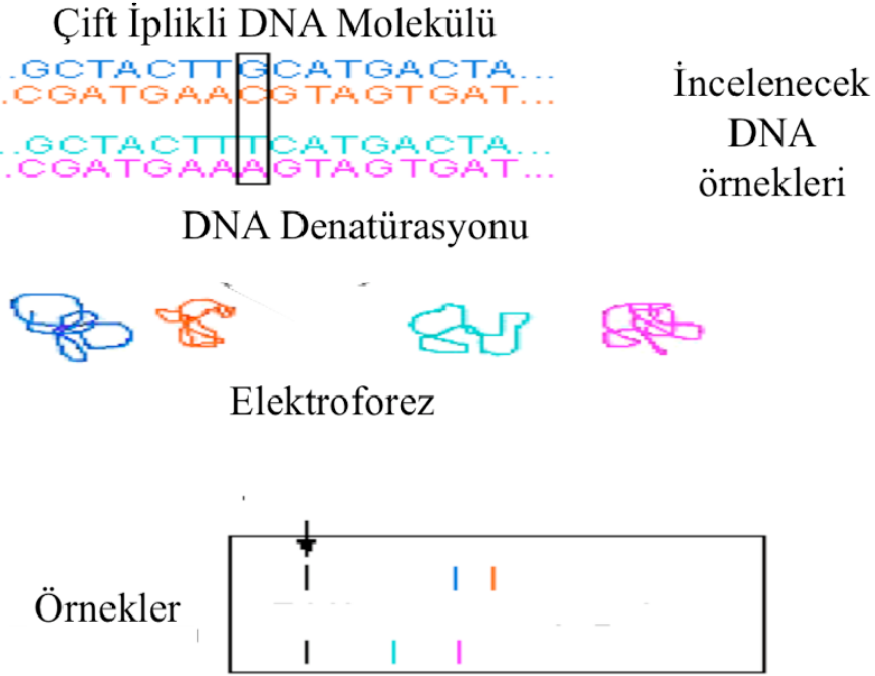
4.8. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçalarının ayrılması ve uzunluklarının tanımlanması için standart bir metot olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. DNA molekülleri fosfat grubu taşıdıkları için eksi (-) yüklüdür ve anoda doğru (+kutba) hareket eder. Bu hareket DNA'nın yapısına ve uzunluğuna bağlıdır. Jel boyunca kısa DNA parçaları daha hızlı yol alırken uzunluk arttıkça DNA'nın hızı azalır. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresans boya olan etidyum bromür ile boyanması ve jelin mor ötesi (UV) ışık altında direkt olarak incelenmesi ile saptanabilir. Bilinen büyüklükteki bir belirteç (marker) DNA kullanılarak çalışılan DNA'nın moleküler büyüklüğü kolayca saptanabilir. Agaroz jel boyunca DNA parçalarının elektroforetik göç (migrasyon) hızları temel olarak dört parametreye bağlıdır. Bunlar; DNA'nın moleküler büyüklüğü, agaroz konsantrasyonu, DNA'nın konformasyonu ve uygulanan voltajdır (81).

4.9. SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)

DNA da meydana gelen mutasyonların belirlenmesinde temel olarak uygulanan metodlardan biri SSCP' dir. Bu metodun uygulama kolaylığı, etkinliği ve maliyeti en önemli avantajlarından. SSCP tekniğinde, yüksek sıcaklık (95°C) kullanılarak DNA'nın çift zincirli yapıdan tek zincirli yapıya denatürasyonu sağlanır ve buzdaki bekletilerek tekrar çift zincirli yapısına renatürasyonu engellenir. Tek bir baz değişiminin neden olduğu konformasyonel değişim, denatüran olmayan poliakrilamid

jelde tek zincirli DNA' nın elektroforetik göç hızını etkiler ve varyasyonun olduğu iplik diğer ipliklerden farklı bant profili gösterir (117).



Şekil 4.12: SSCP metodunun şematize edilmiş şekli (<http://universe-review.ca/I11-50-maxam-gilbert.jpg>' den modifiye edilerek, erişim Tarihi 03.06.2009).

4.10. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizinde ilgili DNA molekülünü oluşturan ve birbirleriyle fosfo di-ester bağı ile bağlanan nükleotidlerin tam dizisi tayin edilir.

Moleküler biyolojide kullanılan iki klasik DNA dizi analizi yöntemi vardır. Maxam ve Gilbert'in kimyasal yönteminde DNA'nın belirli dizilerden kırılarak temel dizileme işlemi gerçekleştirilirken (Şekil 5.3) Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği enzimatik yöntem daha sıklıkla kullanılır (Şekil 5.4) (63, 81, 83). Bu yöntemde, belirli bir bazda sonlanan DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA molekülü için dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri bir nükleotit uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçalarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde,

dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmakta ve jeldeki bantlardan DNA parçasının dizisi okunabilmektedir (63, 81).

Enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'in DNA dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz I ile kataliz edilir. Yöntemde, modifiye dideoksinükleotit trifosfatlar kullanılarak bir dizi DNA parçaları elde edilir. Dideoksinükleotit trifosfatlarda 3'-OH grubu bulunmaz. Bu durumda, nükleotid polimeraz enzimi yardımıyla yeni sentezlenen DNA'ya katılır, ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotit ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçası elde edilir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir dideoksinükleozit trifosfat bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleozit kullanıldığı için yeni zincir rasgele sonlanarak bir dizi DNA parçası oluşur.

Günümüzde enzimatik ve kimyasal yöntemlerin dışında DNA bölgelerinin dizi analizi için otomatik sistemler de kullanılmaktadır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir yöntem kullanılarak farklı bazlarla (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar eklenir. Reaksiyon karışımı amplifikasyon sonrası kapiller jelle yüklenir ve bazlar bir floresan dedektör vasıtasıyla saptanır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak için ise bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırt edilebilir. Kullanılan bilgisayar programları yardımıyla elde edilen veriler renkli kromotogram dosyalarına çevrilir. Bu dosyalarda her bir baz kendisine özgü bir renk eğrisi ile gösterilir (A:yeşil, T:kırmızı, C:mavi; G:siyah). Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır (76).

DNA dizi analizi ticari bir firmada, ABI PRISM 310 Genetik Analizatörü dizi cihazı ile kapiller sistemde, Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yöntemi ile DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) kullanılarak yapıldı. ABI Prism 310 Genetik Analizatörü poliakrilamid jelmatriks sistemi yerine kapiler sistem içine doldurulan polimer jel matriks içerir. Bu polimer jel matriks çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir.

Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analiz yapıldığı elektroforez kısmıdır (65).

Elektroforez İşlemi

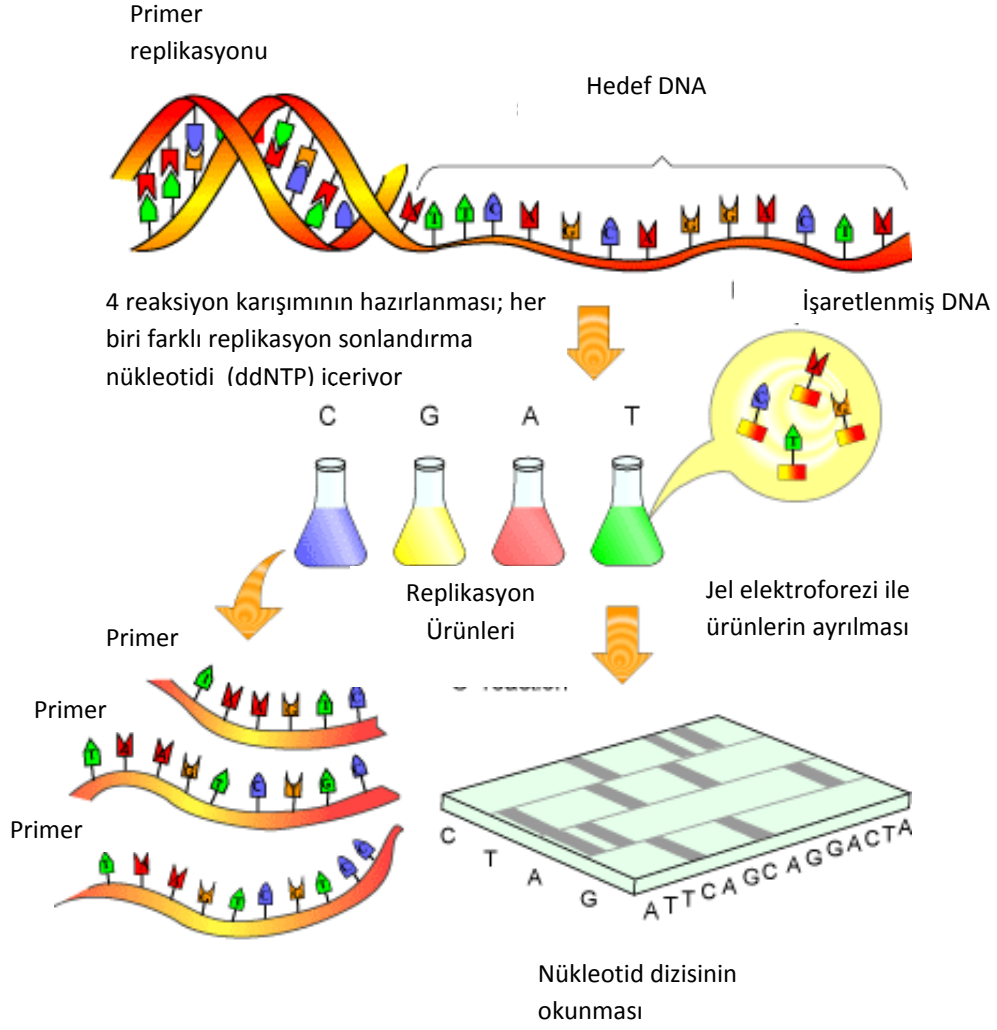
Maxam- Gilbert Dizilemesi

R.E

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

Kısa moleküller hızlı
gider

Şekil 4.13: DNA dizi analizinde Maxam- Gilbert yöntemi (<http://universe-review.ca/I111-50-maxam-gilbert.jpg> den modifiye edilerek, erişim Tarihi 03.06.2009).



Şekil 4.14: Dizi analizi yöntemi (<http://universe-review.ca/I11-50-DNAsequencing1.jpg>' den modifiye edilerek, Erişim tarihi: 09.08.2009).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kullanılan Aletler

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu -20 °C Bosch (Almanya)

Etüv, Heraeus (Almanya)

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, EC105 Apparatus Corporation (A.B.D.)

Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği EC105 Apparatus Corporation (A.B.D.)

PAGE Elektroforez Düzeneği (BioRad)

Hassas Terazı, Mettler AT 261 (İsviçre)

Isı Döngü Cihazı, Techne (İngiltere)

Laminar Flow, Özge A.T. (Türkiye)

Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

pH Metre, WTW (Almanya)

UV Kaynağı, Vilber Lourmat (Fransa)

Jel Dokümantasyon Sistemi, Synergene Genius (İngiltere)

Soğutmalı Santrifüj, IEC MP4R (A.B.D.)

Spektrofotometre, Ultraspec 3300 pro Biochrom Ltd. (İngiltere)

Su Banyosu, GFL 1083 (Almanya)

Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

5.1.2. Kimyasal Maddeler

Agaroz, İnvitrogen (A.B.D.)

Borik asit, Roth (Almanya)

Brom fenol mavisi, Sigma (A.B.D.)

dNTP set, MBI Fermentas (Litvanya)

EDTA, Sigma (A.B.D.)

Etanol, Carlo Erba (İtalya)

Etidyum bromür, Sigma (A.B.D.)

Hidrojen Klorür (HCl), Fluka (İsviçre)
İzoamil alkol, Merck (Almanya)
İzopropanol, Sigma (A.B.D.)
Ksilen siyanol, Sigma (A.B.D.)
Magnezyum klorür, Sigma (A.B.D.)
Proteinaz K, Roche (İsviçre)
Sodyum dedosil sülfat (SDS), Merck (Almanya)
Sodyum hidroksit, Merck (Almanya)
Taq DNA Polimeraz Enzim Seti, MBI Fermantas (Litvanya)
Tris, Sigma (A.B.D.)
100 bp Step Ladder, DNA belirteç, MBI Fermantas (Litvanya)
Primerler, Integrated DNA Technologies (A.B.D.)
Asetik Asit , Merck (Almanya)
Gümüş Nitrat, Merck (Almanya)
Sodyum Borahidrit, Merck (Almanya)
Formaldehit, Merck (Almanya)

5.1.3. Kullanılan Ticari Kitler

DNA izolasyon kiti: High Pure PCR Tamplate Preperation Kit (Almanya)

5.1.4. Kullanılan Primerler

Primerler liyofilize formda alınıp steril distile su ile sulandırılarak ana stok oluşturulmuş ve -20°C'de saklanmıştır. PZR reaksiyonlarında primerler, bu stoklardan hazırlanan 10 pmol/µl konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Tablo 5.1).

Genomik Bölge	DNA Dizisi (5'→3')	TM Derecesi	Amplikon Uzunluğu
MSX1 (Ekzon 1)	5'-GCCCGGAGCC CATGCCCGGCGG-3'	60 °C	579 bp
	5'-CTCCCTCTGCGCCTGGGTTCTGGCT-3'		
MSX1 (Ekzon 2.1)	5'- GCTGATCATGCTGCTCCAATGCTT-3'	60 °C	287 bp
	5'- TCTTGTAGTCTCTTIGCCTGGCG-3'		
MSX1 (Ekzon 2.2)	5'- CGCCAAGGCAAAGAGACTACAAGA-3'	58 °C	381 bp
	5'- AGGGAGCAAAGAGGTGAAACTGGA-3'		

Tablo 5.1: MSX1 geninin amplifikasyonu için kullanılan primerler, Tm değerleri ve amplikon uzunlukları

5.1.5. Kimyasal Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

10mM dNTP

100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP solüsyonlarından 10'ar µl alınarak karıştırıldı ve üzerine 60 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

10X TAE (1Lt)

54 gr Tris-HCl, 27,5 gr Asetik Asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) distile su içinde çözülerek 1000 ml'ye kadar dH₂O ile tamamlandı.

Jel Yükleme Tamponu

% 0.25 bromofenol mavisi (a/h), %0.25 ksilen siyanol FF (a/h) ve %30 gliserol (h/h) ile distile su içinde çözüldü.

Etidyum Bromür stok solüsyonu

10 mg/ml etidyum bromür

SSCP Yükleme ve Denatüre edici tampon:

- % 95 Formamid
- 10 mM NaOH
- % 0,05 w/v Bromofenol mavisi
- % 0,05 w/v Ksilen siyanol

Gümüş Nitrat Çözeltisi

% 0,1 Gümüş nitrat

Akrilamid jel

%30 Akrilamid stok (50 ml) (29:1)

- 14,5 g Akrilamid
- 0,5 g Bisakrilamid
- 50 ml ddH₂O'a tamamlandı, +4°C'de saklandı.

Kullanım için (30 ml, %10' luk)

<u>Akrilamid yüzdesi</u>	<u>% 30 Akrilamid stok</u>	<u>5xTAE</u>	<u>ddH₂O</u>	<u>Gliserol</u>
% 10	10 ml	3 ml	11 ml	4 ml

230 µL % 10 APS (Taze hazırlandı)

25 µL TEMED

Denatüre edici tampon:

- % 95 Formamid
- 10 mM NaOH
- % 0,05 w/v Bromofenol mavisi
- % 0,05 w/v Ksilen siyanol

Gümüş Boyama

Solüsyon I

- % 10 Etanol
- % 5 Asetik asit

Solüsyon II

- % 0,1 Gümüş nitrat

Solüsyon III

- % 1.5 NaOH
- % 0.15 Formaldehit

Solüsyon IV

- % 0,75 Na₂CO₃

5.2. Yöntemler

5.2.1 Akrilamid Jel Elektrofrez

PZR ürünlerinin 3 µl'si denatüre edici tamponun 15 µl'si ile seyreltilerek 95°C'de 8 dakika inkübe edildi. Tüpler 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra tamamı ekzon 1 için %12' lik, ekzon 2 için %10' luk denatüran olmayan poliakrilamid jele yüklenerek elektrofrez işlemine tabi tutuldu. Bunun ardından jel gümüş boyama ile görüntülendi.

5.2.2 Gümüş Boyama

Elektrofrez işlemi sonrasında DNA bantlarının görüntülenmesi için akrilamid jel sırası ile şu solüsyonlardan geçirildi;

→ 100 ml Solüsyon I' de 5 dakika inkübe edildi ve ardından jel 3 kez ddH₂O ile yıkandı.

→ 100 ml Solüsyon II' de 20 dakika,

→ 100 ml Solüsyon III' de 20 dakika,

→ 100 ml Solüsyon IV' de 10 dakika inkübe edildi.

İnkübasyonlar oda sıcaklığında ve hafif salınımda gerçekleştirildi.

5.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

Dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde ChromasPro-v1.45 (Iontek firmasından temin edildi) programı kullanıldı.

Tez yazımında, tablo ve şekillerin hazırlanmasında Microsoft Excel, Word ve Powerpoint 2007 programlarından faydalanıldı.

İstatistiksel analizler için SPSS 16.0 programı kullanılmıştır.

5.2.4. Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışmaya 1992- 2004 yılları arasında Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif cerrahisinde opere edilen izole DDY kriterlerine uygun yaşları 4 ile 17 arasında değişen 100 hasta alınmıştır. DDY tayini aynı anabilim dalınca yapılmıştır. Hastalar Marmara Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına davet edilerek aile hikayeleri ve periferik kan örnekleri alınmıştır. Çalışmaya aile hikayesi bulunmayan bireyler dahil edilmiştir. Kontrol grubu DNA' ları sağlıklı ve aile hikayesinde DDY bulunmayan, yaşları 7 ile 23 arasında değişen 100 çocuğun periferik kan lökositlerinden elde edilmiştir.

5.2.5. Kandan DNA İzolasyonu

Kan dokusundan DNA izolasyonu High PCR Template Preparation Kit ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda yapıldı (Şekil 5.1). Aynı gün izole edilemeyen kan örnekleri ve elde edilen DNA örnekleri -20 derecede saklanmıştır.

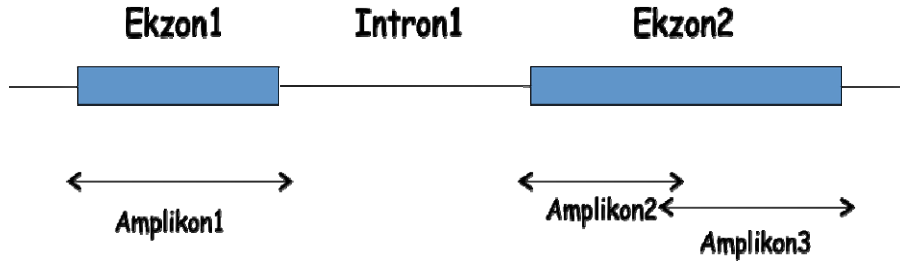
Elde edilen DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapıldı. 260 nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) değeri ile solüsyonun 50 µg/ml çift iplikli DNA içerdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki OD değeri kullanılarak örneklerin konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{sulandırma oranı}$$

DNA örneklerinin saflığı OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı kullanılarak değerlendirildi. İyi saflaştırılmış DNA'nın OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri 1,6- 2 olarak kabul edilir.

5.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR yöntemi ile MSX1 geninin Ekzon 1 ve Ekzon 2 bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Ekzon 2 bölgesi bu bölgenin dizi analizi için uzun olmasından dolayı iki bölge halinde çoğaltılmış ve MSX12.1 ve MSX12.2 olarak adlandırılmıştır. Bu iki bölge birbirleriyle örtüşen bölgeler oluşturularak herhangi bir bölgenin dizilenememesi gibi bir durum ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 5.2: MSX1 geninin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgelerinin amplifikasyon şeması

MSX1 Ekzon 1 bölgesi için, 50 µl'lik son hacimde bir reaksiyon karışımı;

- 100 ng kalıp DNA,
- 1X Taq DNA polimeraz tamponu [100 mM Tris HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40]
- 12,5 pmol ileri ve geri primerleri,
- 200 µM dNTP karışımı,
- 1,5 mM MgCl₂,
- 1.5 ünite Taq polimeraz enzimi,
- 5 µl DMSO
- Steril su içermektedir.

MSX12.1 ve MSX12.2 bölgeleri için 50 µl'lik son hacimde bir reaksiyon karışımı;

- 100 ng kalıp DNA,
- 1X Taq DNA polimeraz tamponu [100 mM Tris HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40]
- 10 pmol ileri ve geri primerleri,
- 200 µM dNTP karışımı,
- 1,5 mM MgCl₂,
- 1 ünite Taq polimeraz enzimi,
- Steril su içermektedir.

Bu işlemler 0.5 ml'lik eppendorf tüplerinde ve buz üzerinde gerçekleştirildi. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek belirlenen program uygulandı.

MSX1 geni Ekzon1 bölgesi için PZR döngü programı:

94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon	}	40 döngü
94 °C'de 30 saniye.....(denatürasyon)		
60 °C'de 30 saniye..... (eşleşme)		
72 °C'de 1 dakika.....(sentez)		
72°C' de 5 dakika final uzaması olarak uygulandı .		

MSX1 geni Ekzon2 bölgeleri için PZR döngü programı:

94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon	}	35 döngü
94 °C'de 1 dakika.....(denatürasyon)		
Uygun °C'de 1 dakika.....(eşleşme)		
72 °C'de 1 dakika.....(sentez)		
72°C' de 5 dakika final uzaması olarak uygulandı .		

MSX12.1 için Tm 60⁰C, MSX12.2 için Tm 58⁰C olarak uygulanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası elde edilen, MSX1 için 579 bç, MSX12.1 için 287 bç, MSX12.2 için 381 bç uzunluklarındaki ampliconlar %2' lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

5.2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

PZR ile çoğaltılan ürünlerin tanımlanması için agaroz jel elektrofrez uygulandı ve bu amaçla % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel 1X TAE tamponunda kaynatıldı ve çözeltiye DNA'nın UV ışık altında görüntülenebilmesi için 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Jel kalıbının üzerine yeterli sayıda kuyucuk oluşturacak tarak yerleştirildi ve jel kalıba dökülerek iyice polimerize olana kadar oda sıcaklığında bekletildi. 10 µl PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 100 bp'lik belirteç DNA'lar kullanıldı. Elektrofrez 100 V/45 mA olacak şekilde uygulandı. Yaklaşık 25 dakika sonra incelenen jelde UV altında etidyum bromür sayesinde ışımaya veren PZR bantları gözlenerek standart belirteçle karşılaştırıldı.

5.2.8. SSCP

PZR ile elde edilen ampikonların mutasyon taramaları gerçekleştirmek için tek zincir konformasyon polimorfizm metodu uygulanmıştır. Çalışmamızda 2 farklı konsantrasyonda PAGE jeli hazırlanmıştır. Ekzon 1 bölgesi için %10' luk, ekzon 2.1 ve 2.2 bölgeleri için %12' lik jeller hazırlanmıştır. Her 3 amplifikasyon ürünü 150 Voltta 12 saat boyunca yürütülmüştür.

5.2.9. Dizi Analizi

SSCP sonuçlarına göre elde edilen bant profillerinden her bir bölge için rastgele seçilmiş toplam 45 örnek için dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi uygulamaları özel bir kuruluş olan İontek firması tarafından ABI 3100 Analyser cihazı gerçekleştirilmiştir. Böylelikle SSCP bant profillerinin sonuçları doğrulanmıştır.

5.2.8. İstatistiksel yöntemler

Bu çalışmada izole DDY' li hastalar ve kontrol grupları arasındaki folik asit kullanımı ve sigara tüketimi yönünden farklılığı araştırmak için "Ki-kare" testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında genetik danışma, cinsiyet ve alkol kullanım bakımından fark olup olmadığını araştırmak için Fisher's Exact testi kullanılmıştır.

6. BULGULAR

6.1. MSX1 Geninin Amplifikasyon Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen DNA moleküllerinden MSX1 geninin kodlayan birimleri olan ekzon 1 ve ekzon 2 bölgeleri PZR yöntemiyle amplifiye edildi. Bölgelerin amplifikasyon analizleri hazırlanan %2' lik jel elektroforezi ile yapıldı (Şekil 6.1, 6.2 ve 6.3).



Şekil 6.1: Ekzon1 bölgesinin amplifikasyon ürünleri (M: 100 bp' lik marker; 1,2,3,4 amplikonlar, 5 negatif kontrol)

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.



Şekil 6.2: Ekzon2.1 bölgesinin amplifikasyon ürünleri (M: 100 bp' lik marker; 1,2,3,4,5 ampliconlar; 6 negatif kontrol)

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.



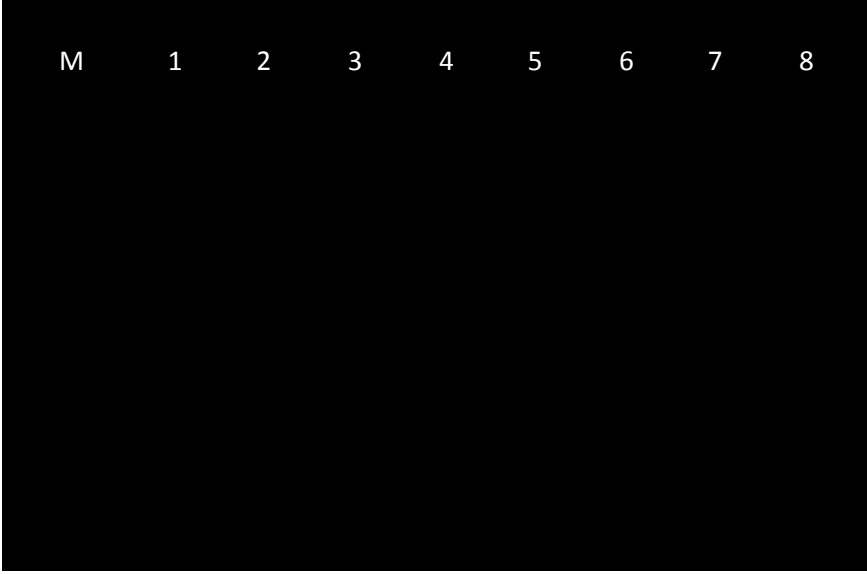
Şekil 6.3: Ekzon2.2 bölgesinin amplifikasyon ürünleri (M: 100 bp' lik marker; 1,2,3,4,5 ampliconlar; 6 negatif kontrol)

6.2. MSX1 Ekzon BÖlgelerinin SSCP Sonuçları

Elde edilen amplikonlar mutasyon taramalarının yapılması için hazırlanan %12' lik (ekzon2.1 ve ekzon2.2) ve %10' luk (ekzon1) PAGE jellerine aktarıldılar. Herhangi bir mutasyon profiline neden olabilecek bant gözlenmedi (Şekil 6.4 ve 6.5).

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

Şekil 6.4: Ekzon2.1' in SSCP bant profilleri (M: 100 bp' lik kontrol; 1,2,3,4,5,6 amplikon ürünlerinin PAGE elektroforez sonuçları)



Şekil 6.5: Ekzon1' in SSCP bant profilleri (M: 100 bp' lik kontrol; 1,2,3,4,5,6,7,8 amplicon ürünlerinin PAGE elektroforez sonuçları)

6.3. Dizi Analizi Sonuçları

Dizi analizi sonuçlarına göre MSX1 geninin ekzonlarından elde edilen ampliconlarda herhangi bir nükleotid değişimine rastlanmamıştır. Dizileme yapılan bölgelerden ikisi Şekil 6.6 ve 6.7' de gösterilmiştir.

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

Şekil 6.6: MSX1 geni ekzon1 bölgesinin dizi analizinin bir bölümü (ekzon1' in 117. Ve 130. nükleotidlerinin arası).

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

Şekil 6.7: MSX1 geni ekzon2.1 bölgesinin dizi analizinin bir bölümü (ekzon2' nin 76. Ve 87. nükleotidlerinin arası).

6.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Sigara kullanımının izole DDY oluşumundaki önemini belirlemek için Ki-Kare testi uygulanmıştır. Kullanım yüzdeleri bakımından her iki grupta dağılım homojen olarak bulunmuştur. Sigara kullanımı bakımından kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,123$) (Tablo 6.1).

Genetik danışma bakımından da hasta ve kontrol grubu arasında bir fark bulunamamıştır ($p=0,345$). Folik asit kullanımı bakımından ise iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,000$) (Tablo 6.1).

	Hasta Grubu (n=100)	Kontrol Grubu (n=100)	p değeri
Folik Asit Kullanımı	% 22	% 74	0,000*
Sigara Kullanımı	% 56	% 58	0,123

Tablo 6.1: Folik asit ve sigara kullanımının hasta ve kontrol gruplarındaki Ki- Kare analiz sonuçları (* $P<0,05$ anlamlıdır)

Hasta ve kontrol gruplarında alkol kullanımı, cinsiyet farkları ve genetik danışma bilgilendirilmelerinin anomali üzerine etkilerini incelemek için Fisher's Exact Analizleri uygulanmıştır (Tablo 6.2 ve 6.3).

	Hasta Grubu (n=100)	Kontrol Grubu (n=100)	p değeri
Genetik Danışma	9	60	0,345
Alkol Kullanımı	0	24	0,987

Tablo 6.2: Hasta ve kontrol gruplarında genetik danışma hakkında bilgilendirilmelerinin ve alkol kullanımının Fisher's Exact analiz sonuçları (* $P<0,05$ anlamlıdır)

Hasta ve kontrol gruplarındaki annelerin genetik danışma hakkındaki bilgili olup olmadığı konusundaki analizde iki grup arasında anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($p=0,345$). Gruplar içindeki dağılım ise homojendir.

Alkol kullanımında da anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,987$).

Hasta ve kontrol gruplarında ki cinsiyet dağılımlarının incelenmesi Fisher's Exact Analizi uygulanmıştır (Tablo 6.3)

	Hasta Grubu n=100		Kontrol Grubu n=100		P değeri
	Erkek	Kız	Erkek	Kız	
Cinsiyet Dağılımı	61	39	44	56	0,023*

Tablo 6.3: DDY oluşumunda cinsiyet dağılımının Fisher's Exact analizi (*P< 0,005 anlamlıdır)

İzole DDY anomalisi gösteren bireylerde erkeklerde izole DDY görülme sıklığı kız çocuklara göre daha fazla çıkmıştır ve bu da istatistiksel olarak iki grup arasında bir fark yaratmaktadır (p=0,023).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İzole DDY ortalama 1/ 700' lük insidansı ile konjenital anomaliler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Cerrahi müdahalelerin yanında bu kişilerde doğumla beraber beslenme, konuşma ve işitme bozuklukları ve enfeksiyonlara yatkınlık söz konusudur. Aynı zamanda yaşla beraber bu kişilerde dental sorunlar da görülmektedir. Bu medikal sorunlara ek olarak bu kişilerin ortalama yaşam süreleri ve psikolojik rahatsızlık geçirme oranları sağlıklı bireylere göre daha fazladır (22). Yapılan başka bir çalışmada ise DDY' li bireylerde belli kanser tiplerinin görülme sıklığının, sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu yayınlanmıştır (11). Bu açıdan bakıldığında gerek izole gerekse sendromik DDY' li vakalar, sağlıklarına kavuşmak veya anomalinin düzeltilmesi ve meydana gelebilecek ek anomalilerin tedavisi için yüksek harcamalar yapmaktadır.

İnsanlarda dudak ve damak gelişiminin moleküler temelleri tam olarak anlaşılamamıştır. Aday genleri belirleme çalışmaları genelde kusurların görüldüğü ailelerde bağlantı analizleri, ilgili gen bölgelerinin belirlenmesi, model organizmalarda knock-out ve fonksiyon analizleri ile model organizmalardaki fenotip değişimlerinin gözlenmesi prensiplerine dayanmaktadır (67, 69, 121). Üzerinde en çok çalışılan genlerden biri MSX1 genidir. Bu genin analizini içeren birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bazılarında doğrudan gen dizilemesi (44, 47, 53, 105, 114), bazılarında bağlantı analizleri (30, 118), bazılarında ise geniş popülasyonlar üzerinde SNP analizleri uygulanmıştır (74, 105, 107).

DDY oluşumu ve MSX1 geni arasındaki ilişkinin belirlenmesindeki en temel yaklaşım MSX1 geninin dizilenmesidir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farkların belirlenmesi genin bu malformasyon üzerindeki önemini göstermektedir. Bazı çalışmalarda izole DDY' li bireylerde herhangi bir MSX1 varyasyonu belirlenmemiştir (44, 121). Bazı çalışmalarda ise farklı varyasyonlar bulunmuş, ancak oran hep %2 civarında kalmıştır (16, 69, 100). Bizim çalışmamızda MSX1 gen varyasyonu saptanmamıştır. Elde edilen sonuçlarla Türk toplumu için MSX1' in izole DDY etmeni olmadığını söylemek zor olsa da bu çalışmanın toplumumuz için önemli bir veri oluşturduğuna inanmaktayız. Daha farklı çalışmalar ile veri sayısının

artması, MSX1 geninin önemi ve etkisini daha iyi ortaya koyacaktır. Ancak malformasyonun etyolojisinin çok etkenli olması bu vakalarda tek bir genin değil gen gruplarının analizlerini gerekli kılmaktadır. Aynı zamanda genler ile çevresel faktörlerin etkileşimleri de çok etkenli olan vakalar için önemli bir noktayı oluşturmaktadır.

MSX1 geni üzerinde günümüze kadar bazı SNP' ler ve protein fenotipini değiştiren missens mutasyonlar bulunmuştur (44, 64, 105, 117). Bu mutant profillerden bazıları DDY' ler ile bağlantılı çıkmış ancak aynı genotipler farklı bir popülasyonda anomali üzerinde aynı etkiyi göstermemiştir. Bu tip sonuçlar çok etkenli kalıtım kalıbına sahip olan anomaliler için sık rastlanılan bir durumdur. Aynı mutasyon tiplerinin aynı veya farklı popülasyonlarda aynı etkiyi göstermemeleri hem kusurun ortaya çıkmasında diğer genlerin de etkili olduğunu göstermekte hem de çevresel faktörlerin önemini artırmaktadır.

MSX1 geninin etkileşimde olduğu diğer proteinler de DDY oluşumunda MSX1 geni kadar etkilidir. Bugüne kadar aynı metabolik yolakta yer alan proteinleri ve onların kodlandığı genlerdeki mutasyonları içeren çalışma bulunmamaktadır. Henüz dudak oluşumunun ve palatogenezin tüm mekanizması tam olarak aydınlatılmadığından sadece iki veya üç geni içeren çalışmalar yapılmış (16, 69) ve bu genlerle hastalık arasında ilişki bulunmasına rağmen kusurun oluşma nedeni henüz belirlenememiştir. Ancak moleküler biyolojideki hızlı gelişmelerin yardımıyla kısa sürede ilgili genlerin hem fiziksel hemde biyokimyasal yapılarının daha iyi anlaşılacağı ve metabolik yollardaki epigenetik faktörlerin de ortaya konacağı düşünülmektedir. Bu gelişmeler sadece DDY oluşumunda değil kanser gibi multigenik temeli olan hastalıkların da daha iyi aydınlatılmasında ve tedavilerinin daha etkili olmasında önem taşımaktadır.

DDY insidansının coğrafik farklılıklar göstermesinin temel nedenlerinden biri de çevresel faktörlerdir. Teratonejik etmenler, bu etmenlere mağruz kalma sıklığı ve süresi DDY oluşumunda rol aldığı düşünülen teratojenik faktörlerin en önemli özelliklerindedir. Sadece teratojenik maddenin yapısı değil bu maddeye karşı bireyin reaksiyonu da DDY oluşumunda önemlidir (16, 44, 100). Çevresel faktörlerden en fazla çalışılan folik asit kullanımınıdır (3, 41, 56, 89, 93, 107). Folik asit yetersizliğine

bağlı olarak nöral tüp defektleri, zeka ve gelişim gerilikleri en fazla görülen kusurlardır. Özellikle birinci trimester fetüsün oral yapılarının gelişiminde etkin olduğundan gebeliğin ilk aylarında folik asit veya multivitamin kullanımı oldukça önemlidir. Perikonsepsiyonel maternal günlük 400 µg folik asit kullanımının NTD insidansını %60' a kadar düşürebileceği (70, 101, 125), düzenli olarak günlük 200 µg kullanımının da hastalığı tamamen önleyebileceği gösterilmiştir (124, 125). Hatta ABD' de 1993 yılından başlayarak tahılların folik asitle zenginleştirilmesinin, takip eden 6 yıllık zamanda NTD prevalansının 1,89/1000' den 0,95/1000' e düştüğünü gösterilmiştir (106). Ancak yapılan başka bir çalışmada folik asit içeren (< 1mg) multivitamin takviyesinin DDY gelişiminin önlenmesinde etkili olmadığı gösterilmiştir (12, 13, 31). Bu çalışmaların yanında folik asit metabolizmasında rol alan enzimlerin etkinliği ve folik asit takviyelerini karşılaştıran çalışmalar da yapılmıştır (32, 62, 110).

Bizim çalışmamızda folik asit takviyesinin izole DDY oluşumunu genotipten bağımsız olarak azalttığı sonucuna varılmıştır (p=0,000). Folik asit metabolizmasında sadece MTHFR genleri değil diğer genlerin de rol aldığı göz önüne alındığında, sadece bir genotipe bakılıp değerlendirme yapılmasının yanıltıcı sonuçlar verebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda sadece folik asit veya folik asit içeren multi- vitamin takviyesi alınıp alınmadığı sorgulanmıştır. Çalışmamızda yer alan hasta grubunun sosyo- kültürel yapılarının kontrol grubuna göre daha düşük olması da bu sonucun ortaya çıkmasına neden olabilir. Kontrol grubunun da aynı sosyo- kültürel düzeyden olmaması, belki farklı sonuçların ortaya çıkmasını engellemiştir ancak yaptığımız çalışmada folik asit takviyesinin gerekliliği ilgili literatür ile paralellik göstermiştir (39, 56, 69, 115, 124).

Sigara ve alkol kullanımı günümüzde birçok sorunun başlıca kaynağı olarak gösterilmektedir. Sigaranın oluşturduğu hücrel toksisiteye yönelik çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır. Fetüsün 12. gestasyonel haftaya kadar kraniyofasiyal gelişiminin çoğunu tamamlaması bu dönemin önemini vurgulamaktadır. Sigara kullanımı ve izole DDY oluşumu ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (p=0,123). Ancak gruplar arasındaki sosyo- kültürel farkların bu sonuca etkisinin olduğu

düşünülmektedir. Hasta gruplarının daha tutucu kesimden olması belki de sonucu etkileyen bir özelliktir. Ancak konu ile ilgili az sayıda literatür olması, bizim Türk toplumu ile diğer toplumlara karşılaştırmamızı kısıtlayan bir faktör olarak değerlendirilmiştir.

Sigara için yapılan yorumların benzerleri alkol için de yapılabilir. Çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel olarak alkol tüketimine dayalı bir fark bulunmamıştır. Aynı şekilde, iki grubun sosyo- kültürel parametrelerin bu sonuca etki ettiğini düşünmekteyiz. Bizim bulgularımız ilgili literatürle ilişkili çıkmamıştır (69, 100, 117). Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

Hasta ve kontrol gruplarına profesyonel genetik danışma alıp almadıkları sorusu sorulduğunda iki gruptan kimsenin almadığı anlaşılmıştır. Bireylerden ayrıntılı anamnez alınırken genetik danışma alıp almadıkları sorulmuş ve hasta grubundan 9, kontrol grubundan ise 60 kişinin bilgilendirildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar iki grup arasında istatistiksel bir fark oluşturmamıştır ($p=0,345$). Ancak genetik danışmanlığın önemi ülkemizde henüz anlaşılmadığından, anlamlı bir fark bulunması beklenmemiştir. Konu ile ilgili literatüre baktığımızda çok az çalışmada DDY oluşumuna dair genetik danışma verildiğini görmekteyiz (69). Genetik faktörlerin daha iyi aydınlatılmasıyla genetik danışma hizmetinin daha iyi verileceği kuşkusuzdur.

Cinsiyetin izole DDY oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan istatistiksel analizde kontrol grubundaki erkeklerle hasta grubundaki erkekler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 6.3). Bugüne kadar ilgili literatürde izole DDY' li vakalarda böyle bir sonuç elde edilmemiştir. İzole DDY oluşumunun erkeklerde daha fazla meydana görülmesinin moleküler bir neden bağlı olmadığını, kusurun oluşmasında çevresel faktörlerin daha etkin olduğunu düşünmekteyiz.

Çok etkenli hastalıklar tanı konması ve hastalığın temelini anlaşılması açısından en karmaşık hastalıklardır. Hastalığın nedeni birden fazla gen grubu ve bu genlerin ekspresyon düzeylerini etkileyen çevresel faktörlerin oluşturduğu düzensizliklerdir. Yapılacak olan çalışmalar ile sadece DDY gibi kusurların değil,

diğer çok etkenli hastalıkların da nedenleri anlaşılmaya çalışılacaktır. Türk toplumunu içeren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Farklı merkezler tarafından yürütülebilecek ortak çalışmalarla toplumumuz hakkında daha fazla bilgiye ulaşabilecektir. Özellikle her toplumda olduğu gibi Türk toplumunda da DDY' li vakaların incelenmesinde çevresel faktörlerin ve bundan sonraki araştırmalarla ortaya çıkarılabilecek moleküler etmenlerin göz önünde bulundurulduğu genetik danışma birimlerine ihtiyaç vardır.

Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarımızda aynı hasta grubunda diş eksikliği ile ilişkili Pax9 ve IFR6 gen varyasyonlarının belirlenmesi ve oral yarıkların etyolojisinde önemi olan TGFB3 ve TGFA gen analizlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, Ekker M. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development*; 121:347-57, 1995.
2. Alkuraya F.S.: SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate, *Science* 313 (5794) p. 1751, 2006.
3. Arruda V.R., Siqueira L.H., Goncalves M.S., Von Zuben P.M., Soares M.P., Menezes R., Annichino-Bizzacchi J.M., Costa F.F.: Prevalance of the Mutation C677/T in the Methylene Tetrahydrofolate reductase Gene Among Distinct Ethnic Groups in Brazil, *Am J Med Genet* 78:332-35, 1998.
4. Baggott J.E., Morgan S.L., Ha T., Vaughn W.H., Hine R.J.: Inhibition of folate-dependent enzymes by non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Biochemical Journal* 282 (Pt 1): 197–202, 1998.
5. Bailey S.W., Ayling J.E.: The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci*, 106:15424–29, 2009.
6. Beaty T.H., Wang H., Hetmanski J.B.: A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol* : 11 (6): 434–42, 2001.
7. Belloni E., Muenke M., Roessler E., Traverso G., Siegel-Bartelt J., Frumkin A., Mitchell H.F., Donis-Keller H., Helms C., Hing A.V., Heng H.H., Koop B., Martindale D., Rommens J.M., Tsui L.C., Scherer S.W.: Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nature Genet*; 14: 353-6, 1996.
8. Bendall A.J., Abate-Shen C.: Roles for *Msx* and *Dlx* homeo-proteins in vertebrate development. *Gene*; 247:17-31, 2000.
9. Bendall A.J., Ding J., Hu G., Shen M.M., Abate-Shen C.: *Msx1* antagonizes the myogenic activity of *Pax3* in migrating limb muscle precursors. *Development*; 126:4965-76, 1999.
10. Bendall A.J., Rincon-Limas D.E., Botas J., Abate-Shen C.: Protein complex formation between *Msx1* and *Lhx2* homeoproteins is incompatible with DNA binding activity. *Differentiation*; 63:151-7, 1998.
11. Bille C., Winther J.F., Bautz A., Murray J.C., Olsen J., Christensen K. : Cancer risk in persons with oral cleft- a population-based study of 8,093 cases, *Am J Epidemiol* 161:1047-55, 2005.
12. Blanton S.H., Kolle B.S., Hecht J.T.: No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP. *Am J Med Genet*: 92 (5): 370–71, 2000.
13. Blanton S.H., Patel S., Hecht J.T., Mulliken J.B.: MTHFR Is Not a Risk Factor in The

Development of Isolated Nonsyndromic Cleft Lip and Palate, *Am J Med Genet* 110:404-05, 2002.

14. Blin-Wakkach C., Lezot F., Ghoul-Mazgar S.: Endogenous Msx1 antisense transcript: *in vivo* and *in vitro* evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals, *Proc Natl Acad Sci*; 98:7336-41, 2001.
15. *Bull World Health Organ*, vol.82, no.3, p.213–8, March 2004.
16. Carinci F., Scapoli L., Palmieri A., Zollino I., Pezzetti F.: Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71, 1509-19, 2007.
17. Catron K.M., Iler N., Abate C.: Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*; 13:2354-65, 1993.
18. Catron K.M., Wang H., Hu G., Shen M.M., Abate-Shen C.: Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech Dev*; 55:185-99, 1996.
19. Catron K.M., Zhang H., Marshall S.C., Inostroza J.A., Wilson J.M., Abate C.: Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol Cell Biol* ; 15:861-71, 1995.
20. Chen Y., Kostetskii I., Zile M.H., Solursh M.: Comparative study of Msx-1 expression in early normal and vitamin A-deficient avian embryos. *J Exp Zool*; 272: 299-310, 1995.
21. Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K., Corden J.L., Westphal H., Beachy P.A. : Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*; 383:407-13, 1996.
22. Christensen K., Juel K., Herskind A.M., Murray J.C.: Long term follow up of survival associated with cleft lip and palate birth. *BMJ* 328:1405, 2004.
23. Christensen K., Olsen J., Norgaard-Pedersen B.: Oral clefts, transfor ming-growth-factor-alpha gene variants, and maternal smoking: a population based case-control study in Denmark 1991–1994. *Am J Epidemiol* 149: 248–55, 1999.
24. Chung K.C., Kowalski C.P., Kim H.M.: Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast Reconstr Surg*: 105 (2): 485–91, Cold spring harbor laboratory Press New York, 2000.
25. Curtis E.J., Fraser F., Warburton D.: Congenital cleft lip and palate. *Am. J. Dis. Child.*:102; 853- 57, 1961.
26. Davidson D.: The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet*; 11:405-11, 1995.
27. Davidson D.R., Hill R.E.: Msh-like genes: a family of homeo-box genes with wide-ranging expression during vertebrate development. *Sem in Dev Biol*; 2:405-12, 1991.

28. Dobias S.L, Ma L., Wu H., Bell J.R., Maxson R.: The evolution of Msx gene function: expression and regulation of a sea urchin Msx class homeobox gene. *Mech Dev*; 61:37-48, 1997.
29. Emekli N.: *Temel ve Uygulamalı Biyokimya*, Cem Ofset Matbaacılık, Haziran, 2004.
30. Feng H., Sassani R., Bartlett S.P., Lee A., Hecht J.T., Malcom S., Winter R.M., Vintiner G.M., Buetow K.H., Gasser D.L.: Evidence,from Family Studies,for Linkage Disequilibrium between TGFA and a Gene for Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate, *Am J Hum Genet*, 55:932-36, 1994.
31. Gaspar D.A., Pavanello R.C., Zatz M.: Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to non-syndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil, *Am J Med Genet*: 87 (2): 197–99, 1999.
32. Gaspar D.A.,Favanello R.C., Zatz M.,Passos-Bueno M.R.,Andre M., Steman S., Wyszynski D.F., Matioli S.R.: Role of the C677T Polymorphism at the MTHFR Gene on Risk to Nonsyndromic Cleft Lip With/Without Cleft Palate:Results From a Case-Control Study in Brasil, *Am J Med Genet* 87:197-99, 1999.
33. Goh Y.I., Koren G.: Folic acid in pregnancy and fetal outcomes, *J. Obstet. Gynaecol.* 28:3–13. 2008.
34. Gorlin R.J., Cohen M.J., L.S. Levin.: *Syndromes of the Head and Neck*, Oxford University Press, Oxford, 2001.
35. Gupta V., Bei V.: Modification of Msx1 by SUMO-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (1) 74-77, 2006.
36. Hartsfield J.K., Hickman T.A., Everett E.T.: Analysis of the EPHX1 113 polymorphism and GSTM1 homozygous null polymorphism and oral clefting associated with maternal smoking, *Am J Med Genet*: 102 (1): 21–24, 2001.
37. Havens J.R., Simmons L.A., Shannon L.M., Hansen W.F.: Factors associated with substance use during pregnancy: Results from a national sample, *Drug and alcohol dependence* 99: 89, 2008.
38. Heinonen S., Ryyänen M., Kirkinen P.:The effects on fetal development of high alpha-fetoprotein and maternal smoking, *Am J Public Health*, April; 89(4): 561–3, 1999.
39. Hernandez –Diaz S., Werler M.M., Walker A.M., Mitchell A.: Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Eng J Med* 343: 1608-14, 2000.
40. Hildebrandt F., Igaraski P.: *Techniques in molecular medicine*. Springer, Almany, 1999.
41. Honein M.A., Rasmussen S.A., Reefhuis J., Romitti P.A., Lammer E.J., Sun L.: Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts, *Epidemiology* 18:226-33, 2007.
42. Hovde S., Abate-Shen C., Geiger J.H.: Crystal structure of the Msx-1 homeodomain/DNA complex, *Biochemistry* 40: 12013-21, 2001.

43. Jennings E.: Folic acid as a cancer-preventing agent, *Med Hypotheses* 45 (3): 297–303, 1995.
44. Jezewski M.: Complete sequencing shows a role for MSX1 in non- syndromic cleft lip and palate, *J. Genet. Med.* 40 (6), 399- 407, 2003.
45. Jones K.L., Smith D.W., Ulleland C.L.: Pattern of Malformation im Offspring of Chronic Alcoholic Mothers. *Lancet* 1:1267-71, 1973.
46. Jones K.L.: Smith's recognizable patterns of human malformations. 5th edition Philadelphia, Saunders 555-58, 1997.
47. Jugessur A., Lie R.T., Wilcox A.J., Murray J.C., Taylor J.A., Saugstad O.D., Vindenes H.A., Abyholm F.: Variants of Developmental Genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and Their Association With Orofacial Clefts: A Case-Parent Triad Analysis, *Genet Epidemiol* 24:230-39, 2003.
48. Kamen B.: Folate and antifolate pharmacology, *Seminars in oncology* 24 (5 Suppl 18): S18, 1997.
49. Kerrigan J., Mansell J.P., Sengupta A., Brown N., Sandy J.R.: Palatogenesis and potential mechanisms for clefting, *J.R.Coll.Surg.Edinb.*, 45, 351-58, 2000.
50. Kim J.W.: Novel MSX1 frameshift causes autosomal- dominant oligodontia, *J. Dent. Res.* 85 (3), 267- 71, 2006.
51. Kim S., Kim J.W., Oh C., Kim J.C.: Cleft lip and palate incidence among the live births in the republic of Korea, *J Korean Med Sci*; 17:49- 52, 2002.
52. Kim Y.I.: Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer?, *Am J Clin Nutr* 80 (5): 1123–8, 2004.
53. Lidral, A.C.: Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines, *Cleft Palate Craniofac. J.* 34 (1) 1- 6, 1997.
54. Lieff S., Olshan A.F., Werler M.: Maternal cigarette smoking during pregnancy and risk of oral clefts in newborns. *Am J Epidemiol*: 150 (7): 683–94, 1999.
55. Lieff S., Olshan A.F., Werler M., Straus R.P., Smith J., Mitchell A.: Maternal Cigarette Smoking during Pregnancy and Risk of Oral Clefts in Newborns *Am J Epidemiol* 150:683-94, 1999.
56. Loffredo L.C., Souza J.M., Freitas J.A.: Oral clefts and vitamin supplementation, *Cleft Palate Craniofac J*: 38 (1): 76–83, 2001.
57. Lorente C., Cordier S., Goujard J.: Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Am J Public Health*: 90 (3): 415–419, 2000.
58. Lorenzo D., Yang B., Yang Q.: 5,10- Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene

Variants and Congenital Anomalies; A HuGe Review, *Am. J. of Epidemiology*, Vol. 151, No. 9, 2000.

59. Maestri N.: Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models, 393–96, 1995.
60. Malloy M.H., Kleinman J.C., Bakewell J.M., Schramm W.F., Land G.H.: Maternal smoking during pregnancy: no association with congenital malformations in Missouri 1980 – 83. *Am J Public Health* 79: 1243– 6, 1989.
61. Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F.: Linkage analysis of three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft. *Ann Hum Genet*: 65, 465–71, 2001.
62. Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F., Carinci F., Carinci P., Stabellini G., Bisceglia L., Gombos F., Tognon M.: C677T Variant Form at the MTHFR Gene and CL/P:A Risk Factor for Mothers?, *Am J Med Genet* 98:357-60, 2001.
63. Maxam A., Gilbert W.:A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4, 1977.
64. Mitchell LE, Murray J.C., O'Brien S.: Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am J Epidemiol*: 153 (10): 1007–15, 2001.
65. Moore K.L., Persaut T.V.N: İnsan Embriyolojisi, 6. baskıdan çeviri, Ed: Yıldırım M, Okar İ.Dalçık H., Nobel Kitabevleri, 2002.
66. Moore, K.L.: *The developing human*, 3rd edition. WB Saunders, Philadelphia, pp197-213, 1988.
67. Mossey P.A., Little J.: Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: *Cleft lip & palate. From origin to treatment.* Wyszynski DF, editor. New York: Oxford University Press, pp. 127-158, 2002.
68. Munger R.G., Romitti P.A., Daack-Hirsch S.: Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*: 54 (1): 27–33, 1996.
69. Murray J.C.: Gene/ environment causes of cleft lip and/ or palate.: *Clin. Gen.* 61:248-256, 2001.
70. Natsume N., Kawai T., Ogi N.: Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38 (1): 23–25, 2000.
71. Nugent P., Greene R.: Msx-1 gene expression and regulation in embryonic palatal tissue. *In Vitro Cell Dev Biol*; 34:831-681, 1998.
72. Padanilam B.J., Stadler H.S., Mills KA.: Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers. *Hum Mol Genet*; 1:407-10, 1992.

- 73.** Park-Wyllie L., Mazotta P., Pastuszak A., Moretti M.E., Beique L., Hunnisett L., Friesen M.H., Jasobson S., Kasapinovic S., Chang D., Diav-Citrin O., Chitayat D., Nulman I., Einarson T.R., Koren G.: Birth Defects After Maternal Exposure to Corticosteroids: prospective Cohort Study and Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Teratology* 62:385-392, 2000.
- 74.** Pawlowska E., Janik-Papis K., Jarosinska M., Szczepanska J., Blasiak J.: Mutations in the human homeobox MSX1 gene in the congenital lack of permanent teeth, *Tohoku Ex. J. Med.* 217, 307- 312, 2009.
- 75.** PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998.
- 76.** Perkin Elmer, ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000.
- 77.** Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E.: Homocysteine and cardiovascular disease, *Annual Review of Medicine* 49 (1): 31–62. 1998.
- 78.** Riley B.M., Mansilla M.A., Ma J., Daack-Hirsch S., Maher B.S., Raffensperger L.M.: Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4512-17, 2007.
- 79.** Robitaille J., Hamner C., Cogswell Mç, Yang Q.: Does the *MTHFR* 677CT variant affect the Recommended Dietary Allowance for folate in the US population? *Am J Clin Nutr.*, 89: 1269-73, 2009.
- 80.** Romitti P.A.: Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts, *Teratology* 59 (1) 39—50, 1999.
- 81.** Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis T., : *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 1989.
- 82.** Sanjoaquin M.A., Allen N., Couto E., Roddam A.W., Key T.J.: Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach, *Int J Cancer* 113 (5): 825, 2005.
- 83.** Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7, 1997.
- 84.** Scapoli L.: Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (1), 180-83, 2005.
- 85.** Scapoli L.: Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate, *Ann. Hum. Genet.* 70 (Pt 3) 410-3, 2006.
- 86.** Scapoli L., Palmieri A., Martinelli M., Vaccari C., Marchesini J., Pezzetti U., Baciliero U., Padula E., Carinci P., Carinci F.: Study of the PVRL1 gene in Italian Nonsyndromic Cleft Lip Patients with or without Cleft Palate, *Annals of Human Genetics* 70, 410- 3, 2006.

- 87.** Scott E., Woods M.D., Raju U.: Maternal Smoking and the Risk of Congenital Birth Defects: A Cohort Study, *J Am Board Fam Pract*, 14:330 – 4, 2001.
- 88.** Sharp L., Little J.: Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review, *Am J Epidemiol*, 159:423-43, 2004.
- 89.** Shaw G., Lammer E.J., Wasserman C.R.: Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet*; 346: 393-6, 1995.
- 90.** Shaw G.M., Wasserman C.R., Murray J.C.: Infant TGF- alpha genotype, orofacial clefts, and maternal periconceptional multivitamin use. *Cleft Palate Cran. J*: 35: 366–70, 1998.
- 91.** Shaw G.M., Lammer E.J.: Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr* : 134 (3): 298–303, 1999.
- 92.** Shaw G.M., Wasserman C.R., Lammer E.J.: Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants, *Am J Hum Genet*: 58: 551–561, 1996.
- 93.** Shaw G.M., Rozen R., Finnel R.H., Todoroff K., Lammer E.J.: Infant C677T Mutation in MTHFR, Maternal Periconceptional Vitamin Use and Cleft Lip, *Am J Med Genet* 80:196-8, 1998.
- 94.** Shen R., Chen Y., Huang L., Vitale E., Solursh M.: Characterization of the human MSX-1 promoter and an enhancer responsible for retinoic acid induction. *Cell Mol Biol Res*; 40: 297-312, 1994.
- 95.** Shiang R., Lidral C., Ardinger H.H., Buetow K.H., Romitti P.A, Munger R.G., Murray J.C.: Association of Transforming Growth-Factor Alpha gene polymorphisms with Nonsyndromic Cleft Palate Only (CPO) *Am J Hum Genet* 53:836-43, 1993.
- 96.** Shimeld S.M., McKay I.J., Sharpe P.T.: The murine homeobox gene *Msx-3* shows highly restricted expression in the developing neural tube. *Mech Dev*; **55**:201-10, 1996.
- 97.** Slavkin H.C.: Molecular biology experimental strategies for craniofacial-oral-dental dysmorphology, *Connect Tiss Res*; **32**: 233-9, 1995.
- 98.** Sozen M., Suzuki K., Tolarova M., Bustos T., Iglesias J.E., Spritz A.: Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non- syndromic cleft lip/ palate in northern Venezuela, *Nature Genetics* 29, 141-2, 2001.
- 99.** Spritz R.A.: The Genetics and Epigenetics of Orofacial Clefts. *Curr Opin Pediatr*. 13:556-60, 2001.
- 100.** Stainer P., Moore G.E.: Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non- syndromic clefts. *Human Molecular Genetics* 13, Review Issue 1, 2004.

- 101.** Stegmann K., Ziegler A., Ngo E., Kohlschmidt N., Schröter B., Ermert A., Koch M.C.: Linkage Disequilibrium of MTHFR Genotypes 677C/T-1298A/C in the German Population and Association Studies in Proband With Neural Tube Defects(NTD). *Am J Med Genet* 87:23-161, 1999.
- 102.** Stelter P., Ulrich H.: Control of spontaneous and damage- induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation, *Nature* 425 (6954) 188-91, 2003.
- 103.** Su M.W., Suzuki H.R., Solursh M., Ramirez F.: Progressively restricted expression of a new homeobox-containing gene during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Development*; 111: 1179- 87, 1991.
- 104.** Suzuki K., Hu D., Bustos T., Zlotogora J., richieri- Costa A., Helms J., Spitz R.A.: Mutations of PVRL1, encoding a ceel- cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/ palate actodermal dysplasia, *Nature Genetics* 25, 427- 30, 2000.
- 105.** Suzuki S.: In a Vietnamese population MSX1 variants contribute to cleft lip and palate, *Genet. Med.* 6 (3), 117- 25, 2004.
- 106.** Sylvia A., Zhang A.Z., Chen Y.P.: *Msx* homeobox gene family and craniofacial development, *Cell research* 13(6): 429-42, 2003.
- 107.** Tongkobetch S., Siriwan P., Shotelersuk V.: MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population, *J. Hum Genet* ;51:671-6, 2006.
- 108.** Tolarova M.M., Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*: 51, 71–78, 1995.
- 109.** Tolarova M.M.: Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet*: 2: 217, 1982.
- 110.** Tolarova M.M., Van Rooij A.M., Pastor M., Van Der Put M.J., Goldberg A.C., Capozzi A., Thomas C.G., Pastor L., Mosby T., Ferrari C., Eskes T.B., Steegers –Theunissen R.M.: A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet* 63:Abstract 27, 1998,
- 111.** Tunçbilek E.: Türkiye’ deki yüksek nöral tüp defekti sıklığı ve önlemek için yapılabilecekler, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47: 79- 84, 2004.
- 112.** Tunçbilek E., Özgür F., Balcı S.: Yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*, 47: 172- 176, 2004.
- 113.** Turecková J., Sahlberg C., Aberg T., Ruch J.V., Thesleff I., Peterkova R.: Comparison of expression of the *msx-1*, *msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. *Int J Dev Biol* 1995; 39:459-68. *Acids Res*; 30:1213-23, 2002.
- 114.** Van den Boogaard M.J.: MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans, *Nat. Genet.* 24 (4), 342—343, 2000.

- 115.** Van Rooij I.A., Vermeij-Keers C., Kluijtmans L.J., Ocke M.C., Zielhuis G.A., Goorhuis-Brouwer S.M., Van Der Blezen J.J., Kuijpers-Jagtman A.M., Steegers-Theunissen R.M.: Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? *Am J Epidemiol*, 157:583-591, 2003.
- 116.** Van Rooij I.A., Wegerif M.J., Roelofs H.M.: Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*: 12 (5): 502-507, 2001.
- 117.** Vastardis H.: A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis, *Nat. Genet.* 13 (4), 417-421, 1996.
- 118.** Vieira A.R.: MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America, *J. Dent. Res.* 82 (4) 289-292, 2003.
- 119.** Vieira A.R.: Unraveling Human Cleft Lip and Palate Research, *J Dent Res* 87(2):119-125, 2008.
- 120.** Vieira A.R., Modesto A., Meira R., Barbosa A.S., Lidral A.C., Murray J.C.: Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A* 143:538-545, 2007.
- 121.** Vieira A.R.: Medical sequencing for candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate, *Plos Genetic*, 1 (6), e64, 2005.
- 122.** Werler M., Lammer E.J., Rosenberg L.: Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts. *Am J Epidemiol*: 132: 926-932, 1997.
- 123.** Wilcox A.J., Lie R.T., Solvoll K., Taylor J., McConaughy D.R., Abyholm F., Vindenes H., Vollset S.E., Drevon C.A.: Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study, *BMJ*, Mar 3;334(7591):464, 2007.
- 124.** Wong F.K., Hagg U.: An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J*, 10: 331-6, 2004.
- 125.** Wyszynski D.F., Beaty T.H.: Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*, May, 53(5): 305-17, 1996.
- 126.** Wyszynski D.F., Diehl S.R.: Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. *Am J Med Genet*: 92 (1): 79-80, 2000.
- 127.** Wyszynski D.F., Duffy D.L., Beaty T.H.: Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac J*: 34: 206-10, 1997.
- 128.** Xuan K., Jin F., Liu Y.L., Yuan L.T., Wen L.Y., Yang F.S., Wang X.J., Wang G.H., Jin Y.: Identification of a novel missense mutation of MSX1 gene in Chinese family with autosomal-dominant oligodontia. *Arch Oral Biol.* Aug; 53(8):773-9, 2008.

- 129.** Zhang H., Hu G., Wang H.: Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol*; **17**:2920-32, 1997.
- 130.** Zhang Z., Song Y., Zhao X., Zhang X., Fermin C., Chen Y.: Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*; **129**: 4135-46.1993; 119:233-45. 2002.
- 131.** Zucchero T.M., Cooper M.E., Maher B.S., Daack-Hirsch S., Nepomuceno B., Ribeiro L.: Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip and palate. *N Engl J Med* 351:769-780, 2004.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Korkut	Soyadı	ULUCAN
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	08.07.1976
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	14345434918
E-mail	korkutulucan@hotmail.com	Tel	0 2122319120

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2003
Lisans	Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü	1999
Lise	H.A.S.A.L.	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Marmara Üni. Dış Hek. Fak.	2000-2009

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

- Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
57								

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	68	66	64
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Powerpoint	Çok iyi
Microsoft Excel	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Ulucan K.: Nanoteknoloji ve Nanotıp, Kimya & Sanayi, Vol. 30, Sayı 228 (54-56), 2007

Korkut Ulucan: Genetik Bozuklukların Temeli, Kimya & Sanayi, Vol:42, sayı 230 (31- 33), 2009.

Ulusal Hakemsiz Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Ulucan K.: Yarık Damak- Dudak, Dişhekimliği Dergisi, Yıl 17, Sayı 71, 2006

Ulucan K.: Dişhekimliğinde Temel PCR Uygulamaları, Dişhekimliği Dergisi, Yıl 19, Sayı 80, 2008.

Uluslararası Toplantılarda Tebliğ Edilen Bildiriler:

Ulucan K., Kuyumcu F., Dogan E., Ozgöl Ş., Özen B., Akyüz S., Kadir T., Yarat A.: In vitro effect of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide on Mononuclear Leukocytes Apoptosis, II. Congress of Molecular Medicine, 24-26 March, 2007, İstanbul.

Özkaynakçı A.E., D. Sevinç D., Özkara Ç, Uzan M., Koçer A., Aker R., **Ulucan K.**, Gören M.Z., Küçükibrahimoğlu E., Bircan R., Özyurt H.B., Güney A.İ., Onat F.: □CYP2C9 and CYP2C19 Polymorphisms In Patients Under Phenytoin Therapy, Balkan Journal of Medical Genetics, Vol 9, 3&4, 2006.

Kasımay O., Sevinç D., Iseri S.O., **Ulucan K.**, Unal M., Güney A.I., Kurtel H.: Skeletal Muscle Gene ACTN3 and Physical Performance, European Journal of Human Genetics, Vol 16, Sup. 2, Barcelona, 2008.

Ulucan K., Ozturhan H.S., Sevinc D., Agirbasli D., Kirac D., Javadova D., Guney A.I.: Frequency, Significance and Association of ACE I/D and MTHFR C766T Gene Polymorphism in Turkish Patients with Early Onset Coronary Artery Disease, European Journal of Human Genetics, Vol 16, Sup. 2, Barcelona, 2008.

Teoman Akcay, Tulay Guran, Serap Turan, Deniz Sevinc, **Korkut Ulucan,** İlter Güney, Bekir Aras, Erdala Adar, Abdullah Bereket: A pilot study for searching androgen receptor mutation in a Turkish male pseudohermaphrodites with clinical diagnosis of androgen insensitivity syndrome, Hormone Research, 47th ESPE (European Society of Paediatric Endocrinology, İstanbul, Turkey, 2008.

İlter Güney, Serap Turan, Deniz Sevinc, Tulay Guran, Teoman Akcay, Elif Karakoc, Bahaddin Colak, **Korkut Ulucan,** Dilsad Save, Abdullah Bereket: Polymorphism in the Vitamin D receptor gene in children with idiopathic hypercalcemia, Hormone Research, 47th ESPE (European Society of Paediatric Endocrinology, İstanbul, Tukey, 2008.

Mehmet A. Ağırbaşlı, Hasan S. Ozturhan, **Korkut Ulucan,** deniz Ağırbaşlı, Deniz Sevinc, kelli Ryckman, Scott Williams: Interaction among MTHFR,

PAI-1, ACE, PON and e- NOS gene polymorphisms can predict the presence and severity of early onset coronary artery disease, Supplement to JACC, Vol:53, No:10, 2009.

- Leyla Koc- Ozturk, Aysen Yarat, **Korkut Ulucan**, Serap Akyuz, Halit Furuncuoglu: Investigation of salivary MUC7 gene alterations in dental students with and without caries, IUBMB Life, Vol :61, Number:3, March 2009.
- Aysen Yarat, Leyla Koc- Ozturk, **Korkut Ulucan**, Serap Akyuz, Hayati Atala: Determination of association between CA VI exon 2 genetic polymorphism and dental caries among Turkish dental students, IUBMB Life, Vol: 61, Number:3, March 2009.
- K. Ulucan**, D. Kirac, T. Akcay, D. Javadova, G. Koc, D. Ergec, A.I. Guney: Infant C677TT Genotype of the MTHFR gene risk factor non- syndromic cleft lip with/ without palate, European Journal of Human Genetics, Vol:17, Supl.:2, May 2009.
- D. Ergec, H. Tavukcu, G. Koc, Mç Ozyurek, D. Javadova, **K. Ulucan**, D. Kirac, L. Turkeri, A.I. Guney: Investigation of the relationship between mitochondrial DNA and transitional cell carcinoma of the bladder, European Journal of Human Genetics, Vol:17, Supl.:2, May 2009.
- D. Kirac, **K. Ulucan**, D. Ergec, T. Guran, T. Akcay, F. Eren, G. Koc, D. Javadova, E. C. Kaspar, I. Ozden, A. Bereket, A.I. Guney: The frequency of 21 hydroxylase gene defects, phenotypic effects and other molecular mechanisms in congenital adrenal hyperplasia patients in Turkish populations, European Journal of Human Genetics, Vol:17, Supl.:2, May 2009.
- D. Javadova, G. Koc, **K. Ulucan**, D. ergec, S. Ergunsu, M. Ozyurek, D. Kirac, H. Tavukcu, T. Tarcan, A. I. Guney: The relationship between Sperm mtDNA mutations, sperm parameters and Genetic Testing Results in Male Infertility, European Journal of Human Genetics, Vol:17, Supl.:2, May 2009.
- Korkut Ulucan**, Figen Ciloglu, Cenk Sesal, Deniz Ergec, Deniz Kirac, İbrahim Sahin, Emin Suel, A. İlter Güney: ACTN3 Gene R577X Polymorphism in Turkish Sprint/ Power Athletes, Medimedgen Abstract Book, Ankara, 28 June- 1 July 2009.
- Korkut Ulucan**, Serap Akyüz, Gizem Ozbay, F. Namdar Pekiner, A. İlter Güney: The Genetic Aspect of Familial Dentinogenesis Imperfecta, Medimedgen Abstract Book, Ankara, 28 June- 1 July 2009.

Ulusal Toplantılarda Tebliğ Edilen Bildiriler:

- A. İlter Güney, Deniz Sevinç, Elif Karakoç, Serap Turan, **Korkut Ulucan**, Tülay Güran, Teoman Akçay, Dilşad Save, Abdullah Bereket: İdiyopatik Hiperkalsemili Çocuklarda Vitamin D Reseptör Genindeki Polimorfizmlerin Araştırılması, VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Çanakkale, 2008.

- Korkut Ulucan**, Teoman Akçay, Tülay Güran, Deniz Sevinç, Serap Turan, Deniz Kıraç, Abdullah Bereket, A.İlter Güney: Klinik Olarak Androjen Duyarsızlığı Tanısı Alan Erkek Psödohermafroditizmli Hastalarda Androjen Reseptör Mutasyonlarının Araştırılması: İlk Bulgular, VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Çanakkale, 2008.
- Ö. Kasımay, D. Sevinç, S. Ö. İşeri, **K. Ulucan**, M. Ünal, İ. Güney, H. Kurtel: İskelet Kası Geni ACTN3 ve Fiziksel Performansı Genotip- Fenotip İlişkisi, II. Egzersiz Fizyolojisi Sempozyumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mayıs, 2009.

Ulusal Toplantılarda Tebliğ Edilen Sözlü Bildiriler:

- Deniz Sevinç, Betül Çelikkol Sertbaş, **Korkut Ulucan**, Onur Gürer, Aybanu Gökçen Tuygun, Mutlu Şenocak, Selim Aydın, Fikri Yapıcı, Azmi Özler, A. İlter Güney: Tromboembolitik Olay veya Tromboembolitik Riski Nedeniyle Kullanılan Oral Antikoagülanların ETKİN İdame Doz Ayarlanmasında Genetik Çeşitliliğin Rolü, VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Çanakkale, 2008
- Özkaynakçı A.E., D. Sevinç D., Özkara Ç, Uzan M., Koçer A., Aker R., **Ulucan K.**, Gören M.Z., Küçükibrahimoğlu E., Bircan R., Özyurt H.B., Güney A.İ.: Epilepsili hastalarda CYP2C ve CYP2C19 alel sıklıkları ve fenotip- genotip ilişkisi, I. Nörogenetik Sempozyumu, İzmir, 2007.

Kitap Bölümleri:

- Korkut Ulucan**; İnsan Genetiği, Nelson Pediatri Cilt 1, S:367- 396, Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN:978-975-420-586-2, 2008.

Katılan Kurslar:

- Hybrid Course in Integration of Cytogenetics, Microarrays and Massive Sequencing in Biomedical and Clinical Research, European School of Genetic Medicine, at ESGM's Remote Training Center of İstanbul (Turkey), October 23rd- 27th, 2008.
- “Deney Hayvanları Kullanımı ve Etik Yaklaşım”, M.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan laboratuvarı, İstanbul, 2004
- “Sağlık Personelinin HIV/ AIDS ve CYBE (Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar) Eğitimi, Merkez Eğitimci Ekibi Eğitimi” AIDS Savaşım Derneği Avrupa Birliği- İstanbul İL Sağlık Müdürlüğü, 24 Eylül- 16 Ekim, İstanbul, 2005.

“Tıbbi laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Güvencesi”, Türk Biyokimya Derneği, İstanbul, 2004.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

03.03.2006

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-73
Konu:

Sayın : Yrd.Doç.Dr. A. İlder GÜNEY

MAR-YÇ-2006- 0004 protokol nolu "Yarık damak-dudak vakalarında genetik faktörler ile Fenotip ilişkisinin incelenmesi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haner DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI

08/01/2007

Sayı: 790
Konu: Dr. Korkut Ulucan

CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞI'NA

İLGİ: B.30.2.MAR.0.01.73.00/42 sayılı ve 13.12.2006 tarihli yazı.

Ekte fotokopisi bulunan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'nın ilgi yazısıyla istenen Yarık damak-dudak vakalarından kan örneklerinin alınmasında sakınca yoktur. Bilgilerinize arz ederim.

Saygılarımla,



Prof. Dr. Ayhan Numanoğlu
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi
Anabilim Dalı Başkanı