

**T.C.**  
**İstanbul Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Tıbbi Genetik Bilim Dalı**  
**Danışman: Prof. Dr. Seher Başaran**

**MULTİPL KONJENİTAL ANOMALİLİ/MENTAL RETARDE  
OLGULARDA MİKRODELESYON VE DUPLİKASYONLARIN  
KOMPERATİF GENOMİK HİBRİDİZASYON (KGH) YÖNTEMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ GENETİK YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tıbbi Biyolog Ayça TERZİ**

**İstanbul, 2005**


**T.C.**  
**İstanbul Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Tıbbi Genetik Bilim Dalı**  
**Danışman: Prof. Dr. Seher Başaran**

**MULTİPL KONJENİTAL ANOMALİLİ/MENTAL RETARDE  
OLGULARDA MİKRODELESYON VE DUPLİKASYONLARIN  
KOMPERATİF GENOMİK HİBRİDİZASYON (KGH) YÖNTEMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ GENETİK YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tıbbi Biyolog Ayça TERZİ**

**İstanbul, 2005**



**Bu çalışma  
İstanbul Üniversitesi  
Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: T-356/03112003**

III.2.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültür Medyumları	30
III.2.2.2. Kromozom Eldesinde Kullanılan Solüsyonlar	30
III.2.2.3. GTG Bantlama Solüsyonları	30
III.2.2.4. FISH Solüsyonları	31
III.2.2.5. KGH Solüsyonları	31
III.2.3. Periferik Kan Lenfosit Kültürü	32
III.2.4. Kromozom Eldesi	33
III.2.5. GTG Bantlama	33
III.2.5.1. GTG Bant Analizleri	34
III.2.6. Subtelomerik Problemlerin Kullanımı	34
III.2.6.1. Ön İşlem	34
III.2.6.2. Denatürasyon	35
III.2.6.3. Hibridizasyon	35
III.2.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	35
III.2.6.5. Hibrid Sinyallerinin Görüntülenmesi	35
III.2.7. KGH İşlemleri	36
III.2.7.1. Kandan DNA eldesi	36
III.2.7.2. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini	37
III.2.7.3. Nick Translasyon ile Direkt İşaretleme	37
III.2.7.3.1. Kullanılan Yöntem	37
III.2.7.3.2. Prob Büyüklüğünün Belirlenmesi	38
III.2.7.4. Prob Karışımının Hazırlanması	39
III.2.7.5. Preparatların Hibridizasyona Hazırlanması	39
III.2.7.6. Prob Denatürasyonu	39
III.2.7.7. Preparat Denatürasyonu ve Hibridizasyon	39
III.2.7.8. Yıkamalar	39
III.2.7.9. Hibrid Sinyallerinin Görüntülenmesi	39

<b>IV. BULGULAR</b>	<b>41</b>
IV.1. KGH Uygulamaları	41
IV.1.1. Periferik kandan DNA izolasyonu	41
IV.1.2. Nick translasyon	41
IV.1.3. Prob karışımının hazırlanması	43
IV.1.3.1. Spesifik olmayan sinyallerin engellenmesi	44
IV.1.4. Hedef metafaz preparatlarının hazırlanması	44
IV.1.5. Denatürasyon	45
IV.1.5.1. Preparatların denatürasyonu	45
IV.1.5.1. Prob denatürasyonu	46
IV.1.6. Hibridizasyon süresi	46
IV.1.8. Dijital görüntüleme sistemi	46
IV.1.7. Hibridizasyon sonrası yıkamalar	46
<b>IV. TARTIŞMA</b>	<b>47</b>
<b>VI. ÖZET</b>	<b>56</b>
<b>VII. SUMMARY</b>	<b>57</b>
<b>VIII. KAYNAKLAR</b>	<b>58</b>
<b>IX. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>72</b>

## ŞEKİL DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Telomerlerin ve subtelomerik bölgelerin dizi organizasyonu	<b>10</b>
<b>Şekil 2.</b> KGH tekniğindeki bazı basamakların şematik gösterimi	<b>16</b>
<b>Şekil 3.</b> MLPA tekniğinin şematik gösterimi	<b>26</b>
<b>Şekil 4.</b> MAPH tekniğinin şematik gösterimi	<b>27</b>



## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> FISH tekniğinin kullanım alanları	<b>6</b>
<b>Tablo 2.</b> Nick translasyon işleminde, enzim miktarı ve inkübasyon süresinde yapılan değişiklikler ve sonuçları	<b>42</b>



## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Mental retardasyon, toplumun %2-3'ünde görülen bir bozukluktur ve olguların %12'sinde etken kromozom anomalileridir. Multipl konjenital anomalilerin etiolojisinde ise kromozom anomalilerine %6 sıklıkla rastlanmaktadır. Sayısal kromozom anomalileri, çoğu zaman fenotipin yönlendirmesi sonucu ve rutin sitogenetik yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Etiyolojide önemli bir kısmı oluşturan yapısal kromozom anomalilerinin tanısında, çoğu zaman klasik bantlama teknikleri yetersiz kalmakta ve High Resolution Bantlama Tekniği (HRBT) ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) gibi tekniklerin uygulanması gerekmektedir. Rutin bantlama teknikleri ile 10 mb'a kadar genomik değişimler saptanabilirken, HRB tekniği ile 5 mb büyüklüğündeki değişimlerin saptanması mümkündür. MKA/MR olgularının etiolojisinin belirlenmesinde FISH tekniği ise, ancak klinik bulgular belli bir sendromu düşündürdüğü zaman sonuca ulaştırabilmektedir.

Komperatif Genomik Hibridizasyon (KGH) tekniği, tüm genomu aynı anda delesyon ve duplikasyonlar açısından tarayan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. KGH ile 3 mb büyüklüğündeki genomik değişimlerin saptanması mümkündür. Teknik, hücrelerin kültüre edilmesine gerek kalmaksızın, DNA elde edilebilen her türlü doku örneğinde uygulanabilmektedir. Sayısal anomaliler ve dengesiz yapısal yeniden düzenlemeleri saptayabilen teknik, marker kromozomların kökenin aydınlatılması ve

Teknik, test DNA'nın ve normal DNA'nın farklı renklerdeki dUTP'ler ile (sırasıyla yeşil ve kırmızı) işaretlenerek, normal metafaz kromozomlarına hibridize edilmesi esasına dayanır. Hibridizasyon sonrasında uygun metafazlar mikroskopta seçilir. Görüntülemenin ardından kırmızı ve yeşil sinyaller, bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilir.

Bu çalışmanın amacı, KGH tekniğinin laboratuvarımızda rutin uygulanmasının sağlanması ve bu teknikle HRBT ve telomerik FISH uygulaması ile normal karyotip saptanmış MKA/MR'lu olguların ile incelenmesi idi.

## II.GENEL BİLGİLER

### II.1. Kromozom Anomalilerinin Tanısında Kullanılan Yöntemler

İnsan kromozomları hakkındaki ilk bilgiler, 1882 yılında Flemming'in çizimlerine kadar geriye gitmekle birlikte insan kromozom sayısı ilk olarak, 1956'da Hsu'nun hücreleri yıkamak amacıyla yanlışlıkla izotonik solüsyon yerine hipotonik solüsyon kullanması ile 46 olarak belirlenmiştir. Ford ile Hamerton'un hücreleri metafaz aşamasında durdurmak için kolşisin kullanması, daha başarılı kromozom eldesine olanak sağlamıştır (57). Aynı yıllarda, bu bilgileri birleştiren Tijo ve Levan'ın kültüre edilmiş embriyonik insan akciğer hücrelerinde 46 kromozom bulunduğunu belirlemesi, klinik sitogenetiğin başlangıcı olmuştur (146). O yıllarda, kromozomlarda çok az detay görülebilmemesine karşın, boylarına ve sentromer yerleşimlerine göre kromozomlar yedi grupta (A-G) toplanmıştır. 1959'da Lejeune ve ark., Down sendromunda trizomi 21, Ford ve ark., Turner sendromunda 45,X, Jacobs ve ark., Klinefelter sendromunda 47,XXY, 1960'da Patau ve ark., trizomi 13, Edwards ve ark., trizomi 18 kromozom yapılarını göstermişlerdir (89,44,58,109,33). Her bir kromozomun bantlarıyla tanınması ve homolog kromozom çiftlerinin karşılaştırılması ise ancak 1970 yılında Caspersson ve ark.nın bir floresan boya maddesi olan quinakrin ile bantları görünür hale getirmesinin ardından bantların floresan mikroskopuyla incelenmesiyle gerçekleştirilebilmiştir (20,21). Floresan yoğunluğunun çabuk azalması, bu tekniğin rutin uygulamada kullanılmasını zorlaştırmıştır. Bunun yanında C, NOR (Nucleolar Organizer Region) bantlama gibi farklı özellikteki tekniklerle, kromozomlardaki yapısal değişiklikler belirlenmiştir (119). Aynı yıl, Seabright ve ark., kromozomları tripsin uygulamasından sonra Giemsa ile boyayarak, günümüzde rutin klinik sitogenetikte kullanılan bantlama yöntemini (Giemsa-Tripsin-Giemsa/GTG) geliştirmişlerdir (128). Yunis tarafından 1976'da geliştirilen HRBT (High Resolution Banding Technique) ile daha uzun kromozomların analiz edilmesi sağlanmıştır. Bu teknikle,

5 milyon baz çiftini kapsayan mikro değişikliklerin (mikrodelesyon, duplikasyon) tanınması mümkün olmuştur (72/26).

1980'li yılların sonlarında, moleküler genetikteki ilerlemelerin sonucunda geliştirilen ve spesifik DNA parçaları ile kromozomların hibridizasyonu esasına dayanan FISH yöntemi, rutin uygulamalarla tanınamayan kromozom anomalilerinin tanınmasını sağlamıştır (46,107).

Bugün rutin uygulamalarda kullanılan klasik bantlama teknikleri G, Q, C, R bantlama, NOR boyama ve HRBT olarak sıralanmaktadır.

FISH yöntemi kromozom anomalilerinin tanısında büyük faydalar sağlasa da, her bir çalışmada ancak bazı belli hedef dizilerin saptanabiliyor olması, genom boyu inceleme yapılamaması, araştırmacıları yeni arayışlara yönlendirmiştir.

1992 yılında Kallioniemi ve ark. tarafından geliştirilen Komperatif Genomik Hibridizasyon (KGH) tekniğinde tek bir çalışma ile genom boyu delesyon ve duplikasyonların açısından taranması yapılabilmektedir (64).

Bu yöntemler ve özellikleri açıklanmaktadır.

### **II.1.1. Klasik Bantlama Yöntemleri**

#### **II.1.1.1. G Bantlama**

Rutin kromozomlar 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 olan ökromatin bölgeler ise açık boyanır. GTG bantlama ile haploid genomda yaklaşık 400-500 bant görülebilmekte ve bu da yaklaşık 5-10 Mb'lık (bant başına yaklaşık 50 gen) kromozomal değişimlerin tanınabilmesini sağlamaktadır (128).

### **II.1.1.2. Q Bantlama**

Floresanlı teknikler arasında en yaygın olarak quinakrin dihidroklorid (atebrin) ve quinakrin mustard (quinakrin) boya ları kullanılır. Quinakrin ile boyanan kromozomlar, floresan mikroskopunda incelendiklerinde G bantlara benzer bant kalıpları gösterir. Ancak floresanın hızlı solması ve görüntü alınmasının zorluğu nedeniyle rutin kullanımda tercih edilmemektedir. Teknik, ağırlıklı olarak 1, 9, 16. kromozomların sentromerik bölgeleri, akrosentrik kromozomların sentromer ve satelit bölgeleri ile Yqh gibi polimorfik heterokromatin bölgelerin parlak boyanma özellikleri nedeniyle heteromorfizmlerin tanımlanmasında kullanılır (20,21).

### **II.1.1.3. C Bantlama**

Sentromerler ve Yqh bölgesini oluşturan, hiç gen içermeyen ve transkribe olmayan konstitutif heterokromatini pozitif boyayan bu teknik ile sentromere yakın kromozom yeniden düzenlemeleri, sentromer varlığı, Yqh ve polimorfik özelliklerin saptanmasında kullanılır.

### **II.1.1.4. R Bantlama**

Bu bantlamada kromozomların G bantlama ile koyu boyanan kısımları R açık, açık boyanan kısımları ise koyu boyanır. Yöntem, floresanlı bir boya olan akridin turuncusu veya Giemsa kullanılarak uygulanır. DNA'nın Guanin ve Sitozin bazlarından zengin ökmatin bölgelerinin koyu boyandığı teknik, özellikle G bantlama ile boya almadığı için saptanması zor olan kromozomların terminal bölgelerindeki değişimleri belirlemek için kullanılır.

### **II.1.1.5. NOR Boyama**

Nukleolus organizasyonundan sorumlu akrosentrik kromozomların satelit bölgeleri (Nucleolar Organizer Region), 18S ve 28S rRNA kodlayan genler için çok sayıda kopya içerir. Bu bölgeler gümüş nitrat ile koyu boyanır. Kişiyeye göre farklı boyanma özellikleri gösterebilen bu bölgeler, polimorfizmlerin ve marker

kromozomların satellit içerip içermediğinin anlaşılmasında kullanılan bir boyama tekniğidir.

### **II.1.2. HRBT (High Resolution Bantlama Tekniği)**

Bu teknik, >550 bant içeren prometafaz hatta profaz kromozomlarının incelenmesine olanak sağlar. Tekniğin esası, hücre kültürünün metatroksat ilavesi ile senkronize edilmesi ve hücre bölünmesinin prometafaz evresinde durdurulmasıdır. HRB tekniği, küçük kromozomal değişimlerle tanımlanmış ve günümüzde mikrolezyon-mikroduplikasyon sendromlarının (Prader Willi / Angelman Sendromu, Miller Dieker Sendromu, DiGeorge Sendromu gibi) tanısına olanak sağlamıştır. Ayrıca 850-1250 bant seviyesindeki profaz kromozomlarında istenen bölgenin mikrodiseksiyonuna olanak sağladığından, bu kromozomlar kullanılarak *in situ* hibridizasyonla gen haritalanması da gerçekleştirilebilmektedir.

### **II.1.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)**

Özgün tek iplikli DNA veya RNA fragmentlerinin radyoaktif, floresanlı veya antijenik maddelerle işaretlenerek, fikse edilmiş sitolojik preparatlarda çift sarmal hedef DNA ile hibrid oluşturması ve mikroskopta görüntülenmesi tekniği *in situ* hibridizasyon olarak adlandırılır (107).

1969 yılında birbirlerinden bağımsız çalışan Gall (46), Pardue (107), John ve ark. (54), radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş DNA veya RNA probunu, denature edilmiş sitolojik preparatlarda hedef hücre DNA'sı ile hibridize etmiş ve otoradyografiyi takiben hibridizasyon bölgelerinin gümüş partiküllerle işaretlendiğini göstermişlerdir. Başlangıçta, DNA problemlerini işaretlemede <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S gibi radyoizotoplar kullanılmaktaydı, ancak radyoaktif maddelerin biyolojik olarak zararlı olmaları, raf ömürlerinin kısa olması ve otoradyografinin zaman alması nedeniyle nükleik asitlerin işaretlenmesinde floresan ve enzimatik özellikli moleküller kullanılmaya başlandı. Ayrıca, yine o yıllarda moleküler klonlama bilinmediğinden, *in situ* hibridizasyonun kullanım alanı, konvensiyonel biyokimyasal yöntemlerle

saflaştırılan ve izole edilen sıçan satelit DNA'sı, viral DNA, ribozomal RNA'lara ait dizilerle sınırlıydı.

1977 yılında Rigby ve ark., klonlama teknikleriyle elde edilen problemlerin radyoaktif ve non-radyoaktif moleküllerle işaretlenmesini sağlayan nick translasyon yöntemini geliştirmişlerdir (116). 1981'de ise Langer, nick translasyon yöntemi ile biotin kullanarak gerçek anlamda ilk radyoaktif olmayan işaretlemeyi gerçekleştirmiştir (82, 83). Daha sonraları biotinin yanısıra digoksinin, sulfonat ve floresin gibi işaretleme molekülleri de kullanılmaya başlanmıştır. In situ hibridizasyon tekniği, 1991 yılında floresanlanmış nükleotid analoglarının kullanılmaya başlanmasıyla **Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği** adını almıştır. Non-izotopik problemler ile, plazmidlere entegre edilen 1kb'lık DNA dizileri haritalanabilmiştir. Daha büyük boyuttaki problemlerle daha kuvvetli sinyal elde edilebileceği anlaşıldıktan sonra daha uzun DNA dizileri kozmid ya da yeast artificial kromozomlara (YAC) entegre edilmiştir. Böylece kromozomların belli bölgelerine özgün DNA problemlerinin sayısı artmış ve kromozomal anomalilerin tanısında FISH çok daha önemli bir yere gelmiştir. Ayrıca FISH tekniğinin gerek interfaz hücrelerinde, gerekse kromozomlarda uygulanması, kullanım alanını genişletmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** FISH tekniğinin kullanım alanları:

<b>Diagnostik:</b>	<b>Araştırma:</b>
Interfaz hücrelerinde anöploidisi tanısı,	Gen haritalaması
Klinik sitogenetik ve prenatal tanı,	Gen ekspresyon analizi
Mikrodelesyon sendromlarının tanısı,	Tümör biyolojisi
Dokularda enfeksiyon ajanlarının tanısı,	Mikrobiyoloji-Viroloji
Kanser sitogenetiği	Mayoz-Mitoz analizleri

FISH tekniğinde izlenen basamaklar;

- Proben işaretlenmesi
- Prob ile hibridize edilecek materyalin fikse edilerek preparatlara yayılması
- Metafaz kromozomları veya interfaz nükleusundaki hedef DNA'nın denatürasyonu
- Proben denatürasyonundan sonra hedef DNA ile hibridize edilmesi
- Hibridizasyon sonrası yıkamalar ile immunokimyasal ve mikroskopi yöntemleri ile hibridizasyonun görünür hale getirilmesi

#### **II.1.3.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar:**

In situ hibridizasyonda kullanılan ilk problemler, bakterial virüsler (dairesel plazmidler veya linear bakteriyofajlar) içine sokulan DNA fragmentinin, bakterinin içinde çoğalarak klonlar oluşturmasıyla elde edilmiştir. Daha büyük fragmentler, kozmid, BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), veya YAC gibi uygun bir vektör içine yerleştirilerek bakteri veya maya gibi konakçı hücrede çoğaltılır (97). Ayrıca PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi ile tüm genomdan, kromozomdan veya kromozomun parçasından, özel problemler veya prob kütüphaneleri oluşturulur.

##### **II.1.3.1.1. Problemlerin İşaretlenmesi**

Radyoaktif olan problemler otoradyografi ile, non-radyoaktif olanlar ise immünokimyasal yollarla işaretlenir.

Non-radyoaktif problemlerin işaretlenmesinde "direkt" ve "indirekt" olmak üzere iki yöntem kullanılır.

##### **II.1.3.1.1.1. Direkt İşaretleme**

Aracı molekül direkt olarak proba bağlanır ve hibridizasyondan hemen sonra mikroskopta gözlenebilir. En önemli nokta, prob ile aracı molekül arasındaki bağın ağır hibridizasyon ve yıkama aşamalarına dayanabilmesidir. Ayrıca, aracının, hibridizasyonun etkinliğini düşürmemesi gerekmektedir (156). Bu yöntemde

kullanılan problar küçük DNA dizilerinden oluştuğundan, sinyaller kısa ömürlü olmaktadır.

En sık kullanılan aracı gruplar;

Fluorescein 2'-deoxyuridine triphosphate 5' (d-UTP)

Rhodamine d-UTP

Kumarine d-UTP'dir (92).

Çok renkli FISH uygulamaları için elverişli olması ve hibridizasyon yöntemini hızlandırması nedeniyle direkt yöntem, prenatal tanıda ve preimplantasyon uygulamalarda tercih edilmektedir (32,113,154).

#### **II.1.3.1.1.2. İndirekt İşaretleme**

Aracı molekül, kimyasal veya enzimatik olarak proba bağlanır. Aracı molekül, sinyalin görünür hale gelmesini immunohistokimyasal afinite reaksiyonları ile sağladığı için görüntüleme dolaylı yoldan gerçekleşir (8,110,116). İndirekt yöntemde sıklıkla biotin-avidin, biotin-streptavidin, digoksinin ve dinitrofenol kullanılır (17,66,82,91). Direkt yöntemle göre daha hassastır ve prob boyunca bağlanan haptin sayısı daha fazla olduğu için sinyal çok daha kuvvetlidir. Ancak yöntem uzun zaman aldığı için günümüzde fazla tercih edilmemektedir.

#### **II.1.3.1.2. Prob Çeşitleri**

Kromozomal anomalileri saptamak amacıyla in situ hibridizasyon tekniğinde kullanılan problar çok çeşitlidir. Hedef dizilerine göre problar başlıca 3 sınıfa ayrılırlar;

1. Lokusa özgü problar (kozmid problar),
2. Kromozomun belirli bir yapısal bölgesine özgü, tekrarlayan dizilerden oluşan problar (sentromerik veya alfa satelit problar),
3. Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problar (painting veya whole chromosome painting problar) (22)

#### **II.1.3.1.2.1. Lokusa Özgü Problar:**

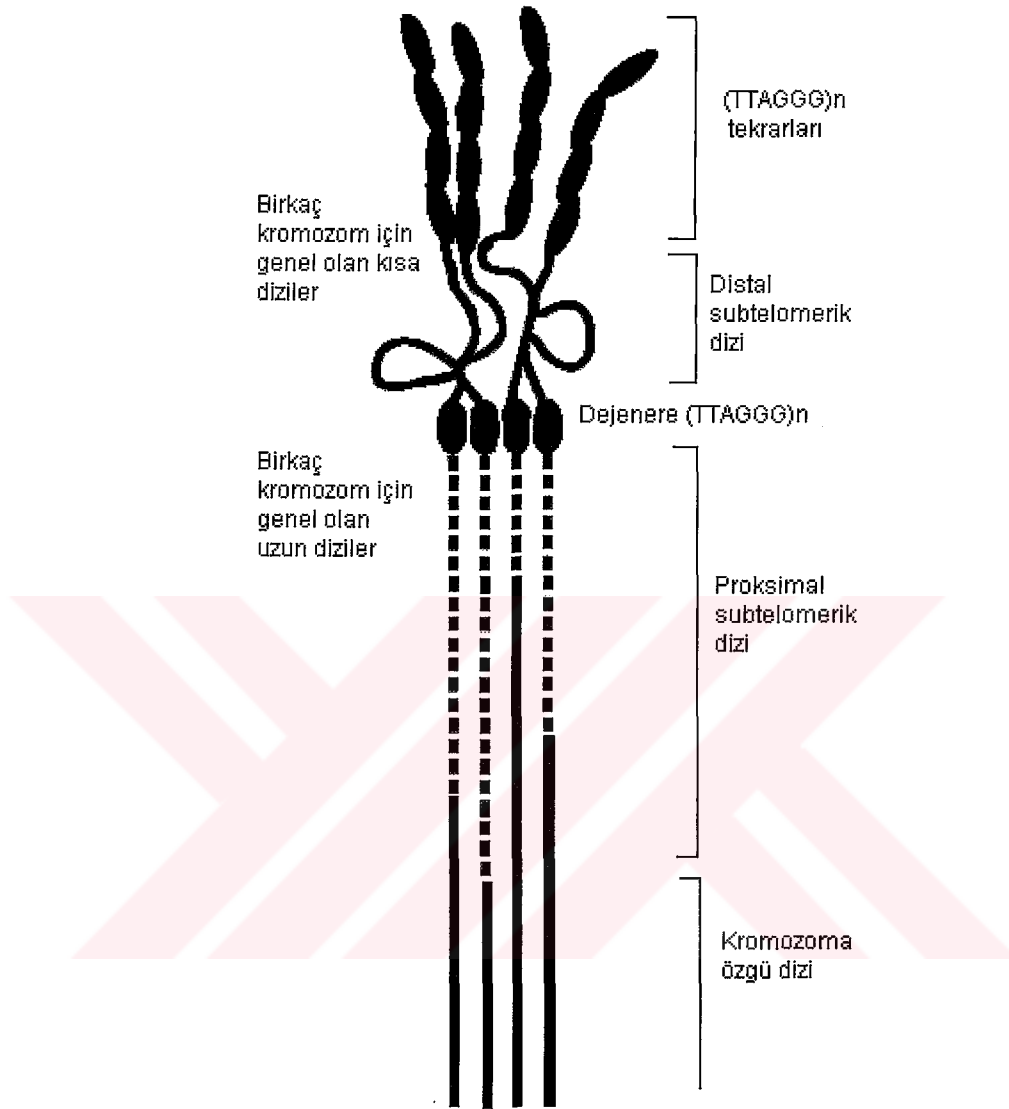
İnterfaz nukleusunda ya da metafaz kromozomlarında bir gene veya genin içindeki bir bölgeye ait özgün DNA dizilerinden oluşan problardır. 15- 500kb uzunluğunda olup kozmide (30- 40kb), BAC'a (100- 300kb), YAC'a (200- 2000kb), veya PAC'a (P1 Artificial Chromosome, 100- 300kb) klonlanmış olan bu problar, mikrolelesyon ve duplikasyonları saptamada, ilgili kromozoma ilişkin yapısal değişimlerin, mikrolelesyon sendromlarının (DiGeorge Sendromu, Miller-Dieker Sendromu, Prader Willi/Angelman Sendromu gibi) tanısında kullanılmakta ve ticari olarak satılmaktadır (148).

Single-copy FISH (ScFISH) probları 1.5- 10kb büyüklüğündedir ve özellikle neoplastik ve kalıtsal genomik bozuklukların saptanmasında kullanılır (118). Tanımlanmış DNA dizilerinin florokromlarla işaretlenmesi ve hibridizasyonunun ardından belirli bir gen bölgesi için, ticari olarak bulunan DNA problarından daha yüksek çözünürlük ve genomik yoğunlukta anomaliler saptanır. Sık ve ender görülen çok daha küçük yeniden düzenlenmelerin saptanmasında, kırık noktalarının belirlenmesinde, insan genom dizisi kullanılarak single-copy FISH probları geliştirilmektedir.

#### **II.1.3.1.2.1.1. Subtelomerik problar:**

Subtelomerik problar, her bir telomerden 100- 300kb uzaklıktaki özgün dizilere komplementer, konvansiyonel sitogenetiğe oranla çok daha yüksek çözünürlük sağlayan dizilerdir (Şekil 1). 60.000 ile 170.000kb uzunluğunda olan subtelomerik problar, rekombinant veya klonlanmış DNA'dan oluşur. Tamamı kromozom spesifik değildir ve bir kromozomdaki subtelomerik bölgeler, diğer kromozomdakilerle homoloji gösterebileceğinden kross-hibridizasyon görülebilir.

Ticari olarak satılan telomerik ve Multiprobe (Cytocell) Telomere FISH gibi subtelomerik problar ile, rutin kromozom bantlama yöntemlerinin yetersiz kaldığı telomerlere yakın bölgelerdeki küçük delesyonların ve bu bölgeleri içeren kriptik translokasyonların belirlenmesi oldukça kolaylaşmıştır.



**Şekil 1.** Telomerlerin ve subtelomerik bölgelerin dizi organizasyonu

#### II.1.3.1.2.2. Tekrarlayan Dizi (Satellit) Problemleri

İnsan DNA'sının %10-20'si satelit ya da kendini tekrarlayan dizilerden oluşur. 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 spesifiktir (E48).

#### **II.1.3.1.2.2.1. Sentromerik Problar**

İnterfaz nukleusunda ya da metafaz kromozomlarında oldukça parlak sinyal verdiklerinden prenatal tanıda anöploidilerin (trizomi 21, 13, 18 gibi) tanısında kullanılmaktadır. Ayrıca cinsiyete bağlı hastalık endikasyonu bulunanlarda hızlı cinsiyet tayini için, marker ve halka kromozomlarda da sentromer yerleşiminin araştırılması için kullanılmaktadır (143).

Beta satellit problar, akrosentrik kromozomlara, perisentrik heterokromatin bölgelere ve 9. kromozoma lokalize olurlar (157).

Klasik satellit probları, AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, 15 ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgü DNA dizilerinden oluşur (11,151).

#### **II.1.3.1.2.2.2. Telomerik Problar:**

Bütün ökaryotik kromozomlar telomerlerle sonlanır. İnsanlarda telomerler, özel bir DNA dizisi olan ve kromozom ucunu korumak ve onarmak için gerekli olan nükleoprotein kompleksini oluşturacak şekilde toplam 2-15kb büyüklüğündeki 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşur (76) (şekil 1).

GTG ile açık boyanan telomer bölgelerindeki kriptik değişimlerin rutin bantlama teknikleriyle belirlenmesi oldukça zordur. Zengin gen içeriği olan ve çoğunlukla kromozomal yeniden düzenlemelere katılan telomerle ilgili olarak son yıllarda yapılan araştırmalar, telomerik bölgelerdeki yeniden düzenlemelerin mental retardasyonun önemli nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. Bütün kromozomların kısa (p) ve uzun (q) kollarındaki (akrosentrik kromozomlarda sadece q kolu için) telomerik bölgeleri tek bir FISH çalışmasıyla değerlendirmek amacıyla hazırlanmış telomer problarıyla delesyonlar sinyal yokluğu ile, trizomiler ise üç sinyal varlığı ile saptanır. Kromozomların sitogenetik karakterizasyonu ile

sinyallerin kromozomal konumu kolayca anlaşılabilirdiğinden, dengeli ve dengesiz translokasyonların her ikisi de kolaylıkla görülebilir (75).

#### **II.1.3.1.2.3. Kromozomun Tümünü Boyayan (Painting) Problar**

Belli bir kromozomun farklı bölgelerine özgün DNA dizilerinden oluşturulan prob karışımı kullanılarak o kromozomun p terminalinden q terminaline kadar tümünün işaretlenmesi/boyanması sağlanır. Painting (whole chromosome painting – wcp) problar, flow sitometri yardımıyla tek tek izole edilen kromozomların PCR ile çoğaltılmasıyla, monokromozomal hücre hibritlerinden ve kromozom kütüphaneleri kullanılarak elde edilir (92,95).

Painting probların hazırlanmasındaki bir diğer yöntem de, metafaz kromozomlarından mikrodiseksiyon yöntemi ile elde edilen kromozom segmentinin PCR ile çoğaltılması ve işaretlenerek prob olarak kullanılmasıdır. Bu prob tekrar metafaz kromozomları ile hibridizasyona sokularak mikrodiseksiyon ile izole edilen parçanın hangi kromozoma ait olduğu saptanabilir. Reverse painting denilen bu yöntem, marker kromozomların ve kompleks kromozom anomalilerinin kökeninin araştırılmasında kullanılır (45).

#### **II.1.3.1.2.3.1. Multicolor Karyotipleme (M-FISH ve SKY)**

Bütün homolog kromozomların aynı anda farklı renklerle boyanmasını sağlayan ve karyotip analizini kolaylaştıran moleküler sitogenetik bir yöntemdir. *Flow-sorted* kromozomlardan oluşturulan kromozom spesifik problar (painting problar) amplifiye edilir ve dejenere oligonükleotid primerli PCR yardımıyla florokromlarla ile işaretlenir. Farklı sayıda florokrom kullanılarak (beş, altı veya yedi) 24 spesifik renk kombinasyonu elde edilir (137, 127, 142 5, 124). “**Multiplex FISH (M-FISH)**” ve “**Spectral Imaging veya Karyotyping (SKY)**” olmak üzere iki farklı multicolor karyotipleme yöntemi vardır.

Her iki yöntemde de benzer işaretleme sistemleri kullanılırken, in situ hibridizasyon sonrası renk kombinasyonlarının saptanması ve renk ayrımının yapılmasındaki teknik açısından, yöntemler birbirinden ayrılır. Her iki yöntemde de

kullanılan florokromlar çıplak gözle görülemez, görüntüleme CCD (Charge-coupled device) kamera temelli sistem ve değerlendirme bilgisayarlı görüntü analiz sistemi ile gerçekleştirilir.

Görüntüleme iki farklı prensibe bağlıdır; Speicher ve ark. tarafından önerilen sistemde, dar bantlı bir filtre seti ile her bir florokrom için farklı görüntüler alınır (M-FISH) veya Schröck ve ark. tarafından geliştirilen sisteme göre spektral görüntüleme ile tüm emisyon tayfı tek bir görüntüde değerlendirir (SKY) (127,137). CCD ile yapılan görüntülemenin ardından, Fourier spektroskopisi ile floresan yoğunluk oranları değerlendirilir. Her piksel için, görüntüdeki belli bir florokrom veya florokrom kombinasyonuna spesifik olan inferogram oluşturulmasıyla renk-kromozom eşleşmesi yapılır.

M-FISH ve SKY, kromozomal kırık noktalarının haritalanmasında, translokasyonların belirlenmesinde, marker kromozomların, homojen boyanan bölgelerin ve double minute kromozomların yapısının aydınlatılmasında, kompleks kromozom anomalilerinin kökeninin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Ancak her iki yöntem de marker kromozomların kesin bant kökenini belirlemede, kompleks kromozomal yeniden düzenlemelerde kesin kırık noktalarını saptamada (158), inversiyon, küçük duplikasyon veya delesyonların belirlenmesinde yetersizdir.

Multicolor karyotipleme yöntemleri ile saptanabilecek minimum değişiklik 1 - 2 Mb olsa da, özellikle delesyon, duplikasyon ve inversiyon gibi interkromozomal yeniden düzenlemelerin aydınlatılmasında bantlamaya dayalı sitogenetik tanıya yardımcı olarak kullanılmaktadır (126).

#### II.1.4. Komperatif Genomik Hibridizasyon (KGH) (Comperative Genomic Hybridisation - CGH )

1992 yılında Kallioniemi ve arkadaşları tarafından geliştirilen Komperatif Genomik Hibridizasyon (KGH); kromozom kopya sayısındaki değişiklikleri hücre kültürüne gerek kalmaksızın, tek bir çalışmayla saptayabilen, moleküler sitogenetik bir yöntemdir(64). Teknik ilk olarak kanser genetiğinde, tümör hücrelerinin kültürüne ve metafaz kromozomlarına gerek olmaması nedeniyle, solid tümörlerdeki yapısal değişimleri göstermek için kullanılmıştır (69). Daha sonraları marker kromozomların tanısında başarılı olması, dengesiz kromozom anomalileri için tek bir çalışmada genom boyu tarama yapabilmesi ve kandan izole edilen DNA ile çalışılması gibi avantajları yüzünden klinik sitogenetikte de uygulanmaya başlanmıştır (19).

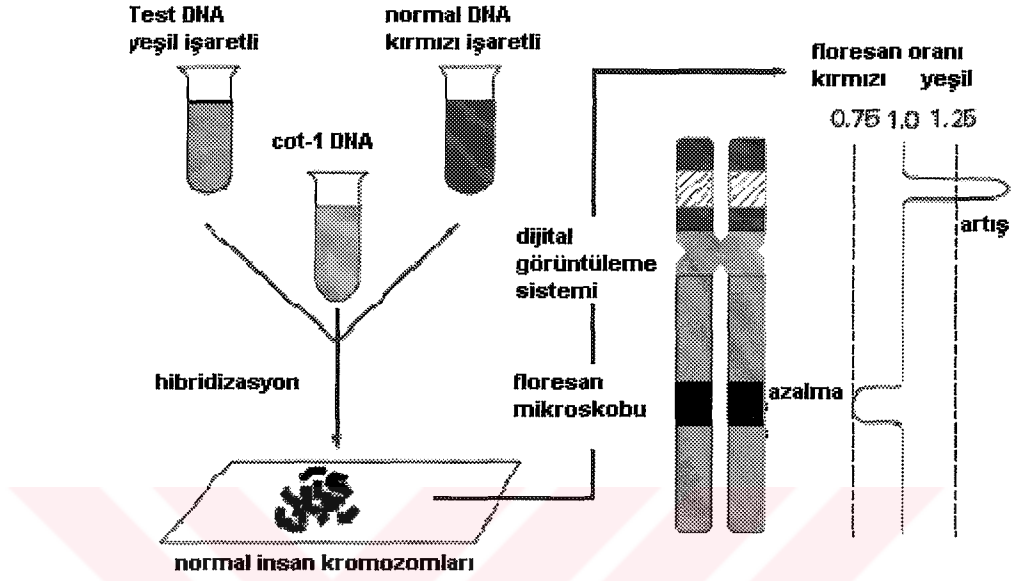
KGH, biri analiz edilecek örnekten (test DNA), diğeri normal karyotipli referanstan (normal DNA) elde edilen ve farklı florokromlarla işaretlenen iki genomik DNA'nın normal metafaz kromozomları üzerinde hibridizasyonu temeline dayanır. Genellikle test DNA'sı, floresan özellikteki FITC veya SpectrumGreen ile yeşil işaretlenirken, normal DNA ise TexasRed veya SpectrumRed d-UTP ile kırmızı işaretlenir. Her iki DNA, 1:1 oranında ve repetitive DNA (cot-1 DNA) varlığında karıştırılır ve normal insan metafaz kromozomlarının bulunduğu preparatlara hibridize edilir. Bu hibridizasyon sırasında normal ve test DNA, metafaz kromozomları üzerinde yer alan aynı hedef bölgelere bağlanmak üzere yarışır. Belirli bir kromozomal bölgeye bağlanacak test ve normal DNA'nın miktarı, bu dizilerin her iki DNA örneğindeki miktarına bağlıdır. Bu nedenle, test (yeşil) ve normal (kırmızı) DNA'nın floresan hibridizasyon paterninin yoğunluğundaki değişiklikler, her iki genom arasındaki kopya sayı farklarını gösterir. Örneğin, test DNA'daki normal bölgeler kırmızı-yeşil dengesi sonucunda sarı olarak gözlenirken, test DNA'daki olası bir artış (duplikasyon) sonucunda yeşil renk gözlenir, azalma (delesyon) kırmızı renkle kendini gösterir. Bu renk farklılıkları, dijital görüntü analizi sisteminin yardımıyla saptanır. Böylece bütün

kromozomlar açısından oran profilleri hesaplanarak genom boyu kromozomal dengesizlikler (artış/azalma) gözlenebilir (60).

#### **II.1.4.1. KGH Tekniğinde İzlenen Basamaklar**

Farklı renklerde işaretlenmiş test ve referans DNA'nın floresan yoğunluklarının karşılaştırılması esasına dayanan KGH'nin temel basamakları şöyledir (Şekil 2);

1. Referans DNA olarak kullanılacak normal DNA'nın kandan izolasyonu,
2. İncelenecek olgu (test) DNA'sının kandan veya dokudan eldesi,
3. İki DNA örneğinin nick translasyonla direkt veya indirekt olarak işaretlenerek prob elde edilmesi.
4. İşaretlenmiş problemlerin eşit miktarlarının cot-1 DNA ile çöktürülmesi,
5. Problemlerin denatürasyonunun ardından normal karyotipli erkek bireyden elde edilen metafaz kromozomlarına hibridizasyonu,
6. Hibridizasyon sonrası preparatın yıkanması,
7. Dijital görüntüleme sistemi ile metafaz plaklarının analizi ve saptanan floresan oranlarının değerlendirilmesi,
8. Artış veya eksilme görülen kromozom bölgelerinin karakterizasyonu için FISH problemleri ve/veya moleküler teknikler ile doğrulama yapılması.



**Şekil 2.** KGH tekniğindeki bazı basamakların şematik gösterimi

#### II.1.4.1.1. Prob İşaretleme Teknikleri

##### II.1.4.1.1.1. Rasgele Seçilmiş Primerlerle DNA İşaretlenmesi (Random Primed DNA Labelling)

10 ng'dan 3 µg'a kadar olan DNA fragmentleri bu yöntemle (38) işaretlenebilir. Standart işaretleme yöntemi hızlıdır (1 saat) ve her 20-25 nükleotidde bir modifiye nükleotid (digoksinin-, biotin-, veya floresan-dUTP), yeniden sentezlenen DNA probun içine sokulmuş olur. Bu işaretleme sıklığı indirekt görüntülemelerde probun yüksek duyarlılıkta işaretlenmesine neden olur.

Random primed işaretleme reaksiyonunda, kalıp DNA doğrusal hale getirildikten sonra denatüre edilir ve 6 nükleotidden oluşan primerlerin bağlanması sağlanır. 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. Ortamda bulunan işaretli nükleotidlerin, yeni sentezlenen DNA'ya yerleşmesi ile kalıp DNA işaretlenmiş olur.

Bir saatlik reaksiyon sonrasında işaretlenmiş DNA fragmentleri 200-1000 bp uzunluğundadır.

#### **II.1.4.1.1.2. Nick Translasyon İle DNA İşaretleme**

Probların, radyoaktif ve non-radyoaktif moleküllerle işaretlenmesini sağlayan Nick translasyon yöntemi Rigby ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (116). Langer ve arkadaşları (1981) ise nonradyoaktif nükleotidler kullanarak yöntemin, rutin kullanıma girmesinde büyük rol oynadılar (82).

Teknik, hapten [(digoksinin- (DIG), biotin-, 2,4-dinitrophenyl (DNP)] veya floresan [(Texas Red-, fluorescein isothiocyanate-(FITC), Alexa 488-, tetramethyl rhodamine- (TAMRA), amino-methyl coumarin- (AMCA)] ile modifiye edilmiş bir nükleotidin, yeni sentezlenen DNA zincirine 20-25 nükleotidde bir katılması esasına dayanır.

Nick translasyon ile, kullanılan molekül hapten ise indirekt, floresan ise direkt olmak üzere iki farklı şekilde işaretleme yapılabilir.

##### **II.1.4.1.1.2.1. İndirekt İşaretleme**

İndirekt yöntemde aracı molekül, kimyasal veya enzimatik olarak probun bünyesine sokulur. Aracı molekül ancak immunositokimyasal afinite reaksiyonları ile probun görüntülenmesini sağladığı için görüntüleme dolaylı yoldan gerçekleşir (85,110,116).

İndirekt işaretlemede test DNA genellikle biotin ile işaretlenirken, referans DNA digoksinin ile işaretlenir. İşaretlemenin görüntülenmesi, FITC (yeşil) ve TRITC (kırmızı) bağlı antibodiler ile sırasıyla test DNA için yeşil ve referans DNA için kırmızı floresan sinyal alınmasıyla gerçekleşir.

İndirekt yöntemler daha hassastır ve prob boyunca bağlanan haptin miktarı daha fazla olduğundan daha yoğun sinyal elde edilir.

#### **II.1.4.1.1.2.1.2. Direkt işaretleme**

Direkt işaretlemede test DNA'nın ve normal DNA'nın sırasıyla yeşil ve kırmızı floresan işaretli d-UTP'ler [(FITC-12-dUTP/TexasRed-5-dUTP (DuPont, Boston, MA, USA), SpectrumGreen-dUTP/SpectrumRed-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, USA)] ile nick translasyon yardımıyla işaretlenmesiyle prob elde edilir.

Bu teknikte kullanılan DNaz I, çift zincirli DNA'nın her bir zincirindeki fosfodiester bağlarında rastgele olarak çentikler (nick) açar. DNA polimeraz, 5'→3' yönündeki eksonükleaz aktivitesi ile nükleotidi ortamdan uzaklaştırırken, bir yandan da 3'→5' yönündeki endonükleaz aktivitesi ile açılan çentiklere yeni nükleotidlerin (işaretli ya da işaretsiz) girmesini sağlar. Eğer nükleotidlerden biri (genellikle UTP) floresan ile işaretlenmiş ise, sonuçta DNA molekülü içerisinde bu nükleotidle beraber floresan molekülü girecektir. Böylece çift zincirli DNA işaretlenmiş olur (yaklaşık olarak 20-25 nükleotidde bir). Bu işaretleme sıklığı, direkt görüntülemeye probun yüksek duyarlılıkta işaretlenmesine ve modifiye nükleotidlerin enzimatik olarak DNA'ya sokulmasına izin verir. Bu reaksiyonun optimal süresi 60-90 dakikadır ve reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerin uzunluğu 200-500 bp kadardır.

Direkt yöntemde en önemli sorunlardan biri, prob ile aracı molekül arasında oluşan bağın, ağır hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası yıkama aşamalarına dayanması gerekliliğidir.

Nick translasyon, random priming oranla daha çok tercih edilen bir yöntemdir, çünkü DNA problemlerinin uzunluğu 0.5-2 kb olmak üzere DNase1 ilavesiyle ayarlanabilir. Nick translasyon sonrasında elde edilen işaretli DNA, agaroz jelde yürütülerek istenilen fragment aralığına ulaşıp ulaşmadığı kontrol edilir.

#### **II.1.4.1.2. Prob Presipitasyonu**

Nick translasyon ile yeşil ve kırmızı olarak işaretlenen test ve normal DNA, eşit miktarda karıştırılır ve karışıma cot-1 DNA eklenir. Cot-1 DNA, tekrarlayan heterokromatin dizilerinden içeren kromozom bölgelerine bağlanarak bu bölgelere

prob bağlanmasını engeller. Santrifüj ile çöktürülen karışım, hibridizasyon için kullanılır.

#### **II.1.4.1.3. Denatürasyon**

Prob DNA'nın hedef DNA ile hibridize olması için ilk koşul, her iki DNA'nın da tek zincirli hale getirilmesi yani denatüre edilmesidir. Nükleik asitler, komplementer dizilerine, bazlar arasındaki zayıf hidrojen bağlar ile bağlıdır. Bu bağlar, hibridizasyondan önce, alkaline 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 (15).

#### **II.1.4.1.4. 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.

#### **II.1.4.1.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

Spesifik olmayan hibrid molekülleri ile, hibridize olmamış problemleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla yıkamalar, seyreltilmiş tuz çözeltisi (formamid/SSC) kullanılarak hibridizasyon ısısından biraz daha yüksek ısıda (örneğin 45°C de) gerçekleştirilir (15).

#### **II.1.4.1.6. Hibrit Molekülünün Görüntülenmesi**

İndirekt yöntemle işaretlenmiş problemler immunositokimyasal yöntemlerle görüntülenebilir. Direkt yöntemle işaretlenmiş floresan problemler kullanıldığında, preparatlar hibridizasyon sonrası yıkamaların hemen ardından floresan mikroskopta değerlendirilebilir. Floresanla işaretlenmiş DNA'yı görüntülemek için

kullanılan karşı-boyalarda (antifade) genellikle kırmızı floresan veren PI ya da mavi floresan veren DAPI'dir. Uygun filtre setleriyle normal floresan mikroskopla görülebilen hibridizasyon, dijital görüntüleme ve analiz sistemiyle değerlendirilir.

#### **II.1.4.1.7. Dijital Görüntüleme ve Analiz Sistemi**

Kromozomal artış veya azalmaları belirleyebilmek için, hibridizasyon sonrası kromozomlardaki yeşil floresan yoğunluğunun kırmızı floresan yoğunluğuna oranı hesaplanır. Bu oran, referans DNA'ya göre test edilen genomdaki artış veya azalmaları göstermektedir. Buna göre teorik olarak eğer test DNA tamamen normal DNA içeriyorsa, bütün kromozomlardaki oran 1.0 olmalıdır (103, 73, 90). Normal test DNA'nın hibridizasyonunun oran profili bazen 1.0'dan sapabilir. Bu sapmalar, kromozomlarda belirli bir paternde olabilir ve bazı kromozom bölgeleri, örneğin 1p'nin distal yarısı, 19. ve 22. kromozomlar gibi, çoğunlukla 1.0'dan sapma gösterebilir. Bu durum telomerik bölgelerin çoğu için de geçerlidir. Buna bağlı olarak genellikle bu bölgelerin yorumu yapılmaz veya bütün kromozomlar için belirlenmiş eşik değerler, bu bölgelerdeki artış ve azalmaların saptanmasını engelleyen değerlerdir (103, 157).

Bunun yanında yalancı negatif sonuçlar da KGH analizinde problem yaratır. Analiz edilen örnekler, poliploid hücrelerden ve/veya heterojen dokulardan köken alabilir ve/veya normal hücrelerle karışmış olabilir. Bu örneklerde anomali olması durumunda, oran profilleri normal DNA profillerinden çok az farklılık gösterebilir ve anomaliler belirlenmiş çoğu eşik değerleriyle saptanamaz.

KGH analizi floresan mikroskopunda, DAPI, yeşil (FITC) ve kırmızı (TRITC) filtrelerle CCD kamera yardımıyla 3 görüntü alınır. Herbir olgu için 9 veya 10 metafaz analiz edilir. Özel bilgisayar programı ile karyotipleme yapılır ve herbir kromozom için yeşil – kırmızı floresan oranı hesaplanır. Metafazlar aşağıdaki kriterlere göre seçilir;

1. DAPI bantlarını iyi gösteren, iyi yayılmış metafazlar olması,
2. Bütün kromozomlarda eşit yeşil ve kırmızı hibridizasyon olması,
3. Zayıf arka plan floresanı olması.

DAPI boyalı metafazlar, DAPI bantlarının kontrastını ayarlayan otomatik görüntü düzeltmesinden sonra değerlendirilir, karyotipleme yapılır (70). Kromozomal artış ve azalmaların doğru değerlendirilmesi için, karyotipleme doğru bir şekilde yapılmalıdır. Yorumlama, belirlenmiş (*fixed*) (klasik KGH) veya istatistiksel eşik değerlere (HR-KGH) göre yapılabilir. Belirlenmiş eşik değerleri daha yaygın olarak kullanılır ve 1.25 ve 0.75 ile 1.1 ve 0.9 aralığında değişir. Genel olarak kromozomal kayıplar için 0.8, artışlar için 1.2 eşik değeri kabul edilmiştir. İstatistiksel eşik değerleri, standart referans aralığına (*standart reference intervals*) ve/veya *confidence interval* 'e (%95, %99 veya %99.5) göre belirlenir (7, 70). İstatistiksel eşik değerleriyle daha fazla anomali saptanabilse de, belirlenmiş eşik değerleri kullanılması ile daha az yalancı pozitif sonuç saptanır (60, 7).

#### **II.1.4.2. KGH'un kullanım alanları**

KGH tekniği, tek çalışmada tüm genomu hücre kültürüne gerek kalmadan taraması gibi avantajlarından dolayı, kanser sitogenetiğinden prenatal tanıya birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Tekniğin kullanım alanları şöyle sıralanabilir:

1. Kanser sitogenetiğinde tümör dokularının kültürüne ve dokulardan kromozom eldesine gerek kalmadan, kandan, parafine gömülü veya dondurulmuş doku kesitlerinden elde edilen DNA ile anomalilerin saptanması,
2. Klinik sitogenetikte kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılması,
3. Rutin bantlama teknikleriyle normal karyotip gösteren dismorfik ve mental retardasyonlu olgularda olası anomalilerin saptanması,
4. Marker kromozomların kökeninin belirlenmesi,
5. Rutin bantlama teknikleriyle saptanamayan subtelomerik delesyon ve duplikasyonların belirlenmesi,
6. Kültür edilebilen ve edilemeyen plasental dokularda, sayısal kromozom anomalilerinin saptanması (19),
7. Az sayıda hücre elde edilebilen durumlarda, yeterli miktarda hücrenin DOP-PCR ile elde edilerek analiz edilmesi,

8. Preimplantasyon genetik tanıda, tek bir hücrenin (örn; blastomer) single cell PCR ile çoğaltılarak dengesiz translokasyonların ve sayısal anomalilerin saptanması (93).

#### **II.1.4.3. KGH'nin limitleri ve duyarlılığı**

Bu tekniğin duyarlılığını etkileyen faktörler;

1. KGH, analiz edilen örnekteki hücrelerin çoğunluğunda (> %50) var olan yeniden düzenlemeleri saptayabilmektedir. Bu nedenle örneğin bir tümör dokusundaki neoplastik olmayan hücreler, KGH'un duyarlılığını düşürebilir. Aynı nedenle klinik sitogenetik uygulamalarda da mozaik yapıların saptanmasında başarılı olamayabilir. Anomalili hücrelerin normal hücrelere oranı en az %50 olmalıdır. (63)

2. KGH yalnız normal DNA'ya kıyasla kopya sayı değişiklikleri hakkında bilgi verebildiğinden, dengeli translokasyonlar, yeniden düzenlemeler veya ploidi değişimlerini saptayamaz.

3. KGH'un en büyük dezavantajı, kromozomal dengesizliklerin tanımlanması ve yerlerinin tespit edilmesi için kullanılan normal metafaz kromozomlarının boylarının sınırı nedeniyle küçük değişimlerin saptanamamasıdır.

4. Sentromer bölgeleri, akrosentrik kromozomların p kolları gibi heterokromatik tekrar dizileri içeren bölgelerde KGH yanıltıcı sonuç verebilir, çünkü bu bölgeler işaretlenmemiş cot-1 DNA tarafından çeşitli boyutlarda kapatılır (Kallioniemi et al 1994; du Manoir et al 1995a, A 14). Ayrıca indirekt işaretlenmiş genomik problemler kullanıldığında 1. kromozomun p kolunun distal yarısı, 19. ve 22. kromozomlarda yalancı pozitif DNA artışları gözlenmiş, direkt işaretleme ile bu sorun büyük ölçüde aşılmıştır (19).

### II.1.5. *High Resolution* KGH (HR-KGH)

Kirchhoff ve ark. (69) 1997'de KGH'da heterokromatin ağırlıklı tekrar dizilerinin değerlendirmeyi zorlaştıran etkisini otomatik olarak düzelten bir algoritma geliştirdi. Bu algoritmaya göre, KGH'nun yorumlanmasında belirlenmiş eşik değerler yerine normal örneklerin hibridizasyonuna dayalı dinamik standart referans aralığının kullanıldığı *High Resolution* KGH (HR-KGH) tekniği geliştirildi. HR-KGH, normal KGH'a oranla çok daha hassastır. Normal KGH ile 10-20 Mb'a kadar olan delesyon ve duplikasyonlar saptanabilirken, HR-KGH tekniği ile 3 Mb'lık değişimler saptanabilmektedir (74).

### II.1.6. Multipleks Ligasyon-bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

Gen doz değişimlerinin saptanması, genetik hastalıkların tanısının konulmasında her geçen gün önem kazanmaktadır. Delesyon veya duplikasyon sonucu hastalığa sebep olan DNA fragmentlerinin boyutu, tek bir eksondan (birkaç yüz baz çifti veya daha az) bütün bir kromozoma kadar değişkenlik gösterebilir. Duchenne kas distrofisi, spinal kas atrofisi, Charcot-Marie Tooth hastalığı, fanconi anemisi, konjenital adrenal hiperplazi gibi tek gen hastalıklarında, genin tamamının veya bir kısmının delesyonu veya duplikasyonu, hastalığa neden olduğu saptanan mutasyonların önemli bir kısmını oluşturur. Birkaç baz çiftlik küçük delesyon ve insersiyonlar PCR ve dizileme teknikleriyle belirlenebilmekte, daha büyük delesyonlar (megabaz boyutunda) sitogenetik tekniklerle saptanabilmektedir. Bunların yanında orta boyuttaki delesyonlar veya insersiyonlar (tek bir gen veya gen parçası) PCR ile ve sitogenetik tekniklerle yapılan analizlerle belirlenememektedir. Bu büyüklükteki delesyon ve duplikasyonların, klinik tanının yönlendirdiği ancak bu mutasyonlara özellikle bakılmadığı takdirde saptanmayabilecek olguların büyük çoğunluğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

MLPA tekniğinde, çeşitli kromozom bölgelerine spesifik iki eşit prob setinden oluşan karışıma, genomik DNA hibridize edilir. Prob setlerinden biri, yanında

universal primer dizisi içeren spesifik hedef diziden (20-30 nükleotid) oluşur ve sentetik olarak elde edilebilir. Diğer prob seti de bir ucunda spesifik hedef dizi (25-43 nükleotid), diğer ucunda universal primer dizisi, arada da problemlerin elektroforetik rezolüsyonu için gerekli boyut farkını sağlamak üzere değişen uzunlukta rastgele fragmanlar (19-370) içerir. Her iki prob seti de, spesifik hedefli diziler ardı ardına hedef DNA'ya bağlanacak şekilde tasarlanır ve daha sonra ligaz yardımıyla birleştirilebilir. Bunun sonucunda, daha sonra PCR ile çoğaltılabilen *universal* primer bağlanma bölgeleri içeren devamlı bir prob oluşur. Bağlanmayan problemler çoğaltılamaz ve yıkama ile fazla problemin uzaklaştırılmasına gerek kalmaz. Çoğaltılan bağlanmış problemin miktarı hedef kopya sayısı ile orantılıdır ve PCR amplifikasyonundan sonra gözlenen piklerin yüksekliği hedef dizinin delesyon veya duplikasyonunu gösterir (Şekil 3).

### II.1.7. Multipleks Amplifiable Prob Hibridizasyonu ( MAPH )

Yöntemde genomik DNA, bir membran üzerine fiske edilir ve saptanmak istenen hedef dizilere karşılık gelen prob setiyle hibridizasyonu sağlanır. Problemler, hedef dizilerin plazmid vektör içine klonlanmasının ardından, klonlanmış dizilerin vektöre yönlendirilmiş primerler yardımıyla amplifikasyonu ile elde edilir ve bunun sonucunda bütün problemler aynı diziyi devam eder (*flank*). Multiplekslenecek problemlerin, kapiller veya *slab* jel elektroforezinde ayırt edilebilecek kadar boyut farkı olması, prob tasarlanmasında kısıtlama yaratmaktadır. Bağlanmayan problemlerin uzaklaştırılması için membranlar yıkanır. Kalan spesifik bağlanmış problemlerin miktarı, hedef kopya sayısı ile orantılıdır. Problemler daha sonra soyularak membrandan uzaklaştırılır ve aynı anda universal primer çifti tarafından amplifiye edilir. Ürünler daha sonra elektroforezle ayrılır ve tespit etme yöntemine bağlı olarak bant yoğunlukları veya pik yükseklikleri açısından karşılaştırılır. Azalmış bant yoğunluğu veya pik yüksekliği, kontrol problemleriyle karşılaştırıldığında, gen kopya sayısında azalmayı (delesyon) gösterirken, gen kopya sayısındaki artışlar (duplikasyon) ise bant yoğunluğunda veya pik yüksekliğindeki artışlarla gözlenir (Şekil 4).

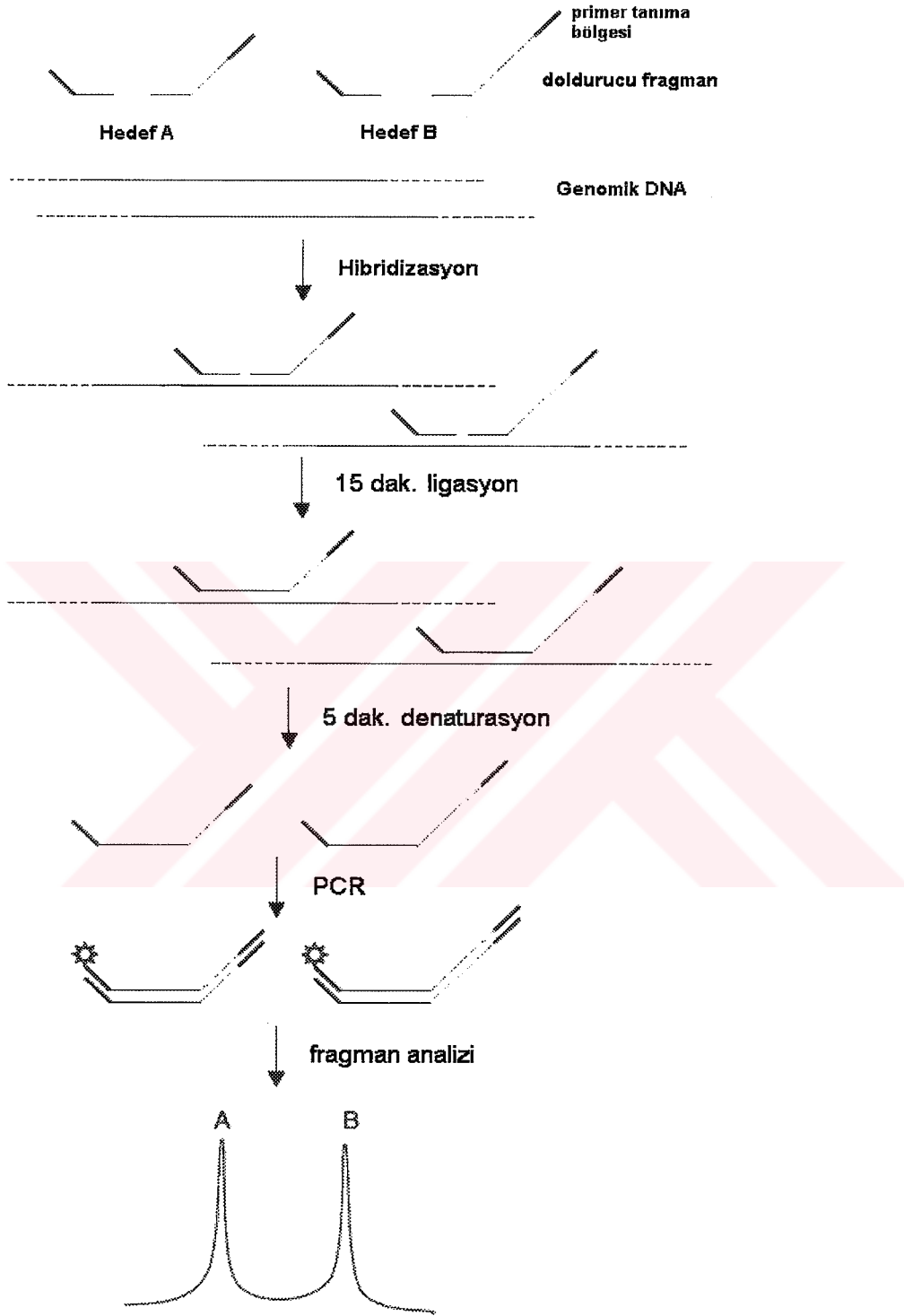
Armour ve arkadaşları tarafından 40 prob multiplekslenmiş ve çeşitli araştırmacılar tarafından DMD geninde, subtelomer bölgelerinde ve CML tümör tipinde delesyonlar MAPH yöntemiyle gösterilmiştir (4, 53,132).

#### **II.1.7.1. MLPA ve MAPH tekniklerinin avantaj ve dezavantajları:**

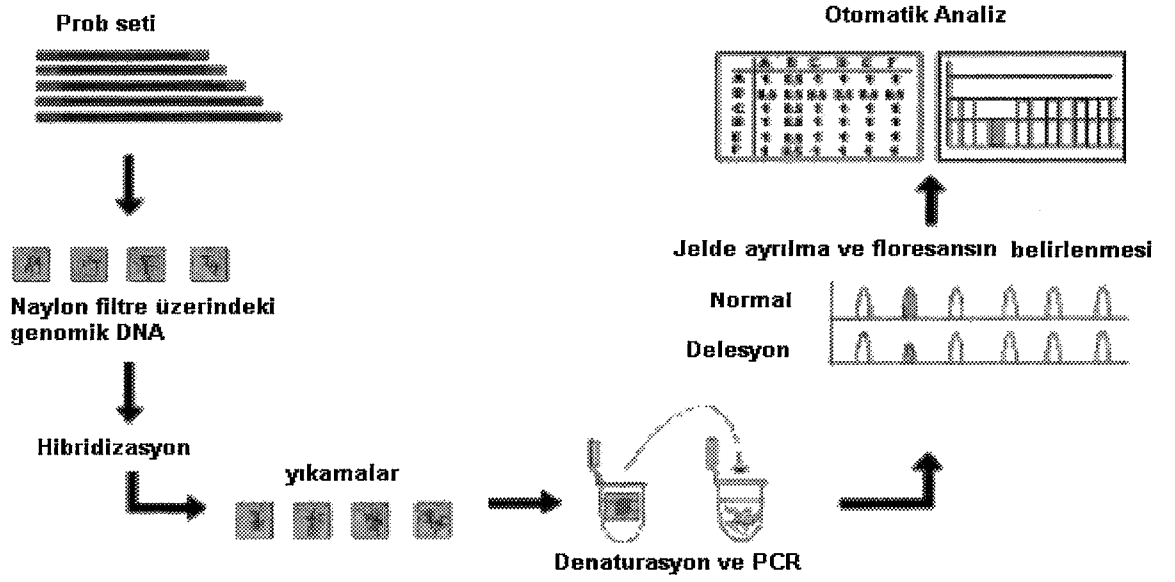
MLPA ve MAPH benzer prensiplerle çalışıp benzer sonuçlar verse de farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Probların hazırlanması yönünden, MAPH, M13 klonlaması gerektiren MLPA'ya oranla çok daha kolaydır. Ancak MAPH problemleri doğal olarak amplifiye edildikleri için, bağlanma basamağından sonra amplifiye edilen MLPA problemlerine oranla daha fazla kontaminasyon riski taşır. MAPH tekniğindeki yıkama aşamaları da kontaminasyon riskini arttıran bir faktördür.

Analiz için gerekli olan DNA miktarı her iki teknikte farklıdır; MLPA yönteminde iyi sonuç alabilmek için 100-200ng yeterliyken, MAPH tekniği 1µg DNA gerektirir.

Prob bağlanma bölgelerindeki polimorfizmler ve tek baz mutasyonları MLPA sonuçlarını etkilese de MAPH tekniğini etkilemez. MLPA problemlerindeki (20-30 nükleotid) spesifik prob bölgelerinin kısalığı, prob bağlanma bölgelerindeki yanlış nükleotid eşleşmeleri prob hibridizasyonunu, bağlanmasını önleyebilir ki bu da tek gen değişimlerinin ekson delesyonu olarak gözlenmesine neden olabilir. Bu nedenle MLPA tekniğiyle saptanan tüm basit fragment delesyonlarının bağımsız bir yöntemle kontrol edilmesi önerilmektedir (129).



**Şekil 3.** MLPA tekniğinin şematik gösterimi



**Şekil 4.** MAPH tekniğinin şematik gösterimi

### II.1.8. Array-KGH

Array-KGH tekniğinde, normal ve HR-KGH'den farklı olarak hibridizasyonda hedef, metafaz kromozomları yerine cam zemin üzerindeki geniş genomik klonlardır (135).

İlk olarak 1999 yılında Pollack ve arkadaşları tarafından meme kanserindeki gen amplifikasyonlarını ve delesyonlarını saptamak üzere 3360 insan cDNA klonu ile hazırlanan arrayler, KGH için kullanıldı (112). Bu çalışmada array-KGH için kullanılan cDNA klonlarının en büyük dezavantajı, klonların genom boyunca eşit olmayan bir dağılım göstermesiydi ve analiz sadece bilinen genlerdeki değişimleri saptayabilirken, genden zengin olmayan bölgeler dışlanmaktaydı.

Günümüzde ise genomik arraylar, tüm genom boyunca seçilen genomik BAC ve PAC klonlarıyla hazırlanmaktadır. Standart sitogenetik yöntemlerle haploid genom için 500 bant seviyesinde olan çözünürlük, en az 1000 klon, en fazla 3500 klondan oluşan arrayler yardımıyla kromozomal bant başına 7 klon olacak şekilde artırılmıştır.

Array- KGH, genom boyunca yüksek çözünürlükte delesyon ve duplikasyonların analiz edilmesini sağlamaktadır. Çözünürlük, klonlar arasındaki genomik mesafeye ve klonların büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte sağladığı bilgi tamamen insan genomunun fiziksel ve genetik haritasına dayanır. Array- KGH ile 200 kb - 1 Mb'lık genomik değişimler saptanabilir, bu nedenle yakın gelecekte özellikle mental retardasyonlu ve/veya konjenital anomalili olguların tanısında tercih edilen bir yöntem olacaktır (152).

## III. MATERYAL VE YÖNTEM

### III.1. MATERYAL

Çalışmanın materyalini, İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda MKA/MR ön tanısıyla incelemeye alınan, HRBT ile yapılan sitogenetik analizlerde ve telomerik FISH uygulamasında normal kromozom yapısı saptanan olgular (n=10) oluşturdu.

### III. 2. YÖNTEM

#### III.2.1. Aygıtlar

- Laminar Air Flow
- Etüv (Heraeus)
- Zaman ayarlı santrifüj
- Mikrosantrifüj (Heraeus)
- Işık-Floresan Mikroskobu ve 365/480 ve 540/550 dalga boyunda floresan filtreleri (Nikon)
- Inverted mikroskop (Nikon)
- Hassas terazi (Metzler)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Mikropipet (Eppendorf)
- pH metre (Nel pH 890)
- Su banyosu
- Vortex

#### III.2.1.1. Cam ve Plastik Malzemeler

- Lam
- Lamel
- Beher

- Mezür
- Şale
- Santrifüj tüpü
- Pastör pipeti
- Falkon tüpü

### **III.2.2. Stok Solüsyonlar**

#### **III.2.2.1. Periferik Kan Lenfosit Kültür Medyumları**

- Ham's F10 ve RPMI 1640 Medium (Biological Industries)
- Peripheral Karyotyping Blood (Biological Industries)
- Chang MF (Irvine Scientific)

**Medyum Hazırlanması:** Ham's F10 yada RPMI 1640, Peripheral Karyotyping Blood veya Chang MF + %10 ila %20 FCS (Nalgene) + %1 L-Glutamine (Biological Industries) + %1 Penisilin + Streptomisin (Biological Industries) + %1 Fitohemaglütinin (PHA) (Biochrom)

+4°C'da buzdolabında saklanan medyumlar, kullanımdan önce 37°C'lık etüvde ısıtıldı.

#### **III.2.2.2. Kromozom Eldesinde Kullanılan Solüsyonlar**

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

#### **III.2.2.3. GTG Bantlama Solüsyonları**

Bu amaçla kullanılacak solüsyonlar oda ısısında saklanır.

- İzotonik tuz çözeltisi: 9 g NaCl (Merck) + 1000 ml distile su
- Pankreatin çözeltisi: 150 mg pankreatin (Merck) + 100 ml izotonik tuz çözeltisi
- Sörensen tampon çözeltisi : A= 18.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)
- B= 18.96 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)
- A + B + 2000 ml distile su
- Giemsa boya: 5 ml Giemsa (Merck) + 95 ml Sörensen tampon çözeltisi

#### III.2.2.4. 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 distile su
- 1N HCl, %0.5 pepsin: 4 ml 0.25N HCl + 96 ml distile su + 50  $\mu\text{l}$  stok pepsin solüsyonu
- 4xSSC: 20 ml 20xSSC + 80 ml distile su
- 2xSSC: 10 ml 20xSSC + 90 ml distile su
- 1xSSC: 5 ml 20 x SSC + 95 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 absolut etanol (Merck) serisi

#### III.2.2.5. KGH Solüsyonları

- "DNA Isolation Kit for Mammalian Blood" (Roche)
- "CGH Nick Translation Kit" (Vysis)

#### Kit içeriği:

- İki pozitif kontrol örneği
- MPE-600 hücre klonundan elde edilmiş işaretlenmemiş DNA (3 µg)
- SpectrumGreen ile işaretlenmiş MPE-600 DNA (1.5 µg)
- Nick translasyon enzim karışımı (525 µl)
- 10X nick translasyon tampon çözeltisi (300 µl)
- dATP, dCTP, dGTP ve dTTP solüsyonları (her biri 200 µl)
- Nükleaz-free su (1500 µl)
- Human Cot-1 DNA (Vysis)
- %0.01N HCl: 1 ml 1 N HCl (Merck) + 99 ml distile su
- 1N HCl, %0.5 pepsin
- Oda ısısındaki % 70, % 85 ve absolüt etanol serisi
- Tween 20 (III.2.1.2.3'de belirtildiği gibi hazırlandı)
- 20xSSC (Standart Saline Citrate) (III.2.1.2.3'de belirtildiği gibi hazırlandı)
- 2xSSC (III.2.1.2.3'de belirtildiği gibi hazırlandı)
- 2xSSC, %0.05 Tween: 10ml 20xSSC + 90 ml distile su + 50 µl Tween 20 (Sigma)
- 0.4xSSC: 2 ml 20xSSC + 98 ml distile su

#### III.2.3. Periferik Kan Lenfosit Kültürü

(Yöntem, Gosden ve ark.ndan modifiye edilerek uygulandı.) (114)

- Steril olarak santrifüj tüplerine stok olarak hazırlanmış olan Ham's F-10 ya da Chang PB medyumlarından 5'er ml, medyum olarak Ham's F-10 (HF10) kullanıldığında 0.08 ml, Chang PB kullanıldığında ise 0.1 ml (2 damla) PHA ve hastanın heparinize kan örneğinden 0.3 ml (5 damla) konuldu.
- Tüpün ağzı sıkıca kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C'lık etüvde 48 saat inkübe edildi.
- 48. saatte, bu kültürlerle 0.2 ml timidin (filtre ile 3 damla) konularak 37°C'lık etüvde 18 saat daha inkübe edildi.

- 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5 ml ısıtılmış bazal medyum (HF10) ilave edildi ve 3 saat etüvde 37°C'de beklendi.
- 3 saatin sonunda 0.1 ml (yaklaşık 2-3 damla) kolşemid (final konsantrasyonu 0.02 µ/ml) konularak 1 saat daha 37°C'lik etüvde bekletildi.

#### **III.2.4. Kromozom Eldesi**

- Sürenin sonunda kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüpe vorteks eşliğinde 37°C'de ısıtılmış 0.075 M KCl'den (hipotonik solüsyon) 10 ml eklendi ve 7-10 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi.
- Sürenin sonunda 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi
- Süpernatant uzaklaştırılarak vorteks eşliğinde pellet üzerine yavaş damlalar halinde taze hazırlanmış ve buzdolabında bekletilmiş Carnoy fiksatifinden 10 ml eklendi.
- Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, her bir tüpte 0.5 ml dip materyali bırakılarak süpernatant atıldı.
- Bu dip materyali Pasteur pipetle içine hava verilerek iyice karıştırıldı, lamların üzerine yaklaşık 3-4 damla/lam damlatıldı.
- Preparatlar havada kurutuldu.
- Faz-kontrast mikroskopunda preparatlar kontrol edildi.
- Yayma koşulları gerekiyorsa değiştirildi.
- Preparatlar GTG bantlaması yapılmak üzere etüvde eskitildi.

#### **III.2.5. GTG Bantlama**

Teknik, Seabright 1972'den modifiye edilmiştir (E67).

- En az iki gece etüvde (75°C-37°C) eskitilen preparatlar 100-150 saniye arasında pankreatin çözeltisinde tutuldu. Bant kalitesine göre süre belirlendi.

- Preparatlar distile su ile yıkandı.
- giemsa çözeltisinde 5 dakika boyandı,
- iki kere daha distile suda çalkalandı ve kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan preparatlar ışık mikroskobunda kontrol edildi.
- Kromozomlardaki koyu ve açık bantlar iyi ayırt ediliyorsa kalan preparatlar da bantlandı.

#### **III.2.5.1. GTG Bant Analizleri**

- Bantlanan preparatlar Optiphot Nikon veya Zeiss mikroskopta 100'lük objektifle incelendi.
- Her olguya ait 12 metafaz bant analizi (500-650 bant düzeyinde) ile değerlendirildi.
- Analiz edilen metafazların 3-4'ü görüntü analiz sistemi (PSI) ile karyotiplendi.
- 8 metafazda sayı analizi yapıldı.
- Mozaisizm saptanması durumunda olgularda incelenen metafaz sayısı 50-100'e kadar çıkartıldı.

#### **III.2.6. Subtelomerik Probların Kullanımı**

##### **III.2.6.1. Ön İşlem**

- Periferik kan lenfosit kültürü ile elde edilen hücreler lamlara yayıldı.
- Faz kontrast mikroskobunda kaliteli ve yeterli metafaz olup olmadığı kontrol edildi.
- Preparat oda ısısındaki 2xSSC'de 2 dakika bekletildi.
- Oda ısısındaki sırasıyla %70, %85 ve absöüt etanol serilerinde 2'şer dakika dehidrate edildi ve kurumaya bırakıldı.
- Preparat, direkt işaretli kuru prob ve hibridizasyon solüsyonu 37°C'de (hot plate veya inkübatörde) 5 dakika ısınmaya bırakıldı.

- Sürenin sonunda, preparat üzerine 10 µl hibridizasyon solüsyonu konuldu ve prob teflon yüzü altta kalacak şekilde üzerine kapatıldı. Etrafı yapıştırıcı ile iyice kaplandı.
- Yapıştırıcının tamamen kuruması için 37°C'de 5 dakika bekletildi.

### **III.2.6.2. Denatürasyon**

Prob ve hedef DNA 75°C'lik hotplate üzerinde 2 dakika tutularak denatüre edildi.

### **III.2.6.3. Hibridizasyon**

Preparat, 37°C'de nemli ve karanlık bir kutu içinde bir gece bekletilerek hibridizasyon sağlandı.

### **III.2.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar**

- Lamel etrafındaki yapıştırıcı soyulduktan sonra dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Preparat 70°C'lik su banyosunda ısıtılan 0.4xSSC 'de 2 dakika yıkandı.
- Oda ısısında bekletilen 2xSSC solüsyonunda 30 saniye yıkandı.

### **III.2.6.5. Hibrid Sinyallerinin Görüntülenmesi**

- Preparat, 2xSSC solüsyonundan çıkarıldı
- Üzerine 10 µl DAPI-Antifade damlatıldı.
- En az 10 dakika karanlık ve nemli bir kutuda +4°C'de buzdolabında bekletildi.
- Floresan mikroskopunda preparat taranarak uygun metafazlar otomatik görüntüleme sistemi (PSI) sisteminde fotoğraflandı.
- Sinyallerin değerlendirilmesi DAPI bantları ile her kromozom çiftinin telomer sinyalleri değerlendirilebilene kadar metafaz sayısı artırıldı.

### III.2.7. KGH İşlemleri

#### III.2.7.1. Kandan DNA eldesi

Normal bireylerden ve test olgularından 10 ml K<sub>3</sub>EDTA'lı kan örneği alındı. Kan örneklerinden, DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche # 1 667 327 prosedürüne uygun olarak DNA elde edildi.

- 50 ml'lik temiz bir falkon tübüne (polypropylene) 15 ml 'red blood cell lysis buffer' ilave edildi ve üzerine oda sıcaklığına getirilmiş ve hafifçe karıştırılmış 5 ml K<sub>3</sub>EDTA'lı kan aktarıldı. Hafif çalkalama pozisyonunda 15 dakika sallanmaya bırakıldı. Sıvının bulanık kırmızı görünümünden berrak kırmızı görünüme geçmesi beklendi.
- 2300 rpm'de 15 dakika frensiz santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı, kırmızı çökeltinin üzerinde ince bir tabaka halinde lökositler görüldükten sonra kısa süre vorteksle karıştırıldı.
- 2.5 ml 'white cell lysis buffer' eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı ve 37°C'de 15-30 dakika bekletildi.
- Üzerine 1.3 ml protein çöktürme tamponu eklenerek bir dakika kadar karıştırılmaya devam edildi.
- 3800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant, temiz 50 ml'lik bir falkon (polypropylene) tübüne aktarılarak üzerine 2.5 hacim katı % 100 soğuk etanol eklendi ve DNA'nın pamuk yumağı olarak çöktüğü gözlemlendi.
- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tübüne 800 µl % 80'lik etanol eklendi. İçine DNA, bir cam çubuk (steril) ile aktarıldı.
- 5-10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerine % 80'lik etanol aktarılarak çalkalandı ve tekrar 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerine % 100 etanol aktarılarak tekrar 5 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant uzaklaştırıldı ve DNA, tüpün ağzı açık olarak 60°C'de yaklaşık 10 dakika alkolün uzaklaşması için etüvde bekletildi.
- Kuruyan DNA'nın üzerine 400 µl distile su aktarıldı, DNA'nın çözülmesi sağlandı ve -20°C'de bankalandı.

### **III.2.7.2. İzole Edilen DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini**

İzole edilen genomik DNA miktar tayini kantitatif olarak spektrofotometrik ölçümlerle yapıldı.

Bidistile su ile 1/20 oranında seyreltilen örneklerin UV-spektrofotometresinde 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (94).

$$\text{DNA konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{seyreltme oranı}$$

DNA molekülünün saflığı, 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine oranı belirlenerek (OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub>) kontrol edildi (123).

### **III.2.7.3. Nick Translasyon ile Direkt İşaretleme**

"Vysis CGH Nick Translation Kit" kullanılarak, normal ve test olgularından elde edilen DNA'lar, işaretlenerek 50-500 bp büyüklüğünde prob elde edildi. Normal DNA 0.2 mM SpectrumRed dUTP (Vysis) ile kırmızı işaretlenirken, test DNA 0.2 mM SpectrumGreen dUTP (Vysis) ile yeşil işaretlendi.

#### **III.2.7.3.1. Kullanılan Yöntem**

- 2.5 µl 0.2 mM SpectrumGreen veya SpectrumRed dUTP, 10 dNTP mix, 5 µl dTTP, 5 µl 10X nick translasyon tampon çözeltisi, 10 µl nick translasyon enzimi, 1 µg genomik DNA karıştırıldı.
- Toplam hacim distile su ile 50 µl'ye tamamlandı,
- vorteksle karıştırıldıktan sonra kısaca santrifüj edildi,

- 1 saat 15°C'de inkübe edildi,
- süre sonunda prob büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla 9 µl örnek jelde yürütülmek üzere ayrıldı, kalan karışım buzda bekletildi.

#### **III.2.7.3.2. Prob Büyüklüğünün Belirlenmesi**

- Karışımdan alınan 9 µl'ye 1 µl jel yükleme tamponu eklendi. 3 dakika 95°C'de denatüre edildi.
- Prob, 100 mL TAE tampon çözeltisine 1 g agaroz ve 1 µl EtBr eklenerek hazırlanan % 1'lik agaroz jelde marker DNA ile yürütüldü (probun büyüklüğü 50-500 bp uzunluğunda olmalıdır).
- Eğer gerekirse, nick translasyon reaksiyonu yeniden 15°C'de inkübe edildi ve prob büyüklüğü tekrar kontrol edildi.
- İstenilen prob uzunluğu elde edildiğinde buzdaki 50 µl'lik reaksiyon 1 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklenerek durduruldu ve 65°C'de 10 dakika bekletildi.

#### **III.2.7.4. Prob Karışımının Hazırlanması**

- Yeşil ve kırmızı işaretlenmiş problardan 10'ar µl ve 10 µl Cot-1 DNA mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
- DNA'yı çöktürmek için 2.1 µl 3 M sodyum asetat ve 52.5 µl %100 EtOH eklendi. Kısaca vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dakika kuru buz üzerinde bekletildi.
- Pellet oluşturmak üzere 30 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi,
- süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 45 dakika-1 saat oda ısısında kurumaya bırakıldı,
- pellete 3 µl TE eklendikten sonra -20°C'de saklandı.

### **III.2.7.5. Preparatların Hibridizasyona Hazırlanması**

Vysis tarafından hazırlanmış normal metafaz KGH hedef preparatları kullanıldı.

- Preparatlar, 2'şer dakika süreyle oda ısısında bulunan alkol serisinde (%70, %80, %100 etanol) bekletildi ve havada kurutuldu.
- daha sonra 37°C'de su banyosunda bulunan 1 N HCl (50 µl %1lik pepsin / 100 ml) solüsyonunda 10 dakika bekletildi,
- tekrar oda ısısındaki alkol serisinden (%70, %85 ve %100) 2'şer dakika geçirildi ve preparat havada kurutuldu.

### **III.2.7.6. Prob Denaturasyonu**

Prob karışımına 10 µl tampon çözeltisi (22x22 mm'lik alan için) eklendikten sonra 73°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında buzda bekletildi.

### **III.2.7.7. Preparat Denaturasyonu ve Hibridizasyon**

Prob, lamın üzerine konuldu ve üzeri lamel ile kapatıldı. Etrafı yapıştırıldıktan sonra 5 dakika 75°C'lik hot plate üzerinde bekletildi. Ardından nemli ve karanlık kutuya alınarak 3 gece 37°C'lik etüvde bekletildi.

### **III.2.7.8. Yıkamalar**

- Lamel etrafındaki yapıştırıcı soyulduktan sonra dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Preparat 75°C'lik su banyosunda ısıtılan 0.4xSSC'de 2 defa 2'şer dakika yıkandı.
- Oda ısısında bekletilen 2xSSC solüsyonunda 2 defa 2'şer dakika yıkandı.

### **III.2.7.9. Hibrid Sinyallerinin Görüntülenmesi**

- Preparat, 2xSSC solüsyonundan çıkarıldı,
- üzerine 10 µl DAPI-Antifade damlatıldı,

- en az 10 dakika karanlık ve nemli bir kutuda +4°C'de buzdolabında bekletildi,
- floresan mikroskopunda preparat taranarak uygun metafazlar otomatik görüntüleme sistemi (PSI) ile fotoğraflandı.
- DAPI bantları ile her kromozom çiftinin yeşil ve kırmızı sinyalleri değerlendirilebilene kadar metafaz sayısı artırıldı.



## IV. BULGULAR

### IV.1. KGH Uygulamaları

KGH tekniğinin laboratuvarımız koşullarında uygulanabilmesi amacıyla yapılan çalışmalar, sonuçları, karşılaşılan sorunlar ve çözümleri işlemlere göre sınıflandırıldı.

#### IV.1.1. Periferik kandan DNA izolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu kit ile gerçekleştirildi (Roche 1 667 327). Kit protokolünde kuruyan DNA'yı çözmek için TE veya distile su kullanılması önerilmekteydi. Yapılan çalışmalarda, TE tampon çözeltisinin tuz içeriğinin, nick translasyon enziminin aktivitesini zaman zaman etkilediği ve enzim kesiminin gerçekleşmediği görüldü. Bunun üzerine, KGH çalışmalarında kullanılacak olan DNA'nın rutin uygulamalardan farklı olarak TE yerine distile suda çözülmesine karar verildi.

#### IV.1.2. Nick translasyon

Nick translasyon işlemi, test ve normal DNA'nın sırasıyla SpectrumGreen (yeşil) ve SpectrumRed (kırmızı) işaretli dUTP'lerle işaretlenmesiyle, her reaksiyon için paralel olarak gerçekleştirildi.

İlk çalışmada nick translasyon reaksiyonu, firma tarafından (Vysis) önerilen protokole uygun olarak hazırlandı. İşaretleme süresi için firma tarafında önerilen 2-4 saatlik süre yerine laboratuvarımızda uygulanan rutin FISH deneyimlerimize ve literatürdeki aynı kitle yapılan benzer çalışma metodlarına dayanarak 1 saat 15°C'da inkübasyon gerçekleştirildi (16). Daha sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve smear görüntüsü ile inkübasyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi. Ancak sonraki denemelerde bu inkübasyon süresi ile tekrarlanan çalışmada, sonuç alınamaması üzerine sürede tekrar değişiklik yapılmasına karar verildi.

Aynı reaksiyonun, 1 ve 2 saatlik inkübasyonlarla tekrarlanmasının sonrasında beklenen görüntü (smear) elde edilemediğinden enzimle ilgili bir sorun olabileceği düşünüldü. Başka bir firmaya ait (Oncor) nick translasyon enzimi ile inkübasyon tekrarlandı. Bu denemede de beklenen sonuç alınmadığından, sonraki çalışma iki ayrı karışımla ve farklı enzim miktarları eklenerek yapıldı. Birinci karışıma 10 µl nick translasyon enzimi (firmanın protokolünde önerildiği gibi) eklendi. Enzim miktarının fazla olmasının çok küçük fragmentler oluşturabileceği ve bunların da agaroz jel elektroforezinde görülemeyebileceği olasılığı nedeniyle ikinci karışıma 5 µl enzim eklendi. Inkübasyonun 2. ve 4. saatinde her iki karışımdan alınan 9 µl örnek agaroz jelde yürütüldü. Ancak, jelde her iki karışım için de smear görülememesi üzerine sonraki denemede enzim miktarında değil, inkübasyon süresinde değişiklik yapılmasına karar verildi.

Deneme	Enzim miktarı	Inkübasyon süresi	Sonuç
1	10µl (Vysis)	60 dk	Başarılı
2	10 µl (Vysis)	60 ve 120 dk	Başarısız
3	10 µl (Oncor)	60 dk	Başarısız
4	10 µl 5 µl	120 dk ve 4 sa	Başarısız
5	10 µl	30 dk +30 dk	Başarılı
6	10 µl	30, 45, 60 ve 90 dk	Başarısız
Yeni kit			
7	10 µl	60 dk 2, 3 ve 4 sa	Başarılı Başarısız

**Tablo 2.** Nick translasyon işleminde, enzim miktarı ve inkübasyon süresinde yapılan değişiklikler ve sonuçları

Firmanın protokolünde önerildiği gibi reaksiyona 10 µl enzim eklenerek, 30 dakika inkübe edildi 9 µl örnek alınarak jelde yürütüldü. Fragment boyu beklenenden büyük gözüküğünden, inkübasyon süresi 30 dakika arttırıldı. Bu denemede istenen sonuç alındı.

Sonraki iki çalışmada SpectrumGreen (yeşil) ve SpectrumRed (kırmızı) dUTP ile işaretlenen DNA'lardan kırmızı ile işaretleme tüpünden alınan örnekte smear görülürken, yeşil işaretleme tüpünden alınan örnekte smear görülemedi. Bunun üzerine, SpectrumRed dUTP ile 30, 45, 60 ve 90 dakikalık inkübasyon süreleri denendi. Sonuçların stabil olmaması, nick translasyon enzimi ve floresan işaretli dUTP'lerin ışığa ve ısıya karşı oldukça hassas olmaları, kitin bozulmuş olabileceğini düşündürdüğünden yeni kit ve işaretli dUTP sipariş edildi.

Yeni kit ve dUTP'ler aynı örnekle 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon süreleri denendi. 2, 3, 4 saatlik inkübasyon denemelerinde jelde smear görülmedi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında silik de olsa smear görüntülendi. Bunun üzerine daha belirgin smear elde edebilmek için reaksiyondan 9 µl yerine 15 µl örnek alındığında daha net bir sonuç alındı. KGH denemelerinde nick translasyon süresinin 1 saat olmasına karar verilmekle birlikte olgu DNA'sının konsantrasyonu işaretleme süresini etkileyebileceğinden, reaksiyon durdurulmadan örnek alınarak jelde yürütülmesi, alınan sonuca göre gerekiyorsa inkübasyon süresinin arttırılmasının sonuçların başarısı açısından gerekli olduğu sonucuna varıldı.

#### **IV.1.3. Prob karışımının hazırlanması**

<http://cc.ucsf.edu/people/waldman/Protocols/directcgh.htm>'den alınan protokol ve Vysis firmasına ait protokol karşılaştırmalı olarak uygulandı. Vysis protokolü, olgu DNA'sından (yeşil işaretli) 10µl, test DNA'dan (kırmızı işaretli) 5µl, UCSF'e ait olan protokol ise her iki DNA'dan da eşit miktarda reaksiyona sokmayı öneriyordu. Hangisinin laboratuvarımız koşullarına uygun olduğunu anlamak amacıyla her iki protokole uygun prob karışımları hazırlandı.

Vysis protokolüne uygun olarak hazırlanan, prob karışımının kullanıldığı hibridizasyonda, kromozomlar üzerinde yaygın ve spesifik olmayan yeşil sinyaller saptanırken tüm zeminin de boyandığı görüldü. Diğer protokole göre hazırlanan prob karışımı ile yapılan hibridizasyon sonrasında, kromozomlar üzerinde sinyallerin dağılımının tüm metafazlarda olmasa da bazı metafazlarda beklendiği gibi olduğu gözlemlendi, ayrıca preparat zemininde sinyal görülmedi. Bu denemeden

sonraki çalışmalarda UCSF'e ait protokolün önerisi uygulanarak her iki DNA'dan da eşit miktarda kullanılmasına karar verildi.

#### **IV.1.3.1. Spesifik olmayan sinyallerin engellenmesi**

KGH çalışmasında, genomik materyalde yer alan tekrar dizilerinin, arka plan hibridizasyonunu engellenmesi gerekmektedir. Prob olarak kullanılan her iki DNA örneğinde de bulunan tekrar dizilerini baskılamak ve spesifik olmayan prob bağlanmasını engellemek için, işaretlenmemiş tekrar dizilerinden oluşan cot-1 DNA (Vysis), firmanın protokolüne uygun olarak kullanıldı. Olumlu sonuç alınması üzerine uygulamaya devam edildi.

#### **IV.1.4. Hedef metafaz preparatlarının hazırlanması**

İlk olarak, HRBT ile 550/600 bant düzeyinde incelenen ve normal karyotip saptanan erkek bireylere ait, mitotik indeksi yüksek olan periferik kan lenfosit kültürlerinden preparatlar hazırlandı. Yayma aşamasında ortamın nem ve sıcaklık açısından sabit olmasına dikkat edildi. Preparatlar yayma sonrasında faz kontrast mikroskopuyla kontrol edilerek KGH uygulamasına kadar (en fazla 2-4 hafta) oda ısısında ve karanlık ortamda saklandı. Hibridizasyon sonrasında, sitoplazma sorunu nedeniyle prob karışımının preparatın tüm zeminini boyadığı, kromozomların ise sinyal almadığı görüldü. Preparasyonda <http://www.righospitalet.dk/servlet/zipervlet/cgh.zip/cgccgh.htm>de önerildiği gibi; yayma işleminden önce dip materyaline 5 ml fiksatif ilave edilip en az 20 dakika -20°C'de bekletildi. Ancak hazırlanan preparatlarda sitoplazma sorununun devam ettiği görüldü. Bunun üzerine laboratuvarımızın rutin FISH uygulamalarında kullanılan yöntem denendi; taze hazırlanan preparatlar, denatürasyon öncesinde 1-2 saat 70°C'de hot plate üzerinde eskitildi, alkol serileri (%70, 85, 100), %1'lik pepsin solüsyonu ve alkol serilerinde yıkandı. Buna rağmen sitoplazma sorununun aşılamadığı görüldü. Bu sorunun çözümü için, ticari preparatların kullanılmasına karar verildi ("CGH Metaphase Target Slides", Vysis). Hazır preparatlarda sitoplazma sorununun olmadığı ve sinyallerin daha spesifik dağıldığı görüldü. Bu

bulgular, preparatların yayma kalitesinin ve metafaz yoğunluğunun KGH çalışmalarında son derece önemli olduğunu gösterdi.

#### **IV.1.5. Denatürasyon**

Prob DNA'nın hedef DNA ile hibridize olması için ilk koşul, her iki DNA'nın da tek zincirli hale getirilmesi yani denatüre edilmesidir.

##### **IV.1.5.1. Preparatların denatürasyonu**

İlk denatürasyon denemesi Vysis protokolüne uygun olarak taze hazırlanmış preparatlar, 73°C'lik su banyosunda %70 formamid/2xSSC solüsyonunda, 2 dakika denatüre edildi. Ancak, hibridizasyon sonrası metafazların eridiğinin görülmesi üzerine, sürenin kısaltılmasına karar verildi. Rutin FISH çalışmalarında uygulanan 30 sn denatürasyon süresi sonucunda da metafazlardaki erimenin devam ettiği görüldü. Rutin FISH uygulamalarındaki alternatif bir denatürasyon yöntemi denendi; preparatlar 1 ve 2 saat 70°C'lik hot plate üzerinde eskitildikten sonra, alkol serileri, pepsin ve tekrar alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra preparatlar;

- formamid solüsyonunda su banyosunda 2 saniye, 70°C'de tutuldu, ardından soğuk alkol serilerinden geçirildi (-20°C de bekletilen %70, %95 ve %100 etanolde 2'şer dakika)
- paralel olarak preparata prob eklenip lamel ile kapatıldıktan sonra formamid solüsyonsuz, hot plate üzerinde 5 dakika, 75°C'de ısı ile denatüre edildi.

Formamid solüsyonu ile yapılan denatürasyon sonucunda kromozomlar erirken, hot plate üzerinde yapılan denatürasyon sonucunda kromozomların yapılarının bozulmadığı görüldü. Denatürasyon aşamasının bu şekilde (ısı ile) uygulanmasına karar verildi.

#### **IV.1.5.1. Prob denatürasyonu**

Prob denatürasyonu, firmanın protokolünde belirtildiği gibi, 73°C'de 5 dakika inkübasyonla gerçekleştirildi. Herhangi bir sorun yaşanmadığından, prob denatürasyonunun bu şekilde yapılması kararlaştırıldı.

#### **IV.1.6. Hibridizasyon süresi**

Literatürdeki protokollerde hibridizasyon süresi 2 veya 3 gün olarak bildirilmekteydi. Her iki süre, aynı şartlarda hazırlanmış reaksiyonlar sonrasında hibridizasyon açısından denendi. 2 günlük hibridizasyonda, sinyallerin çok net olmadığı görüldü. 3 günlük hibridizasyonda, kromozomlar üzerinde daha net sinyaller alındığından, çalışmaya bu şekilde devam edilmesine karar verildi.

#### **IV.1.7. Hibridizasyon sonrası yıkamalar**

Hibridizasyon sonrası yıkamalar, firmanın protokolüne uygun olarak, 74±1°C su banyosunda 0.4xSSC/%0.2 Tween 20 solüsyonunda 1-3 saniye, ardından oda ısısındaki 2xSSC/%0.1 Tween 20 solüsyonunda 1-3 saniye bekletilerek yapıldı. Analiz sırasında preparat zeminindeki non-spesifik sinyallerin fazlalığı nedeniyle, yıkama süreleri rutin FISH uygulamalarında olduğu gibi, her iki solüsyonda da 2'şer dakika olacak şekilde değiştirildi. Sonuç olumlu olduğundan yıkamaların bu şekilde yapılmasına karar verildi.

#### **IV.1.8. Dijital görüntüleme sistemi**

Metafazlardaki sinyal dağılımı DAPI, FITC ve TRITC filtreleriyle floresan mikroskopunda kontrol edildikten sonra uygun metafazlar CCD kamera ile bilgisayara kaydedilerek, değerlendirme MacProbe KGH programı ile yapıldı. Gerek metafazların denatürasyonu, gerekse floresan mikroskopunun ışık ayarının yarattığı problemler, kaliteli görüntü alınmasını etkiledi.

## V. TARTIŞMA

Genotip ve fenotip arasındaki karmaşık ilişki, bilinen ve olası genetik sendromların fazlalığı ve bazen belli bir gen veya kromozomal defektin etken olduğu fenotip ekspresyonundaki farklılıklar, multipl konjenital anomalili/mental retarde olgularda tanıyı güçleştirmektedir. Fenotip incelemesine dayanarak, belli bir gendeki mutasyonu veya kromozomal anomaliiyi tahmin etmek her zaman olanaklı değildir. Spesifik sendromları düşündüren fenotip bulgularının olmadığı veya aile öyküsünün ipucu vermediği olgularda, genetik nedenin açığa çıkarılması analiz yöntemlerinin duyarlılığına bağlıdır. Kromozom anomalilerini saptamak için en sık kullanılan yöntem, konvansiyonel G bantlama ile yapılan kromozom analizidir. HRB tekniği ile >550 bant düzeyinde yapılan incelemeler ile birçok yapısal kromozom anomalisine tanı konulabilmekle birlikte 5 mb'dan daha küçük boyutlu değişimler atlanabilmektedir (142). Ayrıca bu analizler yüksek kalite ve deneyim gerektirmektedir.

Kromozomların sentromer ve telomer gibi belli bölgelerinin, istenilen gen dizisinin veya tamamının floresan veya antijenik işaretli nükleotidlerle boyanarak tanınmasını sağlayan FISH yöntemi, kromozom anomalilerinin pre- ve postnatal dönemde aydınlatılmasında önemli katkılar sağlamıştır. Bu yöntem ile rutin sitogenetik tekniklerle gösterilemeyen birçok anomali saptanmıştır. Ancak, bu tekniğin, prob seçiminde klinik ya da sitogenetiğin yönlendirici olması gerekliliği ve tüm genomun aynı anda, aynı duyarlılıkla taranamaması nedenleriyle kullanımı sınırlıdır.

FISH ve DNA polimorfizm teknolojilerindeki gelişmeler, MKA/MR olgularında etiyojiiyi aydınlatmak için yeni yaklaşımlar sağlamıştır. VNTR, RFLP veya mikrosatellitlerin kullanıldığı moleküler teknikler ile kromozoma özgü subtelomerik problemlerle yapılan FISH çalışmaları, MKA/MR olgularında etiyojinin aydınlatılmasına katkıda bulunmuştur. GTG bant analizleri ile MKA/MR olgularının yaklaşık %12'sinde kromozom anomalisi saptanırken (28,56), bu yeni tekniklerin

kullanımı ile % 6-18 oranında subtelomerik yeniden düzenlenmeler gösterilmiştir (12,76).

Knight ve arkadaşları 550 bant seviyesinde normal karyotip saptanan 284 ağır mental retarde ve 182 hafif mental retarde olguyu subtelomerik yeniden düzenlenmeler açısından Multiprobe Chromoprobe T System ile incelemişler ve hafif mental retarde olguların %0.5'inde, ağır mental retarde olguların ise %7.4'ünde subtelomerik anomaliler saptanmışlardır (76).

Açıklanamayan MR'lu olgularda, subtelomerik FISH ile yapılan kapsamlı çalışmalardan biri de Rossi ve arkadaşlarına aittir. Çalışmada, 400-550 bant düzeyinde normal kromozom yapısı saptanan 44'ü hafif, 62'si orta ve 55'i ağır mental retarde olmak üzere toplam 200 olgu incelenmiş ve 13'ünde (%6.5) yeniden düzenlenme saptanmıştır. Hafif mental retarde olguların hiçbirinde kromozom anomalisi saptanmazken, orta ağır mental retarde olguların %11.2'sinde (7/62) ve ağır mental retarde olguların %9'unda (5/55) telomerik yeniden düzenlenme gösterilmiştir (122).

Joyce ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 550-850 bant seviyesinde normal karyotip saptanan, açıklanamayan MR'lu, 150'si rastgele ve 50'si seçilmiş olgulardan oluşan toplam 200 olguluk seri, 150 bireyden oluşan kontrol grubuyla birlikte subtelomerik yeniden düzenlenmeler açısından yapılan çalışmada, MR'lu olguların hiçbirinde kriptik telomerik yeniden düzenlenme saptanamazken, kontrol grubunda 2 olguda kriptik telomerik dengesiz kromozom yapısı saptanmıştır. Yazarlar bu sonuçlara dayanarak, kriptik telomerik yeniden düzenlenmelerin açıklanamayan mental retardasyonun önemli bir nedeni olamayacağını, bu düzenlenmelerin genel populasyonda sıkça rastlanan bir bulgu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, kontrol grubunda 2 bireyde saptanan dengesiz yeniden düzenlenmelerin, fenotipi etkilememesini bu bölgelerde az sayıda fonksiyonel gen olması ile açıklamışlardır (62).

Bocian ve arkadaşları, 450-550 bant seviyesinde normal karyotip gözlenen 84 açıklanamamış MR'lu olguda yaptıkları subtelomerik FISH çalışmasında, 9 olguda (%10.7) subtelomerik yeniden düzenlenme saptamışlar ve 450-550 bant

düzeyindeki kromozomlar tekrar değerlendirildiğinde, olguların 6'sında söz konusu anomaliler görülebilmiş, olgular 850 bant düzeyinde değerlendirildiğinde tüm anomaliler sitogenetik olarak görülebilmektedir. Bu bant seviyesindeki kromozom analizinin, yorumlamadaki zorluklar nedeniyle ancak geriye dönük uygulandığında anlamlı olabileceği, tek başına subtelomerik yeniden düzenlenmelerin saptanmasında yetersiz kalabileceği vurgulanmıştır (14).

Hélias-Rodzewicz ve arkadaşları tarafından, açıklanamayan MR olgulu 33 ailede yapılan subtelomerik FISH çalışmasında, 450-550 bant seviyesinde normal kromozom yapısı saptanan 3 olguda (%9.1) subtelomerik yeniden düzenlenme olduğu gösterilmiştir (51).

Tıbbi Genetik BD mızda, 500-550 bant düzeyinde normal kromozom yapısı saptanan MKA/MR lu 30 olguda uygulanan subtelomerik FISH incelemesinde 6 olguda subtelomerik yeniden düzenlenme saptandı (% 20). Bu olgulardan birinin kromozom yeniden değerlendirildiğinde bu anomalinin gözden kaçtığı anlaşıldı.

Literatürde, bildirilen subtelomerik yeniden düzenlenme oranlarının ağırlıklı olarak %3-9 aralığında olmakla birlikte çok büyük farklılıklar (%0.0-23.5) göstermesi, hasta seçim kriterlerinin büyük farklar göstermesi, konvansiyonel sitogenetik yöntemlerdeki farklı bant ve deneyim düzeyleri ile açıklanmaktadır (62).

İlk olarak 1992 yılında Kallioniemi ve arkadaşları (64) tarafından solid tümör dokusunun moleküler analizi için geliştirilen KGH tekniği; farklı renklerle işaretlenen normal ve test DNA'sının, normal metafaz kromozomlarına hibridizasyonlarının ardından dijital görüntüleme sistemi ile floresan yoğunluklarına göre değerlendirilmesi temeline dayanır. Bu tekniğin diğer moleküler ve FISH incelemelerine en önemli üstünlüğü, dengesiz yapısal anomalilerin belirlenmesi için genom boyu taramaya olanak sağlamasıdır. Ayrıca, bu teknik, hücre kültürü ve metafaz preparasyonuna gerek duyulmaması nedeniyle özellikle kanser genetiğinde solid tümörlerin incelenmesinde büyük avantajlar sağlamaktadır (63,64,79,101,102). Fetal doku (koryon villus biyopsi materyali, amniyosit hücreleri, plasenta) örneklerinde olduğu gibi tek hücreden elde edilen DNA (örn. blastomer) materyalinde

teknikinin uygulanabildiği ve hızlı tanı olanakları sunduğu bildirilmektedir (1, 35, 23, 29, 93).

KGH tekniğinin, dengeli yapısal değişimleri saptamada, düşük oranlı mozaisizm olgularında ve sentromerik bölgeler ile akrosentrik kromozomların p kolları gibi heterokromatik tekrar dizilerinden zengin olan bölgelerin değerlendirilmesinde yetersiz kaldığı bildirilmektedir (63). Kallioniemi ve arkadaşları, telomerik bölgelerde de yeşil ve kırmızı floresan yoğunluğunun kademeli olarak azalacağını, floresan yoğunluğunun arka plan floresansına yaklaşmasıyla yanıtıcı oran değişimlerinin ortaya çıkabileceği göz önünde bulundurularak telomerik bölgelerin değerlendirilmesinin doğru olmayacağını bildirmiştir (65).

Kallioniemi ve arkadaşları, KGH tekniği ile ilk olarak 400 bantlık bir karyotipte yaklaşık 1 banda eş gelen 10-20 mb aralığındaki delesyonların saptanabildiğini göstermişlerdir (64). Daha sonra yapılan çalışmalarda, Kirchhoff ve arkadaşları (1999) ile Bentz ve arkadaşları (1998) 5-10 mb'lık, Ghaffari ve arkadaşları ise 4-5 mb'lık değişimlerin saptanabildiğini göstermişlerdir (10,47,69). Piper ve arkadaşları tarafından yapılan bilgisayar analizi ile KGH'nun teorik olarak saptayabileceği değişim ise 2 mb olarak bildirilmiştir (111). Saptanabilecek değişimin büyüklüğü, amplifiye olan bölgenin büyüklüğüne ve o bölgedeki eksprese olan gen sayısına bağlıdır. KGH ile genetik değişimin belirlenebilmesi için etkilenen bölgenin büyüklüğünün en az 10-12 mb olması gerekiyorsa da, daha küçük bölgeleri etkileyen değişimler yüksek oranda amplifiye olmaları durumunda (*1 mb'ın 5-10 fold amplifikasyonu*) saptanabilir. Kopya sayısının 20 katına çıkarılması durumunda 100 kb büyüklüğünde bir ampikonun KGH ile saptanabileceği düşünülmektedir (111).

İlk olarak Kallioniemi ve arkadaşları tarafından solid tümörlerde uygulanan tekniği MKA/MR lu olgularda uygulayan Ghaffari ve arkadaşları, normal karyotipli ve etkilenmiş bireylere sahip 3 aileden 5 olgu ile yaptıkları çalışmada, floresan oranlarının değerlendirilmesinde yaptıkları teknik değişikliklerle, telomerlerde 4-10

mb büyüklüğünde 3 dengesiz yeniden düzenleme saptamış, bunu da ayrıca FISH çalışmasıyla doğrulamışlardır (47).

Joly ve arkadaşları, mental retardasyonlu, dismorfik bulguları olan ve normal karyotipli 17 olguyu *subtle* kromozom yeniden düzenlenmeleri açısından KGH tekniği ile değerlendirmiştir. Çalışmada 7 olguda 5 *subtle* terminal yeniden düzenlenme tespit edilirken intersiyel dengesizlik saptanmamıştır. Saptanan yeniden düzenlenmelerin 4'ü ailevi dengeli translokasyon ürünü iken, 1'inin *de novo* olduğu gözlenmiştir. Bulgular, her kromozomun subtelomerik bölgesine özgü 2 farklı prob setiyle ayrıca doğrulanmıştır (61). Çalışma sonucunda, daha önce Knight ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da gösterildiği gibi, kromozom yeniden düzenlenmesini düşündüren aile öyküsü varlığında, olguların kriptik anomaliler açısından dikkatle incelenmesi gerektiği ortaya konulmuştur (61,75). Ayrıca yaptıkları çalışmada, KGH yöntemi ile Smith-Magenis Sendromu'na neden olan 5mb'lık delesyon saptanırken, 2mb'lık delesyon sonucu oluşan Williams Sendromu'nun saptanamadığını göstermişlerdir.

Fetal ve neonatal taramada saptanan kromozom anomalilerinin çoğunu, tüm veya kısmi anöploidiler oluşturmaktadır. Prenatal dönemde saptanan kromozom anomalilerinin yaklaşık %90'undan anöploidiler, geri kalanından ise dengeli yapısal anomaliler ve poliploidiler sorumludur (86). Lapiere ve arkadaşları, tekniğin duyarlılığına yönelik 71 amniyotik sıvı örneğinde sitogenetik çalışmaya paralel olarak yaptıkları KGH incelemede, 7 sayısal anomalinin tümünü KGH ile de saptamışlardır. KGH ile serideki 3 perisentromerik inversiyonun ise saptanamadığını bildirmişlerdir (86). Aynı ekibin bir başka çalışmasında, dengesiz yapısal anomaliler saptanırken, 1 Prader Willi delesyonu saptanamamıştır (86).

Bryndorf ve arkadaşlarının 11 fetal doku örneğinde yaptıkları KGH çalışmasında, konvansiyonel sitogenetik ile çözülemeyen 7 kompleks dengesiz yapısal anomali aydınlatılmış ve bulunan sonuçlar, FISH çalışmasıyla doğrulanmıştır (19).

Prenatal tanıda KGH yönteminin klasik yöntemlere üstünlüğü, genom boyu taramanın, hücre kültürüne gerek duyulmadan yapılabilmesidir. Interfaz FISH

tekniki ile de kültür edilmemiş hücrelerde anöloidiler hızlı bir şekilde saptanabilse de problemler, sık görülen anöloidilere yol açan bir veya birkaç kromozoma özgü tasarlanmaktadır ve bu da tanınma oranının azalmasına yol açmaktadır.

KGH'nin ilave marker kromozomların kökenini belirlemede ve intersiyel veya terminal olarak gözlenen ekstra G bantları aydınlatmadaki başarısı, Breen ve arkadaşlarının 19 yapısal kromozom anomalili olguda yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir (16). Çalışmada 7 olguda delesyon, 2 olguda intersiyel duplikasyon, 5 olguda terminal bölgedeki ilave bant ve 3 olguda marker kromozomun kökeni aydınlatılmış, dengeli resiprokal translokasyon, biri mozaik iki küçük marker kromozomun yapısının aydınlatılmasında ise yöntem yetersiz kalmıştır. Literatürde KGH ile hücrelerin %50'den fazlasında varolan mozaisizmin saptanabildiği öne sürülse de, bu çalışmada olduğu gibi, hücrelerin %75'inde görüldüğü halde mozaik marker kromozomun kökeni boyutunun küçüklüğü nedeniyle saptanamamıştır (16,142). Küçük marker kromozomların ağırlıklı olarak sentromerik tekrar dizilerinden oluşması, yeşil-kırmızı oran profillerinin sentromerik bölgelerde değişiklik göstermesi, marker kromozomlardaki ökromatik bölgelerin tanınmasını zorlaştırmaktadır (16).

Ness ve arkadaşları, değişik derecelerde psikomotor gelişme geriliği olan, belirgin dismorfik bulguları ve konjenital anomalileri olan/olmayan 66 çocuğu konvansiyonel sitogenetik, KGH ve FISH ile incelediklerinde, konvansiyonel sitogenetik ile normal karyotip gözlenen 5 olguda 1'i subtelomerik olmak üzere yapısal değişimler saptamışlardır. Ayrıca 10 olguda G bantlama ile belirlenen marker kromozomların kökeni ve yapısal yeniden düzenlemeler aydınlatılmıştır (103).

Kırmızı ve yeşil floresan yoğunluk oranının sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan klasik KGH yöntemi ile yoğunlukla konvansiyonel sitogenetik ile saptanan anomalilerin konfirmasyonu yapılmaktadır. 1997 yılında Kirchhoff ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem ile test ve normal örneklerin oran profillerinin istatistiksel değeri hesaplanmış ve anormal örneklerdeki kromozomal artış ve azalmaların saptanması için standart referans aralığı (*standart reference*

*interval*) belirlenmiştir. Bu algoritma ile geliştirilen HR-KGH, klasik KGH'ye oranla daha hassas ve spesifiktir. Bu teknikle 3 mb'lık değişimlerin saptanabileceği bildirilmektedir (70). Ayrıca, klasik KGH ile analiz dışı bırakılan sentromerik bölgeler, 1q12, 9q12, 16q12 gibi heterokromatin ağırlıklı bölgeler, telomerik bölgeler, akrosentrik kromozomların p kolları da başarıyla analiz edilebilmektedir (70).

Kriptik anomalileri saptamada kullanılan M-FISH, SKY ve subtelomerik FISH yöntemleri KGH tekniği ile karşılaştırıldığında;

M-FISH ve SKY gibi kromozom boyamaya dayanan tekniklerin kompleks yeniden düzenlemelerin aydınlatılmasında büyük segmentleri ilgilendiren olaylarda daha duyarlı olabileceği ancak; iş yükü, maliyet, teknik problemler açısından KGH'ye göre daha dezavantajlı olduğu ve daha küçük segmentlerin ve kriptik yeniden düzenlenmelerin tanısında daha başarısız olduğu ileri sürülmektedir (88). Oysa, KGH ile gösterilemeyen dengeli translokasyonlar bu yöntemlerle saptanabilmektedir.

Subtelomerik FISH, telomer bölgelerini ilgilendiren yeniden düzenlemeleri saptamada KGH'ye oranla daha hassastır; 3 mb'nin altındaki delesyonlar saptanabilirken, duplikasyonları saptamada daha az duyarlıdır. Subtelomerik FISH'e göre KGH'nin en büyük avantajı ise subtelomerik bölgelerinin dışındaki anomalilerin de saptanabilmesidir (103).

Kirchhoff ve arkadaşları tarafından yapılan, 500-550 bant düzeyinde normal kromozom yapısına sahip 424 olguyu HR-KGH tekniği ile incelediklerinde, 51 olguda (%12) yapısal kromozom anomalisi saptamışlardır. Bu olgu serisinin, subtelomerik FISH yöntemi ile de incelenen 94 MKA/MR olgusunda toplam 9 anomali saptanmıştır. Bu anomalilerin 6'sı yalnızca HR-KGH yöntemi ile saptanırken, FISH incelemesiyle yalnızca 1 anomali tespit edilmiştir. Her iki teknik ile de gösterilebilen 2 anomali olduğu bildirilmektedir. Saptanan yeniden düzenlenmelerin çoğunluğu intersisyel olduğundan, araştırmacılar söz konusu olguların değerlendirilmesinde, HR-KGH yöntemine öncelik tanınması gerektiğini savunmaktadır (71).

Ailede mental retardasyon öyküsü bulunmayan olgularda, bir kromozoma ait delesyon veya duplikasyonların, dengesiz subtelomerik yeniden düzenlemelere oranla daha sık görüldüğü düşünülmektedir (74). Ayrıca, KGH sonuçlarının değerlendirilmesinde, yöntemin duplikasyonlara oranla delesyonları saptamada daha hassas olduğu göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmektedir (71, 103).

Klasik ve HR-KGH yöntemlerinin yanında, mikrosatellit markerlarla, MLPA ve MAPH gibi moleküler genetik yöntemlerle de genom boyu tarama yapılabilmektedir (81,129).

Koolen ve arkadaşları, açıklanamamış mental retardasyonlu 210 olguyu MLPA tekniği ile subtelomerik bölgeler açısından inceledikleri çalışmada, 10 delesyon ve 4 duplikasyon (%6.7) saptamışlardır (81). Polimorfik markerlar, segmental anözomilerin, özellikle de duplikasyon ve delesyonların saptanmasında kullanılmaktadır (120). Rosenberg ve arkadaşları, Mendeliyen kalıtımın mayotik kökeni araştırmak için hazırlanmış yaklaşık 400 mikrosatellit marker ile normal karyotipli 17 ebeveyn ve multipl konjenital anomalili 11 çocukta genom boyu tarama gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 2 çocukta segmental anozomi bulunmuştur (121).

Son yıllarda geliştirilen genomik arraylar, tüm genom boyunca seçilen genomik BAC ve PAC klonlarıyla hazırlanmaktadır. Standart sitogenetik yöntemlerle haploid genom için 500 bant seviyesinde olan çözünürlük, en az 1000 klondan oluşan arraylar yardımıyla kromozomal bant başına 7 klon olacak şekilde arttırılmıştır. Normal ve HR-KGH'den farklı olarak hibridizasyonda metafaz kromozomları yerine cam zemin üzerindeki geniş genomik klonların kullanıldığı Array-KGH ile genom boyunca yüksek çözünürlükte (200kb -1Mb) delesyon ve duplikasyonların gösterilmesi mümkün olmuştur (135, 152).

Schoumans ve arkadaşları, 2500 klondan oluşan BAC-arraylar ile bilinen 16 kriptik anomali açısından inceledikleri 10 olgunun tamamında kriptik yeniden düzenlenmeleri göstermiş ve BAC klonları ile yaklaşık 1 mb büyüklüğündeki anomalilerin saptanabileceğini öne sürmüşlerdir (125). Son zamanlarda yapılan

mikroarray temelli değişik çalışmalarda da stardart çözünürlüğünün 1-5 mb arasında değiştiği, ekstra klonlarla arrayin genişletilmesi halinde, 40kb'lık çözünürlüğün elde edilebileceği ileri sürülmektedir (43,45,152).

Array-KGH, mozaisizmin söz konusu olduğu durumlarda yetersiz kalması, dengeli değişimleri saptayamaması, klon seğimi ve tekniğin henüz tam olarak standardize edilmemiş olması nedeniyle sorunlara yol açmaktadır. Ancak teknik, yüksek çözünürlüğü ve özgünlüğü ile önümüzdeki yıllarda klinik genetik ve kanser genetiği alanında birçok bilinmeyenin aydınlatılmasına büyük katkılar sağlayacaktır.



## VI. ÖZET

Komperatif Genomik Hibridizasyon (KGH) tekniği, tüm genomu aynı anda delesyon ve duplikasyonlar açısından tarayan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. KGH ile 3 mb büyüklüğündeki genomik değişimlerin saptanması mümkündür. Teknik, hücrelerin kültüre edilmesine gerek kalmaksızın, DNA elde edilebilen her türlü doku örneğinde uygulanabilmektedir. Sayısal anomaliler ve dengesiz yapısal yeniden düzenlemeleri saptayabilen teknik, marker kromozomların kökenin aydınlatılmasını da sağlar

Teknik, test DNA'nın ve normal DNA'nın farklı renklerdeki dUTP'ler ile (sırasıyla yeşil ve kırmızı) işaretlenerek, normal metafaz kromozomlarına hibridize edilmesi esasına dayayır. Hibridizasyon sonrasında uygun metafazlar mikroskopta seçilir. Görüntülemenin ardından kırmızı ve yeşil sinyaller, bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilir.

Mental retardasyon, toplumun %2-3'ünde görülen bir bozukluktur ve olguların %12'sinde etken kromozom anomalileridir. Multipl konjenital anomalilerin etiolojisinde ise kromozom anomalilerine %6 sıklıkla rastlanmaktadır. Sayısal kromozom anomalileri, çoğu zaman fenotipin yönlendirmesi sonucu ve rutin sitogenetik yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Etiyolojide önemli bir kısmı oluşturan yapısal kromozom anomalilerinin tanısında, çoğu zaman klasik bantlama teknikleri yetersiz kalmakta ve High Resolution Bantlama Tekniği (HRBT) ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) gibi tekniklerin uygulanması gerekmektedir. Rutin bantlama teknikleri ile 10 mb'a kadar genomik değişimler saptanabilirken, HRB tekniği ile 5 mb büyüklüğündeki değişimlerin saptanması mümkündür. MKA/MR olgularının etiolojisinin belirlenmesinde FISH tekniği ise, ancak klinik bulgular belli bir sendromu düşündürdüğu zaman sonuca ulaştırabilmektedir.

Bu çalışma ile KGH tekniğinin laboratuvarımızda rutin uygulamada kullanılması sağlandı ve HRBT ve subtelomerik FISH uygulaması ile normal karyotip saptanmış MKA/MR'lu olgular incelendi.

## VII. SUMMARY

Mental retardation can be seen in the general population with a prevalence of %2-3. Chromosomal abnormalities are the cause of %12. In the etiology of multiple congenital abnormalities, chromosomal abnormalities have a prevalence of %6. Numerical chromosomal abnormalities usually can be detected by the help of a clinician or by routine cytogenetic methods. Minor structural chromosomal abnormalities cannot be usually detected by routine cytogenetic techniques and High Resolution Banding Technique (HRBT) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) should be used. With the routine detecting techniques, genomic imbalances up to 10 mb can be detected, whereas HRBT can detect deletions or duplications up to 5 mb.

Comparative Genomic Hybridization (CGH), is a molecular cytogenetic technique which is able to screen the whole genome in order to detect deletions and duplications. With the use of this technique, it is allowed to detect genomic imbalances up to 3 mb. Any type of tissue or cells from which DNA can be isolated can be used in the technique, without the need for cell culture. Numerical abnormalities and unbalanced structural rearrangements can be detected by the technique, and identification of marker chromosomes is also possible.

The aim of this thesis was to use CGH for the routine diagnosis of MCA/MR patients and screen some of them in the thesis work.

## VIII. KAYNAKLAR

1. Alers JC, Rochar J, Krijtenburg P, et al. Universal linkage system: An improved method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 1999;25:301-5.
2. Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G et al: Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet*, 2002; 107: 275-84.
3. Anderson G., Schoroer RJ., Stevenson RE., Mental Retardation in South Carolina II causation. *Proc Greenwood Genet Center*, 1996; 15:32-44.
4. Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):605-9.
5. Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet.* 2000 May;66(5):1684-8.
6. Baker E, Hinton L, Callen DF, Aitree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet.* 2002 Feb 1;107(4):285-93.
7. Barth TF, Benner A, Bentz M, Dohner H, Moller P, Lichter P. Risk of false positive results in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Jul;28(3):353-7.
8. Bauman JGJ, Wiegant J, VanDuijn P: Cytochemical hybridization with fluorochrome-labelled RNA III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. *Histochemistry* 73, 181-193, 1981.
9. Becker JM., Kaveggia EG., Penaleton E., A biologic and genetic study of 40 cases of severe pure mental retardation. *Eur J Pediatr*, 1977; 124:231.
10. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Feb;21(2):172-5.

11. Bhat B., McGee JOD.:Chromosomal assignment of genes in "In Situ Hybridization"; (Polak JM, : McGee JOD., edited) Oxford Univ. Press;Oxford, pp:157-158,1990
12. Biesecker LG, Rosenberg M, Dziadzio L, Ledbetter DH, Ning Y, Sarneso C, Rosenbaum K. Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. *Am J Med Genet.* 1995 Sep 25;58(4):389-94.
13. Blasco MA, Gasser SM, Lingner J. Telomeres and telomerase. *Gen Dev* 1999;13:2353-2359.
14. Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kazmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T. Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit.* 2004 Apr;10(4):CR143-51.
15. Boehringer-Mannheim. Nonradioactive in situ hybridization, Application manual. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica , 1992.
16. Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K, Hegarty AM, Khokhar MT, Power M, Ryan K, Green AJ, Stallings RL. Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. *J Med Genet.* 1999 Jul;36(7):511-7.
17. 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* 126: 32-50, 1983.
18. Bruder CE, Hirvela C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, Zhang XX, Evans DG, Wallace AJ, Baser ME, Zucman-Rossi J, Hergersberg M, Boltshauser E, Papi L, Rouleau GA, Poptodorov G, Jordanova A, Rask-Andersen H, Kluwe L, Mautner V, Sainio M, Hung G, Mathiesen T, Moller C, Pulst SM, Harder H, Heiberg A, Honda M, Niimura M, Sahlen S, Blennow E, Albertson DG, Pinkel D, Dumanski JP. High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 1;10(3):271-82.
19. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet.* 1995 Nov;57(5):1211-20.

20. Caspersson T, Farber S, Foley GE, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968;49:219–22.
21. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970;60:315–9.
22. Chan VTW., Herrington CCS., McGee JOD.:Basic background of molecular biology in "In Situ Hybridization"; (Polak JM, : McGee JOD., edited) Oxford Univ. Press;Oxford, pp:1-14, 1990
23. Christiaens GC, Vissers J, Poddighe PJ, de Pater JM. Comparative genomic hybridization for cytogenetic evaluation of stillbirth. *Obstet Gynecol.* 2000 Aug;96(2):281-6.
24. Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L et al: Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet*, 2002; 107: 267-74.
25. Coleman J., Baird DM, Royle NJ. The plasticity of human telomeres demonstrated by a hypervariable telomere repeat array that is located on some copies of 16p and 16q. *Hum Mol Genet* 1999;8:1637-1646.
26. Costeff H., Cohen BE., Weller LE., Biological factors in mild mental retardation, *Develop Med Child Neuro*, 1983; 25:580.
27. Costeff H., Mental Retardation In: Frank Y., *Pediatric behavioral neurology*. Boca Raton, 1996, CRC Press.
28. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.* 1997 Nov 12;72(4):468-77.
29. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 1998 Apr;13(4):805-9.
30. De Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer MF. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 1997;61:660-7.

31. De Vries BB, Winter R, Schinzel A and van Ravenswaaij-Arts C., Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes *J. Med. Genet.* 2003;40;385-398.
32. Dirks RW, Van Gijlswijk RPM, Vooijs MA, Smith AB, Bogerd J, Van Minnen J, Raap AK, Van der Ploeg M: 3' end fluorochromized and hapteneized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple simultaneous RNA detection. *Exp Cell Res*, 194: 310-315, 1991.
33. Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, et al. A new trisomic syndrome. *Lancet* 1960;i:787– 90.
34. Eichler EE. Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res.* 1998 Aug;8(8):758-62.
35. el-Rifai W, Larramendy ML, Bjorkqvist AM, Hemmer S, Knuutila S. Optimization of comparative genomic hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides. *Lab Invest.* 1997 Dec;77(6):699-700.
36. Evans ED., Carey JC. Etiologic evaluation of children referred for developmental delay. *Clin Res* 1988;36:207A.
37. Fan Y-S, Zhang Y, Speevak M et al: Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med*, 2001; 3: 416-21.
38. Feinberg P, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction enzyme fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137, 266-267, 1984.
39. Flint J, Craddock CF, Villegas A, et al. Healing of human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55:505-12.
40. Flint J, Thomas K, Micklem G, et al. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric repeats. *NatGenet* 1997;15:252-7.
41. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995;9:132-40.
42. Ford CE, Jones KW, Polani PE, et al. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959;i:711– 3.
43. Fuscoe JC. Human chromosome-specific DNA libraries: use of an oligodeoxynucleotide probe to detect non-recombinants. *Gene.* 1987;52(2-3):291-6.

44. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969 Jun;63(2):378-83.
45. Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM. A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet*. 1998 Mar;35(3):225-33.
46. Gottfredson LS., The general intelligence factor. In: *The Brain. The Scientific American Book*, 1999;The Lyons Press, New York.
47. Granzow M, Popp S, Keller M et al: Multiplex FISH telomere assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3; 5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *HumGenet*, 2000; 107: 51-57.
48. Hagberg B., Kyllerman M., Epidemiology of mental retardation, a Swedish survey. *Brain Dev* 1983; 5:441.
49. Helias-Rodzewicz Z, Bocian E, Stankiewicz P, Obersztyn E, Kostyk E, Jakubow-Durska K, Kutkowska-Kazmierczak A, Mazurczak T. Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *J Med Genet*. 2002 Sep;39(9):e53.
50. Hodapp RM., Dyken EM., Mental retardations two cultures of behavioral research. *Am Ment Retar*, 1994; 98(6) : 675-687.
51. Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet*. 2002 Nov;39(11):790-5.
52. Holmes JM, Martin RH. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*. 1993 Mar;91(1):20-4.
53. Holmes LB. Inborn errors of morphogenesis. A review of localized hereditary malformations. *N Eng J Med*, 1974;291 (5):763-773.
54. Hook EB. Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality. *Cytogenet Cell Genet*. 1982;33(1-2):101-6.
55. Hsu TC. Mammalian chromosomes in vitro: I. The karyotype of man. *J Hered* 1952;43:167– 72.
56. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;183:302– 3.

57. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS et al: Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med*, 2003; 5: 28-34.
58. Jeuken JW, Sprenger SH, Wesseling P. Comparative genomic hybridization: practical guidelines. *Diagn Mol Pathol*. 2002 Dec;11(4):193-203.
59. Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana S, Vekemans M, Turleau C. Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet*. 2001 Sep;60(3):212-9.
60. Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet*. 2001 Oct;109(4):440-51.
61. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 1994;10:231-43.
62. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D., Gray JW., Waldman F., Pinkel D. ,1992, Comparative Genomic Hybridisation for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
63. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2156-60.
64. Kessler C, Höltnke HJ, Seibl R, Burg J, Mühlegger K: Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371: 917-927, 1990.
65. Kipling D Cooke HJ, et al. Beginning or end? *Hum Mol Genet*. 1992;1:3-6.
66. Kipling D, Telomerase:immortality enzyme or oncogene? *Nat Genet* 1995;9:104-105.
67. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Aug;25(4):410-3.

68. Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry*. 1998 Mar 1;31(3):163-73.
69. Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Duno M, Kolvraa S, Lundsteen C. Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. *Am J Med Genet A*. 2004 Jun 1;127(2):111-7.
70. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet*. 2001 Nov;38(11):740-4.
71. Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tumer Z, Lespinasse J, Jensen PK, Wirth J, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet*. 2000 Sep;8(9):661-8.
72. 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 Jan-Feb;5(1):1-8.
73. 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 Nov 13;354(9191):1676-81.
74. Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000;37:401-9.
75. Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DLN, Nguyen H, Hudson TJ, Tiethman HC, Ledbetter DH, Flint J. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 2000;67:320-32.
76. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, et al. DNAcopy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999;155:683-94.
77. Koch R., Stricland G., Graliker B., A 17 year longitudinal study of 117 children with mental retardation starting infancy: their present status. *Clin Pediatr*, 1997; 16:1015.

78. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 2004 Dec;41(12):892-9.
79. Langer Pr, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel Nucleic Acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 11: 6633-6637, 1981.
80. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC: Immunological method for mapping genes on drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, :4381-4385, 1982.
81. Lansdorp PM, Verwoerd NP, Van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*, 1996, Vol 5, 685-691
82. Lansdorp PM, Vander Kwast TH, de Boer M, Zeijlemaker WP: Stepwise amplified immunoperoxidase ( PAP ) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *J. Histochem Cytochem* 32, 172-178, 1984.
83. Lapierre JM, Cacheux V, Luton D, Collot N, Oury JF, Aurias A, Tachdjian G. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn.* 2000 Feb;20(2):123-31.
84. 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
85. Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet.* 2001 Apr;68(4):1043-7.
86. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus* 1959;248:1721 – 2.
87. Lestou VS, Desilets V, Lomax BL, Barrett IJ, Wilson RD, Langlois S, Kalousek DK. Comparative genomic hybridization: a new approach to screening for intrauterine complete or mosaic aneuploidy. *Am J Med Genet.* 2000 Jun 5;92(4):281-4.

88. 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* 80: 224-234, 1998.
89. 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.
90. Malmgren H, Sahlen S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridstrom M, Hovatta O, Ahrlund-Richter L, Nordenskjold M, Blennow E. Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Mol Hum Reprod.* 2002 May;8(5):502-10.
91. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York, 1982
92. 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. Mazzarella R, Schlessinger D. Pathological consequences of sequence duplications in the human genome. *Genome Res.* 1998 Oct;8(10):1007-21.
93. Miller Orlando J, Therman E. *Human chromosomes.* 4th ed. Springer-Verlag. New York. 2001
94. Moser HW., Ramey CT., Leonar CO. Mental Retardation. In: Emery AEH, Rimoin DL. *Principles and Practice of Medical Genetics*, 1990, Churchill Livingstone, second ed.
95. Mueller RF., Young ID., *Genetics and Congenital Abnormalities.* In : Emery's *Elements of Medical Genetics*, 1998, Churchill Livingstone, Edinburg, London, tenth ed.
96. Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Lineham P, McKechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 1996; 5:727-35.
97. Muslumanoglu HM, Oner U, Ozalp S, Acikalin MF, Yalcin OT, Ozdemir M, Artan S. Genetic imbalances in endometrial hyperplasia and endometrioid carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 May 1;120(1):107-14.

98. Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, et al. Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;100:93-105
99. Ness GO, Lybaek H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet*. 2002 Nov 22;113(2):125-36.
100. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase components and regulation. *Gen Dev* 1998;12:1073-1085.
101. Opitz JM, Diagnostic/genetic studies in mental retardation. *Postgrad Med*, 1979;66:205
102. Opitz JM, Kaveggia EG, Laxova R, The diagnosis and presentation of severe mental retardation. In: Gerald PS, Nemand H, editors. *Proceedings of the First International Conference on Preventable Aspects of Genetic Morbidity*. Vol II., 1982, Cairo.
103. Pardue, ML.: In *Situ Hybridization in "Nucleic Acid Hybridization"* (Hames, BD.; Higgins, S.J., edited) IRL Press, Oxford-Washington DC; pp 179-202, 1988
104. Passarge E, *Color Atlas of Genetics*, George-Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
105. Patau K, Smith DW, Therman E, et al. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1960;1:790-3.
106. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938, 1986.
107. 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 Jan 1;19(1):10-26.
108. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):41-6.
109. 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*. 197: 319-322, 1991.
110. Rickwood D., Czepulkowski BH., *Human Cytogenetics, Vol 1, A Practical Approach*, Oxford University Press, 1992.

111. Riegel M, Baumer A, Jamar M et al: Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet*, 2001; 109: 286-94
112. 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* 113: 237-251, 1977.
113. Rio M, Molinari F, Heuertz S et al: Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet*, 2002; 39: 266-70
114. Rogan PK, Cazcarro PM, Knoll JH. Sequence-based design of single-copy genomic DNA probes for fluorescence in situ hybridization. *Genome Res*. 2001 Jun;11(6):1086-94.
115. Rooney DE, editor. *Human cytogenetics: constitutional analysis*. New York: Oxford Univ. Press; 2001. p. 99– 127.
116. Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J, Aughton D, Bird LM, Bodurtha J, Cassidy SB, Graham JM Jr, Grix A, Guttmacher AE, Hudgins L, Kozma C, Michaelis RC, Pauli R, Peters KF, Rosenbaum KN, Tifft CJ, Wargowski D, Williams MS, Biesecker LG. Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet*. 2001 Sep;109(3):311-8.
117. Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tifft CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG. Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):419-27.
118. Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Dagna Bricarelli F, Bonaglia M, Bedeschi M, Borgatti R. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet*. 2001 Jun;38(6):417-20
119. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Appendixes. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Book 3, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

120. Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R. New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*. 2001 May 1;44(1):7-15.
121. Schoumans J, Anderlid BM, Blennow E, Teh BT, Nordenskjold M. The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet*. 2004 Mar;41(3):198-202.
122. Schrock E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, du Manoir S, Ried T. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet*. 1997 Dec;101(3):255-62.
123. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494–497
124. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971;2:971–2.
125. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*. 2004 May;23(5):413-9.
126. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu. Rev. Genet*. 2000; 34:297-329
127. Shay WJ, Zou Y, Hiyama E and Wright EW. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001;vol.10, No.7, 677-685.
128. Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet*. 2001 Jul;9(7):527-32.
129. Smith DW, *Recognizable patterns of human malformation*, 1997, WB Saunders, Philadelphia, fifth ed.
130. Smith DW, Simons FER, *Rational diagnostic evaluation of the child with mental deficiency*. *Am J Dis Child*, 1975; 129:1285
131. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to

- screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407.
132. Speed RM, Jounston AW, Evans HJ. Chromosome survey of total population of mentally subnormal in North-East of Scotland. *J Med Genet*, 1976; 13:295
  133. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 1996 Apr;12(4):368-75.
  134. Sternberg RJ, Successful intelligence finding a balance trends in cognitive, *Science* 1999;3:436-442.
  135. Sutherland GR, Murch AR, Gardiner AJ, Cytogenetic survey of a hospital for the mentally retarded. *Hum Genet*, 1976;34:231.
  136. Swaiman KF, Mental Retardation. In: *Pediatric Neurology: Principles and Practice*, 1994, Mosby, St Louis, Baltimore, second ed.
  137. Tachdjian G, Aboura A, Lapierre JM, Viguie F. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann Genet*. 2000 Jul-Dec;43(3-4):147-54.
  138. Tanke HJ, De Haas RR, Sagner G, Ganser M, van Gijlswijk RP. Use of platinum coproporphyrin and delayed luminescence imaging to extend the number of targets FISH karyotyping. *Cytometry*. 1998 Dec 1;33(4):453-9.
  139. 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 Mar 1;42(5):720-3.
  140. Thomas NS, Ennis S, Sharp AJ, Durkie M, Hassold TJ, Collins AR, and Jacobs PA. Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Hum. Mol. Genet*. 2001; 10:243-250
  141. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*. 6th edition. W.B. Saunders company. 2001,
  142. Tjio JH, Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas* 1956;42:1– 6.
  143. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996;64:196-7.
  144. 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 Feb;17(2):173-9.
145. vanKarnebeek CDM, Koevoets C, Sluijter S et al: Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet*, 2002; 39: 546-53
  146. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2002 May;70(5):1269-76.
  147. 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*, 77-85, 1997 .
  148. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genome wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1261-70.
  149. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* 1999 Oct;52(5):243-51.
  150. Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, Vander Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK: In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucl Acids Res*, Vol. 19, No. 12: 3237-3241, 1991.
  151. Wilkie AOM. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1993;53:688-701.
  152. Wilkenson DG (ed) *In situ Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1992.
  153. Willard HF. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet.* 1990 Dec;6(12):410-6.
  154. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003 Feb 15;117(1):15-24.

## IX. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** AYÇA TERZİ

**Doğum Tarihi:** 14.04.1980

**Doğum Yeri:** İstanbul

### **Eğitim:**

1985-1990 Beylerbeyi İlkokulu

1990-1997 Kadıköy Anadolu Lisesi

1997-2002 İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler-Lisans Eğitimi

2002- İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik ABD, Yüksek Lisans Eğitimi

“Multipl Konjenital Anomalili/Mental Retarde Olgularda Mikrodelesyon ve Duplikasyonların Komperatif Genomik Hibridizasyon Yöntemi ile Araştırılması” konulu Yüksek Lisans Tezi

**Yabancı Dil:** İngilizce (iyi), Almanca (orta)