

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**NICK TRANSLASYON YÖNTEMİYLE İŞARETLENMİŞ  
ÖZGÜN DNA DİZİLERİNİN KOMPLEKS KROMOZOM  
ANOMALİLERİNİN AYDINLATILMASINDA  
KULLANILMASI**

**BİO. ZEYNEL DEMİR**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SEHER BAŞARAN**

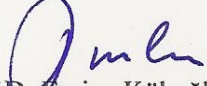
**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2008**

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

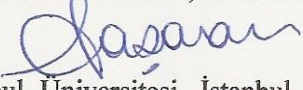

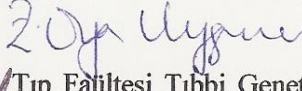
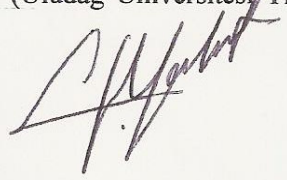
01 / 07 / 2008

  
Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Genetik  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
Anabilim Dalı : Genetik  
Tez Sahibi : Zeynel Demir  
Tez Başlığı : Nick translyasyon yöntemi ile işaretlenmiş özgün DNA dizilerinin kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılması  
Sınav Yeri : İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.  
Sınav Tarihi : 20 / 06 / 2008

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Seher BAŞARAN (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) (Tez Danışmanı) 
2. Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı) 
3. Doç. Dr. Hülya KAYSERİLİ (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)
4. Doç. Dr. Z. Oya UYGUNER (İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) 
5. Doç. Dr. Tahsin YAKUT (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı) 

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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.

Zeynel DEMİR



*Sevgili Aileme...*

## TEŞEKKÜR

İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki öğrenimime olanak sağlayan, zamanını ve engin bilgilerini cömertçe paylaşmış bu yoldaki ilk adımımı atmamı sağlayan hocam ve aynı zamanda danışmanlığımı üstlenen Prof. Dr. Seher Başaran'a,

Hem öğrenim sürecim de hem de tez çalışmalarım sırasında gerek bilimsel gerekse de manevi desteğini esirgemeyen Dr. Birsen Karaman'a

Tez çalışmalarımın gerçekleşmesinde zaman ayırarak bilimsel ve teknik katkıda bulunan Doç. Dr. Z. Oya Uyguner'e ve Doç. Dr. Hülya Kayserili'ye,

Çalışmalarımın en önemli kısımlarında her türlü bilgi, laboratuvar, alet ve teknik desteğini eksik etmeyen ve benim için zaman ayıran Yrd. Doç. Dr. Duran Ustek'e

Tücrübelerini, bilimsel ve manevi desteklerini sürekli hissettiğim Uzm. Bio. Güven Toksoy'a, Dr. Abdullah Üzümcü'ye ve Dr. Şükrü Candan'a

Hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve bana hep destek olan çalışma arkadaşlarım Bio. Nuray Kırmızı, Bio. Havva Öztürk, Uzm. Bio Kader Yılmaz ve Zuhâl Temur'a

Tez çalışmalarım boyunca beni destekleyen tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Ayrıca çalışmaya vermiş olduğu büyük karşılıksız destekten dolayı İtalya Bari Üniversitesi, Mikrobiyoloji Genetiği Departmanı başkanı Prof. Dr. Mariano Rocchi'ye

Bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksiltmeyen, bana her konuda destek olan ve sıcaklıklarını hep arkamda hissettiğim kıymetli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-27/15122006

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	Vİ
TABLolar LİSTESİ .....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kromozom Anomalileri .....	4
2.2. Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırılması .....	4
2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri.....	5
2.2.1.1. Anöplidiler.....	5
2.2.1.2. Poliplidiler .....	6
2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri .....	6
2.2.2.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri .....	6
2.2.2.1.1. İnversonlar.....	6
2.2.2.1.2. Translokasyonlar .....	7
2.2.2.1.2.1. Resiprokal Translokasyonlar .....	7
2.2.2.1.2.2. Robertsonian Translokasyonlar .....	7
2.2.2.1.2.3. İnsersiyonal Translokasyonlar.....	8
2.2.2.2. Dengesiz Yapısal Kromozom Anomalileri.....	8
2.2.2.2.1. Delesyonlar.....	9
2.2.2.2.2. Duplikasyonlar .....	9
2.2.2.2.3. Halka Kromozomlar.....	9
2.2.2.2.4. İzokromozomlar .....	10

2.2.2.2.5. Disentrik Kromozomlar .....	10
2.2.2.2.6. Marker Kromozomlar.....	10
2.2.2.2.7. Mozaisizm.....	11
2.3. Kompleks Kromozom Anomalileri (CCRs).....	122
2.4. Kromozom Anomalilerinin Tanı Yöntemleri .....	13
2.4.1. Klasik Bantlama Yöntemleri.....	13
2.4.1.1. G Bantlama.....	13
2.4.1.2. Q Bantlama.....	14
2.4.1.3. C Bantlama .....	14
2.4.1.4. R Bantlama .....	14
2.4.1.5. NOR Boyama (Nuclear Organiser Region) .....	15
2.4.2. HRBT (High Resolution Bantlama Tekniği).....	15
2.4.3. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH).....	16
2.4.3.1. Problar .....	17
2.4.3.1.1. Prob Çeşitleri.....	17
2.4.3.1.1.1. Lokusa Özgü Problar.....	18
2.4.3.1.1.2. Tekrarlayan Dizi (Satellit) Probları.....	18
2.4.3.1.1.3. Kromozomun Tümünü Boyayan (Painting) Problar .....	19
2.4.3.1.2. Probların Elde Edilmesi .....	20
2.4.3.1.2.1. Plasmidler .....	22
2.4.3.1.2.2. Bakteriyofaj $\lambda$ .....	22
2.4.3.1.2.3. Kozmidler .....	23
2.4.3.1.2.4. P1 Bakteriyofajlar .....	23
2.4.3.1.2.5. Bakteri Yapay Kromozomlar (BAC) .....	23
2.4.3.1.2.6. P1 Yapay Kromozomlar (PAC) .....	23
2.4.3.1.2.7. Maya Yapay Kromozomlar (YAC).....	24
2.4.3.2. Probların İşaretlenmesi .....	24
2.4.3.2.1. Direk İşaretleme.....	24

2.4.3.2.2. İndirekt İşaretleme.....	25
2.4.3.3. Prob İşaretleme Teknikleri.....	26
2.4.3.3.1. Rasgele Seçilmiş Primerlerle DNA İşaretlenmesi.....	26
2.4.3.3.2. Nick Translasyon İle DNA İşaretleme.....	26
2.4.3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR ) İle Prob İşaretleme.....	29
2.4.3.3.4. PRINS (Primed İn Situ İşaretleme).....	29
2.4.3.4. Dokuların Hibridizasyona Hazırlanması.....	29
2.4.3.5. Denatürasyon.....	30
2.4.3.6. Hibridizasyon .....	30
2.4.3.7. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar .....	30
2.4.3.8. Hibrid Moleküllerin Görüntülenmesi .....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Gereçler .....	32
3.1.2. Stok Solüsyonlar.....	33
3.1.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültür Medyumları.....	33
3.1.2.2. Kromozom Eldesinde Kullanılan Solüsyonlar.....	33
3.1.2.3. BAC Kültür ve İzolasyon Solüsyonları.....	33
3.1.2.4. Nick Translation ve Antibody Karışımı .....	34
3.1.2.5. FISH Solüsyonları.....	34
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültürü .....	35
3.2.2. Kromozom Eldesi.....	35
3.2.3. BAC ve BAC Kültürü .....	36
3.2.4. BAC İzolasyonu.....	37
3.2.5. Nick Translasyon İle Prob İşaretleme.....	40
3.2.6. Floresan İn Situ Hibridizasyon .....	41
3.2.6.1. Preparatların Hibridizasyona Hazırlanması.....	41
3.2.6.2. Problemlerin Hazırlanması.....	41

3.2.6.3. Denatürasyon ve Hibridizasyon .....	41
3.2.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar .....	42
4. BULGULAR .....	44
4.1. Tekniklerin Yerleştirilmesi Aşaması .....	44
4.1.1. BAC Klonlarının Seçimi .....	44
4.1.2. BAC Klonlarının Stoklanması .....	45
4.1.3. BAC Klonlarından DNA İzolasyonu .....	46
4.1.4. DNA'nın İşaretlenmesi .....	47
4.1.5. Preparatların Hazırlanması .....	49
4.1.6. Hibridizasyon ve Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar .....	49
4.1.7. Görüntüleme .....	50
4.2. Sitogenetik Uygulamalar ve Sonuçları .....	51
4.2.1. OLGU 1 : B.D. ....	51
4.2.2. OLGU 2 : I.Ö. ....	55
4.2.3. OLGU 3 : İ.Ç. ....	59
4.2.4. OLGU 4 : E.G. ....	63
4.2.5. OLGU 5 : H.Ç. ....	67
4.2.6. OLGU 6 : A.K. ....	74
4.2.7. OLGU 7 : S.E. ....	77
4.2.8. OLGU 8 : F.S. ....	81
5. TARTIŞMA .....	84
KAYNAKLAR .....	93
FORMLAR .....	101
ETİK KURUL KARARI .....	104
ÖZGEÇMİŞ .....	106

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Fetal veya postnatal yaşamın farklı evrelerinde kromozom anomalilerinin sıklığı.....	4
Tablo 2-2: Vektörler ve DNA taşıma kapasiteleri.....	22
Tablo 2-3: Sık kullanılan fluokromlar ve dalga boyları.....	31
Tablo 4-1: Klon listesi.....	44
Tablo 4-2: İzolasyon sonrası konsantrasyon oranları.....	47

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Prob çeşitleri.....	20
Şekil 2-2: Direk ve indirek İşaretleme.....	25
Şekil 2-3: Rasgele Seçilmiş Primerlerle DNA İşaretlenmesi.....	27
Şekil 2-4: Nick Translasyon İle DNA İşaretlenmesi.....	28
Şekil 4-1: İşaretleme sonrası jel görüntüsü.....	48
Şekil 4-2: Olgu 1'in karyotipi.....	51
Şekil 4-3: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-1.....	52
Şekil 4-4: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-2.....	52
Şekil 4-5: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-3.....	53
Şekil 4-6: Olgu 2'nin karyotipi.....	55
Şekil 4-7: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-1.....	56
Şekil 4-8: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-2.....	56
Şekil 4-9: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-3.....	57
Şekil 4-10: Olgu 3'ün karyotipi.....	59
Şekil 4-11: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-1.....	60
Şekil 4-12: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-2.....	60
Şekil 4-13: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-3.....	61
Şekil 4-14: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-4.....	61
Şekil 4-15: Olgu 4'ün karyotipi.....	63
Şekil 4-16: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-1.....	64
Şekil 4-17: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-2.....	64
Şekil 4-18: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-3.....	65
Şekil 4-19: Olgu 5'in karyotipi.....	68
Şekil 4-20: Olgu 5'in FISH resmi-1.....	69
Şekil 4-21: Olgu 5'in FISH resmi-2.....	69
Şekil 4-22: Olgu 5'in FISH resmi-3.....	70

Şekil 4-23: Olgu 5'in FISH resmi-4.....	70
Şekil 4-24: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-1.....	71
Şekil 4-25: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-2.....	71
Şekil 4-26: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-3.....	72
Şekil 4-27: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-4.....	72
Şekil 4-28: Olgu 6'nın karyotipi.....	74
Şekil 4-29: Olgu 6'nın BAC-FISH resmi.....	75
Şekil 4-30: Olgu 7'nin karyotipi.....	77
Şekil 4-31: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-1.....	78
Şekil 4-32: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-2.....	78
Şekil 4-33: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-3.....	78
Şekil 4-34: Olgu 8'in karyotipi.....	81
Şekil 4-35: Olgu 8'in BAC-FISH resmi.....	82

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

CCRs	: Kompleks kromozom anomalileri
MKA/MR	: Multipl konjenital anomali ve mental retardasyon
HRBT	: High resolution bantlama tekniği
FISH	: Fluoresan in situ hibridizasyon
BAC	: Bacterial artificial chromosomes
YAC	: Yeast artificial chromosomes
PAC	: P1 artificial chromosomes
PCR	: Polymerase chain reaction
T <sub>m</sub>	: Erime ısısı
SSC	: Standart caline citrate
LB	: Luria Bertani
DIG	: Digoksigenin
AMCA	: 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate
TRITC	: Tetramethylrhodamine isothiocyanate
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
ADR	: Anti-Digoksigenin-Rodamin
FCS	: Fetal calf serum

## ÖZET

Demir, Z. Nick Translasyon Yöntemi ile İşaretlenmiş Özgün DNA dizilerinin Kompleks Kromozom Anomalilerinin Aydınlatılmasında Kullanılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.

Bu çalışmada; klasik sitogenetik yöntemlerle ve ticari problemlerle yapılan FISH çalışmaları ile açıklanamayan kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında, anomaliye özgün BAC klonlarının Nick translasyon tekniği ile işaretlenerek kullanılabilir hale getirilmesi amaçlandı.

Bu çalışma kapsamında öncelikle 9., 13. ve 22. kromozomların katıldığı kromozom anomalileri kullanıldı.

Çalışmaya alınan anomalilerin kırık noktalarına özgün 31 BAC klonu seçildi. Laboratuvarımıza ulaşan 30 BAC klonu öncelikle çoğaltılarak stoklandılar. Daha sonra, stoklanmış 20 kültürden BAC lar izole edildi ve Nick Translasyon yöntemiyle işaretlenerek prob haline getirildiler.

Özellikle kırık noktalarının aydınlatılması amacıyla çalışmaya alınan 8 kromozom anomalisinde, özgün problemlerle FISH çalışmaları uygulandı ve sitogenetik tanıya katkı sağlandı.

Çalışmalar sonunda; BAC-FISH tekniğinin

1. laboratuvar koşullarında uygulanabilir olduğu ancak bakteri klonlarının üretilmesi ve izolasyonu aşamasında uygun laboratuvar koşullarının göz önünde bulundurulması gerektiği
2. en önemli aşamalarından biri klonların izolasyonu olup problemlerin kalitesini etkilediği ve diğer önemli etmenin preparatların kalitesi olduğu ve hibridizasyonun başarısını etkilediği
3. uygun BAC klonlarının kullanımı koşulu ile kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında ek bilgiler sağladığı saptandı.

BAC-FISH tekniğinin referans merkezi olarak çalışan ve daha sıklıkla kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılması sorunu ile karşı karşıya kalan laboratuvarlar için uygun ve uygulanabilir bir teknik olduğu kararına varıldı.

Anahtar Kelimeler : BAC-FISH, Nick translasyon, kromozom anomalileri, plasmid izolasyonu.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-27/15122006

## ABSTRACT

Demir, Z. Usage of Distinctive DNA Sequences That Labeled by Nick Translation Method For Identifying Complex Chromosome Abnormalities. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Genetics. Master Thesis. Istanbul. 2008

In this study, we aimed to reveal the use of specific BAC clones labeled by Nick translation in identification of complex chromosome abnormalities, which could not be defined by classical cytogenetic methods and commercial FISH probes.

Primarily, abnormalities of chromosome 9, 13 and 22 were used within this study.

31 BAC clones peculiar to break points of abnormalities were chosen and 30 BAC clones were cultured and stocked. 20 BACs were rendered as FISH probes following isolation from stock cultures and labeling by Nick translation method.

FISH studies using distinctive probes was performed on 8 chromosome abnormalities, especially selected for identification of break points, and contributed to cytogenetic diagnosis.

By this study, the following keypoints were achieved:

1. applicability of BAC-FISH needs special laboratory conditions, especially at stage of cloning and isolating of bacterial cultures,
2. isolating is one of the most important stage and it affects the probe quality. The other important step is slide preparation and this is effective on the hybridization success,
3. using of suitable BAC clones; contribute identification of complex chromosome abnormalities.

In conclusion, BAC-FISH technique is suitable and applicable for laboratories that are working as reference center and which usually challenges with complex chromosomal abnormalities

Key Words: BAC-FISH, Nick translation, chromosome abnormalities, plasmid isolation.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-27/15122006

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kromozom anomalileri, minör ve majör konjenital anomalilerin, mental retardasyonun ve spontan düşüklerin en önemli sebeplerindedir. Kromozom anomalisi, bir kromozom ile ilişkili ya da 2 veya daha fazla kromozomun katılımı ile oluşabilir. Bu anomaliler, sitogenetik açıdan “sayısal” veya “yapısal”, klinik bulgu verip vermemelerine göre de “dengeli” ya da “dengesiz” olarak sınıflandırılır (77). Genetik materyalde artış veya azalışa yol açan kromozomal düzenlenmeler, genomik dengesizliğe yol açtığından fenotip te etkilenmektedir. Delesyonlar, duplikasyonlar, izokromozomlar, disentrik kromozomlar, halka kromozomlar ve marker kromozomlar bu grubu oluşturmaktadırlar.

Kromozom anomalilerinin sıklığı, incelenen populasyonun klinik özelliklerine göre değişir. En yüksek kromozom anomali oranı zigot aşamasında olup intra uterin yaşam süresi uzadıkça bu oran azalır ve canlı yeni doğan evresinde  $\approx 1:200$  dür (53). Anomalinin tipi de yaşam süresi ile ilişkilidir. Dengeli anomaliler klinik bulgu vermediklerinden erişkin normal bireylerde saptanırken, letal sayısal anomaliler spontan abortus materyallerinde, trizomi 21 ve cinsiyet kromozom anöploidileri ise yenidoğanlarda en sıklıkla görülmektedir.

Kromozom anomalilerinin tanısında kullanılan klasik bantlama teknikleri sayısal anomalilerin ve basit yapısal anomalilerin tanısında yeterli olmaktadır. Klasik teknikler, mikrodelesyon/duplikasyonlar ile ender görülen kompleks anomalilerin aydınlatılmasında yetersiz kalmaktadır. Son 20 yılda bu anomalilerin aydınlatılmasında en etkin teknik Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) olmuştur. FISH tekniği kromozomların belli bölgelerine özgün DNA/RNA dizilerinin (prob) enzimatik yolla floresan veren maddelerle işaretlenerek, bunların interfaz ya da metafaz kromozomları ile hibridize

edilerek hedef bölgenin değerlendirilmesi esasına dayanır (58). Tekniğin 24 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmesi, prenatal tanıda sık görülen 5 kromozom anöploidisinin taramasına yönelik yeni bir uygulama alanı oluşturmuştur. Hematolojik ve solid doku kanserlerinde özgün ve çoğu zaman tedaviyi yönlendirebilecek bazı kromozom anomalileri, FISH tekniği ile interfaz hücrelerinde ya da kalitesi hemen her zaman periferik kan kültürlerine göre daha düşük olan metafaz kromozomlarında araştırılabilir. Moleküler genetikteki gelişmeler özgün DNA dizilerinin klonlanılarak tek iplikli oligonükleotidler olarak elde edilmelerine de olanak sağlamıştır. Bu oligonükleotidlerin işaretlenerek prob olarak kullanılması ise rutin teknikler ile gösterilemeyen, sub mikroskobik delesyonların (DiGeorge Sendromu, Prader-Willi/Angelman sendromu, Williams sendromu vb) tanısı daha kolaylaşmıştır.

Günümüzde, 5 kromozom anöploidisi taraması, kanser problemleri, mikrodelesyon sendrom problemleri, subtelomerik bölge ve tüm kromozom boyama problemleri gibi daha sıklıkla kullanılan problemler uluslararası ticari firmalar tarafından üretilmekte ve satışa sunulmaktadır. Ancak ender görülen sendrom ve anomaliler ile özel olarak araştırılması gereken, yapısal kromozom anomalilerinin kırık noktalarının ve bu bölgelerde lokalize olan gen bölgelerinin aydınlatılmasında gerek duyulan problemler yeterince kullanıcı bulamadığından firmalar tarafından üretilmemektedir. Bu nedenle araştırma laboratuvarları kendi kullanım amaçlarına uygun problemleri kendileri hazırlamak zorunda kalmaktadırlar.

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sitogenetik laboratuvarında incelenen olguların önemli bir kısmının kromozom anomalileri açısından yüksek riskli multipl konjenital anomali ve mental retardasyon (MKA/MR) olguları ile ultrasonografik olarak anomali saptanan fetuslardan oluşması kromozom anomali ve kompleks anomali oranının

yükselmesine yol açmaktadır. Referans merkezi de olunması nedeniyle diğer merkezlerde saptanan kompleks anomaliler, aydınlatılması amacıyla merkezimize yönlendirilmektedir. Yukarıda söz edildiği gibi bu anomalilerin aydınlatılmasında ticari problemler çoğu zaman yetersiz kaldığından gerek duyulduğunda anomaliye özgün prob/ların hazır edilebilmesi amacıyla fakültemiz koşullarında BAC klonlarının üretilmesi, gerektiğinde izolasyonu ve nick translasyon ile işaretlenerek kullanılabilir hale getirilebilmesi planlandı. İlk aşamada, eldeki tam olarak açıklanamamış olgular değerlendirildi ve 9. , 13. ve 22. kromozomlar ile ilgili problemlerin hazırlanmasına karar verildi.

Aydınlatılmasında ticari problemlerin yetersiz kaldığı kompleks kromozom anomalilerinde, anomaliye özgün problemlerin laboratuvarımızda hazırlanarak kullanılması sayesinde anomalilerin aydınlatılmasının yanı sıra bilimsel literatüre ve ülkenin döviz kaybının önlenmesine katkıda bulunulacaktır. Ayrıca Türkiye'deki diğer laboratuvarlarda saptanan kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında da laboratuvarımız referans merkezi olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kromozom Anomalileri

Normal insan diploid somatik hücresinde 22 çift otozom ve bir çift cinsiyet kromozomları gonozom olmak üzere 23 çift, toplam 46 kromozom vardır (24). Kromozom kuruluşu dişiler için 46,XX, erkekler içinse 46,XY' dir. Kromozom çiftini oluşturan, biri anneden diğeri ise babadan gelen kromozomlar "homolog kromozomlar" olarak adlandırılır. Somatik hücrelerde diploid ( $2n=46$ ), gamet hücrelerinde ise haploid ( $n=23$ ) kromozom bulunur. Kromozomların gerek sayısında gerekse yapısında oluşan değişiklikler "kromozom anomalisi" olarak isimlendirilirler. Genetik bilgiyi değiştirmeyen anomaliler klinik bulguya yol açmaz ve "dengeli kromozom anomalisi"; genetik bilgiyi değiştiren ve klinik bulgulara yol açanlar ise "dengesiz kromozom anomalisi " olarak adlandırılır (77).

### 2.2. Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırılması

Kromozom anomalileri, sayısal veya yapısal olabilir, tek ya da çok sayıda kromozomu, yalnızca otozom veya cinsiyet kromozomunu ya da hepsini birden ilgilendirebilir ve farklı sıklıklarla saptanır (Tablo 2-1)

**Tablo 2-1: Fetal veya postnatal yaşamın farklı evrelerinde kromozom anomalilerinin sıklığı-Thompson (77)'dan**

Anormal karyotip	İlk trimester abortus	35 yaş üzeri annelerin fetüsleri	Canlı doğumlar
Toplam sıklık	1/2	1/50	1/160
<b>Anomalilerin yüzdesi</b>			
Sayısal Anomaliler	96%	85%	60%
Yapısal Anomaliler			
Dengeli	-	10%	30%
Dengesiz	4%	5%	10%

### 2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

Genellikle gamet hücrelerinde oogenez veya spermatogenezde I. ya da II. Mayoz bölünme sırasında, ender olarak da postzigotik mitotik bölünmelerde oluşan hatalar (nondisjunction veya anafaz lag) sonucunda, diploid sette kromozom sayısında artış ya da azalma ile kendini gösteren anomaliler “sayısal kromozom anomalisi” olarak tanımlanır (24).

Sayısal anomaliler; anöploidi ve poliploidi olmak üzere iki grupta değerlendirilir (32).

#### 2.2.1.1. Anöploidiler

Anöploidiler, mayoz veya mitoz bölünmede meydana gelen ayrışma hatalarının yol açtığı, diploid bir hücrede tek bir kromozomun artması ( $2n+1$ =trizomi) ya da eksilmesi ( $2n-1$ =monozomi) ile oluşur (24). Klinik olarak gösterilmiş gebeliklerin en az %3 ile %4'ünde anöploidi olduğu bildirilmektedir. Moleküler genetik çalışmalar, trizomilerin mayoz I ve II de meydana gelen non-disjunction, monozomilerin ise anafazda geri kalma ile oluştuğu gösterilmiştir (77).

İnsanoğlunda ilk tanımlanan kromozom anomalisi olan trizomi 21, 1/700'lük insidansla canlı doğumlarda en sık görülen trizomidir. Bunu cinsiyet kromozom anöploidileri 47,XXY, 47,XYY ve 47,XXX izler. 18. ve 13. kromozomların trizomileri canlı doğumlarda görülebilse de daha çok spontan abortus olgularında görülür. Canlı doğumlarda görülen tek monozomi örneği, Turner Sendromu' na yol açan X kromozomu monozomisidir (45,X). Otozom monozomileri letaldir ve bu nedenle canlı doğumlarda görülmez.

### 2.2.1.2. Poliploidiler

Kromozom haploid set sayısının ( $n=23$ ) katları halinde artışı ile ortaya çıkan (triploidi= $3n$ , tetraploidi= $4n$ ) sayısal kromozom anomalilerine poliploidi denir (24). Poliploidiler, daha çok spontan abortus materyallerinde görülürler.

### 2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri

Yapısal kromozom anomalileri, kromozomlarda oluşan kırılmalar sonucunda kaybolma, artma ya da yeniden düzenlenmelerle ortaya çıkarlar. Yapısal kromozom anomalilerinin yenidoğandaki sıklığı yaklaşık  $1/450'$  dir (81). Yapısal anomaliler ailevi olabilecekleri gibi, yeni de (*de novo*) oluşabilir. Yeni oluşumlar iyonize radyasyon, bazı viral enfeksiyonlar ve bazı kimyasallar gibi kırığa neden olan ajanlarla indüklenebilecekleri gibi kendiliğinden de oluşabilir (77).

#### 2.2.2.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri

Dengeli yapısal anomalilerde, kromozom setindeki genetik bilgide herhangi bir eksiklik veya fazlalık oluşmadığından fenotipin etkilenmesi beklenmemektedir. Ancak, *de novo* oluşan kromozom anomalilerinin, sitogenetik olarak dengeli görüldükleri halde moleküler düzeyde dengesiz olmaları durumunda klinik bulgulara yol açabildikleri bilinmektedir. İnversonlar ve translokasyonlar dengeli yapısal kromozom anomalilerindedir.

##### 2.2.2.1.1. İnversonlar

Bir kromozomda 2 kırık ile oluşan segmentinin ters dönerek, aynı bölgeye girip birleşmesiyle meydana gelen kromozom içi yapısal anomaliler inversonlar olarak adlandırılır. Anomali, segment sentromer içeriyorsa "perisentrik inverson", sentromer içermiyorsa "parasentrik inverson" olarak adlandırılır. Perisentrik inversonlarda kromozomun p/q kol oranında değişim olduğundan sitogenetik tanı oldukça kolaydır. Parasentrik

inversiyonlar ise kol oranında değişim olmadığından ancak bant yapısındaki değişim ile tanınabilirler. İversiyonlar genellikle taşıyıcılarda anormal bir fenotipe neden olmazlar, ancak taşıyıcıların dengesiz gamet oluşturma riski yüksektir.

En sık görülen inversiyon, 9 numaralı kromozomun p11q12 heterokromatin bölgesini içeren perisentrik inversiyondur. Bu inversiyon fenotipi etkilemediğinden ve ayrıca fetal kayıplar veya dengesiz karyotipli çocukların doğmasına ilişkin önemli bir risk oluşturmadığından normal varyant veya polimorfizm olarak kabul edilir (24, 77, 22).

#### **2.2.2.1.2. Translokasyonlar**

Bir kromozomun veya kromozom segmentinin aynı karyotip içinde başka bir kromozom üzerinde bulunması translokasyon olarak tanımlanır. Resiprokal, Robertsonian ve insersiyonal olmak üzere üç ana grupta incelenirler.

##### **2.2.2.1.2.1. Resiprokal Translokasyonlar**

Homolog olmayan iki kromozom arasında karşılıklı parça değişimi “resiprokal translokasyon” olarak adlandırılır. Genellikle en az iki kromozom arasında, iki kırık oluşumu ile meydana gelir ve toplam kromozom sayısı değişmez. Genellikle dengeli anomalilerdir ve klasik bantlama teknikleri ile tanınabilirler. Resiprokal translokasyonlar, yaklaşık olarak 600 yenidoğanda 1 görülürler (4).

##### **2.2.2.1.2.2. Robertsonian Translokasyonlar**

İki akrosentrik kromozomun kısa kollarını kaybederek sentromer ya da sentromere yakın bölgeden birleşmesiyle oluşur. Akrosentrik kromozomların kısa kollarında, p11 bölgesinde satellit DNA’lar I, II, III, IV, ve  $\beta$ ; p12

bölgesinde 18S ve 28S ribozomal RNA'yı kodlayan genlerin tekrar dizileri; ve p13 bölgesi  $\beta$ -satellit DNA ve telomerik diziler ile sonlanmaktadır (5, 54). Bu nedenle kısa kol kayıplarında fenotipin etkilenmesi beklenmemektedir. Dengeli Robertson tipi translokasyon taşıyıcılarında total kromozom sayısı 45'dir. Genel popülasyonda görülme sıklıkları 1/1000'dir. Tüm akrosentrik kromozomlar arasında Robertson tipi translokasyon kombinasyonları saptanmakla birlikte en sık görülen iki tip 13q14q (~1/1300) ve 14q21q translokasyonlarıdır. Bunlar tüm Robertsonian translokasyonların yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (68, 25).

Dengeli Robertson tipi translokasyon taşıyıcıları fenotipik olarak normal olmalarına karşın dengesiz gamet verme olasılıkları yüksektir; trizomik ve monozomik zigotlar ortaya çıkar. Homolog kromozomların Robertson tipi translokasyonları için taşıyıcı olanların sağlıklı ürün şansı yoktur.

#### **2.2.2.1.2.3. İnsersiyonal Translokasyonlar**

İnsersiyonal translokasyonlar, iki kırık noktası ile serbest kalan intersisyal bir kromozom parçasının, oluşan üçüncü bir kırık noktasına girerek birleşmesi ile oluşur. Bu olay aynı bir kromozom üzerinde ya da farklı kromozomlar arasında oluşabilir (22).

#### **2.2.2.2. Dengesiz Yapısal Kromozom Anomalileri**

Genetik materyalde kayba ve/veya artışa yol açan yeniden düzenlenmelerde, klinik bulgular ortaya çıkar ve bulguların şiddeti olaya katılan kromozom bölgesinin büyüklüğü ve o bölgedeki fonksiyonel genlerle doğrudan ilişkilidir. Başlıca dengesiz yapısal kromozom anomalileri; delesyonlar, duplikasyonlar, marker ve ring kromozomlar, izokromozomlar ve disentrik kromozomlardır.

### 2.2.2.2.1. Delesyonlar

Delesyon bir kromozom parçasının kaybı ile kısmi monozomi oluşmasıdır. Klinik etkileri genellikle, delesyona uğrayan parçanın büyüklüğü ve bu parçadaki genlerin sayısı ve işlevine bağlıdır. Çok büyük delesyonlar, özellikle total genomun %2'sinden fazlasının kayba uğradığı kromozom anomalileri genellikle yaşarla bağdaşmazlar. Sitogenetik olarak görülebilen otozomal delesyonların yeni doğandaki sıklığı yaklaşık olarak 1/7000'dir (77, 52).

Delesyonlar, terminal veya intersisyel olabilir. Delesyonlar, basit olarak kromozom kırılması ve asentrik kısmın kaybolması ile ya da homolog kromozomlar veya kardeş kromatidler arasında eşit olmayan crossing over sonucu oluşabilirler. Dengeli translokasyon veya inversiyon taşıyıcılarının verdiği dengesiz gametlerde de delesyonlar ortaya çıkabilir.

### 2.2.2.2.2. Duplikasyonlar

Duplikasyon, bir kromozom segmentinin genomda 3 kez bulunması ve parsiyel trizomiye yol açmasıdır. Duplikasyonlar da delesyonlarda olduğu gibi, eşit olmayan krosing-over sonucunda oluşabilir ya da translokasyon veya inversiyon taşıyıcılarının gebelik ürünlerinde görülebilir. Duplikasyondan etkilenmiş fenotipler delesyondan etkilenmiş fenotiplere oranla daha hafiftir (24).

### 2.2.2.2.3. Halka Kromozomlar

Aynı bir kromozomun iki kolunda oluşan 2 kırık noktasının birleşmesiyle oluşan halka şeklinde kromozomlardır. Sonuç olarak her iki kolunda terminal uçlarının delesyonu söz konusudur (24). Ender görülmelerine karşın insandaki her kromozomun halka kromozomu bildirilmiştir. Eğer halka

kromozom bir otozom kromozomdan oluşursa klinik tablo ağır, fakat cinsiyet kromozomları ile ilgili ise daha hafif bulgu verir. Halka kromozomu en sık X kromozomunda görülür.

#### **2.2.2.2.4. İzokromozomlar**

İzokromozom, sentromerin her iki tarafında aynı kromozom kolunun bulunduğu kromozomlardır. Genomda, kromozomun bir kolu için monozomi, diğer kol için trizomi söz konusudur. Karyotipte, homolog kromozom çiftine ek olarak bir izokromozom bulunuyorsa, bu kromozom kolu için olgu tetrazomiktir (24, 77).

#### **2.2.2.2.5. Disentrik Kromozomlar**

Disentrik kromozomlar, sentromer içeren iki kromozom parçasının (farklı kromozomlardan veya bir kromozomun iki kromatidinden) sentromeri bulunmayan parçalarını kaybederek uç uca eklenmeleriyle oluşan nadir görülen bir kromozom anomalisidir. Bu kromozomlar, parasentrik inversiyon taşıyıcılarının dengesiz ürünlerinde de görülebilirler. Disentrik kromozomlar, çift sentromer taşımalarına rağmen, sentromerlerden biri inaktiftir ve mitotik olarak stabildir (77).

#### **2.2.2.2.6. Marker Kromozomlar**

Marker kromozomlar, normal kromozom setine ek ve çoğunlukla mozaik olarak bulunan, klasik sitogenetik yöntemlerle tanınamayan kromozomlardır. Genel populasyonda görülme sıklıkları yaklaşık olarak 2000 kişide 1'dir (71). Marker kromozomlar etkilenmiş bireylerde saptandığı gibi normal fenotipli bireylerde de görülmektedir. Bunun nedeni sentrik heterokromatinden oluşan marker kromozomların fenotipi etkilememesidir. Ökromatin materyali taşıyanlar ise ağır klinik bulgulara neden olurlar. Bu

nedenle marker kromozomların kökenlerinin belirlenmesi ve ökromatin materyal taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi son derece önemlidir. Bu araştırmada moleküler sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır.

Marker kromozomlar, X/Y ya da otozom kromozomlarından köken alabilir. Otozomal kökenli markerlar içinde en sıklıkla (~ %40)görülen 15'inci kromozom kökenli olan disentrik kromozomlardır (39). Çoğunlukla inv dup(15) olarak belirtilen bu markerlar, 15'inci kromozomun kısa kolunu iki kopya olarak ters biçimde taşıyan çift satellitli markerlardır. Tüm inv dup(15) markerlar çift sentromerlidirler (68). Marker kromozomun ökromatin materyali içerip içermediğine bağlı olarak fetal anomali riski çok düşükten %100'e kadar geniş bir dağılım gösterebildiğinden genetik danışmada problemlere yol açabilir (77).

#### **2.2.2.2.7. Mozaisizm**

Mozaisizm, bir organizmada aynı zigottan kaynaklanan ancak genetik yapıları farklı birden fazla hücre dizisinin birlikte bulunmasıdır. Bu durum, zigotun geçirdiği mitoz bölünmelerde yeni bir mutasyon oluşmasından kaynaklanır. Mozaisizm, tek gen ya da kromozomal, ya da dokusal olabilir. Fenotipik olarak etkilenmiş bireylerde yapılan çalışmalarda, lenfositlerde normal bir kromozom seti (örneğin, Pallister-Killian sendromunda olduğu gibi) saptanmasına karşın fibroblast kültürlerinde farklı kromozom yapısı gösteren hücre dizisi gösterilmiştir. Mozaisizmin bireyin gelişmesine olan etkilerini değerlendirmek, özellikle prenatal tanıda saptandığında çok güçtür. Bu etkiler, kromozom anomalisinin türü, non-disjunction olayının zamanı, anomalili hücrelerin oranları ve etkilenen dokulara bağlı olarak değişir (24, 55, 56, 78).

### 2.3. Kompleks Kromozom Anomalileri (CCRs)

Kompleks kromozom anomalileri (complex chromosomal rearrangements: CCRs), en az iki kromozomda en az üç kırıkla oluşan yeniden düzenlenmelerdir. Çoğunlukla *de novo* oluşan bu anomaliler nadiren ailevi de olabilmekte, dengeli yada dengesiz olarak görülmektedir. *de novo* CCRs sıklıkla multipl konjenital anomali ve mental retardasyonlu bireylerde, dengeli anomaliler ise kötü obstetrik öykülü çiftlerde saptanmaktadır. Kırık noktalarının sayısı arttıkça etkilenme olasılığı da artmaktadır (22, 14, 27).

FISH çalışmalarının yaygın olarak kullanılmasından önce kompleks kromozom anomalileri, kırık noktalarının sayısı, ailevi yada *de novo* oluşu ve anomaliye katılan kromozom sayısı gibi kriterlere göre sınıflandırılmıştır. Kleczkowska ve ark. (36) kompleks kromozom anomalilerini kökenlerine göre ailevi veya *de novo* olarak, Kousseff ve ark. (40) ise kırık sayısına göre gruplandırmışlardır. Kousseff ve arkadaşlarına göre; 3-4 kırıkla oluşanlar "1. grup", en az 5 kırık ile oluşanlar ise "2. grup" olarak sınıflandırılmaktadır (36, 40).

FISH çalışmalarının yaygın olarak kullanılması ile birlikte en kabul gören sınıflandırma Gardner ve Sutherland (22) tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre kompleks kromozom anomalileri 3 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar;

- Three way exchange (Üç kırıklı değişim): 3 kromozomun katıldığı, 3 kırıkla oluşan yeniden düzenlenmeler
- Complicated CCRs (Komplike CCRs) : Kırık sayısının anomaliye katılan kromozom sayısından daha fazla olduğu komplike yeniden düzenlenmeler
- Simple CCRs (Basit CCRs) : 2 bağımsız, basit düzenlenmenin bir arada görüldüğü anomalilerdir (22).

## 2.4. Kromozom Anomalilerinin Tanı Yöntemleri

İnsan organizmasında nukleusu olan, bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokular kromozom çalışmalarında kullanılabilir. Metafaz kromozomları spontan mitotik aktivitesi olan dokulardan (kemik iliği hücreleri ve koryon vilusların sitotrofoblast hücreleri) direkt olarak, diğer dokulardan ise in vitro hücre kültürleri sonrasında elde edilir. Elde edilen metafazlar, klasik bantlama teknikleri ile değerlendirilir. En yaygın bantlama yöntemi G bantlama olup gerekli durumlarda diğer (Q, C, R bantlama, NOR boyama) teknikler de uygulanır. Prometafaz kromozomları metafaz kromozomlarına oranla daha uzun olduklarından daha fazla bandın izlenmesine ve < 5 mb büyüklüğünde anomalilerin tanınmasına olanak sağlamaktadır. "High Resolution Banding Technique" (HRBT) olarak adlandırılan bu teknik özellikle yapısal kromozom anomalisi beklenen olgularda uygulanmaktadır.

1980'li yılların sonlarında, moleküler genetik alanındaki gelişmeler sonucunda elde edilen özgün DNA parçacıklarının tel iplikli hale getirilerek florokromlarla işaretlenmesi ve prob adını alan bu yapıların kromozomlarla hibridizasyonu esasına dayanan FISH yöntemi, klasik uygulamalarla tanınamayan pek çok kromozom anomalisinin tanınmasını sağlamıştır (30, 58)

### 2.4.1. Klasik Bantlama Yöntemleri

#### 2.4.1.1. G Bantlama

Kromozom analizlerinde en yaygın kullanılan bantlama yöntemidir. Tekniğin temeli, kromozom üzerindeki yapısal histon ve non-histon proteinlerin bir proteaz (tripsin, pankreatin vb.) yardımı ile denatürasyonunun ardından Giemsa (GTG) veya Leischman (GTL) ile DNA'nın Adenin ve Timin bazlarından zengin heterokromatin bölgelerinin koyu boyanması esasına dayanır. Guanin ve Sitozin bazlarından zengin ökromatin bölgeler ise açık boyanır. GTG bantlama ile haploid genomda metafaz evresinde yaklaşık 400-500 bant görülebilmekte ve bu da yaklaşık 5-10 Mb'lık (bant başına yaklaşık 50

gen) kromozomal değişimlerin tanınabilmesini sağlamaktadır. HRBT tekniği ile, izlenebilen bant sayısı daha da artmaktadır.

#### **2.4.1.2. Q Bantlama**

DNA'nın AT bazlarınca zengin bölgelerinin seçici olarak quinacrine veya atebrin gibi AT-özgün floresanlı boya maddeleri ile boyanarak floresan mikroskobu altında parlak bantların elde edilir. Q bant adı verilen bu teknik ile, tüm sentromerler, 1, 9, 16. kromozomların perisentromerik bölgeleri, akrosentrik kromozomların sentromer ve satellit bölgeleri ile Yqh bölgeleri parlak boyanır ve bu nedenle heteromorfizm çalışmalarında kullanılır (11, 12, 50).

#### **2.4.1.3. C Bantlama**

Kromozomların asid ve baryum hidroksid gibi bir alkali ile muamelesi ile ökromatik bölgelerin yapısının bozulması sağlanır ve bunu takiben Giemsa ile boyanması ile kromozomların sentromerik bölgeleri ile başta 1, 9, ve 16 nolu kromozomlar olmak üzere perisentromerik bölgeler ve Y'nin q kolunun terminal bölgesi koyu boyanır. Gen içermeyen ve transkribe olmayan konstitutif heterokromatini pozitif boyayan bu teknik polimorfizm çalışmaları, sentromere yakın kromozom anomalilerinin ve marker kromozomlarında ökromatin varlığının araştırılmasında kullanılır (75).

#### **2.4.1.4. R Bantlama**

R bantlama tekniği, GTG ile koyu boyanan kromozom bölgelerinin açık, açık boyanan kromozom bölgelerinin ise koyu boyanmasını sağlar. Boyama için floresanlı bir boya olan akridin turuncusu veya Giemsa kullanılır. Ökromatin bölgelerinin koyu boyanmasını sağlayan bu teknik, G bantlama ile açık boyanan ve saptanması zor olan terminal değişimleri belirlemek için kullanılır. İnaktif olan X kromozomunun daha soluk boyanmasını sağlayan bu

teknik, translokasyon tipi yapısal X anomalilerinde bu kromozomun inaktif olup olmadığı gösterir.

#### **2.4.1.5. NOR Boyama (Nuclear Organizer Region)**

Akrosentrik kromozomların satellit bölgeleri nukleolus organizasyonundan sorumlu (Nucleolar Organizer Region), rRNA kodlayan genlerin çok sayıda kopyasını içerir. Bu bölgeler gümüş nitrat ile koyu boyanır. Kişiden kişiye farklı boyanma özellikleri gösterebilen bu bölgelerin boyanmasında kullanılan NOR boyama tekniği, polimorfizmlerin gösterilmesi ve marker kromozomların satellit içerip içermediğinin anlaşılmasında kullanılır.

#### **2.4.2. HRBT (High Resolution Bantlama Tekniği)**

Metafaz kromozomlarının sahip oldukları bant seviyesi kromozom analizlerinde ancak 5 mb' den daha büyük anomalilerin tanınmasına olanak sağlamaktadır ancak bu teknik, >550 bant içeren prometafaz hatta profaz kromozomlarının incelenmesini mümkün kılmaktadır ve bu da daha yüksek bant seviyesinde analiz yapılabilmesini sağlamaktadır. İlk olarak 1976'da Yunis, tarafından geliştirilen bu yöntem, lenfosit hücre kültürünün metotraksat ile senkronize edilerek kromozomların daha az kondanse oldukları prometafaz evresinde elde edilmesi temeline dayanır (89). Senkronizasyon için, hücre döngüsü erken bir evrede, kimyasal bir madde (MTX ve BrdU) ile bloke edilir. Daha sonra bu blok kaldırılarak tüm hücrelerin eş zamanlı bölünmeye uyarılması sağlanmaktadır. Sitogenetik laboratuvarlarında HRBT'nin daha sık kullanılmaya başlanması ile birlikte kromozomların bazı yapısal yeniden düzenlenmeleri alt bantlar düzeyinde tanımlanabilmiş ve bazı genetik sendromların kromozomlardaki mikrolezyonlarla ilişkisi ortaya çıkarılmıştır.

### 2.4.3. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)

Kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılan klasik bantlama yöntemlerinin, kompleks anomalilerin (mikrodelesyon ve duplikasyonlar, inversiyonlar, insersiyonlar vb.) aydınlatılmasında yetersiz kalması üzerine araştırcılar yeni teknikler geliştirme yoluna gitmişlerdir. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden birisi de kromozomların belli bölgelerine özgül DNA dizilerinin (prob) enzimatik yolla floresan veren maddelerle işaretlenerek DNA ile hibrid oluşturması ve mikroskopta görüntülenmesi esasına dayanan “floresan *in situ* hibridizasyon= FISH” tekniğidir (58).

Bu yöntemin çıkışı 1969 yılında birbirlerinden bağımsız çalışan Gall (30) ve Pardue'nin (58) yapmış oldukları ribozomal problemlerini *Xenopus laevis* nükleusundaki DNA'ya hibridize etmeleri ile başlamıştır. John ve ark. (33), radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş problemlerini, denatüre edilmiş sitolojik preparatlarda hedef hücre DNA'sı ile hibridize etmişler ve otoradyografiden sonra hibridizasyon bölgelerinin gümüş partiküllerle işaretlendiğini göstermişlerdir. <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S gibi radyoizotoplar tekniğın kullanıldığı ilk dönemlerde problemlerin işaretlenmesinde kullanılmaktaydı, ancak radyoizotoplar birçok açıdan dezavantaja sahiplerdi. Radyoaktif moleküllerin hibridizasyon alanı dışına saçılmaları, zararlı olmaları, ömürlerinin kısa olması ve radyoaktif işaretlemenin uzun zaman alması araştırcıları yeni işaretleme tekniklerinin geliştirilmesine yönlendirmiş ve nükleik asitlerin işaretlenmesinde nonizotopik floresan ve enzimatik özellikli moleküller kullanılmaya başlanmıştır.

Rigby ve ark. (62) 1977 yılında DNA klonlama teknikleriyle elde edilen problemlerin işaretlenmesi için yeni bir teknik geliştirdiler. “Nick translasyon” adı verilen bu teknikle problemlerin radyoaktif ve non-radyoaktif moleküllerle işaretlenmesi sağlandı (62).

İlk radyoaktif olmayan işaretlemeyi Langer 1981 yılında nick translyon yöntemiyle biotin kullanarak gerçekleştirmiştir. Bu sistemin esası dTTP nin biotinlenmiş analogu olan biotin ( d ) UTP ile yer değiştirmesine dayanmaktadır (41, 42). Biotinin yanısıra digoksinin, sulfonat ve floresin gibi floresan işaretleme moleküllerinin de kullanılmaya başlanması ile In situ hibridizasyon tekniği, Floresan In Situ Hibridizasyon tekniği adını almıştır.

Sitogenetik ile moleküler genetik arasında bir köprü oluşturan FISH tekniği sitogenetik tanıda önemli bir tamamlayıcı olarak hızla kullanım alanı bulmuştur. Moleküler genetikteki ilerlemeler çok sayıda özgün DNA dizilerinin klonlanmasına olanak sağlamış ve bu sayede belirli bölgelere özgün tek iplikli DNA oligonükleotidleri (prob) elde edilmiştir. Bu problemlerin, metafaz kromozomlarında ya da interfaz nükleus DNA'sına hibridizasyonu sayesinde özgün bölgeler görüntülenebilmiştir. FISH, standart bantlama teknikleri ile tanımlanamayan 5mb dan küçük kromozom anomalilerinin (submikroskopik delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar) aydınlatılmasında vazgeçilmez bir teknik olmuştur.

Probların işaretlenmesi, prob ile hibridize edilecek materyalin fikse edilerek preparatlara yayılması, prob ile hedef dokunun denatüre edilmesi, denatüre edilen prob ile hedef DNA'nın hibridizasyonu, hibridizasyon sonrası yıkamalar ve immunokimyasal ve mikroskopi yöntemleri ile hibridizasyonun görünür hale getirilmesi FISH tekniğinin temel basamaklarını oluşturur.

#### **2.4.3.1. Problemler**

Problar, ilk olarak klonlama teknikleri ile oluşturulmuştur. Genomdan izole edilen bir DNA parçasının, uygun vektörlere yüklenerek, bakteri hücrelerinin içerisine sokulup hücre içinde çoğalması ile problemler üretilmiştir. Daha büyük fragmentler, kozmid, Bacterial Artificial Chromosomes (BAC), veya Yeast Artificial Chromosomes (YAC) gibi amaca uygun vektörler içine

yerleştirilerek bakteri veya maya gibi konak hücreler içerisinde çoğaltılırlar (51).

#### 2.4.3.1.1. Prob Çeşitleri

FISH tekniğinde kullanılan problar çok çeşitlidir. Kromozom üzerindeki hedef bölgelerine göre problar başlıca 3 sınıfa ayrılırlar;

- Lokusa özgü problar (kozmid problar),
- Tekrarlayan dizilerden oluşan problar (sentromerik veya alfa satellit problar)
- Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problar (painting veya whole chromosome painting problar) (13).

##### 2.4.3.1.1.1. Lokusa Özgü Problar

İnterfaz nukleusunda ya da metafaz kromozomlarında bir gene veya genin içindeki bir bölgeye ait özgün DNA dizilerinden oluşan ortalama 15-500kb büyüklüğünde problardır (Şekil 2-1). Daha çok mikrolelesyonların ve duplikasyonların saptamasında (DiGeorge Sendromu, Miller-Dieker Sendromu, Prader Willi/Angelman Sendromu vb) ve kırık noktalarının belirlenmesinde kullanılmakta ve ticari olarak satılmaktadır (80).

##### 2.4.3.1.1.2. Tekrarlayan Dizi (Satellit) Probları

İnsan DNA'sı büyük ölçüde tekrarlayan diziler içermektedir. Bu tekrar dizileri ve satellit bölgeleri total genomun %10-20'sini oluşturmaktadır. Kromozomların sentromerik ya da perisentromerik bölgelerinde  $10^5 - 10^6$  baz çifti uzunluğunda tekrar dizileri vardır. Bunlar alfa-satellit, beta-satellit ya da diğer satellit DNA dizilerinden oluşur ve çoğu, her kromozom için özgündür (48).

Tekrarlayan dizilere özgün problar; "sentromerik", "beta satellit", "klasik satellit" ve "telomerik" problar olarak gruplandırılır (Şekil 2-1). Alfa

satellitlere özgün sentromerik proplar bütün kromozomların sentromerlerine özgün tekrarlayan monomer dizilerdir. 1–170 kb büyüklüğündeki bu proplar güçlü sinyal verirler ve bu özelliklerinden dolayı interfaz FISH incelemeleri ile fetal anöploidilerin hızlı tanısında kullanılmaktadır. Ayrıca cinsiyete bağlı hastalık endikasyonu bulunan hastalarda hızlı cinsiyet tayini için, marker ve halka kromozomlarda da sentromerik kökeninin araştırılması için kullanılmaktadır (76). Beta satellit proplar, perisentrik heterokromatin bölgelere, akrosentrik kromozomlara ve 9. kromozoma lokalize olurken, biyolojik olarak kişiden kişiye farklılık gösterdiklerinden alfa satellit proplardan ayrılırlar. Klasik satellit propları, AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, 15 ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgü DNA dizilerinden oluşur (86, 82).

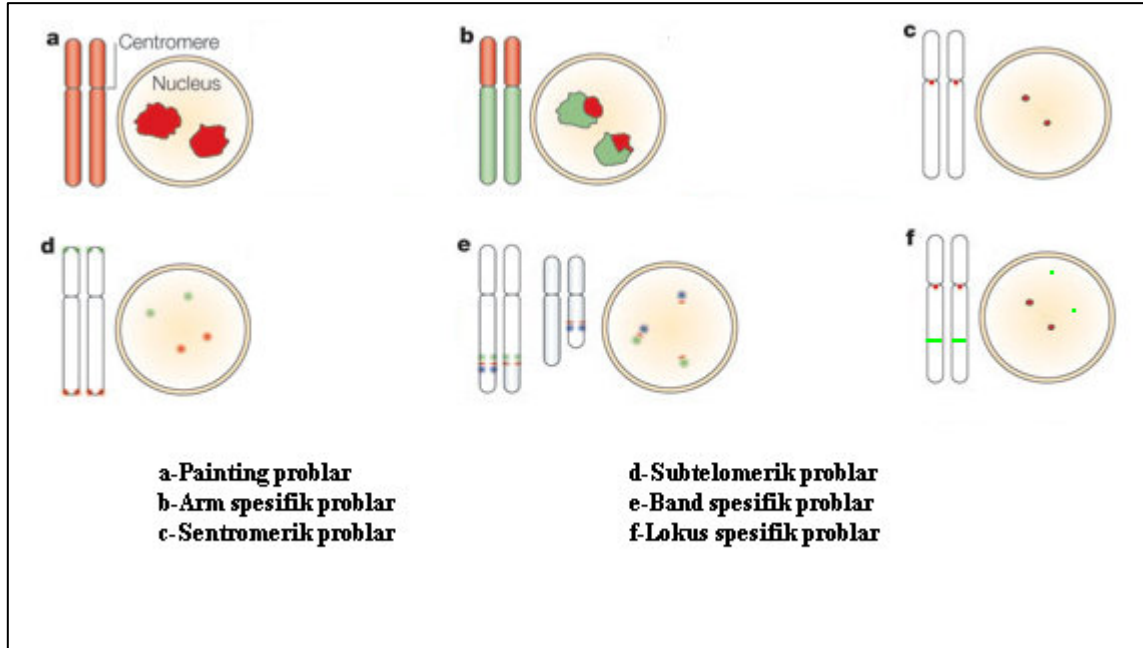
Ökaryotik kromozomlar telomerlerle sonlanır. İnsanlarda telomerler, toplam 2-15kb büyüklüğündeki 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşur. Bu dizi kromozom ucunu korumak ve onarmak için gerekli olan nükleoprotein kompleksini oluşturur (38). Telomerik proplar bu tekrarlayan dizilere özgün proplardır. Telomer bölgeleri, GTG bantlamalarında açık renk boyanan bölgelerdir ve bu nedenle olası kriptomik değişimlerin tanınması oldukça zordur (37). Telomerlerin yapısında tekrar bölgelerinin distalinde kromozoma özgün ve işlevsel genler açısından zengin subtelomerik bölgeler bulunmaktadır. Son yıllarda, bu bölgeleri içeren dengesiz yeniden düzenlenmelerin yol açtığı yeni sendromlar tanımlanmaktadır. Telomerik bölgelerle yapılan çalışmalar bu tür düzenlenmelerin mental retardasyonun önemli nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir (63).

#### **2.4.3.1.1.3. Kromozomun Tümünü Boyayan (Painting) Proplar**

Bir kromozomun tümünü kapsayacak şekilde farklı bölgelerine özgün DNA dizilerinden oluşturulan prob karışımı hazırlanır ve kromozomun p

terminalinden q terminaline kadar tümünün boyanması sağlanır (Şekil 2–1). Painting (whole chromosome paintig – wcp) problar, flow sitometri yardımıyla tek tek izole edilen kromozomların PCR ile çoğaltılmasıyla, monokromozomal hücre hibritlerinden ve kromozom kütüphaneleri kullanılarak elde edilir (48, 46, 21).

Mikrodiseksiyon yönteminin giderek gelişmesiyle painting probların üretimi ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Bu gelişimin doğrultusunda kromozomların her bir kolunu ayrı renklerde boyayabilen “arm spesifik problar” ve kromozomların belli bir bandını ya da her bandını ayrı ayrı boyayabilen “bant spesifik problar” üretilmiştir (Şekil 2–1) (66).



Şekil 2-1: Prob çeşitleri – Speicher (70)'den değiştirilerek

#### 2.4.3.1.2. Probların Elde Edilmesi

DNA'nın herhangi bir bölgesinin kopyalanması temel olarak 2 yolla yapılabilir. Bunlardan ilki hücre içi klonlama (cell-based cloning) diğeri ise polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction=PCR) tekniğidir.

Hücre içi klonlama tekniğinde hedef DNA molekülleri bir vektöre yerleştirilir ve uygun konak hücreye transfer edilir (transformasyon). Hibrid molekül (DNA-vektör molekülü), konak hücre içerisinde defalarca replikasyona uğrayarak klonlanır. Daha sonra klonlanmış olan DNA molekülü bulunduğu konak hücreden ve bağlandığı vektörden izole edilebilir (73).

PCR'la klonlama tekniğinde ise klonlanmak istenen DNA dizisi için bu diziyeye özgün primerler seçilir ve bu primerler ile uygulanan PCR işleminin döngü sayısının artmasıyla binlerce kopya elde edilmiş olur (73).

In situ hibridizasyon için geliştirilen ilk problemler, hücre için klonlama tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Konak hücre olarak yüksek kapasiteli hücre bölünme özelliklerinden dolayı bakteri hücreleri tercih edilmekle birlikte fungal hücreler de kullanılmaktadır (73).

Klonlanması istenen DNA dizisinin konak hücreye girip replike olmasını sağlayan vektörler ise 2 ana gruba ayrılır

- Plasmidler : Doğada çoğunlukla bakterilerde bulunmalarına rağmen ökaryotiklerde de olabilmektedirler (*S. Cerevisiae*). Plasmidler kromozomal DNA dan ayrı, kendi kendine çoğalabilen (self replicative) çoğunlukla çift iplikli DNA yapılarıdır. Çok az gen içeren küçük, dairesel, çift zincirli DNA molekülleridir. Hücre içerisinde fonksiyoneldirler.
- Bakteriyofajlar : Bakteri hücrelerini enfekte eden viruslerdir. Dairesel ya da lineer çift zincirli 5–500 kbp DNA'ya sahiptirler. Plasmidlerden farklı olarak hücre dışında da fonksiyoneldirler (3).

Prob eldesinde sıklıkla kullanılan vektörler şunlardır:

Plasmidler, bakteriyofaj  $\lambda$ , kozmidler, P1 bakteriyofaj, BAC, PAC, YAC'lar (Tablo 2–2).

**Tablo 2-2: Vektörler ve DNA taşıma kapasiteleri - Strachan (73)'den değiştirilerek**

Vektör	Taşıma kapasitesi
Plasmid Vektörler	0–10 kb
Bakteriyofaj $\lambda$	9–23 kb
Kozmidler	30–44 kb
P1 Bakteriyofaj	70–100 kb
BAC (bacterial artificial chromosome)	300 kb
PAC (P1 artificial chromosome)	150–300 kb
YAC (yeast artificial chromosome)	0.2–2.0 Mb

#### 2.4.3.1.2.1. Plasmidler

Plasmid kelimesi ilk olarak Joshua Lederberg tarafından 1952 yılında kullanılmış ve kromozom dışı genetik element (extra chromosomal genetic element) olarak tanımlanmıştır. Genellikle birkaç kilobazlık DNA parçacıklarının transformasyonunda kullanılmakla birlikte nadir olarak 5–10 kb'lık parçaların taşınmasında da kullanılabilirler. DNA taşıma kapasitelerinin düşük olması dezavantajlarıdır (64).

#### 2.4.3.1.2.2. Bakteriyofaj $\lambda$

Kendisine ait olmayan yabancı bir DNA parçası taşıması durumunda dahi hayat döngülerine devam edebilen Bakteriyofaj  $\lambda$ , içerisinde DNA'nın olduğu baş kısmı ve üzerinde fiberlerin olduğu kuyruk kısmından oluşur. Genomu çift zincirli lineer DNA molekülünden oluşmaktadır. Ve yaklaşık 45–48 kb'lık bir uzunluğa sahiptir. Bakteriyofaj  $\lambda$  genomu yaklaşık 30 genden oluşmaktadır. Bu genlerin bir kısmının görevi büyüme ve konak hücreyi parçalamakla ilişkilidir. Büyüme ve lizis ile ilgili olmayan genler kesilip atıldıktan sonra klonlanacak DNA,  $\lambda$  genomu içerisine eklenir ve hibrid genomun 2 ucuna tek zincirli 12 nükleotidlik (cos) uç oluşturulur. Bu bakteriyofaj  $\lambda$  genomu konak hücreye transforme edilerek konağın genomuna eklenir ve birlikte replike olur. Bu yöntemle 20 kb büyüklüğünde DNA parçaları taşınabilir (77, 64).

#### **2.4.3.1.2.3. Kozmidler**

Kozmid vektörler, standart plazmidlere cos dizisi eklenerek oluşturulur ve böylece taşıma kapasitesi 30–44 kb'a ulaşır (73, 15, 64).

#### **2.4.3.1.2.4. P1 Bakteriyofajlar**

P1 bakteriyofajların 70-100 kb'lık taşıma kapasiteleri vardır. Bu vektörler genel olarak genomic DNA parçalarının vektör kolları ile birlikte ligasyonu sonucu oluşturulurlar ve dolayısıyla liner bir DNA molekülü meydana gelir. Bu da viral partiküller içinde daha iyi işlenmeyi ve paketlenmeyi sağlar. Bakteriyofaj partiküllerinin sıkı paketlenmesi P1 bakteriyofajların DNA taşıma kapasitelerini arttırabilir (yaklaşık 110 kb) (26).

#### **2.4.3.1.2.5. Bakteri Yapay Kromozomlar (BAC: Bacterial Artificial Chromosomes)**

1992 yılında Shizuya ve arkadaşları tarafından geliştirilen, antibiyotik direnç geni taşıyan ve *Escherichia coli* F factor'den (fertilite faktörü) türetilen dairesel DNA molekülüdür. PAC'larla benzer özelliklere sahiptirler. 300 kb DNA taşıma kapasiteleri vardır. Yüksek kapasiteleri ve stabil kalabilmeli sayesinde genom kütüphanelerinin oluşturulmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Kimerizm ve DNA karasızlığı oranlarının düşük olmasıyla YAC'lardan ayrılırlar. (3, 74, 69).

#### **2.4.3.1.2.6. P1 Yapay Kromozomlar (PAC: P1 Artificial Chromosomes)**

Yapısal olarak P1 bakteriyofajlara özellik olarakta BAC'lara benzeyen dairesel DNA molekülleridir. 300 kb'ye kadar DNA'yı taşıyabilirler. Oldukça stabil bir yapıya sahiptirler. BAC'lara nazaran taşıdıkları DNA daha verimli bir şekilde izole edilebilir (64, 26).

#### 2.4.3.1.2.7. Maya Yapay Kromozomlar ( YAC: Yeast Artificial Chromosomes)

YAC'lar gerçek maya kromozomlarına benzer yapıda olan lineer DNA molekülleridir. Ortalama 1–2 Mb ile en yüksek DNA parçası taşıma kapasitesine sahip vektördür. Telomer, sentromer ve replikasyon bölgesi olmak üzere 3 ayrı bölgeye sahiptirler. Yüksek kapasitelerine rağmen kimerizm oranının fazla oluşu, nadiren eklenen DNA'nın maya genomuyla karışması sonucu izolasyonun zorlaşması ve karasızlığı gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (73, 9, 65, 74).

#### 2.4.3.2. Probların İşaretlenmesi

Radyoaktif olan problar otoradyografi ile non-radyoaktif olanlar ise immünokimyasal yollarla işaretlenmektedir.

Non-radyoaktif probların işaretlenmesinde "direkt" ve "indirekt" olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır.

##### 2.4.3.2.1. Direk İşaretleme

Aracı molekül direkt olarak proba bağlanır ve hibridizasyondan hemen sonra mikroskopta gözlenebilir (Şekil 2–2). En önemli nokta, prob ile aracı molekül arasındaki bağın ağır hibridizasyon ve yıkama koşullarına dayanabilmesidir. Ayrıca aracı molekülün hibridizasyonun duyarlılığı üzerine negatif etkisinin olmaması gerekmektedir (85). Bu yöntemde kullanılan problar küçük DNA dizilerinden oluştuğundan, sinyaller kısa ömürlü olmakta ve görüntülemeye problemlere neden olmaktadır. Ancak çok renkli FISH uygulamaları için elverişli olması ve hibridizasyon yöntemini hızlandırması nedeniyle direkt yöntem, prenatal tanıda ve preimplantasyon uygulamalarında tercih edilmektedir (18, 61, 84).

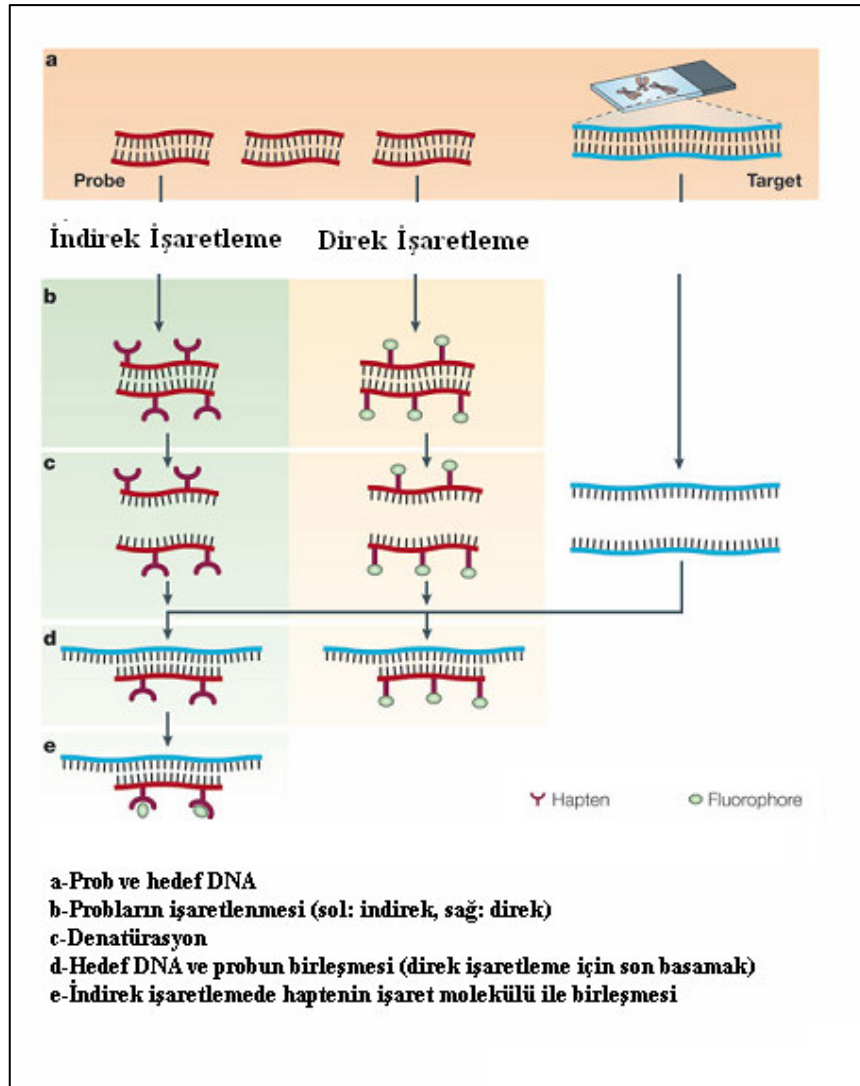
En sık kullanılan aracı moleküller;

Floresan 2'-deoksiüridin trifosfat 5' (d-UTP)

Rhodamin d-UTP ve Kumarine d-UTP'dir.

### 2.4.3.2.2. İndirekt İşaretleme

Aracı molekül, kimyasal veya enzimatik olarak proba bağlanır (Şekil 2–2). Sinyalin görünür hale gelmesi immunohistokimyasal afinite reaksiyonları ile sağladığından görüntüleme dolaylı yoldan gerçekleşir (6, 57). İndirekt yöntemde sıklıkla biotin-avidin, biotin-streptavidin, digoksinin ve dinitrofenol kullanılır (8, 41, 44). Direkt yöntemde göre daha hassastır ve prob boyunca bağlanan haptent sayısı daha fazla olduğu için sinyal çok daha kuvvetlidir. Ancak hibridizasyon sonrası yıkama aşamalarının direkt işaretleme yöntemine göre biraz daha uzun ve non spesifik sinyallerin daha fazla olması yöntemin dezavantajıdır.



Şekil 2–2: Direkt ve indirekt İşaretleme - Speicher (70)'den değiştirilerek

### 2.4.3.3. Prob İşaretleme Teknikleri

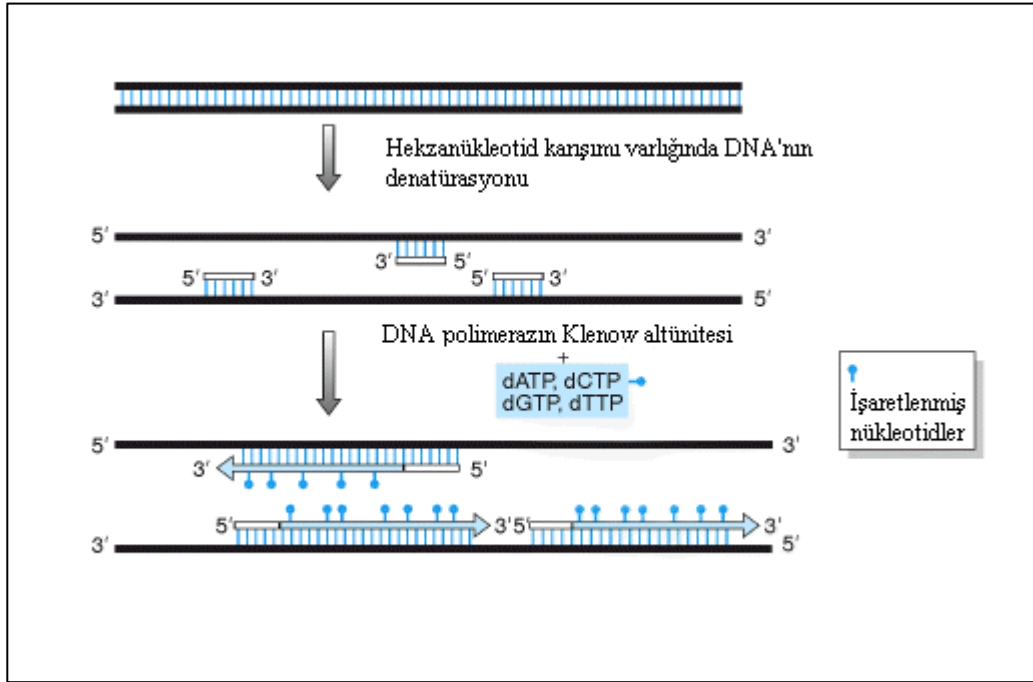
#### 2.4.3.3.1. Rasgele Seçilmiş Primerlerle DNA İşaretlenmesi (Random Primed DNA Labelling)

Bu teknik aynı zamanda “oligolabeling” olarakta bilinmektedir. 10 ng’dan 3 µg’a kadar olan DNA fragmentleri bu yöntemle işaretlenebilir (20). Her 20–25 nükleotidde bir modifiye nükleotid (digoksinin-, biotin-, veya floresan-dUTP), yeniden sentezlenen DNA probunun içine sokulur. Böylece probun yüksek duyarlılıkta işaretlenmesi sağlanmış olur.

Random primed işaretleme reaksiyonu olası tüm hekzanükleotidlerin (6 nükleotid) karışımının hibridizasyonuna dayalıdır (Şekil 2–3). Başlangıç olarak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir ve yavaşça soğutulur. Bu arada kalıp DNA doğrusal hale getirildikten sonra denatüre edilir ve hekzanükleotid primerler tek tek komplementer bölgelerine bağlanırlar. Başlangıç olarak, primer kalıp DNA’nın 3’-OH ucuna bağlanır ve bu bağlanmayı takiben Klenow enzimi, 5’→3’ polimeraz aktivitesi ile tek zincirli DNA’yi kalıp olarak kullanarak yeni DNA’yı sentezler. DNA sentezi biri işaretli olmak üzere 4 dNTP’nin varlığında meydana gelir. Ortamda bulunan işaretli nükleotidlerin, yeni sentezlenen DNA’ya yerleşmesi ile kalıp DNA işaretlenmiş olur. Bir saatlik reaksiyon sonrasında 200–1000 bp uzunluğunda işaretlenmiş DNA fragmentleri elde edilir (73).

#### 2.4.3.3.2. Nick Translasyon İle DNA İşaretlemesi

Rigby ve ark. (62) tarafından geliştirilmiş olan Nick translasyon yöntemi nükleik asitlerin radyoaktif ve non-radyoaktif moleküllerle işaretlenmesinde en sık kullanılan tekniktir. İşaretlenecek dizi eklendiği vektörden ayrılmış bir DNA parçası olacağı gibi rekombinant molekülün (vektör + DNA) tamamı da olabilir.



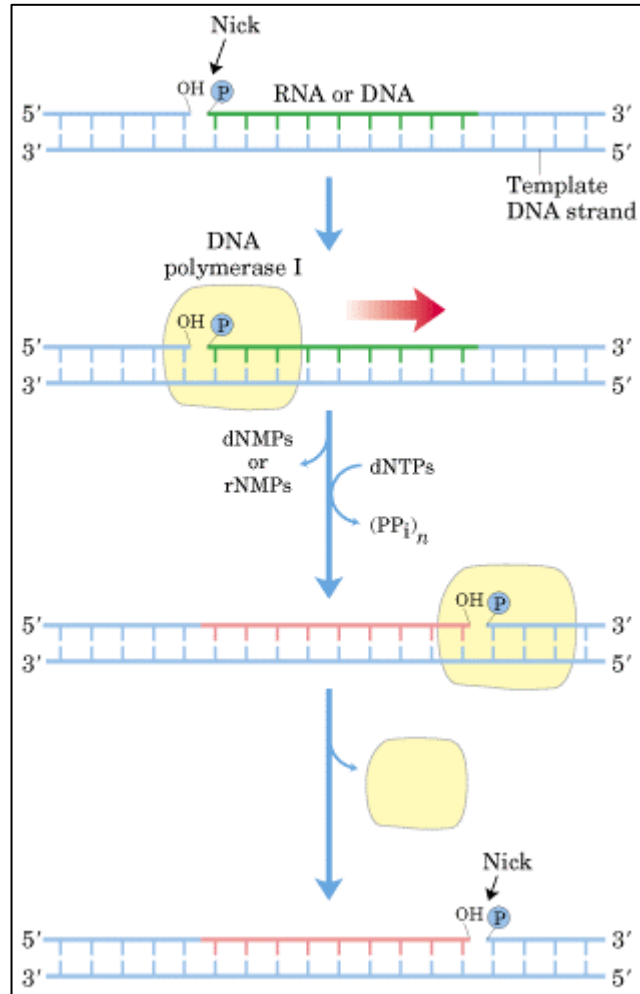
**Şekil 2-3: Rasgele Seçilmiş Primerlerle DNA İşaretlenmesi - Strachan (73)'den değiştirilerek**

Prensip olarak çift zincirli DNA molekülünün, işaretlenmemiş üç deoksiribonükleosit trifosfat, işaretlenmiş bir deoksiribonükleosit trifosfat ve magnezyum iyonlarının varlığında bovin pankreatik deoksiribonükleaz I (DNaz I) ve *E.coli* DNA polimeraz I (Pol I) ile inkübe edilmesine dayanmaktadır (Şekil 2–4) (59).

DNaz I hem çift zincirli hem de tek zincirli DNA'yı hidrolize edebilen bir endonükleazdır.  $Mg^{+2}$  varlığında çift zincirli DNA'nın tek zinciri üzerinde gelişigüzel çentikler oluşturur. *E.coli* DNA polimerazı olan Pol I, bakteriyal genomun sentezinden sorumludur. Ayrıca Pol I hem 5'-3' hem de 3'-5' yönünde ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Bu yüzden Pol I çift zincirli DNA'yı kalıp olarak tek zincir üzerinde sentez yapabilir. Teorik olarak nick translasyon olayında DNaz I bir Pol I'in görev yapabilmesi için DNA üzerinde çentikler oluşturarak serbest 3' hidroksi ucu ve 5' fosfat ucu oluşturulur. Pol I'de çentik atılmış zincir üzerinde 3'-OH ucunun primer olarak alır ve 5'-3' yönünde

ilerleyerek kalıp DNA'yı baz olarak deoksiribonükleotid değişimi yapar. Aynı zamanda 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle de sentez yönündeki nükleotidleri ortadan kaldırır. Polimerizasyon işlemi enzim aktivitesi bitene kadar devam eder ve işaretli deoksiribonükleotidin orijinal nükleotidle yer değiştirmesi ile sonuçlanır (23).

Nick translasyonla işaretlenmiş probun yapısı, en duyarlı sonuçların alınabilmesi için optimize edilmelidir. Bu yüzden nick translasyon işleminin kontrolü için denatürasyon sonrası jelde yürütme aşamasında, prob boylarının ideal olarak 200–500 bp aralığında gözlenmesi amaçlanmaktadır. Probların ortalama boyları, reaksiyon esnasındaki DNaz yoğunluğuna ve dolayısıyla oluşturulan çentiklere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (73, 23).



Şekil 2–4: Nick Translasyon İle DNA İşaretlemesi

#### **2.4.3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR ) İle Prob İşaretleme**

PCR yöntemi ile DNA veya RNA molekülü özgün olarak birkaç milyon kez çoğaltılabilir. PCR yönteminde, DNA dizisi çoğaltılırken, işaretli bir nükleotid kullanılarak (digoksinin-11-dUTP gibi) işaretleme de yapılabilir. Hızlı ve güvenilir olan bu yöntem, günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

#### **2.4.3.3.4. PRINS (Primed İn Situ İşaretleme)**

PRINS, in situ hibridizasyonda kullanılan alternatif bir yöntemdir (20). PRINS yönteminde, işaretsiz sentetik oligonükleotidler, uygun bağlanma koşullarında denatüre edilmiş metafaz yaymalarındaki kromozomlara bağlanırlar. DNA çift sarmalının tek bir zincirine bağlanan primerlerin, ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanarak uzaması sağlanır (28). Primerlerin uzama reaksiyonu sırasında, polimeraz enzimi, yeni sentezlenen DNA nin içine non-radyoaktif işaretli nükleotidlerin girmesine izin verir ve böylece, yeni sentezlenen DNA işaretlenmiş olur (29). Bu yöntemle problemler hem direkt hem de indirekt olarak işaretlenebilir.

#### **2.4.3.4. Dokuların Hibridizasyona Hazırlanması**

Kromozom anomalilerinin tanısında yaygın olarak kullanılan FISH tekniği birçok doku üzerinde uygulanabilmektedir. Kültür edilmiş veya edilmemiş periferik kan lenfositleri, trofoblast dokusu, amniyotik sıvı hücreleri, fetal kan ve parafin kesitlerindeki dokulardan hazırlanan örneklerle uygulanabilir. Prob ve hedef DNA arasında iyi bir hibridizasyonun olması için preparasyon aşaması oldukça önemlidir. Sitoplazma ya da protein artıkları, probun hedef bölgeye bağlanmasını engelleyeceği için yayma kalitesinin çok iyi olması gereklidir. Buna rağmen yayma ile birlikte oluşabilecek artıkların ise

proteaz (pepsin), deterjan ve DNaz içermeyen RNaz uygulamaları ile ortamdan uzaklaştırılmaları gerekmektedir.

#### **2.4.3.5. Denatürasyon**

Bu aşama hibridizasyon için ilk basamak olduğundan FISH tekniğinin en önemli aşamalarından biridir. Prob DNA'nın hedef DNA'ya yapışabilmesi için her iki DNA'nın da tek zincirli hale getirilmesi yani denatüre edilmesi gerekmektedir. Nükleik asitler, komplementer dizilerine, bazlar arasındaki zayıf hidrojen bağlar ile bağlıdır. Bu bağlar, hibridizasyondan önce, alkalik ortamda ya da yüksek pH ve ısı yardımıyla kırılarak DNA molekülü tek zincirli hale getirilebilir. Bir DNA'daki GC çiftinin molar oranı arttıkça, erime ısı (T<sub>m</sub>) da artar. T<sub>m</sub> değeri, ortamda bulunan çift zincirli DNA'lardan yarısının tek zincirli hale geldiği, yani denatüre olduğu ısıdır (7).

#### **2.4.3.6. Hibridizasyon**

Hibridizasyon, denatüre edilmiş DNA'nın, T<sub>m</sub> değerinden daha düşük bir ısıda, komplementer zinciri ile eşleşmesidir. Isı, pH, monovalent katyonlar ve organik eriyikler, prob uzunluğu ve prob konsantrasyonu T<sub>m</sub> değerini ve renatürasyonu etkiler (87).

#### **2.4.3.7. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

Hibridizasyon aşamasından sonra spesifik olmayan hibrid molekülleri ile, ortamdaki hibridize olmamış problemler seyreltilmiş tuz çözeltisi (formamid/SSC) ve deterjanlar (Tween) kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır.

#### **2.4.3.8. Hibrid Moleküllerin Görüntülenmesi**

Direkt yöntemle işaretlenmiş floresan problemler kullanıldığında, preparatlar hibridizasyon sonrası yıkamaların hemen ardından floresan mikroskopta değerlendirilebilir. İndirekt yöntemle işaretlenmiş problemler ise immunositokimyasal reaksiyonlardan sonra görüntülenebilir. Floresanla

işaretlenmiş DNA'yı görüntülemek için kullanılan karşı-boyalara (antifade) genellikle kırmızı floresan veren PI ya da mavi floresan veren DAPI'dir (35).

Probun işaretlendiği moleküle ve fluokroma göre uygun filtre seçimi yapılır. En sık kullanılan fluokrom FITC (yeşil) TRITC (kırmızı) ve AMCA (mavi) dir. Çok renkli FISH uygulamalarında ise birden fazla rengin görüntülenebilmesini sağlayan filtre sistemleri kullanılmaktadır (Tablo 2-3).

**Tablo 2-3: Sık kullanılan fluokromlar ve dalga boyları**

	Mavi	Turkuaz	Yeşil	Sarı	Turuncu	Kırmızı
<b>Fluokrom</b>	DAPI	DEAC	FITC/ R110	R6G	TAMRA/ Cy3™	TexRed/C y3.5™
<b>Eksitasyon Dalga Boyu</b>	358	426	494/500	524	552/550	590/581
<b>Emisyon Dalga Boyu</b>	461	480	517/525	550	575/570	612/596

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Sitogenetik laboratuvarında MKA/MR endikasyonu ile kromozom analizi yapılan ve 9. , 13. ve 22. kromozomlarını ilgilendiren kompleks yapısal kromozom anomalisi saptanan 15 olgunun ileri çalışmalar için fiksatifte saklanmış hücre kültür örnekleri oluşturdu. Yeterli kalitede mitoz elde edilmeyen olgulardan yeni kan örnekleri alınarak hücre kültürü yapıldı.

##### 3.1.1. Gereçler

- Laminar Air Flow
- Etüv (Heraeus)
- Bakteri kültürü etüvü
- Zaman ayarlı santrifüj
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- Mikrosantrifüj (Heraeus)
- Işık-Floresan Mikroskobu ve 365/480 ve 540/550 dalga boyunda floresan filtreleri (Nikon, Olympus)
- Inverted mikroskop (Nikon)
- Hassas terazi (Metzler)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Mikropipet (Eppendorf)
- pH metre
- Su banyosu
- Vortex
- Çalkalayıcı
- –85 °C dondurucu
- Otoklav

- Konik beher
- Plastik gode
- Hibridizasyon cihazı (Dako Hibridizer)

### 3.1.2. Stok Solüsyonlar

#### 3.1.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültür Medyumları

- Peripheral Blood Karyotyping (Biological Industries)
- Chang MF (Irvine Scientific)

Medyum Hazırlanması: Peripheral Blood Karyotyping veya Chang MF + %1 L-Glutamine (Biological Industries) + %1 PSA (Penisilin + Streptomisin +Amfoterisin (Biological Industries))

–20 °C’de buzdolabında saklanan medyumlar, kullanımdan önce 37 °C’lik etüvde ısıtılır.

#### 3.1.2.2. Kromozom Eldesinde Kullanılan Solüsyonlar

- Kolşemit (Biological Industries): +4°C’de saklanır.
- Timidin (Sigma) : 1g timidin + 67 ml bazal medyum (Ham’s F10) +4 °C’de saklanır.
- Hipotonik solüsyon: 0.075 M KCL (Merck) = 11.2g KCL + 2000 ml distile su (37 °C’lık su banyosunda saklanır)
- Carnoy fiksatif: Methanol ve asetik asit (Riedel) 3:1 (v/v)

#### 3.1.2.3. BAC Kültür ve İzolasyon Solüsyonları

- Qiagen Hispeed Plasmid Maxi Kit içeriği:  
P1, P2, P3, QBT, QC, QF, TE, RNase A solüsyonları
- LB Broth (MILLER) (Luria Bertani medium-Merck)  
Hazırlanışı: Toz halindeki stok LB Broth’tan 25 gr tartılır ve 1 litrelik şişeye aktarılır. Üzerine distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. İyice

karıştırılarak toz halindeki LB'nin çözülmesi sağlanır ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıktıktan sonra +4 °C' de saklanır. Kullanılmadan önce yaklaşık 550 µl kloramfenikol eklenir.

- Kloramfenikol (12,5 ug/ml)
- Gliserol

#### 3.1.2.4. Nick Translation ve Antibody Karışımı

- Roche DIG-Nick Translation Mix (– 20 °C' de saklanır).
- Blocking buffer %10 Blocking reagent + 100 mM maleik asit ( pH 7,5 )

(Boehringer Mannheim) (+4 °C' de saklanır).

- Anti-Digoksigenin-Rodamin Fab fragments (ADR) (Roche, –20 °C' de saklanır).
- Albumine ( BSA ) (Boehringer Mannheim, –20 °C' de saklanır).
- Fetal calf serum ( FCS ) (– 20 °C' de saklanır).
- 1xPBS (oda ısısında saklanır).

#### 3.1.2.5. FISH Solüsyonları

- 20xSSC (Standart Saline Citrate) (pH 7): 175.3 g NaCl (Merck) + 88.2 Na-sitrat (Merck) + 1000 ml distile su (1 yıl +4 °C' de saklanabilir)
- 5M HCl: 20,8 ml HCl (Merck) + 29,2 ml distile su
- 0.25N HCl: 5 ml 5M HCl + 95 ml distile su
- Stok pepsin solüsyonu: 0.1 g pepsin (Merck) + 1000 µl distile su
- 0,4xSSC: 2 ml 20xSSC + 98 ml distile su
- 2xSSC: 10 ml 20xSSC + 90 ml distile su

- Tween 20 stok solüsyonu (%10'luk) : 10 ml Tween 20 (Sigma) + 90 ml distile su
- Tween 20 yıkama solüsyonu (1000 ml) : 400 ml 2 x SSC + 590 ml distile su + 10 ml (%10'luk) Tween 20 stok solüsyonu
- Oda ısısındaki % 70, % 85 ve % 100 absolut etanol (Merck) serisi
- Hibridizasyon solüsyonu (Oncor Hybrisol VI - %65 formamid, 2XSSC)
- DAPI Antifade (0.125 µg/ml, +4 °C' de saklanır).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültürü

- Steril koşullarda Peripheral Blood Karyotyping ya da Chang MF medyumlarından 5 ml kan kültür tüpüne konuldu. Üzerine 0,2 ml (3 damla) PHA ve hastanın heparinize kan örneğinden 0,3 ml (5 damla) konuldu.
- Tüpün ağzı ve kapağı alevden geçirildikten sonra sıkıca kapatılıp hafifçe çalkalanıp 37 °C' lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- 48. saatte, inkübasyona bırakılan kan kültürlerine 0,2 ml timidin (filtre ile 3 damla) eklendi ve 37 °C'lik etüvde 18 saat inkübasyona devam edildi.
- Sürenin bitiminde, kültür etüvden çıkarılarak 1000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Kültür tüpüne 5 ml taze medyum eklenerek etüve konuldu.
- 72 saatin dolmasından 1-1,5 saat önce kültürlerle 0,2 ml kolşemid eklendi.

### 3.2.2. Kromozom Eldesi

- 72 saatlik kültür sonunda tüpler santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüplerin dibinde hafifçe vurularak pelletin karışması sağlandı. Daha sonra tüpler 37 °C' de ısıtılmış 0.075 M KCl (hipotonik

solüsyon) ile dolduruldu ve ortam koşullarına göre 7 ile 10 dakika arası bir süre boyunca 37 °C'lik etüvde bekletildi (hipotonik şok).

- Hipotonik şok süresi dolmadan tüpler santrifüje aktarıldı ve sürenin dolmasıyla birlikte 10 dakika 1000 rpm de santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılarak vorteks eşliğinde pellet üzerine yavaş damlalar halinde taze hazırlanmış ve buzdolabında bekletilmiş Carnoy fiksatifinden eklenerek tüpler fiksatifle dolduruldu ve tekrar santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Son yıkamadan sonra, hücrelerin üzerinde ~ 1 ml fiksatif kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı.
- Dip materyali Pasteur pipetle içine hava verilerek iyice karıştırıldı. Lamların üzerine yaklaşık 3–4 damla dip materyalinden 4–5 damla da Carnoy fiksatifinden damlatılarak ve preparatlar hazırlandı. Preparatlar hazırlanması aşamasında ortamın ısısının 20–23 °C, neminin ise % 55–60 olmasına dikkat edildi.
- Faz-kontrast mikroskopunda kontrol edilen preparatlarda mitoz yayılması ve kalitesi uygun ise yayma işlemine devam edildi.
- Gerekliyse yayma koşulları değiştirildi.
- Preparatlar havada kurutuldu.

### 3.2.3. BAC ve BAC Kültürü

Çalışmada kullanılan BAC klonlar, İtalya, Bari Üniversitesi Mikrobiyoloji Genetiği Departmanı'ndan Prof. Dr. Mariano Rocchi tarafından laboratuvarımıza gönderildi. BAC klonlarının stoklanması ve izolasyonu için yapılan çalışmalar, bakteri kültürü uygulamalarının genetik laboratuvarlarında rutin olarak çalışılan kültürler için kontaminasyon riskleri taşımasından ve gerekli cihazların

bulunmamasından dolayı fakültemizin Deneysel Tıp Araştırmalar Enstitüsü (DETAE), bakteri kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

- İzolasyon için Qiagen Hispeed Plasmid Maxi Kit'in kullanıldı.
- Kitin hazırlanması: RNase A solüsyonunun P1 solüsyonuna eklenmesi ve P1'in sürekli +4 °C'de saklanması gerekmektedir. Ayrıca P3 solüsyonunun kitin kullanılmadan önce +4 °C'ye koyularak soğutulması ve kullanıldıktan sonra tekrar dolaptan çıkarılması gerekmektedir.
- Öncelikle BAC'ın -80 °C'de uzun süreli saklanabilmesi için BAC-gliserol karışımı (bug) stok kültürler hazırlandı.
- Stok kültürlerin oluşturulması için 15 ml'lik tüplere 10 ml LB Broth eklendi. Hazırlanan tüpler kültürünü oluşturacağımız BAC'lar ile kontamine edildi.
- Kontamine edilmiş tüplerin kapakları hafif bir şekilde kapatıldı.
- Tüpler bir spora yerleştirilerek 37 °C sıcaklığa ve 180–200 devire ayarlanmış çalkalayıcıda 16–20 saat (gece boyunca) bırakıldı.
- Ertesi sabah tüpler kontrol edildi ve üreme sağlanan kültürler ayrıldı. Üreme olduğu, kültürlerdeki yoğunluk ve bulanıklık ile farkedilmektedir.
- Özel bug tüplerine 1 ml gliserol ve 1 ml BAC kültüründen eklenerek stok hazırlandı. Bu stoklar –80 °C'de saklandı.

#### 3.2.4. BAC İzolasyonu

- İzolasyon öncesinde her BAC örneği için başlangıç kültürü oluşturmak gereklidir.
- İzolasyona başlamadan önce, her klon için gerekli olan 1 lt LB broth hazırlandı.

- Yüksek hacimli örnekler kullanılacağı ve santrifüjde aynı anda dört adet 500 ml'lik gode çevrilebildiği için izolasyonun ikişer ikişer yapılması gerekmektedir.
- İzole edilecek her BAC için 1 adet 15 ml'lik tüp hazırlandı ve içerisine 5 ml LB broth konuldu. Derin dondurucudan izolasyonu yapılacak BAC'lar çıkarıldı ve buz içinde izolasyonun yapılacağı yere getirildi.
- Tüpler BAC'larla kontamine edildi ve stok BAC'lar hızla  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya kaldırıldı.
- Tüpler çalkalayıcıya koyuldu ve başlangıç kültürünün oluşturulması için  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 180–200 devirde ortalama 8 saat inkübasyona bırakıldı.
- Sürenin sonunda her örnek için 2 adet konik beher hazırlandı ve bunlara 500'er ml LB konuldu. Tüpte inkübe edilen 5 ml'lik bakteri örneği iki behere de 2,5 ml gelecek şekilde paylaştırıldı.
- Bakteri örnekleri eklenen beherler aynı ısı ve devirdeki çalkalayıcıda gece boyu (12–16 saat) inkübe edildi.
- Sürenin bitiminde üreme kontrolü yapıldı. Örnekler santrifüj edilmek üzere özel plastik godelere doldurularak 3000 rpm'de  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Çökelen bakteri hücrelerin godenin alt taraflarından vurularak karışması sağlandı.
- P1 solüsyonundan 10 ml eklendi ve hafifçe çalkalayarak pelletin iyice çözülmesi sağlandı.
- Daha sonra örneklerin üzerine 10 ml P2 solüsyonu eklendi ve godenin kapağı kapatıldı. 5–6 kez ters-düz edilerek iyice karışması sağlandı. Oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. Bekleme anında enjektör şeklindeki filtre kartuşlar (Qiafilter Cartridge) hazırlandı.

- P2 solüsyonundan sonra +4 C'de bekletilmiş olan P3 solüsyonundan godeye 10 ml eklendi ve hızla ve güçlü bir şekilde karıştırıldı. Bekletmeden örnek filtre içerisine döküldü ve 10 dakika filtre içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sırasında kullanılacak olan 2. filtre (Maxi Tip) çıkarıldı ve altına bir kap gelecek şekilde bir tutucu yardımıyla oturtuldu ve QBT solüsyonu ile ıslatıldı (bu solüsyonun filtreden aktığı gözlenmeli).

- 10 dakikalık 1. filtredeki inkübasyondan sonra filtrenin pompası takılarak sıvının tamamı 2. filtreye akıtıldı.

- Sıvının tamamının aktığı görüldükten sonra 2. filtreye 60 ml QC solüsyonu konuldu ve solüsyonun filtreden geçmesi beklendi.

- Filtrenin altına süzülen sıvının toplanması için 50 ml lik falkon tüp yerleştirildi. Filtreye eklenen 15 ml QF solüsyonu ile filtredeki DNA'nın birlikte falkon tüpüne geçmesi sağlandı.

- Falkondaki DNA içeren solüsyonun üzerine 10,5 ml oda sıcaklığındaki izopropanol eklenerek 5 dakika bekletildi ve DNA'nın çökmesi sağlandı.

- Bekleme esnasında kite ait 50 ml'lik enjektörün pompası çıkarıldı ve enjektör ucuna 3. ve son filtre (QIAprecipitator Maxi Module) takıldı.

- Sürenin sonunda örnek, ucunda 3. filtre olan enjektöre aktarıldı ve pompa takılarak izopropanolün filtreden geçerek uzaklaşması, DNA'nın ise filtrede kalması sağlandı. Bu işlem, izopropanolün tamamen uzaklaştırılması amacıyla 5-6 kez tekrar edildi.

- İşlem sonunda filtre, kurutma kağıdı üzerine alınarak kurumaya bırakıldı (1-2 dakika).

- Daha sonra kitteki 5 ml'lik enjektör çıkarıldı ve pompa sökülerek ucuna DNA'nın tutunduğu filtre takıldı.

- Enjektörün içine 1 ml TE solüsyonu eklendi ve pompa tekrar takılarak DNA'nın 1,5 ml lik toplama ependorfunu akması sağlandı. Ependorfa toplanan DNA tekrar enjektöre aktarılarak filtreden 2. kez geçirildi. Bu işlemle birlikte izolasyon tamamlanmış oldu.
- İzolasyondan sonra DNA'nın konsantrasyonu ölçüldü. Her izolasyonda ortalama 750-1000 µl DNA elde edilmesi beklenir.

### 3.2.5. Nick Translasyon İle Prob İşaretleme

- İzole edilmiş BAC'tan 1µg DNA steril bir PCR tüpüne koyuldu ve 20 µl ye tamamlanacak kadar steril su eklendi.
- Daha sonra tüpe 4 µl Roche DIG-Nick Translation Mix eklendi ve tüp kısa santrifüjden geçirildi.
- Oluşturulan karışım 15 °C de 90 dakika PCR cihazında inkübe edildi. İnkübasyon devam ederken % 0,9'luk agaroz jel hazırlandı.
- İnkübasyondan sonra tüp buz üzerine yerleştirildi ve örnekten 3 µl alınarak 5 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 3 dakika denatüre edildi.
- Denatürasyon esnasında agaroz jelin ilk kuyusuna 123 bç'lik DNA merdiveni yüklendi. DNA örneği de denatüre olduktan sonra jele yüklenerek yürütüldü. Nick translasyon doğru bir şekilde gerçekleştiyse 200–500 bç boy aralığında bant gözlenir.
- DNA resimlenerek doğru bant aralığında olduğu görüldükten sonra buz üstündeki DNA tüpüne 25 µl 50 mM EDTA ve 8 µl steril su eklenerek reaksiyon durduruldu ve Nick translasyon işlemi tamamlandı.

### 3.2.6. Floresan In Situ Hibridizasyon

#### 3.2.6.1. Preparatların Hibridizasyona Hazırlanması

- Preparat seçilirken, mitotik indeksin yüksek olmasına ve sitoplazmanın olmamasına dikkat edildi.
- Seçilen preparat ilk önce oda ısısında bekleyen %70, %85 ve %100 lük etanol serisinden 2'şer dakika geçirildi.
- Havada kurutulduktan sonra, 37°C de bulunan 0.1N HCl, %0.05 pepsin solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
- Preparat pepsinden çıktıktan sonra kurutulmadan, oda ısısındaki etanol serisinden yeniden 2 şer dakika geçirildi. Alkol serisinden çıkan preparatlar oda ısısında kurumaya bırakıldı.

#### 3.2.6.2. Probların Hazırlanması

- 4 µl Nick translasyonla işaretlenmiş prob, 2 µl Cot DNA ve 20 µl hibrizol solüsyonu ile karıştırıldı. Kısa santrifüjden geçirilerek prob kullanıma hazır hale getirildi.

#### 3.2.6.3. Denatürasyon ve Hibridizasyon

- Hazırlanan prob preparat üzerine damlatılarak üzeri lamelle kapatıldı. Denatürasyon ve hibridizasyon basamaklarının ikisi de hibridizasyon cihazında gerçekleştirildi.
- Cihaza denatürasyon ve hibridizasyon için optimum değerler girildi ve programlandı. Prob eklenmiş preparat cihaz aracılığıyla önce 75 °C' de 2 dakika boyunca denatüre edildi. Denatürasyondan sonra cihaz otomatik olarak 37 °C' ye gelerek hibridizasyon sıcaklığını ayarladı. Hedef DNA ve prob 37 °C' de 18 saat hibridize oldu.

### 3.2.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

- Yıkamalar için 0,4 x SSC ve 2 adet Tween 20 solüsyonları hazırlandı. Su banyosu 72–75 °C' ye ayarlandı ve 0,4 x SSC su banyosuna koyuldu. Tween 20' ler oda sıcaklığında bekletildi.

- 0,4 x SSC' nin ısınması sırasında, nick translasyonla işaretli bölgelerin görünür hale gelmesi için gereken antibody karışımı buz üzerinde hazırlandı.

Antibody Karışımı : 173,5 µl	1 x PBS
20 µl	Blocking buffer
6 µl	FCS
1 µl	BSA bir stok ependorfuna dolduruldu.

Stok karışımdan preparat başına 25 µl çekildi ve yeni bir ependorfa aktarıldı. Her bir prob için ependorfa, 1 µl olacak şekilde ADR (1 ml distile su ile sulandırılmış, 0,2 µg/ml) eklendi ve antibody karışımı hazır hale getirildi.

- Hibridizasyon süresinin tamamlanması ile preparatlar cihazdan çıkarıldı ve üzerlerindeki lameller yavaşça kaldırıldı. Su banyosu içerisindeki 0,4 x SSC' de 2 dakika bekletildi. Sürenin sonunda preparatlar karanlık bir ortama Tween 20 solüsyonunda 2 dakikada süreyle bekletildi.

- Bu arada her bir preparat için yumuşak lamel hazırlandı ve bu lamellerin üzerine antibody karışımından mikropipetle 26 µl çekilerek damlatıldı.

- Tween 20' den çıkan preparatlar ters çevrilerek yumuşak lamellerin üzerine kapatıldı ve preparatlar bir hibridizasyon kutusuna koyularak 37 °C' lik etüve kaldırıldı. Antibody solüsyonu içerisindeki anti-DIG içeren moleküllerin ilgili yerlere bağlanması için 45 dakika inkübe edildi.

- 45 dakika sonunda preparatların üzerindeki yumuşak lameller alınarak preparatlar 2. Tween 20 solüsyonuna sokuldu. Ancak bu sefer 8 dakika bekletildi.
- Bu arada preparatlar için lameller hazırlandı ve her bir lamel üzerine 20 µl DAPI damlatıldı. Tween 20' den çıkan preparatların arkası silindi ve ters çevrilerek DAPI damlatılmış lameller üzerine yerleştirildi. Bu basamakla birlikte tüm işlemler tamamlanmış oldu ve preparatlar incelenmeye hazır hale geldiler.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Tekniklerin Yerleştirilmesi Aşaması

#### 4.1.1. BAC Klonlarının Seçimi

Öncelikle sitogenetik laboratuvarımızda daha önce dengesiz yapısal kromozom anomalisi saptanan olgular incelendi ve anomalilerin daha çok 9, 13 ve 22. kromozomlara ait olduğu belirlendi. Bu nedenle bu 3 kromozoma ait BAC klonlarının kullanılmasına karar verildi.

İncelemeye alınacak kromozom anomalileri/ olgular seçilirken iki kritere dikkat edildi; İlk kriter aynı BAC klonlarını birden fazla hastada kullanabilmek amacıyla anomalilerin birbirine yakın veya örtüşen kırık noktaları göstermesi, diğer kriter ise, olgulara ait fiksatifte saklanan hücre kültürü materyallerinin çalışmada kullanılması planlandığından ve çok eski örneklerin bozulmuş olma olasılığı nedeniyle tekniğin etkilenebileceği düşünüldüğünden oldukça yeni olgular çalışmaya dahil edildi. Bu kriterler doğrultusunda çalışmaya toplam 15 hasta dahil edildi.

Seçilen hastalar arasında aynı kromozoma ait anomaliler listelendi ve GTG analiz sonuçlarına göre anomali içeren ortak bant bölgeleri belirlendi

İtalya, Bari Üniversitesi Mikrobiyoloji Genetiği Departmanı'nın, kendi ürettiği ve lokalizasyonlarını "USCS Genome Informatics" in verilerine göre yaptığı BAC klonları listesinden ([www. biologia.uniba.it/rmc/](http://www.biologia.uniba.it/rmc/)), 31 adet BAC klonu belirlenerek çalışmaya dahil edilmesine karar verildi (Tablo 4-1). Bu merkezle iletişim kurularak, seçilen BAC klonları istendi ve klonlar bedelsiz olarak tarafımıza gönderildi.

Tablo 4-1: Klon listesi

No #	Klon	Lokalizasyon	
1	RP11-3J10	9p13.2	chr9:37,745,915-37,935,185
2	RP11-182N22	9p13.3	chr9:35,020,281-35,215,382
3	RP11-562M8	9p21.1	chr9:32,871,544-32,992,078
4	RP11-438B23	9p21.2	chr9:27,864,315-28,042,166
5	RP11-149I2	9p21.3	chr9:21,899,259-22,000,413
6	RP11-296P7	9p22.1	chr9:18,959,327-19,048,503
7	RP11-335H2	9p22.2	chr9:16,726,992-16,784,841
8	RP11-307K19	9p22.3	chr9:15,399,993-15,456,627
9	RP11-364M22	9p23	chr9:12,344,849-12,480,002
10	RP11-77E14	9p24.1	chr9:7,671,914-7,825,237
11	RP11-157A10	9p24.2	chr9:3,925,717-4,050,190
12	RP11-143M15	9p24.3	chr9:812,147-991,152
13	RP11-56D16	9q34.11	chr9:129,388,788-129,552,125
14	RP11-111F5	9q13+9p	chr9:46,401,036-46,588,540
15	RP11-356B19	9q33.3	chr9:129,146,307-129,371,685
16	RP11-318K12	9q12+9p	chr9:66,426,709-66,603,162
17	RP11-111L24	13q32.2	chr13:97,843,998-97,950,575
18	RP11-153M24	13q12.2	chr13:27,414,162-27,490,882
19	RP11-128N14	13q32.1	chr13:96,803,848-96,954,144
20	RP11-540M5	13q14.12	chr13:44,290,912-44,450,196
21	RP11-30L8	13q31.1	chr13:85,529,116-85,655,985
22	RP11-155N3	13q32.3	chr13:98,227,263-98,390,578
23	RP11-158A8	13q31.3	chr13:89,901,814-90,017,144
24	RP11-29P20	13q31.2	chr13:86,954,602-87,112,550
25	RP11-586I18	22q11.21	chr22:18,853,727-18,976,359
26	RP11-24N11	22q11.22	chr22:20,756,141-20,941,659
27	RP11-759G12	22q11.23	chr22:22,590,798-22,824,469
28	RP11-635G2	22q12.1	chr22:24,568,685-24,749,119
29	RP11-837H18	22q12.2	chr22:28,596,566-28,774,666
30	RP11-450E19	22q12.3	chr22:30,960,839-31,138,389
31	RP11-455G13	22q13.1	chr22:38,492,367-38,669,099

#### 4.1.2. BAC Klonlarının Stoklanması

İstenen 31 klondan 30'u 1,5 ml lik ependorf tüplerinde LB agar karışımı içerisinde laboratuara ulaştı ve klonlar çalışmalar başlayana kadar +4 °C' de saklandı.

30 BAC klonu aynı anda stoklanmak üzere çoğalmaya bırakıldığında 21 klonda yeterli üremenin olduğu (#1, #2, #3, #5, #6, #7, #8, #11, #12, #14, #15, #16, #17, #19, #20, #21, #24, #27, #28, #30, #31), 3 klonda üremenin az olduğu (#13, #18, #23) ve 6 klonda da ise hiç üreme olmadığı (#9, #10, #22, #25, #26, #29) görüldü. Az üreme olan tüplerde inkübasyona devam edildi. Tam üremenin olduğu 21 örnek içirse buğlar hazırlanarak stok yapıldı.

Az üremenin görüldüğü ve inkübasyonu devam ettirilen tüpler kontrol edildiğinde 3 klonun daha (#13, #18, #23) yeterli seviyede çoğaldığı görüldü ve bunlarda stoklandı.

İlk aşamada üreme sağlanamayan BAC'lar için yeni LB tüpleri hazırlandı ve tekrar kontamine edilerek üremeye bırakıldı. Kontroller sonunda 6 örnekten 1 tanesinde (#22) üremenin yeterli olduğu, 4 tanesinde (#9, #25, #26, #29) yetersiz üreme olduğu diğerinde ise (#10) tekrar üremenin olmadığı görüldü. Tam üreyen klon stoklandı. Az üreyen 4 klon için inkübasyona devam edildi ve inkübasyon sonunda yeterli üremeye ulaşıldığı ve stoklandı.

İlk iki denemede de üreme sağlanamayan bir klon (#10) için çalışma tekrarlandı ancak BAC klonunda tekrar üreme sağlanamadı. Bu klonun büyük olasılıkla ölmüş olabileceğine karar verildi ve çalışmadan çıkartıldı.

Stoklama çalışmaları sonunda gelen 30 BAC klonundan 29 tanesi başarılı bir şekilde stoklandı.

#### **4.1.3. BAC Klonlarından DNA İzolasyonu**

İki farklı klon eş zamanlı çalışılarak izole edildi (bkz. 3.2.4. BAC izolasyonu). İzolasyon işleminin başarısını arttırabilmek amacıyla başlangıç kültürlerinde yeterli düzeyde üremenin olmasına dikkat edildi. Üremenin yeterli olmadığı durumlarda 2 tüpte yeni başlangıç kültürleri oluşturuldu.

Yeterli üremeye sahip klonlar izolasyon protokolüne uygun olarak çalışıldı ve izolasyon sonrasında DNA konsantrasyonları ölçüldü. Düşük konsantrasyon görülen klonlarda çöktürme işlemi yapılarak konsantrasyonun artırılmasına çalışıldı (Tablo 4–2). Konsantrasyonun çok düşük olduğu klonlar için izolasyon işlemi LB Broth'lara eklenen kloramfenikol miktarı azaltılarak tekrarlandı (bkz. 3.1.2.3. BAC Kültür ve İzolasyon Solüsyonları).

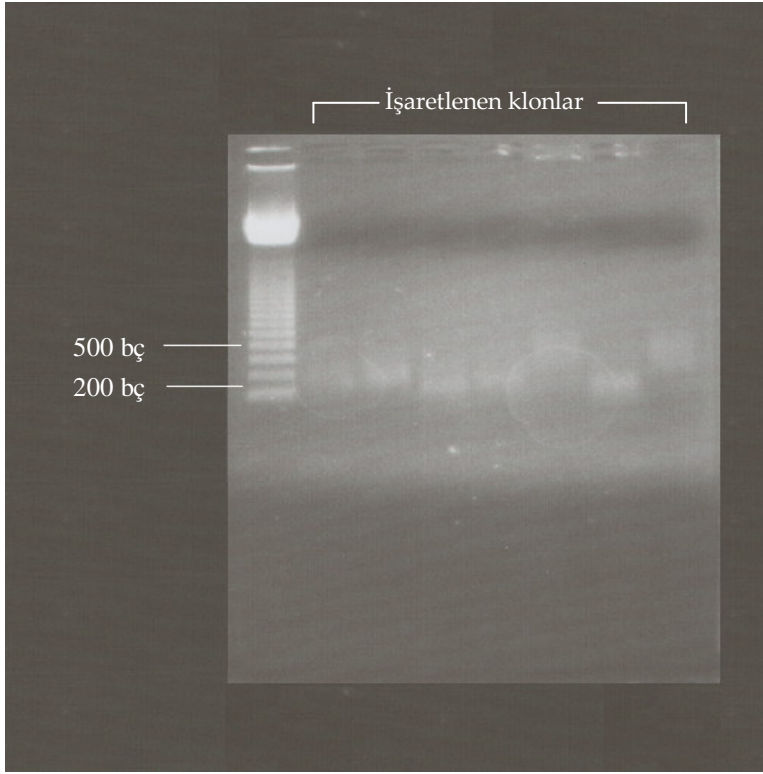
Elimizdeki toplam 30 BAC klonundan 25'inde izolasyon çalışmaları gerçekleştirilebildi. Çünkü çalışmada kullanılan Qiagen Hispeed Plasmid Purification Maxi Kit'i ile ancak 25 adet izolasyon yapılabilmekteydi ve tez projesi kapsamında ancak bir kit alınabilmişti.

#### **4.1.4. DNA'nın İşaretlenmesi**

İzolasyon sonrasında, proplar protokole uygun olarak Nick translasyon karışımı ile işaretlendi. Agoroz jelde yürütüldü ve 200–500 bç aralığında bant izlenen propların reaksiyonu durduruldu ve işaretleme tamamlandı. 200–500 bç aralığında bant vermeyen proplar için 15 °C'deki inkübasyona ve reaksiyona devam edildi (Şekil 4–1). Jelde yürütülen örneklerin bir kısmının uygun bant aralığına geldiği bazılarının ise bu aralığın dışında kaldıkları görülmesine rağmen reaksiyon sonlandırıldı.

Tablo 4-2: İzolasyon sonrası konsantrasyon oranları

No #	Klon	Konsantrasyon	
		İzolasyondan sonra	Çöktürmeden sonra
1	RP11-3J10	55,60 ng/μl	0,98 ng/μl
2	RP11-182N22	izole edilmedi	
3	RP11-562M8	izole edilmedi	
4	RP11-438B23	gelmedi	
5	RP11-149I2	izole edilmedi	
6	RP11-296P7	izole edilmedi	
7	RP11-335H2	49,1 ng/μl	573 ng/μl
8	RP11-307K19	73,1 ng/μl	-
9	RP11-364M22	60 ng/μl	766,9 ng/μl
10	RP11-77E14	üremedi	
11	RP11-157A10	11 ng/μl	188,2 ng/μl
12	RP11-143M15	78,5 ng/μl	-
13	RP11-56D16	8,4 ng/μl	150,4 ng/μl
14	RP11-111F5	73 ng/μl	-
15	RP11-356B19	4,9 ng/μl	73 ng/μl
16	RP11-318K12	75,9 ng/μl	-
17	RP11-111L24	90,1 ng/μl	-
18	RP11-153M24	izole edilmedi	
19	RP11-128N14	11,7 ng/μl	294,2 ng/μl
20	RP11-540M5	13,9 ng/μl	311 ng/μl
21	RP11-30L8	izole edilmedi	
22	RP11-155N3	73,4 ng/μl	-
23	RP11-158A8	izole edilmedi	
24	RP11-29P20	8,6 ng/μl	159,4 ng/μl
25	RP11-586I18	85,8 ng/μl	-
26	RP11-24N11	74,2 ng/μl	-
27	RP11-759G12	38,8 ng/μl	949,7 ng/μl
28	RP11-635G2	75,5 ng/μl	-
29	RP11-837H18	izole edilmedi	
30	RP11-450E19	izole edilmedi	
31	RP11-455G13	14,5 ng/μl	156,3 ng/μl



**Şekil 4-1: İşaretleme sonrası jel görüntüsü**

#### 4.1.5. Preparatların Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen 15 olgunun saklanan hücre kültürü materyallerinden yayma yapılarak örnek preparatlar oluşturuldu. Ancak 15 olgunun 8'inden oluşturulan preparatların FISH çalışmalarında kullanılamayacak kadar kötü olması nedeniyle olgulardan yeni kan örnekleri alınması planlandı. Yedi olgudan hazırlanan preparatların kalitesinin çalışma için yeterli kalite olabileceği düşünüldü.

#### 4.1.6. Hibridizasyon ve Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Hibridizasyon işlemi, tüm problemler için hibridizasyon cihazında gerçekleştirildiğinden bu süreç standardize edilmiş oldu. İlk görüntülemeden önce tüm problemler için aynı yıkama şartları uygulandı. Görüntüleme sonrası

sorun saptandığında çözüme yönelik olarak yıkama koşullarında değişiklikler yapıldı.

#### **4.1.7. Görüntüleme**

Preparat kalitesi yüksek olduğunda görüntülemeye genellikle sorun yaşanmadı. Sorun yaşanan olgularda Cot-1 DNA ve/veya prob DNA miktarı değiştirilerek çözüm arandı. Yaygın nonspesifik sinyallerin görüldüğü durumlarda Cot-1 DNA miktarı arttırıldı ve prob DNA miktarı azaltıldı. Sinyal yoğunluğunun az olduğu durumlarda prob DNA'sı arttırıldı. Bu işlemler en uygun sinyaller alınana kadar denendi. Eğer nonspesifik sinyaller çok aşırı miktarda değilse, yıkama koşullarında (Tween 20 solüsyonu) süreyi bir miktar arttırılmasıyla çözüm sağlandı.

## 4.2. Sitogenetik Uygulamalar ve Sonuçları

### 4.2.1. OLGU 1: B.D.

**Materyalin ilk geliş yılı** : 2003 (2008 de yeni kan örneği alındı)

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XY,9p+ *de novo* (Şekil 4-2)

**Parental kromozom analiz sonuçları** : 46,XX ve 46,XY

**Ticari problemlerle yapılan FISH sonucu** :

46,XY,9p+.ish der(9)(7pter→7p21.2::9p24.2→9qter)(wcp9 -, wcp7 +) *de novo*

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

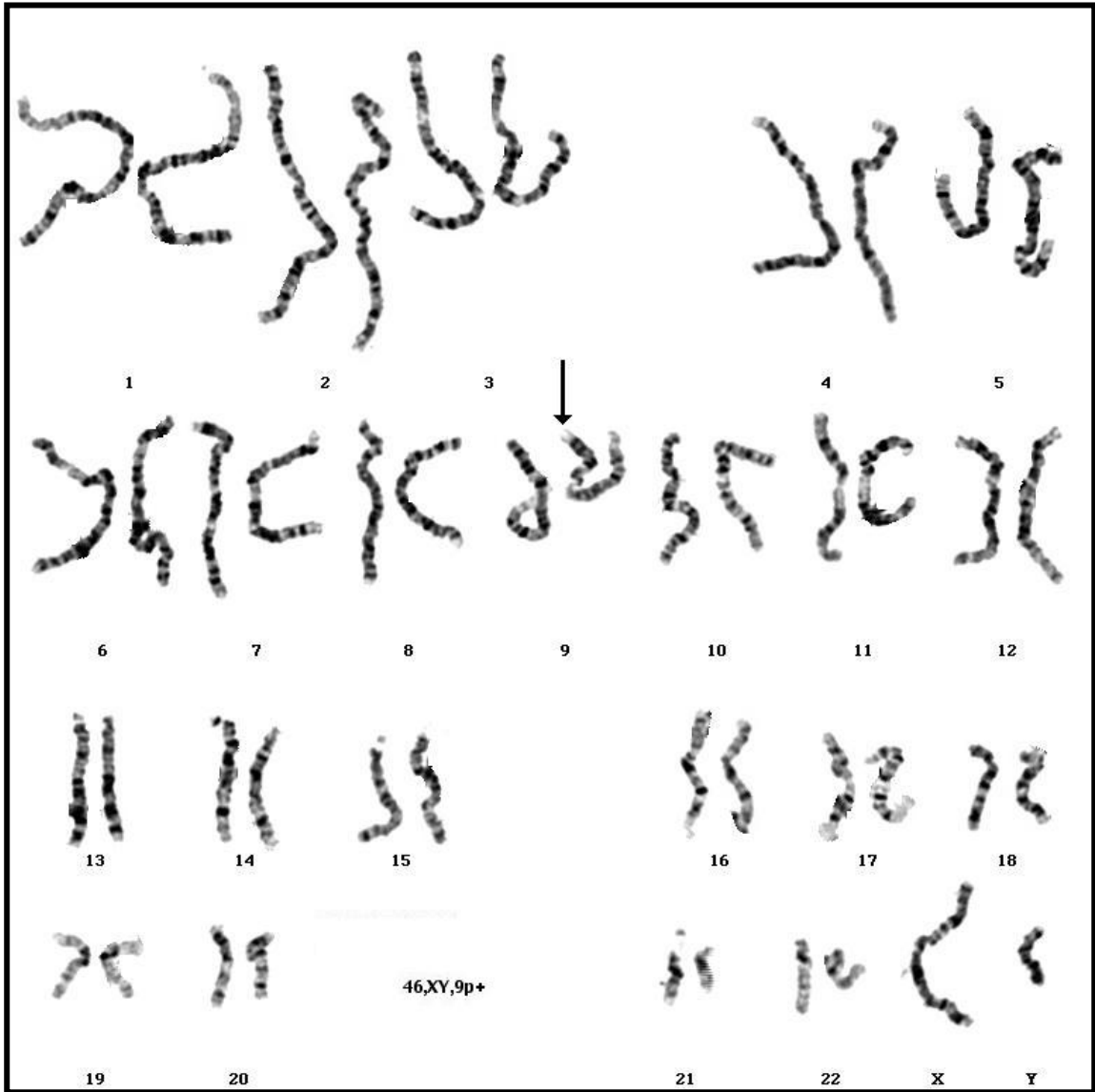
RP11-364M22 – 9p23, RP11-157A10 – 9p24.2, RP11-143M15 – 9p24.3  
(Şekil 4-3, 4-4, 4-5)

#### **BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar:**

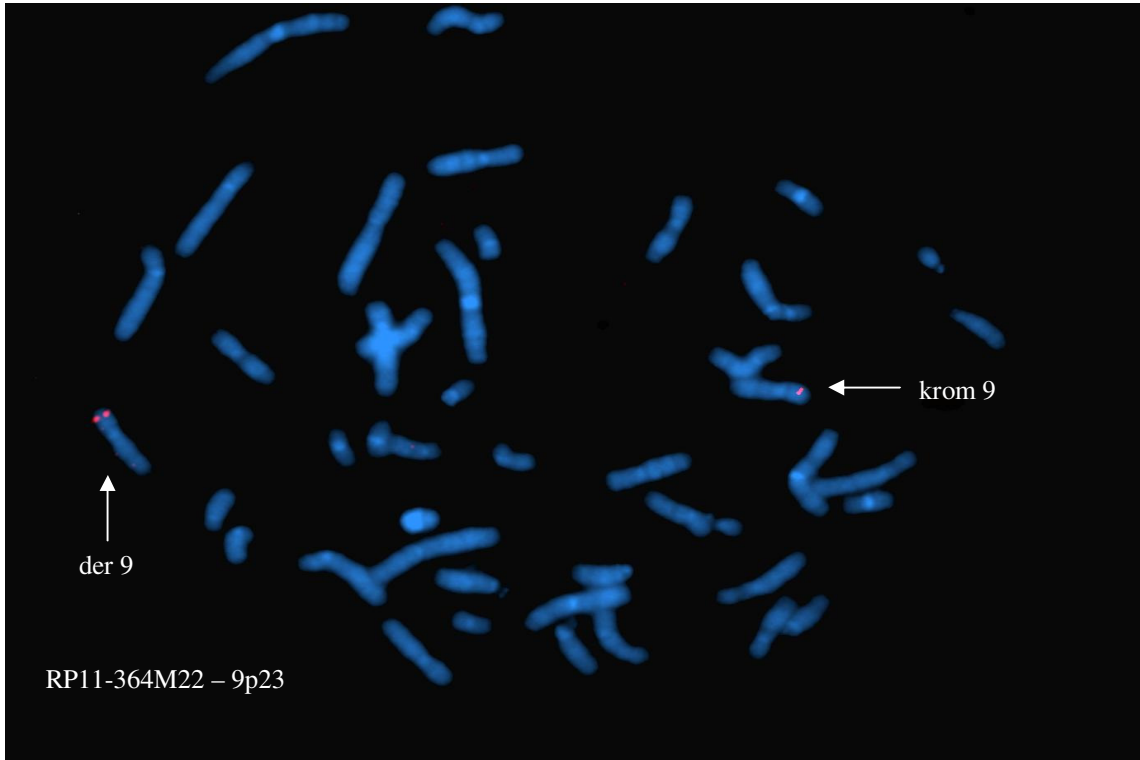
Hazırlanan preparatlarda protokole uygun olarak hibridizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Görüntüleme esnasında mitoz oranının çok düşük olduğu, kromozomlarda erimeler olduğu ve sinyallerin nonspesifik olarak dağıldığı gözlemlendi. Bu sorunların materyalin eski oluşundan kaynaklandığı düşünülmüş ve olgudan yeni kan örneği istendi. Yeni kan örneğinden hazırlanan preparatlarda işlemler tekrarlandı ve başarılı sonuç alındı.

#### **BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı:**

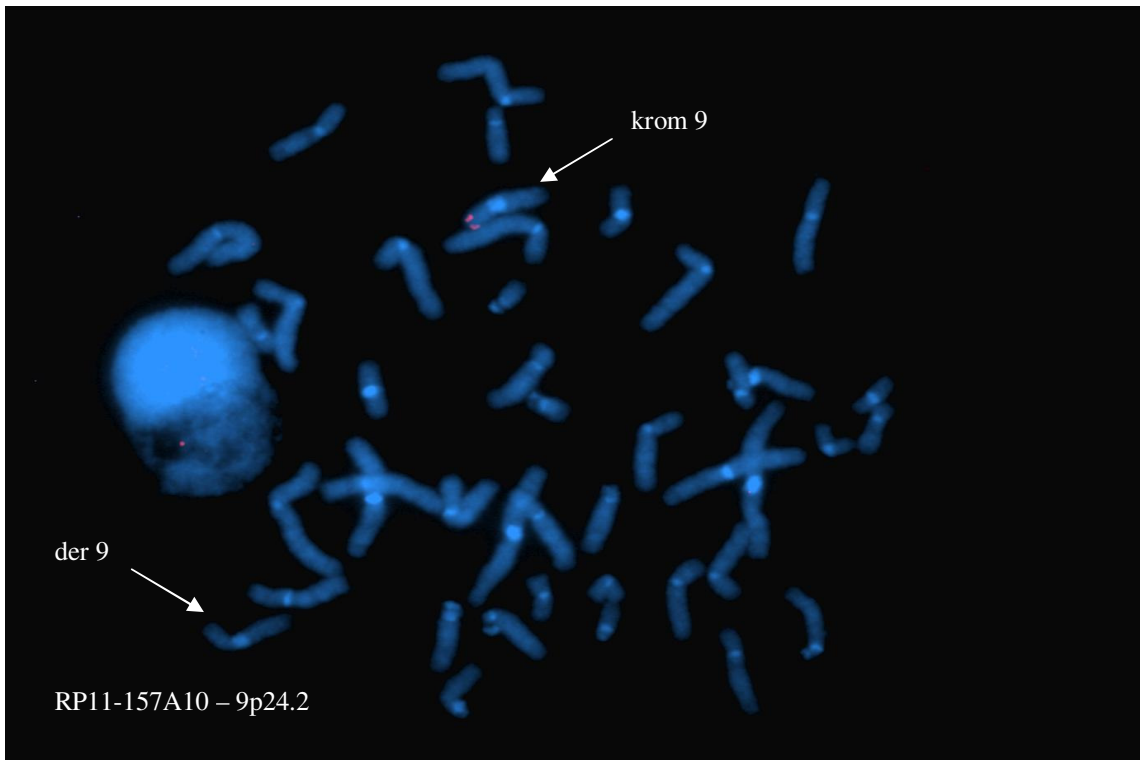
9p23 e lokalize BAC klonu ile hazırlanan prob ile her iki (normal ve derivatif) 9. kromozom üzerinde sinyal alınırken 9p24.2 ve 9p24.3 e lokalize problemlerle normal 9. kromozomda sinyal alınırken derivatif 9. kromozomda sinyal gözlenmedi. Bu sonuçlar, 9p deki kırık noktasının 9p23 ile 9p24.2 noktaları arasında olduğunu göstermektedir.



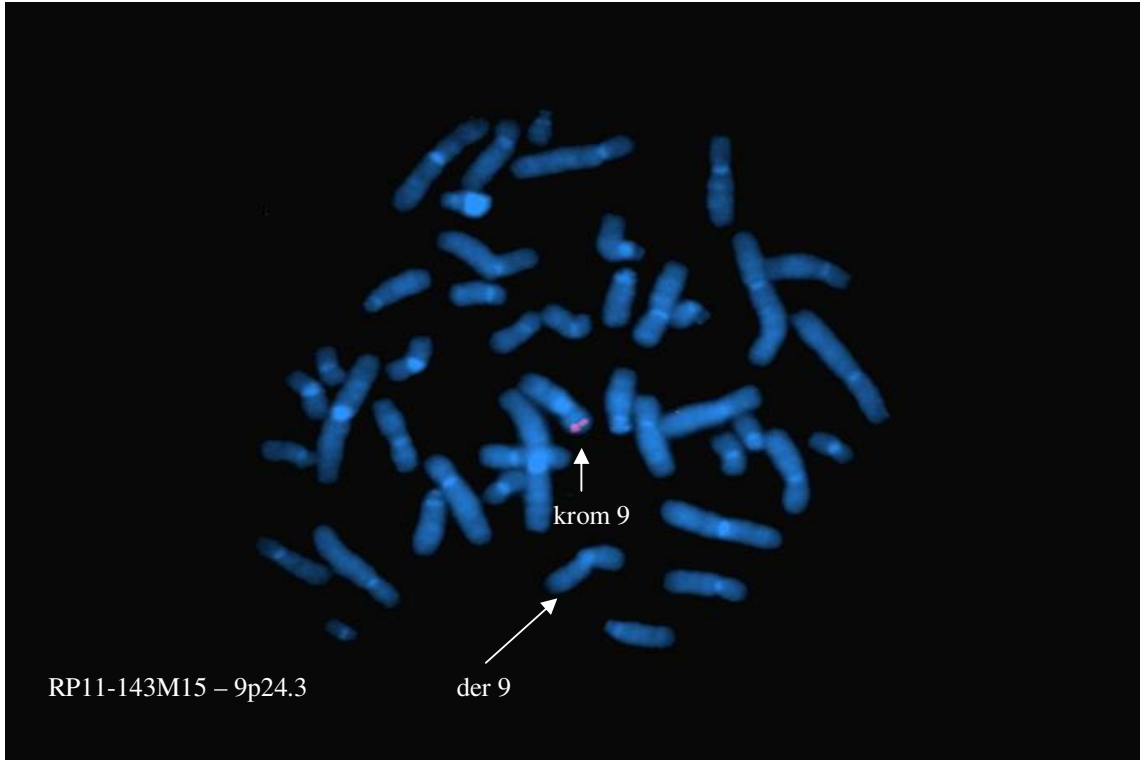
Şekil 4-2: Olgu 1'in karyotipi



Şekil 4-3: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-4: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-5: Olgu 1'in BAC-FISH resmi-3

#### 4.2.2. OLGU 2: I.Ö.

**Materyalin ilk geliş yılı** : 2005 (2008 de yeni kan örneği alındı)

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XX,13q- *de novo* (Şekil 4-6)

**Parental kromozom analiz sonuçları** : 46,XX ve 46,XY

**Ticari problemlerle yapılan FISH sonucu** :

46,XX,13q-.ish del(13)(q32.2→qter)(wcp13 +, 13qtel -)

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

RP11-128N14 – 13q32.1, RP11-111L24 – 13q32.2, RP11-155N3 – 13q32.3

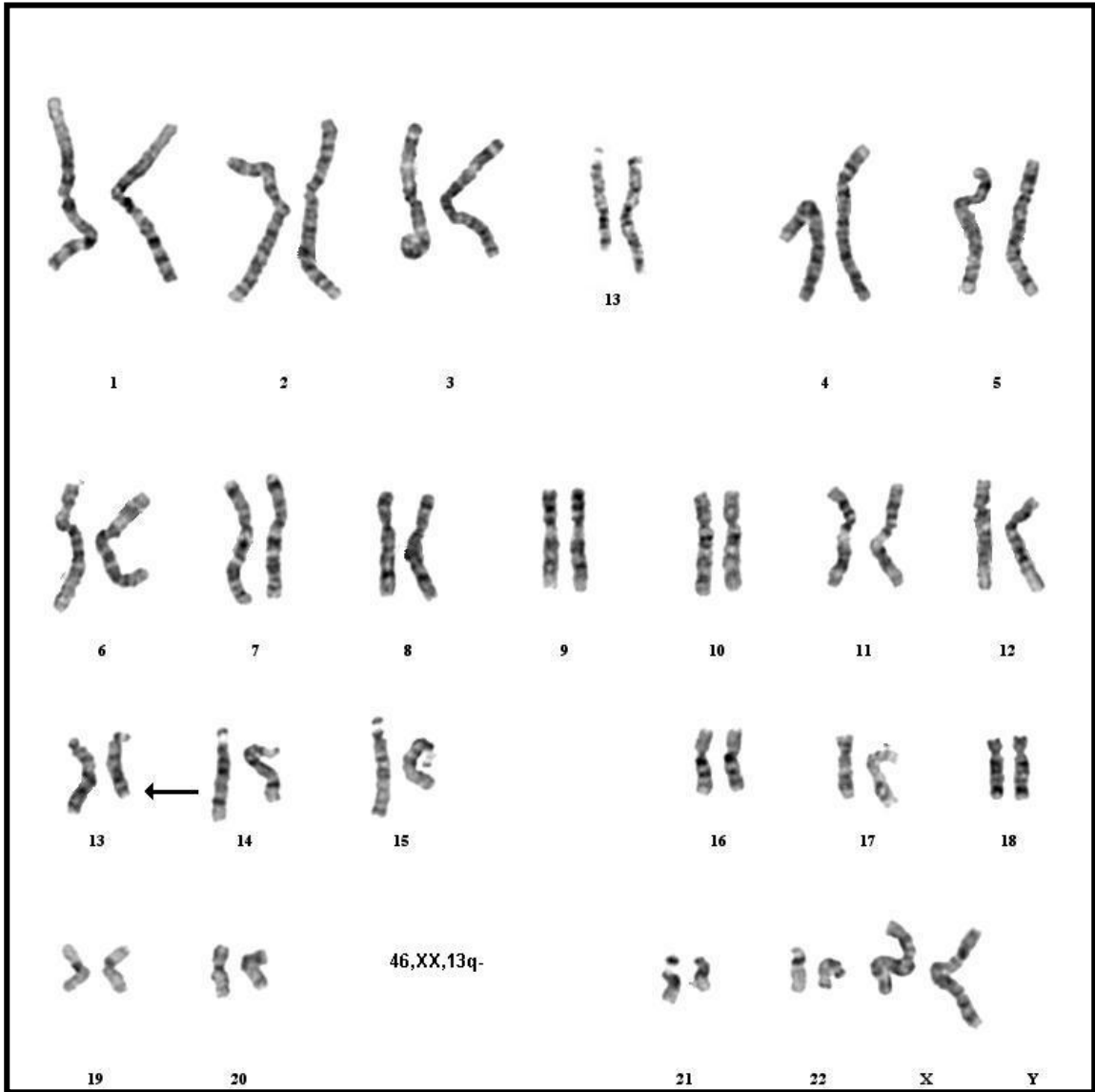
(Şekil 4-7, 4-8, 4-9)

#### **BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar:**

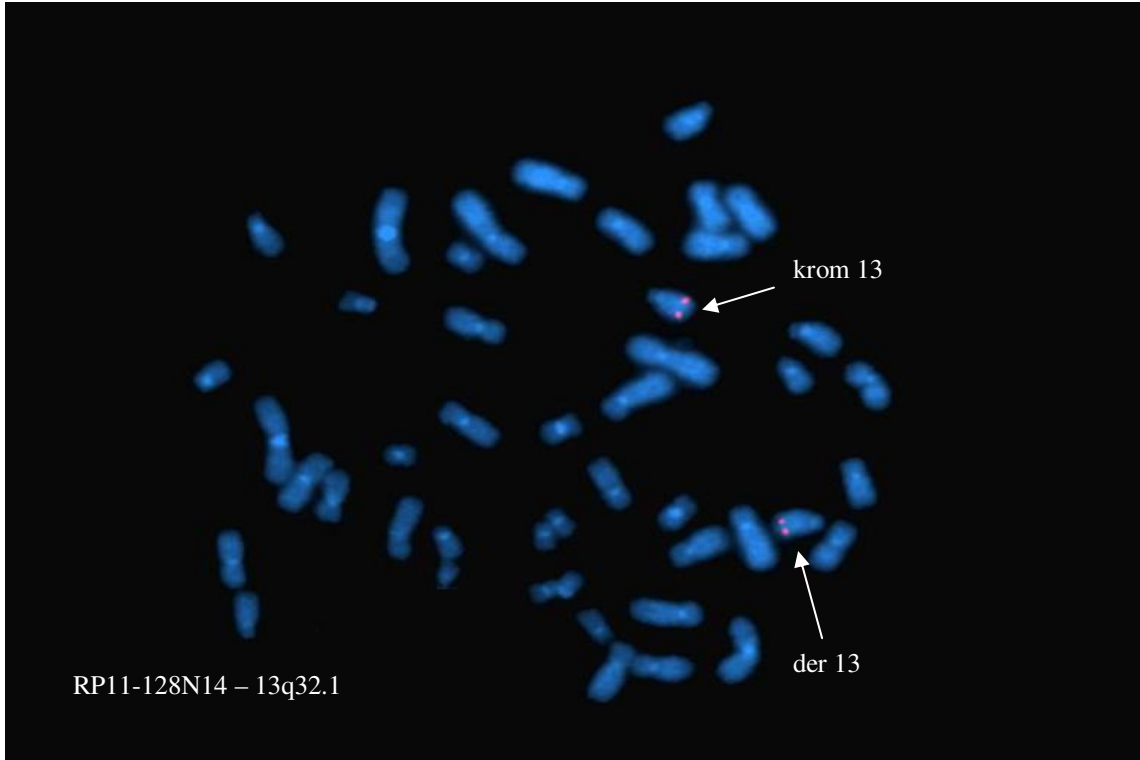
Olgunun bekletilmekte olan dip materyalinden elde edilen ilk preparatlarıyla yapılan FISH çalışmalarında mitoz kalitesinin ve oranının düşük olması, kromozomlarda erimelerin olması gibi materyalin eski olmasından kaynaklanabilecek sorunlarla karşılaşıldı. Olgudan yeni kan örneği istendi. Yeni kan örneğinden hazırlanan preparatlarda çalışmalar tekrarlandı ve başarılı sonuçlar alındı.

#### **BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı:**

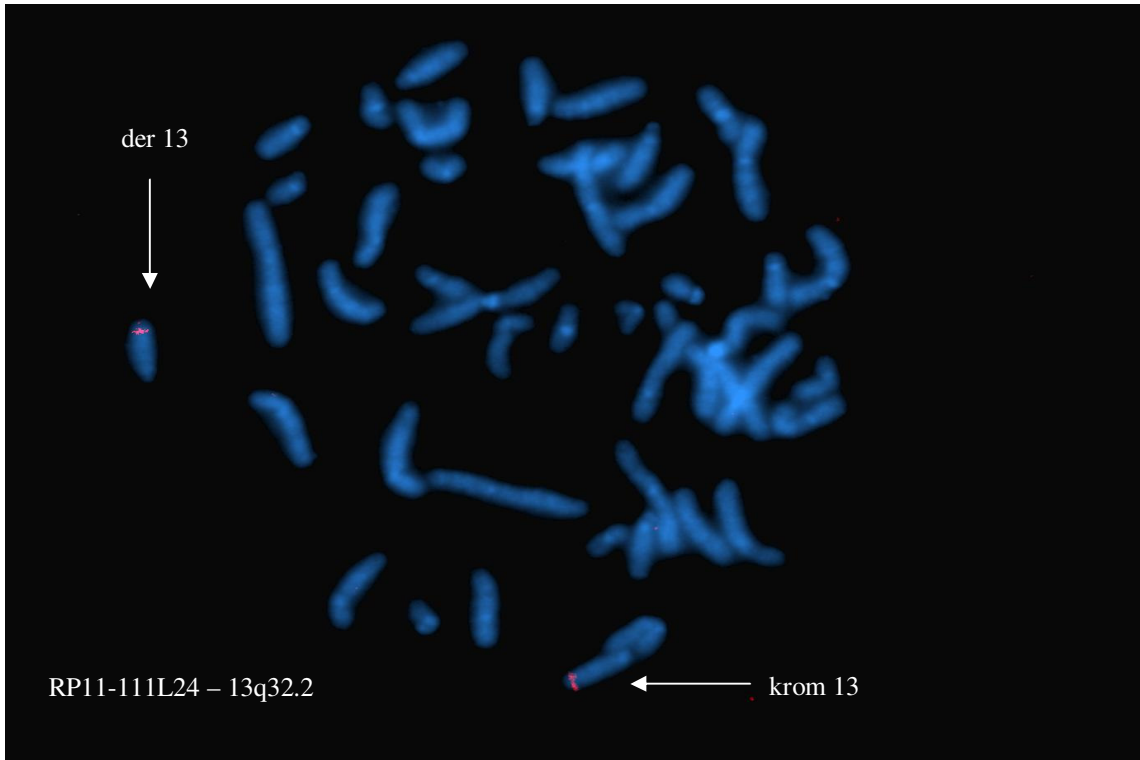
GTG bant analizine göre kırık noktası 13q32.2 olarak belirlenmişken, BAC-FISH uygulaması sonrasında 13q32.3 klonu için de sinyal alınması kırık noktasının bunun daha distalinde (13q33.1 bandı ?) olması gerektiğini gösterdi.



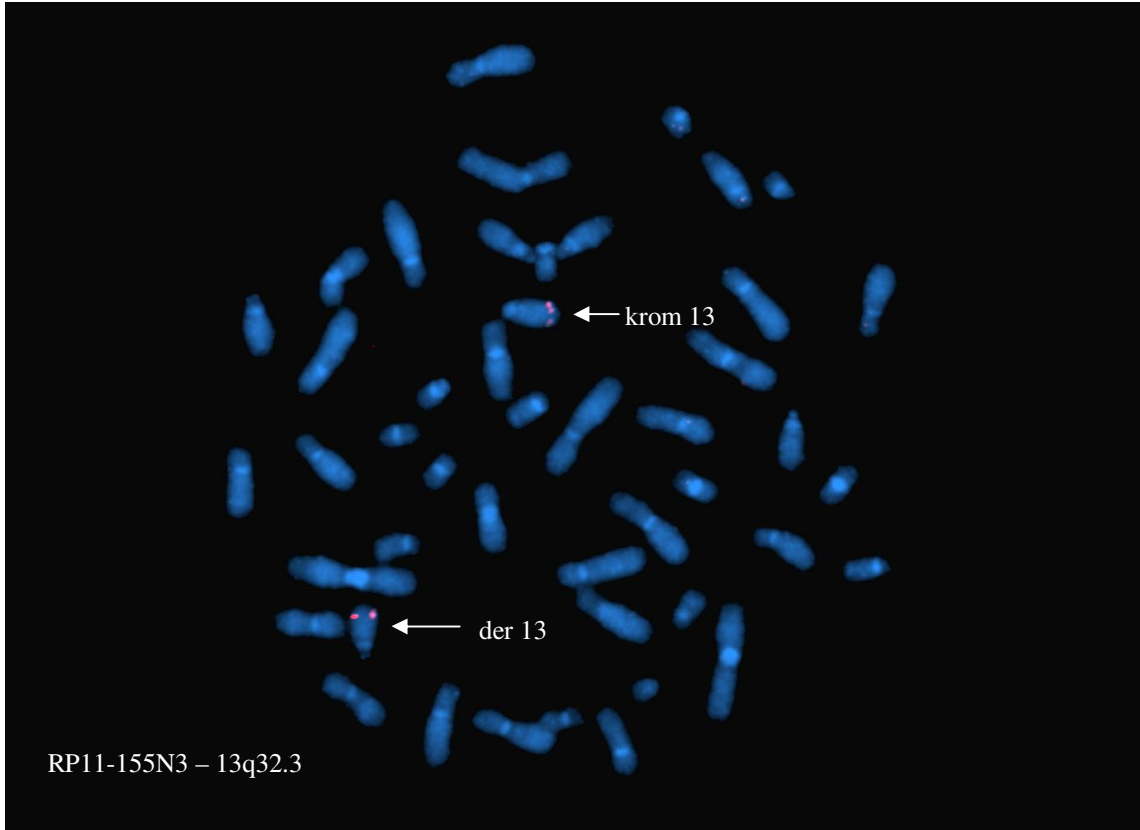
Şekil 4-6: Olgu 2'nin karyotipi



Şekil 4-7: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-8: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-9: Olgu 2'nin BAC-FISH resmi-3

### 4.2.3. OLGU 3: İ.Ç.

**Materyalin ilk geliş yılı** : 2005 (2008 de yeni kan örneği alındı)

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XX,13q- *de novo* (Şekil 4–10)

**Parental kromozom analiz sonuçları** : 46,XX ve 46,XY

**Ticari problemlerle yapılan FISH sonucu** :

46,XX,13q-.ish del(13)(pter→q14.1::q31.2→qter)(wcp13 + RB -, D13S1825 +)

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

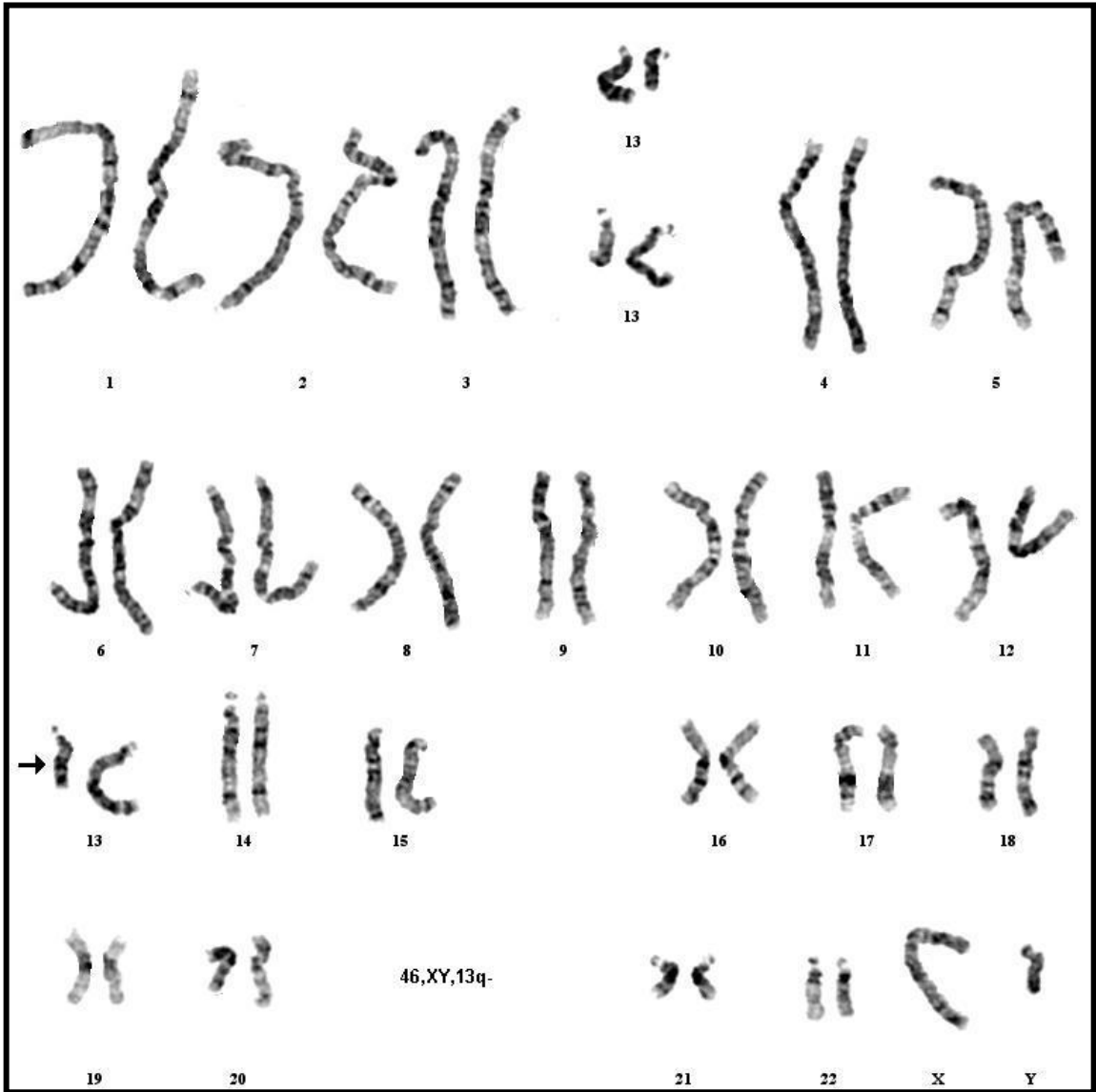
RP11-128N14 – 13q32.1, RP11-111L24 – 13q32.2, RP11-540M5 – 13q14.12, RP11-29P20 – 13q31.2 (Şekil 4–11, 4–12, 4–13, 4–14)

#### **BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar:**

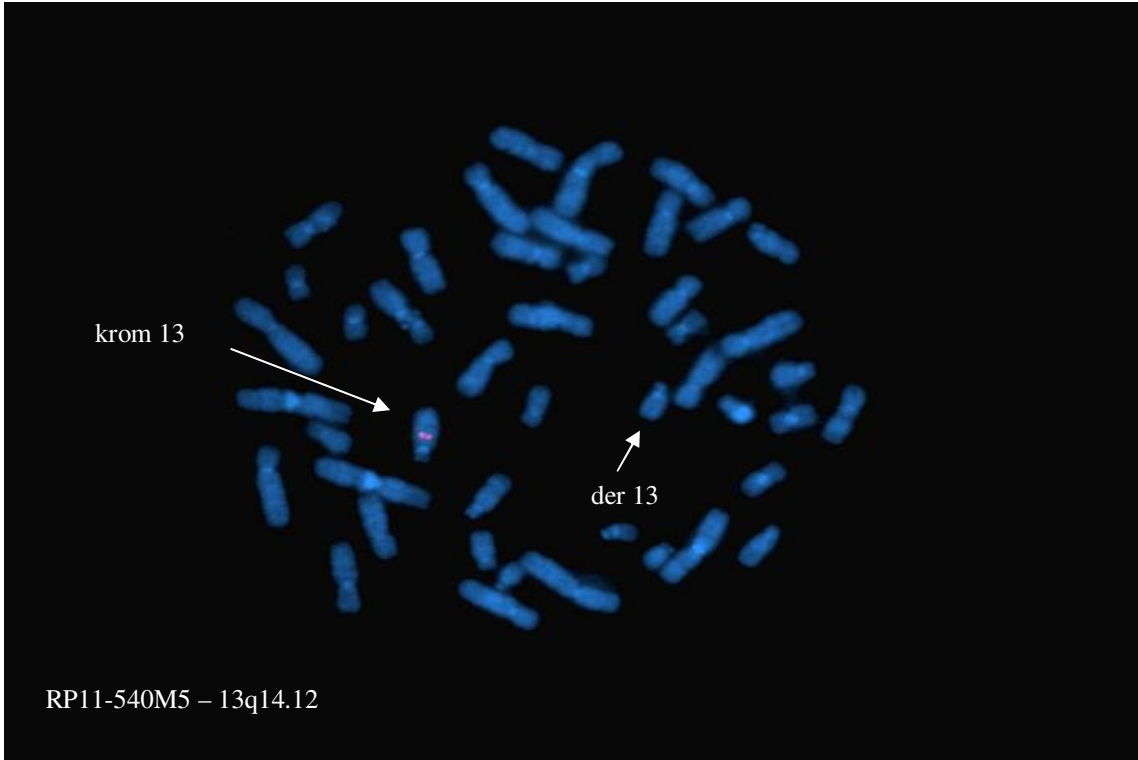
Olgumuzun saklanan materyalinden yapılan yaymalarla elde edilen preparatların FISH çalışmalarında kullanılamayacağına karar verildi ve yeni kan örneği istendi. Gelen yeni örnekle yapılan FISH çalışmalarından başarılı sonuçlar elde edildi.

#### **BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı:**

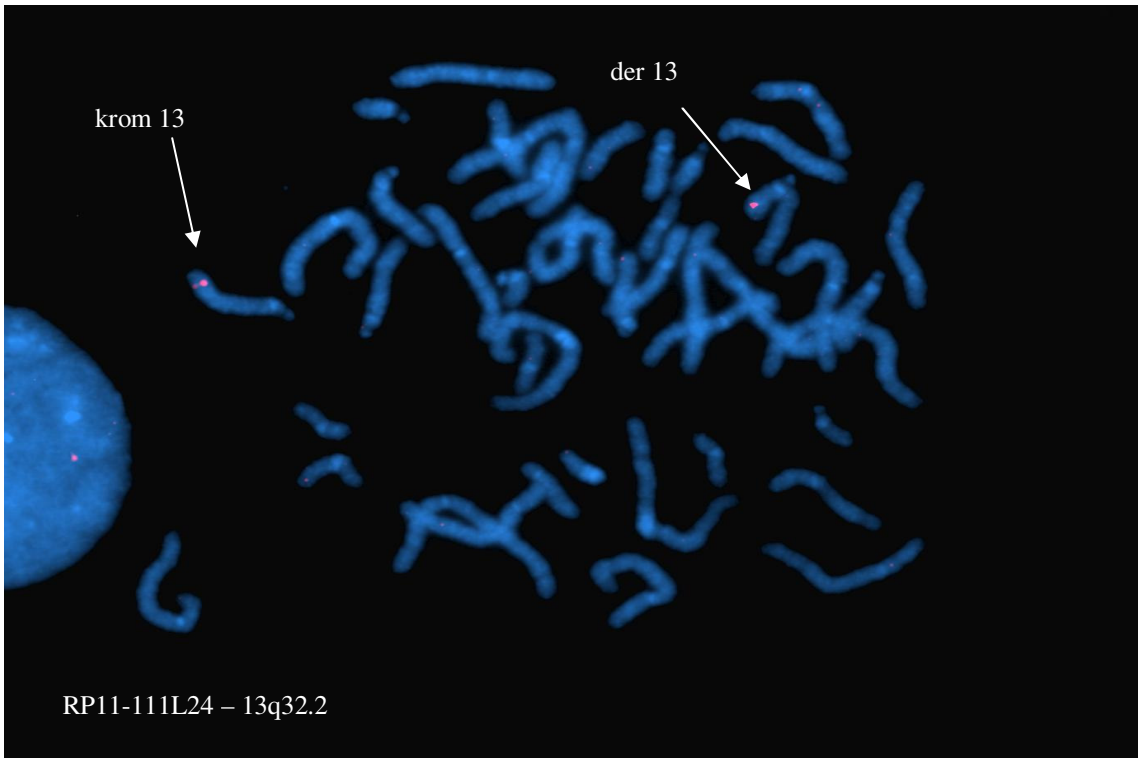
Telomer bölgesi için sinyal alınırken Retinoblastom bölgesi (13q14.3) için sinyal alınmaması delesyonun intersisiyal olduğunu gösterdi. BAC-FISH uygulamalarında 13q14.12 için sinyal alınmaması kırık noktasının daha proksimalinde olduğunu gösterdi. 13q31.2 klonu 14q ve 11p bölgelerine hibridizasyon gösterdi. Bu durum yanlış klonun gönderilmiş olabileceğini düşündürdü. 13q32.1 ve 13q32.2 klonlarıyla sinyal alındı. Bu sonuçlarla sitogenetik tanıya katkıda bulunulamadı.



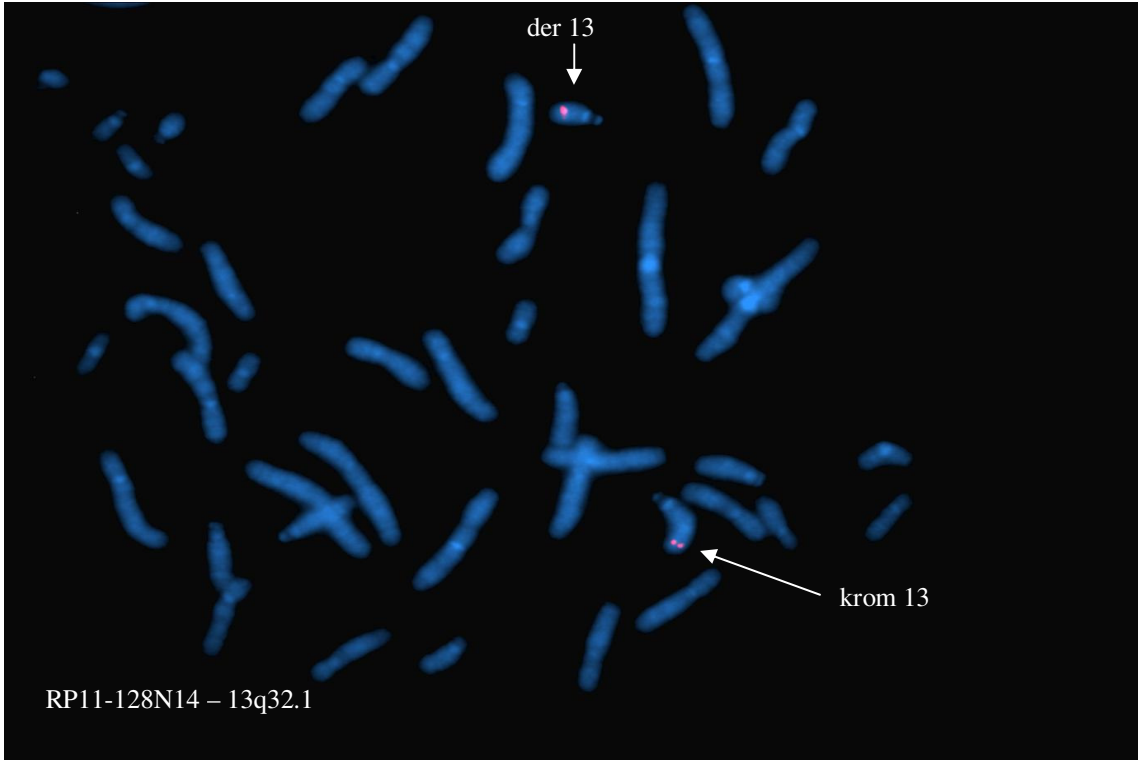
Şekil 4-10: Olgu 3'ün karyotipi



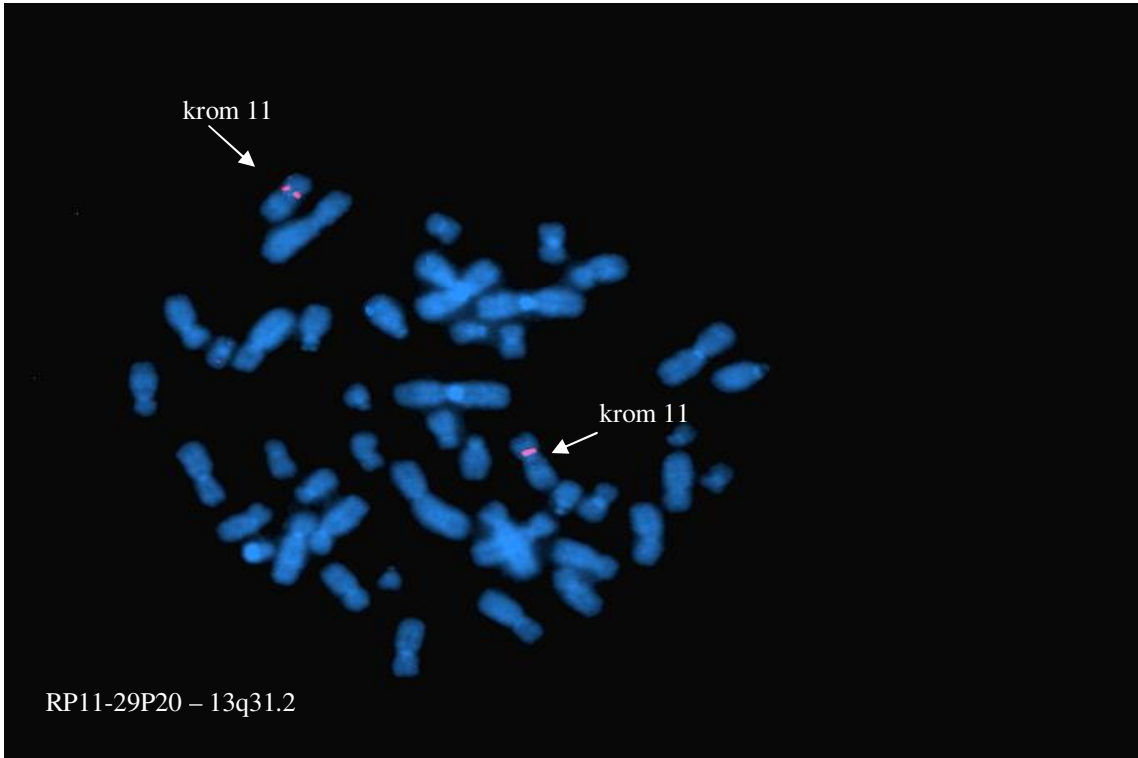
Şekil 4-11: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-12: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-13: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-3



Şekil 4-14: Olgu 3'ün BAC-FISH resmi-4

#### 4.2.4. OLGU 4: E.G.

**Materyalin geliş yılı** : 2006

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XY,22p+ (Şekil 4–15)

**Ticari problarla yapılan FISH sonucu** :

46,XY,22p+.ish dup(22)(pter→q12.1?::cen→qter)(wcp22 +, D22S75 ++)

**Annenin karyotipi** : 46,XX,22p+.ish dup(22)(cen11.22)(D22S75++)

**Babanın karyotipi** : 46,XY

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

RP11-586I18 – 22q11.21, RP11-24N11 – 22q11.22, RP11-759G12 – 22q11.23

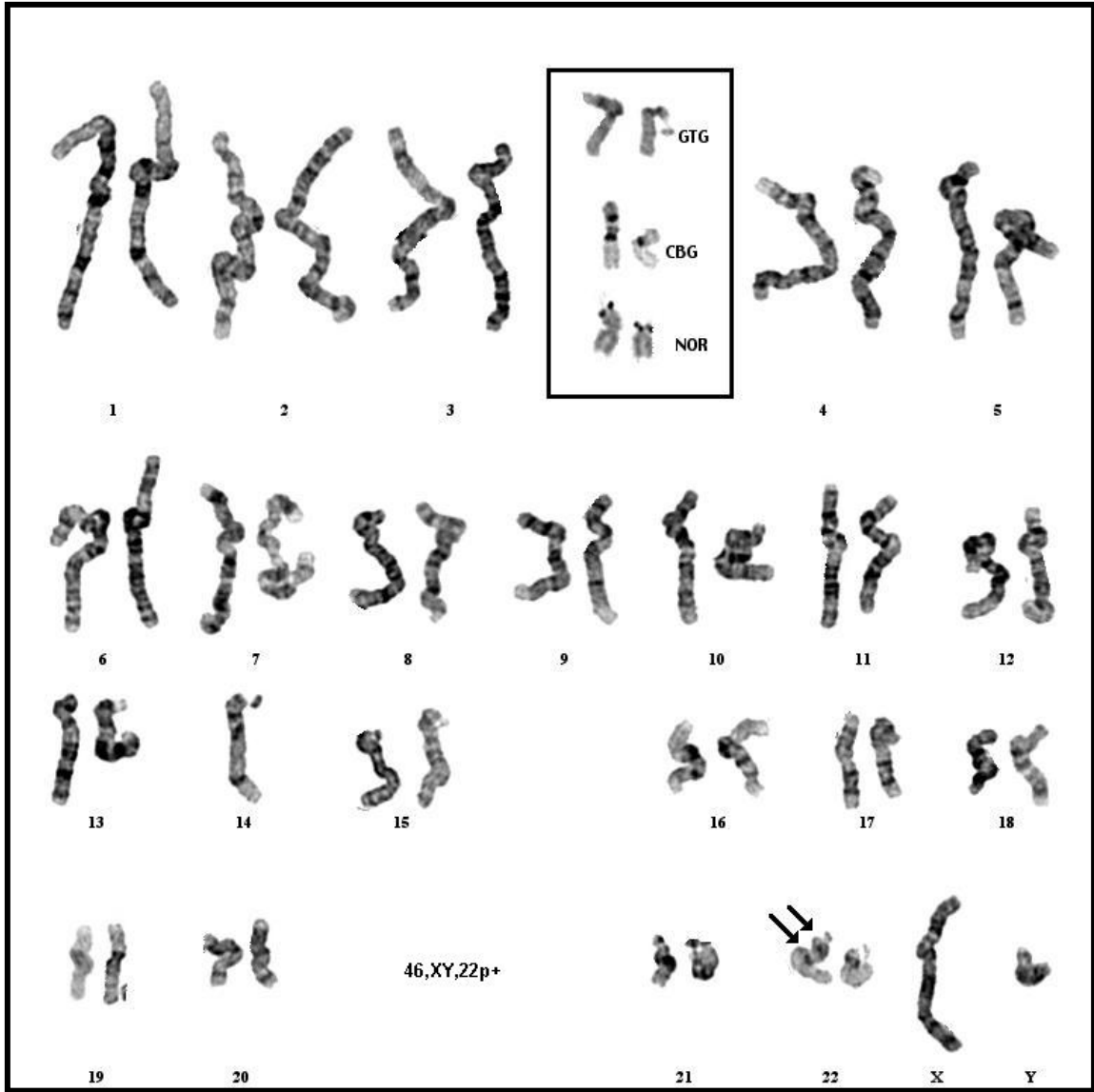
(Şekil 4–16, 4–17, 4–18)

**BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar** :

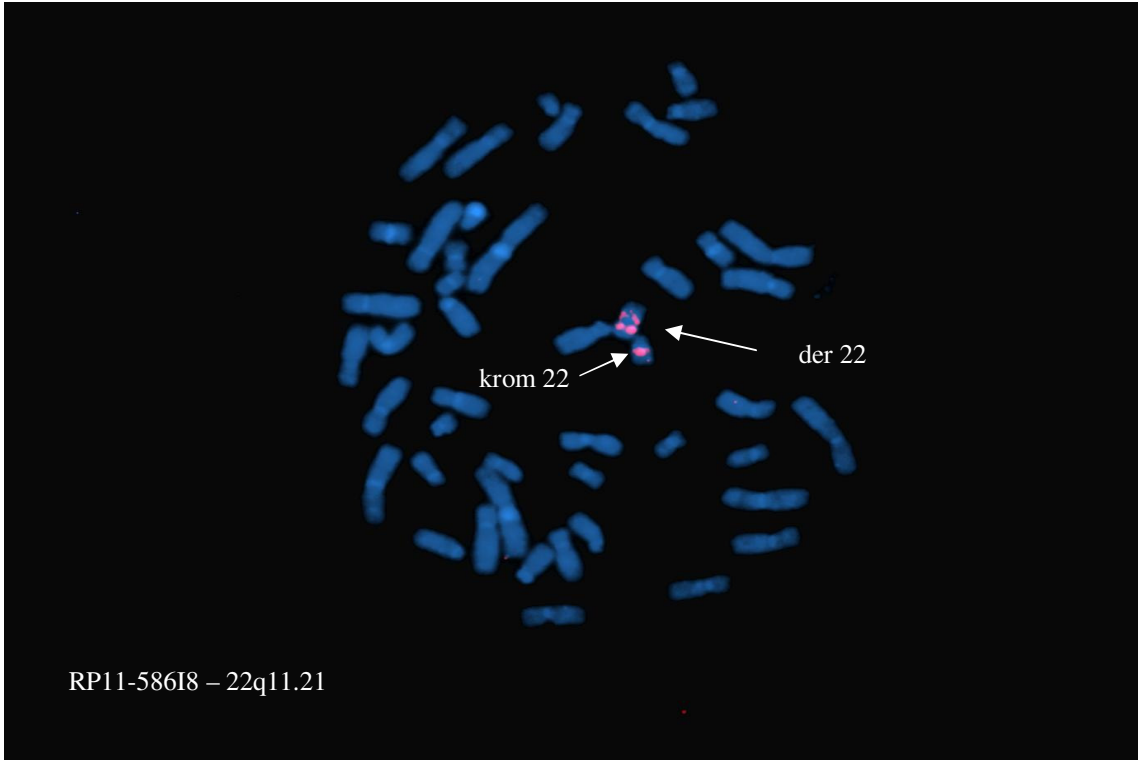
Olgunun bekletilmekte olan dip materyalinden elde edilen ilk preparatlarıyla yapılan FISH çalışmalarında herhangi bir sorunla karşılaşılmadı. Çalışmalar başarılı bir şekilde tamamlandı.

**BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı** :

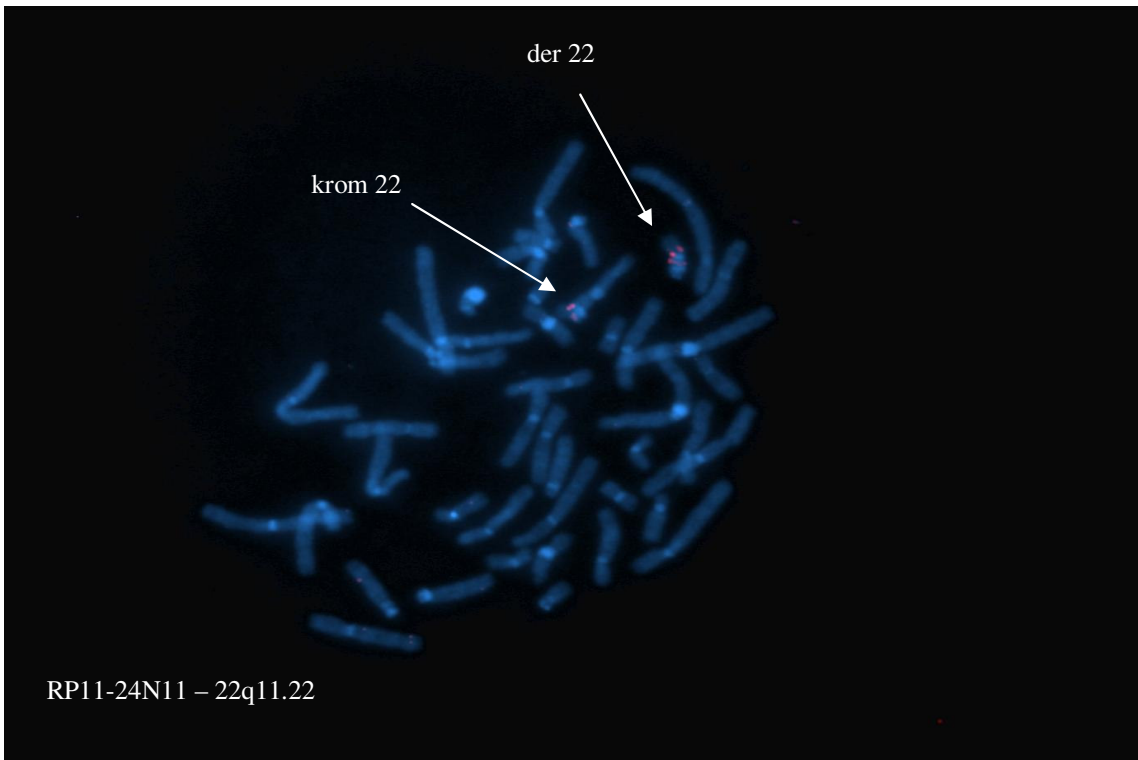
GTG bant analizinde 22p de ilave materyal görülmesi üzerine uygulanan C ve NOR bant sonucunda kromozomun çift sentromer ve tek satellit içerdiği belirlendi. WCP 22 ve DiGeorge probları ile yapılan FISH çalışmalarıyla ilave bölgenin tamamen boyandığı, DiGeorge bölgesi için (22q11.22) duplikasyon olduğu belirlendi. GTG bant kalıbına göre kırık noktasının sentromer ve 22q12.1 olduğu düşünüldü. BAC-FISH çalışmaları ile ilave materyalin olduğu bölgede 22q11.21 ve 22q11.22 klonları için sinyal alınması, 22q11.23 için ise sinyal alınmaması kırık noktasının 22q12.1 değil, 22q11.22 ve 22q11.23 arasında olduğunu göstermektedir.



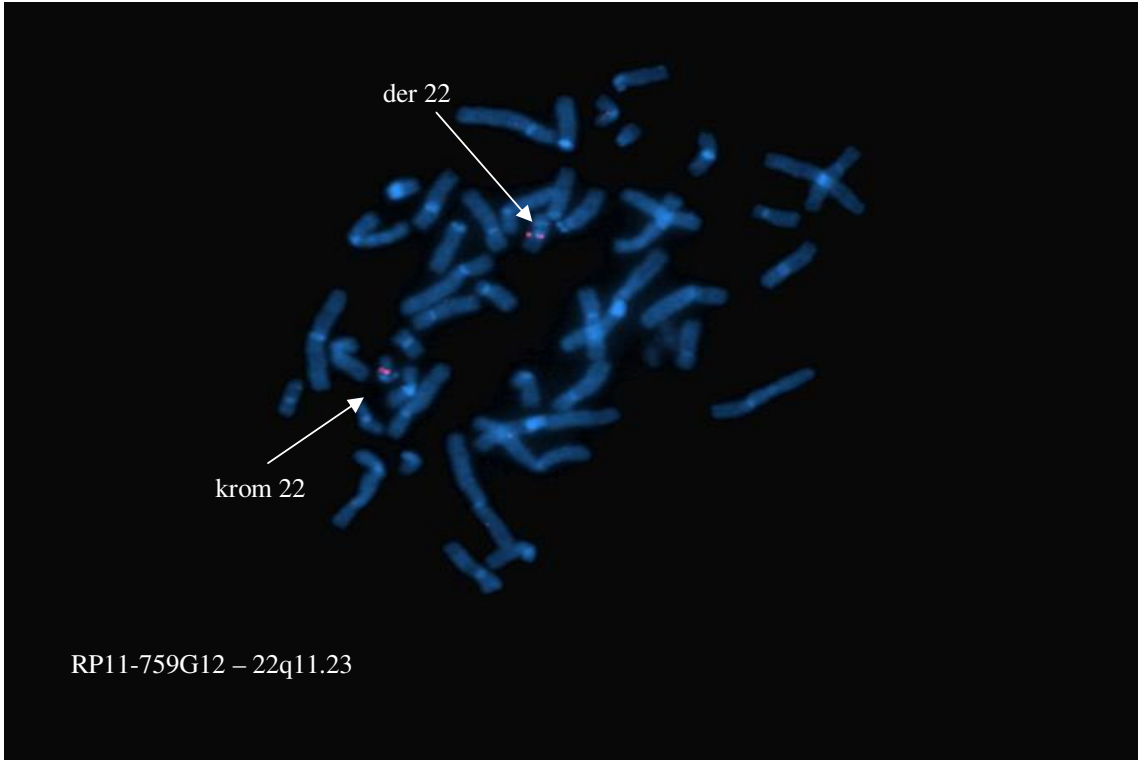
Şekil 4-15: Olgu 4'ün karyotipi



Şekil 4-16: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-17: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-18: Olgu 4'ün BAC-FISH resmi-3

#### 4.2.5. OLGU 5: H.Ç. (Prenatal olgu)

**Materyalin geliş yılı** : 2008

**Kromozom analiz endikasyonu** : PAT-USG

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XY,t(9:11)(p?:p?) *de novo* (Şekil 4-19)

**Parental kromozom analiz sonuçları** : 46,XX ve 46,XY

**Ticari problarla yapılan FISH sonucu** : 46,XY,t(1:9:11)(q?:p?:p?)

(Şekil 4-20, 4-21, 4-22, 4-23)

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

RP11-3J10 – 9p13.2, RP11-335H2 – 9p22.2, RP11-307K19 – 9p22.3,  
RP11-157A10 – 9p24.2 (Şekil 4-24, 4-25, 4-26, 4-27)

**BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar** :

Materyalin taze oluşu nedeniyle uygulamada herhangi bir sorun yaşanmadı.

**BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı** :

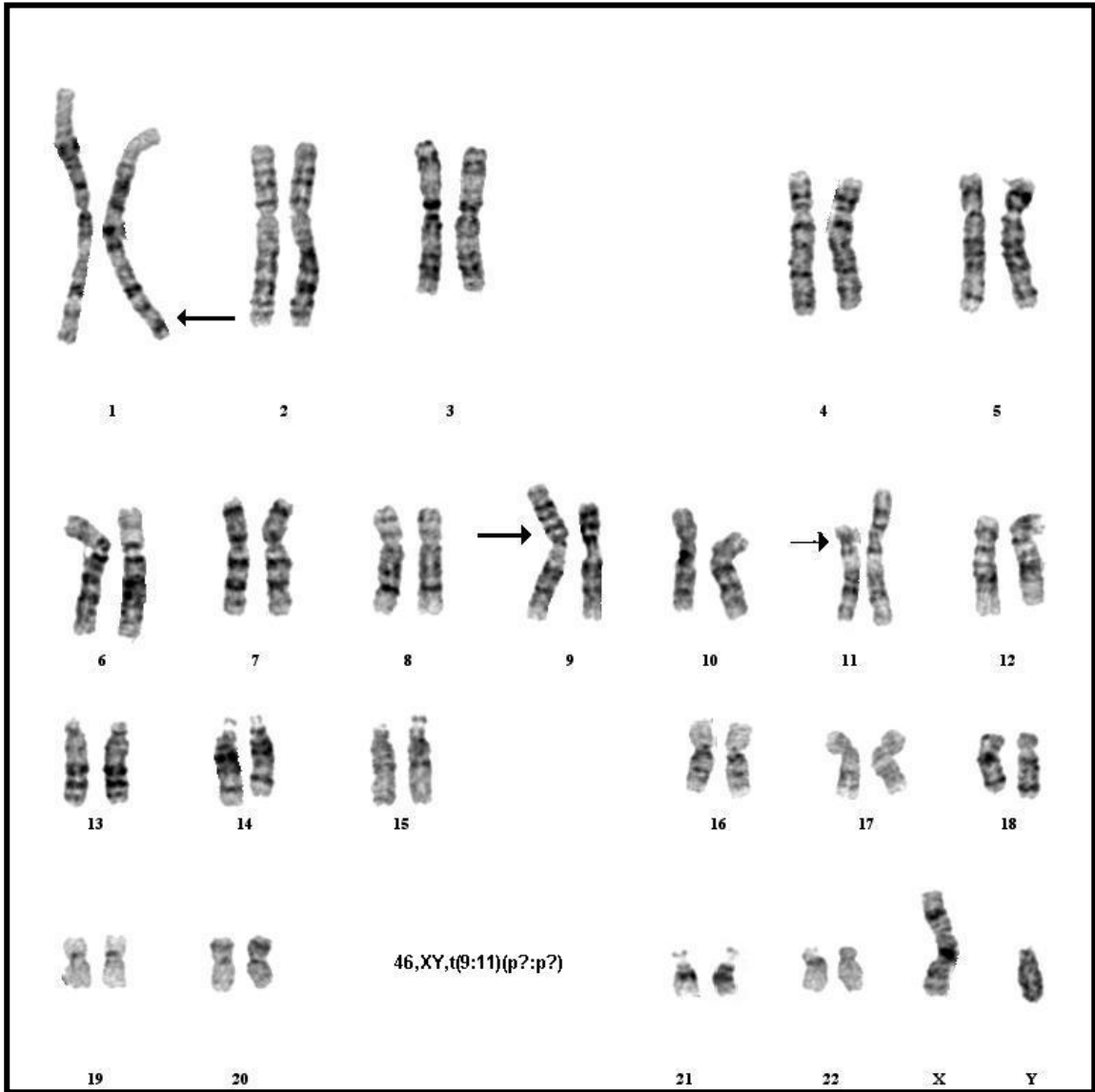
GTG bant analizleri sonucunda 9. ve 11. kromozomlar arasında bir translokasyonun olduğu görüldü. wcp 9 ve 11 ile yapılan FISH incelemesinde 11. kromozoma ait materyalin 9p'de yer aldığı, 9. kromozoma ait materyalin bir kısmının 11p'de yer aldığı ancak bu kromozomun uç bölgesinde boyanmayan bir alanın kaldığı, beklenmedik bir şekilde 1q telomer bölgesinin ise 9. kromozom için sinyal verdiği gözlemlendi. wcp 1 probu ile yapılan incelemede 1q distalindeki bu bölgenin boyanmadığı görüldü. 1q telomer probu ile yapılan çalışmada probun derivatif 11. kromozomun telomer bölgesinde sinyal verdiği görüldü. Bu sonuçlarla translokasyonun 3 kromozoma ait 4 kırık noktası içeren bir CCR olduğuna karar verildi. Ancak özgün kırık noktaları belirlenemedi.

BAC-FISH uygulamaları için 9. kromozoma ait 4 klon kullanıldı. 9p13.2 klonu ile normal ve derivatif 9. kromozomlarda sinyal alınırken, 9p22.2, 9p22.3

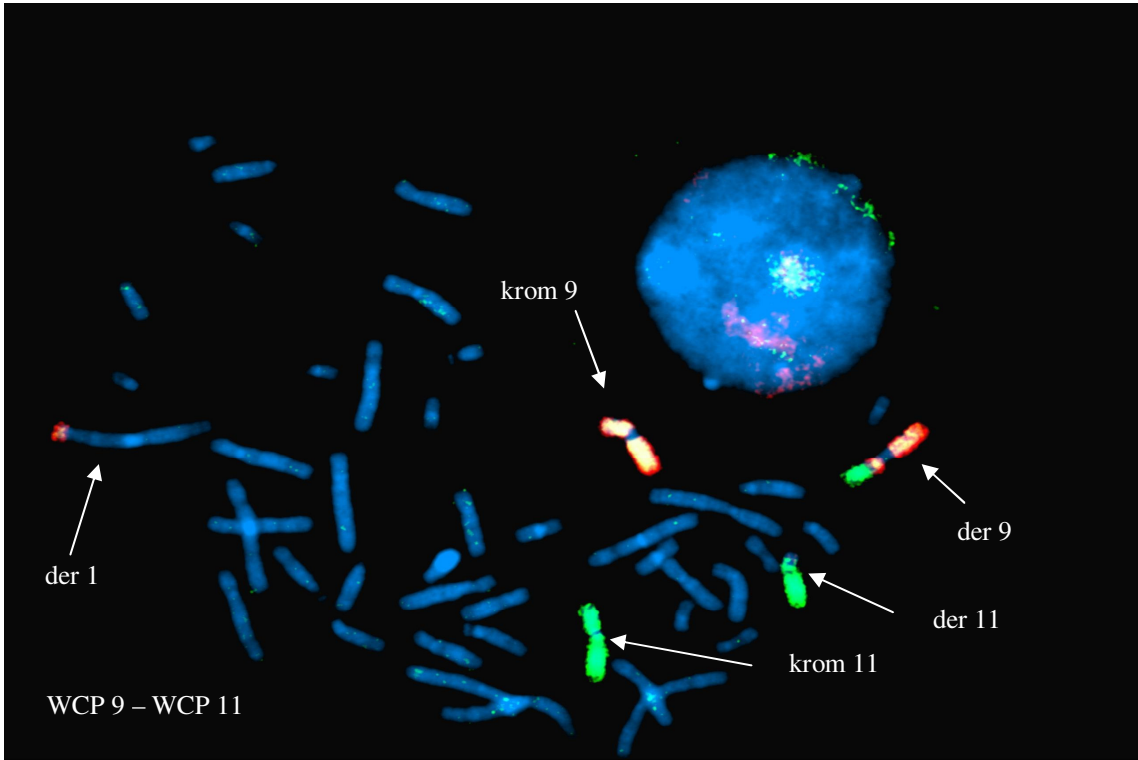
ve 9p24.2 klonlarından 1. kromozomun q terminalinde sinyal alındı. Bu sonuçlarla 9p22.2 den 9p telomer bölgesine kadar olan bölgenin 1. kromozomun q terminalinde yer aldığı kesinleşti. 9p13.3 ile 9p22.1 bantları arasından kırık noktaları kesin olarak belirlenemeyen bir segmentin derivatif 11p'ye yerleştiği ve bu segmentin açık ucuna 1q telomerin geldiği düşünüldü. Karyotip;

46,XY,t(1;9;11)(1pter→1q43::9p22.2?→9pter;11pter→11p11.12?::9p22.1?→9qter;1q ter→ 1q43::9p21.3?→9p13.3?::11p11.12?→11qter) olarak yorumlandı.

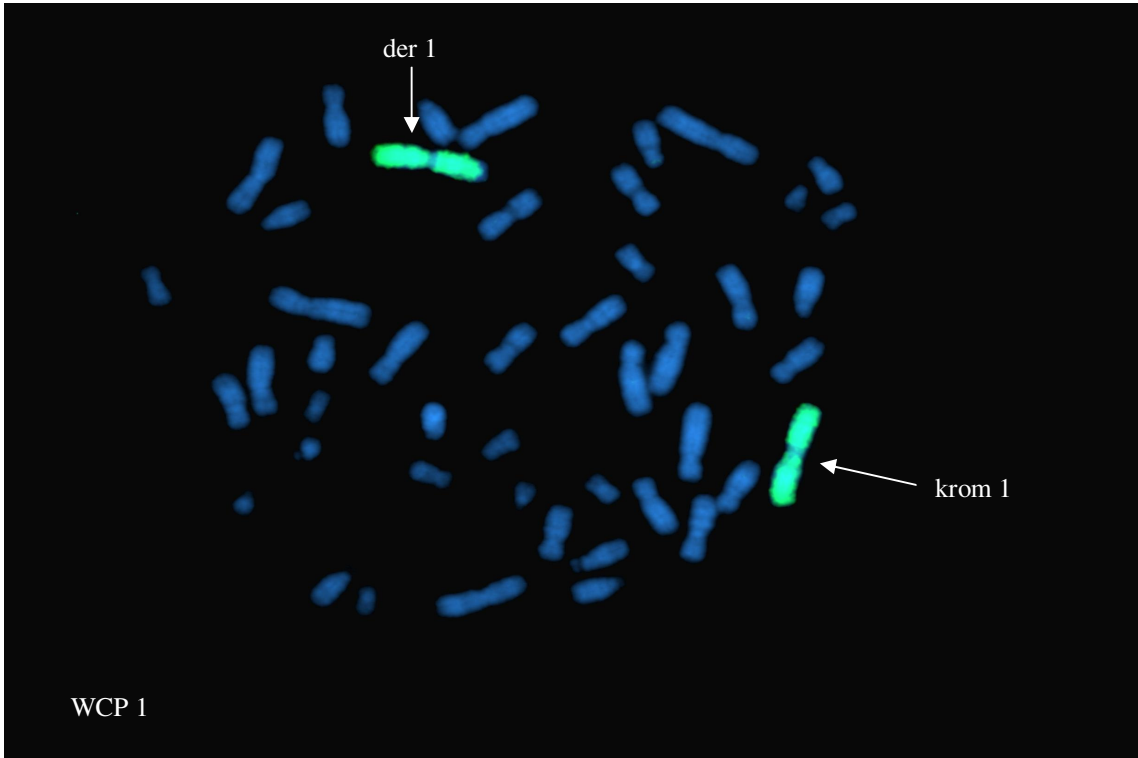
Sonuç olarak yeterli sayıda klonla BAC-FISH çalışması yapılamadığından kırık noktaları kesin olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle anomalinin ya daha fazla özgün BAC klonuyla çalışılması ya da Array CGH tekniğiyle aydınlatılması gerekmektedir.



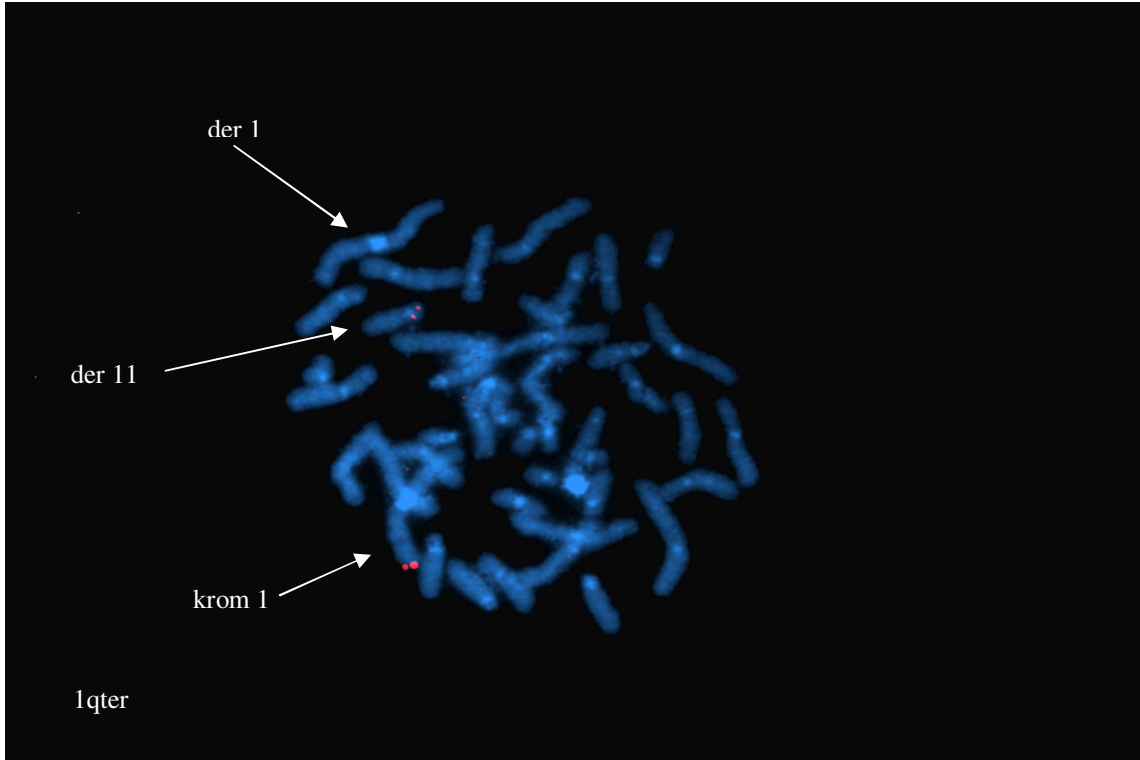
Şekil 4-19: Olgu 5'in karyotipi



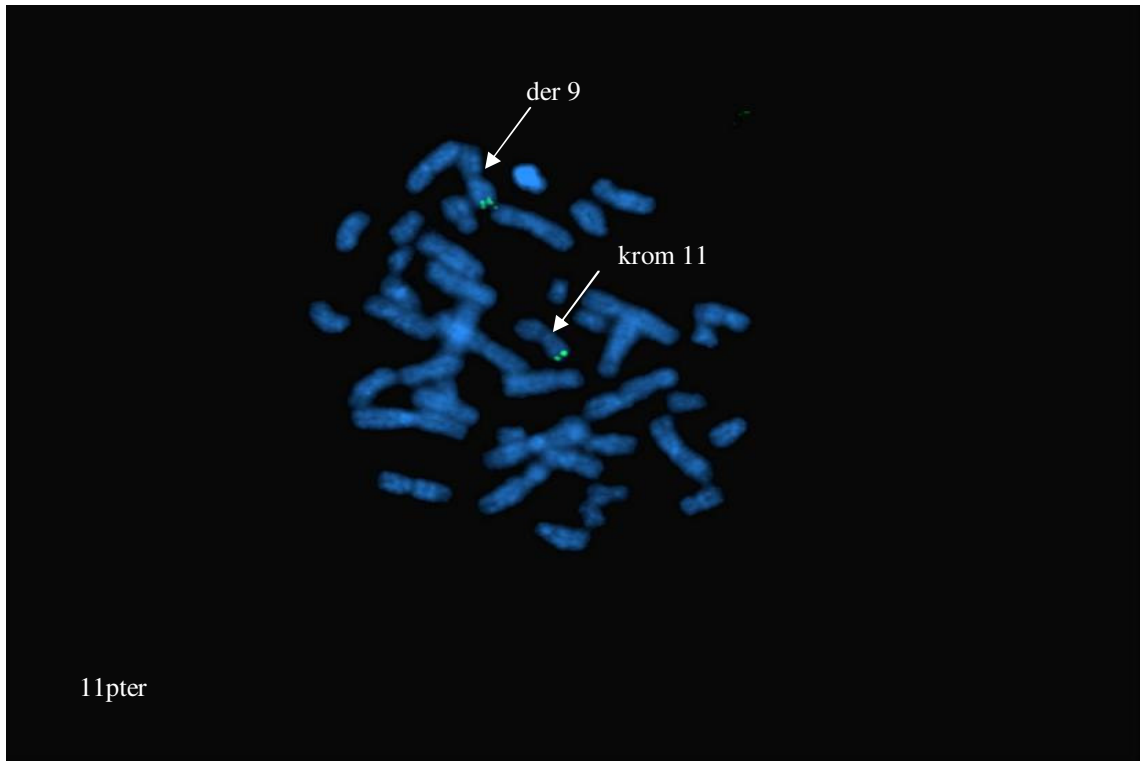
Şekil 4-20: Olgu 5'in FISH resmi-1



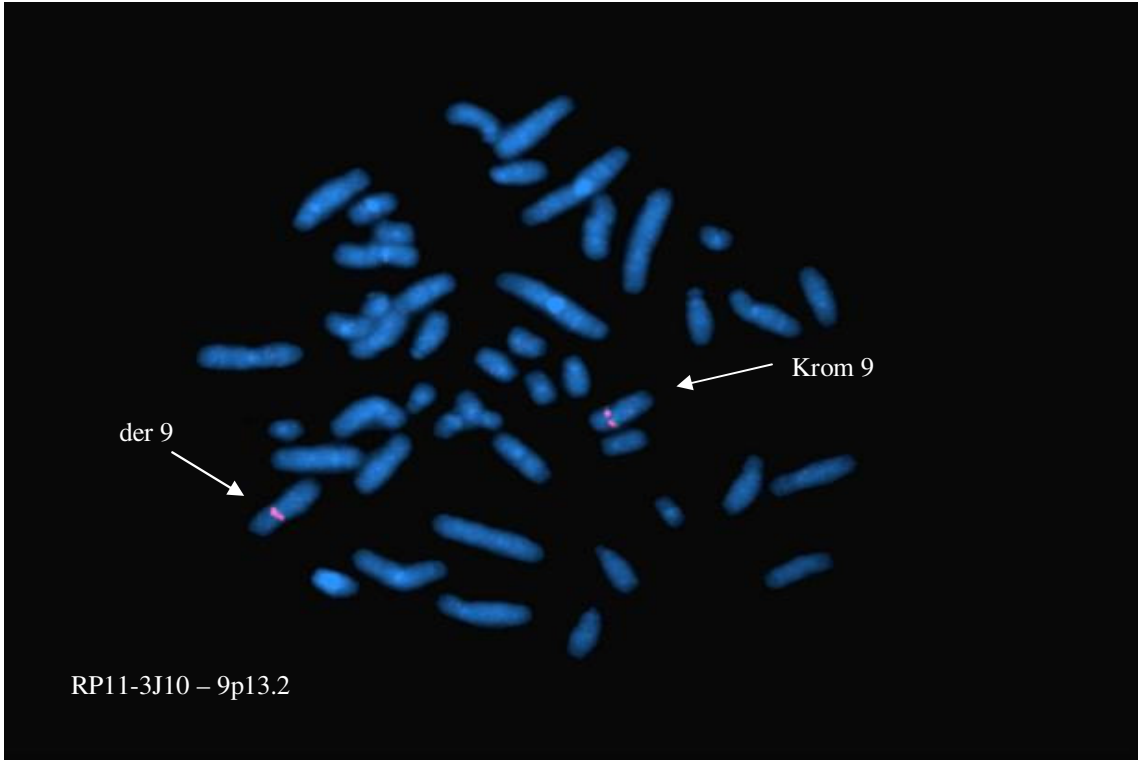
Şekil 4-21: Olgu 5'in FISH resmi-2



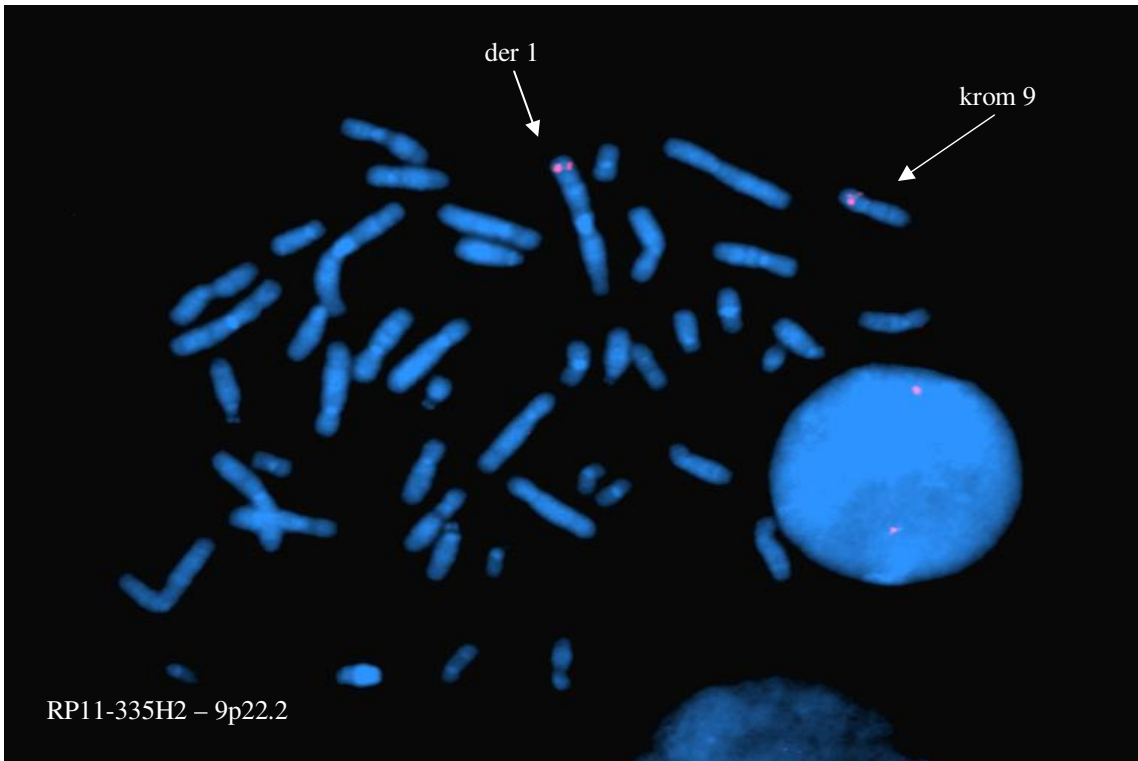
Şekil 4-22: Olgu 5'in FISH resmi-3



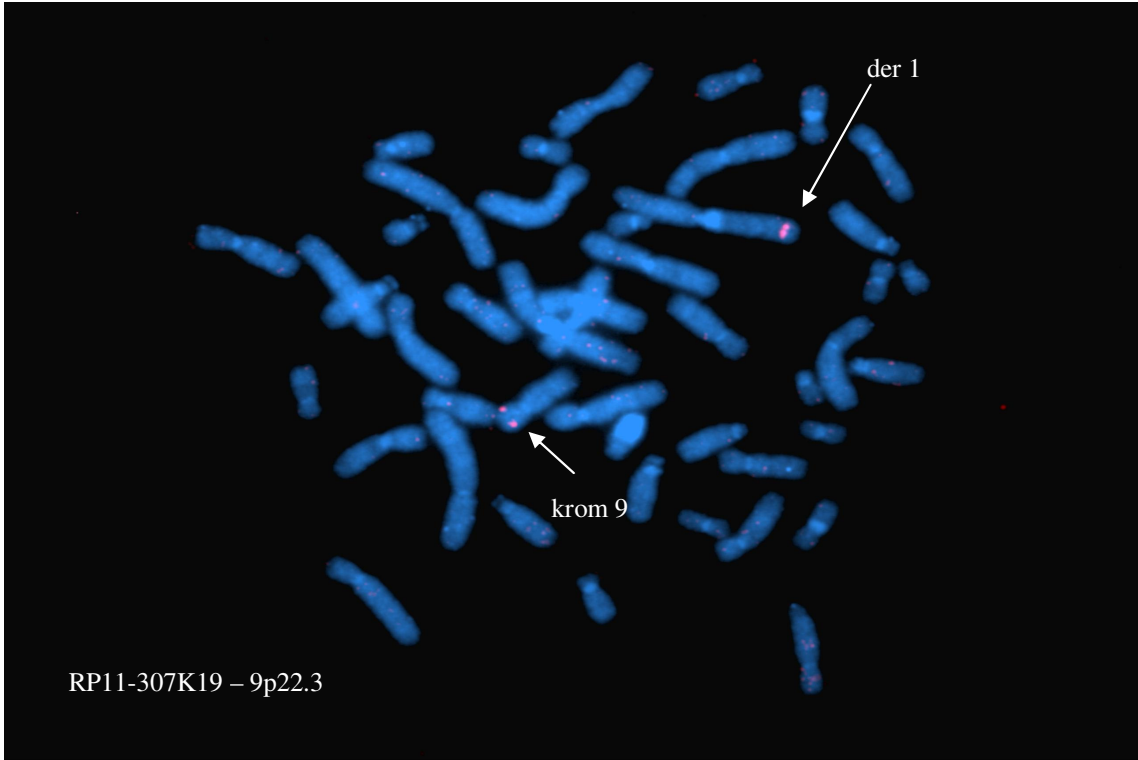
Şekil 4-23: Olgu 5'in FISH resmi-4



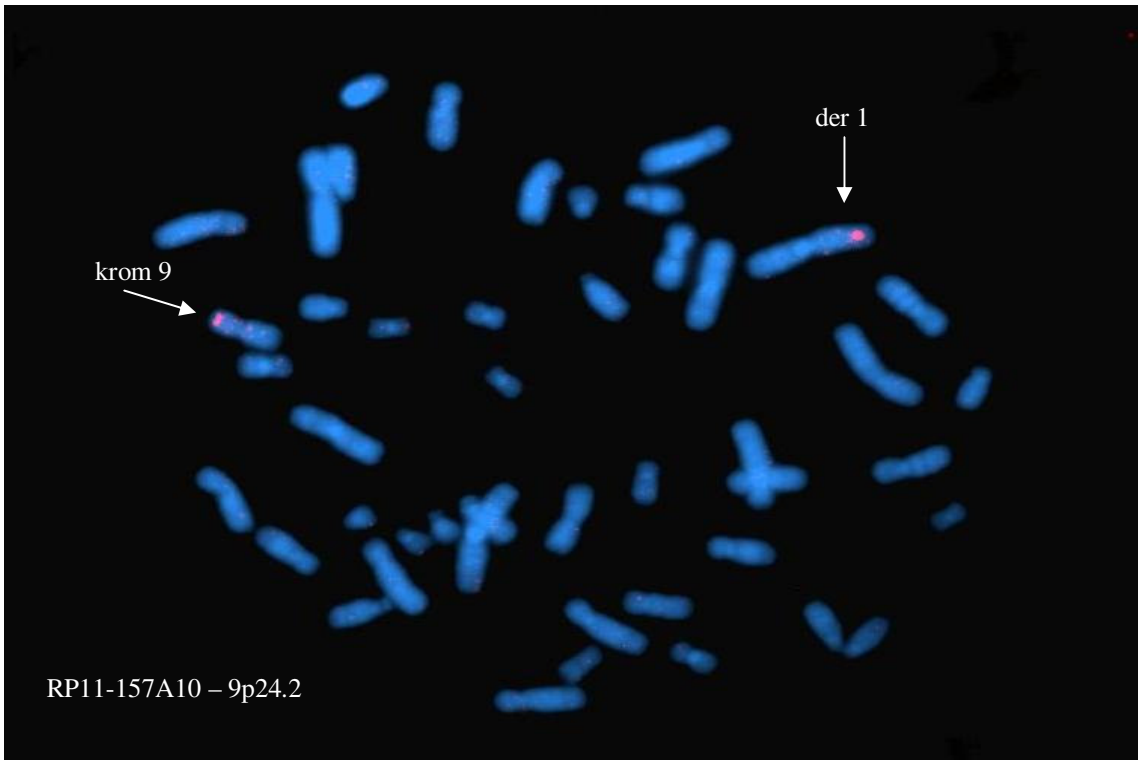
Şekil 4-24: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-25: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-26: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-3



Şekil 4-27: Olgu 5'in BAC-FISH resmi-4

**4.2.6. OLGU 6: A.K.**

**Materyalin geliş yılı** : 2005

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR

**GTG bant analiz sonucu** : 45,XY,-22,2q+ *de novo* (Şekil 4–28)

**Parental kromozom analiz sonuçları** : 46,XX ve 46,XY

**Ticari problarla yapılan FISH sonucu** :

45,XY,-22,der(2)(2pter→2q37.3::22q13→22qter).ish 22q11.2(D22S75x1)

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

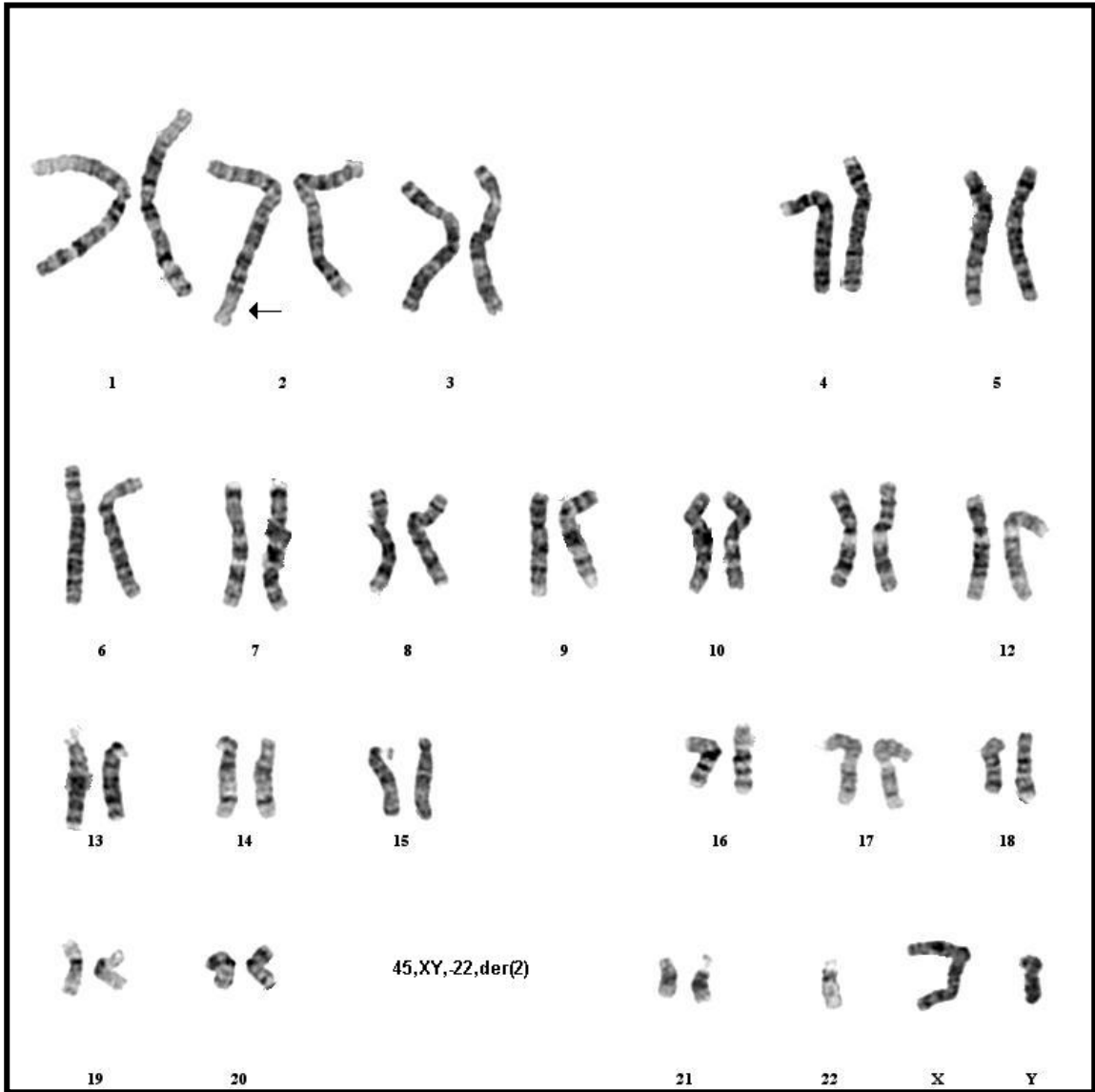
RP11-455G13 – 22q13.1 (Şekil 4–29)

**BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar** :

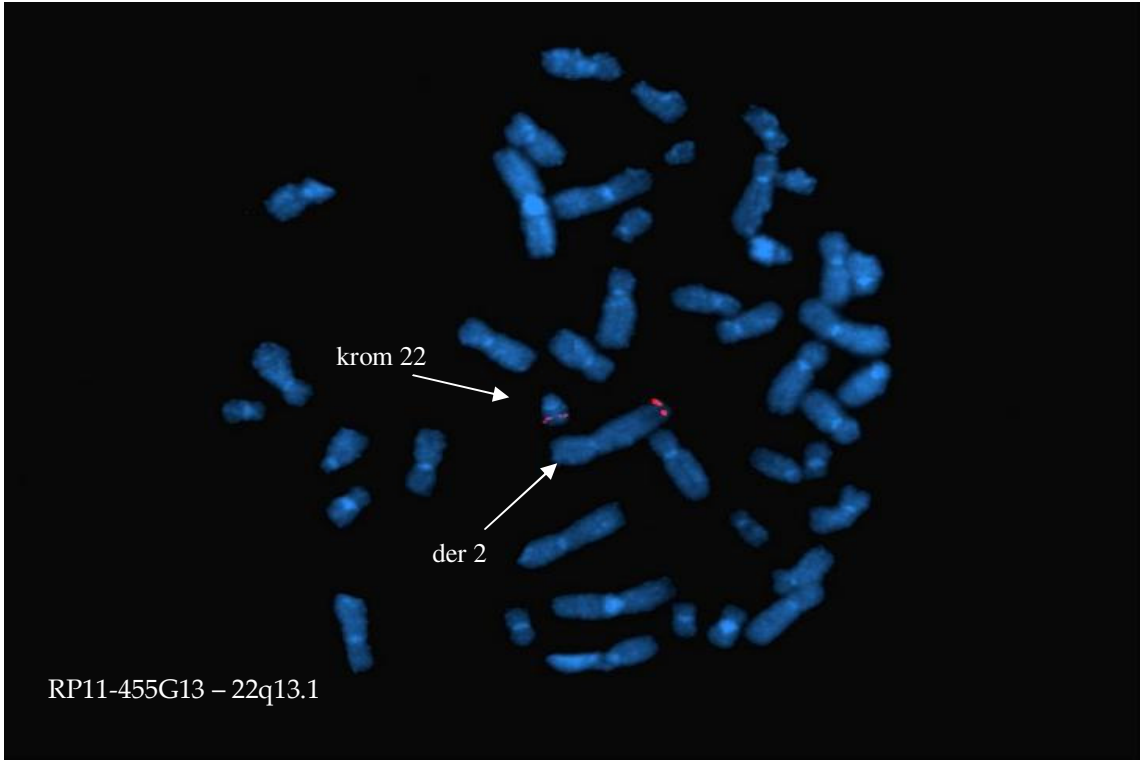
FISH çalışmalarında herhangi bir sorunla karşılaşılmadı.

**BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı** :

GTG bant analizine göre düşünülen kırık noktasının doğru olduğu, 22q13.1 bölgesini işaretleyen proba yapılan BAC-FISH çalışması ile gösterildi.



Şekil 4-28: Olgü 6'nın karyotipi



Şekil 4-29: Olgu 6'nın BAC-FISH resmi

#### 4.2.7. OLGU 7: S.E.

**Materyalin ilk geliş yılı** : 2004 (2008 de yeni kan örneği geldi)

**Kromozom analiz endikasyonu** : MKA/MR –

**GTG bant analiz sonucu** : 46,XY (Şekil 4-30)

**Ticari problemlerle yapılan FISH sonucu** :

46,XX.ish dup(22)(q11.2q11.2)(D22S75 ++, N85A3 +) pat

**Annenin karyotipi** : 46,XX

**Babanın karyotipi** :46,XY.ish 22q11.2 (D22S75x2)/46,XY.ishdup(22) (q11.2q11.2) (D22S75++, N85A3+) [75/25]

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

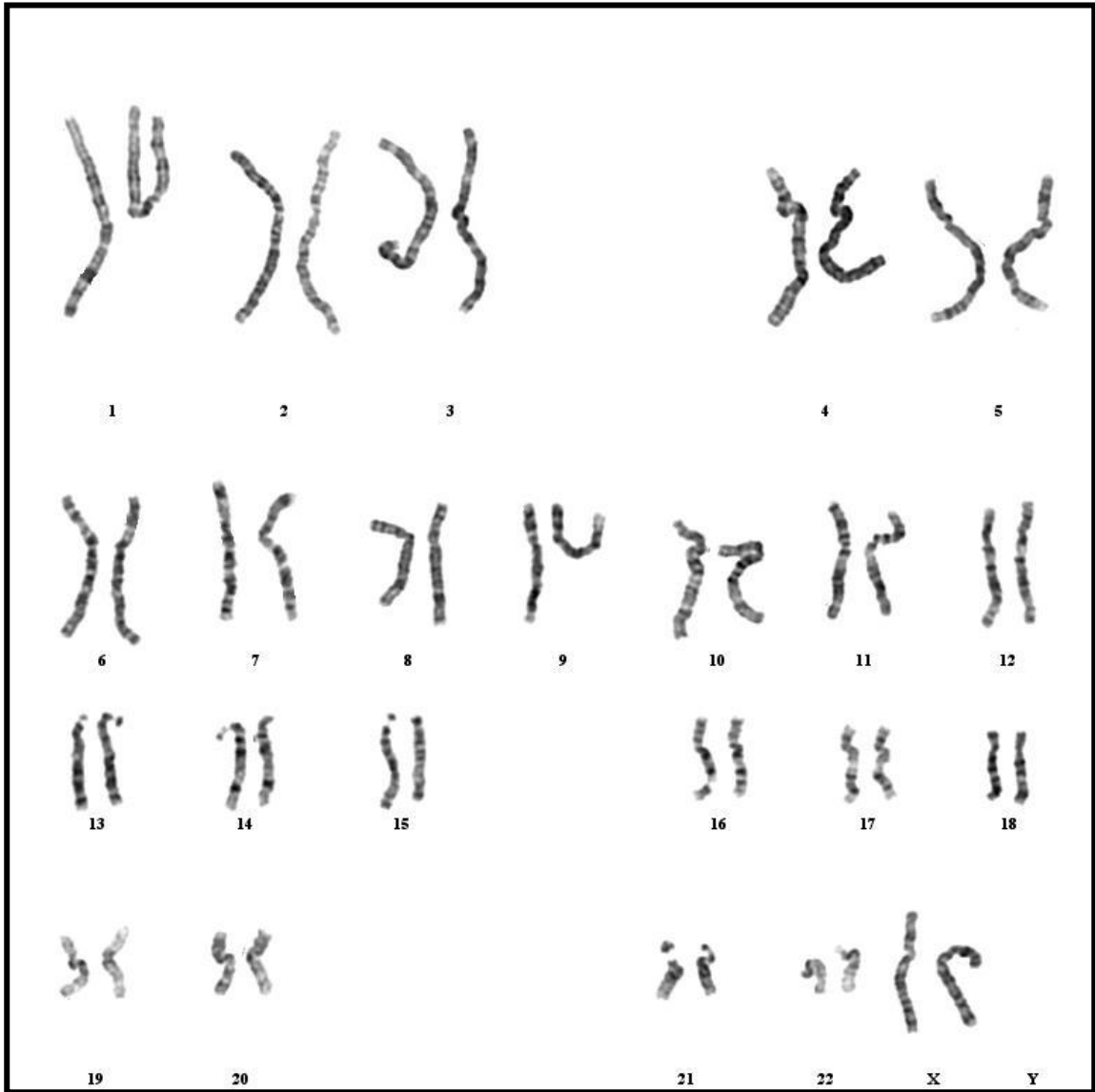
RP11-586I18 – 22q11.21, RP11-24N11 – 22q11.22, RP11-759G12 – 22q11.23, RP11-635G2 – 22q12.1 (Şekil 4–31, 4–32, 4–33)

**BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar** :

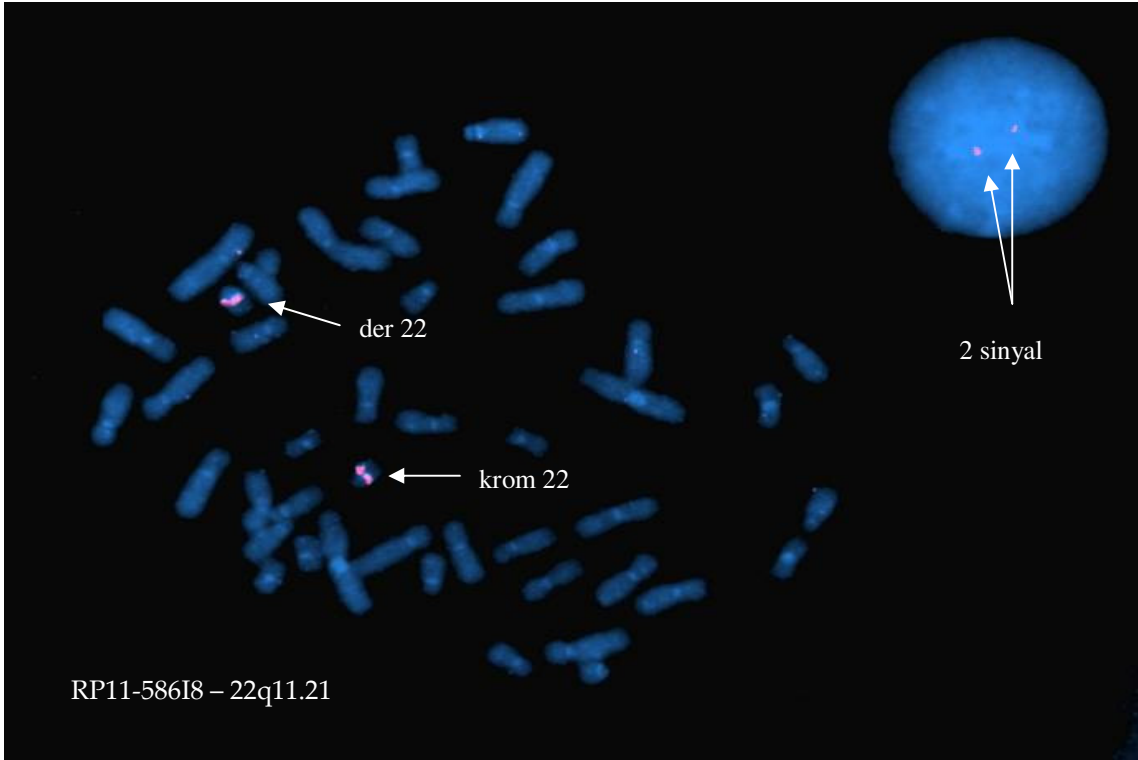
Olgunun saklanan olan dip materyalinden elde edilen ilk preparatlarıyla yapılan FISH çalışmalarında mitoz kalitesinin ve oranının düşük olması, kromozomlarda erimelerin olması gibi materyalin eski olmasından kaynaklanabilecek sorunlarla karşılaşıldı. Olgudan yeni kan örneği istendi. Yeni kan örneğinden hazırlanan preparatlarda işlemler tekrarlandı ve başarılı sonuçlar alındı. Ancak 22q12.1 ile yapılan çalışmalar çok fazla nonspesifik sinyaller içerdiği için özgün sonuçlar vermedi ve bundan dolayı resimlenmedi.

**BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı** :

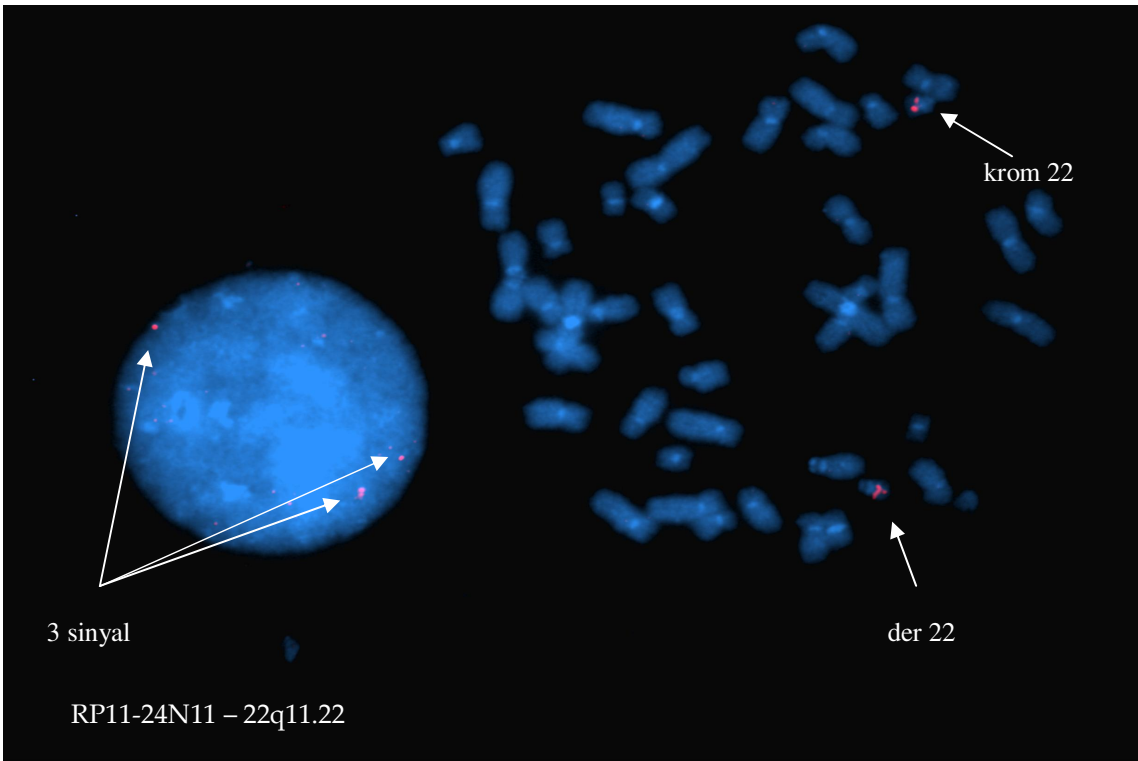
BAC-FISH çalışmaları sonucunda 22q11.21 ve 22q11.23 bantları için 2 sinyal alınırken, 22q11.22 klonu için interfaz FISH'te 3 sinyal gözlemlendi. Bu sonuçlar duplikasyonun sadece 22q11.22 bandını içerdiğini göstermiştir.



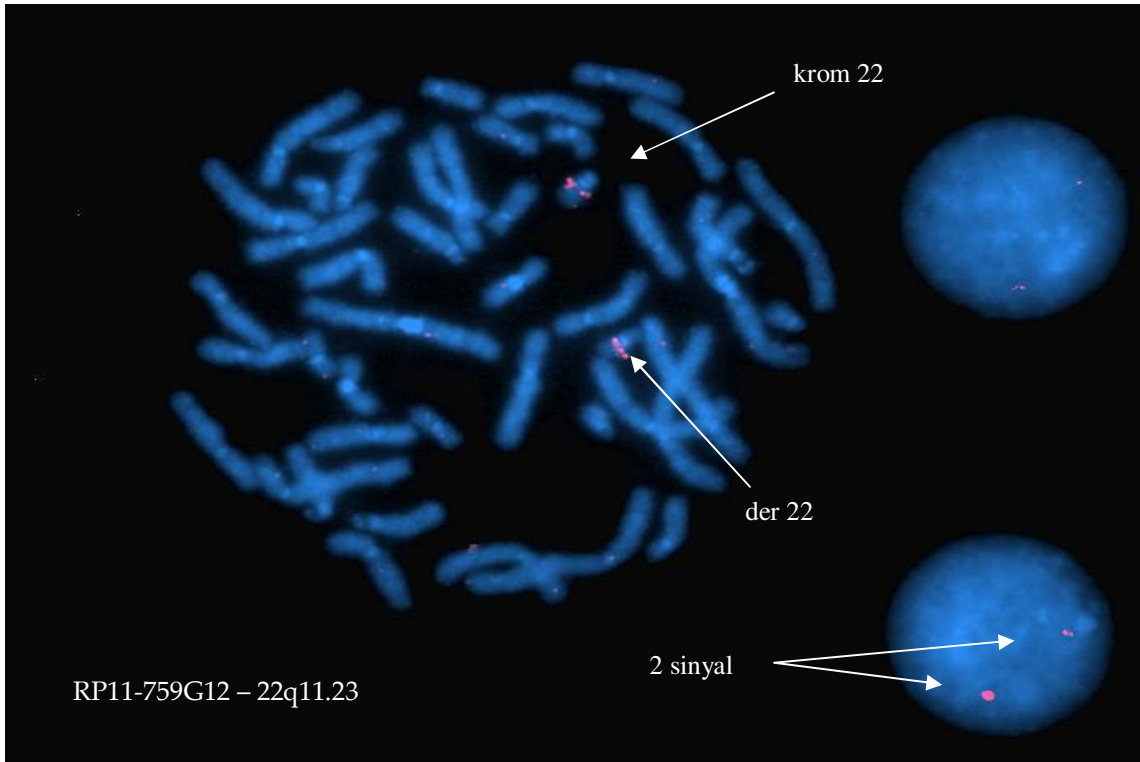
Şekil 4-30: Olgu 7'nin karyotipi



Şekil 4-31: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-1



Şekil 4-32: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-2



Şekil 4-33: Olgu 7'nin BAC-FISH resmi-3

#### 4.2.8. OLGU 8: F.S. (Prenatal olgu)

**Materyalin geliş yılı** : 2007

**Kromozom analiz endikasyonu** : İleri anne yaşı - ICSI

**GTG bant analiz sonucu** : mos47,XX,+mar/46,XX *de novo* (Şekil 4–34)

**Ticari problarla yapılan FISH sonucu** : mos47,XX,+r(9)(p12q11)/46,XX *de novo*

**Seçilen – kullanılan BAC klonları** :

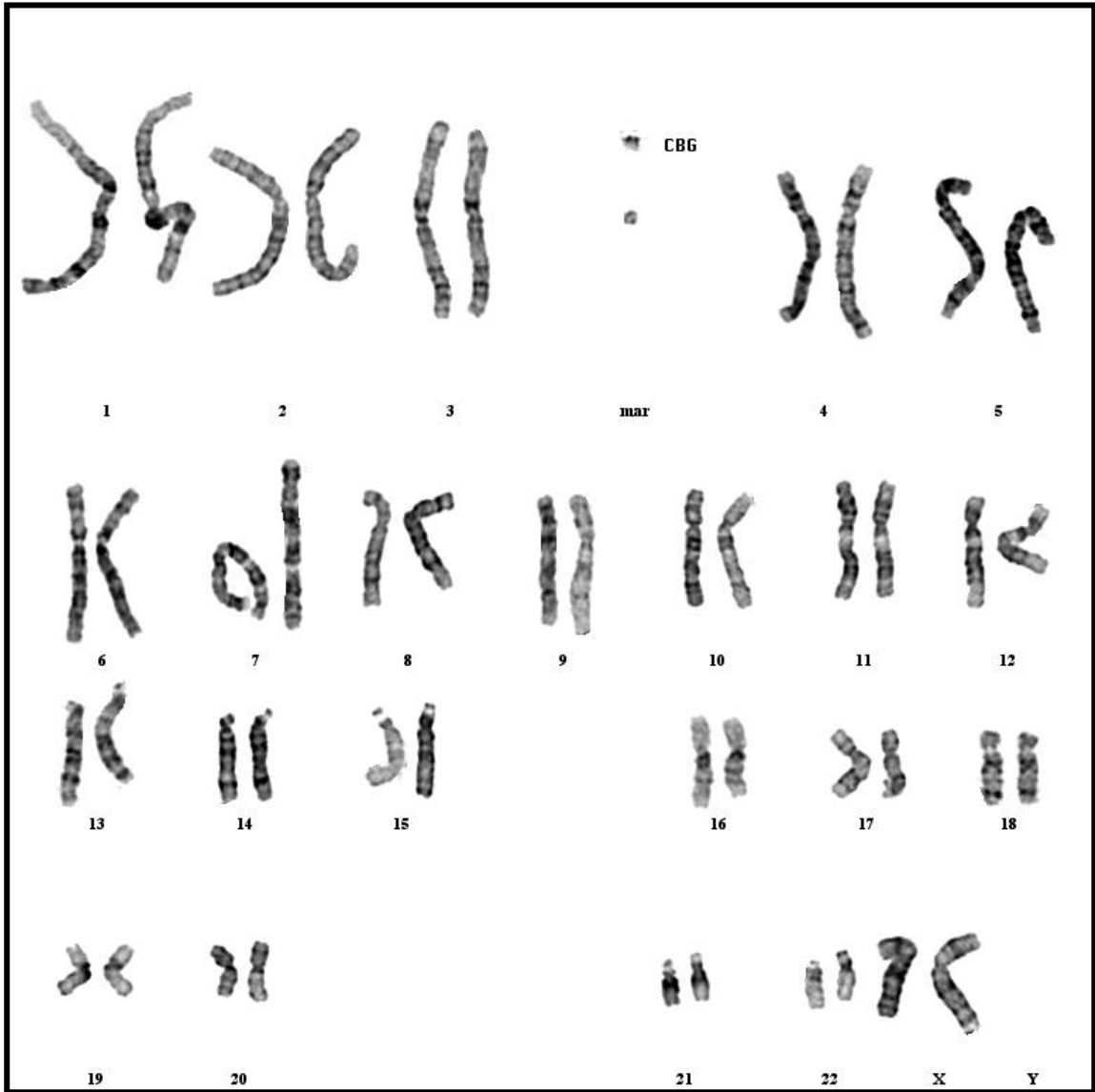
RP11-3J10 (Şekil 4–35)

**BAC - FISH uygulamasında karşılaşılan sorunlar** :

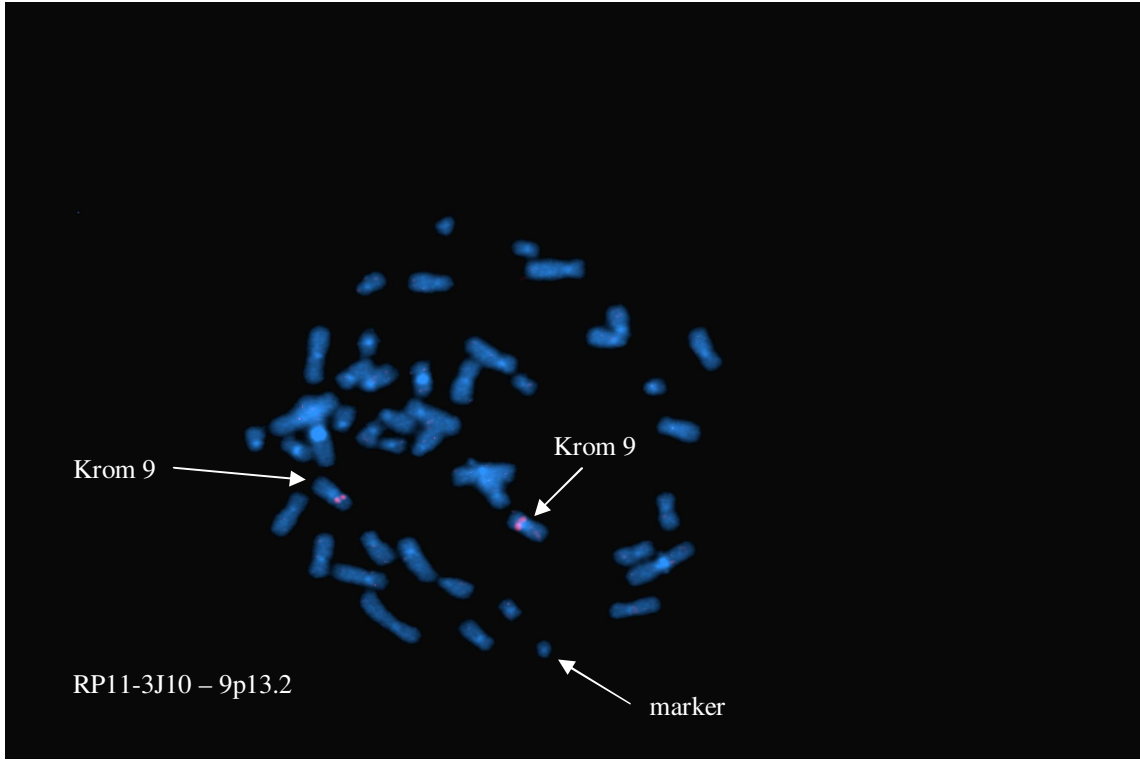
FISH çalışmalarında herhangi bir sorunla karşılaşılmadı.

**BAC - FISH uygulaması sonuçlarının sitogenetik tanıya katkısı** :

Öncelikle arm spesifik 9 probuyla yapılan FISH çalışmaları sonucunda ökromatin materyalin 9p olduğu belirlendikten sonra 9p13.2 BAC klonu ile yapılan FISH uygulaması ile marker kromozomdan ilgili bölge için sinyal alınmadı ve kırık noktasının bu bandın daha altında (9p13.1 veya 9p12?) olduğu belirlendi.



Şekil 4-34: Olgu 8'in karyotipi



**Şekil 4-35: Olgu 8'in BAC-FISH resmi**

## 5. TARTIŞMA

Son 20 yılda moleküler genetik dalındaki ilerlemeler FISH tekniğinin de gelişerek daha yaygın ve etkin kullanımına olanak sağlamıştır. Moleküler ve sitogenetik alanları arasında köprü oluşturan bu teknik, bugün klasik sitogenetik teknikler ile tanı koyulamayan kromozom anomalilerinin saptanmasından, genlerin kromozomal lokalizasyonlarına kadar pek çok alanda kullanılmaktadır.

FISH tekniğinin kullanım alanının genişlemesi ve daha yaygın kullanılması, daha sık kullanılan problemlerin ticari firmalar tarafından hazır işaretlenerek (kansere ve anöploidi tarama problemleri ile bazı lokus spesifik problemler) satışa sunulmasına yol açmıştır. Bu kolaylık FISH yönteminin daha da yaygın kullanımını sağlamıştır. Oysa, ender görülen ve kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında ve özellikle kırık noktalarının belirlenmesinde hazır problemler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Anomaliye özgün problemler uluslararası firmalara ticari olarak hazırlanabilir ancak ekonomik açıdan pahalı, teslimat süresi uzun olması ve ayrıca özel ısmarlanacak problemlerin en az 20 ölgü olma zorunluluğu gereksiz prob alımına ve ülkenin döviz kaybına yol açmaktadır. Referans laboratuvarı olması nedeniyle çok özgün ve kompleks anomalilerin çözüldüğü ve olguların bazılarının prenatal olması nedeniyle zamana karşı çalışılan laboratuvarımızda bu sorunun aşılması amacıyla kendi problemlerimizi kendimiz ve gerektiği miktar ve zamanda yapabilmeyi planladık.

Genel bilgiler kısmında da anlatıldığı gibi problemlerin hazırlanması altyapısı uygun olan laboratuvarlarda da mümkündür. Laboratuvarımızda yürütülmüş bir yüksek lisans tezi kapsamında 1999–2002 yılları arasında alternatif iki işaretleme yöntemi olan Nick transkripsiyonu ve PCR yöntemlerinin farklı DNA fragmentlerine uygulanarak prob eldesi ve uygulamada yaşanan

sorunların aşılması çalışmaları yürütülmüş ve laboratuvarımız koşullarına en uygun protokoller belirlenmişti. Geçen süre içerisinde prob eldesinde vektör olarak kullanılan BAC, PAC ve YAC klonlarını üreten ticari (BACPAC Resource Center - Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland <http://bacpac.chori.org/> , The Sanger Institute Hinxton, Cambridge UK, <http://www.sanger.ac.uk/>) birçok merkez kurulmuş ve tüm insan genomunu kapsayan kütüphaneler oluşturulmuştur. Aynı zamanda, manuel yöntemlerin yerine geliştirilen kitler (Qiagen ve Roche) plasmid izolasyonu aşamasını kolaylaştırıp izolasyonu daha rahat hale getirmiştir. Ayrıca işaretleme işlemlerini kolaylaştırmak amacıyla geliştirilen yeni kitler prob hazırlanmasında önemli katkılar sağlamıştır (Roche ve Vysis).

Bu çalışmada, özgün BAC klonlarının izolasyonu, işaretlenmesi, prob olarak hazırlanması ve GTG bantlama sonucu kompleks kromozom anomalisi saptanan ve ticari problemlerle aydınlatılamayan olgularda kullanılarak tekniğin uygulanmasında karşılaşılabilecek sorunların belirlenmesi ve bunların aşılması hedeflendi.

Proje kapsamında öncelikli olarak bu çalışmaya dahil edilebilecek anomaliler incelendiğinde en fazla yapısal anomalinin 9, 13 ve 22. kromozomlara ait olduğu belirlendiğinden bu kromozomlarla ilgili BAC klonlarının kullanılmasına karar verildi. Özellikle yakın geçmişte bu kromozomlarla ilişkili olup kromozom anomalisi kesin olarak aydınlatılamayan ve GTG bant analizine göre kırık noktaları birbirine yakın olan 15 olgu belirlendi. Olası kırık noktalarını kapsayacak şekilde 31 BAC klonunun oluşturulduğu liste hazırlandı. Bilimsel araştırmalarda kullanılmak üzere bedelsiz olarak klon gönderen İtalya, Bari Üniversitesi, Mikrobiyoloji Genetiği Departmanı'ndan istendi.

Klonlar istendikten 1 hafta sonra hazırlanıp 1 günlük gönderim süresinin ardından merkezimize ulaşılar. İstenen 31 klondan 1 klon gönderilmemişti.

Klonlar üretildiğinde 1 klonun üremediği görüldü ve bunun sebebinin klonun ulaşım sırasında zarar görmesi olabileceği düşünüldü. Geri kalan 29 klondan, izolasyon kiti 25 olguluk olduğundan, 25'i izolasyon çalışmaları için seçildi. 20 klon başarılı bir biçimde izole edildi. 5 klonda ise izolasyonun başarısız olması yetersiz üreme ile açıklandı.

Klonların izole edilmesi takiben işaretleme işlemlerine geçmeden DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Ölçümlerde 11 klonun DNA konsantrasyonları çok düşük bulundu ve bu klonlar için çöktürme işlemi uygulandı. İşlem sonrasında DNA konsantrasyonlarının arttığı ve klonların işaretlemeye uygun hale geldiği gözlemlendi. Nick translasyon işlemleri kit protokolüne uygun yürütüldü ve herhangi bir sorunla karşılaşılmadı. İşlem sonrasında her klon jelde yürütülerek işaretleme aşamasının başarısı konfirme edildi. Belirlenmiş optimum baz çifti aralığının dışında kalan klonlar için nick translasyon reaksiyonları devam ettirilerek uygun bant aralığının yakalanması sağlandı. Ancak, yine de optimum aralıkta olmayan klonlar gözlemlendiğinde reaksiyon sonlandırıldı.

FISH çalışmalarında en önemli unsur hibridize olacak preparatın çalışmaya uygun kalitede olması gerekliliğidir (66). Çalışmaya dahil edilen 15 olgunun fiksatifte saklanan hücre kültürü materyalleri ile deneme preparatları hazırlandı. Örneklerimizden 8'inde yayma işlemleri sonucu preparat kalitesinin düşük olduğu gözlemlendi. Preparat kalitesini en çok etkileyen faktörün dip materyalin saklanma süresi olduğu ve saklanma süresi arttıkça preparat kalitesinin azaldığı gözlemlendi. Bir diğer önemli faktör de primer hücre kültürünün mitotik indeks ve metafaz kalitesiydi (45).

Her anomali için özgün işaretlenmiş proplar kullanılarak 15 olguda da FISH çalışmaları yapıldığında, yayma sonrasında kalitesinin yetersiz olduğu gözlemlenmiş olan preparatlarda başarısız olduğu görüldü. Yayma sonrasında kalitesinin yeterli olabileceği düşünülen 7 olguya ait preparatlardan da iki olgu

hariç elde edilen FISH sonuçları tatmin edici değildi. Bu iki olgunun diğer olgulara göre nispeten yeni oluşu (olgu 4, 2005 ve olgu 6, 2006 yılına ait olgular) saklama süresinin uzaması ile tekniğin başarısı arasındaki ters ilişkiye bir örnek oluşturmaktadır. FISH tekniği ile başarısız olunan 13 anomali olgusundan yeni kan örneği istenmesi kararlaştırıldı ancak bunlardan 4'üne ulaşılabildi. Bu olgulardan hazırlanan yeni preparatlarla FISH çalışmaları tekrarlandı ve bu kez başarılı sonuçlar elde edilmesi saklama süresinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Tez sürecinde saptanan 2 prenatal olgu da çalışma grubuna alındı ve uygun BAC klonları ile değerlendirildi. Özellikle bu 2 olgu, böyle bir tekniğin laboratuarda uygulanabilir olmasının, prenatal tanı gibi gebeliğin akıbetini etkileyecek sitogenetik bir sonuca ve tanı için gerekli zamanın kısaltılmasına katkısına çok iyi örnek oluşturmaktadır.

Kromozom anomalileri içinde tek kırık ile oluşan terminal delesyonlar en basit anomalilerdir. 5 mb den daha büyük kayıplara yol açan delesyonlar klasik bantlama yöntemleri ile 500 bant düzeyinde analizler görülebilirler ve sitogenetik tanısı da oldukça kolaydır. Bu olgularda dikkat edilmesi gereken olay, anne ve babanın translokasyon taşıyıcısı olmadığı ve anomaliye başka kromozomun katılmadığının gösterilmesi gerektiğidir. Anomalilerin kırık noktasının daha detaylı belirlenmesi, fenotip-genotip korelasyonu açısından önemlidir. Genom çalışmalarının hızla yürütüldüğü günümüzde, hangi genlerin ve proteinlerin hangi klinik bulgulara yol açtığı araştırılmaktadır. Bu nedenle, delesyonlar sadece bir bölgedeki genlerin tek doza inmelerine (haplo yetersizlik) sebep olduklarından oldukça değerlidirler. Bugüne kadar tanımlanmış genler, kromozom lokalizasyonları, genlerin anatomileri, biliniyorsa fonksiyonları uluslar arası kullanıma açık moleküler genetik veritabanlarında (Ensemble <http://www.ensembl.org> , UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/> vb) yayınlanmaktadır. Delesyonların kırık noktalarının daha detaylı tanımlanması ile bu veritabanları kullanılarak hangi

genlerin etkilenmiş olabileceği tanısına gidilebilir ve olgunun klinik bulguları ile genlerin fonksiyonları arasında ilişki kurulabilir. Bu yolla, genleri tanımlanmamış sendromlarda saptanacak *de novo* kromozom anomalileri son derece kıymetlidir, çünkü ilgili kromozom ve gen bölgesi belirlenmiş olduğundan bu bölgedeki aday genlerin araştırılması mümkün olabilmektedir. Aynı şekilde 2 kırık ile oluşan resiprokal translokasyonlar, translokasyon segmentlerinin yeterli büyüklükte olması durumunda sitogenetik tanısı kolaydır. Sitogenetik olarak dengeli translokasyonların fenotipik olarak normal bireylerde saptanması ailevi taşıyıcılık ile açıklanır ve genetik danışma için önemlidir. Ancak fenotipik olarak etkilenmiş olgularda saptanacak *de novo* anomaliler yeni genlerin tanımlanmasında olağanüstü değerlidir ve pozisyonel klonlamanın ilk aşamasını oluşturur. Duchenne muskuler distrofi (DMD) hastalığı bu yola ilk örnektir. İlk olarak Greenstein ve ark. (31) 16 yaşındaki kız bir hastada X ve 11 arasında dengeli bir resiprokal translokasyon bildirdiler. Daha sonra Verellen ve ark. (83) ve Canki ve ark. (10) 2 yeni *de novo* X;otozom translokasyonlu olgu tanımlayarak rasgele X inaktivasyonu ile sendromun ortaya çıktığına ve DMD geninin Xp21 bölgesinde olması gerektiği gösterdiler. Daha sonra bunu kistik fibroz ve Huntington hastalığı vb izledi (73). Günümüzde ise moleküler sitogenetik teknikler gen bölgesinin daha da detaylı belirlenmesine olanak sağlayabildiğinden *de novo* her olgunun olabildiğince detaylı incelenmesi bilimsel araştırmalara katkı sağlayacaktır. Çalışmadaki olgularımızdan 2 sinin (olgu 2 ve olgu 3) ilk sitogenetik inceleme sonunda 46,13q- tanısı almasına rağmen moleküler sitogenetik incelemeler sonunda birinin terminal (olgu 2) diğerinin ise intersisyel (olgu3) bir delesyon olduğu belirlendi. Kırık noktaları birbirinden farklı olduğundan farklı bölge/genlerin etkilenmesi söz konusudur. Olguların 13q fenotip-genotip korelasyonuna katkısı olacağı kesindir.

*De novo* duplikasyonların oluşum mekanizmalarında eşit olmayan crossing over rol oynamaktadır. Duplikasyonlar genel olarak delesyonlara göre klinik açıdan daha az zarar verici kabul edilirler (24, 77). Duplikasyonlar, genomik dengesizliğe neden olsa bile asıl fenotipik etki kırık noktalarında yer alan genlerin zarar görmesidir. Bunun en önemli göstergesi aynı bölgenin delesyonu (22q11.2) olan DGS/VCFS (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome) ile pek çok olgu bildirilmiş olmasına rağmen bu bölgenin duplikasyonu ile çok az olgu tanımlanmıştır (60, 19). Oysa aynı bölgeyi içeren eşit olmayan bir crossing over sonrasında eşit oranda duplikasyon ve delesyon taşıyan gamet oluşması ve bu anomalilerin eşit oranda görülmesi gerekmektedir. Literatürde yayınlanmış olan DGS bölge duplikasyonları intersisyel tandem duplikasyonlarıdır (49). Olgu 7 bu tip duplikasyona bir örnek oluşturmaktadır. Olgunun zelliği, DGS FISH probu ile metafaz kromozomlarında çift sinyal alınırken interfaz nukleuslarında 3 sinyal alınması ile tanı konan ve BAC 22q11.22 klonu için interfaz FISH'te 3 sinyal alınması ile duplikasyon bölgesi daralan, fenotipik olarak normal babanın da aynı anomali için mozaik taşıyıcı ve kardeşin nonmozaik taşıyıcı olmasıdır. Olgu 4, hem ender görülen 22q12 duplikasyonuna bir örnek olması hem de duplikasyonun kırık noktasından birinin sentromer olması nedeniyle ender görülen disentrik, monosatellitli bir kromozom olması nedeniyle özel bir anomalidir. Olgumuz, disentrik bir anomali ürünü duplikasyon 22cen→q12 için literatürde daha önce bildirilmemiş bir örnektir (17). Bu olgunun özelliği de fenotipik olarak normal olan annesinde aynı anomaliyi taşımasıdır. Olgu 7 ve 4 sitogenetik ve moleküler sitogenetik sonuçları ile aynı gibi gözükmesine rağmen klinik bulguları farklı olması nedeniyle moleküler açıdan daha iyi incelenmesi gereken ilginç olgulardır.

22q11.2 delesyonları, fenotipik bulguları birbirinden farklı DGS, VCFS ve Sphritzen sendromu gibi bazı sendromlarda gösterildiğinden CATCH 22

(cardiac defects, abnormal facies, thymic hypoplasia, cleft palate, and hypocalcemia) akronimi altında toplanmıştır (1, 88, 67). Bu klinik bulgular saptandığında olgularda ticari olarak kullanıma sunulmuş DGS/VCFS FISH probu kullanılarak tanıya gidilebilir. Laboratuvarımızda da bu uygulama yapılmakta ve pek çok olguda intersisyel delesyonlar saptanmaktadır. DGS fenotipi gösteren olgu 6 yapılan sitogenetik incelemede 22. kromozomlardan birinin 2q telomer bölgesine transloke olduğu saptanmıştı. 2qtel probu ile yapılan incelemede delesyon olmadığı, DGS probu ile bu bölgenin delesyona uğradığı gösterilmişti. BAC-FISH incelemeleri sonunda ise 22 için kırık noktasının 22q13.1 olduğu belirlendi. 22q11.2 bandını içeren kromozom anomalileri literatürde bildirilmiştir (79). Fakat, 22q11 ve 2qter translokasyonları ender görülen anomalilerdir. Magnani ve ark. (47) ve Huber ve ark. (34) konjenital anomali ile ilişkili konstitusyonel anomali olarak daha ön literatürde 2 olgu tanımlanmışlardır. Olgumuzun literatürdeki 3. olgu olması nedeniyle moleküler düzeyde daha iyi araştırılması fenotip-genotip korelasyonuna önemli katkılar sağlayacaktır (2).

9. kromozom ile ilgili elde daha fazla BAC klonu bulunması sayesinde 2 si prenatal olmak üzere 3 kromozom anomalisi bu tez kapsamında değerlendirildi. Bunlardan ilki 9. kromozomun p kolunda ilave bir materyal saptanan bu segmentin daha sonra FISH tekniği ile 7. kromozoma ait olduğu belirlenen bir anomali idi (olgu 1). İki kırık ile büyük olasılıkla mayotik aşamada oluşmuş bu *de novo* rekombinat kromozomun klasik yöntemlerle kırık noktasının 9p24.2'den geçtiği düşünülürken, BAC-FISH çalışmaları derivatif 9. kromozomun p24.2 bandını içermediği ve kırık noktasının 9p23 ile 9p24.2 arasında olduğu gösterildi. Diğer 2 olgu (olgu 5 ve 8) ise fetal kromozom analizlerinde saptanmış ve sitogenetik tanısı zor fakat son derece önemli olgulardı.

Kompleks kromozom anomalileri, en az 2 kromozomda en az 3 kırık noktası ile oluşan ve genellikle *de novo* oluşan ve fenotipik olarak etkilenmiş bireylerde saptanan kromozom anomalileridir (22, 14, 27). Sitogenetik tanıda rutin teknikler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (16). Böyle bir anomalinin fetal kromozom analizlerinde saptanması durumu daha da zorlaştırmaktadır (4). Olgu 5 de prenatal tanıda saptanan bir kompleks kromozom anomalisi örneğidir. Bu olgudaki anomalinin, GTG bant analizleri ile 9. ve 11. kromozomları ilgilendiren bir anomali olduğu düşünülürken ticari problemlerle yapılan FISH çalışmaları anomaliye 1. kromozomun da dahil olduğunu gösterdi. BAC klon çalışmaları 9. kromozom üzerindeki birinci kırık noktasının 9p13.2'nin proksimalinde olduğu, ikinci kırık noktasının ise 9p22.2'nin distalinde olduğunu gösterdi. 9. kromozom üzerinde kırık noktalarına daha da yaklaşılmaya olanak sağlayacak BAC klonları ve anomaliye katılan diğer kromozomlar ile ilgili klonlar elde olmadığından incelemeler devam ettirilemedi.

Olgu 8 de, fetal kromozom analizlerinde küçük bir ilave mozaik ring kromozom saptanmış, kromozomun C negatif ökromatin materyal taşıdığı belirlenmiş ve FISH analizleri ile bu kromozomun kökeninin 9. kromozom olduğu saptanmıştı. 9. kromozom arm spesifik problemlerle ökromatin materyalin 9p olduğu belirlendikten sonra 9p13.2 BAC klonu ile yapılan çalışmada sinyal alınmaması kırık noktasının bu bandın daha altında (9p13.1 veya 9p12?) olduğunu gösterdi. Literatürde bu bölgenin ökromatin polimorfizmi gösterdiği ve fenotip üzerine etkisinin olmadığı bildirilmişti (72). Bu sonuçlar ışığında genetik danışma verilmiş ve aile gebeliği sürdürmüştür. Bu arada bebeğin dünyaya geldiği ve sağlıklı olduğu aile tarafından telefon ile haber verildi.

Özellikle prenatal bu iki olgunun sonuçları, laboratuarda bu tekniğin uygulanabilir olmasının avantajlarını bir kez daha vurgulamaktadır.

Özellikle referans merkezi olarak çalışan sitogenetik laboratuvarlarında daha sık görülen anomalilere yönelik ticari problemlerin kullanımının yanı sıra, daha ender görülen kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılmak üzere, gerektiği anda ve ekonomik olarak daha uygun koşullarda özgün problemlerin BAC klonlarından elde edilerek işaretlenmesi ve kullanılması çok anlamlıdır.

## KAYNAKLAR

1. Alikasıfoğlu M, Malkoç N, Ceviz N, Ozme S, Uludoğan S, Tunçbilek E. Microdeletion of 22q11 (CATCH 22) in children with conotruncal heart defect and extracardiac malformations. *Turk J Pediatr.* 2000; **42(3)**: 215–8.
2. Altunoglu U, Karaman B, Kayserili H, Yılmaz K, Basaran S. De novo monosomy of 22pter->q13 caused by an unusual unbalanced translocation. 6th European Cytogenetics Conference (6th ECC). 7–10 July, 2007. İstanbul-Turkey. Abstract book pp. 95. Poster no: 1.165-P.
3. Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, Kishi N, Wang Y, Kubota R, Kudoh J, Kawasaki K, Minoshima S, Shimizu N. Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene.* 1997; **191**: 69–79.
4. Balíček P, Jüttnerová V, Jarosová M, Fialová J, Fiedler Z, Kolmanová J. Prenatal diagnosis of de novo complex balanced rearrangements in chromosomes 3,4, and 13. *Cas Lek Cesk.* 2001; **140(4)**: 122–4.
5. Bandyopadhyay R, McQuillan C, Page SL, Choo KHA, Shaffer LG. Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrosentric chromosomes. *Chromosome Res* 2001; **9**: 223–233.
6. Bauman JGJ, Wiegant J, VanDuijn P. Cytochemical hybridization with fluorochrome-labelled RNA III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. *Histochemistry.* 1981; **73**: 181–193.
7. Boehringer-Mannheim. Nonradioactive in situ hybridization, Application manual. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1992.
8. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spallholz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward DC. Detection of viral genomes in cultured cells paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology.* 1983; **126**: 32–50.
9. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science.* 1987; **236(4803)**: 806–12.
10. Canki N, Dutrillaux B, Tivadar I. Dystrophie musculaire de Duchenne chez une petite fille porteuse d'une translocation t(X;3) (p21;q13) de novo. *Ann. Genet.* 1979; **22**: 35–39.

11. Caspersson T, Farber S, Foley GE, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968;**49**: 219–22.
12. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; **60**: 315–9.
13. Chan VTW, Herrington CCS, McGee JOD. *Basic background of molecular biology in "In Situ Hybridization"* (Polak JM, : McGee JOD., edited) Oxford: Oxford Univ. Press; 1990. pp. 1–14.
14. Coco R, Rahn M.I, Garcí'a Estanga P, Antonioli G, Solari AJ. A constitutional complex chromosome rearrangement involving meiotic arrest in an azoospermic male: Case report. *Human Reproduction* 2004; **19**: 2784–2790.
15. Collins J. and Hohn B. Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci.*1978; **75(9)**: 4242–6.
16. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007; **44(12)**: 750–62.
17. Demir Z, Karaman B, Kayserili H, Apak-Yuksel M, Basaran S. Dicentric chromosome 22 causing partial trisomy of 22q10->q13 in a child cat eye syndrome phenotype. 6th European Cytogenetics Conference (6th ECC). 7–10 July, 2007. İstanbul-Turkey. Abstract book pp.61. Poster no.: 1.90-P.
18. Dirks RW, Van Gijlswijk RPM, Vooijs MA, Smith AB, Bogerd J, Van Minnen J, Raap AK, Van der Ploeg M. 3' end fluorochromized and haptenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple simultaneous RNA detection. *Exp Cell Res.* 1991; **94**: 310–315.
19. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular

- basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet.* 1999; **7**: 1157–67.
20. Feinberg P, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction enzyme fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1984; **137**: 266–267.
  21. Fuscoe JC. Human chromosome-specific DNA libraries: use of an oligodeoxynucleotide probe to detect non-recombinants. *Gene.* 1987; **52(2–3)**: 291–6.
  22. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2004.
  23. Garg P, Burgers PMJ. How the Cell Deals with DNA Nicks. *Cell Cycle.* 2005; **2**: 221–224.
  24. Gersen SL, Keagle MB. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2005.
  25. Ghanbari Marand A. De novo yapısal kromozom anomalilerinde mikrosatellit analizleri ile parental kökenin belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. İstanbul; 2005
  26. Giraldo P, Lluís Montoliu L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Research.* 2001; **10**: 83–103.
  27. Gorski JL, Klistenmacher ML, Punnet HH, Zackai EH and Emanuel BS. Reproductive risk for carriers of complex chromosome rearrangements: analysis of 25 families. *Am J Med Genet.* 1988; **29**: 247–261.
  28. Gosden J, Hanratty D, Starling J, Fantes J, Mitchell A, Porteus D. Oligonukleotid primed in situ DNA synthesis ( PRINS ): A method for chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. *Cyogenet Celle Genet.* 1991; **57**: 100–104.
  29. Gosden J, Hanratty D. PCR in situ: A rapid alternative to in situ hybridization for mapping short, low-copy number sequences without isotopes. *Bio Techniques.* 1993; **15**: 78–80.
  30. Gottfredson LS., The general intelligence factor. In: *The Brain. The Scientific American Book*, 1999; The Lyons Press, New York.

31. Greenstein, RM, Reardon, MP, Chan, TS. An X-autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence for DMD gene localization. (Abstract) *Pediat. Res.* 1977; **11**: 457.
32. Hook EB, Porter IH. (eds) *Population Cytogenetics Studies in Human*. London, Academic Press; 1977.
33. Hook EB. Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality. *Cytogenet Cell Genet.* 1982; **33**(1-2): 101-6.
34. Huber J, Rainho CA, Gomes MV, Santos SA, Ramos ES. Velocardiofacial syndrome with a rare t(2;22). *Clyn Dysmorphol.* 2007; **16**: 181-3.
35. Karaman B. DNA spesifik problemlerin kullanımı ile yapısal seks kromozom anomalilerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. İstanbul; 1998.
36. Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H (1982): Complex chromosomal rearrangements (CCR) and their genetic consequences. *J Génét Hum* 30(3):199-214.
37. Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet.* 1997; **5**(1): 1-8.
38. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999; **354**(9191): 1676-81.
39. Koch JE, KFlvraa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund N: Oligonucleotide priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma (Berl.)*. 1989; **98**: 259-265.
40. Kousseff BG, Papenhausen P, Essig Y-P, Torres MP. Complex chromosome rearrangement with ankyloblepharon filiforme adnatum. *J Med Genet.* 1993; **30**: 167-170.
41. Langer Pr, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel Nucleic Acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; **11**: 6633-6637.

42. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC: Immunological method for mapping genes on drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 1982; **79**: 4381–4385.
43. Leana-Cox J, Jenkins L, Palmer CG, Plattner R, Sheppard L, Flejter WL, et al. Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probs specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 748–56
44. Licher P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 1998; **80**: 224–234.
45. Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC. High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science.* 1990; **247(4938)**: 64–9.
46. Lichter P., Cremer T.: Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization in Human Cytogenetics “A Practical Approach” Vol 1 (Rooney DE., Chepulkowski, BH.: edited) Oxford Univ. Press, pp:157–192–1992.
47. Magnani I, Larizza L, Doneda L, Weitnauer L, Rizzi R, Di Lernia R. Malformation syndrome with t(2;22) in a cancer family with chromosome instability. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; **38(2)**: 223–7.
48. Manuelidis L. Chromosomal localization of single copy gene by in situ hybridization human beta-globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet.* 1981; **45**: 135–141.
49. Meins M, Burfeind P, Motsch S, Trappe R, Bartmus D, Langer S, Speicher MR, Mühlendyck H, Bartels I, Zoll B. Partial trisomy of chromosome 22 resulting from an interstitial duplication of 22q11.2 in a child with typical cat eye syndrome. *J Med Genet.* 2003; **40(5)**: e62
50. Miller OJ, Therman E. *Human chromosomes.* 4th ed. New York: Springer-Verlag; 2001.
51. Miller Orlando J, Therman E. *Human chromosomes.* 4th ed. New York: Springer-Verlag; 2001.
52. Mueller RF, Young ID. *Emery’s Elements of Medical Genetics.* 9th ed. London: Churchill Livingstone; 1995

53. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991; **87(1)**: 81–3.
54. Page SL, Shin J-C, Han J-Y, Choo KHA, Shaffer LG. Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1279–1288.
55. Pagon RA, Hall JG, Davenport SLH, Aase J, Norwood TH, Hoehn HW. Abnormal skin fibroblast cytogenetics in four dysmorphic patients with normal lymphocyte chromosomes. *Am. J. Med Genet* 1979; **31**: 54–61.
56. Peltomäki P, Knuutila S, Ritvanen A, Kaitila I, De La Chapelle A. Pallister-Killian syndrome: cytogenetic and molecular studies. *Clin Genet* 1987; **31**: 399–405.
57. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; **83**: 2934–2938.
58. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; **19(1)**:10–26.
59. Polak J. M., O'Donnell McGee J. *In Situ Hybridization: Principles and Practice.* 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
60. Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F, Taillemite JL, Marlin S. 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A.* 2005; **137(1)**: 47–51.
61. Raap AK, Vande Rijke EM, Dirks RW, Sol CJ, Boom R, Vander Ploeg M. Bicolor fluorescence in situ hybridization to intron and exon mRNA sequences. *Exp Cell Research.* 1991; **197**: 319–322.
62. Rigby PWJ, Diechmann M, Rhodes C, Berg P: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.*1977; **113**: 237–251.
63. Ruiters EM, Koolen DA, Kleefstra T, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BC, Brunner HG, Sistermans EA, de Vries BB. Pure subtelomeric

- microduplications as a cause of mental retardation. *Clin Genet.* 2007; **72(4)**: 362–8.
64. Sambrook J, Russell WD. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001
65. Sambrook J, Russell WD. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001
66. Schwarzbacher T, Heslop-Harrison P. *Practical in situ Hybridization*. Norwick, UK: BIOS Scientific Publishers Limited; 2000
67. Sergi C, Serpi M, Müller-Navia J, Schnabel PA, Hagl S, Otto HF, Ulmer HE. CATCH 22 syndrome: report of 7 infants with follow-up data and review of the recent advancements in the genetic knowledge of the locus 22q11. *Pathologica.* 1999; **91(3)**:166–72.
68. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000; **34**: 297–329
69. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; **89(18)**: 8794–7.
70. Speicher MR., Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet.* 2005; **6(10)**: 782–92.
71. Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype phenotype correlation and classification. *Hum Genet.* 2003; **114(1)**: 51–67.
72. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2002; **10(12)**: 790–800.
73. Strachan T, Andrew PR. *Human molecular Genetics 3*, 3rd ed. New York: Garland Publishing; 2004.

74. Tao Q, Zhang HB. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. *Nucleic Acids Res.* 1998; **26(21)**: 4901–9.
75. Terzi A. Multipl konjenital anomalili / mental retarde olgularda mikrodelesyon ve duplikasyonların komperatif genomik hibridizasyon (KGH) yöntemi ile araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi. İstanbul; 2005.
76. Tharapel SA, Wilroy RS, Keath AM, Rivas ML, Tharapel AT. Identification of the origin of ring/marker chromosomes in patients with Ullrich-Turner syndrome using X and Y specific alpha satellite DNA probes. *Am J Med Genet.* 1992; **42(5)**: 720–3.
77. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 2001.
78. Turleau C, Taillard F, Doussau de Bazignan M, Delepine N, Desbois JC, de Grouchy J. Hypomelanosis of Ito (incontinentia pigmenti achromians) and mosaicism for a microdeletion of 15q. *Hum Genet* 1986; **74**: 185–87.
79. Tyshchenko NA, Riegel M, Evseenkova EG, Zerova TE, Gorovenko NG, Schinzel A. Duplication of (12)(pter-q13.3) combined with deletion of (22)(pter-q11.2) in a patient with features of both chromosome aberrations. *Eur J Med Genet.* 2007; **50**: 128–32
80. Van Zelderen-Bhola SL, Breslau-Siderius EJ, Beverstock GC, Stolte-Dijkstra I, de Vries LS, Stoutenbeek P, de Pater JM. Prenatal and postnatal investigation of a case with Miller-Dieker syndrome due to a familial cryptic translocation t(17;20) (p13.3;q13.3) detected by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn.* 1997; **17(2)**: 173–9.
81. Vaz N. and Shyama SK. Numerical Chromosomal Abnormalities in the Malformed Newborns of Goa. *Int J Hum Genet.* 2005; **5(4)**: 237–240.
82. Verdier R, Pichon I, Bellec V, Menezo Y, Quimsiyeh M, Benkhalifa M. Non disjunction assessment in human capacitated sperm: data using multicolor FISH for 16 chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 77–85.
83. Verellen C, Markovic V, DeMeyer R, Freund M, Laterre C, Worton R. Expression of an X-linked recessive disease in a female due to non-random activation of the X chromosome. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 1978; **30**: 97A.

84. Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, Vander Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucl Acids Res.*1991; **19(12)**: 3237-3241.
85. Wilkonson DG. *In situ Hybridization, A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1992.
86. Willard HF. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet.* 1990; **6(12)**: 410–6.
87. Yılmaz K. Özgün DNA dizilerinin floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği için işaretlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi. İstanbul; 2002.
88. Yonehara Y, Nakatsuka T, Ichioka S, Sasaki N, Kobayashi T. CATCH 22 Syndrome. *J Craniofac Surg.* 2002;**13(5)**: 623–6.
89. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science.* 1976; **191**: 1268–1270.

## FORMLAR

**T.C**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MOLEKÜLER SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN**  
**BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU \***

**Proje Adı: “Nick Translasyon yöntemiyle işaretlenmiş özgün DNA dizilerinin kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılması”**

**Hasta Adı:**

**Tarih:**

Bu inceleme, farklı endikasyonlarla (multiple konjenital anomali, zeka geriliği, infertilite, kötü obstetrik öykü, nöromotor gelişme geriliği v.b ) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen ve tanı amaçlı yapılan kromozom analizlerinde kompleks kromozom anomalisi saptanan bireylerle bunların ailelerinde saptanan ve klasik yöntemlerle sitogenetik tanısı kesinleşemeyen kromozom anomalilerinin daha detaylı aydınlatılması amacı ile yapılan ek incelemelerden oluşmaktadır. Bu ek incelemelerin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Aşağıdaki **Moleküler Sitogenetik ve Moleküler İncelemeler için Bilgilendirilmiş Onay Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

**1.Yapılacak işlemin tanımı :** İnceleme, sizde/ aile bireylerinizde saptanan kromozom anomalilerinin ileri düzeyde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

İleri moleküler sitogenetik ve moleküler analizlerin yapılması için hastaların tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri kullanılacaktır. Örnekler üzerinde FISH (Floresan in situ hibridizasyon) yöntemi ile çalışılacaktır. Bu yöntemin esası DNA'nın komplementerini oluşturabilme özelliğine dayanmaktadır. İşlemden önce örnekler mikroskop lamaları üzerine yayılarak preparat hazırlanacaktır. Anomaliye özgün laboratuvarımızda hazırlanmış ve işaretlenmiş problemlerle bu preparatlar hibridizasyona sokulacaktır. Ertesi gün hibrit sinyaller floresan mikroskoplarda uygun filtreler yardımı ile görüntülenecek ve bu sinyallerin yardımı ile daha önce ailenizde saptanmış olan kompleks kromozom anomalisinin kırık noktaları aydınlatılacaktır.

Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku (kan, vb) örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kanlardan ve/veya deri biyopsisinden elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:

a.Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum .....

b.Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum .....  
Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde başka bir çalışma için kullanılmayacaktır

## **2. Olası riskler ve faydalar :**

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Deri Biyopsisi alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) Biyopsi alınan bölgede çok hafif bir acı hissi duyulabilir (2) biyopsi bölgesinde çok nadiren enfeksiyon gelişebilir

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Olası yararlar :Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan kromozom anomalisini daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

-----  
(Doktor Adı)

hastaya,

-----  
(Aile Adı)

-----  
(Tanık Kişi)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :

Doktorun imzası:

Kontakt kurulabilecek kişiler: Prof. Dr. Seher BAŞARAN  
Bio. Zeynel DEMİR

Ulaşılabilir Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 631 13 63  
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 - 32327

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı

Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: .....

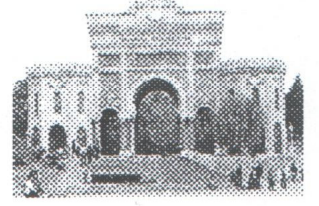
**İzin :** Yukarıda tanımlanan ileri düzey incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun ) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

**Hasta Adı:**

	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Doğum tarih</u>	<u>İmza</u>
(Ebeveyn)			
Aile üyesi	-----		
-----			
Aile üyesi	-----		
-----			
Aile üyesi	-----		
-----			
Aile üyesi	-----		
-----			



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI  
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2158

Tarih : 13/11/2006

Konu : Prof.Dr.Seher BAŞARAN hk,

Sayın, Prof.Dr.Seher BAŞARAN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

İlgi : 12.09.2006 tarihli, 111 sayılı yazınız,

Sorumlu Araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Zeynel DEMİR'in yürüteceği 2006/1733 dosya no'lu "Nick translayon yöntemiyle işaretlenmiş özgün DNA dizilerinin kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi kurulumuzun 11.10.2006 tarihli, 10 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

**Toplantı Tarihi :** 11/10/2006

**Toplantı Yeri :** Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

**Toplantı Sayısı :** 10

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Seher BAŞARAN'ın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Zeynel DEMİR'in yürüteceği 2006/1733 protokol numaralı "Nick translasyon yöntemiyle işaretlenmiş özgün DNA dizilerinin kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

**Prof.Dr. Zafer ARI**

Etik Kurul Başkanı ( Dekan Yardımcısı)

**Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN**

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

**Prof.Dr. Ahmet GÜL**

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

**Prof.Dr. Berrin UMMAN**

Kardiyoloji A.D.

**Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU**

Biokimya A.D

**Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ**

Anesteziyoloji A.D.

**Prof.Dr. Nuran YILDIRIM**

Tıp tarihi ve Deontoloji A.D.

**Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN**

Nöroloji A.D.

**Prof.Dr. Pınar SAİP**

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

**Prof.Dr. Sevinç EMRE**

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

**Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU**

Biokimya A.D

**Prof.Dr. Veli UYSAL**

Patoloji A.D.

**Prof.Dr. Yeşim ERBİL**

Genel Cerrahi A.D.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Zeynel	<b>Soyadı</b>	DEMİR
<b>Doğ. Yeri</b>	Siirt	<b>Doğ. Tar.</b>	26.12.1981
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	52402043864
<b>Email</b>	zeyneldemir@hotmail.com	<b>Tel</b>	532 322 53 47

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üni. Sağlık Bilimleri Ens. Genetik Programı	2008
<b>Lisans</b>	İstanbul Üni. Fen Fak. Biyoloji bölümü	2005
<b>Lise</b>	Kuleli Askeri Lisesi	1999

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi	67	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>ALES Puanı</b>	73.281	76.201	78.828

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
----------------	--------------------------

Microsoft Office	Çok iyi

### Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

#### Ulusal Kongre Özetleri

1. **Demir Z**, Kırmızı N, Öztürk H, Önal EP, Karaman B, Başaran S, Kayserili H, Yüksel-Apak M. Trizomi 21'li 1368 postnatal olgunun kromozom analiz sonuçları VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 17-20 Mayıs 2006 Kayseri. Kongre kitapçığı sf. 103 (poster)
2. Yılmaz K, Karaman B, Üzümcü A, Koçbaş A, **Demir Z**, Kayserili H, Başaran S. *De novo* nonmozaik, paternal kökenli Xp monozomi ve Xq21.2→Xqter trizomili bir olgu sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 17-20 Mayıs 2006 Kayseri. Kongre kitapçığı sf. 101 (poster)
3. **Demir Z**, Karaman B, Yılmaz K, Öztürk H, Kırmızı N, Kayserili H, Başaran S. 1, 9 ve 11. kromozomlar arasında 4 kırık noktası ile oluşan kompleks kromozom anomalisinin prenatal tanısı. VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008; Çanakkale. Kongre kitapçığı sf. 141 (sözlü sunum)

#### Uluslar Arası Kongre Özetleri

1. **Demir Z**, Karaman B, Kayserili H, Apak-Yüksel M, Basaran S. Dicentric Chromosome 22 Causing Partial Trisomy of 22q10→q13 in a Child Cat Eye Syndrome Phenotype. 6<sup>th</sup> European Cytogenetic Conference, 7-10 Temmuz 2007; İstanbul (poster)
2. Yılmaz K, Karaman B, Uzumcu A, Kocbas A, Kırmızı N, **Demir Z**, Uyguner O, Kayserili H, Basaran S. A Case with Non-Mosaic *de novo* Monosomy Xp and Trisomy Xq21.2-→Xqter: Paternal in Origin. 6<sup>th</sup> European Cytogenetic Conference, 7-10 Temmuz 2007; İstanbul (poster)
3. Karaman B, Yılmaz K, Kırmızı N, Öztürk H, **Demir Z**, Kayserili H, Apak-Yüksel M, Başaran S. Subtelomeric Rearrangements In Children With Multiple Congenital Anomalies And Mental Retardation. 6<sup>th</sup> European Cytogenetic Conference, 7-10 Temmuz 2007; İstanbul (poster)

