

BAHRIYE ÖYKÜ CANDAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BOY KISALIĞI PATOFİZYOLOJİSİNDE ROL OYNAYAN
SHOX GEN MUTASYONLARININ KLASİK VE GÜNCEL
TEKNİKLERİN KULLANIMI İLE ARAŞTIRILMASI

BAHRİYE ÖYKÜ CANDAN

DANIŞMAN
PROF. DR. BİRSEN KARAMAN

AZİZ SANCAR DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA
ENSTİTÜSÜ
GENETİK

İSTANBUL-2024

İTHAF

Anneme, babama ve kardeşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteğini her zaman yanımda hissettiğim, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Birsen Karaman'a,

Tez çalışmam boyunca moleküler analizlerinde engin tecrübe ve bilgileriyle yardım edip çalışmalarımnda yol gösteren sayın Doç. Dr. Güven Toksoy'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca sevgi ve destekleriyle her daim yanımda olan sevgili Bio. Havva Öztürk, Bio. Nuray Kırmızı ve Tek. Zuhâl Kaplan'a,

Eğitimim boyunca her birinin emeği olan tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına ve arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca her konuda desteği ve sevgisiyle yanımda olan sevgili LL.M. Serhat Engin'e,

En önemlisi de beni her konuda her şekilde destekleyen ve sonsuz sevgisini esirgemeyen kıymetli canım annem Gülten, babam Gürcan ve kardeşim Gürçağ Candan'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı'yla burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2022-39328

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Boy Kısallığı	2
2.1.1. Boy Kısallığına Yaklaşım	3
2.2. Boy Kısallığı Etiyolojisi.....	5
2.2.1. Fizyolojik (Patolojik Olmayan) Boy Kısallıkları	7
2.2.2. Patolojik Boy Kısallıkları.....	8
2.2.2.1. Orantılı Boy Kısallıkları.....	8
2.2.2.2. Orantısız Boy Kısallıkları.....	10
2.3. Boy Kısallığının Genetik Altyapısı.....	11
2.3.1. Kromozom Anomalileri	12
2.3.1.1. Cinsiyet Kromozomları.....	13
2.3.1.2. Cinsiyet Kromozom Anomalileri.....	18
A. Cinsiyet Kromozomu Sayısal Anomalileri	18
B. Cinsiyet Kromozomu Yapısal Anomalileri.....	20
2.3.2. Büyüme Hormonu-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (BH/IGF-1) Ekseninin Genetik Değişimleri	24
2.3.2.1. İzole BH Eksikliği.....	25
2.3.2.2. BH Direnci ve IGF-I Eksikliği.....	25
2.3.3. Büyüme Plağında Yer Alan Genlerin Mutasyonları	26
2.3.3.1. Kıkırdak Hücre Dışı Matrisinin Genetik Kusurları.....	27
2.3.3.2. Hücre İçi Yolların Genetik Kusurları.....	28

2.3.4. The Short-stature Homeobox Gene (<i>SHOX</i>).....	29
2.4. Boy Kısıtlılığı Tanısında Kullanılan Teknikler	34
2.4.1. Sitogenetik Yöntemler	34
2.4.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler	35
2.4.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler	36
2.4.2. Moleküler Yöntemler	38
2.4.2.1. Sanger Dizileme	38
2.4.2.2. Yeni Nesil Dizileme	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Hasta Grubu	41
3.2. Olguların Klinik Değerlendirmesi	41
3.3. Klasik Sitogenetik Yöntemler.....	41
3.3.1. Kültür Aşaması	42
3.3.2. Harvest Aşaması	42
3.3.3. Yayma ve Bantlama Aşaması	43
3.3.4. Analiz	44
3.4. Moleküler Sitogenetik Yöntemler.....	44
3.4.1. FISH İncelemesi.....	44
3.4.1.1. Örneğin Hazırlanması	44
3.4.1.2. Hibridizasyon Aşaması	44
3.4.1.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	45
3.4.1.4. Analiz ve Değerlendirme	45
3.4.2. Array-CGH Çalışması.....	45
3.4.2.1. DNA İzolasyonu.....	45
3.4.2.2. DNA'nın Kesilmesi.....	46
3.4.2.3. Hasta ve Referans DNA'ların İşaretlenmesi	46
3.4.2.4. Pürifikasyon	46
3.4.2.5. Hibridizasyon	47
3.4.2.6. Yıkama	47
3.4.2.7. Tarama ve Analiz	48
3.5. Moleküler Yöntemler.....	48
3.5.1. Ion Torrent Tabanlı Gen Paneli ile Dizileme.....	48
3.5.1.1. Hedef Genlerin Belirlenmesi.....	48

3.5.1.2. Kütüphane Hazırlanması	50
3.5.1.3. Primerlerin Kısmi Olarak Kesilmesi	50
3.5.1.4. Adaptörlerin Bağlanması ve Barkodlama	50
3.5.1.5. Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması	51
3.5.1.6. Taslak Hazırlanması	52
3.5.1.7. Dizileme	54
3.5.1.8. Verilerin Analizi	55
3.5.2. Sanger Dizileme	56
3.5.2.1. Sanger Dizileme için Primerlerin Tasarlanması	56
3.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	56
3.5.2.3. Dizi PZR Reaksiyonu	57
3.5.2.4. Elektroforez Cihazına Yükleme ve Sonuçların Değerlendirilmesi	58
4. BULGULAR	60
4.1. Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Bulgular	61
4.1.1. Sayısal Anomali Saptanan Bulgular	61
4.1.2. Yapısal Anomali Saptanan Olgular	62
4.1.3. FISH İncelemesi ile Saptanan Anomaliler	71
4.1.4. a-CGH ile Saptanan Anomaliler	74
4.2. Yeni Nesil Dizileme Gen Paneli Dizileme Bulguları	76
4.2.1. Sanger Dizileme Sonuçları	77
5. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	98

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Boy kısalığı panel çalışmasındaki genler, kalıtım modelleri ve ilişkili oldukları klinik.....	49
Tablo 4-1: Çalışmada kullanılan teknikler, hasta sayıları, normal ve anormal sonuçların dağılımı.	60
Tablo 4-2: Kromozom analizi, FISH ve a-CGH çalışmalarının sonuçları	61
Tablo 4-3: Gen paneli dizilemesinde saptanan varyant ve olgunun endikasyon bilgileri	76



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Boy kısalığının ACMG sınıflandırması ve ayrıntılı etiyolojik tanı algoritması	6
Şekil 2-2: X ve Y cinsiyet kromozomlarını üzerinde <i>SHOX</i> geni lokasyonunun gösterildiği diagram	12
Şekil 2-3: a) G-bant ile elde edilmiş üç farklı çözünürlükteki X kromozomu b) X kromozomu üzerinde yer alan bazı genler ve yerleşimleri.....	13
Şekil 2-4: Birden fazla X kromozomu bulunan hücrelerde inaktif X kromozomlarının Barr cisimciği görüntüleri.....	14
Şekil 2-5: a) X kromozomu üzerindeki Y kromozomu ile homolog olan bölgeler, b) X ve Y kromozomu üzerindeki psödootozomal bölgeler	16
Şekil 2-6: a)Y kromozomunun kısa (p) ve uzun (q) kolları. b) G-bantlı bir Y kromozomunun şematik gösterimi ve üzerinde bulunan bazı önemli genler	17
Şekil 2-7: Non-disjunction sonucu oluşan cinsiyet kromozomu sayısal anomalileri gösterilmiştir.	18
Şekil 2-8: X kromozomu yapısal anomalileri..	21
Şekil 2-9: Normal X kromozomu ve izokromozom Xq kromozomu görüntüsü	22
Şekil 2-10: Hücre içi büyüme plakasıyla ilişkili gen yolları.....	28
Şekil 2-11: <i>SHOX</i> geni yapısı	29
Şekil 2-12: Xp22.3 ve Yp11.3'te bulunan <i>SHOX</i> geni ve ilişkili olduğu sendromlar	31
Şekil 2-13: Homozigot <i>SHOX</i> delesyonu saptanmış Langer mezomelik displazisi olan olgu görüntüsü (IU ITF, Tıbbi Genetik AD)	32
Şekil 2-14: Madelung deformitesinin oluşumu	33
Şekil 3-1: a-CGH iş akış şeması.	45
Şekil 4-1: Olgu 1’de saptanan 45,X karyotip görüntüsü.	62
Şekil 4-2: Olgu 2’ye ait 46,X,Xp- karyotip görüntüsü.	63
Şekil 4-3: a) <i>SHOX</i> genine özgün proba yapılan FISH incelemesi b) X kromozomuna özgün arm spesifik problemlerle yapılan FISH incelemesi.	63
Şekil 4-4: a) Olgu 3’te saptanan mozaik 46,X,r(X)(p22.1q23) (halka X kromozomu ok işareti ile gösterilmiştir), b) 45,X karyotip görüntüleri.....	64
Şekil 4-5: Olgu 3’te saptanan 46,X,X(r).ish Xp22.3(<i>SHOX</i> x1/ <i>DXZ1</i> x2) FISH görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomunun sentromerini, kırmızı sinyal <i>SHOX</i> genini	

göstermektedir. Halka(X) kromozomunda sentromer için sinyal alınırken <i>SHOX</i> geni için sinyal alınmadı ve genin delesyona uğradığı gösterildi.....	65
Şekil 4-6: Olgu 4'te saptanan 46,X,i(Xq) karyotip görüntüsü. İzokromozom X kırmızı ok ile gösterilmiştir.	66
Şekil 4-7: Olgu 4'te saptanan mos 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX.ish Xp22.3(<i>SHOX</i> x1/ <i>DXZ1</i> x1)/(<i>SHOX</i> x1/ <i>DXZ1</i> x2)/ <i>SHOX</i> x2/ <i>DXZ1</i> x2) FISH görüntüsü. a) <i>SHOX</i> delesyonunun interfaz FISH görüntüsü. b) <i>SHOX</i> delesyonunun metafaz FISH görüntüsü.	67
Şekil 4-8: Olgu 5'in karyotip görüntüsü..	68
Şekil 4-9: Olgu 5'e yapılan a-CGH çalışması görüntüsü	69
Şekil 4-10: Olgu 6'ya yapılan karyotip sonuçlarının görüntüsü. a) 46,X,der(Y) karyotip görüntüsü. b) 47,X,der(Y),+der(Y) karyotip görüntüsü..	70
Şekil 4-11: Olgu 6'ya ait FISH görüntüleri. a) <i>SRY</i> genine özgün proba yapılan FISH incelemesi. b) <i>SHOX</i> genine özgün proba yapılan FISH incelemesi.....	71
Şekil 4-12: Olgu 7'ye yapılan kromozom analizi sonucunda saptanan 46,XY karyotip görüntüsü.	72
Şekil 4-13: Olgu 7'ye <i>SHOX</i> genine özgün proba yapılan FISH incelemesinin interfaz ve metafaz görüntüsü	72
Şekil 4-14: Olgu 8'e yapılan kromozom analizi sonucunda saptanan 46,XX karyotip görüntüsü.	73
Şekil 4-15: Olgu 8'in <i>SHOX</i> genine özgün proba yapılan metafaz FISH görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomunun sentromerini, kırmızı sinyaller <i>SHOX</i> genini işaretlemiştir. X kromozomlarının birinde kırmızı sinyal alınamadı ve <i>SHOX</i> geninde delesyon olduğu gösterildi.	74
Şekil 4-16: a) Olgu 10'a yapılan kromozom analizi sonucu saptanan 46,XX karyotip görüntüsü. b) Olgu 11'e yapılan kromozom analizi sonucu saptanan 46,XY karyotip görüntüsü.	75
Şekil 4-17: a) Olgu 10'a ait a-CGH görüntüsü. Xp22.33 bölgesinde <i>SHOX</i> geni delesyonu gösterilmiştir.....	75
Şekil 4-18: Olgu 13'te <i>SHOX</i> geninde saptanan c.412G>T heterozigot varyantın görüntüsü. a) IGV b) Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü. Varyant ok ile gösterilmiştir.	77

Şekil 4-19: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, annenin (a) ve babanın (b) normal olan elektroferogram görüntüsü. 78

Şekil 4-20: Saptanan p.Glu138* değişimindeki Glu amino asiti, *SHOX* proteini modellemesi üzerinde ok işareti ile gösterilmiştir. 78



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

a-CGH	: Microarray-based Comparative Genomic Hybridization
ACMG	: American College of Medical Genetics and Genomics
BAM	: Binary Alignment Map
bç	: Baz çifti
BH	: Büyüme hormonu
BHE	: Büyüme hormonu eksikliği
CGH	: Comparative Genomic Hybridisation
CNV	: Copy Number Variations
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ddNTP	: Dideoksinükleotid
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
dsDNA	: Double-stranded DNA (çift zincirli DNA)
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
HGMD	: Human Gene Mutation Database
IUBK	: İntrauterin Büyüme Kısıtlılığı
IGV	: Integrative Genomics Viewer
İBK	: İdiyopatik boy kısalığı
Kb	: Kilobaz
LMD	: Langer mezomelik displazisi
LWD	: Léri-Weill diskondroosteozis
MAF	: Minör Allel Frekansı
Mb	: Megabaz
ml	: Mikrolitre
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
PAR	: Psödootozomal bölge
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Standart deviasyon skoru
SGA	: Gebelik yaşına göre küçük doğan bebek
SHOX	: The short-stature homeobox gene
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
TED	: Tüm Ekzom Dizileme
TGD	: Tüm Genom Dizileme
VCF	: Variant Call Format
YND	: Yeni Nesil Dizileme



ÖZET

Candan, B.Ö. (2024). Boy Kısalığı Patofizyolojisinde Rol Oynayan SHOX Gen Mutasyonlarının Klasik ve Güncel Tekniklerin Kullanımı ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Boy kısalığı, genel popülasyonun %2-3'ünde görülen, hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkili olduğu kompleks bir fenotiptir. Boy kısalığı ile ilişkilendirilmiş The short-stature homeobox gene (*SHOX*) geni, X ve Y kromozomlarının psödootozomal bölgesinde (PAR1) bulunan, erken embriyonik gelişim döneminde birçok organın oluşumunu ve üst-alt ekstremitelerdeki kemiklerin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan bir gendir. Geniş varyant spektrumunu bulunan *SHOX* geni defektleri, normalden ağır klinik bulgulara sahip mezomelik boy kısalığına kadar değişken bir fenotip göstermektedir. Bu çalışmada, idiyopatik boy kısalığı tanılı 125 olguda sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler teknikler kullanılarak *SHOX* geninin etiyolojisi araştırıldı. Sitogenetik yöntemlerle yapılan incelemelerde olguların %4,8 (n=6) ve FISH incelemesinde %6,6'sında (n=8) *SHOX* geni delesyonu ile sonuçlanan anomaliler saptandı. Yirmi iki olguda yapılan a-CGH çalışmasında ise olguların %18,18'inde (n=4) bir anomali saptandı. On olguya yapılan boy kısalığı gen-panel testinde bir olguda (%10) *SHOX* geninde c.412G>T heterozigot novel varyant saptandı. Klinik öneme sahip olduğu belirlenen novel varyant Sanger dizileme ile doğrulandı ve aile segregasyon analizi yapılarak varyantın *de novo* oluştuğu saptandı. Boy kısalığı olgularında *SHOX* geni patofizyolojisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmamızın, *SHOX* geninin fenotip-genotip ilişkisini açıklanmasına ve özgün genetik danışma için aydınlatıcı olarak literatüre katkı sağlaması beklenmektedir. Ancak, *SHOX* geni defektlerinin geniş bir fenotipik spektruma sahip olması nedeniyle tüm ekzom veya tüm genom dizileme teknikleriyle, indeks ve ailesinin birlikte bulunduğu olgu havuzunda araştırma yapılmasının çalışmayı ilerletmek açısından doğru bir yaklaşım olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler : *SHOX* geni, boy kısalığı, sitogenetik, yeni nesil dizileme, cinsiyet kromozomları

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2022-39328

ABSTRACT

Candan, B.Ö. (2024). Investigation of SHOX Gene Mutations Playing a Role in the Pathophysiology of Short Stature with the Use of Classical and Current Techniques. İstanbul University Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Genetic. Master of Degree Thesis. İstanbul.

Short stature (SS) is a complex phenotype that occurs in 2-3% of the general population. The short-stature homeobox gene (*SHOX*) gene is located in the pseudotosomal region (PAR1) of the sex chromosomes and plays an important role in the formation of many organs during early embryonic development and in the growth of bones in the upper and lower extremities. Defects in the *SHOX* gene, which has a wide variant proband, show a variable phenotype ranging from normal to mesomelic short stature with severe clinical findings. In this study, we investigated the etiology of the *SHOX* gene in 125 patients with idiopathic SS using cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular techniques. Anomalies in *SHOX* gene deletion were found in 4.8% (n=6) by cytogenetic methods and 6.6% (n=8) by FISH. In a-CGH study performed in 22 cases and 18.18% (n=4) with anomaly. In the gene-panel sequencing of SS performed in ten patients, a c.412G>T heterozygous *novel* variant in the *SHOX* gene was detected in one case (10%). The *novel* variant was confirmed by Sanger sequencing and with family segregation analysis that the variant occurred *de novo*. Our study, which was conducted to investigate the pathophysiology of the *SHOX* gene in cases of SS, is expected to contribute to the literature by explaining the phenotype-genotype relationship of the *SHOX* gene. However, since *SHOX* gene defects have a wide phenotypic spectrum, it was concluded that it would be the right approach to advance the study by using next generation sequencing techniques.

Key Words: SHOX, short stature, cytogenetics, Next-Generation Sequencing, sex chromosomes

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TYL-2022-39328

1. GİRİŞ VE AMAÇ

The short-stature homeobox gene (*SHOX*) geni, X ve Y kromozomlarının p kolu terminal bölgesinin psödootozomal bölgesinde (PAR1) lokalize, geniş bir homeobox gen ailesinin parçasıdır. *SHOX* geni, SHOXa ve SHOXb proteinlerini (sırasıyla 292 ve 225 amino asit) kodlayan iki farklı izoforma eksprese olan yedi ekzondan oluşur. *SHOX* geninin özellikle üst ve alt ekstremitelerdeki kemiklerin büyümesinde ve olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, ayrıca, erken embriyonik gelişim döneminde birçok organın oluşumunu ve büyümeyi kontrol ettiği bilinmektedir.

Bu genin tek ya da her iki kopyasının kaybı, farklı büyüklükteki delesyonları, *SHOX* geninin düzenleyici elemanlarında meydana gelen kopya sayısı varyasyonları (CNVs) ve DNA ya da gen düzeyindeki mutasyonları bazı genetik hastalıklarla ilişkilidir. *SHOX* geni haplo yetmezliğinin neden olduğu diğer bir durum idiyopatik boy kısalığıdır (İBK). Bu genin mutasyonları ile ilişkili Madelung deformitesi ile karakterize mezomelik boy kısalığı sendromu olarak da bilinen Léri-Weill diskondroosteozis (LWD) fenotipinin oluşumundan *SHOX* haplo yetmezliğinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Daha ağır klinik bulgularla seyreden diğer bir hastalık olan Langer Mezomelik Displazisi (LMD), *SHOX* geninin her iki kopyasının kaybıyla ortaya çıkmaktadır.

SHOX defekti olan bireyler, normalden LWD'ye kadar değişken bir fenotipe sahiptir. Fenotipik farklılıklar ile ilgili birçok hipotez öne sürülmüştür, ancak *SHOX* ve kodlama bölgesindeki defektler arasındaki birleşik oran ve fenotipik ilişkiler tam olarak açıklanamamıştır. Aynı ailedeki aynı mutasyonda bile oldukça değişken fenotipler gözlenmektedir. Bu nedenle, fenotipik farklılıkların nedenini belirlemek için *SHOX* geni ve ilişkili gen ve yolak defektleri ile ilgili ayrıntılı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında idiyopatik boy kısalığı bulunan bulgulara karyotip analizi, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Array tabanlı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (a-CGH), Yeni Nesil Dizileme (YND) tekniği olarak boy kısalığı ile ilişkili olduğu bilinen genlerin bulunduğu panel gen tekniği ve Sanger dizileme teknikleri sırasıyla kullanılarak, *SHOX* geni defektlerinin genotip-fenotip korelasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boy Kısalığı

Büyüme, birçok geni içeren ve kalıtım, hormonlar, beslenme ve çevreden etkilenen karmaşık bir süreçtir. Boy kısalığı, bireyin boyunun belirli bir yaş, cinsiyet ve nüfus grubuna göre ortalama boya göre 3. persentilde olması durumu olarak tanımlanır. Standart büyüme eğrileri, bir popülasyonda yaş ve cinsiyete bağlı gözlenerek oluşturulan ortalama değerlerdir. [1]

Boy kısalığının değerlendirilmesinde genetik potansiyel, büyüme hızı ve büyüme paterni başta olmak üzere incelenmesi gereken birden çok faktör vardır. Büyüme hızının belirlenmesi, boy kısalığının değerlendirilmesi açısından güvenilir bir göstergedir. Önceki büyüme noktaları ile 4-6 aylık kontrollerdeki ölçümlerin değerlendirilerek büyüme hızı ideal olarak belirlenir. Boy kısalığının başlangıç zamanı, boy kısalığının sınıflandırılıp değerlendirilmesi açısından önemlidir. Çocuklarda kısa boy, genetik ve genetik olmayan faktörler dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. [2] Hussein ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmaya göre (2017) Mısır'da boy kısalığının en yaygın nedeni yapısal büyüme ve ergenlik gecikmesiydi. [3] Erkeklerde boy kısalığının en sık nedeni yapısal büyüme geriliği iken, kadınlarda boy kısalığının en sık nedeni ailesel boy kısalığıdır. Patolojik tanı, 3 yaş ile geç çocukluk arasındaki büyüme çizgilerin birleşmesi durumunda düşünülebilir. Açıklanamayan boy kısalığı olan çocuklar için, özellikle genetik bir sendromu düşündüren başka klinik özellikler varsa, genetik değerlendirme önerilir. Büyük ölçekli dizileme çabaları, boy kısalığının genetik etiyolojilerini hızlı bir şekilde belirleme potansiyeline sahiptir, ancak veri yorumlaması karmaşıktır. [4,5] Noonan sendromu, boy kısalığının yetersiz teşhis edilen bir nedeni olabilir. Natriüretik peptid reseptörü-B genindeki (NPR2) heterozigot mutasyonların da boy kısalığının bir nedeni olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca diğer büyüme parametreleri olan ağırlık ve baş çevresinin analizi, büyüme modelinin oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Hedef boy, kişinin genetik potansiyelini gösterir. [6]

$$\text{Kız çocuk için hedef boy} = \frac{(\text{Anne boyu} + \text{Baba boyu}) - 13}{2} \pm 7$$

$$\text{Erkek çocuk için hedef boy} = \frac{(\text{Anne boyu} + \text{Baba boyu}) + 13}{2} \pm 7$$

Vücut oranlarının analizi, boy kısalığının orantılı ya da orantısız olması hakkında fikir vermektedir. Kemik yaşı, kemik yaşının gecikmesine rağmen iskelet gelişimi, kol açıklığı-boy oranı ve üst-alt segment oranı gibi ölçümlerin analizi, boy kısalığının birçok farklı nedeni ile ilişkilidir.

2.1.1. Boy Kısalığına Yaklaşım

Kısa boy, belirli yaş ve cinsiyet için ortalama boyun eksi iki standart sapma altında olması olarak tanımlanmaktadır. Boy kısalığına yaklaşımın doğru uygulanmasıyla beraber etiyolojik nedenlerin de aydınlatılması amaçlanmaktadır. Boy kısalığının değerlendirilmesi için, kapsamlı bir tıbbi öykü, fizik muayene ve laboratuvar testlerinin sorgulanması gerekmektedir. Tıbbi öykü; ayrıntılı bir aile hikayesi, büyüme çizelgeleri ve kemik yaşı değerlendirmesini içermelidir. Belirgin boy kısalığı (boy <-2 SD) olan bireydeki fizik muayenede yüz dismorfizmi, iskelet anormallikleri, zihinsel yetersizlik, mikrosefali, çoklu hipofiz hormonu eksikliği, ciddi büyüme hormonu eksikliği, kalıcı boy kısalığı olan ve gebelik yaşına göre küçük doğan (SGA), ailede akrabalık öyküsü ve aile öyküsü akrabalarının boy uzunlukları ile beraber sorgulanmalıdır. [1]

Antenatal ve natal öykünün sorgulanması, doğum tartısı, doğum boyu ve baş çevresi hastanın başvurduğu dönemdeki ölçülerinin alınarak karşılaştırılması gerekmektedir. Gebelik dönemindeki dış etkenler, teratojenler göz önünde bulunarak bu nedenler dışlanmalıdır. Boy kısalığının prenatal ya da postnatal başlangıçlı olduğu tespit edilmeli ve hikaye doğru alınmalıdır, bu boy kısalığına yaklaşım açısından değerlidir.

Yapılan çalışmalarda, SGA olgularının, doğum ağırlığı 25.-75. persantilde bulunan olgulardan önemli ölçüde daha düşük yetişkin boyuna sahip olduğunu ve daha düşük doğum ağırlığı ve daha kısa gebelik yaşı olan SGA deneklerinde erişkin boy kısalığı riskinin arttığını bulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, antenatal ve natal dönemde boy kısalığına yaklaşım, fetal büyümenin dikkatli bir şekilde izlenmesini ve intrauterin büyüme kısıtlılığı (IUBK) ve SGA için risk faktörlerinin belirlenmesini içermelidir. Ek olarak, IUBK ve SGA'nın erken teşhisi ve yönetimi, boy kısalığı da dahil olmak üzere uzun vadeli sağlık sonuçlarının önlenmesine yardımcı olabilir. Çalışma ayrıca, SGA deneklerinde yetişkin boy kısalığı riskini belirlemede ebeveyn, yenidoğan ve gebelikle ilgili parametrelerin önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle

antenatal ve natal dönemde boy kısalığına yaklaşımda bu faktörlerin kapsamlı bir değerlendirmesi yer almalıdır. [7]

Ailede benzer öykü olup olmadığı, psikososyal çevre, beslenme öyküsü, sosyo-ekonomik durumu ve ilaç kullanımları göz önünde bulundurulmalıdır. Boy kısalığı postnatal dönemde başlamışsa hastalık öyküsü, kronik ilaç, özellikle kortikosteroid kullanımı, beslenme öyküsü, psikososyal çevre, ailenin sosyo ekonomik durumu, ailedeki puberte başlama yaşları ve ailede benzer öykünün olup olmadığı detaylı bir şekilde öğrenilmelidir.

Boy kısalığı şüphesi ile yaklaşılan olguya ayrıntılı fizik muayene yapılmalıdır. Güncel boy, tartı, beş yaşına kadarki baş çevresi ve vücut oranları kaydedilmelidir. Bulunan bulgulara göre çeşitli sorunlar düşünülebilir. Endokrin bozuklukları, kronik hastalıklar, malnütrisyon, psikososyal sorunlar, büyüme hormonu (BH) eksikliği, hipotiroidi gibi altta yatan sebepler düşünülmelidir. Yetersiz beslenme, kronik hastalıklar ve endokrin bozukluklar gibi genetik olmayan faktörler de boy kısalığına neden olabilir. Örneğin, büyüme hormonu eksikliği (BHE) boy kısalığının yaygın bir nedenidir ve rekombinant insan büyüme hormonu (r-hGH), BHE olan çocukları ve ergenleri tedavi etmek için kullanılır. Fizik muayenede ek olarak dismorfik bulgulara da dikkat edilmelidir.

Yapılan tetkikler sonuç verme açısından ya da boy kısalığı etiyolojisini açıklama açısından yetersiz kalırsa, laboratuvar tetkikleri ile desteklenmelidir. Kemik yaşının kronolojik yaş ile uyumluluğu, birçok fikir vermektedir. Gecikmiş kemik yaşı, kronik hastalıkların, boy kısalığının, psikolojik faktörlerin, endokrin nedenlerin ve yetersiz beslenmenin bir işaretidir. Kan sayımı, tam idrar tahlili ve diğer biyokimyasal tetkikler kronolojik hastalıklar açısından fikir verebilmektedir. İskelet grafileri, iskelet displazileri açısından vücuttaki orantısız bozuklukları açıklamak için önemlidir. Hormon tayinleri yapılarak bazı sendromlar dışlanabilmektedir. Bir sonraki aşama olarak genetik testler önerilmektedir. İskelet radyografileri vücuttaki orantısız anormallikleri anlamak için gereklidir. Bazal ve günlük kortizol seviyeleri de değerlendirilmelidir. Düşük IGF-1 değerleri, Laron sendromu gibi BH dirençli hastalıkların dikkate alınmasını gerektirir. Kan sayımı, tam idrar tahlili ve diğer biyokimyasal tetkikler kronolojik hastalıklar açısından fikir verebilmektedir. İskelet grafileri, iskelet displazileri açısından vücuttaki orantısız bozuklukları açıklamak için

önemlidir. Hormon tayinleri yapılarak bazı sendromlar dışlanabilmektedir. Bir sonraki aşama olarak genetik testler önerilmektedir. [1]

Antenatal dönemde boy kısalığı, düşük doğum ağırlığı ve *IGF1R* genindeki mutasyonlar gibi genetik faktörler gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Uygun yönetim ve tedaviyi sağlamak için doğumda boy kısalığının altında yatan nedeni belirlemek önemlidir. Kısa boy için monogenik bir nedeni düşündüren aşağıdaki özelliklere sahip hastalar için klinik ekzom dizilimi ile daha ileri testler ve tıbbi genetiğe sevk düşünülmelidir.

2.2. Boy Kısalığı Etiyolojisi

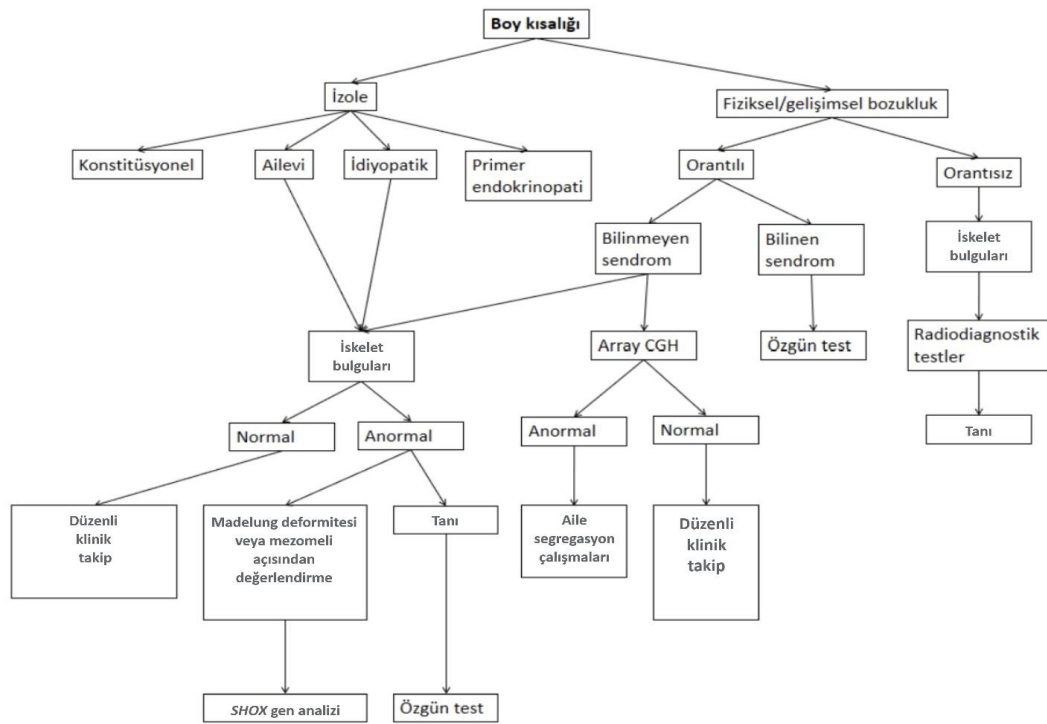
Boy kısalığı, özellikle pediatrik değerlendirilmede yaygın bir başvuru sebebidir. Boy kısalığı, çocukların %2-3'ünü etkileyen önemli bir tıbbi sorundur. Boy üzerinde, yirminci yüzyıl boyunca ortalama boydaki dünya çapındaki artışla ilgili olabilecek açıkça çevresel etkiler olsa da, farklı etkenlerin de boy değişimi üzerinde büyük bir etkisinin olduğu bilinmektedir. Boy kısalığının sebebi olarak altta yatan kronik bir hastalığın klinik prezentasyonu olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Değerlendirme sürecinde dikkat edilmesi gereken potansiyel sebepler arasında ailesel boy kısalığı, yapısal büyüme geriliği, endokrinopatiler ve genetik bozukluklar yer almaktadır. Boy kısalığı tanısı için belirlenen bu kategoriler birbirini dışlamazlar. Ek olarak, vakaların %70'i, büyüme bozukluğunu açıklayacak ve boy kısalığı ile ilişkilendirilecek klinik ya da laboratuvar kanıtı bulunmayan, idiyopatik boy kısalığı olarak tanımlanmaktadır.

Hyo-Kyoung Nam (2018) tarafından, SGA doğan çocukların yaşam boyu birçok sorunla karşılaştıkları ve bir dizi kronik hastalığın belirtilerinin doğum öncesi dönemde ortaya çıktığı bildirilmiştir. [7] Düşük doğum ağırlığı genellikle kısa boy da dahil olmak üzere uzun vadeli sağlık sonuçlarına yol açabilen IUBK ile ilişkilidir. IUBK, SGA'nın yaygın bir nedenidir ve yaşamın ilerleyen dönemlerinde boy kısalığı ve diğer sağlık sorunları riskinin artmasıyla ilişkilidir. Buna ek olarak, Gluckman ve Hanson (2004), fetal yetersiz beslenme ve büyüme kısıtlamasının, besin kullanımı ve depolanmasının etkinliğini artıran adaptasyonlara yol açabileceğini, ancak aynı zamanda yaşamın ilerleyen dönemlerinde metabolik bozukluk riskini artırabileceğini öne süren "tutumlu fenotip hipotezi"ni öne sürdüler. Bu hipotez, doğum öncesi dönemde kısa boy etiyolojisinin, uzun vadeli sağlık sonuçlarına yol açabilecek fetal

yetersiz beslenme ve büyüme geriliği ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca genetik faktörler de boy kısalığı gelişimine katkıda bulunabilir. [8]

Antenatal dönemde boy kısalığı, düşük doğum ağırlığı, *IGF1R* genindeki mutasyonlar gibi genetik faktörler gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Uygun yönetim ve tedaviyi sağlamak için doğumda boy kısalığının altında yatan nedeni belirlemek önemlidir.

Boy kısalığının etiyolojisinde ailesel boy kısalığı, yapısal büyüme gecikmesi, endokrin bozukluklar, genetik bozukluklar ve kronik hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli altta yatan bozukluklar yer almaktadır. Şekil 2-1'de görüldüğü gibi, boy kısalığı fizyolojik ve patolojik olarak iki ana kategoride sınıflandırılır ve alt kategorilere ayrılır. [9]



Şekil 2-1: Boy kısalığının ACMG sınıflandırması ve ayrıntılı etiyojik tanı algoritması [103]

2.2.1. Fizyolojik (Patolojik Olmayan) Boy Kısallıkları

Konstitüsyonel ya da yapısal boy kısallığı, boy kısallığı dışındaki diğer muayene bulguları normal, doğum boyu ve tartısı da normal standart içinde olan ve 3-4 yaşına kadar genellikle büyümesi normal izlenen olgulardır. Daha sonra kemik yaşı geri olan, vücut ağırlığı ve boyu giderek 3. persantilin altına düşen çocuklar, konstitüsyonel büyüme/gelişme gecikmesi kategorisine dahil edilmektedirler. Bu olgularda geçici fonksiyonel hipopituitarizm olduğundan “tembel hipofiz” olarak da tanımlanmaktadır. Kemik yaşı, kronolojik yaşa göre ortalama 2 sene geriden takip eder. Üst/alt segment oranları, iskelet maturasyonundaki gecikmeyle ilişkili olarak normalden yüksektir. Pubertal başlangıç, kemik yaşı ile korelasyon gösterdiğinden, gecikmiş puberte görülür. Bu olgularda puberte başladıktan sonra pubertal progresyon normal hızda tamamlanır ve erişkin boyu normal değerlere ulaşması beklenir. Ailede benzer büyüme gecikme öyküsü görülebilir. Tanısı için yapılan büyüme hormonu testleri sonucunda BHE ve hipogonadotropik hipogonadizmden ayırt edilmesi güç olabilir. Ancak konstitüsyonel boy kısallığının en belirgin özelliği boy uzamasındaki yavaşlamanın prepubertal dönemde başlamasıdır. [1]

Ailevi boy kısallığı, anne ve/veya babanın boyunun kısa olduğu (<3 persantil), genellikle tanımlı genetik anomalisi bulunmayan ailesel formlardır. Tüm boy kısallıklarının ortalama %40'ını oluşturur. Ailevi boy kısallığı olgularında, ortalamadan düşük büyüme eğrisi olsa da büyüme hızları normal büyüme eğrisine paraleldir. Fizik muayene bulguları, vücut oranları, boy ve tartı oranları, pubertal gelişim ve kas oranları ailevi boy kısallığı olgularında normaldir. Kemik yaşı kronolojik yaşa paraleldir, sonuç olarak nihai boy prognozu hedef boy potansiyeli için, kısa da olsa uyumludur. [10]

Etiyolojik nedeni aydınlatılamamış ve 3. persantilin altındaki boy kısallığı bulunan olgulara, idiyopatik boy kısallığı (İBK) tanısı konulmaktadır. Ailevi boy kısallığı bulunan olgularda da eğer altta yatan patolojik sebep saptanamazsa ve olgunun bulguları BH tedavisi gerektirirse, bu olgular da İBK olarak tanımlanmaktadır. İBK tanısında vücut oranları, doğum ağırlığı ve kilosu, beslenmesi, endokrin sonuçları normal olması, büyüme hızı normal ya da normalin alt sınırında bulunması, kronik hastalık bulgusu olmaması gerekli ölçütlerdir. İBK olgularının tedavisi için farklı görüşler bulunsun da, kısa boyun yaratabileceği psikososyal ve ekonomik etkilerini en aza indirmek açısından 2003 yılında FDA tarafından BH tedavisi onaylanmıştır. [11]

2.2.2. Patolojik Boy Kısallıkları

Patolojik boy kısallıkları, -3 SD veya 1.persantilin altında olan ve yıllık büyüme hızları normal değerlerin altında olan olguları kapsamaktadır. Tüm boy kısallıklarının ortalama %20'sini oluşturmaktadır. Patolojik boy kısallığına yol açacak çok sayıda etken olduğundan, birçok alt kategorisi bulunmaktadır ve orantılı ve orantısız boy kısallıkları olmak üzere iki geniş başlık altında incelenmektedir. [12]

2.2.2.1. Orantılı Boy Kısallıkları

Orantılı boy kısallığı, üst/alt ekstremitelerin oranı ve kulaç-boy farkı normal sınırlarda olan olgular için kullanılan bir tanımdır. Doğumdaki alt/üst ekstremitte oranı gittikçe azalan ve kulaç-boy farkı gittikçe artan değerlerdedir. Orantılı boy kısallığına yol açan nedenler prenatal ve postnatal olarak ayrı başlıklarda incelenmektedir.

A. Prenatal Başlangıçlı Orantılı Boy Kısallıkları

1) İntrauterin büyüme kısıtlılığı (IUBK, SGA): Gestasyon yaşına göre küçük bebek (SGA), yaşına göre -2 SD'den düşük olan çocukları tanımlamaktadır. İntrauterin büyüme kısıtlılığı (IUBK) ise, 26. gestasyon haftasından önce alınan en az 2 ölçümle yavaşlayan fetal büyümenin gösterilmesi olarak tanımlanmaktadır.

IUBK ve SGA terimleri eşdeğer sayılamaz, çünkü her IUBK olgusu SGA doğmaz ve her SGA olgusu da IUBK değildir. Maternal, fetal ve plasental olmak üzere SGA'nın birçok nedeni bulunmakla beraber, birçoğu da idiyopatiktir. SGA'lı çocuklar, ilk 2-3 yılda %80-85 oranda büyümede standartı yakalarlar. Ancak SGA olarak doğan olguların %10-15'i beklenen sıçramayı yapamaz, ve boy kısallığı tanısı alır. Preterm dönemde teratojen ve ilaç kullanımının, doğumda boy ve baş çevresinin standart altında olmasıyla beraber IUBK-boy kısallığı birlikteliğine neden olması beklenmektedir. Bu olgularda doğumsal anomali ve bilişsel gerilik sıklığı yüksektir.

Term SGA'lara göre preterm SGA'ların büyüme yakalaması daha geç olur. SGA olgularda kemik yaşı ve kronolojik yaş uyumlu olmakla beraber, genetik potansiyeline göre boy kısadır.

2) Bazı genetik anomalilerin büyüme üzerinde belirgin etkileri olmakla beraber, ilk klinik bulgularını boy kısallığı olarak gösterebilmektedir. Özellikle X ve Y kromozomlarının kısa kolunun PAR1 bölgesinde bulunan *SHOX* geninin mutasyonları ve delesyonları, büyümeyi etkileyen en önemli nedenlerdendir. Short Stature Homeobox

(*SHOX*) geni mutasyonları, Madelung deformites, Leri-Weill Diskondrosteozu ve Langer Mezomelik Displazi (LMD) sendromları ilişkilidir ve iskelet malformasyonları dahil olmak üzere ciddi displazilere ve boy kısalığına neden olmaktadır. Dismorfik bulgularla seyreden en önemli sendrom ise Turner sendromudur. Sıklığı 1/2500 kız doğum olan ve X kromozomlarından birinin tam veya kısmi yokluğu ile karakterize Turner sendromunun en belirgin bulgusu 3. persantil altında olan boy kısalığıdır. Düşük doğum tartısı ve ağırlığı, yavaş büyüme ve gonadal disgenezi sebebiyle pubertel büyüme görülmez. [13] Klinikte en sık görülen boy kısalığıyla ilişkili diğer sendromlar: Down sendromu, Prader-Willi sendromu (PWS), Russel-Silver sendromu (RSS) ve Noonan sendromu. [14,15]

B. Postnatal Boy Kısalıkları

1) Endokrin nedenler, geniş çaplı incelenmesi gereken hormonal bozukluklardır. Büyüme üzerinde ciddi önemi olan büyüme hormonu, tiroksin hormonu büyümeyi hızlandırıcı etki ederken, kortizol büyümeyi baskılayıcı yönde etki eder. Androjen ve östrojen hormonları büyümeyi hızlandırma üzerine etki etseler de, kemik olgunlaşmasını hızlandırmaları sebebiyle büyüme kıkırdağını kapatarak büyümenin durmasına ve bu sürecin hızlı olması halinde boy kısalığına neden olabilirler.

Büyüme hormonu (BH) eksikliği 1/3500-1/4000 sıklıkta görülmektedir ve boy kısalığının başlıca nedenidir ve çoğunlukla idiyopatiktir. Doğum boyu ve tartısı normal veya normal sınırın altında olan olgulardaki büyüme hızı 6-9 ay sonra düşmeye başlar ve kemik yaşları geridir. Sıklıkla geç puberte görülür. Diğer klinik bulguları hipoglisemi veya erkeklerde mikropenistir. *GHI* gen mutasyonlarının neden olduğu konjenital BH eksikliği, BH reseptör gen anormalliğinin bir sonucu olarak IGF-I yetersizliğinin neden olduğu Laron sendromu gibi BH'ye direnç vakalarda ağır boy kısalığı görülür. İntrauterin dönemde BH ve diğer ön hipofiz hormonlarını üreten hücrelerin büyümesinde, bir dizi transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Bu transkripsiyon faktörlerini etkileyen genetik değişiklikler, BH ve diğer ön hipofiz hormonlarında eksikliklere yol açar. Bir beyin hasarından sonra büyüme hormonu eksikliği de meydana gelebilir. Kemoterapi, kranial ve/veya kraniyospinal radyasyon veya her ikisi de kanseri tedavi etmek için kullanıldığında, izole BH eksikliği veya panhipopitüitarizm meydana gelebilir. [10]

Hipotiroidinin temel bulgularından biri boy uzamasında yavaşlamadır. Konjenital hipotiroidide geç tanı koyulursa ya da tedaviye geç başlanırsa, ağır boy kısalığının yanı sıra bilişsel gerilik, metabolik ve morfolojik birçok bozukluk meydana gelir. Dismorfik yüz görünümü bulgularının yanı sıra kemik yaşı oldukça geridir, geç puberte görülür ve tartı standartların üstündedir. Biyokimyasal, hormonal testler ve görüntüleme ile kesin tanı konulabilir ve etiyolojisi belirlenebilir. Düzenli tiroid hormonu tedavisi ile tiroid hormonlarının yerine konması amaçlanmaktadır ve genellikle tedaviye olumlu yanıt alınır.

Diabetes mellitus, insüline bağımlı diyabet hastası olgularda uygun tedavi uygulanmazsa, büyüme yavaşlar ve geç puberte görülür. BH düzeyi normal ya da yüksek olan diyabetli olgularda Somatomedin (IGF-1) düzeyi azalmış olabilir ve bu boy kısalığına neden olabilir.

2) Postnatal boy kısalıklarında en önemli nedenlerden olan kronik hastalıklar, olgunun besin alımını, emilim yetersizliği, metabolik bozukluklar, hipotalamusun baskılanması ve psikolojik olarak birçok etmene sebep olur ve bu nedenle büyüme hızında düşüş görülebilir. Kronik hastalıkların tedavisi sonrasında büyümede hızlanma görülebilir. Çölyak hastalığı, kistik fibroz, Crohn, orak hücreli anemi ve talasemi boy kısalığına neden olan kronik hastalıklara örnek olarak verilebilir.

3) Malnütrisyon, yeterli besin elemanlarını karşılayamamaktan kaynaklanan en yaygın boy kısalığı nedenlerindendir. Özellikle protein, yeterli kalori alımı ve esansiyel besin maddelerinin eksikliği sonucu boy kısalığı görülmektedir. Tartı ölçümü ve büyüme hızı düşüktür. Kemik yaşı da kronolojik yaşına göre, boy kısalığı kadar belirgin olmasa da geridir.

2.2.2.2. Orantısız Boy Kısalıkları

1) İskelet displazileri orantısız boy kısalığı fenotipi görülen ve çoğu kalıtsal geçişli olan iskelet sistemi bozukluğudur. Klinik tanı genellikle radyolojik görüntüleme ile ön tanı ve genetik testlerle kesin klinik tanı koyulmaktadır. Uzun kemiklerin epifizinde ya da metafizinde bozukluk olması, iskelet sistemindeki bozukluğa vertebranın da katılıp katılmamasına göre farklı tanımlar konulmaktadır. [1]

Akondroplazi, 1/20.000 sıklıkta görülen, otozomal dominant geçişli, dismorfik bulguları olan ve doğumdan itibaren büyüme hızının kademeli olarak yavaşladığı iskelet

displazisidir. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (*FGFR3*) genindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları (%98'inde c.1138G>A (p.Gly380Arg), %1'inde ise c.1138G>C (p.Gly380Arg) akondroplaziye neden olmaktadır. [16]

Hipokondroplazi, akondroplaziye göre daha hafif seyreden, brakidaktili gibi dismorfik bulgular gösteren allelik varyantıdır. Boy kısalığı sıklıkla 3 yaşında daha belirgin hale gelir ve yenidoğanlar normale göre daha küçük olabilir.

2) D vitaminine dirençli, tedavi görmemiş, büyüme kıkırdığı genişlemiş ve epifizlerde mineralizasyonu azalmış olgularda görülen raşitizm, orantısız ekstremitte kısalığı görülen bir diğer boy kısalığı nedenidir.

2.3. Boy Kısalığının Genetik Altyapısı

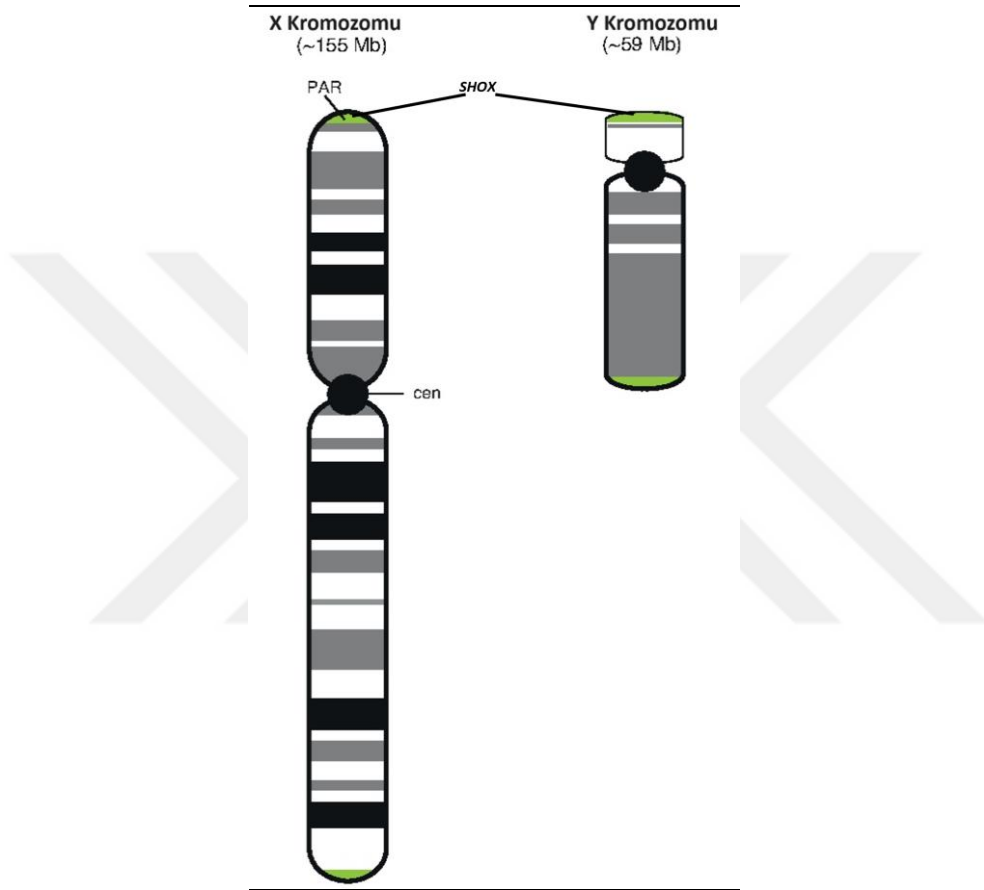
Tüm boy kısalığı biçimleri, büyüme plakasındaki kondrojenезin sonucu olan doğrusal büyüme hatasından, yani büyüme plakalarındaki kondrojenезin azalmasından kaynaklanır. Besin alımı, hormonlar ve inflamatuvar sitokinler, büyüme plakası kondrojenезini ve sonuç olarak lineer büyümeyi düzenleyen birçok sistemik faktörlerdendir. Çocuklukta büyüme, kronik hastalıklar ve diğer sistemik hastalıklar tarafından engellenir. Ek olarak, büyüme plakası kondrositlerindeki hücre içi düzenleyici mekanizmalar, kıkırdak hücre dışı matris bileşenleri ve büyüme plakasındaki parakrin faktörler, büyüme plakası kondrojenезini etkileyen birçok yerel faktör arasındadır.

Lango ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir araştırmada, boy değişimlerinin yaklaşık %10'undan sorumlu 180 lokusun olduğu bulundu. [17] Wood ve arkadaşlarının yaptığı daha yeni bir çalışmada ise (2014), genel popülasyonda yetişkin boyu ile ilgili yaklaşık 400 lokus tanımlamıştır. [18] Çocuklar, büyüme plakası kondrojenезini hafifçe engelleme eğiliminde olan çoklu polimorfizmleri miras aldıkları için hafif boy kısalığına sahip olabilirler. GWA çalışmasındaki lokusların, ifade edilen ve büyüme plakası işlevi için gerekli olan genler açısından zengin olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, normal büyümenin, büyüme plakası işlevini etkileyen birkaç yüz gen tarafından etkilendiğini göstermektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar ve hafif mutasyonlar, yüksekliği normal aralıkta modüle edebilir ve hafif poligenik boy kısalığına neden olabilir. Öte yandan, protein fonksiyonu üzerinde daha güçlü etkileri olan mutasyonlar ve/veya bialelik mutasyonlar, önemli monogenik boy kısalığına veya iskelet displazilerine neden olabilir.

Boy kısalığının genetik etiolojisi kromozom anomalileri ve tek gen hastalıkları yer almaktadır;

2.3.1. Kromozom Anomalileri

En sık görülen kromozomal bozukluklar, 400 yenidoğandan birini etkileyen X ve Y cinsiyet kromozomlarının anomalileridir. [19] (Şekil 2-2)



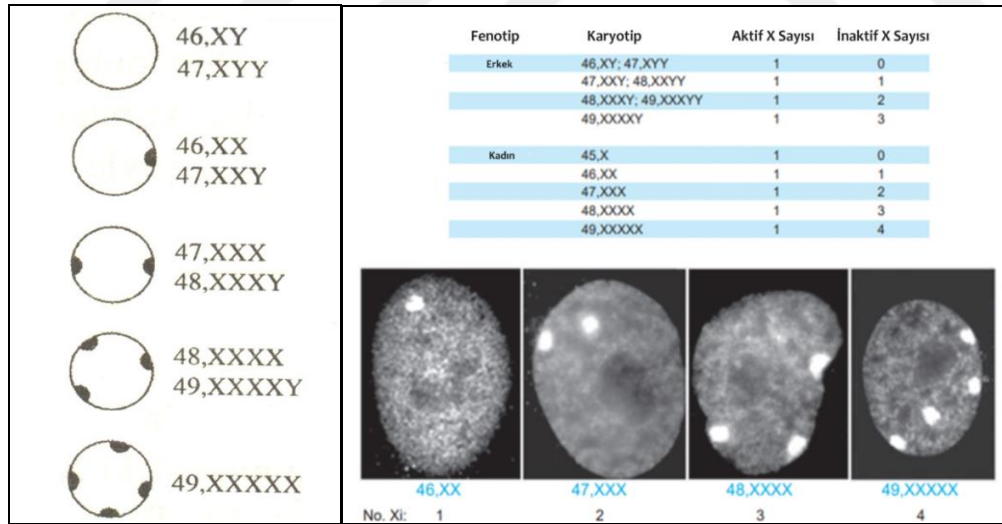
Şekil 2-2: X ve Y cinsiyet kromozomlarını üzerinde *SHOX* geni lokasyonunun gösterildiği diagram.

Cinsiyet kromozomlarının tamamının (anöploidi) ya da bir kısmının (yapısal anomaliler) kazanılması ya da kaybedilmesi ile karakterize olan anomaliler, çeşitli klinik fenotiplerle ilişkilidir. X veya Y kromozomlarının sayısal anomalileri (fazlalığı ya da kaybı), monozomi X (45,X), trizomi X (47,XXX), 47,XYY veya 47,XXY olarak görülmektedir. X ve Y kromozomlarının yapısal anomalileri ise (örneğin, X'in uzun kolunda izokromozom veya X'in kısa kolunda delesyon) çeşitli fenotipler göstermekle beraber, p kolunun kaybının görüldüğü anomaliler kısa boy ile ilişkilidir. [20]

Normal dişilerde iki X kromozomu bulunurken normal erkeklerde bir X ve bir Y kromozomu bulunmaktadır. Erken embriyonik gelişim döneminde, dişilerde yumurta hücreleri dışındaki hücrelerde bulunan iki X kromozomundan biri rastgele ve kalıcı olarak inaktive edilir.

X İnaktivasyonu

X kromozomu Y kromozomunun aksine binden fazla gen içermektedir. Normal dişilerde X kromozomunun iki kopyası bulunurken, normal erkeklerde tek X kromozomu bulunmaktadır ve bu durum X'e bağlı genlerin potansiyel olarak toksik çift dozuyla sonuçlanır. Bu dengesizliğin önlenmesi için dişilerde bir dozaj dengeleme mekanizması gelişmiştir. X kromozomu inaktivasyonu (XCI) olarak adlandırılan bu fenomende, dişilerdeki X kromozomlarından biri transkripsiyonel olarak inaktive edilir ve XX dişiler ile XY erkekler arasındaki gen ürünlerinin dozajı eşitlenir. İnaktive edilmiş X kromozomu daha sonra Barr cisimciği adı verilen kompakt bir yapıya kondanse olur ve susturulmuş olarak stabil şekilde korunur (Şekil 2-4).



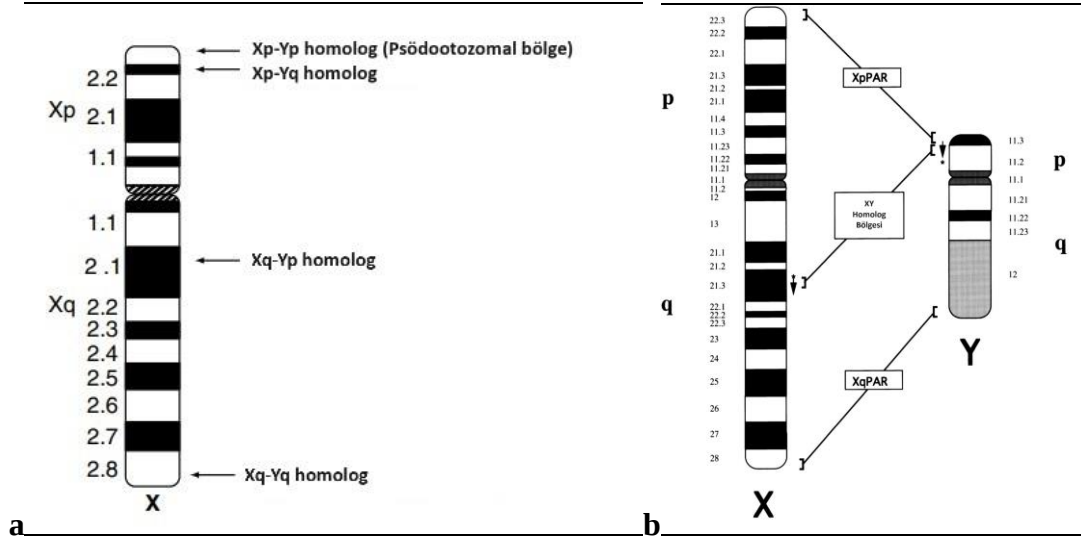
Şekil 2-4: Birden fazla X kromozomu bulunan hücrelerde inaktif X kromozomlarının Barr cisimciği görüntüleri.

X inaktivasyonunun gerçekleşmesinde spesifik olarak kodlanmayan tamamlayıcı iki gen *XIST* ve *TSIX* yer almaktadır. *XIST*, protein kodlamayan 17 kilobaz (kb) fonksiyonel RNA üreten bir gendir ve yalnızca iki X kromozomu içeren hücrelerde

ifade edilir, normal erkek hücrelerinde eksprese olmaz. X kromozomu sayısının fazla olduğu hücrelerde fazladan *XIST* ifadesi görülebilir, çünkü her hücrede yalnızca bir X'in aktif kalması gerekmektedir. İnaktif X kromozomunda eksprese edilen *XIST* geni ürettiği RNA sayesinde yalnızca üretildiği kromozomu kaplayıp kromozom üzerindeki diğer genleri susturabilmektedir. *XIST* transkript eksprese olduğu kromozom inaktive olurken aktif olan X kromozomundaki *XIST* antisensi *TSIX* geninin transkripsiyonunun artması sayesinde *XIST* geninin transkripsiyonu azalır ve böylece *XIST* genini antagonize eder.

X inaktivasyonu iki farklı şekilde gerçekleşmektedir: rastgele ya da seçici. Rastgele X inaktivasyonu, hem anneden hem babadan gelen X kromozomunun eşit inaktive olma şansına sahip olması durumudur. Erken dönem dışı embriyosunda her bir hücre iki X kromozomundan birini aktif, diğerini ise inaktif X olarak belirlemektedir. Bu olay her hücrede bağımsız olarak gerçekleşmektedir ve böylece normal dişiler aslında X kromozomları açısından mozaik hale gelmektedir. Seçici X inaktivasyonunda ise anomali olan X kromozomunun inaktive olması beklenmektedir. Bu sebeple erkeklere göre dişilerde X'e bağlı hastalıklar ve X kromozomunun anomalisi durumundaki klinik özelliklerin ortaya çıkması daha az sıklıkla görülmektedir. Diğer seçici inaktivasyon örneği X/otozom translokasyonlarında görülmektedir. X/Otozom translokasyonlarında seçici inaktivasyon iki şekilde gerçekleşir; Translokasyon dengeli ise normal X inaktive olur ve otozomda yer alan genler korunur. Dengesiz translokasyonlarda ise transloke X, *XIST* genini taşıyorsa bu kromozom inaktive olur. X/Otozom translokasyonu taşıyan bireylerin klinik olarak daha az etkilenme nedeni bu mekanizma ile açıklanmaktadır.

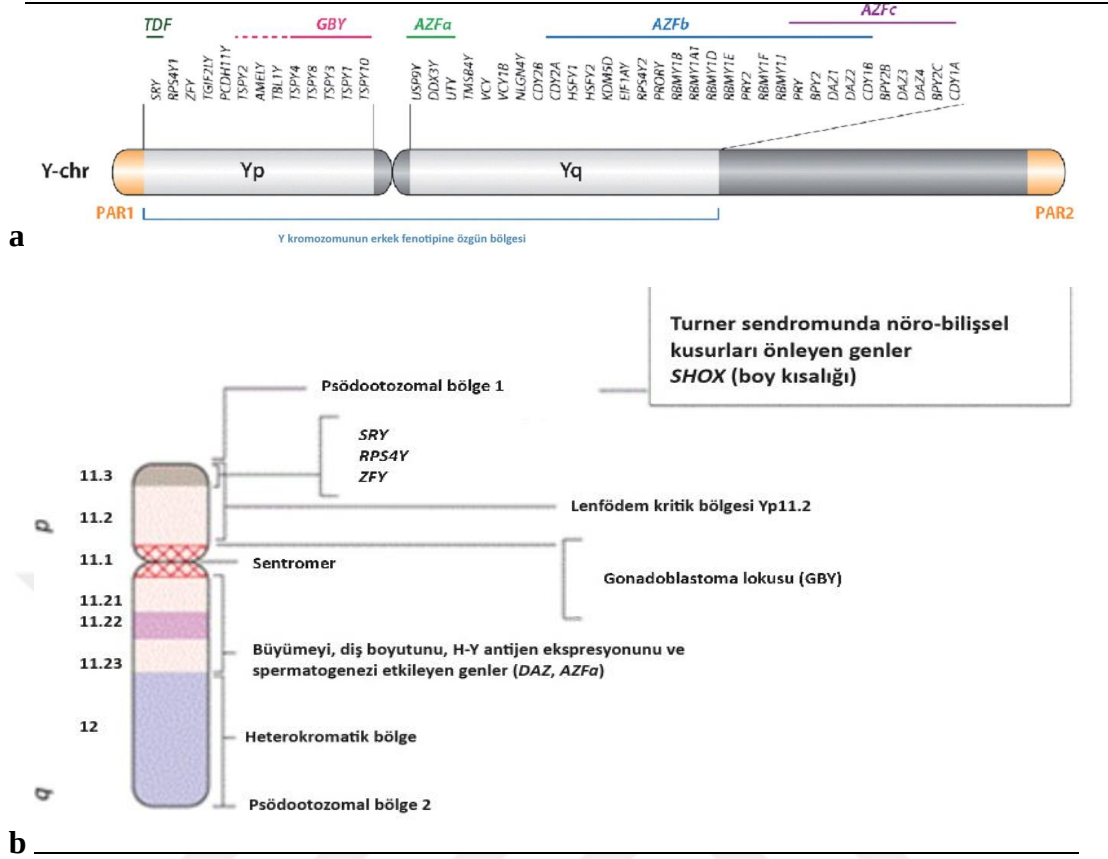
İnaktif X kromozomundaki bazı genler inaktivasyondan kaçır. X kromozomu üzerindeki genlerin yaklaşık %25'i inaktivasyondan kaçabilmektedir. X kromozomunun p (kısa) ve q (uzun) kollarının uç kısmında bulunan psödootozomal bölgede (PAR1 ve PAR2), Y kromozomunda benzer kopyaları bulunan genler içermektedir. Bu nedenle PAR bölgeleri ve her iki cinsiyet kromozomunda da bulunan genler X inaktivasyonundan kaçmaktadır. (Şekil 2-5)



Şekil 2-5: a) X kromozomu üzerindeki Y kromozomu ile homolog olan bölgeler, b) X ve Y kromozomu üzerindeki psödootozomal bölgeler (PAR)

Y Kromozomu

Cinsiyeti belirleyen iki kromozomdan biri olan Y kromozomu, 200'den fazla gen ve 50 milyondan fazla baz çifti içermektedir ve insan genomundaki en küçük kromozomlardan biridir (~60 Mb) (Şekil 2-6). Diğer kromozomlarla karşılaştırıldığında daha az gen içeren Y kromozomunun dizisinin yaklaşık %50'den fazlası tekrarlanan elementlerden oluşmakla birlikte, rekombinasyon eksikliğinden dolayı sürekli bozulma eğilimindedir. [21]



Şekil 2-6:a)Y kromozomunun kısa (p) ve uzun (q) kolları gösterilmiştir. Psödootozomal bölgeler (PAR1 ve PAR2) ve erkek fenotipi ile ilişkili AZF bölgeleri işaretlenmiştir. b) G-banılı bir Y kromozomunun şematik gösterimi ve üzerinde bulunan bazı önemli genler (*MIC2*, monoklonal antikor 12E7 tarafından tanınan bir hücre yüzeyi antijeni geni; *PRKY*, cAMP'ye bağımlı serin-treonin protein kinaz geninin bir üyesi ailesi; *RPS4Y*, ribozomal protein S4; *SHOX*, kısa boy homeobox geni; *SRY*, cinsiyet belirleyici bölge Y; *TSPYA/B*, testislere özgü faktör gen ailesinin üyeleri; *ZFY*, çinko parmak Y).

Y kromozomu içerdiği genler sayesinde, örneğin erkek fenotipinden sorumlu olan gen *SRY*, memeli embriyolarında testis gelişimine sebep olur. [22]

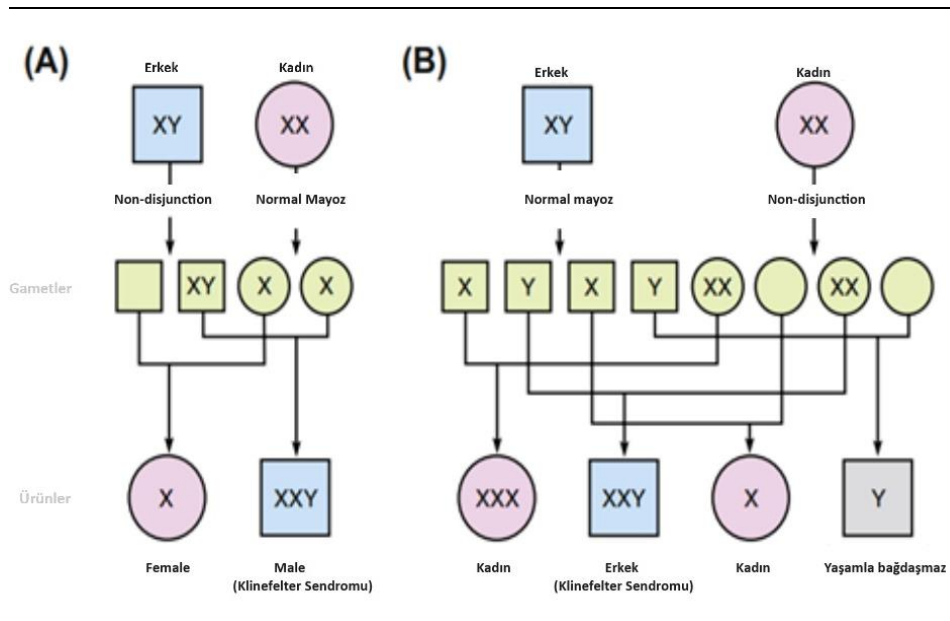
Yapılan sitogenetik çalışmalar sonucunda Y kromozomunu psödootozomal bölgeler, ökromatik ve heterokromatik bölgeler olarak sınıflandırmak mümkündür. Y kromozomunun kısa ve uzun kollarının terminal bölgelerinde (Yp ve Yq) bulunan psödootozomal bölgeler (PAR) yaklaşık 3000 kb DNA içerir ve mayoz sırasında X kromozomu ile eşleşip genetik materyali değiştirdiği bölgedir. Ökromatin bölgeler çoğunlukla tekrar dizilerinden oluşmaktadır. [21]

2.3.1.2. Cinsiyet Kromozom Anomalileri

Cinsiyet kromozomlarının anomalileri sayısal ve yapısal olarak iki grupta sınıflandırılabilir.

A. Cinsiyet Kromozomu Sayısal Anomalileri

X ve Y kromozomlarının doğru ayrışamaması (non-disjunction) nedeniyle normal sayıda bulunmayıp fazla X, fazla Y ya da eksik X ve Y kromozomlarının görülmesi durumudur. (Şekil 2-7)



Şekil 2-7: Non-disjunction sonucu oluşan cinsiyet kromozomu sayısal anomalileri gösterilmiştir.[24] A) X ve Y kromozomlarının ayrışamaması sonucu oluşan XXY ve X genotipleri gösterilmiştir. B) XX gametinin ayrışamaması sonucu oluşan XXX, XXY, X, Y (yaşamla bağdaşmaz) genotipleri gösterilmiştir.

X Kromozomu Sayısal Anomalileri

Monozomi X (45,X): Monozomi X, Turner sendromu ile ilişkilendirilmektedir. X kromozomunun tamamen ya da kısmen bulunmadığı bir genetik anomali olan Turner sendromu, ilk kez 1938 yılında Henry Turner tarafından tanımlanmıştır. Canlı doğumlarda en sık görülen kromozomal anomalilerdendir ve toplum sıklığı yaklaşık olarak 1/3000'dir. [25] Monozomi X dismorfik özelliklerin yanında (kalkan göğüs, yele boyun, kübitus valgus, konjenital kalp kusurları vb.) kısa boy ile karakterizedir. [26]

Turner spektrumu çeşitli genotiplerle kısa boy fenotipi gösterebilir. Bu vakaların çoğunda mozaik 45,X/46,XX olarak görülürken, X veya Y kromozomunun yapısal anomalileri de Turner spektrumuna sebep olabilmektedir. [27] Delesyon, izokromozom ve halka kromozom dahil olmak üzere X kromozomunun ve Y kromozomunun çok sayıda yapısal anomali tipi vardır.

Trizomi X (47,XXX): Trizomi X, 1000 canlı doğumdan birinde görülen cinsiyet kromozomu anomalisidir. Değişken nörogelişimsel ve psikolojik özelliklere sahip geniş bir fenotipe sahip olduğundan olgularının sadece %10'u klinik olarak tespit edilebilmektedir. Uzun boy, prematür overyan yetmezliği (POF), nöbetler gibi tipik klinik özellikler yaygın olarak görünmektedir. [28]

47,XXX sendromu, X kromozomlarının gametogenez veya mitoz sırasında doğru ayrışmaması (disjunction) nedeniyle oluşmaktadır. [29] Üç X kromozomu olan dişilerin yaklaşık %90'ında fazla bulunan X kromozomu maternal kökenli iken %10'unda paternal kökenlidir. İki X kromozomu maternal kökenli olduğunda, anomalilerin %66'sı mayoz I hatalarından, %18'i mayoz II hatalarından ve %16'sı postzigotik hatalardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca ileri anne yaşı, diğer trizomilerde olduğu gibi 47,XXX için de bir risk faktörüdür. [30] İki X kromozomu paternal kökenli olduğunda ise bu anomalinin postzigotik bölünme hatalarından kaynaklandığı bilinmektedir.

48,XXXX: Tetrazomi X, fazladan 2 adet X kromozomu bulunan kadınlarda görülen nadir bir sendromdur. Klinik bulguları ve semptomları değişiklik gösteren bu kromozom anomalisinde, gelişimsel bozukluklar, dismorfik yüz, kalp ve iskelet bulguları ve mental motor gerilik görülebilmektedir. Gametogenez sırasında rastgele meydana gelen bir disjunction sebebiyle oluşmaktadır. [31]

Y Kromozomu Sayısal Anomalileri

47,XXY: Klinefelter sendromu (47,XXY), erkeklerde fazladan bir X kromozomunun bulunması ile oluşur. 47,XXY yaklaşık 600 erkekten birinde görülmektedir, ancak yalnızca ~%25'i klinik olarak teşhis edilebilmektedir. Fenotipik özellikleri arasında uzun boy, testiküler gelişim ve işlev bozuklukları, genellikle hipergonadotropik hipogonadizm ve küçük testisler, uzun ekstremiteler, jinekomasti ve azospermi gibi tipik klinik bulgular görülmektedir. [32]

Bu anomali, gametogenez veya döllenme sonrası mitotik bölünme sırasında cinsiyet kromozomlarının ayrışamamasının sonucu oluşur. Moleküler genetik çalışmalar ilave X kromozomunun çoğunlukla maternal kökenli olduğunu göstermiştir. İleri anne yaşı 47,XXY karyotipinin de görülme riskini arttıran bir faktördür. [33]

47,XXY: Spermatogenez sırasında mayoz bölünmede oluşan disjunction sonucu iki Y kromozomunun bulunmasıdır. Fazladan Y kromozomu olan bu olguların standart büyüme verilerine göre daha uzun olması beklenmektedir. 47,XXY sendromlu olguların aksine normal cinsel gelişime ve fertil oldukları bilinmektedir. Klinik bulguları ve semptomları çeşitlilik göstermektedir ancak genellikle gelişimleri ve davranışları standart ortalama ile seyretmektedir, bu nedenle tanı oranı düşüktür. Toplumda görülme sıklığı 1:1000'dir. [34]

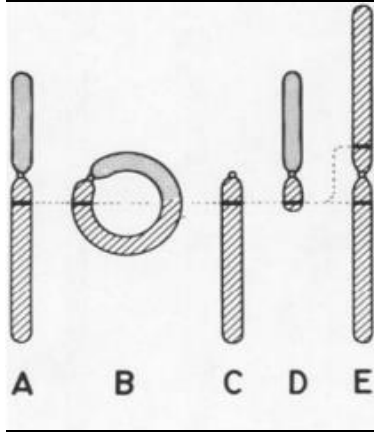
X ve Y polizomileri: 48,XXXXY ve 49,XXXXXY sendromları, erkeklerde iki veya daha fazla ekstra cinsiyet kromozomunun bulunmasıyla karakterize edilen nadir bir anöploid anomalişidir. Erkeklerde fazla X kromozomunun varlığı kliniğe testis disgenezisi ve hipergonadotropik hipogonadizm olarak yansır. Bu varyantlar Klinefelter sendromunun spektrumunda görülse de, X kromozomu sayısı arttıkça konjenital malformasyonlar ve ek klinik bulgular ağırlaşmaktadır.

Sıklığı 1:18000-1:40000 doğumda bir olan 48,XXYY sendromuna ise diğer polizomilere göre daha sık rastlanmaktadır. [35]

B. Cinsiyet Kromozomu Yapısal Anomalileri

X Kromozomu Yapısal Anomalileri

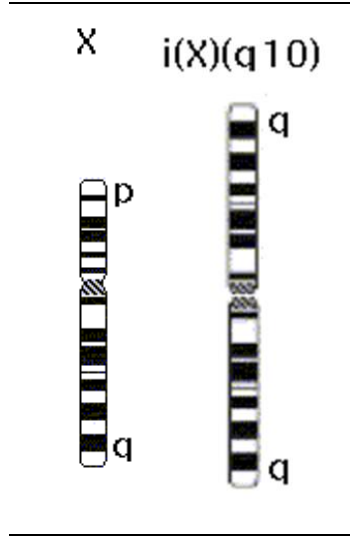
X kromozomunun yapısal anomalileri Halka X, Xp ve Xq delesyonları ve izokromozom X olarak sınıflandırılabilir. (Şekil 2-8)



Şekil 2-8: X kromozomu yapısal anomalileri. A) Normal X kromozomu, B) Halka(X) kromozomu, C) Xp delesyonu, D) Xq delesyonu, E) İzokromozom Xq görüntüsü.

İzokromozom X: İzokromozomlar, sentromerde birleşen iki özdeş kolu içeren çoğunlukla monosentrik bir kromozom anomalisidir. (Şekil 2-8-E) Kırılma sıklıkla perisentromik bölgede meydana gelmektedir. Sentromer bölünmesi ile türetilmiş olan izokromozom, iki kısa kol ya da iki uzun koldan oluşan, yapısal bir kromozomal sapmadır. X kromozomunun izo olması durumunda gözlenen en yaygın bulgular olan otoimmün tiroid hastalığı prevelansında iki kat artış görülmektedir.

Diğer izokromozom olasılığı olan $46,X,i(Xq)$, X kromozomunda görülen en sık yapısal anomalilerdendir. (Şekil 2-8) Mozaik ya da non-mozaik şekilde rastlanabilen bu anomalinin Turner sendromu spektrumundaki sıklığı %15-18 arasındadır. [37] Boy kısalığı fenotipi beklenen bu vakalarda, bu fenotipe yol açan faktörün X kromozomunun p kolundaki *SHOX* geninin haplo-yetmezliği ile açıklanmaktadır. Ayrıca izokromozom Xq karyotipinin mozaik bulunması durumunda ağır klinik bulguların gelişme riskinin daha düşük olduğu görülmüştür. [36,38]



Şekil 2-9: Normal X kromozomu ve izokromozom Xq kromozomu görüntüsü

X Kromozomu Delesyonları: Xp delesyonları *SHOX* genini içeriyorsa boy kısalığı fenotipi görülmektedir. Xq delesyonlarının ise gerçekleştiği lokusa bağlı olmakla birlikte, dişilerde infertilite ya da gonadal disgenezi ile ilişkilidir. (Şekil 2-8-C/D) Sitogenetik çalışmaların ışığında Xq13 ve Xq28 arasındaki bölgenin normal yumurtalık ovulasyon fonksiyonu için önemli olduğu bilinmektedir. Bu bölgenin proksimal delesyonları genellikle doğurganlık fertilite ile ilişkilidir. Xq23-q28 bölgesinin terminal ve interstisyel delesyonları çoğunlukla erken yumurtalık overyan yetmezliğinden sorumludur. [40] Xq27.3 lokusunda lokalize olan *FMR1* geninde oluşan delesyonlar ise erken menapoz riskini arttırmaktadır. [41]

Halka X: Kromozom kolundaki p ve q kolu terminal bölgelerinin kırılmasının ardından kırık uçların füzyonu sonucunda oluşan kromozomlar halka kromozom olarak adlandırılır. (Şekil 2-8-B) Halka X kromozomu, çoğunlukla Turner spektrumlu kadınlarda görülen ve mitotik instabiliteleri nedeniyle genellikle 45,X hücreleri (45,X/46,X,r(X)) ile mozaik formda bulunan bir kromozomal anomalidir. Erkeklerde son derece nadir görülen bir bulgudur çünkü X kromozomu materyali için büyük delesyonlar yaşamla bağdaşmaz. Daha önce halka kromozomu X olan yalnızca iki erkek vakası rapor edilmiştir. [107]

Kadınlarda ise halka X kromozomunda eksprese olmayan genler açısından X kromozomunun kısmi monozomisi görülür. Halka kromozomun boyutu ve gerçekleşen

delesyonlara bağlı olarak fenotip değişkenlik göstermektedir. Turner sendromlu olguların yaklaşık %6'sında halka X kromozomu saptanmaktadır. [42]

46,X,r(X) karyotipli vakalarda boy kısalığı, dismorfik bulgular, over disgenezisi gibi bulgular izlenmektedir. Ayrıca X inaktivasyon bölgesinin işlevsel olup olmamasına bağlı olarak, fenotipte çeşitlilik görölmektedir. X inaktivasyonunu gerçekleştiren *XIST* geninin delesyonuna bağlı olarak, halka X üzerinde bulunan genler disomik hale gelir. Bunun sonucunda vakalarda ağır bir fenotip gözlenmektedir. [43]

Y Kromozomu Yapısal Anomalileri

İzokromozom Y: Y kromozomunun yapısal anomalileri arasında izokromozom Y ve izodisentrik Y sıklıkla görölmektedir. Y kromozomunun kırılması ve ardından füzyonu sonucunda oluşan çift sentromerli izodisentrik Y ve tek sentromerli izokromozom Y'de, Y kromozomunu materyalinin kazanımı ve kaybına görölmektedir. Y kromozomu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici, spermatogenez, büyüme ve gelişme ile ilgili çeşitli genler bulunduğundan, bu genlerin kaybı ve kazanımı bireylerde çoklu malformasyonlara neden olmaktadır. İzokromozom Y ve izodisentrik Y kromozomlarının tespit edilmesi ve kırık noktalarının belirlenmesi için klasik karyotipleme ve FISH çalışmalarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca moleküler tekniklerden Multipleks ligasyona bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), qPCR ve dizi etiketli bölge PCR'ının kullanımı moleküler bakış açısı kazanmak için değerli tekniklerdir. Y kromozomunun izokromozom ve izodisentrik anomalilerinin karmaşık mozaikliği sebebiyle tespiti zor olabilmektedir. Bu sebeple Y kromozomlarının daha iyi karakterize olmuş problemlerle kritik kırık noktalarının tespiti için FISH tekniği vazgeçilmez bir yöntemdir.

Y kromozomunun q kolunda bulunan genler spermatogenez ile ilişkilidir. Aynı zamanda *SHOX* geninin proksimalinde bulunan *USP9Y* geni büyümeyi desteklemektedir. İzokromozom Yp anomalisi, q kolunun tamamen delesyona uğradığı nadir görölen bir kromozom anomalisidir. Mozaik ya da non-mozaik formda bulunabilen izokromozom Yp, erkek olgularda ciddi spermatogenik defektlere ve mikst gonadal disgeneziye sebep olmaktadır. Kadın fenotipindeki olgularda ise streak gonadlar ve seksüel infantilizmle belirgin geniş spektrumda fenotip gözlenebilir. [44] İzokromozom Yp olgularında *SHOX* geninin 2 kopyası olmasına rağmen genellikle

normal boy görülmesinin sebebi ise Yq bölgesinde bulunan GCY lokusu delesyonu olduğu düşünülmektedir. [45]

Y kromozomunun p kolundaki delesyonlar, *SHOX*, *RPS4Y* ve *ZFY* genlerini kapsadığında Turner fenotipi ile ilişkilidir. [20] İzokromozom Yq, en yaygın yapısal anomaliler arasında gösterilmektedir. idic(Y)(p11), disentrik Y kromozomuna ve belirli materyallerin delesyona uğrayıp q kolunun duplikasyonuna neden olur. Y kromozomunun p kolunda meydana gelen delesyonlar *SHOX* genini içerdiğinden, fenotipik olarak boy kısalığına sebep olmaktadır. [46]

Y Kromozomu Delesyonları: Y kromozomunun p kolunda bulunan *SRY* geninin delesyonunu içeren anomalilerde, testis gelişimi olmaz ve Turner spektrumunda boy kısalığı dışında görülen bulgular izlenmektedir. Yp11 lokusuna ek olarak *SHOX* geninde de delesyon gerçekleşirse boy kısalığı fenotipi gözlenir.

Y kromozomunun q11 bölgesi azospermi faktörü (AZF) içermektedir. Spermin büyüme ve gelişmesinde rol oynayan genleri içeren bu bölgenin delesyonu veya mikrodelesyonu, spermatogenik patogenezinde rol oynar. [47] Bu olgularda erkek fenotipi görülmesiyle birlikte azospermi, oligospermi ve infertilite görülmektedir. [45]

Halka Y: Literatürde çoğunlukla mozaik olarak kaydedilen halka Y kromozomu, cinsiyet gelişim anomalisi bulgularıyla seyreden nadir bir kromozom anomalisidir. *SRY* geninin kaybı durumunda Turner sendromu stigmatası görülürken, *SRY* içermeyen heterokromatin bölgenin kaybı sonucunda azospermi, infertilite ve hipospadias gibi geniş spektrumda belirsiz bir fenotip bulunmaktadır. [48]

2.3.2. Büyüme Hormonu-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (BH/IGF-1) Ekseninin Genetik Değişimleri

Büyümeyi etkileyen farklı gelişim aşamalarından olan BH-IGF-I eksenini, BH'nın IGF-1 üretimini düzenlemesi yoluyla hipotalamustan dokuların hedef reseptörlerine kadar farklı yönlerden ve noktalardan etkilenebilir. Genellikle embriyonik dönemde intrauterin büyüme geriliği ile ilişkili olan GH/IGF-1 eksenindeki genetik değişiklikler, üç farklı şekilde sonuçlanabilir: izole ya da çoklu hipofiz hormonu eksikliği (BH eksikliği), BH duyarsızlığı (GHI) ve IGF-1 eksikliği, BH veya IGF-1 direnci.

2.3.2.1. İzole BH Eksikliği

İzole BH eksikliği, büyüme geriliğinin dolayısıyla boy kısalığının ana nedenlerinden biridir. Tüm genom dizileme çalışmalarında, BH (*GH1*) veya BH salgılayan hormon reseptörünü (*GHRHR*) kodlayan gende delesyon ya da mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. [50] Hipofizin farklı kusurlarından kaynaklanabilse de, genellikle idiyopatik olan BH eksikliğinin insidansı 1:4000-1:10000'dir ve %3-30'u aileseldir. İzole BH eksikliği olan hastalarda %11, ailesel BH eksikliği olan vakalarda ise %34 oranda ilgili aday gen mutasyonları tanımlanmıştır. [51]

İzole BH eksikliği farklı türlerden oluşmaktadır. Tip IA, en şiddetli formdur ve otozomal resesif geçişlidir. [53] Tip IB BH eksikliğinde *GH1* ve *GHRHR* genlerinin çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonları sonucu oluşur ve Tip IA'ya göre daha az şiddetlidir.

Tip II BH eksikliği, diğerlerinden farklı olarak otozomal dominant olarak kalıtılır. *GH1*'in intron 3'ünün ilk altı nükleotidinde oluşan mutasyonlar sebebiyle ekzon 3 okunmaz ve %5-45 oranında çoklu hipofiz hormon eksiliğine sebep olmaktadır. [54]

Tip III BH eksikliği Bruton agamaglobulinemi tirozin kinaz geninin (*BTK*) 600 farklı mutasyonu sonucu oluşan agamaglobulinemi ile ilişkilidir ve kalıtımı X'e bağlıdır. [55] Transkripsiyonel baskılayıcı görev gören *HESX1* ve *SOX2* homebox genlerindeki mutasyonlar ve *SOX3* genindeki heterozigot mutasyonlar hipofiz gelişimini etkileyerek izole BH eksikliğine neden olmaktadır. [56,57]

2.3.2.2. BH Direnci ve IGF-I Eksikliği

BH direnci ve IGF-I eksikliği, birçok genin mutasyonu sonucu oluşmaktadır ve klinik olarak genetik, fenotipik ve biyokimyasal anomalilerin komplike bir sürekliliği olarak görülmektedir. IUBK ve SGA ile ilişkilidir. [58] BH reseptörü (*GHR*) genindeki missense ve splice mutasyonlar ve delesyonlar, BH direncine sebep olmaktadır. [50,59]

IGF-I, IGF-II mutasyonları da boy kısalığına neden olur ve BH direncine neden olur. IGF-1 mutasyonu daha nadir görülür. [60] Fonksiyonel IGF-I'in tamamen kaybıyla sonuçlanan homozigot IGF1 kusurları, sensorinöral sağırılık, mikrosefali ve bilişsel gerilik ile birlikte hem doğum öncesi hem de doğum sonrası aşırı büyüme geriliği ile ilişkilidir.

IGF-2 mutasyonlarının hem doğum öncesi hem de doğum sonrası büyümeyi etkiler, kliniği özellikle Silver-Russel sendromu ile ilişkilendirilir. [61] Mikrosefali ve psikomotor retardasyon ile ilişkilidir ve bozulmuş glukoz toleransı, dismorfik özellikler ve kardiyak anormallikler gibi başka klinik patolojiler ile ilişkilendirilebilir ancak bu konuda kesin bir model belirlenemez. [62]

2.3.3. Büyüme Plağında Yer Alan Genlerin Mutasyonları

Boy kısalığının nedenlerinin araştırılmasında büyüme plakasındaki genlerin incelenmesi de son çalışmalarla önem kazanmıştır. Endokondral ossifikasyon, büyüme plakasında meydana gelir ve kemiğin uzamasını destekler. Kondrosit ve kıkırdak matris sentezinin proliferasyonu, hipertrofisi ve yaşlanması ile karakterizedir. [63] Bu dengeyi etkileyen ve değiştiren genlerdeki mutasyonlar, farklı derecelerdeki vücut orantısızlıklarına ve büyüme geriliğine ve iskelet displazilerine neden olmaktadır.

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) büyüme plakasında rol oynar. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü-3 (FGFR-3), büyüme plakası kondrojenезini negatif olarak düzenler. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3'teki heterozigot aktive edici mutasyonları, iskelet büyümesini inhibe ederek tanatoforik displazi, akondroplazi ve hipokondroplazi gibi çok çeşitli fenotiplere neden olur. Ayrıca kondrojenезi negatif olarak düzenler ve *FGFR3* genindeki mutasyonlar, büyüme plakalarının proliferasyon bölgesinin normal işleyişini ve kemik uzamasını bozan aktivite artışına neden olur. [48] Bu nedenle, FGFR-3'ün aktivasyonu uzun kemik uzamasını baskılar ve sonuç olarak iskelet displazisini indükler (Şekil 2).

Hipokondroplazi ve akondroplazi, *FGFR3* geninin anormallikleri ile ilişkili olan ve boy kısalığına neden olan en yaygın iskelet displazileridir. [16,64] Otozomal kalıtılan bu displaziler, sıklıkla spontan mutasyondan da kaynaklanır. Akondroplazi, aktivasyonunu belirleyen *FGFR3* geninin transmembran alanındaki tekrarlayan bir kusurdan kaynaklanır. [16] Özellikle alt ve üst ekstremitelerin proksimal bölgelerinde orantısız boy kısalığı ve makrosefali tipik klinik özellikleridir. Hipokondroplazi, *FGFR3* sitoplazmik (immünoglobulin benzeri) alan aktive edici mutasyonlarla ilişkilidir. Tipik klinik özellikleri kısa boy, dirsek ekstansiyonunda kısıtlılık, rizomelik uzuv kısalması, brakidaktili ve göreceli makrosefalidir. [65] İlk birkaç yılda büyüme hızını arttırsa da, BH tedavisi onaylanmış bir tedavi değildir.

Agrekan, büyüme plakasının ve eklem yüzeylerinin kıkırdak hücre dışı matrisinin önemli bir bileşenidir. Proteoglikanı kodlayan *ACAN* genindeki anormallikler, genellikle ileri kemik yaşlanması ve erken büyüme durması ile orantılı veya hafif orantısız boy kısalığına neden olur. [66] *ACAN* kusurları, idiyopatik boy kısalığının yaygın bir nedenidir ve gebelik yaşına göre küçük doğar; homozigot anormallikler şiddetli iskelet displazisine neden olurken, heterozigot defektler daha hafif iskelet displazisine neden olur. [67,68]

Büyüme plakasındaki bir başka yolak, C-natriüretik peptit (CNP) ve natriüretik peptit reseptörü B'yi (NPR-B) içermektedir. CNP, *NPPC* geni tarafından kodlanır ve büyüme plakası fonksiyonunun pozitif düzenleyicisi görevindedir. CNP, FGFR-3'ün negatif bir düzenleyicisidir ve süreç, kondrosit proliferasyonu ve farklılaşmasının artmasına neden olur. [69] Bu mutasyonlara sahip bireyler, değişken derecelerde kısa boy, orantısız vücut (oturma boyu: boy oranı SDS > 2) ve farklı iskelet anormalleri ile klinik bulgu verirler. Bu bireyler son derece kısa boy ve ekstremitelere sahiptir, kol ve bacaklardaki ön ekstremiteler (orta segmentler) ile el ve ayaklar (distal segmentler) orantısız kısalmıştır. [70]

Heterozigot bir CNP-NPR-B ile ilişkili mutasyon, *SHOX* haplo yetmezliğine benzer özelliklere sahip orantısız boy kısalığı ile karakterize hafif büyüme bozukluğuna neden olur. Bu bireyler mezomeli sergiler ancak Madelung deformitesini göstermezler. [71] Son araştırmalara göre, *NPR2* geninin heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonu, boy kısalığı vakalarının yaklaşık %2-3'ünden sorumludur. [72]

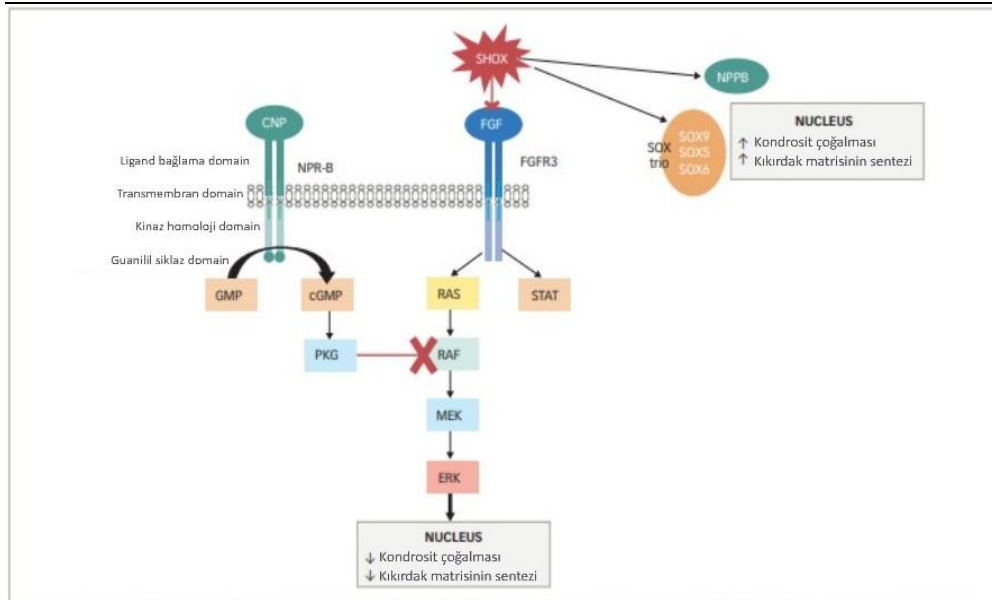
2.3.3.1. Kıkırdak Hücre Dışı Matrisinin Genetik Kusurları

Son yıllarda, büyüme geriliğinin nedenleri arasında kollajen hastalıklarının bulunması üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Büyüme plağında kollajen tip II, IX, X ve XI mevcuttur; bunların arasında tip II kollajen en çok miktarda bulunan bileşendir. Tip II kollajenopatiler, *COL2A1* varyantları ile ilişkilidir ve net bir genotip-fenotip korelasyonu olmamasına rağmen kısa boy ve iskelet displazisi ile ilişkilidir. Bununla birlikte, büyüme plakasının farklı bileşenleri arasındaki ilişkiyi daha iyi karakterize etmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. [71,72,75]

2.3.3.2. Hücre İçi Yolların Genetik Kusurları

Hücre içi büyüme plakasıyla ilgili, *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF* ve *NRAS* gibi farklı genleri içeren Ras-MAPK sinyal yolağındaki mutasyonlar, Noonan sendromu da dahil olmak üzere 'rasopatiler' adı verilen bir grup sendromla sonuçlanır. Bu sendromlar, yüz dismorfizmi ve geniş bir doğuştan kalp hastalığı spektrumu gibi diğer fenotipik özelliklerle ilişkilendirilebilen değişken derecelerde büyüme bozukluğu ve boy kısalığı ile karakterize edilir. [73]

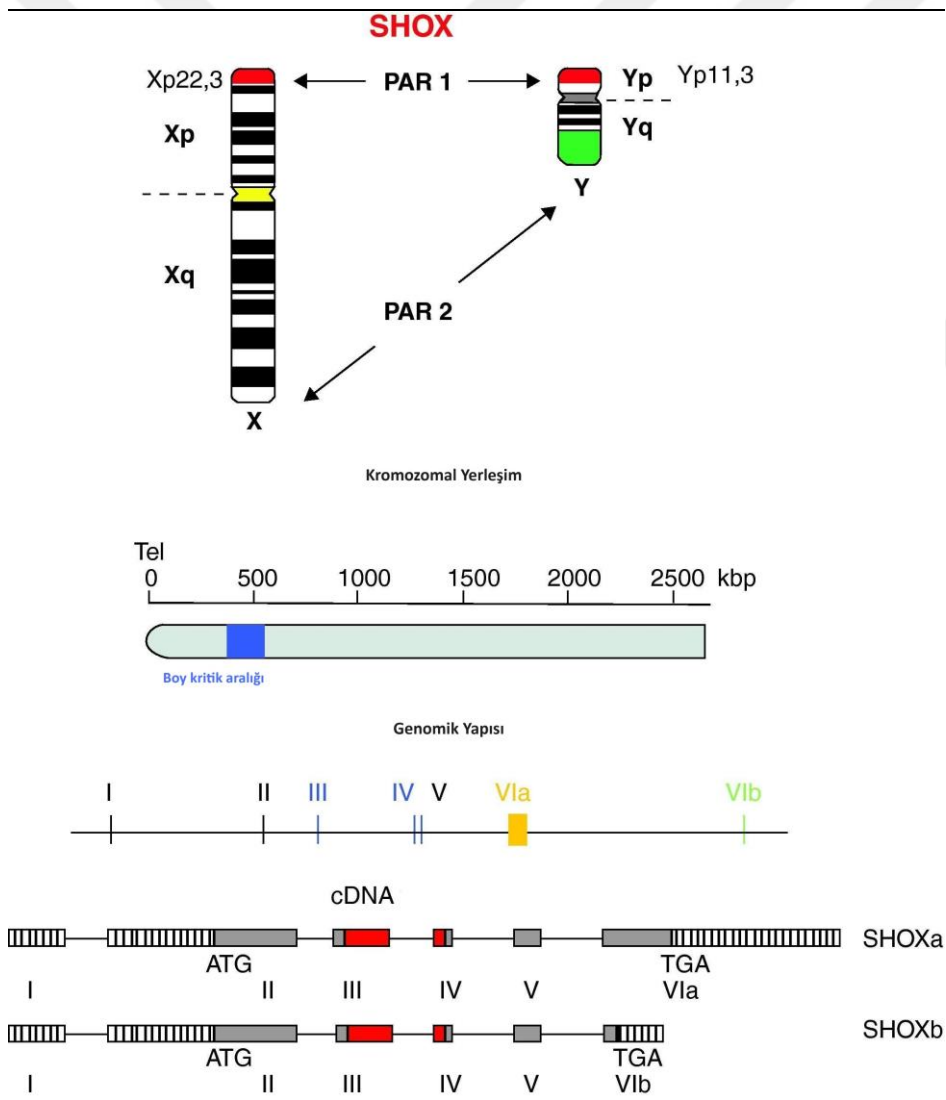
Hücre içi yollardaki en önemli genetik kusur, kısa boy homeobox (*SHOX*) kodlayan genin mutasyonları nedeniyle görülmektedir. *SHOX* geninin haploin yetmezliği ile ilgili ana patolojik durumlar, Langer mezomelik displazi, Leri-Weill diskondrosteozu (LWD)'den izole boy kısalığına kadar değişir.63 Hipertrofik kondrositlerde eksprese edilen bir transkripsiyonel aktivatördür. [74] NPPB'nin aktivasyonu ve *FGFR3* ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla kondrosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır ve koordine eder, böylece uzunlamasına büyümeyi destekler. Ayrıca *SHOX*, kıkırdak matris üretiminde yer alan SOX üçlüsü (*SOX9*, *SOX5*, *SOX6* genleri) ile etkileşime girer (Şekil 2-10). [75]



Şekil 2-10: Hücre içi büyüme plakasıyla ilişkili gen yolları [75]

2.3.4. The Short-stature Homeobox Gene (*SHOX*)

The short-stature homeobox gene (*SHOX*) geni, ilk olarak 1997'de Rao ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve boy kısalığının önemli bir nedeni olarak gösterilmiştir. 1981'de yapılan çalışmalarda ilk kez, küçük Yp terminalinin delesyonu boy kısalığı ile ilişkilendirmiştir. [76] 1993 yılında yapılan çalışmada, psödootozomal bölgede (PAR) yer alan bir büyüme geninin haplo yetersizliğinin boy kısalığının fenotipine neden olduğu öne sürülmüştür. 1997'de Ercole Rao ve arkadaşları tarafından PAR bölgesinin distal kısmından boy kısalığı ile ilişkili gen klonlandı ve bu gen, "short stature homeobox-containing gene" (*SHOX*) olarak isimlendirildi (Şekil 2-11). [77]



Şekil 2-11: *SHOX* geni yapısı [78]

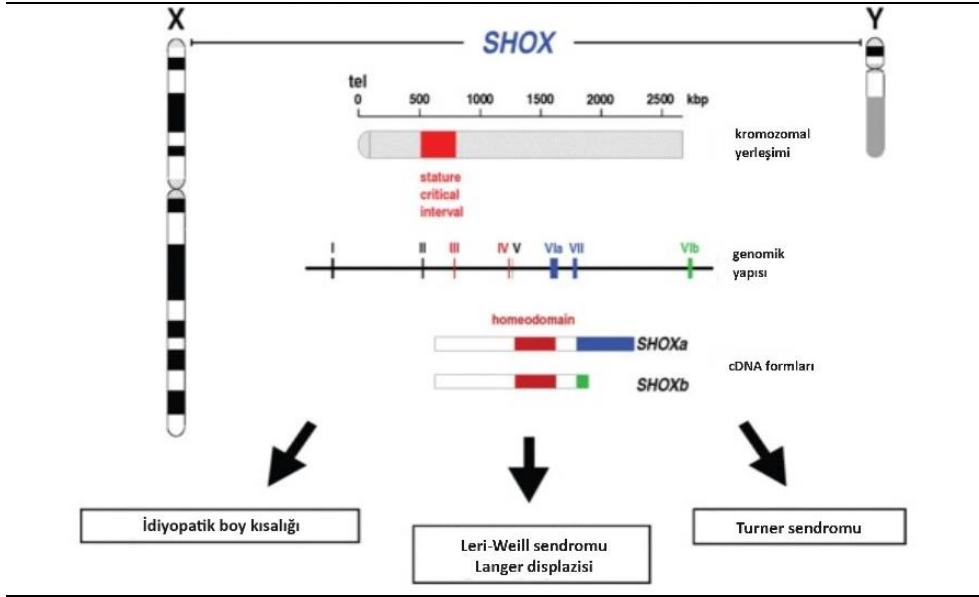
1997’de, Turner sendromunda görülen boy kısalığının *SHOX* geni ilişkili olduğu belirlenerek ilk defa genin mutasyonları bir sendromla bağdaştırıldı. [76]

SHOX geni, X ve Y kromozomlarının psödotozomal bölgesi (PAR1) olan p terminalinde lokalize, geniş bir homeobox gen ailesinin parçasıdır. *SHOX* geni, *SHOXa* ve *SHOXb* proteinlerini (sırasıyla 292 ve 225 amino asit) kodlayan iki farklı izoforma eksprese olan yedi ekzondan oluşur. [79] (Şekil 2-13) Erken embriyonik gelişim döneminde birçok organın oluşumunu ve büyümeyi kontrol eden *SHOX* geninin özellikle üst ve alt ekstremitelerdeki kemiklerin büyümesinde ve olgunlaşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir.

SHOX geni mutasyonları, Gerhard Binder’in 2011’de yaptığı araştırmaya göre, idiyopatik boy kısalığı olan çocukların yaklaşık %2-15’inde görüldüğünü saptanmıştır. [80] *SHOX* geninin işlevi doza bağımlıdır: Bir *SHOX* alelinin işlev kaybına yol açan mutasyon (haploinsufficiency) boy kısalığı ile ilişkilidir.

SHOX geninin birkaç yüz kilobaz aşağısında yer alan ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş kodlanmayan genler (örneğin *CNE4*, *CNE5*, *ECR1* ve *ECS4/CNE9*), enhancer olarak rol oynamaktadır. [78,81] Bu genlerin *SHOX* geni ile etkileşimi in vitro ve in vivo testlerle doğrulanmıştır. Gen boyunca yayılan yanlış ve anlamsız mutasyonlar ya da enhancer bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, *SHOX* ile ilişkili boy kısalıklarını oluşturmaktadır. Bu mutasyonların protein inaktivasyonuna neden olması, nükleer translokasyonu veya *SHOX* geninin dimerizasyonunu bloke etmesi beklenir.

Bu genin tek ya da her iki kopyasının kaybı, farklı büyüklükteki delesyonları, *SHOX* geninin düzenleyici elemanlarında meydana gelen kopya sayısı varyasyonları (CNVs) ve gen içi mutasyonları bazı genetik hastalıklarla ilişkilidir. *SHOX* defekti olan bireyler, normalden, mesomeli ve Madelung deformitesi, Léri-Weill diskondroosteozis (LWD) ve idiyopatik boy kısalığına kadar değişen geniş spektrumlu bir fenotipe sahiptir (Şekil 2-12). [78,82] LWD kısa boy, mezomeli ve bileğin klasik Madelung deformitesi ile belirlenir. Orantısız uzuv kısalması ve Madelung deformitesi genellikle ergenlikten sonra daha belirgin hale gelir ve bu nedenle küçük çocuklarda gözden kaçabilir.



Şekil 2-12: Xp22.3 ve Yp11.3'te bulunan *SHOX* geni ve ilişkili olduğu sendromlar

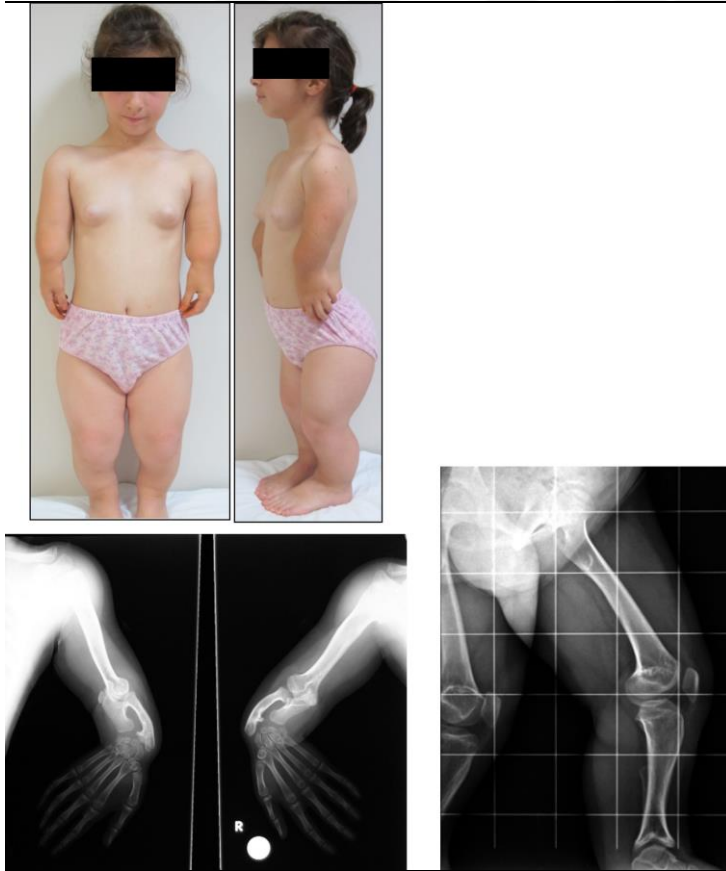
Heterozigot mutasyonlar LWD'ye neden olur ve boy kısalığı vakalarının yaklaşık %2,6-12'sinde görülür. [83] LWD, değişken derecelerde boy kısalığı ve daha hafif iskelet displazisi ile karakterize edilir. [84] Langer mezomelik displazisi, homozigot veya bileşik heterozigot inaktive edici *SHOX* mutasyonlarının neden olduğu en şiddetli ve nadir görülen bir durumdur. Bu durum kritik iskelet displazisi, aşırı boy kısalığı, ulna ve fibula gibi kısa uzun kol ve bacak kemikleri (mesomelia) ve ayrıca bilekte Madelung deformitesi ile karakterizedir. [85]

Léri-Weill Diskondrosteozu (LWD) (OMIM #127300)

Genellikle *SHOX* geninin haployetmezliğinden kaynaklanan Léri-Weill diskondrosteozu, klinik tablosu boy kısalığı, mesomelia ve Madelung deformitesinden oluşan bir genetik defektir. *SHOX* geninin neden olduğu diğer genetik defektlere kıyasla (Langer mezomelik displazisi gibi) ek olarak LWD'li bireylerde baldır kaslarının hipertrofisi, dirseğin taşıma açısının artması, skolyoz ve artan vücut kitle indeksi (BMI) gibi başka özellikler de vardır. Göreceli olarak daha kısa bacaklar ve buna bağlı olarak daha kısa boyların aşırı kilo, kardiyovasküler hastalık (KVH) ve diyabet riskini artırdığına inanılmaktadır. Ancak LWD'nin tip 2 diyabet veya metabolik sendromla birlikteliği literatürde tanımlanmamıştır. *SHOX* gen anomalileri, Léri-Weill diskondrosteozisi olan çocukların ~%70'inde bulunur. [81]

Langer Mezomelik Displazisi (MIM#249700)

Langer mezomelik displazisi (LMD), *SHOX* geninin homozigot veya bileşik heterozigot delesyonları sonucu meydana gelmektedir. LWD'ye göre daha ciddi klinik bulgularla seyreden LMD, belirgin kısa boy, ekstremité aplazisi, küçük bir ulna ve fibula, küçük bir mandibula ile klinik göstermektedir. *SHOX* ile ilişkili anomaliler spektrumunun en şiddetli ucu olan Langer mezomelik displazisi, radius ve kaval kemiğinin kalınlaşması ve eğriliği, ciddi ekstremité aplazisi veya ulna ve fibula'nın ciddi hipoplazisi ve kalınlaşmış ve kavisli radius ve tibia ile karakterizedir. Bu değişiklikler el ve ayaklarda yer değiştirme deformitelerine neden olabilir. Ayrıca, mandibula hipoplazisi de gözlenir. Leonard O. Langer 1967'de yayınladığı makalede bu klinik durumdan 'hipoplastik ulna, fibula, mandibula tipinin mezomelik cüceliği' diye bahsetmiştir. Şekil 2-13'te Langer mezomelik displazisi olan bir olgunun fenotipi ve kol-bacak grafi görüntüleri gösterilmiştir.

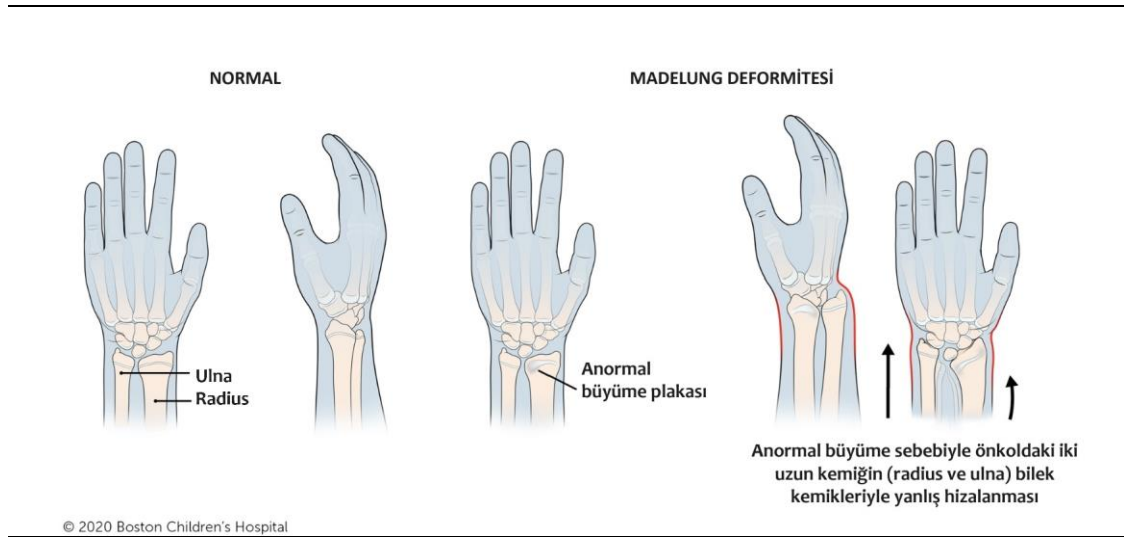


Şekil 2-13: Homozigot *SHOX* delesyonu saptanmış Langer mezomelik displazisi olan olgu görüntüsü (IU ITF, Tıbbi Genetik AD)

Madelung Deformitesi

Madelung'un deformitesi, ön koldaki bir kemik olan radiusun büyüme plakasını etkileyen nadir bir defektir. Büyüme geliştikçe bu anormal büyüme, önkoldaki iki uzun kemiğin (radius ve ulna) bilek kemikleriyle buluştuğu yerde yanlış hizalanmaya neden olur. Anatomik modifikasyonları olan, bilekte radiusun kısalması ve kıvrılması, ulnar başın belirginleşmesi ve karpal kemiklerin palmar ve ulnar deviasyonu olarak görülür. Bu durum genellikle her iki bileği de etkiler, ancak bir taraf diğerinden daha ciddi şekilde etkilenebilir. Madelung deformitesinin belirtileri, bileğin üst kısmındaki hafif bir çıkıntıdan tam bir bilek çıkığına kadar değişebilir. Ayrıca bilekte sınırlı hareket aralığı ve aktiviteden sonra veya sürekli olarak bilek ağrısı görülen belirtileridir. [108]

Madelung'un deformitesinin oluşumunun kesin nedeni bilinmese de, radius'ta büyüme plakasının anormal büyümesiyle, radiusun ucunu bileğin küçük kemiklerine bağlayan bağdaki bir anormallikten de kaynaklandığı söylenebilir. Radiusun sonundaki büyüme plakasında meydana gelen bir deformite, Madelung'a benzer bir deformiteye neden olabileceği de bildirilmiştir. Normal bilek gelişimi ve Madelung deformitesinin görünümü Şekil 2-14'te gösterilmiştir.



Şekil 2-14: Madelung deformitesinin oluşumu [109]

Madelung deformitesi olan olguda ağır hareket kısıtlılığı ya da yoğun ağrısı bulunmuyorsa, düzenli kontrol önerilmektedir. Ancak bahsedilen sorunlar varsa,

ameliyat ile deformitenin kötüleşmesi önlenerek bileğin hareketini kolaylaştırılması sağlanmaktadır.

Bilek deformitesine ek olarak, *SHOX* eksikliğinin daha az belirgin başka belirtileri de vardır. Bu özellikler şunları içerir: dördüncü ve beşinci metakarpaların kısalığı, yüksek damak, dirseğin taşıma açısında artış, skolyoz ve mikrognati. Bireylerin üçte birinde ayrıca baldır kası hipertrofisi olabilir. Bu belirtilerden birinin yokluğu tanıyı dışlamaz. [86]

İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda, *SHOX* genindeki veya onun düzenleyici elemanlarındaki (delesyonlar, duplikasyonlar ve insersiyonlar dahil) anomalilerin prevalansının yaklaşık %6 ila 22 arasında olduğu bildirilmiştir ve genetik testler geliştikçe geldikçe artan prevalans rapor edilmektedir. [78]

2.4. Boy Kısalığı Tanısında Kullanılan Teknikler

2.4.1. Sitogenetik Yöntemler

Sitogenetik yöntemler sayesinde kromozomlar incelenerek olası sayısal ve yapısal dengesizliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Sitogenetik yöntemler, genetik hastalık riski topluma göre kromozom anomali beklentisi daha yüksek olan bireylere önerilmektedir. Postnatal dönemde multipl konjenital anomalisi bulunan, bilişsel yetersizlik, büyüme gelişme geriliği, cinsiyet gelişim anomalileri, infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı endikasyonuna sahip bireylere uygulanabilir. Prenatal dönemde ise ileri anne yaşı (35 yaş ve üzeri), tarama testlerinde risk artışı, patolojik ultrason bulguları, ebeveynlerden en az birinde dengeli kromozom anomalisi taşıyıcılığı, kromozom anomalili çocuk öyküsü ve ICSI (Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) endikasyonu ile gelişen gebeliklerde sitogenetik testler önerilmektedir.

Kromozomları inceleyen sitogenetik alanı iki ayrı başlığa ayrılabilir: Klasik sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler. Klasik sitogenetik yöntemlerle kromozomların hem sayısal hem de yapısal dengesizlikleri mikroskobik düzeyde (8-10 Mb boyutunda) incelemek mümkündür. Moleküler sitogenetik tekniklerle ise submikroskobik düzeyde belirli bölgeye hedefli ve hedefsiz dengesiz kromozom anomalileri saptanabilmektedir. Ancak moleküler sitogenetik ile saptanamayan dengeli yapısal anomaliler, klasik sitogenetik yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

2.4.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler

Klasik sitogenetik yöntemler ile kromozom eldesinde, mitoz bölünme sırasında kromozomların en belirgin olduğu prometafaz ya da metafaz aşamasında hücre bölünmesinin durdurulması ve kromozomların hücre içinden alınarak metafaz plaklarının lamellere aktarılması, ardından kromozomların belirli enzimler yardımıyla boyanarak mikroskop altında değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Kromozom eldesinde mitotik aktivite özelliği bulunan ve nükleusu olan hücreler/dokular kullanılır. Bu hücreler/dokular arasında en yaygın kullanılanlar periferik kan, kemik iliği, koryon villus dokusu ve amniositlerdir.

Metafaz eldesinde kullanılan yöntemler direkt ve kültür yöntemi olarak sınıflandırılabilir. Direkt metafaz eldesi yönteminde spontan mitotik aktiviteye sahip dokuların (kemik iliği, koryon villusları ve prolifer dokular) kullanılmalıdır. Spontan mitotik aktiviteye sahip olmayan hücrelerden hücre proliferasyonu yoluyla metafaz elde etmek için kullanılan kültür yönteminde, in vitro ortamda uygun koşullar sağlanarak hücrelere mitotik aktivite kazandırılmaktadır. Çalışılan dokuya göre belirlenen uygun kültür süresi sonunda kolşemid (inhibe edici ajan) yardımıyla mitoz bölünme metafaz/prometafaz aşamasında durduruldu. Ardından hücrelere hipotonik bir solüsyon uygulanır ve böylece hücrelerin hipertonic yapısının izotonik yapıya dönüştürülmesi sağlanır. Bu sayede kromozomlar birbirinden ayrışır. Hipotonik solüsyon ile muamele edilen hücreler fikse edilir, lam üzerine yayılır ve metafaz plaklarının açığa çıkması sağlanır. Ardından her bir homolog kromozomu diğerinden ayırt edilebilmesini sağlayacak bantlama teknikleri ile kromozomlar boyanır.

En yaygın kullanılan bantlama tekniği G bantlamadır. Bu bantlama tekniği, kromozom üzerindeki histon ve non-histon proteinlerinin bir proteaz enzimi (pankreatin, tripsin vb.) ile denatürasyon edilmesinin ardından Giemsa (GTG) veya Leischman (GTL) boyaları ile kromozomların boyanması temeline dayanmaktadır. Kromozomların koyu ve açık görülen bantları, DNA'nın Adenin (A) ve Timin (T) bazlarından zengin olan bölgelerinin (heterokromatin) koyu, Guanin (G) ve Sitozin (C) bazlarından zengin olan yapısal genlerin bulunduğu bölgelerin (ökromatin) ise açık renkte boyanmamış olarak temsil etmektedir. Bu teknikle elde edilen kromozomlar yaklaşık 450-500 bant düzeyindeyken, daha yüksek bant düzeyleri için hücre kültürüne bazı kimyasallar (Timidin, EtBr, BrdU vb.) eklenerek High Resolution Banding

Technique uygulanabilir. rRNA'yı kodlayan genlerin çok sayıda kopyalarını içeren ve akrosentrik kromozomların satellitleri üzerinde bulunan nükleolar organize edici bölgeleri boyayan teknik NOR boyama tekniğidir.

Benzer kromozom morfolojisini göstermek için diğer alternatif bantlama yöntemleri de bulunmaktadır. Kromozomların sentromerik heterokromatin ve akrosentrik kromozomların uç kısımlarını boyayan C bantlama tekniği bunlardan biridir. R-bantlamada ise, kromozomların G bantlama ile açık boyanan bölgeler tam tersi, yani koyu boyanmaktadır.

2.4.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

Florescence In Situ Hybridization (FISH)

Sitogenetik alanındaki en önemli gelişmelerden biri, belirli kromozom ve kromozom parçalarını tanımlamak için in situ hibridizasyon yoluyla işaretli problemlerin kullanılması temeline dayanan Florescence *In Situ* Hybridization (FISH) tekniğinin geliştirilmesidir. Klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan submikroskopik anomalileri tespit etmek ve saptanan kromozom anomalilerinin karakterize edilip araştırılması için FISH tekniği kullanılmaktadır. Sitogenetik ile moleküler genetik yöntemleri arasında anomalilerin araştırılması açısından köprü gören FISH tekniği, klasik sitogenetik için tamamlayıcı rol oynamaktadır.

İlk olarak 1969 yılında yerinde hibridizasyon tekniği olarak geliştirilen teknik ile, hibridize nükleik asitlerin kromozomal konumu belirlemek için güçlü araçlar olduğu saptandı. Daha sonra floresan etiketler geliştirilerek hibridizasyon problemlerindeki radyoaktif etiketlerden daha güvenilir, stabilite ve tespit kolaylığı sağlayan tekniği geliştirildi. Floresan in situ hibridizasyon (FISH), biyotin veya digoksisinin gibi bir hapteni içerecek şekilde nükleik asitlerin kimyasal olarak değiştirilebileceğinin ve bunun da avidin veya anti-digoksisinin gibi floresan etiketli bir raportör molekülle tespit edilebileceğinin keşfiyle başladı. Prob hazırlama ve etiketleme teknikleri zamanla değiştirildi ve basitleştirildi. Artık florofor içerikli etiketli problemlerin kombinasyonları ile nükleotidler doğrudan etiketlenebilmekte ve böylece zahmetli olan adımlar ortadan kaldırılarak yöntemler kolaylaştırılmıştır. [87]

Metafaz kromozomlarında veya interfaz nükleusundaki bir gene ya da genin içindeki belli bir bölgeye ait özgün bölgelere ait DNA dizilerinden oluşan lokusa özgü

problar, yaklaşık 15-500 kb büyüklüğündedir. DNA'nın farklı bölgelerine bağlanabilen problar tekrar bölgelerine özgün olarak da tasarlanabilmektedir. Alfa satellit, beta satellit ve telomerik problar özgün tekrar bölgelerine sahip dizilerden oluşmaktadır ve sentromerik, perisentrik, akrosentrik anomalilerin ya da marker kromozomların kökeninin araştırılmasında kullanılmaktadır.

Subtelomerik bölgeler için kullanılan subtelomerik problar kromozomların yeniden düzenlemelerinin ve kriptik değişimlerinin tespitinde ve spesifik olarak MKA/MR endikasyonlu grubun analizlerine yardımcı olarak kullanılmaktadır.

Kromozomların kısa kolunu (p) ve uzun kolunu (q) terminal bölgesine kadar tamamı olacak şekilde boyayabilen “whole chromosome painting (WCP)” ve kromozomların kollarını ayrı renklerde boyayan “arm specific” problar, yeniden düzenlenen kromozomların yapısının araştırılmasında kullanılmaktadır.

a-CGH (Array Comparative Genomic Hybridization)

Array Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon tekniği, mikroarray ve CGH (Comparative Genomic Hybridisation) tekniklerinin birlikte kullanılması ile ortaya çıkmıştır. Mikrodizin çalışmalarının öncüsü olan CGH yöntemi, incelenen ve kontrol DNA'ların floresanlı boyalar ile işaretlenmesi, metafaz kromozomlarıyla hibridizasyonu ve ardından mikroskopta görüntülenerek iki DNA örneğinin floresan sinyallerinin birbiriyle karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Kromozomlardaki genomik dengesizliğin iki farklı renkteki floresan renginin yardımıyla görünmesi sayesinde delesyon ve duplikasyonlar tanımlanmaktadır. Bu tüm genomun incelenmesi hedeflenirken, kromozomların perisentromerik ve terminal bölgelerindeki düşük hassasiyet ve kısıtlı rezolüsyon, uygulama ve analiz zorluğu sebebiyle yaygın kullanım zorlaşmıştır. [88]

İlk olarak 1996'da temelleri atılan a-CGH tekniği, iki farklı floresan boya ile etiketlenmiş DNA örneklerinin (referans ve incelenen hasta örneği) slayt üzerine immobilize edilmiş DNA ile hibridizasyonu temeline dayanmaktadır. Hibridizasyon sürecinin gerçekleştiği çip üzerinde tüm genom ve hedef bölgeler için tasarlanmış oligonukleotidler (problar) bulunmaktadır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve mikrodizin teknolojilerinin birleştirilmesi genomdaki dengesizlikleri DNA düzeyinde araştıran a-CGH tekniği, birden fazla genom birbiriyle karşılaştırılabilmesi, çalışma için

az miktarda DNA örneğinin yeterli olması, genomdaki kb düzeyindeki değişikliklerin saptanabilmesi açısından oldukça avantajlıdır. Probların kapsadığı oranda spesifik olarak gen bölgelerinde, çözünürlüğü yüksek şekilde ve yaklaşık 1 kb boyutuna kadar değişimler tespit edilebilmektedir. [89]

Çip tüm genom veya hedef bölge için tasarlanmış oligonukleotidler (problar) içermektedir ve hibridizasyon işlemi de probların bulunduğu bu çip yüzeyinde gerçekleşmektedir.

Sitogenetik yöntemlerin yanında submikroskopik kromozom değişimlerinin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Kanseri, prenatal ve postnatal çalışmalarda uygulanması mümkündür. Array-CGH yöntemi çalışıldıktan sonra Illumina, Agilent ve Affymetrix veya özgün tasarım platformlarında analizleri yapılmaktadır. Uygulanan platform ve kit çözünürlüğüne göre elde edilen verilerin analiz edildiği programlar değişiklik gösterebilmektedir. Agilent platformu genomik kopya sayısı değişikliklerini saptamaya yönelik dizayn edilmiştir ve 50-70 kb büyüklüğündeki probların çalışılmasına uygundur. Diğer platformlardan olan Illumina ve Affymetrix ise SNP genotiplemesine dayalı olsa da, CNV probları eklendiğinde genomik kopya sayısı değişimlerini de saptamaktadır.

2.4.2. Moleküler Yöntemler

DNA Dizileme Yöntemleri

Genomun yapısını ve kontrol mekanizmalarını aydınlatan DNA'nın dizilenmesi süreci 1965 yılında R. Holley'in 74 nükleotidlik tRNA molekülünü dizilemesine dayanmaktadır. İnsan Genom Projesi ve beraberinde ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), HapMap projeleriyle canlı genomunun organizasyonu, dizilimi ve fonksiyonu belirlenmeye ve aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan teknikler de genomun dizilenmesi için Sanger, ikinci nesil, üçüncü nesil yüksek kapasiteli paralel dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu sayede genomun ve fonksiyonlarının analizleri ile çeşitli hastalıkların genetik temellerinin araştırılmasına ve aydınlatılmasına imkan sağlanmıştır. [90]

2.4.2.1. Sanger Dizileme

Günümüzde genetik tanıda en sık kullanılan DNA dizileme yöntemlerinden olan Sanger dizileme 1975 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir. Zincir

uzamasının sonlandırılması temeline dayanmaktadır. Oligonukleotid primer, deoksiniükleotid trifosfat (dNTP), her biri farklı renkte ve dalga boyunda ışıma yapan floresan boyalarla işaretlenmiş dideoksi nükleotid trifosfat (ddNTP) ve DNA polimeraz kullanılarak yeniden sentezlenmesi sağlanan DNA kalıbına zincir uzama aşamasında floresan işaretleri nükleotidler eklenir. Her basamak sonunda uzaması sonlandırılmış fragmanlar elde edilir. Ürün olarak elde edilen dizi fragmanlarının her birinin 3' ucunda belli bir floresan ddNTP bağlanmış olarak bulunmaktadır. Dizilerin taşıdıkları floresan sinyallerine göre dizilerinin belirlenmesi için kapiller jel elektroforezine yükleme yapılır ve dizileme gerçekleşir. Sanger dizileme genetik hastalıklarla ilişkili baz değişimlerinin belirlenmesi, gen polimorfizmlerinin araştırılması için sıkça kullanılmaktadır. [91]

2.4.2.2. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (YND) teknikleri, 1970'lerin sonları ve 1980'lerin başlarında DNA dizileme alanında önemli gelişmelerin yaşandığı bir dönemde ortaya çıkmaya başlamıştır. Ancak, YND teknolojisinin gerçek anlamda ortaya çıkışı ve gelişimi 2000'lerin başlarında olmuştur. İlk olarak 454 Life Sciences (Roche) firması, DNA'yı çoklu parçalara bölen ve ardından paralel olarak dizilenen bir teknoloji olan "pyrosequencing" yöntemini geliştirilmesiyle yeni nesil dizileme çalışmaları başlamıştır. Bu yöntem, aynı anda yüz binlerce DNA parçasının dizilenmesini sağlamıştır. Daha sonra, Solexa (Illumina) tarafından geliştirilen bir diğer önemli YND teknolojisi olan "Sequencing by Synthesis (SBS)" piyasaya sürülmüştür. Bu teknoloji ile DNA parçalarının sentezlenerek dizilenmesini sağlanmış, yüksek miktarda veri üretilenmiştir.. 2005 yılında, üçüncü nesil dizileme yöntemlerinden biri olan "Single Molecule Real-Time (SMRT)" teknolojisi, Pacific Biosciences (PacBio) firması tarafından duyurulmuştur. Bu teknolojiyle beraber tek bir DNA molekülünün gerçek zamanlı olarak dizilenmesiyle uzun DNA parçalarını okuması sağlandı. 2014 yılında Oxford Nanopore Technologies, nanopor tabanlı dizileme teknolojisini piyasaya sürmüştür. Bu teknoloji, elektronik sensörlerle DNA'nın nanoporlardan geçişini izleyerek dizileme temeline dayanmaktadır ve taşınabilir cihazlarla gerçek zamanlı veri elde etme olanağı sağlamıştır. Bu yenilikçi teknolojilerin geliştirilmesi ve iyileştirilmesiyle YND, genetik araştırmaların ve genomik çalışmaların temel bir aracı haline gelmiştir.

Sanger dizileme gibi eski nesil yöntemlere kıyasla çeşitli avantajlar sunan yeni nesil dizileme teknikleri, birden fazla genin ya da genomdaki tüm genlerin birden fazla örnekle eş zamanlı olarak tek bir test ile dizilenmesine olanak sağlamıştır. Yüksek verimlilik ve hızda olması, daha düşük maliyet sebepleriyle daha avantajlıdır.

Yeni Nesil Dizileme teknikleri olarak çeşitli seviyelerde dizileme sağlayabilen hedefli gen panelleri, hastalık ilişkili birçok genin eşzamanlı dizilenmesini içeren klinik ekzom dizileme, tüm ekzom dizileme (TED), tüm genom dizileme (TGD), tüm genom dizilemeyle ilişkili ekspresyon çalışmaları, RNA dizileme ve metagenomik çalışmaları bulunmaktadır. Genomun kodlanmayan bölgeleri dahil olmak üzere genomik bilginin en kapsamlı halini araştıran Tüm Genom Dizileme yönteminin yanısıra Tüm Ekzom Dizileme yöntemi genlerin işlevsel elementlerini dizilediğinden (tüm genomun %1,5'i) genetik nadir hastalıkların tanısında daha sık kullanılmaktadır. Ayrıca sadece araştırılmak istenen hastalıkla ilişkili genleri içeren hedefli dizileme yöntemi olan gne panelleri de oldukça sık kullanılan Yeni Nesil Dizileme tekniklerindendir. Hedeflenen genler %99'a kadar kapsanabilmektedir ve genetik heterojeniteye sahip hastalıklar için daha düşük maliyetli yüksek kapsamlı dizilemeye olanak sağlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Bu tez çalışması için belirlenen olgular, Ocak 2020- Eylül 2023 tarihleri arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalına boy kısalığı sebebi ile başvurmuş etkilenmiş hasta grubunda gerçekleştirildi. Non sendromik boy kısalığı bulunan etkilenmiş olgular çalışmaya alınırken, boy kısalığı fenotipinin yanında sendromik bulguları olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Kriterlere uygun seçilen 125 olgu, bilgilendirilmiş onam formları ve onayları alınarak periferik kan örneklerinin incelenmesini kabul etmiş ve çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın ayrıca etik uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik kurulu tarafından etik uygunluğu onaylanmıştır. (Tarih:05.10.2022, tarih ve Sayı: 1290653 sayı).

3.2. Olguların Klinik Değerlendirmesi

Olguların cinsiyet, yaş, antenatal ve natal öyküleri sorgulanarak ayrıntılı fizik muayene sonucunda elde edilen verileri (özellikle boy uzunluğu, kilo, kulaç boyu, baş çevresi) dosyalarına kaydedildi. Özellikle *SHOX* geni mutasyonları ile ilişkili Madelung deformitesi gibi belirgin bulgular kontrol edildi. Ayrıntılı aile öyküsü alınarak en az üç kuşak içeren pedigriler hazırlandı. Olguların doğumdan itibaren tüm verileri karşılaştırılarak not edildi. Gebelik dönemindeki dış etkenler (teratojen maruziyeti, sigara kullanımı vb.) sorgulandı ve dışlandı. Psikososyal çevre, beslenme öyküsü, sosyo ekonomik durumlar da gözetilerek, laboratuvar bulguları da istendi. Özellikle endokrin bulguları incelenerek büyüme hormonu eksikliği gibi endokrinolojik sebepler dışlandı.

3.3. Klasik Sitogenetik Yöntemler

Olgulardan alınmış olan periferik kan örneklerinden, her örnek için en az iki hücre kültürü oluşturuldu. Mitoz bölünen hücrelerin senkronizasyonu sağlanarak prometafaz aşamasında bölünmesi durduruldu ve metafaz plakları elde edildi. Sırasıyla kültür, harvest, yayma ve bantlamadan sonra kromozom analizi gerçekleştirildi. Klasik karyotipleme yöntemi uygulanarak, olgulardaki sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin dışlandı.

3.3.1. Kültür Aşaması

Öncelikle 5 ml steril enjektör içerisine 0.3 ml heparin çekildi ve heparinin enjektörün tüm iç yüzeyine yayılması sağlandı. Heparinli enjektöre, her hastadan yaklaşık 2 ml kan alındı ve kanın heparinle karışması için hafifçe çalkalandı, böylece heparinin kanın pıhtılaşmasını önlenmesi ve plazma eldesinin kolaylaştırması amaçlandı. Enjektör üzerine hasta bilgileri yazılı etiket yapıştırıldı.

Periferik kanların bulunduğu enjektörler steril kabine alınarak ekim aşamasına geçildi. Hasta bilgilerine göre etiketlenirilmiş steril tüplere 5 ml PB-MAX Karyotyping Medium (Gibco™) konuldu. Ardından her enjektörden 0.04 ml (yaklaşık 5 damla) olacak şekilde periferik kan tüplere eklendi. Son olarak her tüpe 0.04 ml mitotik uyarıcı olan Phytohaemagglutinin-M (PHA-M) ilave edildi. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak karışması için hafifçe çalkalandı ve 37°C etüve kaldırıldı.

Periferik kandan kısa süreli hücre kültürü 72 saat sürmektedir. 67 saat 37°C etüvde bekletilen kültürlerle 48. saatte 2 damla (önceden hazırlanmış 1gr timidin+67ml Bazal medyum solüsyonu) timidin eklendi. Bu sayede hücre bölünmesi G1/S sınırında inhibe/bloke edilip tüm hücrelerin senkronize olması ve daha fazla hücrenin prometafaz aşamasında yakalanması sağlandı. Timidin eklenmesinden sonra tüpler yeniden 37°C etüve kaldırıldı. 67. Saatte timidinin uzaklaştırılması için tüm tüpler 10 dakika 1200 rpm santrifüj edilip 0.5 ml süpernatant bırakılacak şekilde süpernatantlar atıldı ve kaldırılarak 5 ml PB-MAX eklendi. Tüpler yeniden etüve kaldırıldı.

71. Saatte tüm tüplere 0.04 ml (final konsantrasyonu 0.2 g/ml olan) stok colcemid solüsyonu eklendi. Kültürler 1 saat daha inkübe edildikten sonra kromozom eldesi aşamasına geçildi.

3.3.2. Harvest Aşaması

72. saatin sonunda kültür edilmiş tüpler, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Her tüpün dibinde 0,5 ml süpernatant kalacak şekilde tüplerdeki süpernatantlar atıldı ve dipteki hücreler kaldırıldı. 37°C su banyosunda bekletilmiş 0.075 M KCl her tüpe ilave edilerek tekrar 37°C etüve kaldırıldı ve tüpler 7 dakika boyunca hipotonik şoka maruz bırakıldı. Bu esnada 3:1 metanol:asetik asit oranında fiksatif solüsyonu hazırlanarak (her tüp için yaklaşık 21 ml olacak şekilde) +4°C dolaba kaldırıldı. Yedi dakikanın sonunda tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar her tüpte 0,5 ml bırakılacak şekilde atıldı ve dipteki hücreler vorteksle kaldırıldı. Tüp vorteks

üzerindeyken damla damla önceden hazırlanmış fiksatif eklenerek tüm tüplerin ilk fiksasyon aşaması tamamlandı. Fiksasyon, hücrelerin sabitlenmesi ve hücre membranındaki suyun uzaklaştırılarak elastikiyetinin kaybına, yani hücrelerin sabitlenmesine neden olur. Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve 2 kez daha aynı işlemler tekrarlandı. Böylece kültür tüpleri toplamda 3 kez fiksatif ile yıkanmış oldu.

3.3.3. Yayma ve Bantlama Aşaması

Son yıkama aşamasında 0.5 ml süpernatant kalacak şekilde süpernatantlar atıldı. Pelet bir pipet yardımıyla homojen hale getirildi. Yayma aşamasına geçilirken en önemli detay olan odanın neminin %45-48 ve sıcaklığının 23-24°C olmasına dikkat edildi. Hastaya özel etiketlenmiş lam üzerine nefes verilerek lamın buğulanması sağlandı ve yaklaşık 45° açıdan 50 cm yukarıdan 1-2 damla damlatılarak yayma işlemi gerçekleştirildi. Yayma yapılan lam inverted mikroskopta kontrol edilerek mitotik indeks ve sitoplazma kalıntısı kontrol edildi, duruma göre yayma tekniği geliştirilerek, her hasta için 3-4 lam olacak şekilde yayma bitirildi. Preperatlar kuruduktan sonra 45 saniye U.V. ışık altında bekletildi ve eskitildi (yaşlandırıldı). GPL bantlamasına geçmeden önce gerekli solüsyonlar hazırlandı.

Stok Leishman solüsyonu: 1 gram leishman boyası (Sigma) ve 500 ml metanol (Merck) karıştırılır ve 70°C su banyosunda çözündürülür. Çözelti 1 gece oda sıcaklığında bekletilir.

Stok Gurr buffer: 1 adet Gurr buffer tablet (0.47 gr/lt $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.47 gr/lt KH_2PO_4)(merck) 1 litre distile suda çözündürülür ve pH'nın 7 olduğu kontrol edilerek 1 gece oda sıcaklığında bekletilir.

PBS çözeltisi: 8 gr NaCl (M:58,44 gr/mol-merck), 0.2 gr KCl (M: 74,55 gr/mol-Riedel-de haen), 0.2 gr K_2HPO_4 (M: 136,09 gr/mol), 1.44 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M: 177,99 gr/mol) tartılır ve hepsi 1 litre distile suda çözündürülür. (pH:7 olmalıdır)

Pankreatin solüsyonu: 0.1-0.2 gr (sıcaklık, nem, kromozom kalitesine göre değişmektedir) tartılan pankreatin ile 100 ml PBS çözeltisi karıştırılarak 37°C su banyosunda solüsyon ısınana kadar bekletilir.

Boya hazırlanması: 80 ml Gurr buffer üzerine 20 ml stok leishman boya konularak, boyanın ısısının 23°C gelmesi beklenir.

Hazırlanan pankreatin ve boya solüsyonlarına ek olarak distile su içeren 5 adet cam şale hazırlandı. Eskitilmiş lamalar önce 37 derecedeki pankreatin solüsyonunda 35 saniye bekletildi (Bu süre sıcaklık, nem, kromozom kalitesine göre değişebilmektedir.) Pankreatinden çıkarılan lamalar distile su içerisinde birkaç saniye bekletildikten sonra boya çözeltisine konarak ve 2 dakika bekletildi. Ardından boyanın arındırılması için distile su içeren üç şalede yıkama işlemi yapıldı. Mikroskop altında incelenen preparatlardaki metafaz görüntüleri ve bant kalitelerine göre pankreatin süresi düzenlenerek bitirildi.

3.3.4. Analiz

Bantlanan preparatlar metafaz tarama cihazına yerleştirildi. Cihaz tarafından çekilen metafaz görüntülerinden her hasta için en az 20 metafaz alanı analiz edildi.

3.4. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

3.4.1. FISH İncelemesi

Florescence *In Situ* Hybridization (FISH) tekniği spesifik kromozom anomalilerini ve klasik karyotiplemeyle görülmeyen submikroskopik delesyonları tespit etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada, *SHOX* geni bölgesine özgün prob kullanılarak FISH incelemesi yapılmıştır ve bu sayede *SHOX* genindeki submikroskopik delesyon ve duplikasyonların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3.4.1.1. Örneğin Hazırlanması

Öncesinde klasik karyotipleme için çalışılmış ve fiksatifli hücre dipleri saklanmış olan örnekler tekrar yayma için hazırlandı. Nemi %45-55 ve sıcaklığı 23-24°C olarak yayma için optimum şartlar hazırlandıktan sonra her olgudan 1 lam yayıldı. Mikroskopta yeterli metafaz ve interfaz hücrelerinin kalite ve miktarı kontrol edildi.

3.4.1.2. Hibridizasyon Aşaması

Tüm olgulara *SHOX* genine özgün *SHOX* probu çalışıldı. 1 µl prob, 5 µl hibridizasyon solüsyonu ile karıştırılarak lam üzerindeki metafaz ve interfaz yoğunluğunun en çok olduğu bölgeye konuldu. Ardından yaklaşık 45° açıyla probu kapsayacak şekilde lam üzerine lamel kapatıldı. Preparatlar hibridizasyon cihazına

yerleştirildi. 5 dakika 72°C denatürasyondan sonra gece boyu 37°C’de bekleyecek şekilde hazırlanmış program ayarlanarak lamalar hibridizasyona bırakıldı.

3.4.1.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Hibridizasyon sonrasında lamalar üzerinden lameller çıkarıldı. Lamalar ilk olarak 72°C 2xSSC solüsyonunda 1 dakika bekletildi. Ardından oda ısısındaki 0,4xSSC solüsyonunda 1 dakika yıkandı. Yıkamaları yapılan preparatların kuruması beklenmeden her birine 5 µl DAPI damlatıldı ve lamel kapatıldı.

3.4.1.4. Analiz ve Değerlendirme

FISH tarama cihazına yerleştirilen preparatlar, DAPI, FITC ve Texas red filtrelerinde incelenecek şekilde ayarlanarak taratıldı. Cihaz tarafından çekilen metafaz ve interfaz alanları incelenerek analiz edildi.

3.4.2. Array-CGH Çalışması

Array-CGH (a-CGH), karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve mikrodizin teknolojisi sayesinde genomdaki dengesizlikleri DNA düzeyinde inceleme imkanı sunan bir moleküler sitogenetik yöntemidir.

Bu çalışma için, klasik karyotipleme ve FISH incelemelerinde herhangi bir anomali saptanmamış 20 olgu seçildi. Uygulanan a-CGH tekniğindeki mikroarray 4x180K array tipi, CGH+SNP prob tipi, 180K prob sayısı ve 7,3 Kb prob mesafesi özelliklerine sahiptir.

Array-CGH çalışmasındaki iş akışı sırasıyla Şekil 3-1’de gösterildiği gibi oluşturulmuştur.



Şekil 3-1: a-CGH iş akış şeması.

3.4.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmanın ilk aşamasında, olgulardan alınan periferik kan örneğinden DNA izolasyonu yapmak için otomatik DNA izolasyon cihazı ve EZ1&2 DNA Blood Kit kiti

(Qiagen) kullanıldı. Elde edilen DNA örneklerinin saflığının ve yoğunluğunun belirlenmesi için Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) kullanıldı. Spektrofotometrik olarak ölçülen DNA saflığı A260/280 nm ve A260/230 nm dalga boylarındaki kriterler ölçütünde değerlendirildi. (İdeal saflık için değerlerin 1,60 ve 2,00 arasında olması gerekmektedir.)

3.4.2.2. DNA'nın Kesilmesi

DNA'nın uygun uzunlukta parçalarının elde edilebilmesi için hem hasta hem de hasta ile aynı cinsiyetteki referans örneklerine RSA ve Alu1 restriksiyon enzimleri kullanıldı. Soğuk blok üzerine yerleştirilen 0,2 µL'lik PZR tüplerine her örnek için 500 ng DNA eklendi. Ardından kite uygun olarak 2 µl nükleaz içermeyen dH₂O, 2,6 µl 10x restriksiyon enzim tamponu, 0,2 µl Bovine serum albumin eklendi ve karıştırıldı. Son olarak restriksiyon enzimi olarak 0,5 µl Alu I ve 0,5 µl Rsa eklendi.

Karışım öncelikle 2 saat 37°C'de enzimlerin aktivasyonu için bekletildi ve ardından 20 dakika 65°C'de inkübe edildi. İşlem sonucunda örnekler soğuk blok içinde -20°C soğutucuya kaldırıldı.

3.4.2.3. Hasta ve Referans DNA'ların İşaretlenmesi

Daha önce kesilen DNA örnekleri her hasta ve referans örnekleri için hazırlanmış 0,2 µL'lik PZR tüplerine alındı ve 95°C'de 3 dakika boyunca denatüre edildi. Denatürasyon sonunda tüpler soğuk blok üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. İşaretleme (labelling mix) solüsyonu her örnek için 2 µl nükleaz içermeyen dH₂O, 10 µl 5x reaksiyon tamponu, 5 µl 10x dNTPs ve 1 µl Exo (-) Klenow enzimi ve 3 µl florokromlu dUTP eklendi. İşaretleme solüsyonlarında referans DNA için Cyanine5 (Cy5) (mavi) kullanılırken, hasta DNA örneği için DNA Cyanine3 (Cy3) (pembe) kullanıldı.

Hazırlanan işaretleme solüsyonu DNA örneklerine karıştırıldıktan sonra santrifüj edildi ve 37°C termal döngü cihazında 2 saat, 65°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından tüpler soğuk blok üzerine alınarak -20°C soğutucuya kaldırıldı.

3.4.2.4. Pürifikasyon

İşaretlenmiş DNA örnekleri High Pure PCR Template Preparation kiti kullanılarak saflaştırıldı.

Örnek DNA sayısı kadar mikrosantrifüj tüpü filtreli kolon içerecek şekilde hazırlandı. Kolonların içerisine 430 ul TE tamponu ve DNA örnekleri eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüpler 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra filtreden süzülen sıvı atıldı. Her kolona 480 ul TE tamponu eklendikten sonra 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen kolonlar ters çevrildi ve yeni tüplere yerleştirildikten sonra 1000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Yeni tüplere aktarılmış saflaştırılmış DNA örnekleri soğuk blok üzerine alındı ve kolonlar atıldı. Nanodrop cihazı yardımıyla pürifike DNA örneklerinin konsantrasyon ve floresan boya absorpsiyon değerleri ölçüldü.

3.4.2.5. Hibridizasyon

Nanodrop ile ölçülmüş konsantrasyon ve absorbans değerlerine göre her örnek için spesifik aktivite ve hibridizasyon için kullanılması gereken son hacim değerleri hesaplandı. Her örnek için hesaplanmış DNA miktarı, örneğe göre etiketlenmiş 0,2 mL'lik PZR tüplerine eklendi. Eklenen DNA örneği dahil toplam hacim 39 µl olacak şekilde tüplerin üzerlerine nükleaz içermeyen dH₂O eklendi.

Ardından her örnek için hibridizasyon karışımı hazırlanması için kite uygun olarak 5 µl Cot-1 DNA (1 mg/mL), 11 µl 10x a-CGH Blocking Agent ve 55 µl 2x HI-RPM solüsyonları karıştırıldı. Toplam 71 µl olan hibridizasyon solüsyonları, örneğin içinde bulunduğu tüplere eklendi ve toplamda 100 µl karışım elde edildi. Hibridizasyon için hazırlanmış örnekler 95°C'de 3 dakika ve sonrasında 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Yükleme slaytı üzerinde örneklerin yerleşim yerleri belirlendikten sonra inkübe edilmiş örnekler her birinden 100 µl olacak şekilde ilgili bölgeye yüklendi. Yükleme yapıldıktan sonra, a-CGH problemleri içeren slayt, barkod konumlarına dikkat edilerek yükleme slaytı üzerine kapatıldı. Önceden ısıtılmış hibridizasyon fırınına yerleştirilen yükleme slaytı 67°C 20 rpm'da yaklaşık 20 saat inkübe edildi.

3.4.2.6. Yıkama

Inkübasyon için geçen 20 saatin sonunda slaytlar yıkama aşamasına alındı. Bu aşama için slaytların yıkanması için hazır olan kit kullanıldı. Yükleme slaytı ve problemleri içeren a-CGH slaytı, oda sıcaklığındaki Yıkama-1 solüsyonu içerisinde bir penset yardımıyla slaytlar birbirinden ayrıldı. Yükleme slaytı bir slayt tutucu içerisine yerleştirildi. Slayt, manyetik karıştırıcı üzerinde Yıkama-1 solüsyonunda 5 dakika,

ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerindeki Yıkama-2 solüsyonunda ise 1 dakika boyunca yıkandı. Ardından manyetik karıştırıcı üzerindeki asetonitrilde 10 saniye yıkanan slayt, stabilize edici ve kurutucu solüsyon içerisinde 30 saniye yıkandı.

3.4.2.7. Tarama ve Analiz

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra slaytlar Agilent Technologies SureScan Microarray Scanner cihazına yerleştirildi. Tarama cihazında uygun program kullanılarak tarama işlemi başlatıldı. Tarama sonunda elde edilen ve prob bağlanma bilgilerini içeren görüntü dosyası Agilent Feature Extraction for CytoGenomics analiz programına aktarıldı ve .txt dosya formatına dönüştürüldü. CytoGenomics (ver.5.1.2.1, Agilent) kullanılarak a-CGH verileri analiz edildi.

Analiz edilirken standart hata ve log2 ratio değerlerine göre düşük kaliteli problara bölgeleri dışlandı. Ardından standart filtreleme yapılarak minimum prob bağlanma sayısı 3 olarak belirlendi. Delesyon ve duplikasyon için minimum KSD boyutu 50 ve 100 kb olarak belirlendi. Hasta ve referans genomdaki prob bağlanma oranlarının karşılaştırılmasıyla saptanan değişimler için biyoinformatik analizler ve klinikle ilişkisi için belirli veri tabanları kullanıldı. Kullanılan veri tabanları şunlardır: Database of Genomic Variants (DGV), DECIPHER, Franklin (by Genoox), Online Inheritance in Man (OMIM), ACMG, ClinVar, HGMD.

3.5. Moleküler Yöntemler

3.5.1. Ion Torrent Tabanlı Gen Paneli ile Dizileme

Yeni Nesil Dizileme yöntemi kullanılarak *SHOX* geninin milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak yüksek sayıda ve yüksek çözünürlükte dizilenmesi planlandı. Yeni Nesil Dizileme yöntemi olarak Ion Torrent (Thermo Fisher) PGM platformu seçildi ve panel gen testi tasarlandı. Böylece *SHOX* geninin yanısıra boy kısalığı ile ilişkili birçok genin eş zamanlı olarak dizilenmesi amaçlandı.

3.5.1.1. Hedef Genlerin Belirlenmesi

Hedef genler belirlenirken profesyonel veritabanları olan OMIM ve HGMD kullanıldı ve güncel literatürler incelendi. Panel çalışması için seçilen kitteki 25 gen ve boy kısalığı ile ilişkisi Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Boy kısalığı panel çalışmasındaki genler, kalıtım modelleri ve ilişkili oldukları klinik

GEN	LOKUS	KALITIM	İLİŞKİLİ OLDUĞU KLİNİK (OMIM)
<i>BMP4</i>	14q22.2	OD -	Sendromik mikroftalmi 6 (607932) Orofasiyal yarık 11 (600625)
<i>FGF8</i>	10q24.32	OD	Hipogonadotropik hipogonadizm 6 (612702)
<i>FGFR1</i>	8p11.23	SMo OD OD OD OD OD OD	Ensefalokraniyokutanöz lipomatoz (613001) Hartsfield sendromu (615465) Hipogonadotropik hipogonadizm 2 (147950) Jackson-Weiss sendromu (123150) Osteoglofonik displazi (166250) Pfeiffer sendromu (101600) Trigonosefali 1 (190440)
<i>GH1</i>	17q23.3	OR - OD OR	İzole büyüme hormonu eksikliği tip 1A (262400) İzole büyüme hormonu eksikliği tip 1B (612781) İzole büyüme hormonu eksikliği tip 2 (173100) Kowarski sendromu (262650)
<i>GHR</i>	5p13.1-p12	OR - - OD	Laron sendromu (262500) Büyüme hormonuna artan yanıt Parsiyel büyüme hormonu duyarsızlığı (604271) Ailevi hiperkolesterolemi (143890)
<i>GHRH</i>	20q11.23		İzole büyüme hormonu eksikliği GHRF hipersekresyonu nedenli gigantizm
<i>GHSR</i>	3q26.31	OD, OR	İzole parsiyel büyüme hormonu eksikliği (615925)
<i>HESX1</i>	3p14.3	OD, OR OD, OR OD, OR	Hipofiz anomalileri ile giden büyüme hormonu eksikliği (182230) Kombine hipofiz hormon eksikliği 5 (182230) Septooptik displazi (182230)
<i>HHIP</i>	4q31.21		Kombine hipofiz hormon eksikliği (606178)
<i>IGF1</i>	12q23.2	OR	Sağırılık ve bilişsel gerilik ile giden büyüme geriliği (608747)
<i>IGF1R</i>	15q26.3	OD,OR	IGF-1 direnci (270450)
<i>IGFALS</i>	16p13.3		Asit-kararsız alt ünite eksikliği (615961)
<i>IGFBP3</i>	7p12.3		Büyüme inhibitörü olarak etkilidir.
<i>IGSF1</i>	Xq26.1	X'e bağlı resesif	Santral hipotiroidizm ve testiküler genişleme (300888)
<i>LHX3</i>	9q34.3	OR	Kombine hipofiz hormon eksikliği 3 (221750)
<i>LHX4</i>	1q25.2	OD	Kombine hipofiz hormon eksikliği 4 (262700)
<i>OTX2</i>	14q22.3	OD OD OD	Sendromik mikroftalmi 5 (610125) Kombine hipofiz hormon eksikliği 6 (613986) Erken başlangıçlı retinal distrofi (610125)
<i>POU1F1</i>	3p11.2	OD, OR	Kombine hipofiz hormon eksikliği 1 (613038)
<i>PROKR2</i>	20p12.3	OD	Hipogonadotropik hipogonadizm 3 (244200)
<i>PROP1</i>	5q35.3	OR	Kombine hipofiz hormon eksikliği 2 (262600)
<i>SHH</i>	7q36.3	OD OD - OD	Holoprozensefali 3 (142945) Kolobomlu mikroftalmi 5 (611638) Şizensefali (269160) Üst çenede santral tek kesici diş (147250)
<i>SHOX</i>	Xp22.33	OR OD -	Langer mezomelik displazi (249700) Leri-Weill diskondrostoza (127300) Ailevi idiyopatik boy kısalığı (300582)
<i>SOX3</i>	Xq27.1	X'e bağlı kalıtım	İzole büyüme hormonu eksikliği ile giden bilişsel gerilik (300123) Panhipopituitarizm (312000)
<i>STAT5B</i>	17q21.2		İmmün yetmezlikle giden büyüme hormone duyarsızlığı (245590) Lösemi, akut promyelositik, somatik (102578)
<i>WDR11</i>	10q26.12	OD	Hipogonadotropik hipogonadizm 14 (614858)

Yukarıda gösterilen genlerin hedef bölgelerinin toplam 319 bç'lık parçasının dizi kapsamına alınamamıştır. Genomik lokalizasyon ve dizi motifleri nedeniyle uygun tasarım yapılamayan *FGF8*, *IGFALS*, *IGFBP3*, *LHX3*, *SHOX* ve *WDR11* genleriyle beraber paneldeki genlerin %99,25'i dizide kapsamıştır.

3.5.1.2. Kütüphane Hazırlanması

Kütüphane, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) protokolleri uygulanarak hazırlandı.

Önceden izole edilmiş ve saflaştırılmış 10 hastanın DNA örnekleri hazırlandı. Öncelikle hedef gen bölgelerin amlifikasyonu için iki adet primer havuzu hazırlandı. Primer havuzunu hazırlamak için 4 µl 5X Ion Ampliseq HiFi Mix ve 10 µl 2X Ion Ampliseq Primer Havuzu karıştırıldı. Plate içine hasta başına iki farklı solüsyon ve iki pool olacak şekilde, her pool'a 14 µl 2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks ve 6 µl seyreltilmiş DNA örneği konuldu. Plate üzerine MicroAmp® adhesive film kapatıldı ve vortekslendikten sonra santrifüj ile çöktürüldü. Ürünleri içeren plate termal döngü cihazına yerleştirildi.

PZR işlemi sırasıyla, enzimi aktive etmek için 99°C'de 2dk, denatürasyon için 99°C'de 15 saniye, bağlanma ve uzatma için 60°C'de 4dk (19 cycle) ve 10°C'de bekleyecek şekilde gerçekleştirildi.

3.5.1.3. Primerlerin Kısmi Olarak Kesilmesi

PZR işlemi sonucu iki primer havuzuyla çoğaltılmış DNA ürünleri, her birinden 10 µl alınarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş PZR ürünlerine 2 µl FuPa Reagent eklendi. Plate üzerine MicroAmp® adhesive film kapatıldıktan sonra vortekslendi ve plate içerisindeki ürünler kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. Ardından plate termal döngü cihazına konuldu. Termal döngü cihazı programı sırasıyla 10 dakika 50 °C, 10 dakika 55 °C, 20 dakika 60 °C ve 1 saate kadar 10 °C'de bekleyecek şekilde ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı.

3.5.1.4. Adaptörlerin Bağlanması ve Barkodlama

Her hasta için farklı barkod (Ion Express™ Barcode) belirlendi. 2 µl seçilmiş Ion Xpress™ Barcode X1, 4 µl nukleaz içermeyen su ve 2 µl Ion P1 Adapter karıştırıldı. Böylece 1:4 oranında seyreltilmiş barkod adaptör karışımı hazırlanmış oldu. Bu karışım her hasta için seçilen barkodla ayrı olarak hazırlandı.

Primerlerin kesiminden sonra 22 µl olan PZR ürünlerinin her birine 4 µl Switch solüsyonu, 2 µl barkod-adaptör karışımı, 2 µl DNA ligaz eklendi ve 30 µl son hacim elde edildi. Ardından plate üzerine MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı, vorteks ve kısa süreli santrifüj ile solüsyonlar karıştırılıp çöktürüldü. Ardından sırasıyla 30 dakika 22 °C, 10 dakika 72 °C ve 1 saate kadar 10 °C’de bekleme olacak şekilde programı ayarlanan termal döngü cihazına yerleştirildi.

3.5.1.5. Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması

Ligasyon aşaması sonrasında fazla DNA materyalinin ve enzimlerin uzaklaştırılması için ürünler saflaştırıldı. Saflaştırma iki aşamadan oluşmaktadır:

1. **Aşama:** Her örnek için hacminin 0.5 katı olacak şekilde (50 µl olarak bulunan örneklere 25 µl) Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu aşamada 0.5X hacim oranında örnek-bead süspansiyonu elde edilmiş oldu. Karışımlar oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra plate manyetik raf üzerine (DynaMag™-96 Side Magnet [Cat.no.12331D]) alındı ve oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Süpernatant içinde ampikon ve primerler kalırken, moleküler ağırlığı yüksek olan DNA bead’lere bağlandı ve çöktürüldü. Magnet üzerindeki plate içerisindeki solüsyonların berraklaşıp, pelletlerinin koyu şekilde belli olduktan sonra, ampikonları içeren süpernatantlar dikkatli bir şekilde yeni bir plate içerisine aktarıldı. Bu aşamada barkodlanan hastaların karışmamasına dikkat edildi.
2. **Aşama:** Süpernatantların bulunduğu plate içerisindeki her bir örneğe 60 µL Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi ve 1.2X oranında DNA-bead süspansiyonu hazırlandı. Pipetaj yapıldıktan sonra plate yeniden MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından manyetik raf üzerine alınan plate en az 3 dakika boyunca bekletildi. Bu süreçte ampikonlar beadlere bağlanarak çöktürüldü ve süpernatant solüsyonunda primerler bırakıldı. Solüsyon berraklaştıktan sonra süpernatantlar dikkatlice atıldı. Pelletler üzerine taze hazırlanmış %70’lik etanolden her kuyuya 150 µl eklendi. Plate yanlara hareket ettirilerek içerisindeki beadlerin yıkanması sağlandı ve sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlemi iki kez tekrarladıktan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için plate manyetik raf üzerinde oda sıcaklığında 5 dakika, aşırı kuruması

önlenecek şekilde kurumaya bırakıldı. Magnet üzerinden alınan plate içerisindeki beadlerin üzerine 50 µL Low TE eklendi. MicroAmp® adhesive film ile kapatılan plate vorteks ve kısa santrifüj sonrasında solüsyonların iyice karışması için pipetaj yapıldı. Ardından plate yeniden kapatılarak 2 dakika boyunca manyetik raf üzerine alındı.

Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra kütüphane ürünlerinin normalizasyonun belirlenmesi için Qubit® 2.0 fluorometre kullanılarak ürünler ölçüldü ve sulandırma faktörleri hesaplandı.

Qubit® dsDNA HS assay kiti Qubit® dsDNA HS Buffer ile 1:200 oranında çalışmada kullanılmak üzere sulandırıldı. Çoğaltılmış Ion AmpliSeq™ kütüphane ürünlerinin her birinden 10 µl alınarak 190 µL sulandırılmış boyalı reaktif ile karıştırıldı ve 2 dakika boyunca inkübe edildi. Qubit® 2.0 Fluorometer’de sulandırılmış ürünlerin konsantrasyonları ölçüldü. Qubit ölçüm cihazının “Calculate Stock Concentration” butonundan örnek hacim ayarı 10 µl olarak ayarlandı. Kütüphanelerin konsantrasyonları, fluorometrede çıkan değerleri 20 ile çarpılarak hesaplandı. Elde edilen verilerde kütüphane ürünlerinin konsantrasyonları 300–1500 ng/ml arasındadır.

3.5.1.6. Taslak Hazırlanması

Bu aşamada her bead’e bir amplikon bağlanması ve yağ küreciği içinde klonal olarak çoğalması amaçlandı. Kütüphane ürünlerinin klonal amplifikasyonu ve zenginleştirilmesi için emülsiyon bazlı PZR uygulandı.

	Ion AmpliSeq™ DNA Kütüphanesi	Ion AmpliSeq™ RNA Kütüphanesi	gDNA veya Fragment Amplikon Kütüphanesi	Ion Total RNA- Seq kütüphanesi
Kütüphane konsantrasyonu	100 pM	100 pM	100 pM	100 pM
Kütüphane hacmi	2 µL	4 µL	6.5 µL	5 µL
Nükleazdan arındırılmış suyun hacmi	23 µL	21 µL	18.5 µL	20 µL
Amplifikasyon solüsyonuna eklenecek seyreltilmiş kütüphane hacmi	total 25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Yukarıdaki tabloda gösterilen prosedüre uygun şekilde hazırlandı. Hazırlanan kütüphane örneklerin her birinden 2 µl alındı ve toplam hacim 25 µl olacak şekilde üzerlerine nükleaz içermeyen su eklendi. Bu işlem sonucunda ürünler 12 pM'a seyreltilmiş oldu. Ardından emülsiyon PZR için aşağıdaki tabloda verilen prosedüre uygun olarak emPZR çözeltisi hazırlandı.

Malzeme	Hacim
Ion PGM Template Hi-Q™ View Reagent Mix	800 µl
Ion PGM Template Hi-Q™ View Enzyme Mix	50 µl
Nükleazdan arındırılmış su	25 µl
Seyreltilmiş kütüphane	25 µl
Toplam hacim	900 µl

Emülsiyon PZR çözeltisi hazırlandıktan sonra vortekslendi ve üzerine 100 µl Ion PGM Template Hi-Q™ View Ion Sphere Particles eklendi. Toplam hacim 1000 µl'ye tamamladı. Kütüphane ürünlerinin bulunduğu emPZR karışımı vortekslendikten sonra reaksiyon filtresine (Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly) yüklendi ve Ion OneTouch 2 cihazında emülsiyon PZR yapıldı.

Emülsiyon PZR sonrası ürünler 10 dakikalık santrifüj ile çöktürüldü. Çöktürülen amplikon yüklü partiküllerin bulunduğu 100 µl'lik ürün bırakılarak üzerindeki süpernatantlar atıldı. Ion OneTouch Yıkama Solüsyonundan 500 µl ürünlere eklenerek pipetaj yapıldı ve ürünler yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı. 2,5 dakikalık santrifüj sonrasında yeniden tüpte 100 µl çözelti bırakılacak şekilde süpernatantlar atıldı. Bu esnada emülsiyon PZR ürünlerinin zenginleştirilmesi için melt-off çözeltisi hazırlandı. 280 µl Tween® Solution ve 40 µl 1 M NaOH birleştirilerek toplam hacmi 320 µl ve final yoğunluğu % 0.1 Tween® 20 deterjan ve 125 mM NaOH olan melt-off çözeltisi hazırlandı.

Streptavidin C1 boncuklarının yıkanması için *DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* çözeltisinden 13 µl alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüp manyetik raf üzerine alınarak (DynaMag™ -2 Magnet) oda ısısında 2 dakika boncukların tüp duvarına yapışması için bekletildi. Ardından süpernatant atıldı ve 130 µl MyOne™

Beads Wash Solution eklendi. Manyetik raf üzerinden alınan çözeltiye pipetaj yapıldı ve böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

Son olarak, hazırlanan tüm çözeltiler ve emülsiyon PZR ürünleri zenginleştirme için 8 kuyulu levhaya yüklendi. Eklenen çözeltiler ve kuyucukları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Kuyu Numarası	Yüklenen Malzeme
Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş

Zenginleştirme ürünleri çipe yükleneceği için hacimleri çip kapasitesine göre belirlendi. Ardından 8 kuyulu levha Ion OneTouch™ ES cihazına konuldu.

3.5.1.7. Dizileme

Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit kullanıldı. Ion PGMTM cihazının kanallarının tıkanmasını önlemek çalışma öncesinde cihazın 18 MΩ su ve klorid tablet ile yıkaması, pH kalibrasyonları yapıldı ve ürünler çipe (Ion 318™ Chip v2) yüklendi. Dizileme planı aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi ilerlemiştir.

Ion Reporter	Version: 5.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	SS_CHD_W_HOTSPOTv6
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane anahtarı	Ion TCAG (TCAG)

Template Kiti	Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit
Akış sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
3' Adaptör:	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGA GAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir dizi (%)	30
Referans Kütüphane	Hg 38 (Homo sapiens)
Hedef Bölgeler	SS_CHD_IAD116213_197_Designed
Hotspot Bölgeler	SS_CHD_hotspots_v6
Eklentiler	coverageAnalysis, FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	SS_CHD

3.5.1.8. Verilerin Analizi

Dizileme sonrasında BAM dosyaları, Coverage Analysis v5.6.0.1, Torrent Variant Caller v5.6.0.4 gibi eklentileri bulunan Torrent Server yazılımına aktarıldı. Kapsanmayan veya yeterli okuma derinliği elde edilemeyen bölgeler araştırılarak kalite incelemeleri tamamlandı. Ardından analiz için Ion Reporter Uploader programı kullanılarak veriler bulut bazlı varyant analizi, annotasyonu ve raporlama programı olan Ion Reporter (v.5.6)'a aktarıldı.

Hedef ve hotspot bölgeleri içeren BED dosyası Ion Reporter'a eklendi ve gerekli parametrelerin önerilen aralıklarda olmasına özen gösterilerek verilerin analiz edileceği analiz akış şeması oluşturuldu. Her hasta için saptanan değişimlerin değerlendirilmesi hotspot mutasyon dosyası verileri, NoRef, NoCall ve dbSNP minör allel frekansı (MAF) filtreleri kullanılarak yapıldı. Minör allel frekansı (MAF) değişimi filtresi frekansı %1'in altındaki değişimleri gösterecek şekilde ayarlandı. Ayrıca 1000 Genom Projesi veri tabanından, UCSC ve RefSeq veritabanlarından sık varyantlar filtrelendi.

Ekspresyon paternleri, değişimlerin kodlanan proteine etkisi, türler arası korunmuşluk gibi veriler dikkate alınarak hastalarda saptanan varyantlar değerlendirildi. Varyantlar çeşitlerine göre ayrıldı (stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası, missense) ve önceliklendirildi. Tüm filtrelemeler sonucu saptanan değişimler ve aday genleri Online Mendelian Inheritance in Man 58 (OMIM), ClinVar, Genecards ve UCSC Genome portalları kullanılarak incelendi ve toplum sıklığı ExAC veritabanından değerlendirildi. Veritabanlarında taranan varyantlardan tanımlanmamış olanları in silico patolojik olup olmadığı kalıtım kalıbı, klinik ile uyumu göz önünde bulundurularak değerlendirildi.

3.5.2. Sanger Dizileme

Sanger dizileme yöntemi öncelikle Ion Torrent tabanlı panel çalışması sonucu *SHOX* geninde değişim saptanan olguların segregasyonu için uygulandı. Bu aşamada *SHOX* genine özgün hazır alınan kitler kullanıldı.

Ardından yeni nesil dizileme temelli panel çalışmasında *SHOX* geninin kapsanmayan ve düşük derinlikli bölgelerine özgün primerler tasarlandı ve bu bölgeler Sanger dizileme ile tarandı.

3.5.2.1. Sanger Dizileme için Primerlerin Tasarlanması

SHOX geninin Ion Torrent tabanlı gen panel testinde varyant saptanan bölgeye özgün (ekzon 3) primer tasarlandı. Tasarlama sürecinde öncelikle seçilecek primer bölgesinin herhangi bir SNP ve tekrar dizisi içerip içermediği dbSNP veritabanından kontrol edildi. İleri ve geri primerlerin bağlanma ısıları açısından 2-3°C'den fazla fark olmamasına, A-T ve C-G nükleotid oranlarının eşit dağılımlı olmasına, en fazla 18-25 nükleotid uzunluğu boytuunda olmasına dikkat edildi. Ayrıca dizi analizinde hedeflenen bölgenin daha iyi okunabilmesi için primerlerin, istenen dizinin ilk ~30-50 bazın istenen bölgeden geride başlanmasına özen gösterildi.

Tasarlanan primer örneklerinin özgünlükleri UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)'den, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ve Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtDNA.com/calc/analyzer>) ile test edildi.

3.5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu için öncelikle hasta DNA'larından final konsantrasyonu 200 ng olacak şekilde sulandırıldı. Ardından her reaksiyon tüpüne 1X

tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), %5 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve gDNA eklendi. Her olgu için hazırlanan DNA içeren PZR karışımlarına ek olarak DNA içermeyen kontrol PZR karışımı (negatif kontrol) hazırlandı ve beraber çalışıldı. İşlemler buz aküsü üzerinde ve pipetaj kayıp oranlarına dikkat edilerek gerçekleştirildi. Hazırlanan PZR reaksiyonu karışımına, toplam hacim 50 µl olacak şekilde distile su eklendi. Hazırlanan solüsyonlar termal döngü cihazına (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) yerleştirildi ve ; 10 dakika 95°C (başlangıç denatürasyon), 30 saniye 95°C (denatürasyon), 30 saniye 62°C (primerlerin bağlanma ısısına göre belirlenmiştir) ve 70°C de 90 saniye (1 kb / 1 dk) (uzama) aşamalarını içeren 35 döngü ve 10 dakika 70°C de son uzama aşamalarından oluşan program ayarlanarak PZR işlemleri gerçekleştirildi.

Cihazdaki işlemler tamamlandıktan sonra PZR ürünleri alındı ve her birinden 5'er µl örnek yeni tüplere alınarak 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jel yardımıyla ürünlerdeki amplifikasyon başarısı tespit edildi. 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde, 1X TBE tamponunda, 120 V'da 20 dakika boyunca bekletildi ve jel içerisinde yürüyen amplikonların bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ardından jel üzerindeki bantlar UV altında görüntülendi ve kaydedildi.

Görüntülerdeki ürünlerin kaliteleri onaylandıktan sonra PZR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma aşamasında Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri ürünlerin içerisine karıştırıldıktan sonra karışım termal döngü cihazına yerleştirildi. Cihazın protokolü 30 dakika 37°C, 15 dakika 85°C olacak şekilde protokole ayarlanarak çalıştırıldı. Program bitiminde cihazdan alınan ürünler +4°C'de ve karanlıkta saklandı.

3.5.2.3. Dizi PZR Reaksiyonu

Dizi PZR için hazırlanan çözeltide PZR için gerekli kimyasalları içeren 5X tampon solüsyonu BigDye buffer, PZR aşamasında kullanılan primerler ve saflaştırılmış PZR ürünleri kit protokolüne uygun olarak karıştırıldı. Final hacmi 10µl olacak şekilde distile su da eklenerek her hasta için ayrı hazırlanan karışımlar plate (USA Scientific-800-522-8477) içerisindeki kuyucuklara yerleştirildi. Plate termal döngü cihazına

yerleştirildikten sonra cihazın protokolü 1 dakika 96°C (denatürasyon) ve toplam 25 döngüde 10 saniye 96°C (denatürasyon), 5 saniye 50°C (bağlanma) ve 4 dakika 60°C (sonlanma) aşamalarını içerecek şekilde ayarlandı.

Cihazdan alınan dizi PZR ürünlerinin BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinden ve kullanılmayan primerlerden saflaştırılması için alkolle çöktürme yöntemi kullanıldı. Plate içerisindeki ürünlerin bulunduğu her bir kuyuya 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate üzerine MicroAmp™ adhesive film (seal) kapatıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra 60 dakika boyunca 3810 rpm'de santrifüj edildi. Ardından koruyucu bant çıkarıldı ve plate ters çevrilerek 30 saniye 1100 rpm'de kısa santrifüj edildi. Santrifüj sonunda her kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve yeniden koruyucu bantla kapatılarak 15 dakika boyunca 3460 rpm'de santrifüj edildi. Plate üzerinden film çıkarılarak ters çevrildi ve 60 saniye 1030 rpm'de kısa santrifüj yapıldı. Bu işlemler sonunda her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklenerek plate termal döngü cihazına yerleştirildi. Program 5 dakika 97°C de bekletilecek şekilde ayarlandı ve bu işlemle örneklerin denatürasyonu gerçekleştirildi. Cihazdan alınan örnekler 2 dakika buzda bekletildi.

3.5.2.4. Elektroforez Cihazına Yükleme ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Saflaştırılan ürünlerin olduğu plate, ABI3500 cihazına yerleştirilerek yürütme programı ve önceden kalibrasyonu yapılmış boya seti olan Dyeset seçildi. Program 13,4 kVolts yürütme voltajı, 15 kVolts ön yürütme voltajı, 1,6 kVolts injeksiyon voltajı, 2.520 saniye yürütme süresi, 180 sn ön yürütme süresi, 8 sn injeksiyon zamanı ve 250 sn veri gecikmesi (data delay) şeklinde ayarlanarak ürünlerin elektroforez cihazında yürütülmesi sağlandı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kapiller elektroforez cihazından alınan ab1 dosyası, ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v.3.0 programlarında analiz edildi.

SeqScape v.3.0 programına önceden referans dizi ekzon ve intronlar tanıtıldı. Programa ab1 formatındaki dizi yüklenerek analiz komutu verildi ve program olgunun dizisini analiz edilebilir formata getirdi. Dizi görüntüsünün saflaştırma kalitesi, pik kalitesi, dizilenen baz sayısı, piklerin yüksekliği ve arka plan kirliliği doğru analiz için kontrol edildi. Dizi görüntüsünde değerlendirilen kriterlerin yeterli olmaması

durumunda örnekler için PZR aşaması ve saflaştırma aşamaları tekrarlandı ve tekrar dizilendi.

Kriterlere uygun dizi görüntüsünün analizinde referans ve olgu dizisi karşılaştırıldı. Saptanan değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanlarından yararlanılarak araştırıldı ve işaretlendi. Sonuçlar gen-panel testi sonuçlarıyla karşılaştırıldı.



4. BULGULAR

Bu araştırma, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalına boy kısalığı endikasyonu nedeniyle yönlendirilmiş 94'ü kız 31'i erkek fenotipli 125 olgunun genetik etiyolojilerinin araştırılmasını kapsamaktadır. Çalışmaya alınan olguların %96'sı 18 yaş altında ve boy uzunlukları -5.07 SD ila 1 SD arasında değişmektedir. Olguların tümüne klasik karyotipleme tekniği ile kromozom analizi yapıldı ve 125 olgunun 6'sında anomali saptandı. Kromozom analizleri sonucunda cinsiyet kromozomlarında *SHOX* genini de içerdiği düşünülen yapısal ve sayısal anomali saptanan altı olguya *SHOX* genine özgün proba yapılan FISH incelemesiyle konfirmasyon yapıldı. Ayrıca 116 olguda *SHOX* geninin varlığının incelenmesi için *SHOX* genine özgün proba yapılan FISH tekniği uygulandı ve 2 olguda anomali saptandı. Boy kısalığı -2.99 SD ile -0.89 SD arasında değişen ve klasik karyotip ve FISH incelemesinde herhangi bir kromozom anomalisi saptanmayan 22 olguya yapılan a-CGH çalışmasında 4 olguda anomali saptandı. Sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda herhangi bir anomali saptanmayan ve idiyopatik boy kısalığı olan 10 olguda NGS panel tekniği ile boy kısalığı ile ilişkili 25 genin dizilendi ve 1 olguda *SHOX* geninde olası patojenik varyant saptandı. Olguların *SHOX* geniyle ilişkili genetik analiz sonuçları Tablo 4-1 ve Tablo 4-2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Çalışmada kullanılan teknikler, hasta sayıları, normal ve anormal sonuçların dağılımı

Kullanılan Teknikler	Σn	Normal Sonuç	Anormal Sonuç	Anomali Yüzdesi
Karyotip Analizi	125	118	6*	%4,8
FISH	122	113	2*+6**	%6,55
Array-CGH	22	18	4*	%18,18
NGS Panel	10	9	1***	%10

*Olguların ayrıntılı analiz sonuçları Tablo 4-2'de verilmiştir. **FISH tekniği ile konfirme edilen olgular. ***Ayrıntılı analiz sonucu Tablo 4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-2: Kromozom analizi, FISH ve a-CGH çalışmaları sonuçları

Olgu No	Başvuru Endikasyon	Karyotip	FISH	a-CGH
Olgu 1	Boy kısalığı, gelişme geriliği fasiyal dismorfizm) A/T:Turner Sendromu	mos 45,X/46,XX[7/43]	ish (SHOXx1/DXZ1x1)/(SHOXx2/DXZ1x2) [10/40]	-
Olgu 2	Boy kısalığı, hipergonadotropik hipogonadizm	46,X,Xp-	.ish del(X)(p11.3>pter)(SHOXx1/DXZ1x2,wcpXp-)	-
Olgu 3	Boy kısalığı, primer overan yetmezlik	mos 45,X/46,X,r(X)(p22.1q23) [43/15]	.ish Xp22.3(SHOXx2/DXZ1x2)(SHOXx1/DXZ1x2) [40/15]	-
Olgu 4	Boy kısalığı, obezite	mos 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX[8/3/49]	.ish Xp22.3(SHOXx1/DXZ1x1)/(SHOXx1/DXZ1x2)/SHOXx2/DXZ1x2) [15/5/30]	-
Olgu 5	Boy kısalığı, sol yüz ve sol vücut hipoplazisi	46,X,Xp+,der(X)t(X;6)(p22.31;p22.1)	.ish Xp22.3(SHOXx1/DXZ1x2)	.arr[GRCh38] 6p25.3p22.1(255350_27548234)x3, Xp22.33p22.31(265492_6495923)x1
Olgu 6	Rizomezomelik boy kısalığı, hafif mitral yetmezlik	mos 45,X/46,X,der(Y)/47,X,der(Y),+der(Y) [6/47/4]	.ish idic(Y)(p11.2)/idic(Y)(p11.2)x2(SRYx0,DYZ1x0,DXZ1x1/SRYx2,DYZ1x2,DXZ1x1/SRYx4,DYZ1X4,DXZ1x1) [10/80/10] .ish (SHOXx1/DXZ1x1/DYZ3X2)	-
Olgu 7	İdiyopatik boy kısalığı, Azospermi	46,XY	ish (SHOXx1/DXZ1x1/DYZ3x1)	-
Olgu 8	Boy kısalığı, fenilketonüri, kalkan göğüs	46,XX	ish Xp22.3(SHOXx2/DXZ1x2)(SHOXx1/DXZ1x2) [89/11]	-
Olgu 9	Boy kısalığı, mezomelik kısalık, kulak kısalığı	46,XY	FISH sonucu?	arr[GRCh38] Xp22.33(589723_653999)x0, Yp11.31p11.2(589723_653999)x0
Olgu 10	Çocuğunda boy kısalığı, mezomelik kısalık, kulak kısalığı	46,XX	FISH sonucu?	arr[GRCh38] Xp22.33(589723_653999)x1
Olgu 11	Çocuğunda boy kısalığı, mezomelik kısalık, kulak kısalığı	46,XY	FISH sonucu?	arr[GRCh38] Xp22.33(589723_653999)x1

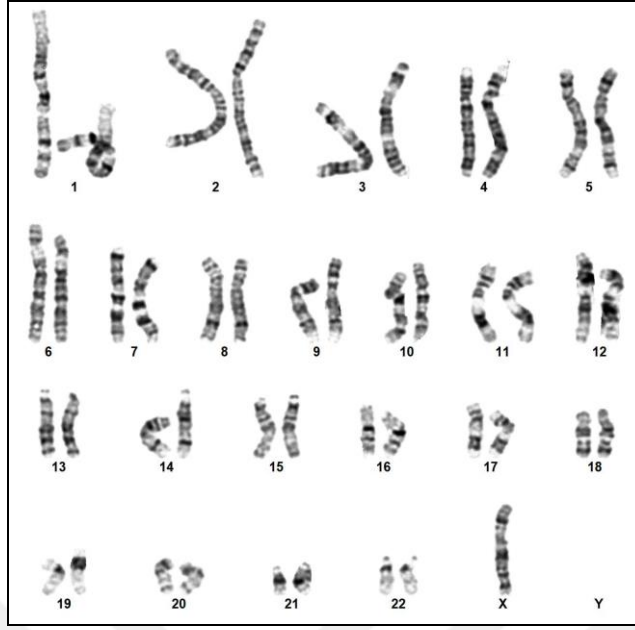
4.1. Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Bulgular

İdiyopatik boy kısalığı endikasyonu ile gelmiş ve diğer anomalileri dışlanmış 125 olguya karyotip analizi yapıldı. Bu olguların birinde mozaik sayısal anomali, 5’inde ise yapısal anomali saptanmıştır.

4.1.1. Sayısal Anomali Saptanan Bulgular

Olgu 1

Turner sendromu ayırıcı tanısıyla başvuran ve boy kısalığı (-2,94 SD) olan 9 yaş 10 aylık kız olguya yapılan kromozom analizinde 7 hücrede 45,X ve 43 metafazda 46,XX karyotipi saptandı. (Karyotip: mos 45,X/46,XX[7/43])



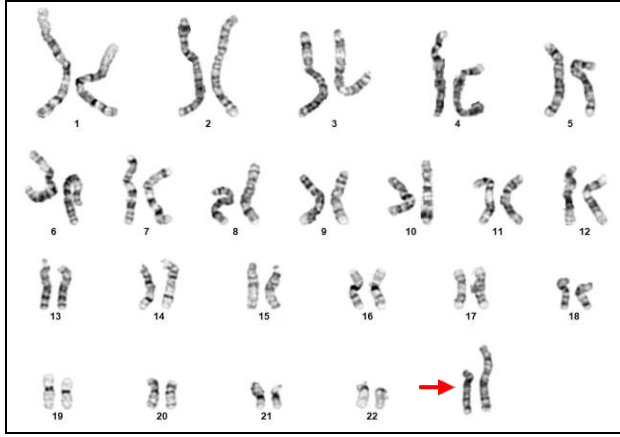
Şekil 4-1: Olgu 1’de saptanan 45,X karyotip görüntüsü.

Ayrıca *SHOX* genine özgün proba çalışılan FISH tekniğinde incelenen 50 hücreden 10’unda X kromozomu ve *SHOX* geni için birer sinyal alındı ve *SHOX* delesyonu saptandı (Karyotip: 45,X/46,XX .ish (SHOXx1/DXZ1x1)/(SHOXx2/DXZ1x2)[10/40]).

4.1.2. Yapısal Anomali Saptanan Olgular

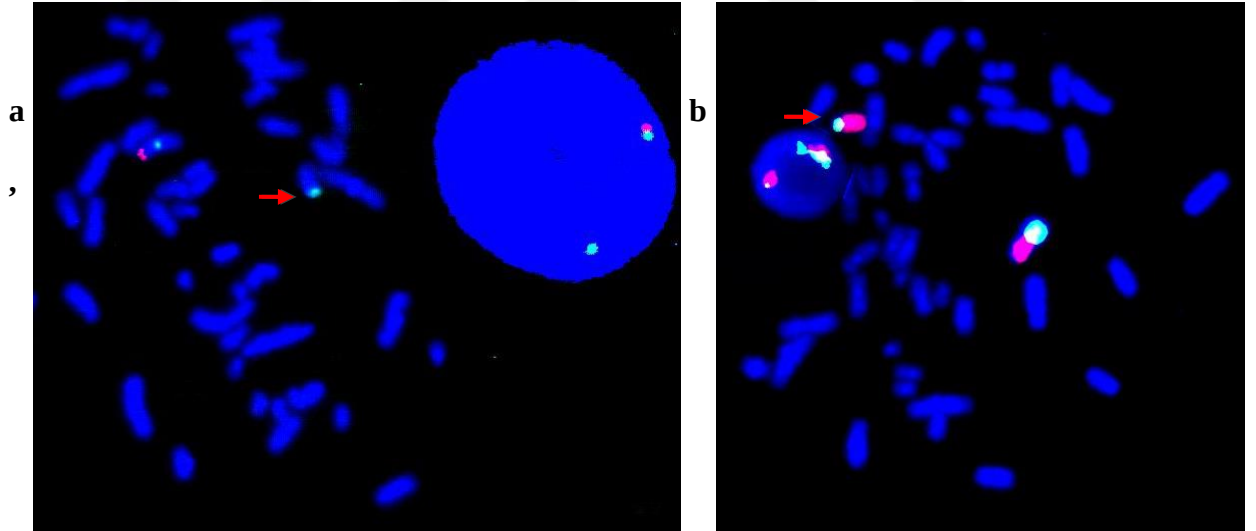
Olgu 2

Boy kısalığı (-3,59 SD), hipergonadotropik hipogonadizm endikasyonu ile başvuran 14 yaş 6 aylık kız olguya yapılan sitogenetik analizler sonucunda olgunun X kromozomlarından birinin p kolunda bir delesyon olduğu görüldü (Karyotip: 46,X,Xp-) (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Olgu 2'ye ait 46,X,Xp- karyotip görüntüsü (X kromozomun p kolundaki delesyon gösterilmiştir.).

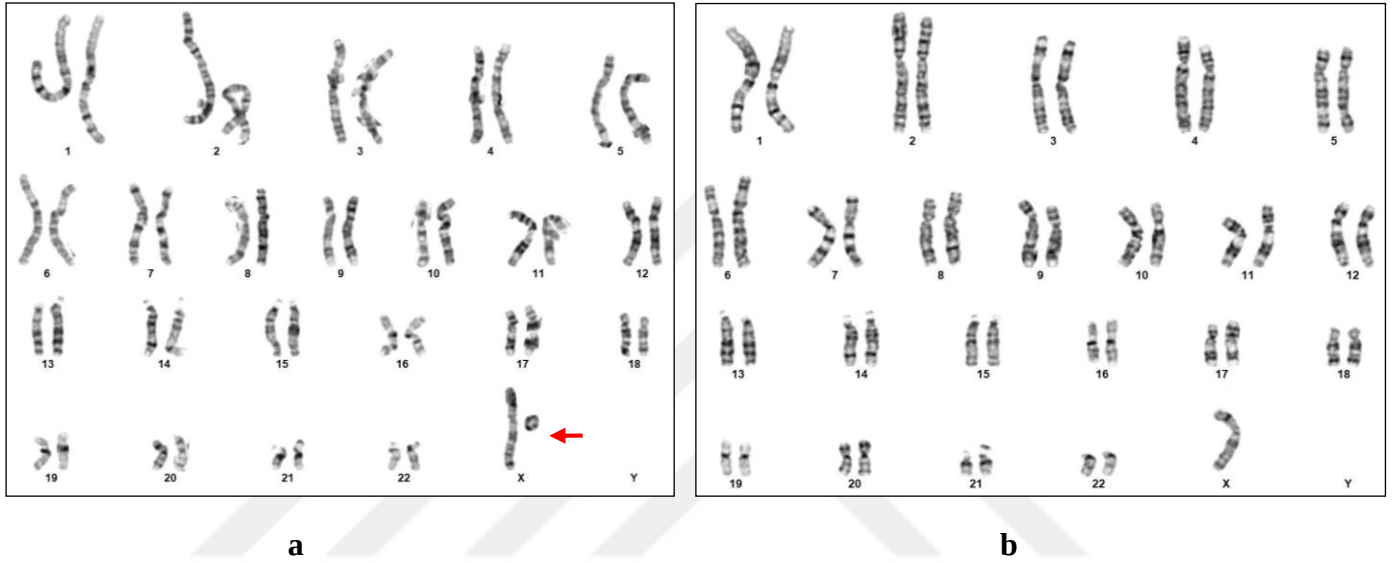
Olguda saptanan delesyonun aydınlatılması amacıyla *SHOX* genine ve X kromozomuna özgün arm spesifik problarla yapılan FISH incelemelerinde *SHOX* geninin delesyona uğradığı, anomaliye başka bir kromozomun da katılmadığı gösterildi (Karyotip 46,X,Xp-.ish del(X)(p11.3>pter)(*SHOX*x1/*DXZ1*x2,wcpXp-) (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: a) *SHOX* genine özgün prob (Diagen) yapılan FISH incelemesinde saptanan *SHOX* geni delesyonu görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomunun sentromer bölgesini, kırmızı sinyaller ise *SHOX* genini işaretlemektedir. X kromozomunun sentromeri için 2 sinyal alınmıştır. Ok işareti ile gösterilen 1 kırmızı sinyal ise *SHOX* geninin delesyonunu göstermektedir. b) X kromozomuna özgün arm spesifik problarla yapılan FISH görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomunun p kolunu boyarken, kırmızı sinyaller X kolunun q kolunu boyamıştır. Ok işareti ile gösterilmiş boyanmış kromozomlardan birinde daha küçük görünen yeşil sinyal, X kromozomlarından birinin p kolunun delesyona uğradığını göstermektedir.

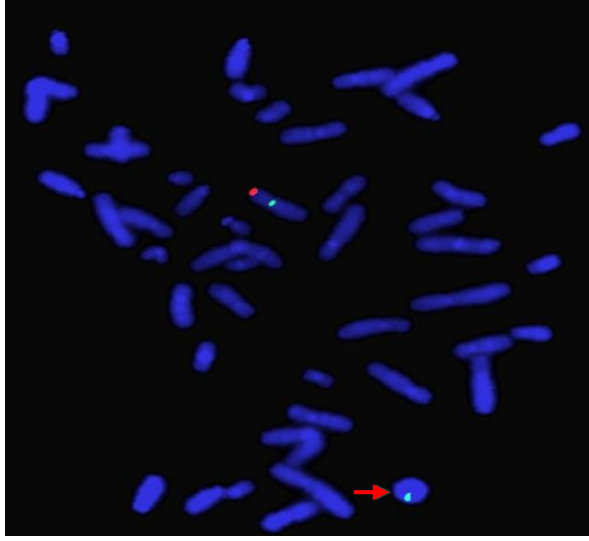
Olgu 3

Boy kısalığı, primer overyan yetmezlik endikasyonu bulunan 26 yaşındaki kız olguya yapılan kromozom analizinde 15 metafazda ring(X) kromozomu görüldü. Mozaik olarak 43 metafazda tek X kromozomu saptanan olguda mos 45,X/46,X,r(X)[43/15] karyotipi saptandı (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: a) Olgu 3'te saptanan mozaik 46,X,r(X)(p22.1q23) (halka X kromozomu ok işareti ile gösterilmiştir), b) 45,X karyotip görüntüleri

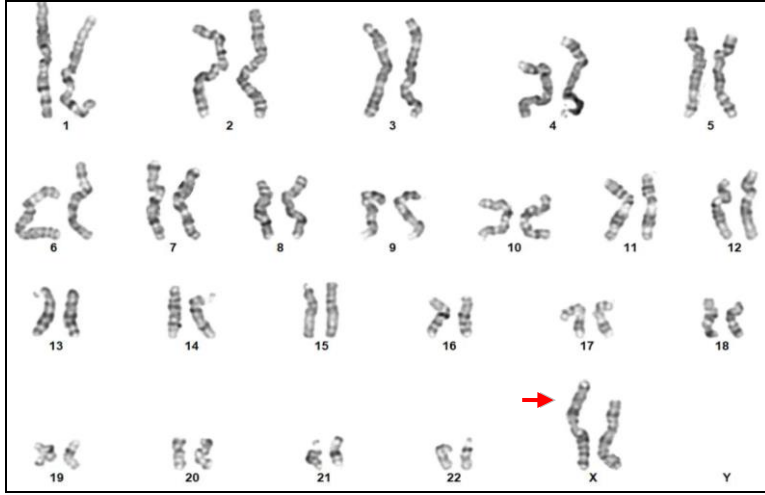
Kromozom analizinde saptanan halka (X) kromozomunun araştırılması amacıyla *SHOX* genine özgün proba yapılan FISH incelemesinde *SHOX* geninin hem 45,X hücrelerde hem de halka (X) bulunan hücrelerde delesyona uğradığı gösterildi (Şekil 4-5) (46,X,X(r).ish Xp22.3(SHOXx1/DXZ1x2).



Şekil 4-5: Olgu 3’te saptanan 46,X,X(r).ish Xp22.3(SHOXx1/DXZ1x2) FISH görüntüsü.
Yeşil sinyaller X kromozomunun sentromerini, kırmızı sinyal *SHOX* genini göstermektedir. Halka(X) kromozomunda sentromer için sinyal alınırken *SHOX* geni için sinyal alınmadı ve genin delesyona uğradığı gösterildi.

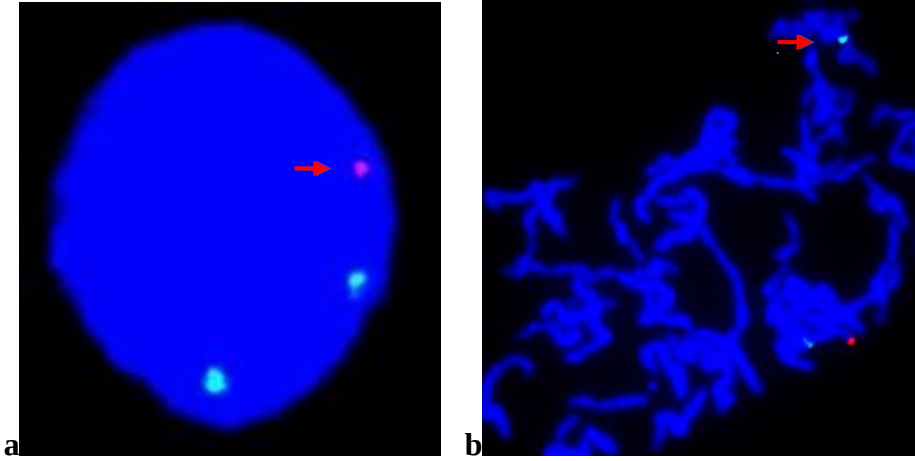
Olgu 4

Boy kısalığı (-2.29 SD), dismorfik yüz bulguları (sinofiri, mediyalde dağınık kaşlar, belirgin kirpikler, yukarı çekik palpebral fissürler, yanaklarda flushing, antevort burun delikleri), düşük ense saç çizgisi, kalkan göğüs, ayrık meme başları, kubitus valgus ve obezite endikasyonu bulunan 11 yaş 3 aylık kız olguya yapılan klasik sitogenetik incelemelerde 8 metafazda 45,X ve 49 metafazda 46,XX karyotipi görüldü. Üç metafazda ise izokromozom X saptandı (Karyotip: mos 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX[8/3/49]) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Olgu 4’te saptanan 46,X,i(Xq) karyotip görüntüsü. İzokromozom X kırmızı ok ile gösterilmiştir.

Olgu 4’te saptanan anomaliyi araştırmak amacıyla yapılan *SHOX* genine özgün proba FISH incelemesi yapıldı. FISH incelemesinde analiz edilen 50 hücrenin 15’inde X kromozomunun sentromeri ve *SHOX* geni için birer sinyal alındı. Beş alanda X kromozomunun sentromeri için 2 sinyal, *SHOX* bir sinyal alındı. Bu sonuç izokromozom X’te *SHOX* geninin delesyona uğradığını ve tek sentromeri olduğunu gösterdi. Otuz hücrede ise *SHOX* geni ve X kromozomu sentromeri için ikişer sinyal alındı (Şekil 4-7) (Karyotip: 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX[8/3/49].ish Xp22.3(*SHOX*x1/*DXZ1*x1)/(*SHOX*x1/*DXZ1*x2)/*SHOX*x2/*DXZ1*x2)[15/5/30]).

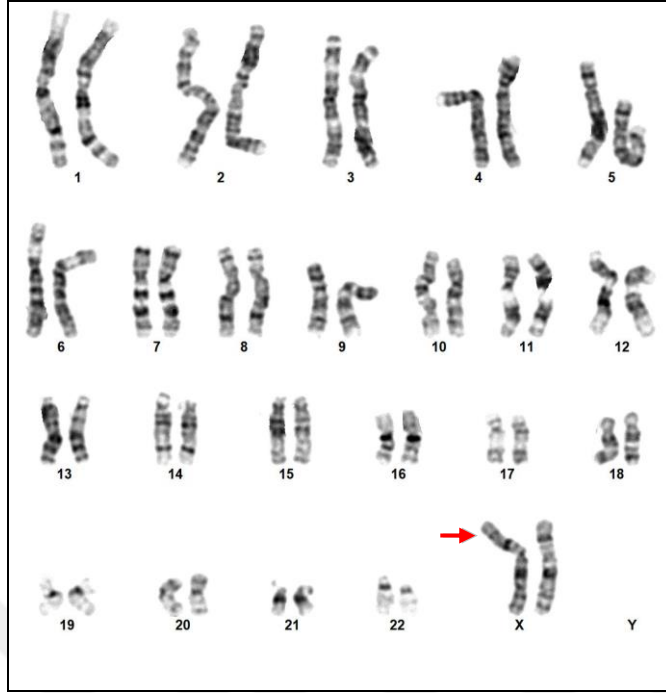


Şekil 4-7: Olgu 4’te saptanan mos 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX.ish

Xp22.3(SHOX_{x1}/DXZ1_{x1})/(SHOX_{x1}/DXZ1_{x2})/SHOX_{x2}/DXZ1_{x2}) FISH görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomu sentromerini gösterirken kırmızı sinyaller *SHOX* genini işaretlemektedir. Kırmızı sinyalden bir tane görülmesi *SHOX* geninin tek doza düştüğünü göstermektedir. a) *SHOX* delesyonunun interfaz FISH görüntüsü. b) *SHOX* delesyonunun metafaz FISH görüntüsü.

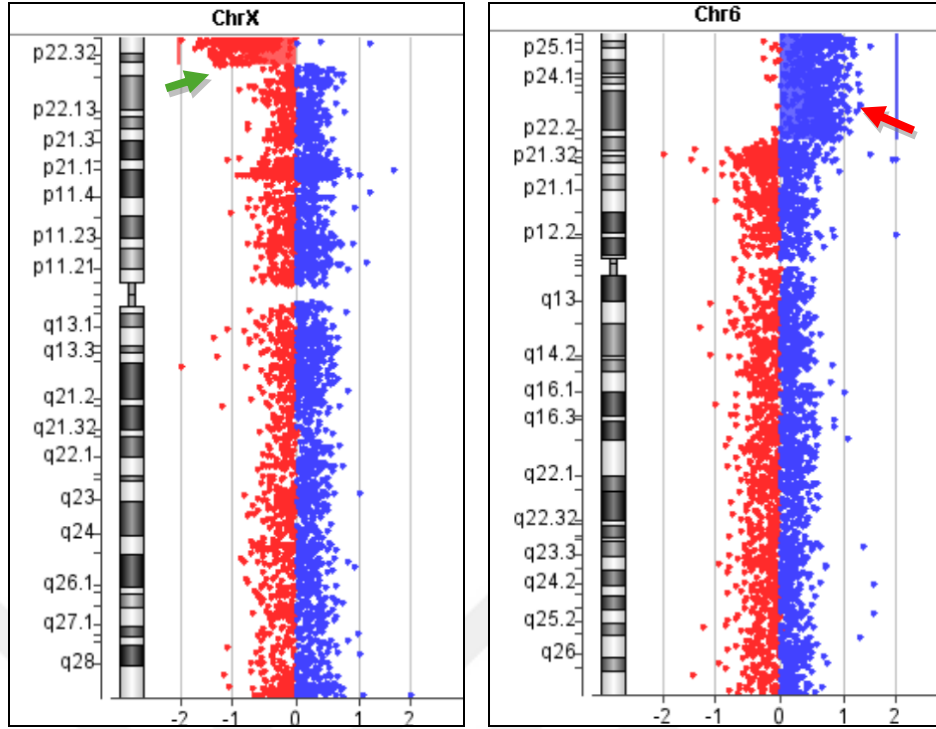
Olgu 5

Boy kısalığı (-0,83 SD), sol yüz ve sol vücut hipoplazisi endikasyonu bulunan 8 yaş 6 aylık kız olguya yapılan kromozom analizinde X kromozomunun p kolunda ekstra bir non-spesifik bir bant görüldü (Karyotip: 46,X,Xp+) (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Olgu 5'in karyotip görüntüsü. Ok işareti, X kromozomunun p kolundaki non-spesifik bant yapısını göstermektedir.

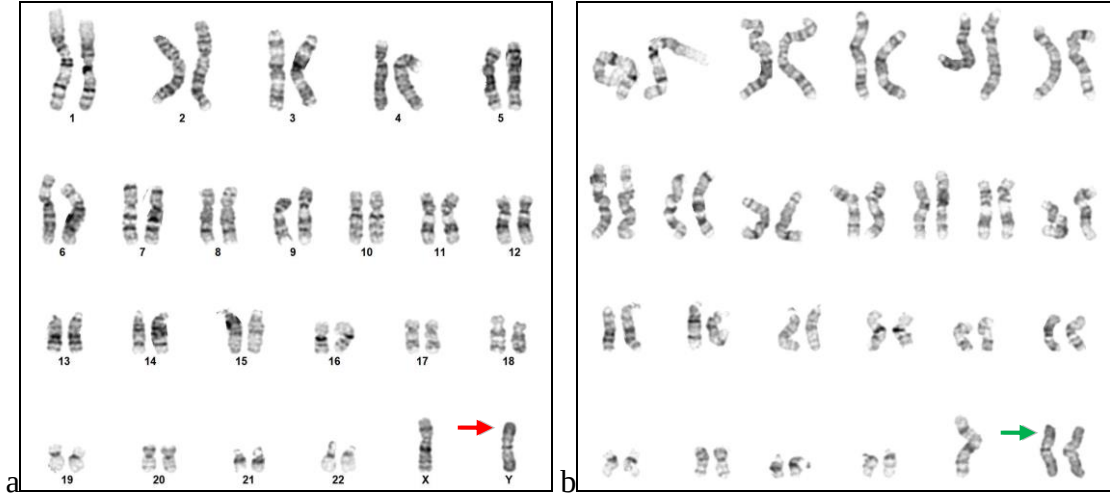
Bu değişimin aydınlatılması amacıyla uygulanan a-CGH çalışmasında 6. kromozomun p25.3p22.1 bölgesinde (255350 -27548234 baz çiftleri arasında) 27 Mb büyüklüğünde bir duplikasyon olduğu tespit edildi. Ayrıca X kromozomunun p22.33p22.31 bölgesinde (265492-6495923 baz çiftleri arasında) *SHOX* genini de içeren 6,2 Mb büyüklüğünde delesyon tespit edildi. Bu sonuçlara göre, X kromozomunun p kolundaki non-spesifik bant yapısının 6. kromozomun p kolunun bir bölgesinden kaynaklandığı ve dengesiz X;otozom translokasyonunun oluşumu sırasında oluştuğu gösterildi (Şekil 4-11) (.arr[GRCh38] p25.3p22.1(255350_27548234)x3,Xp22.33p22.31(265492_6495923)x1).



Şekil 4-9: Olgu 5'e yapılan a-CGH çalışması görüntüsü. X kromozomunda tespit edilen p22.33p22.31 bölgesindeki 6,2 Mb delesyon yeşil okla, 6. kromozomun p25.3p22.1 bölgesindeki 27 Mb duplikasyon ise kırmızı ok ile gösterilmiştir.

Olgu 6

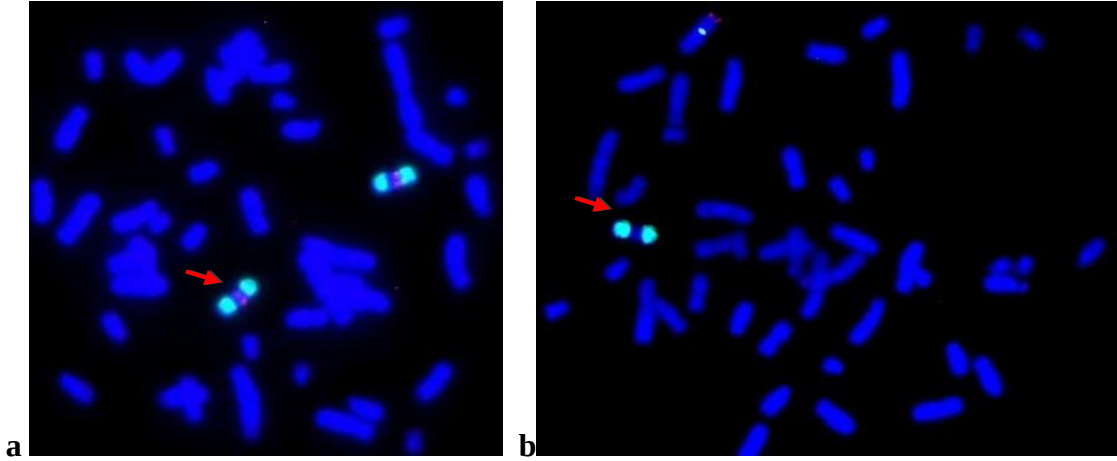
Rizomezomelik boy kısalığı (-1.62 SD) ve hafif mitral yetmezlik endikasyonu bulunan 3 yaş 5 aylık kız olguya yapılan sitogenetik analizler sonucunda derivatif Y kromozomu saptandı. Mozaik olarak saptanan derivatif Y kromozomu 47 alanda tek doz bulunurken, 4 alanda iki doz olarak bulunduğu görüldü (mos 45,X/46,X,der(Y)/47,X,der(Y),+der(Y) [6/47/4]) (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Olgu 6'ya yapılan karyotip sonuçlarının görüntüsü. a) 46,X,der(Y) karyotip görüntüsü. Derivatif Y kromozomu kırmızı ok ile gösterilmiştir. b) 47,X,der(Y),+der(Y) karyotip görüntüsü. 2 doz bulunan derivatif Y kromozomu yeşil ok ile gösterilmiştir.

Saptanan derivatif Y kromozomunun kökeninin araştırılması amacıyla *SRY* genine özgün FISH incelemesi yapıldı. Bir adet der(Y) bulunan hücrelerde *SRY* geninden 2 tane bulunurken, 2 adet der(Y) bulunan hücrelerde 4 tane *SRY* geni sinyali alındı. Bu veriler ve derivatif kromozomun bant yapısı göz önüne alınarak derivatif kromozomun idic(Y) olduğu anlaşıldı.

Saptanan idic(Y) kromozomunda *SHOX* geninin varlığının araştırılması amacıyla yapılan FISH incelemesinde derivatif kromozomda *SHOX* geninin delesyona uğradığı görüldü (Şekil 4-11).

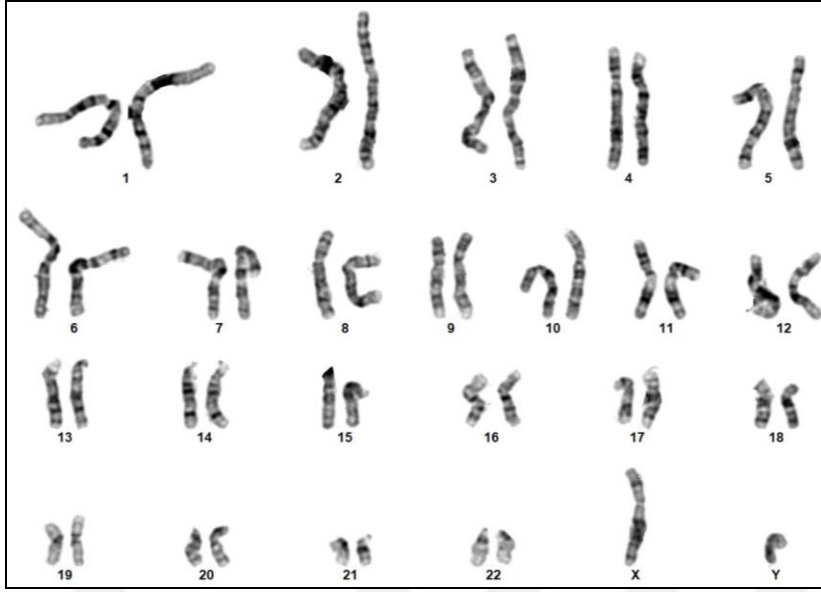


Şekil 4-11: Olgu 6'ya ait FISH görüntüleri. a) *SRY* genine özgün proba (Cytocell) yapılan FISH incelemesinde kırmızı sinyaller *SRY* genini gösterirken yeşil sinyaller Y kromozomunun Yq12 bölgesini göstermektedir. 4 doz Yq12 bölgesi ve 4 doz *SRY* geni bulunan metafaz FISH görüntüsüne göre derivatif kromozomun idic(Y) kromozomu olduğu anlaşılmaktadır. b) *SHOX* genine özgün proba (Cytocell) yapılan FISH incelemesi görüntüsünde yeşil sinyaller X kromozomunun sentromerini ve Y kromozomunun Yq12 bölgelerini, kırmızı sinyal ise *SHOX* genini işaretlemektedir. Ok işareti ile gösterilen bölgede *SHOX* geninin derivatif kromozomda bulunmadığı ve delesyona uğradığı gösterilmiştir..

4.1.3. FISH İncelemesi ile Saptanan Anomaliler

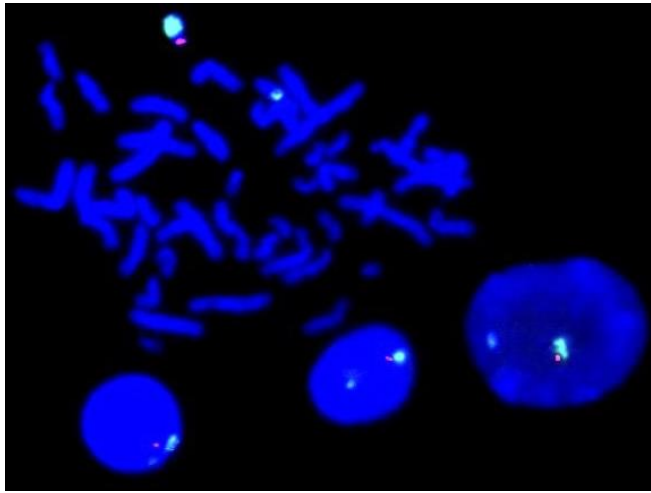
Olgu 7

İdiyopatik boy kısalığı, azospermi endikasyonu ile gelen 35 yaşındaki erkek olguya yapılan klasik sitogenetik incelemelerde normal sonuç (46,XY) alındı (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: Olgu 7'ye yapılan kromozom analizi sonucunda saptanan 46,XY karyotip görüntüsü.

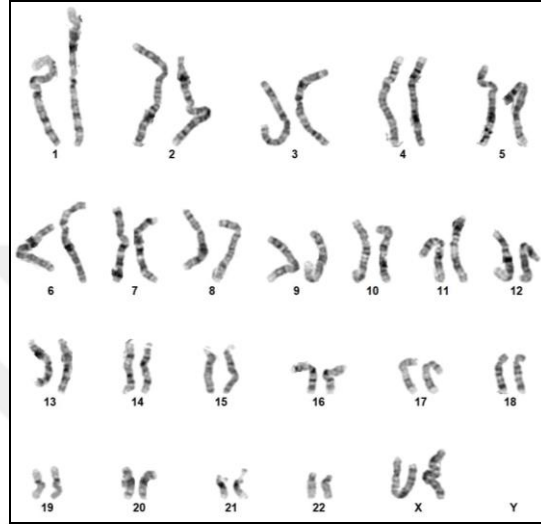
Boy kısalığını araştırmak amacıyla *SHOX* genine özgün proba yapılan FISH incelemesinde *SHOX* geninde delesyon saptandı. FISH incelemesi sonuçlarında saptanan delesyonun X kromozomu üzerindeki *SHOX* geninde gerçekleştiği görüldü (Karyotip: 46,XY.ish (SHOXx1/DXZ1x1/DYZ3x1)) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Olgu 7'ye *SHOX* genine özgün proba (Cytocell) yapılan FISH incelemesinin interfaz ve metafaz görüntüsü. Kırmızı sinyaller *SHOX* genini, yeşil sinyal Y kromozomunun Yq12 bölgesini, aqua sinyaller de X kromozomunun sentromer bölgesini işaretlemiştir. Metafazda ve interfaz görüntülerinde X kromozomunun sentromeri ve Y kromozomunun Yq12 bölgesi ve *SHOX* geni için birer sinyal alındı. Metafazda görüldüğü gibi, X kromozomu üzerindeki *SHOX* geni delesyona uğramıştır.

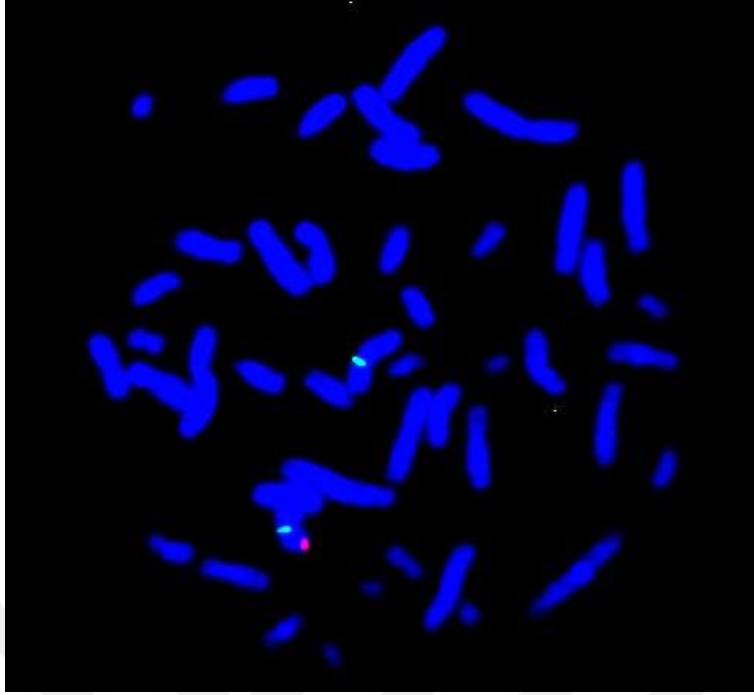
Olgu 8

Boy kısalığı (-2.15 SD), fenilketonüri, kalkan göğüs endikasyonu bulunan 10 yaş 9 aylık kız olguya yapılan kromozom analizinde herhangi bir anomali saptanmadı (Karyotip: 46,XX) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: Olgu 8'e yapılan kromozom analizi sonucunda saptanan 46,XX karyotip görüntüsü.

Boy kısalığı endikasyonu sebebiyle *SHOX* genine özgün proba (Cytocell) yapılan FISH incelemesinde toplam 100 hücre analiz edildi ve mozaik olarak 11 hücrede *SHOX* delesyonu saptandı (46,XX.ish Xp22.3(SHOXx2/DXZ1x2)(SHOXx1/DXZ1x2)[89/11] (Şekil 4-15).

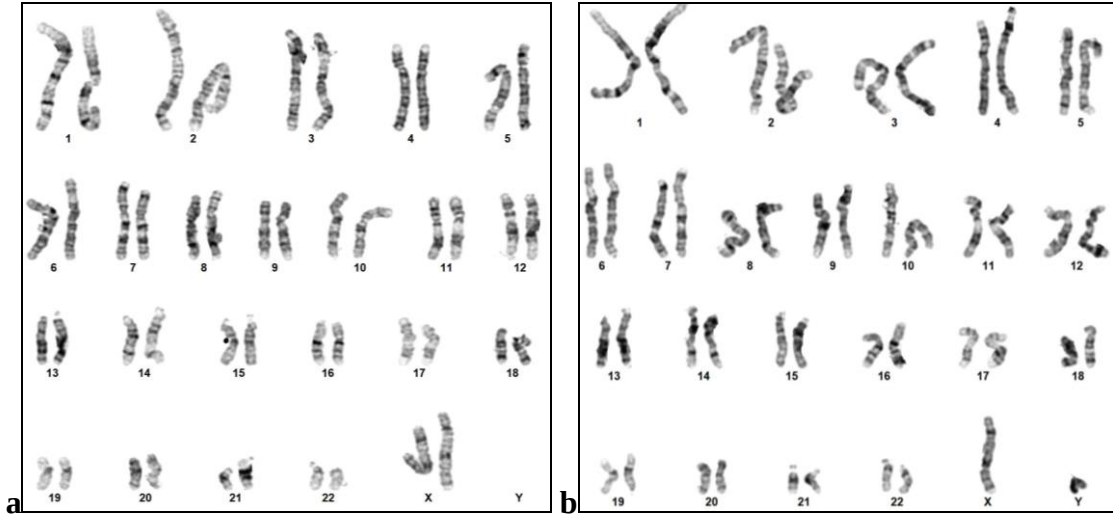


Şekil 4-15: Olgu 8'in *SHOX* genine özgün proba yapılan metafaz FISH görüntüsü. Yeşil sinyaller X kromozomunun sentromerini, kırmızı sinyaller *SHOX* genini işaretlemiştir. X kromozomlarının birinde kırmızı sinyal alınamadı ve *SHOX* geninde delesyon olduğu gösterildi.

4.1.4. a-CGH ile Saptanan Anomaliler

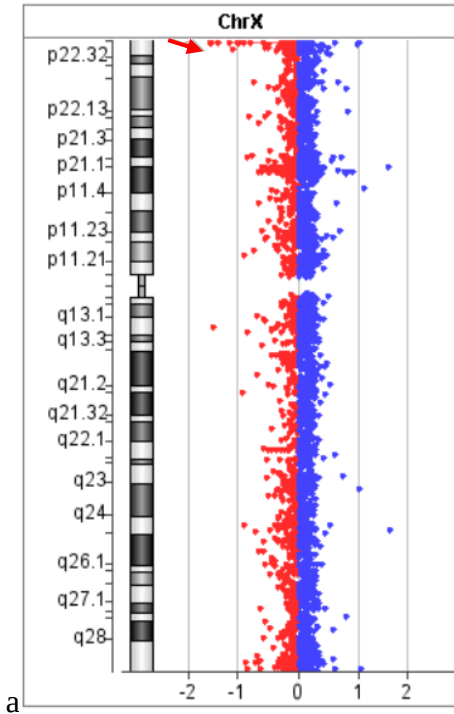
Olgu 9: Boy kısalığı ve mezomelik kısalık endikasyonu ile başvuran olguya yapılan karyotip analizi normal (46,XY) olarak sonuçlandı. Ardından yapılan a-CGH incelemelerinde Xp22.33 ve Yp11.31p11.2 bölgesinde (589723-653999 baz çiftleri arasında) *SHOX* genini içeren 64 Kb boyutunda homozigot bir delesyon saptandı (arr[GRCh38] Xp22.33(589723_653999)x0, Yp11.31p11.2(589723_653999)x0).

Olgu 10-11: Olguda saptanan *SHOX* geni delesyonunun etiyolojisinin ve parental kökeninin araştırılması amacıyla anne ve babasına (Olgu 10-11) yapılan klasik sitogenetik analizlerden normal sonuç alındı (Olgu 10 Karyotip: 46,XX; Olgu 11 Karyotip: 46,XY) (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: a) Olgu 10'a yapılan kromozom analizi sonucu saptanan 46,XX karyotip görüntüsü. b) Olgu 11'e yapılan kromozom analizi sonucu saptanan 46,XY karyotip görüntüsü.

Ardından yapılan a-CGH çalışmasında olgu 10'da Xp22.33 bölgesinde, olgu 11'de ise Yp11.31p11.2 bölgesinde *SHOX* genini içeren delesyon saptandı. Olgu 10 ve olgu 11'in *SHOX* geni delesyonu açısından taşıyıcı oldukları saptandı (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: a) Olgu 10'a ait a-CGH görüntüsü. Xp22.33 bölgesinde *SHOX* geni delesyonu gösterilmiştir.

4.2. Yeni Nesil Dizileme Gen Paneli Dizileme Bulguları

Yeni Nesil Dizileme Ion Torrent tabanlı YND Gen-panel dizileme çalışması için idiyopatik boy kısalığı endikasyonu bulunan ve karyotip analizi, FISH ve a-CGH çalışmaları normal çıkan 10 olgu seçildi. İki erkek ve sekiz kız olan olguların akraba evliliği oranı %10 idi. Olguların seçilme kriterleri boylarının kısalığının yanı sıra ailede kısa boylu bireylerin bulunması, madelung deformitesi gibi *SHOX* delesyonu ile ilişkili fizik muayene bulgularının olması ve kromozom analizi ve *SHOX* genine özgün FISH sonuçlarının normal olması olarak belirlendi.

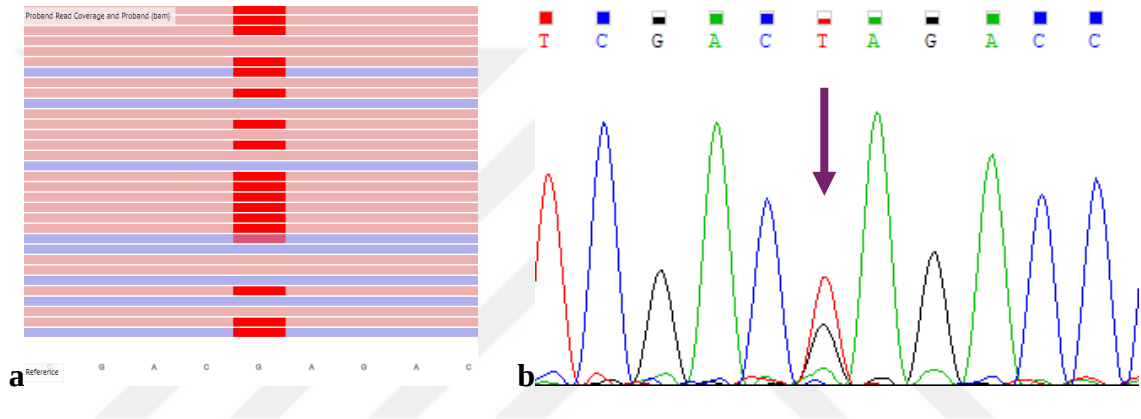
Tablo 4-3: Gen paneli dizilemesinde saptanan varyant ve olgunun endikasyon bilgileri

Moleküler Bulgular	Detaylar
Olgu No	Olgu 13
Endikasyon	Boy kısalığı (-1,49 SD) Antenatal US'de tüm ekstremitelerde kısalık
Gen	<i>SHOX</i> (NM_000451.3)
Kalıtım	Heterozigot
Koordinat (Hg19)	chrX: 595487
Ekzon	3
Nükleotid	c.412G>T
Protein	p.Glu138*
ACMG varyant sınıflandırması (VarSome)	Olası patojenik
<i>In silico</i> analiz	-

YND çalışmaları sonucunda toplam bir olguda *SHOX* geninde daha önce bildirilmemiş anlamlı olabilecek patojenik bir değişim saptandı. Değişimler *in silico* araçlarla ve

çeşitli veri tabanlarıyla değerlendirildi ve dizinin okunma kalitesi, okuma derinliği, okuma yön uyumsuzlukları ve olguların dizi kaliteleri birbiriyle karşılaştırılarak kontrol edildi. *SHOX* geninde chrX:595487 G>T noktasında saptanan değişim olası patojenik bir varyant olarak belirlendi ve Sanger dizileme ile varyant konfirme edildi.

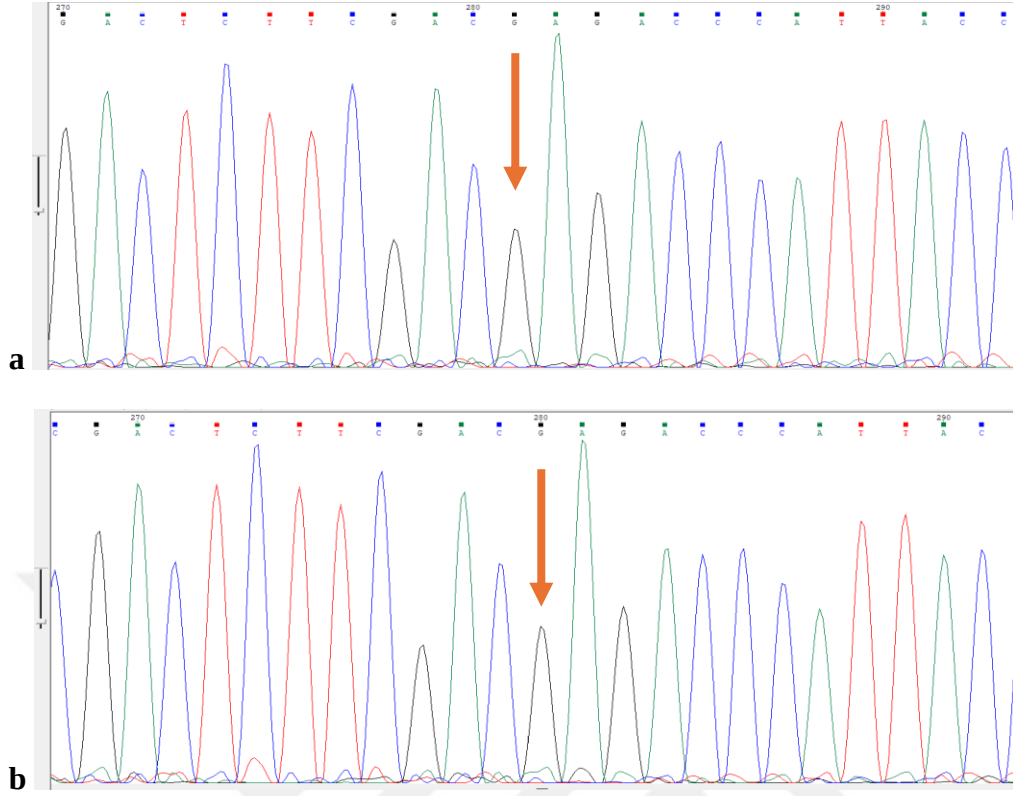
Olgu 13: Proksimal ekstremité kısalığı ve boy kısalığı (-2,08 SD) bulunan 10 aylık kız olguda yapılan boy kısalığı YND gen-paneli dizilemesi sonucunda *SHOX* geninde heterozigot chrX:595487, c.412G>T noktasında *novel*, ACMG kriterlerine göre olası patojenik olarak sınıflanan bir varyant saptandı. ,



Şekil 4-18: Olgu 13'te *SHOX* geninde saptanan c.412G>T heterozigot varyantın görüntüsü. a) IGV b) Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü. Varyant ok ile gösterilmiştir.

4.2.1. Sanger Dizileme Sonuçları

Olgu 13'te saptanan heterozigot olası patojenik varyantı araştırmak amacıyla olgunun anne ve babasına Sanger dizileme ile segregasyon çalışması yapıldı. Çalışmaların sonucunda anne ve babanın *SHOX* geninde saptanan varyant açısından normal oldukları indeks de saptanan varyantın de novo olarak oluştuğu gösterildi (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, annenin (a) ve babanın (b) normal olan elektroferogram görüntüsü.

Olgu 13'te YND gen-paneli dizilemesi ile saptanan *SHOX* genindeki heterozigot c.412G>T, p.Glu138* *novel* varyantının, protein değişimi araştırıldı. Şekil 4-20'de *SHOX* geninden eksprese olan protein modellemesi üzerinde, olguda değişim saptanan aminoasitin konumu gösterilmiştir.



Şekil 4-20: Saptanan p.Glu138* değişimindeki Glu amino asiti, *SHOX* proteini modellemesi üzerinde ok işareti ile gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Boy kısalığı, belirli yaş, cinsiyet kriterlerine göre oluşturulmuş verilere göre ortalama boyun 2 standart sapmanın altında olması durumu olarak kabul edilmektedir. Poligenik ve heterojen özellikte olan insan boyununu gelişimi genetik ve çevresel faktörlere dayanmaktadır. Çevresel faktörler dışlandığında, boy kısalığı kromozomal, multifaktöriyel ve tek gen gibi birçok genetik faktörle oluşabildiğinden boy kısalığının etiyopatogenezinin aydınlatılması oldukça zordur. İzole kısa boydan şiddetli ve sendromik boy kısalığına kadar fenotipik olarak heterojen bir grup olan idiyopatik boy kısalığının genetik etiolojisinin araştırılması, sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerinin gelişmesiyle daha mümkün hale gelmiştir.

Boy kısalığının en sık görülen genetik nedenlerinden birisi *SHOX* geninin haployetmezliğidir. Boy kısalığı ile ilişkili *SHOX* geni her iki cinsiyet kromozomunun kısa kolundaki telomerik PAR1 bölgesinde bulunmaktadır ve iskelet büyümesinde rol oynayan bir transkripsiyonel faktörü kodlamaktadır. X inaktivasyonundan kaçan bölgede bulunduğundan *SHOX* geninin normal bireylerde 2 doz bulunması gerekmektedir. İşlevi doza bağımlı olan *SHOX* geninde meydana gelen delesyon ve mutasyonlar, normal fenotipten mezomelik kısalık ve Madelung deformitesini içeren belirgin iskelet anomalilerinin de olduğu kısa boya kadar fenotipik olarak geniş bir spektruma sahiptir. Boy kısalığı vakalarının yaklaşık %2,6-12'sinde görülen Leri-Weill diskondrosteozis (LWD) kısa boy, orantısız mezomeli ve Madelung deformitesi ile belirgin olan *SHOX* geninin mutasyonu ile ilişkili bir sendromdur. Leri-Weill diskondrosteozisi olan çocukların yaklaşık %70'inde *SHOX* geni mutasyonu söz konusudur. İdiyopatik boy kısalığı bulunan bireylerin ise yaklaşık %15'inde *SHOX* mutasyonlarına bağlı LWD tanımlanmıştır. [92] Langer mezomelik displazisi ise, *SHOX* geninin homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyonlarının neden olduğu en şiddetli sendromik bulgusudur.

Pavlina Capkova ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada boy kısalığı bulunan 174 olguda karyotip, FISH, MLPA ve Sanger dizileme teknikleri kullanılarak *SHOX* geninin boy kısalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda olguların %15,5'inde *SHOX* geniyle ilişkili anomali saptanmıştır. Bu anomalilerin %3,55'i karyotip analizi ile %13,46'inde ise FISH tekniğiyle saptanmıştır. [93] Bu tez

çalışması kapsamında, boy kısalığı ile başvuran 125 olguda yapılan kromozom analizinde olguların %4,8'inde (n=6) *SHOX* genini içeren sayısal ve yapısal kromozom anomalisi saptandı. Yüz yirmi iki olguda *SHOX* genine özgün prob kullanılarak yapılan FISH incelemesinde ise olguların %6,55'inde (n=8) anomali gösterildi. Olguların %1,6'sında (n=2) kromozom analiz sonucu normal olmasına rağmen FISH incelemesinde *SHOX* geninde sub-mikroskobik saptanmıştır. Bu sonuca göre, yukarıdaki çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da, FISH tekniğiyle saptanan anomali oranı daha yüksektir. Bu sonuç, daha önceki araştırmalarda da vurgulandığı gibi, hedefli incelemelerde FISH tanı veriminin karyotip analizinden daha etkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda FISH incelemelerinde anomali saptanan olguların %62,5'unda (n=5) mozaik *SHOX* delesyonu gösterildi. Pavlina Capkova ve arkadaşlarının çalışmasında da FISH incelemesi yapılan olguların %50'sinde *SHOX* geninin mozaik delesyonları rapor edilmiştir. Bu çalışmalar, özellikle submikroskobik düzeydeki değişimlerin saptanmasında FISH tekniğinin daha verimli olduğunu göstermekte ve idiyopatik boy kısalığı olgularında özellikle dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, cinsiyet kromozomu anomalilerinin dokusal dağılımının araştırılması için periferik kana ek olarak farklı dokularda da *SHOX* genine özgün FISH incelemesi yapılarak ve olası dokusal mozaizmin dışlanması gerektiğini düşünüyoruz.

Bahsedilen Capkova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada boy kısalığı olgularında saptanan kromozom anomalilerinin %3,3'ü cinsiyet kromozomlarında saptanmıştır. [93] Bizim çalışmamızda ise saptanan kromozom anomalilerinin tamamının cinsiyet kromozom anomalisi olduğu gösterildi. Sayısal anomaliye bağlı *SHOX* geni haployetmezliği ise %0,81 (n=1) oranında görülmüştür.

Turner sendromu sadece monozom X ile değil, X kromozomunun p kolunun delesyonu, izokromozom Xq ve halka X kromozomu olmak üzere X kromozomunun yapısal anomalilerinin de mozaik ve non-mozaik formda görüldüğü geniş bir spektrumdur. Klasik karyotipleme ve FISH incelemesi uygulanan 125 olgunun %4'ünde (n=5) saptanan anomaliler mozaik olarak bulunmuştur. Boy kısalığı, primer overyan yetmezlik ve yele boyun, cubitus valgus, yüksek damak gibi dismorfik özellikleri bulunan Olgu 3'te mozaik halka X kromozomu saptandı (mos 45,X/46,X,r(X)(p22.1q23)[43/15]). Halka X kromozomunun tespiti diğer cinsiyet

kromozom anomalilerine göre daha zordur. Çünkü, r(X) kromozomlarının kararsız doğası sebebiyle hücre bölünmesi ve yaşla birlikte mozaiklik oranının azaldığı bilinmektedir. Halka X kromozomu oluşumu aşamasında delesyona uğramış genlere bağlı olarak olgulardaki klinik bulguların şiddeti farklılık göstermektedir. Ayrıca X inaktivasyonunu kontrol eden XIST transkriptinin delesyona uğraması zihinsel yetersizlik ve çoklu konjenital anomalileri içeren ağır bir fenotipe neden olmaktadır. [94] Ancak bizim olgumuzda saptanan klinik bulgular bahsedildiği kadar ağır değildi. Bu nedenle XIST transkriptinin eksprese olamadığı ve seçici X inaktivasyonuna bağlı olarak halka X kromozomunun inaktive edildiğini düşünüldü. Halka X kromozomuna sahip olgularda kırık noktasına bağlı olarak Turner spekturumunun farklı klinik bulguları görülmektedir. Olgumuzun klinik muayenesinde görülen, primer overyan yetmezlik, yele boyun ve kubitus valgus sendromla uyumludur. Boy kısalığı fenotipinin ise halka X kromozomundaki p kolunda yerleşimli *SHOX* geninin delesyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı.

X kromozomunun nadir görülen yapısal anomalilerinden birisi izokromozom X'tir (46,X,i(Xq)). İki uzun kolun (q) kopyasının sentromerik füzyonla oluşması sonucunda meydana gelen izokromozom Xq mozaik olarak bulunmaktadır ve Turner sendromlu vakaların %8-9'unda görülmektedir. [95] Bizim çalışmamızda bir olguda (Olgu 4) mozaik 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX[8/3/49] karyotipi saptandı. X kromozomlarından birinde q kolundan 2 doz bulunurken p kolunun delesyona uğraması *SHOX* geninin haployetmezliğine neden olmuştur ve olgudaki boy kısalığının sebebi aydınlatılmıştır. Ancak, olguda literatürde bahsedilen diğer ağır klinik bulgulara rastlanmamıştır [96]. Olguda 46X,i(Xq) karyotipinin yanında mozaik olarak 46,XX ve 45,X karyotiplerinin de saptanması, olgunun kliniğinin hafiflemesine neden olduğu ya da patolojik hücrelerin dokusal dağılımının etkili olabileceği düşünüldü. Böylece çeşitlilik gösteren mozaik Turner spekturumunun bir örneği gösterilmiş oldu. da Tip2 diyabet bulgularına rastlanması, olgunun izokromozom Xq fenotipini yansıttığını göstermiştir.

Çalışmamızda yapılan kromozom analizleri sonucunda Olgu 5'te saptanan derivatif X kromozomunun aydınlatılması amacıyla yapılan a-CGH çalışmasında X kromozomunun p22.33p22.31 bölgesinde 6,2 Mb büyüklüğünde delesyon ve 6. kromozomun p25.3p22.1 bölgesinde 27 Mb büyüklüğünde bir duplikasyon olduğu

gösterildi (.arr[GRCh38] 6p25.3p22.1(255350_27548234)x3, Xp22.33p22.31(265492_6495923)x1). Bu sonuca göre olguda 6. kromozomun parsiyel trizomisi ve X kromozomunun parsiyel monozomisi söz konusudur. Altıncı kromozomun p kolunun trizomisinin gelişimsel bozukluklara ve ağır klinik bulgulara yol açtığı bilinmektedir. [97] Ancak, olgumuzda boy kısalığı (-0,83 SD) ve sol yüz, sol vücut hipoplazisi gibi daha hafif bulgular dikkati çekmektedir. Dengesiz X;otozom translokasyonları nadir görülen bir durumdur ve bu tür anomalilerde klinik bulgular değişkenlik göstermektedir. Bu tür olgularda derivatif X kromozomunun seçici inaktivasyonu sırasında otozom kromozomda susturulduğundan trizomik bölgenin etkisi azalmaktadır. [98] Buna karşın, X kromozomunun üzerinde genler ise parsiyel monozomiye uğramış ve Xp22.33p22.31 bölgesinde gerçekleşen delesyon *SHOX* genini de içerdiğinden, *SHOX* geninin haployetmezliği bağlı boy kısalığı görülmüştür.

Y kromozomunun yapısal anomalileri arasında sıklıkla görülen izodisentrik Yp oluşumunda kırılma noktasına bağlı olarak Y kromozomu materyalinin artması ve kaybı meydana gelir. İki sentromeri bulunduğu izodisentrik kromozomların mitotik instabilitesi nedeniyle stabil kalması zordur ve kararsız yapıdadırlar. Hücre bölünmesi sırasında sentromerlerden birinin inaktivasyonu ya da sentromerlerin birbirine yakın olması durumunda iki aktif sentromerin mitotik iğlere bağlanmasıyla stabil kalamaması sonucu izodisentrik Y kromozomu saptanan olguların %91-95'i 45,X hücre hattı ile mozaik yapıda bulunurlar. Erkek cinsiyeti belirleyici faktörleri, spermatogenez, büyüme ve gelişme genleri içerdiğinden Y kromozomundaki delesyonlar ve duplikasyonlar çoklu malformasyonlar ve işlev bozukluklarına neden olmaktadır. Monozomi X hücre hattı ile mozaik olan olgularda Turner fenotipi görülebilirken, idic(Yp) saptanan olgularda boy kısalığı, infertilite, azospermi, gonadal anormallikler (örn. gonadal disgenezi) ve atipik genital yapı (örn. klitoromegali, hipospadias) gibi geniş bir yelpazede klinik bulgular gözlenmektedir. Bu çalışmada bir olguda (olgu 6) karyotip analizinde mozaik derivatif Y kromozomu saptandı. *SRY* genine özgün prob kullanılarak yapılan FISH incelemesiyle idic(Y)(p11.2) olduğu gösterildi.

Rizomezomelik boy kısalığı bulunan 3 yaş 5 aylık kız olguda mos 45,X/46,X,der(Y)/47,X,der(Y),+der(Y) [6/47/4] karyotipi saptandı. Erkek fenotipiyle ilişkilendirilmiş *SRY* geninin FISH incelemesi sonucunda 80 hücrede 2 doz ve 10 hücrede 4 doz olarak bulunduğu saptandı (.ish

idic(Y)(p11.2)x1/idic(Y)(p11.2)x2(SRYx0,DYZ1x0,DXZ1x1/SRYx2,DYZ1x2,DXZ1x1/SRYx4,DYZ1x4,DXZ1x1) [10/80/10]). Y kromozomunun mevcut kısmına bağlı olarak idic(Y) erkek ya da dişi fenotiple ilişkilendirilebilmektedir. Camargo ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptıkları araştırmada, kültür edilmiş hücrelerde inter-sentromerik mesafe ile mitotik instabilite arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. idic(Y)'de inter-sentromerik uzaklığı 20 Mb'den fazla olan hastalarda yaygın 45,X gonadal mozaikliğine bağlı olarak kadın fenotipi riskinin artacağı düşünülmektedir. [104] Yiqun He ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada ise, çift SRY kopyası olan idic(Y) kromozomuna sahip 9 olgunun 7'sinde normal erkek fenotip saptanmıştır. Spermatogenezi kontrol eden genleri içeren AZF bölgesi, AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerini kapsayan Yq11.2'de yer almaktadır. AZFa bölgesinin tamamen silinmesi azospermiye, AZFb bölgesinin silinmesi testis fenotipinde olgunlaşmanın durmasına, AZFc delesyonu ise tam azospermiden hafif oligozoospermiye kadar değişen en değişken fenotipe neden olmaktadır. Yukarıda bahsedilen aynı çalışmada, bir olguda idic(Y)(p11.3)'ü çift AZF bölgesine sahip olmasına rağmen 45,X hücre hattı taşıdığından, gonadlardaki 45,X hücre hattının düzeyi ve dağılımı spermatogenezi etkileyebileceği düşünülmüştür. [105] Bizim çalışmamızda da haricen dişi olan olguda rizomezomelik kısalık dışında mikst gonadal disgenezi tanısıyla ilişkilendirilebilecek herhangi belirgin bir bulguya rastlanmadı.

İzodisentrik Y kromozomlarının mozaikliği, hücre hatlarının farklı dokulardaki dağılımları sebebiyle hastaların genotip fenotip korelasyonunu belirlemek literatürde belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da zor olmuştur. SRY geninin iki ve dört kopyasının bulunmasına rağmen mozaiklikten dolayı olgudaki cinsiyet belirteçlerinin tespiti zor olmuştur. Ayrıca, izodisentrik Y kromozomu saptanan olgularda gonadoblastoma prevalansının %10-24 olduğu gösterilmiştir. [106] Bu nedenle izodisentrik Y ile ilgili fenotipin daha eksiksiz bir şekilde anlaşılması, mozaik taşıyıcılarda ergenlik gelişimi, doğurganlık ve tümör riski ile ilgili yönetimi yönlendirmek için gereklidir. İzodisentrik Y kromozomunun çoklu sistem etkilerinin yanı sıra aşırı fenotipik heterojenlik göz önüne alındığında, bakımın genetik, jinekoloji, üroloji, endokrinoloji, cerrahi ve psikolojinin katkılarıyla disiplinler arası bir yaklaşımı içermesi gerektiğini savunuyoruz. İzodisentrik kromozom yapısı oluşurken kırık noktasının Yp11.2 bölgesinde gerçekleşmesi sebebiyle SHOX geninin delesyona uğradığı FISH incelemeleri sonucunda gösterilmiş ve olguda saptanan boy kısalığının sebebi aydınlatılmıştır.

Çalışmamızda boy kısalığı endikasyonu bulunan 125 olgunun n=22 (%17,6) a-CGH çalışması yapıldı ve n=4 (%18,18) *SHOX* geni ile ilişkili değişim saptandı. Saptanan anomalilerden %75'i (n=3) kromozom analizi ve FISH incelemesi normal sonuçlanan olgulardı. Klinik değerlendirmede, boy kısalığı, mezomelik kısalık, küçük kulak bulunan Olgu 9'un a-CGH çalışması sonucunda X ve Y kromozomlarının Xp22.33 ve Yp11.31p11.2 bölgesinde 589723-653999 baz çiftleri arasında 64 Kb boyutunda *SHOX* geni içeren homozigot delesyon saptandı. Anomaliyi araştırmak amacıyla olgunun anne ve babasına (Olgu 10-11) öncelikle karyotip ve *SHOX* genine özgün proba FISH analizleri yapıldı ve normal sonuç alındı. Ardından olgulara a-CGH analizi yapıldı ve olgu 10'nun Xp22.33 bölgesinde, olgu 11'de ise Yp11.31p11.2 bölgesinde *SHOX* genini içeren delesyon gösterildi. Olgu 9'da saptanan homozigot *SHOX* delesyonunun heterozigot ebeveynlerden kalıtıldığı a-CGH tekniği sayesinde aydınlatılmıştır. Array tabanlı genomik hibridizasyon yöntemi ile geleneksel karyotipleme analizine göre delesyonlar ve duplikasyonların tanısı kilobazlar düzeyinde mümkündür. [99]

SHOX delesyonu ve mutasyonları saptanan olguların fenotipik özellikleri ve klinik bulguları değişiklik göstermektedir. LWD'li vakaların %60'ında *SHOX* geninde mutasyon ya da delesyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca idiyopatik boy kısalığında *SHOX* geninin mutasyonları olguların %2-22'sinde tanımlanmıştır. [100] Bir çalışmada *SHOX* geninin nokta mutasyonlarının çoğunlukla ekzon 3 ve ekzon 4'te meydana geldiği saptanmıştır. [101] Bir başka çalışmada ise *SHOX* geninin mutasyonlarının araştırılması amacıyla idiyopatik boy kısalığı olgularına yapılan dizi analizi sonucunda herhangi bir varyanta saptanmamıştır. [102] Bizim çalışmamızda idiyopatik boy kısalığı bulunan, sitogenetik ve moleküler sitogenetik analiz sonuçları normal olan 10 olguya yapılan YND gen paneli çalışması sonucunda olgulardan birinde olası patojenik varyant saptandı. *SHOX* geninin dizilendiği olgulardan %10'unda saptanan nokta mutasyonu oranının literatürle uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Olguda *SHOX* geni (NM_000451.3) 3. ekzonda saptanan c.412G>T (p.Glu138Ter)(NM_000451.3) heterozigot varyantın anlamsız (*nonsense*) tipte erken stop kodon oluşumuna neden olması beklenmektedir. Ayrıca varyantın sağlıklı anne babada bulunmaması ve klinik bulguları uyumlu olgumuzda saptanması, varyantın anlamlı olduğunu göstermiş oldu. Daha önce bildirilmemiş (*novel*) olan bu varyantın patojenitesini ve ilişkisini anlamlandırmak amacıyla öncelikle olgunun anne ve babasına

segregasyon çalışmaları yapıldı. Sanger dizileme ile yapılan segregasyonda anne ve babanın *SHOX* geninde saptanan varyant açısından normal oldukları görüldü. Olguda *de novo* olduğu gösterilen varyantın daha önce literatürde bildirilmemesi sebebiyle *in silico* patojenite tahmin programı Franklin (genoox) da yapılan incelemede varyant ACMG sınıflamasına göre fonksiyon kaybına neden olması ve gnomad veritabanında rastlanmaması nedeni ile patojenik benzeri olarak sınıflanmıştır [112].

Yedi ekzonlu *SHOX* geni, birbirinin izorformu olan SHOXa ve SHOXb (sırasıyla 292 ve 225 amino asitlik) proteinleri kodlamaktadır. İki farklı promoterin (biri ekzon 1'in önünde bulunan ve diğeri ekzon 2'nin başında bulunan) alternatif kullanımı, 5'UTR'de farklı olan ancak aynı proteinleri üreten iki mRNA'ya yol açar. Bu transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanmasından sorumlu olan homeodomain, ekzon 3 ve 4 tarafından kodlanır. [111] *SHOX* geninde eksprese olan homeodomain proteinin iskelet sistemi gelişimi, DNA şablonlu transkripsiyonun düzenlenmesi, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun düzenlenmesi ve RNA polimeraz II ile transkripsiyonun pozitif düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Homeodomain transkripsiyon faktörleri, model oluşumu, farklılaşma ve organogenezin düzenlenmesinde rol oynar ve bu genlerdeki eksiklikler, malformasyonlarla sonuçlanan gelişimsel süreçlerin yanlış düzenlenmesine yol açabilir. Çalışmamızda saptanan p.Glu138Ter değişiminin ekzon 3'te ve *SHOX* geni ekspresyonunda homeodomain transkripsiyon faktörü üzerinde bulunduğu tespit edildi. İnsan profesyonel mutasyon veritabanına göre (HGMD professional (v2024.1)) *SHOX* geninde literatürde bugüne kadar bildirilen 396 hastalık ilişkili patojenik varyantın 22'sinin stop kodon oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir [110]. mRNA da erken stop kodonu oluşturan bu varyantların fonksiyon çalışmalarında Anlamsız aracılı mRNA bozunmasına (nonsense-mediated decay) neden olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmanın ana işlevi, erken durdurma kodonları içeren mRNA transkriptlerini ortadan kaldırarak gen ifadesindeki hataları azaltmaktır [111] . Protein yapımı gerçekleşmeyen ve stop kodon oluşumuna yol açan varyantlar kısa boy, Leri-Weill dyschondrosteosis klinik tanıları ile ilişkilendirilmiştir. Olgumuzda da mRNA decay nedeni ile güdük protein yapımının engellendiği ve haployetmezliğin klinik bulgulara yol açtığı anlaşılmıştır.

Sonuç

SHOX geniyle ilişkili boy kısalığının genetik etiyolojisinin araştırılması için öncelikle olguların fizik muayeneleri ve aile öyküsü tartışılmalıdır. Ardından genetik testler uygulanarak olası tedavi yaklaşımı belirlenmelidir. Sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik teknikleriyle *SHOX* geni incelenerek, boy kısalığının nedeninin aydınlatılması mümkündür. Tek gen hastalıklarında regülatör bölge mutasyonları ve derin intronik varyantların da diğer tek gen hastalıkları gibi klinik bulgu verme olasılığı bulunmaktadır. Ancak çalışmamızda bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeni ile *SHOX* geninin regülatör bölge ve derin intronik bölgeleri incelenmemiştir.

Bu çalışma sonucunda klasik sitogenetik tekniklerin halen gold standart olduğu gösterilmiştir. Boy kısalığı ile ilişkili anomali saptanan olguların %50'si (n=6) klasik karyotipleme ile tespit edilmiştir. Ayrıca moleküler sitogenetik yöntemi olan FISH incelemesinin konvensiyonel sitogenetik tekniklere gerektiğinde tamamlayıcı rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak genin bağlı olduğu yolakları ve daha küçük anomalileri araştıramadığından yeni nesil dizileme teknolojilerine ihtiyaç vardır.

Yeni nesil dizileme teknolojileri, çok sayıda varyantı tarayarak hastalıkla ilişkili değerlendirme yapmaya olanak sağlar. Geniş etkilere sahip nadir varyantların saptanması ve hastalıkla ilişkilerinin belirlenmesi için ek çalışmalarla yeni nesil dizileme tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Saptanan varyantların hastalıkla ilişkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak veritabanları doğru seçilmeli ve güncel literatür bilgisi takip edilmelidir. Çoğu varyantın henüz patojenitesi hakkında yeterli veri bulunmaması nedeniyle dikkatli davranılmalıdır. Ayrıca saptanan varyantların aile çalışmaları ile doğrulanması ve kalıtım modelinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada proje bütçesinin kısıtlılığından dolayı tercih edilen YND gen -panel testinin *SHOX* geni varyantlarının tamamının araştırılması açısından yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, boy kısalığı olgularının genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında *SHOX* geni varyantlarının dışlanması sonrasında tüm ekzom veya tüm genom dizileme çalışmaları ile ilerleyen çalışmalarda devam ettirilmesinin daha doğru bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Neyzi, O., et al., Büyüme-Gelişme ve Bozuklukları, in Pediatri, O. Neyzi and T. Ertuğrul, Editors. 2009, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 89-149.
2. Baron, J., et al., Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol*, 2015. 11(12): p. 735-46.
3. Hussein A, Farghaly H, Askar E, et al. Etiological factors of short stature in children and adolescents: experience at a tertiary care hospital in Egypt. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2017;8(5):75-80. doi:10.1177/2042018817707464
4. Dünder, Y., O. Evliyaoğlu, and Ş. Hatun, Okul çocuklarında boy kısalığı ve obezite: ihmal edilen bir sorun. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*, 2000. 9(1): p. 19-22.
5. Uçkun, U. e. (2019). Evaluation of the etiology of severe short stature in children at a Tertiary Pediatric Endocrinology Centre. *The Journal of Child*.
6. Schneider, K.U., et al., Identification of a major recombination hotspot in patients with short stature and SHOX deficiency. *Am J Hum Genet*, 2005. 77(1): p. 89-96. 3. Seaver, L.H., et al., ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genet Med*, 2009. 11(6): p. 465-70.
7. Nam, H. K., & Lee, K. H. (2018). Small for gestational age and obesity: epidemiology and general risks. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, 23(1), 9–13. <https://doi.org/10.6065/apem.2018.23.1.9>
8. Gluckman P.D., Hanson M.A., Morton S.M. & Pinal C.S. (2004b) Life long echoes – a critical analysis of the developmental origins of adult disease model. *Biology of the Neonate*, 87, 127–139.
9. Wit, J.M., Kiess, W. and Mullis, P. (2011) “Genetic evaluation of short stature,” *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.06.007>
10. Kliegman, R.M., et al., *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis E-Book*. 2017: Elsevier Health Sciences.

11. Wit, J.M. et al. (2008) "Idiopathic short stature: Definition, Epidemiology, and diagnostic evaluation," *Growth Hormone & IGF Research*, 18(2), pp. 89–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2007.11.004>.) 24
12. Malkoç, İ. (2006) "Boy Kısallıkları," *Van Tıp Dergisi*, 13(2), pp. 67–70.)
13. Yüksel Apak, M., Tıbbi Genetik ve Genetik Hastalıklar, in *Pediyatri*, O. Neyzi and T. Ertuğrul, Editors. 2009, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 151-189.
14. Saal, H.M., *Russell-Silver Syndrome*. 2011.
15. Allanson, J.E. and A.E. Roberts, Noonan Syndrome, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
16. Pauli RM. Achondroplasia: a comprehensive clinical review. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14:1.
17. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*. 2010;467(7317):832-838. doi:10.1038/nature09410
18. Wood AR, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*. 2014;46(11):1173–86.
19. Berglund, A., Stochholm, K., & Gravholt, C. H. (2020). The epidemiology of sex chromosome abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. doi:10.1002/ajmg.c.31805
20. Fidanboy, M., Özbek, M., Alp, M., Budak, T., & Balkan, M. (2015). Different chromosome Y abnormalities in a case with short stature. *Journal of Pediatric Genetics*, 01(04), 239–242. doi:10.3233/pge-12038
21. National Center for Biotechnology Information (US). *Genes and Disease* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 1998-. Chromosome Map. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22266/>
22. Polani PE. Experiments on chiasmata and nondisjunction in mice. *Hum Genet Suppl*. 1981;2:145–146.

23. Quintana-Murci, L., & Fellous, M. (2001). The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland". *Journal of biomedicine & biotechnology*, 1(1), 18–24. <https://doi.org/10.1155/S1110724301000080>
24. Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). Sexual Differentiation. *Human Reproductive Biology*, 87–102. doi: 10.1016/b978-0-12-382184-3.00005-2)
25. Turner HH: A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*. 1938, 23:566-74. 10.1210/endo-23-5-566
26. Turner Syndrome: Diagnostic and Management Considerations for Perinatal Clinicians. Redel JM, Backeljauw PF *Clin Perinatol*. 2018;45(1):119.)
27. Gravholt CH: Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005, 49:145-56. 10.1590/s0004-27302005000100019
28. Berglund, A., Stochholm, K., & Gravholt, C. H. (2020). The epidemiology of sex chromosome abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. doi:10.1002/ajmg.c.31805
29. Messer, K., D'Epagnier, C., Howell, S., & Tartaglia, N. (2013). Trisomy X Syndrome (47,XXX). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 195–197. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.01700-9
30. Morton, C. C., & Lee, C. (2009). Cytogenetics in Reproduction. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*, 777–799. doi:10.1016/b978-1-4160-4907-4.00031-0
31. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2015. *Improving Diagnosis in Health Care*. Washington, DC: The National Academies Press.
32. Davis, S. M., & Ross, J. L. (2018). Klinefelter Syndrome. *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.66137-8
33. Ferguson-Smith, M. A. (2013). Klinefelter Syndrome. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 170–171. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.00835-4
34. Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). Sexual Differentiation. *Human Reproductive Biology*, 87–102. doi:10.1016/b978-0-12-382184-3.00005-2 V
35. Sorensen K, Nielsen J, Jacobsen P, Rolfe T. The 48,XXYY syndrome. *J Ment Defic Res*. 1978;22:197–205. [PubMed] [Google Scholar]

36. M.F. Portnoi and others, Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients, *Human Reproduction*, Volume 21, Issue 9, 1 September 2006, Pages 2329–2334, <https://doi.org/10.1093/humrep/del174>
37. Wolff DJ, Van Dyke DL, Powell CM; Working Group of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet Med* 2010;12:52-5
38. Oliveira CS, Ribeiro FM, Lago R, Alves C. Audiological abnormalities in patients with Turner syndrome. *Am J Audiol* 2013;22:226-32.
39. ChoSY, Ki CS, Jang JH, et al. Familial Xp22.33-Xp22.12 deletion delineated by chromosomal microarray analysis causes proportionate short stature. *Am J Med Genet A* 2012;158:1462-6.
40. Mercer CL, Lachlan K, Karcianas A, et al. Detailed clinical and molecular study of 20 females with Xq deletions with special reference to menstruation and fertility. *Eur J Med Genet* 2013;56:1-6.
41. Murray A. Premature ovarian failure and the FMR1 gene. *Semin Reprod Med* 2000;18:59-66.
42. Sybert VP, Mccauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:1227-38.)
43. Gürsoy, Semra & Erçal, Derya. (2017). Turner Syndrome and Its Variants. *The Journal of Pediatric Research*. 4. 171-175. 10.4274/jpr.35744.
44. Lin, Y. H., Chuang, L., Lin, Y. M., Lin, Y. H., Teng, Y. N., & Kuo, P. L. (2005). Isochromosome of Yp in a man with Sertoli-cell-only syndrome. *Fertility and Sterility*, 83(3), 764–766. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.08.
45. Kim, J.-W., Park, S.-Y., Ryu, H.-M., Lee, D.-E., Lee, B.-Y., Kim, S.-Y., ... Seo, J.-T. (2012). Molecular and Clinical Characteristics of 26 Cases with Structural Y Chromosome Aberrations. *Cytogenetic and Genome Research*, 136(4), 270–277. doi:10.1159/000338413
46. Bağcı G, Acar H, Tomruk H. Different chromosome Y abnormalities in Turner syndrome. *Genet Couns* 2001;12(3): 255–61.
47. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, et al: Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933–943 (1996).
48. DesGroseilliers, M., Fortin, F., Lafrenière, A.-M., Brochu, P., Lemyre, E., & Lemieux, N. (2006). Dynamic increase of a 45,X cell line in a patient with

- multicentric ring Y chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 115(1), 90–93. doi:10.1159/000094805
49. Argente, J., Tatton-Brown, K., Lehwalder, D., & Pfäffle, R. (2019). Genetics of Growth Disorders—Which Patients Require Genetic Testing? *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi:10.3389/fendo.2019.00602
 50. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M, van Duyvenvoorde HA, Ruivenkamp CA, Kant SG. Mechanisms in endocrinology: novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*. (2016) 174:R145–73. doi: 10.1530/EJE-15-0937
 51. Mullis PE. Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:11–31. ve Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, et al. . Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:3191–3199.
 52. Andrew Dauber, Ron G. Rosenfeld, Joel N. Hirschhorn, Genetic Evaluation of Short Stature, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 99, Issue 9, 1 September 2014, Pages 3080–3092, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1506>
 53. Riedl S, Frisch H. Effects of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I therapy in patients with gene defects in the GH axis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006;19:229–36.
 54. Argente J, Tatton-Brown K, Lehwalder D, et al. Genetics of growth disorders – which patients require genetic testing? *Front Endocrinol*. 2019;10:602.
 55. Duriez B, Duquesnoy P, Dastot F, et al. An exon-skipping mutation in the *BTK* gene of a patient with X-linked agammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *FEBS Lett*. 1994;346:165–70.
 56. van Duyvenvoorde HA, Lui JC, Kant SG, et al. . Copy number variants in patients with short stature. *Eur J Hum Genet*. 2014;22:602–609.
 57. Burkitt Wright EM, Perveen R, Clayton PE, et al. . X-linked isolated growth hormone deficiency: expanding the phenotypic spectrum of SOX3 polyalanine tract expansions. *Clin Dysmorphol*. 2009;18:218–221.

58. David A, Hwa V, Metherell LA, Netchine I, Camacho-Hübner C, Clark AJ, et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev.* (2011) 32:472–97. doi: 10.1210/er.2010-0023
59. Klammt J, Neumann D, Gevers EF, Andrew SF, Schwartz ID, Rockstroh D, et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nat Commun.* (2018) 9:2105. doi: 10.1038/s41467-018-04521-0
60. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, et al. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* (2005) 90:2855–64. doi: 10.1210/jc.2004-1254
61. Begemann M, Zirn B, Santen G, Wirthgen E, Soellner L, Büttel HM, et al. Paternally inherited IGF2 mutation and growth restriction. *N Engl J Med.* (2015) 373:349–56. doi: 10.1056/NEJMoa1415227
62. Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Govaerts LC, et al. Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* (2009) 94:4717–27. doi: 10.1210/jc.2008-1502
63. Nilsson O, Marino R, De Luca F, et al. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 2005;64:157–65.
64. Ornitz DM, Legeai-Mallet L. Achondroplasia: development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn.* (2017) 246:291–309. doi: 10.1002/dvdy.24479
65. Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias. *Hum Mutat.* 2012;33:29–41.
66. Hauer NN, Sticht H, Boppudi S, Büttner C, Kraus C, Trautmann U, et al. Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature. *Sci Rep.* (2017) 7:12225. doi: 10.1038/s41598-017-12465-6

67. Gkourogianni A, Andrew M, Tyzinski L, Crocker M, Douglas J, Dunbar N, et al. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* (2017) 102:460–9. doi: 10.1210/jc.2016-3313
68. van der Steen M, Pfundt R, Maas SJWH, Bakker-van Waarde WM, Odink RJ, Hokken-Koelega ACS. ACAN gene mutations in short children born SGA and response to growth hormone treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* (2017) 102:1458–67. doi: 10.1210/jc.2016-2941
69. Kang MJ. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;22:153–7.
70. Vasques GA, Arnhold IJP, Jorge AAL. Role of the natriuretic peptide system in normal growth and growth disorders. *Horm Res Paediatr.* 2014;82:222–9.
71. Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, et al. Heterozygous NPR2 mutations cause disproportionate short stature, similar to Léri-Weill dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:E1133–42.
72. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1636–44.
73. Kruszka P, Porras AR, Addissie YA, et al. Noonan syndrome in diverse populations. *Am J Med Genet A.* 2017;173:2323–34.
74. Jorge AAL, Souza SC, Nishi MY, et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri–Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:130–5.
75. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 1994;371:252–4.
76. Rao E, Weiss B, Fukami M, et al. . Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 1997;16:54–63.
77. Bernasconi, S., & Garavelli, L. (2010). A short history of the initial discovery of the SHOX gene. *Journal of endocrinological investigation*, 33(6 Suppl), 3–6.

78. Marchini A, Ogata T, Rappold GA. A track record on SHOX: from basic research to complex models and therapy. *Endocr Rev.* 2016;37:417–448.
79. Karaman, B., Wollnik, B., Ermiş, H., Yüksel-Apak, M., & Başaran, S. (2003). A familial XP+ chromosome detected during fetal karyotyping, which is associated with short stature in four generations of a Turkish family. *Prenatal Diagnosis*, 23(4), 336–339.
80. Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm Res Paediatr.* 2011;75:81–9.
81. Fukami, M., Seki, A., & Ogata, T. (2016). SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature. *Molecular syndromology*, 7(1), 3–11. Doi:10.1159/000444596
82. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V. French SHOX GeNeSIS Module. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet.* (2006) 43:735–9. doi: 10.1136/jmg.2006.040998
83. Kang MJ. Novel genetic cause of idiopathic short stature. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;22:153–7.
84. Binder G, Rappold GA. SHOX deficiency disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds). *GeneReviews®* Seattle (WA): University of Washington, 1993–2022.
85. Zinn AR, Wei F, Zhang L, et al. Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet.* 2002;110:158–63.
86. Schmidt-Rohlfing B, Schwöbel B, Pauschert R, et al. Madelung deformity: clinical features, therapy and results. *J Pediatr OrthopB.* 2001;10:344–8.
87. Shakoori AR. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. *Chromosome Structure and Aberrations.* 2017 Feb 10:343–67. doi: 10.1007/978-81-322-3673-3_16. PMID: PMC7122835.
88. Jacobsen, A., et al., Comparison of comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization in ovarian carcinomas: possibilities and limitations of both techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000. 122(1): p. 7-12.
89. Shimokawa O., Takeda M., Ohashi H., Shono-Ota A., Kumagai M., Matsushika R., et al. (2021). D-karyo—A New Prenatal Rapid Screening Test Detecting Submicroscopic CNVs and Mosaicism. *Diagnostics*;11:337

90. Bainbridge, M.N., et al., Whole-genome sequencing for optimized patient management. *Science translational medicine*, 2011. 3(87): p. 87re3-87re3.
91. S. Tobias Edward, Connor Michael, Ferguson-Smith Malcolm, Tıbbi Genetiğin Esasları. Çev., Uğur Özbek. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri, 2014, s.45
92. Benito-Sanz, S., Barroso, E., Heine-Suñer, D., Hisado-Oliva, A., Romanelli, V., Rosell, J., Aragones, A., Caimari, M., Argente, J., Ross, J. L., Zinn, A. R., Gracia, R., Lapunzina, P., Campos-Barros, A., & Heath, K. E. (2011). Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(2), E404–E412.
93. Capkova P, Capkova Z, Rohon P, Adamová K, Zapletalova J. Short stature and SHOX (Short stature homeobox) variants-efficacy of screening using various strategies. *PeerJ*. 2020 Nov 17;8:e10236. doi: 10.7717/peerj.10236. PMID: 33240610; PMCID: PMC7678493.
94. Luo, H., Ni, L., Yang, YQ. et al. Characterization of a rare mosaic X-ring chromosome in a patient with Turner syndrome. *Mol Cytogenet* 15, 15 (2022).
95. Cytogenetic and clinical evaluation of two cases that have 45,X/46,X,i(Xq) and 46,X,i(Xq) karyotype 45,X/46,X,i(Xq) ve 46,X,i(Xq) Akbaş E, Yazıcı FG, Durukan H, Topal H, Erdoğan NE. *J Clin Exp Invest*. 2014;5:444–448
96. Ferdousi, T., Banu, H., Sultana, N., Mahrukh, H., & Hasanat, M. A. (2023). Turner Syndrome With Isochromosome Structural Abnormalities: A Case Report. *Cureus*, 15(6), e40516.
97. Sills, E. S., Cotter, P. D., Marron, K. D., Shkrobot, L. V., Walsh, H. M., & Salem, R. D. (2012). Ovarian dysgenesis associated with an unbalanced X;6 translocation: first characterisation of reproductive anatomy and cytogenetic evaluation in partial trisomy 6 with breakpoints at Xq22 and 6p23. *Molecular medicine reports*, 5(1), 29–31.
98. Ciaccio, C., Redaelli, S., Bentivegna, A., Marelli, S., Crosti, F., Sala, E. M., & Cavallari, U. (2020). Unbalanced X;Autosome Translocations May Lead to Mild Phenotypes and Are Associated with Autoimmune Diseases. *Cytogenetic and Genome Research*.
99. Tulay, P., Ergoren, M. C., Alkaya, A., Yayci, E., Sag, S. O., & Temel, S. G. (2020). Inconsistency of Karyotyping and Array Comparative Genomic

- Hybridization (aCGH) in a Mosaic Turner Syndrome Case. *Global medical genetics*, 7(4), 128–132.
100. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 2009;46:834–839.
 101. Gürsoy, S., Hazan, F., Aykut, A., Nalbantoğlu, Ö., Korkmaz, H. A., Demir, K., Özkan, B., & Coğulu, Ö. (2020). Detection of shox gene variations in patients with skeletal abnormalities with or without short stature. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 12(4), 358–365. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2020.2019.0001>
 102. Çatal, İsmail A., Şatıroğlu Tufan, L., Semiz, S., & Semerci, N. (2012). İdiyopatik boy kısalığı olan olgularda SHOX geni mutasyonlarının araştırılması . *Pamukkale Tıp Dergisi*, 5(1)(5–11).
 103. Mintz, C.S., Seaver, L.H., Irons, M. et al. Focused Revision: ACMG practice resource: Genetic evaluation of short stature. *Genet Med* 23, 813–815 (2021).
 104. Camargo M, Cervenka J. DNA replication and inactivation patterns in structural abnormality of sex chromosomes: I.X-A translocations, rings, fragments, isochromosomes, and pseudo-isodicentrics. *Hum Genet*. 1984;67(1):37–47.
 105. (He, Y., Guo, L., Zheng, L. et al. Clinical and molecular cytogenetic findings and pregnancy outcomes of fetuses with isochromosome Y. *Mol Cytogenet* 15, 32 (2022).
 106. Hipp, L. E., Mohnach, L. H., Wei, S., Thomas, I. H., Elhassan, M. E., Sandberg, D. E., Quint, E. H., & Keegan, C. E. (2016). Isodicentric Y mosaicism involving a 46, XX cell line: Implications for management. *American journal of medical genetics. Part A*, 170A(1), 233–238.
 107. Elghezal, H., Alfayez, K., Ben Abdallah, I., Alfares, A., Almazyad, A., Al Jasser, A., ... Alhashem, A. (2021). Hypospadias in ring X syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, 64(7), 104225.
 108. Saxena TA, Mckie J. Madelung Deformity. [Updated 2023 Dec 14]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from:

109. Madelung's deformity. Madelungs Deformity | Boston Children's Hospital. (n.d.).
110. Bioinformatics software. Qiagen digital insights. (n.d.).
111. Durand, Claudia et al. "Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of SHOX expression." PloS one vol. 6,3 e18115. 23 Mar. 2011, doi:10.1371/journal.pone.0018115
112. Franklin. (n.d.). <https://franklin.genoox.com/clinical-db/variant/snp/chrX-595487-G-T>



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BOY KISALIĞI PATOFİZYOLOJİSİNDE ROL OYNAYAN SHOX GEN
MUTASYONLARININ KLASİK VE GÜNCEL TEKNİKLERİN
KULLANIMI İLE ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

13%	12%	5%	4%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	8%
2	Submitted to Istanbul University Student Paper	1%
3	acikerisim.kirklareli.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
4	link.springer.com Internet Source	<1%
5	Submitted to Koc University Student Paper	<1%
6	acikerisim.pau.edu.tr Internet Source	<1%
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	<1%
8	"Human Ring Chromosomes", Springer Science and Business Media LLC, 2024 Publication	<1%