

KABUL VE ONAY



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Sayı :B.30.2.GÜN.0.20.11.16 / 12 6

01/ 12/2011

Konu :

Arş.Gör.Dr.Abdullatif Bakır,

Akademik kurulumuz 01.12.2011 tarihinde toplanarak; tez danışmanınızın Prof.Dr.Meral Yirmibeş Karağuz' un olmasına ve tez konunuzun " İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan İn Situ Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri ile SHOX geninin araştırılması " olmasına karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Başkanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bizlere bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran, akademik kişiliği, disiplin anlayışı ve çalışkanlığının yanı sıra sosyal ilişkiler ve ahlaki değer açısından bizlere örnek olan değerli hocam Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e,

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte bilimsel desteğini ve emeğini hiç esirgemeyen, bizlere açık sözlü, samimi ve güler yüzlü yaklaşan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a,

Değerli bilgi ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen, her sorunumuzu anlatabildiğimiz ve akıl danışabildiğimiz, gerektiğinde bizden arkadaşlığını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e,

Bize her zaman hoşgörü ve sabırla destek olan ve gerektiğine arkadaş gibi yaklaşan değerli hocamız Öğr. Gör. Dr. Esra Tuğ'a,

Beraber çalışmaktan, kendilerini tanımaktan mutluluk duyduğum ve ömür boyu görüşmek istediğim değerli iş arkadaşlarım Uzm. Dr. Kadri Karaer, Uzm. Dr. Özgür Erkal, Uzm. Dr. Ayşegül Ö. Kaymak, Uzm. Dr. Büşra Çavdarlı, Uzm. Dr. Guyem Özgen, Arş. Gör. Dr. Gülsüm Kayhan, Arş. Gör. Dr. Bayram Taşkın, Arş. Gör. Dr. F. Nihal Dilek, Arş. Gör. Dr. Taha Bahsi, Arş. Gör. Dr. Hanife Çoban ve Arş. Gör. Dr. Pelin Ö. Çubuk'a,

Sitogenetik ve moleküler laboratuvarında beraber çalıştığım ve eğitimim boyunca tecrübelerinden faydalandığım değerli iş arkadaşlarım Bio. Işıl Küçün Kiraz, Selma Karakılıç, Esra Küçük, Uzm. Bio. Ebru Aytekin, Uzm. Bio. Halide Gül Akyar'a, Bio. Dr. Derya Karaer ve Uzm. Bio. Sezen Güntekin Ergün'e,

Değerli sekreterimiz ve arkadaşımız, çalışkanlığı ve iş bitiriciliğiyle hepimizin işlerini kolaylaştıran sekreterlerin en iyisi Mehtap Tırpan'a,

Beni büyütüp yetiştiren ve bu günlere ulaşmamı sağlayan, sevgi ve şefkatlerini eksik etmeyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim çok sevdiğim anne ve babama,

Varlıklarıyla bana güç veren, sorunlarımı çekinmeden paylaşabildiğim hepsini ayrı ayrı sevdiğim değerli kardeşlerime ve canımdan çok sevdiğim dünya güzeli yeğenlerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Giriş	4
2.2. Büyüme.....	4
2.2.1. Prenatal Dönem	5
2.2.2. Prepubertal Dönem.....	5
2.2.3. Puberte Dönemi.....	6
2.3. Büyüme Üzerine Etkili Faktörler.....	6
2.3.1. Prenatal dönem.....	7
2.3.2. Postnatal Dönem ve Puberte Dönemi.....	7
2.4. Büyümenin Değerlendirilmesi	8
2.5. Boy Kısaldığı	9
2.5.1. Ailesel Boy Kısaldığı	12
2.5.2. Yapısal Boy Kısaldığı	13
2.5.3. Nutrisyonel Boy Kısaldığı ve Kronik Hastalıklar	15
2.5.4. Endokrinolojik Boy Kısaldıkları	17
2.5.5. İntrauterin Büyüme Geriliği	18
2.5.6. Kemik Gelişim Bozuklukları	19

2.5.7. Kromozomal Anomaliler ve Genetik Sendromlar	20
2.5.8. Metabolik Hastalıklar	22
2.5.9. Psikososyal Boy Kısalığı	22
2.5.10. İlaça Bağlı Boy Kısalığı	23
2.6. İdiyopatik Boy Kısalığı	24
2.6.1. İdiyopatik Boy Kısalığına Sebep Olan Genler	24
2.7. SHOX Geni (Short Stature Homeobox Containing Gene)	27
2.8. Mutasyon	32
2.8.1. Mutasyon çeşitleri	34
2.8.2 Sonuçlarına Göre Mutasyon	37
2.9. Kromozom analizi	42
2.10. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon Yöntemi	45
2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (PZR)	47
2.12. DNA Dizi Analizi	48
3. MATERYAL ve METOD	51
3.1. Hasta Seçimi	51
3.2. Kromozom Eldesi için Kısa Dönem GTG Doku Kültürü	53
3.3. Kromozom Eldesi İçin Kısa Dönem HRB Doku Kültürü	54
3.4. GTG Boyama ve Bantlama Tekniği	55
3.5. Solüsyonların Hazırlanışı	55
3.6. FISH Tekniğinin Uygulaması	56
3.6.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu	56
3.6.2. Prob Denatürasyonu	58
3.6.3. Hibridizasyon	58
3.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	59
3.6.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi	60
3.6.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	61

3.7. Spin Kolon Yöntemi İle Periferik kandan DNA izolasyonu	61
3.8. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	63
3.9. SHOX Genini Dizileme İşlemi İçin PZR İle Örneklerin Çoğaltılması	63
3.9.1. SHOX Geninin Tüm Dizisine Erişilmesi	63
3.9.2. SHOX Genini Dizileme İşlemi İçin Primer Tasarlanması	63
3.9.3. DNA Dizi Analizi Primerlerinin Blast Sonuçları	66
3.9.4. PZR örneğinin hazırlanması	67
3.9.5. PZR aşamaları	67
3.9.6. PZR Ürününün Görüntülenmesi	69
3.9.7. PZR Ürününün Temizlenmesi ve DNA Dizi Analizi	70
4. BULGULAR	71
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ	91
7. KAYNAKLAR	92
8. ÖZET	106
9. ABSTRACT	107
10. ÖZGEÇMİŞ	108
11. EKLER	110

KISALTMALAR

AD	Anabilim Dalı
ark	Arkadaşları
ALS	Asid-Labil Subünit
bç	Baz Çifti
BH	Büyüme Hormonu
Bkz	Bakınız
BrDU	5-bromo-2'-deoksiüridin
dH₂O	Distile su
DHPLC	Denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EtBr	Etidyum Bromür
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
GH	Büyüme Hormonu
GHR	Büyüme Hormonu Reseptörü
g	Gram
HCl	Hidroklorür
HRB	Yüksek Çözünürlüklü Bantlama (High-Resolution Banding)
IGF1	Insuline-like Growth Factor 1
IGF-IR	IGF-I Reseptörü

IGFBP-3	IGF Bağlı Protein-3
İBK	İdiyopatik Boy Kısıalığı
kb	Kilo Baz
KCL	Potasyum Klorür
LMD	Langer Mezomelik Displazi
lt	Litre
LWD	Leri-Weill Diskondrosteozu
M	Molar
Mb	Megabaz
MgCl₂	Magnezyum Klorür
mg	Miligram
ml	Mililitre
MLPA	Multipl Ligasyon Prob Amplifikasyonu (Multiple Ligation Probe Amplification)
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mRNA	Mesajcı RNA
MSM	Mikrosatellit Markır
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NPR2	Natriuretik Peptid Reseptör B
°C	Derece
ORF	Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)

PAR	Psödootozomal Bölge (Pseudo-Autosomal Region)
PHOG	Psödootozomal Homeobox Osteojenik Gen (Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogenic Gene)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Standart Deviasyon Skoru
SHOX	Short Stature Homeobox
SHOXa	SHOX geni protein a
SHOXb	SHOX geni protein b
Sn	Saniye
SSC	Saline / Sodium / Citrate
SSCP	Tek Zincir Yapısal Polimorfizm (Single-Strand Conformation Polymorphism)
STAT	Transkripsiyon Sinyal Aktivatör
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
U	Ünite
UTR	Translasyona uğramayan bölge (Untranslated region)
UV	Ultraviyole
V	Volt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no:

Şekil 1. 2-18 yaş kız ve erkek çocuklarında boy uzunluğu persentil eğrileri.....	10
Şekil 2. Ailesel boy kısalığı.....	13
Şekil 3. Yapısal Boy Kısalığı.	14
Şekil 4. Nutrisyonel boy kısalığı.	15
Şekil 5. SHOX geninin X ve Y kromozomu üzerindeki yerleşimi	28
Şekil 6. SHOX geninin yapısı	29
Şekil 7. SHOX geni 5' UTR'sinin şematik gösterimi	31
Şekil 8. SHOX geni regülasyon modeli	32
Şekil 9. Somatik hücre mutasyonu	33
Şekil 10. Germ hücre mutasyonunun kalıtımı	34
Şekil 11. Yanlış anlamlı mutasyonun şematik gösterimi	38
Şekil 12. Transisyon ve transversiyonda baz değişimleri.....	39
Şekil 13. Sessiz mutasyonun şematik gösterimi.....	40
Şekil 14. Anlamsız mutasyonun DNA üzerinde şematik gösterimi	41
Şekil 15. Çerçeve kayması mutasyonunun şematik gösterimi	42
Şekil 16. Otomatik DNA dizi analizi.....	50
Şekil 17. Ekzon 2 Bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi	64
Şekil 18. Ekzon 3 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi.	64
Şekil 19. Ekzon 4 ve 5 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi. ..	65
Şekil 20. Ekzon 6 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

sayfa no:

Tablo 1. Boy kısalığı nedenleri	11
Tablo 2. İBK olan olgularda tanımlanan genler ve mutasyonlar.....	26
Tablo 3. Kromozomların gruplandırılması.....	44
Tablo 4. Çalışmaya katılan olguların İBK açısından değerlendirilme kriterleri.....	52
Tablo 5. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları	57
Tablo 6. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu	58
Tablo 7. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar	59
Tablo 8. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	61
Tablo 9. SHOX geni çoğaltılmasında kullanılan primerler	66
Tablo 10. Ekzon 2'ye özgü primerler için kullanılan PZR programı	67
Tablo 11. Ekzon 3'e özgü primerler için kullanılan PZR programı	68
Tablo 12. Ekzon 4 ve 5'e özgü primerler için kullanılan PZR programı	68
Tablo 13. Ekzon 6'ya özgü primerler için kullanılan PZR programı	68
Tablo 14. Çalışma grubunun boy uzunluğu ve boy SDS değerleri	72
Tablo 15. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri.....	74

RESİMLER DİZİNİ

sayfa no:

Resim 1. SHOX geninin FISH tekniği ile çalışılması (Olgu 25)	73
Resim 2. Ekzon 2 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü.....	75
Resim 3. Ekzon 3 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü.....	76
Resim 4. Ekzon 4 ve 5 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü.	77
Resim 5. Ekzon 6 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü.....	78
Resim 6. Ekzon 2'ye ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 14).....	79
Resim 7. Ekzon 3'e ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 6).	79
Resim 8. Ekzon 4 ve 5'e ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 11).	80
Resim 9. Ekzon 6'ya ait örnek DNA dizi analizi görüntüsü (olgu 24).	80

1.GİRİŞ

Boy kısalığı bir bireyin kronolojik yaşına göre boy persentilinin 3'ün altında olması olarak tanımlanmaktadır. Boy kısalığı genetik nedenli olabileceği gibi, hormonal, kronik hastalık veya çevresel nedenlere bağlı olarak da ortaya çıkabilir ve yaklaşık olarak çocukluk çağındaki popülasyonun %2'sini etkilemektedir (1).

Longitudinal boy uzaması ile ilişkili, growth hormone 1 (GH1), growth hormone receptor (GHR), signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B), insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding protein-3 (IGFBP-3), acid labile subunit (ALS), IGF-I receptor (IGF-IR), natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gibi birkaç gen tanımlanmıştır. Bunlardan biri **“short-stature homeobox containing gene”**adı verilen **SHOX** genidir. Bu gen X ve Y kromozomunun psödootozomal bölgelerinde (PAR 1) yer almakta ve lokalizasyon olarak Xp22.33 ve Yp11.3 bölgelerine karşılık gelmektedir (2-7). Bu gen 6 ekzondan (anlamlı gen bölgesinden) oluşur. Ekzon 1 kodlayıcı ekzon değildir. Diğer ekzonlar 2, 3, 4, 5 ve 6a, 6b şeklindedir. Altıncı ekzon alternatif kesimle iki ayrı adet mesajcı RNA oluşturduğu için iki bölümdür. Bu mesajcı RNA'lar sırasıyla 229 ve 225 amino asitten oluşan, benzer işlevleri olan SHOXa ve SHOXb proteinlerini kodlar. Bu gen büyümenin düzenlenmesi ile ilgili bir yolakta görev yapmaktadır. Osteojenik hücrelerde, hücrenin bölünme döngüsünde ve büyümenin düzenlenmesinde transkripsiyonu aktive eden özgül homedomain proteinini kodlamaktadır (3,4).

SHOX genine ait kromozom üzerindeki kopyalardan birinin kaybı (heterozigot) Turner sendromundaki boy kısalığının nedenlerinden biri olabileceği gibi, Leri-Weill diskondrotozis gibi kısa yapıyla giden sendromlara ve herhangi bir anomalinin eşlik etmediği izole boy kısalığı fenotipine de neden olabilir. Boy kısalığının idiyopatik olduğuna karar vermek için; endokrinolojik bozukluklar, genetik sendromlar ve boy uzamasını engelleyecek kronik hastalıklar ve beslenme problemleri tespit edilmemiş olmalıdır. Ayrıca periferik kan kültüründen yüksek çözünürlükte bantlama (HRB) ile yapılan karyotip tayininde kromozomal anomaliler ekarte edilmelidir. SHOX geninin her iki kopyasının (homozigot) kaybı, çok daha ağır bulguları olan Langer mezomelik displazi sendromuna neden olabilir. Özetle, bu genle ilgili mutasyonlar ve delesyonlar boy kısalığının sık görülen genetik nedenlerinden biridir ve hem izole ve hem de ailesel boy kısalığı ile ilişkilendirilmektedir (1, 3).

İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda yapılan çalışmalarda heterozigot SHOX geni mutasyonu sıklığı %2 -14 arasında değişmektedir (2). Bu oran, etnik köken, çalışılan hasta sayısı, hastaların seçilme kriterleri ve SHOX gen mutasyonu araştırılmasında kullanılan yöntemlerin farklı olmasına göre değişkenlik göstermektedir (3).

SHOX geninin delesyonunun belirlenmesine yönelik sık kullanılan yöntemlerden biri “**Floresan *in situ* Hibridizasyon**” (FISH) yöntemidir. Bu yöntemde, ilgili genin bir kopyasında delesyonun varlığı araştırılmaktadır. Bununla birlikte, SHOX geninde meydana gelen nokta mutasyonlarının da idiyopatik boy kısalığına neden olduğu bildirilmektedir. FISH yöntemiyle

herhangi bir delesyon saptanamayan olgularda, ilgili gende mutasyon varlığını belirlemeye yönelik, **polimeraz zincir rekasiyonu (PZR)** temelli moleküler genetik yöntemler ve **dizi analizi (sekans)** yöntemi tercih edilmektedir (1,3).

Bu çalışma ile boy kısalığı nedeniyle Genetik Hastalıklar Tanı Merkezimize başvuran ve/veya refere edilen ve boy kısalığının nedenine yönelik herhangi bir etken bulunamayan hastalarda SHOX genine ait sitogenetik (kromozom analizi), moleküler sitogenetik (FISH) ve moleküler genetik (dizi analizi) tekniklerin çalışılması hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmaya katılma koşullarını sağlayan hastalarımızda, daha önceden karyotip tayini yapılmamışsa önce kromozom analizi, eğer yapılmışsa ikinci aşama olarak FISH tekniği ile SHOX geninde delesyonun araştırılması ve son olarak eğer her iki sonuç normal ise dizi analizi yöntemi ile olası tek nükleotid değişikliklerinin araştırılması planlanmıştır. **Sonuç olarak bu proje ile idiyopatik boy kısalığı olan hastalarda SHOX geninin doğru algoritmalar kullanılarak konvansiyonel ve ileri moleküler teknikler ile delesyonlarının/mutasyonlarının çalışılması ve elde edilen sonuçların yorumlanması gerçekleştirilmiştir.**

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Giriş

Etiyolojisinde birçok faktörün rol oynadığı boy kısalığında farklı sınıflandırmalar mevcuttur. Genel bir sınıflandırma şekli; orantılı ve orantısız boy kısalığıdır. Orantılı boy kısalığı; kulaç boyunun, oturma yüksekliğinin, ekstremitelerinin boya göre normal olması olarak tanımlanmakta iken orantısız boy kısalığı oturma yüksekliği/boy veya kulaç uzunluğu/boy oranının normal sınırlarda olmaması olarak tanımlanmaktadır. Etiyolojide boy kısalığını açıklayacak herhangi bir sebep bulunamaz ise bu durum idiyopatik boy kısalığı (İBK) olarak tanımlanmaktadır. Nedeni bilinmemekle beraber idiyopatik boy kısalığında da bazı genlerin sebep olabileceği düşünülmektedir. Bunların en önemlilerden biri Turner sendromunda da boy kısalığından sorumlu olduğu düşünülen “Short Stature Homeobox Containing” (SHOX) genidir (5). İdiyopatik boy kısalığının % 2 ila %14’ünden bu genin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (6).

2.2. Büyüme

Büyüme, çocukluk çağındaki esas fizyolojik süreçtir. Hekimler ve ebeveynler tarafında çocuk sağlığının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (8). Büyüme konsepsiyon ile başlar ve değişik hızlarda gestasyonel hayatta, infantil dönemde, çocukluk çağında ve adolesan dönemde devam eder. Büyümenin en

hızlı olduğu dönem ftal dönem olmakla beraber ilk iki yaşta da büyüme hızlı devam eder. Çocukluk çağı ve puberte öncesi dönemde yavaşlar. Erken puberte döneminde tekrar büyüme hızı artar ve büyüme hızı belli bir noktada pik yapar. Daha sonra erişkin boya ulaşıncaya kadar yavaş yavaş azalır ve durur (5).

2.2.1. Prenatal Dönem

Embriyonik dönem, fertilizasyondan iki hafta sonra başlar ve sekiz hafta sonra sona erer. Bu on hafta içinde organogenez büyük oranda tamamlanmış olur ve ftal boy yaklaşık 3-4 cm civarındadır (9,10). İkinci trimesterde ftal büyüme hızlanır ve yaklaşık haftada 2.5 cm civarında büyüme hızıyla en üst noktaya ulaşır. çnc trimesterde longitudinal büyüme (boy uzaması) yavaşlar ve ağırlık artışı hızlanır (11). Doğumda boy yaklaşık 51 cm, ağırlık ise 3400 g civarına ulaşır (12).

2.2.2. Prepubertal Dönem

İnfantil dönemde büyüme hızlıdır. Boy yaklaşık doğum boyunun %50'si civarında artar ve ağırlık doğum ağırlığının üç katına ulaşır (13). Boy uzaması ilk iki veya üç ayda 20 cm/yıl civarından 24-36. aylarda 9 cm/yıl civarına düşer.

Çocukluk çağının ortalarında boy uzaması 5-6 cm/yıl olarak devam eder. Ancak puberte öncesine kadar bu hız 2-3 cm/yıl kadar azalır (5).

2.2.3. Puberte Dönemi

Boy uzunluğunun yaklaşık % 20'si ve kemik yoğunluğunun % 50'si bu dönemde kazanılır. Bu dönemde büyüme hızının en fazla olduğu zaman aralığı kızlarda 12 ve erkeklerde 14 yaşa denk gelir. Bu dönemden sonra büyüme hızı epifizler kapanıncaya kadar azalarak devam eder. Kızlarda büyüme hızı, telarş evresiyle artmaya başlar, Tanner evre III olduğunda büyüme hızı pik yapmıştır. Erkeklerde ise genitalya evre IV olduğu zaman büyüme hızı maksimum düzeydedir. Büyüme hızı pikinin daha geç olması erkeklerin kızlardan daha uzun olmasıyla sonuçlanır (5).

2.3. Büyüme Üzerine Etkili Faktörler

Normal büyüme üzerine etkili faktörler prenatal ve postnatal dönemde farklılık göstermektedir. Bununla birlikte gerek prenatal gerekse postnatal dönemde boy uzunluğu birden çok faktöre bağlıdır (5).

2.3.1. Prenatal dönem

Bu dönemde lineer büyüme olur ve buna anne rahminin büyüklüğü, maternal beslenme, plasantanın fetüse oksijen ve besin kazandırma fonksiyonları ve endojen fetal büyüme faktörleri birlikte etki eder. Esas olarak ise büyüme üzerine genetik faktörler, beslenme, glikoz ve “Insulin-like Growth Factor” (IGF) ‘ler etkilidir. 25. ve 31. gestasyonel haftaları arasında IGF-1 %400 artar. IGF-1 düzeyi ile doğum boyu arasında pozitif bir korelasyon vardır. Bununla birlikte fetal büyüme üzerine en etkili faktör IGF-2’dir (14,15).

2.3.2. Postnatal Dönem ve Puberte Dönemi

Genetik faktörler, beslenme, sosyoekonomik düzey ve sakatlık, hastalık gibi olumsuz olaylar erişkin boyunu belirler. Tiroid hormonu yokluğu ve büyüme hormonu yokluğu büyüme üzerine direkt etkilidir ve özellikle prepubertal dönemde büyüme üzerine en etkili faktörleri bu iki hormon oluşturmaktadır (5). Puberte döneminde ise büyüme hormonu ve seks hormonları büyüme hızını belirler (16).

2.4. Büyümenin Değerlendirilmesi

Büyümenin değerlendirilmesi için o bireyin içinde yaşadığı topluma ait aynı etnik köken ve yaşa göre belirlenmiş büyüme (persentil) eğrileri mevcut olmalıdır. Bu eğrilerde aynı yaş ve etnik kökene sahip bireyler yüzdeler olarak belirlenmiştir. Bireyin büyümesinin normal kabul edilmesi için aynı etnik köken ve yaştaki diğer bireylerin yüzde üçünden kısa olmayıp (3 persentil), yüzde doksan yedisinden (97 persentil) uzun olmamalıdır. Bununla birlikte büyüme hızında da azalma olmamalıdır. Büyüme hızının da normal değerlerin altında olup olmaması büyümenin değerlendirilmesinde önemlidir. Yıllık büyüme hızı 25 persentilin altında olmamalıdır (5).

Büyümenin normal olduğunu değerlendirmede anne ve baba boyu da göz önünde bulundurulmalıdır. Anne ve baba boyuna bakılarak bir hedef boy tespit edilmelidir. Daha sonra büyüme hızının hedef doğrultusunda olup olmadığı takip edilmelidir. Hedef boy aralığına ulaşamayacak hızda büyüme olmadığında boy persentili normal olsa dahi büyüme geriliğinden bahsedilebilir (17,18).

Hedef boy hesaplaması:

$$\text{Kız çocuklar: } \frac{(\text{Baba boyu}-13) + \text{Anne boyu}}{2}$$

$$\text{Erkek çocuklar: } \frac{(\text{anne boyu}+13) + \text{Baba boyu}}{2}$$

Hedef boy hesaplaması yapıldıktan sonra hastanın kemik yaşı ve muayene esnasındaki boyu ile tahmini final boyu hesaplanır. Tahmini final boyu hedef boyu ile uyumlu olmalıdır (5).

2.5. Boy Kısallığı

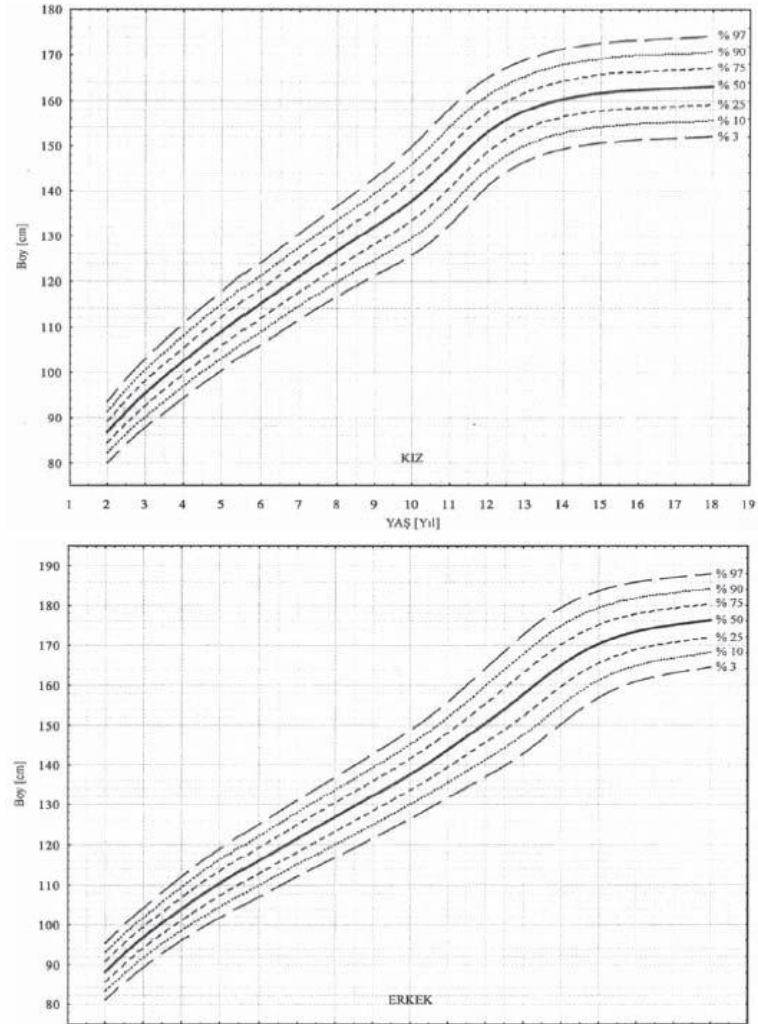
Boy kısallığı genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı multifaktöryel kalıtımın bir sonucu olarak meydana gelir ve bir bireyin kendi yaş ve cinsiyete göre boyunun -2 SDS veya 3 persentilin altında olması ya da bu değerlerin üzerinde olduğu halde hedef boy sınırlarının altında olması olarak tanımlanır (5).

Bir bireyin boy Standart Deviasyon Skoru (SDS) hesaplaması şu şekilde yapılır:

$$SDS = \frac{\text{Bireyin boyu (cm)} - \text{aynı yaş ve cinsiyetteki ortalama değer(cm)}}{\text{Yaş ve cinsiyete göre standart sapma(cm)}}$$

Normal ortalama ve SD değerleri için yaş ve cinsiyete göre hazırlanmış tartı ve boy tablolarından yararlanılır. Normal çocuklarda boy ölçümleri çan eğrisine uyan simetrik bir dağılım gösterdiğinden ortalama yerine median (50. persentil) değer kullanılabilir. -2 SDS yaklaşık olarak 3. persentile, +2 SDS 97. persentile eşittir. Yaşına göre boy uzunluğu ortalamaya uyan bir çocukta SDS değeri “0”dır (5).

Persentil eğrileri, farklı yaşlardan sağlıklı çocukların oluşturduğu gruplarda genellikle aynı zaman dilimi içinde (kesitsel) ve standart yöntemlere uyularak yapılmış ölçümlerden belirli istatistiksel yöntemler kullanarak hazırlanmış, yaşlara göre vücut ölçülerine ilişkin dağılımı gösteren eğrilerdir. Türk çocuklarına ait 2-18 yaş arası boy uzunluğu için belirlenen persentil eğrileri şekil 1. de gösterilmiştir (19).



Şekil 1. 2-18 yaş kız ve erkek çocuklarında boy uzunluğu persentil eğrileri (19).

Tablo 1. Boy kısalığı nedenleri

Normal'in Varyantı Boy Kısalıkları

- Yapısal büyüme geriliği
- Genetik-Ailesel boy kısalığı

Patolojik Boy Kısalığı Nedenleri

Orantısız

- İskelet displazileri
- Metabolik kemik hastalıkları

Orantılı ve Prenatal Başlangıçlı

- İntrauterin Büyüme geriliği (IUGR)
 - Fötal baskı
 - Plasental disfonksiyon
 - Enfeksiyonlar
 - Teratojenler
- Kromozomal Hastalıklar
 - Turner sendromu
 - Down sendromu
- Dismorfik sendromlar
 - Russell-Silver sendromu
 - De Lange sendromu
 - Seckel sendromu
 - Dubowitz sendromu
 - Bloom sendromu
 - Johanson-Blizzard sendromu

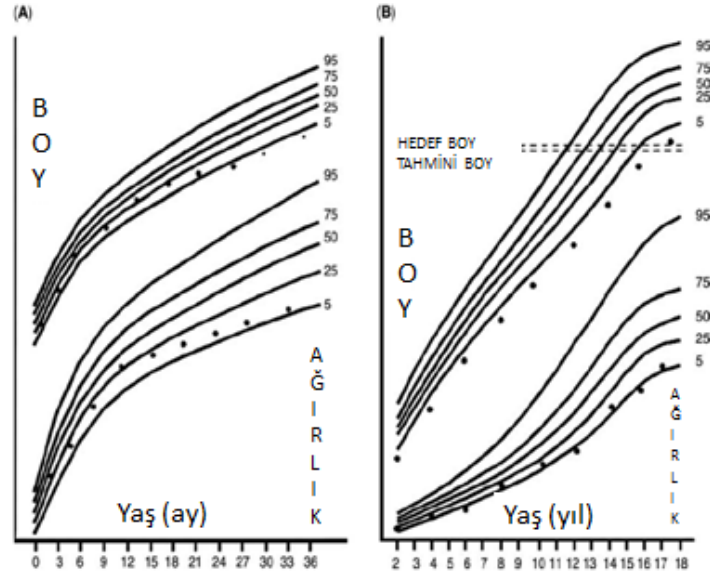
Orantılı ve Postnatal Başlangıçlı

- Malnutrisyon
 - Kronik inflamatuvar barsak hastalığı
 - Malabsorbsiyon
 - Çölyak hastalığı
 - Çinko eksikliği
- Kronik hastalıklar
 - Gastrointestinal
 - Kardiyopulmoner
 - Enfeksiyonlar
 - Renal
 - Hematolojik
 - Nörolojik
- İlaçlar
 - Glukokortikoidler
 - Yüksek doz östrojen kullanımı
- Psikososyal cücelik
- Genetik faktörler
- Endokrin hastalıklar
 - Hipotiroidizm
 - İzole büyüme hormonu eksikliği
 - Hipopituitarizm
 - Kortizol fazlalığı
 - Erken puberte

2.5.1. Ailesel Boy Kısalığı

Ailesel boy kısalığı birçok kaynakta genetik boy kısalığı olarakta isimlendirilir. Ailesel boy kısalığı olan bireyler hayat boyu kısıadırlar bununla birlikte boyları ve büyüme hızları anne ve babanın genetik potansiyelinin izin verdiği sınırlar içerisinde. Bu hastalarda, kemik yaşı ve boy yaşı birbiri ile uyumlu olup takvim yaşına göre geri seyredir. Tahmini (predicted) boy hedef boy ile uyumludur ve her ikisi de kısadır (5) (Şekil 2).

Ailesel boy kısalığı durumlarında, ekstremite uzunlukları ve vücut oranları iyi ölçülmelidir. Çünkü boy kısalığının ailesel olması vertikal geçiş gösteren bir kemik hastalığının (iskelet displazileri) ya da hormonal bozukluğun işareti olabilir. Örneğin otozomal dominant geçişli büyüme hormonu eksikliği gibi. Bununla beraber boy uzamasının birçok genle ve çevresel faktörlerle ilişkisi olduğu unutulmamalıdır (21-24).



Şekil 2. Ailesel boy kısalığı. A-İnfant dönemi. Genetik potansiyele uygun büyüme eğrisi. B-Çocukluk çağı ve adolesan dönem. Boy uzunluğu kilo ile paralel. Ani düşüşler olmaz ve puberte çağında normal persentillere ulaşamaz (5)

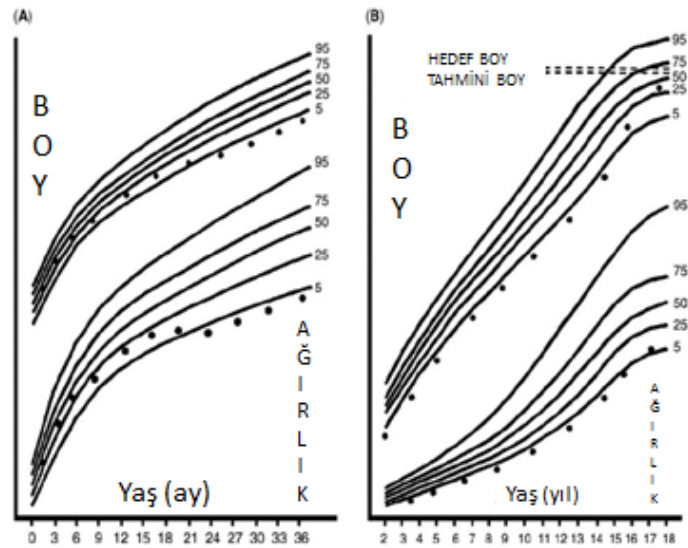
2.5.2. Yapısal Boy Kısalığı

Boy kısalığının en sık nedeni yapısal boy kısalığıdır. Boy kısalığı nedeni ile kliniğe bakanların önemli bir kısmı bu gruptandır. Bu durum gerçek anlamda boy kısalığı olmayıp boy uzaması varyasyonu olarak kabul edilir ve geç olgunlaşma olarak da tanımlanabilir (Şekil 3). Bu durum genellikle aileseldir ve sorgulandığında ailede boyu sonradan uzayan bireyler olduğu ortaya çıkar (25) .

Konstitüsyonel (yapısal) boy kısalığı olan çocuklar karakteristik olarak; ilk iki yaşta büyüme yavaşlaması, prepubertal dönemde düşük hızda sabit büyüme hızı ve geç adolesan dönemde bir yakalama büyümesi gösterirler (26). Sıklıkla

babada benzer bir hikaye mevcuttur. Ailede benzer hikaye olmasına rağmen ailesel boy kısalığı yoktur. Kemik yaşı boy yaşından geridir ve her ikisi takvim yaşının altındadır (Şekil 3). Bu durum boy uzama potansiyelinin yüksek olduğunu ifade eder. Yapısal boy kısalığı erkeklerde daha sık olup, erkek kız oranı 2:1 dir (27). Konstitüsyonel boy kısalığı tanısı konurken diğer olasılıklar ve patolojik büyüme paternleri ekarte edilmelidir (5).

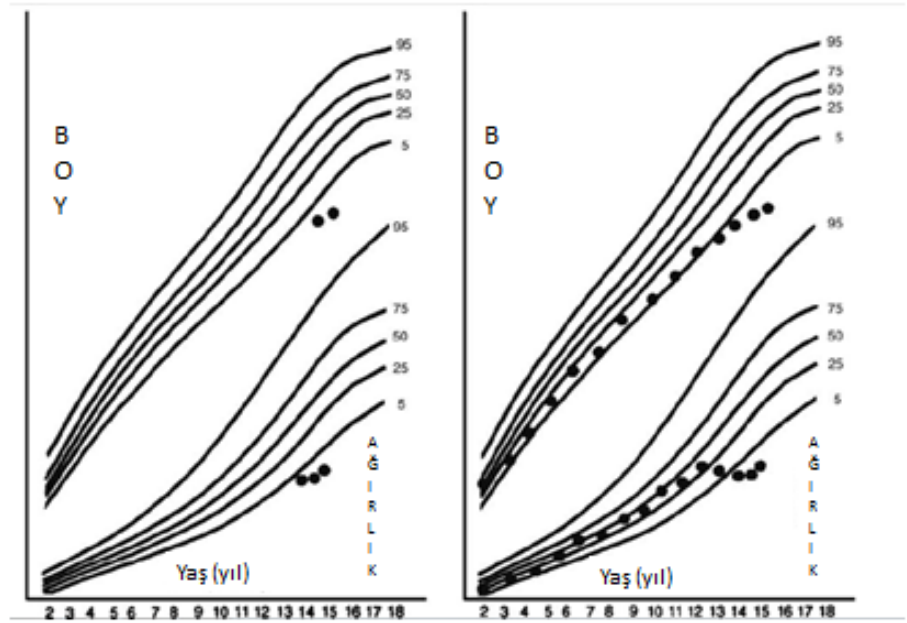
Yapısal boy kısalığı olan çocuklar ailesel boy kısalığı olanlarla kıyaslandığında prepubertal dönemde ağırlık persentillerinin, boy persentillerine göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sekonder seks karakterlerinin gelişmeye başladığı dönemde bu fark kapanır. Bu durum, konstitüsyonel boy kısalığının infant dönemindeki suboptimal beslenmeyle ilgili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil3)(28).



Şekil 3. Yapısal Boy Kısalığı A. İnfant dönemi, boy ve kilo erken dönemde normal sınırlar altına iner. B. Çocukluk çağı ve adolesan dönem, geç pubertal boy uzaması ve normal aralıkta final boyu. Tipik olarak kilo boya göre daha geç düzelir (5).

2.5.3. Nutrisyonel Boy Kısalığı ve Kronik Hastalıklar

Dünya genelinde boy kısalığının en önemli nedenlerinden biri malnutrisyona bağlı (beslenme bozukluğu) boy kısalığıdır (Şekil 4) (29). Bu tip hastalarda iyi hikaye alınmalıdır. Büyüme geriliği ve beslenme bozukluğu inflamatuvar barsak hastalığı, çölyak hastalığı, HIV gibi sistemik hastalıkların sonucu olabilir (30- 33). Bunun yanında iştahsızlık ve beslenme bozukluğuna yol açan medikal tedaviler sorgulanmalıdır. Örneğin dikkat eksikliği ve hiperaktivite tedavisi gibi (34).



Şekil 4. Nutrisyonel boy kısalığı A. Boy kısalığı ile başvuran hastaya ait büyüme eğrileri. Boy ve kilo normalin altında ve seksüel gelişim normal. B. Eğrilerin tamamlanmış hali. 12 yaşından sonra kötü beslenme nedeniyle boy uzamasında yavaşlama belirgin olarak görülüyor (5).

Bu hastalarda boy kısalığının yanı sıra kilo kaybı karakteristiktir. BMI (body mass index) eğrileri tanıda yardımcıdır (Şekil 4) (5, 35)

Beslenme bozukluğu, alım azlığı ya da fazla kayıp sonucu oluşabilir ve organik ya da inorganik beslenme bozukluğu ile sonuçlanabilir. Ailesel ya da yapısal boy kısalığı ile ayrımında boy uzaması ve pubertal ilerlemeye oranla kilo alımının azlığı önemlidir (Şekil 4) (5).

Organik beslenme bozukluğu sebepleri arasında en yaygın olanlar Crohn hastalığı, çölyak hastalığı, kistik fibrozis, HIV, tüberküloz, kalp ve böbrek hastalıkları gibi kronik hastalıklar yer almaktadır (5).

Organik olmayan beslenme bozukluğu ise genellikle okul çağındaki çocuklarda obezite ve yüksek kolesterol korkusu nedeniyle alım azlığı sonucu oluşur. Gerçek sıklığını tespit etmek zordur. Adolesan dönemde beslenme bozukluğunun yaklaşık %73'ünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (35-37).

Beslenme bozukluğu sonucu vitamin ve mineral kayıpları da boy kısalığı ile sonuçlanabilmektedir. Büyüme hormonunun ifadenmesinde (ekspresyon) görev alan A vitamini eksikliğinde (38), kemiklere kalsiyum sağlanmasında görevli D vitamini eksikliğinde ve büyüme hormonunun reseptör yapısına katılan çinko eksikliğinde boy kısalığı oluşmaktadır (35, 39).

2.5.4. Endokrinolojik Boy Kısalıkları

Endokrin nedenlerin çoğu büyüme sürecinin bozulmasına neden olur. Bunlardan büyüme hormonu (BH) eksikliği önemli bir boy kısalığı nedenidir. Daha çok nedeni bilinmeyen BH eksikliğinde doğum ağırlığı ve boy uzunluğu normal veya normalin alt sınırlarına yakındır. Vücut oranları normal olup boya göre ağırlık yüksek ve kemik yaşı geridir. Pubertede sıklıkla gecikme görülür. BH gen delesyonuna bağlı doğumsal BH eksikliği ve BH reseptör gen defekti sonucu IGF'lerin sentezlenememesi de boy kısalığının nedenleri arasında olabilir (40).

Tiroid hormonu boy gelişmesinin yanı sıra beyin gelişimini de etkileyen bir hormondur. Bu nedenle yenidoğan taramalarında tanı koymada önemli bir yeri vardır. Doğumsal hipotiroidide, boya göre ağırlık fazladır ve kemik yaşı oldukça geridir. Pubertede gecikme görülür (40).

Diabetes mellitusda, eğer metabolik kontrol kötü ise büyüme yavaşlar ve pubertede gecikme görülür. Diyabetle birlikte seyreden hipotiroidi ve Çölyak gibi hastalıkların büyüme üzerine olumsuz etkileri vardır (40) .

Büyümenin duraklamasına etki eden diğer endokrin nedenler arasında psödohipoparatiroidi, doğumsal olmayan BH eksikliği ve hipotiroidi de sayılabilir (40).

Yapılan araştırmalar BH geninde ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü (GHRHR) geninde meydana gelen mutasyonların izole büyüme hormonu eksikliğine neden olduğunu; Pituitary-Specific Transcription Factor 1

(PIT1), Prophet Of PIT1 (PROP1), Homeobox Gene Expressed In Es Cells 1 (HESX1), Lim Homeobox Gene 3 (LHX3) gibi bazı transkripsiyon faktörleri ve genlerde meydana gelen defektlerin ise multipl pituiter hormon eksikliğine neden olduğunu göstermiştir (41-44).

2.5.5. İntrauterin Büyüme Geriliği

İntrauterin büyüme geriliği gestasyonel yaşa göre doğum ağırlığının 10 persentilin altında olması olarak tanımlanır. Altta yatan sebepler anneye bağlı (ekstrinsik faktörler) ve fetüsa bağlı (intrinsik faktörler) olarak iki gruba ayrılır (37). Ektrinsik faktörler daha çok plasentanın fetüse yeterli oksijen ve besin sağlamasıyla sonuçlanan durumlardır (44, 46). İntrinsik faktörler ise fetüsün genetik potansiyeli ile ilişkili faktörler ve enfeksiyonlardır. Genetik faktörler kromozomal anomaliler, tek gen hastalıkları ve genomik damgalama (imprinting) hataları olarak sınıflandırılabilir. Enfeksiyonlar içinde ise özellikle toksoplazma, rubella, sitomegalovirüs ve herpes virus (TORCH) enfeksiyonları sorumlu tutulmaktadır (47).

İntrauterin büyüme geriliği olan bireyler postnatal dönemde yaşitlarıyla olan farkı genellikle kapatırlar. Ancak yaklaşık %10 -15 kadarında büyüme geriliği devam eder ve bu bireyler ileride kısa boylu bireyler olarak kalırlar. Bu bireylerin neden yaşitlarını yakalayamadığı açık değildir. Bununla birlikte bu

bireylerin intrauterin hayatta büyümesini kısıtlayan genetik faktörlerin etkisinin doğumdan sonra da devam ediyor olabileceği düşünülmektedir (48, 49).

2.5.6. Kemik Gelişim Bozuklukları

Kemik gelişim bozuklukları iskelet displazileri olarak da bilinmektedir. İskelet displazileri orantısız boy kısalığı ile sonuçlanan orta dereceden aşırı kısa yapıya kadar değişen oldukça heterojen bir grup hastalıktır (50). İskelet displazileri kemiğin etkilenen bölgesine (epifizyel, metafizyel, diyafizyel veya bunların kombinasyonu) radyolojik bulgularına, patogeneze ve moleküler ve genetik mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar (51).

İskelet displazileri orantısız boy kısalığı ile sonuçlanır. Fizik muayenede hastanın boy uzunluğu ve oturma boyu ölçülerek üst/alt oranına bakılarak ve kol kulaç uzunluğu ölçülerek orantısız boy kısalığı tespit edilebilir. Ancak sınıflandırma yapmak için daha detaylı ölçümler, radyolojik değerlendirme ve moleküler değerlendirme yapmak gereklidir (5).

2.5.7. Kromozomal Anomaliler ve Genetik Sendromlar

Hem sayısal hem de yapısal pek çok kromozomal anomali boy kısalığına neden olabilmektedir. Sayısal anomali nedeniyle ortaya çıkan sendromlardan en sık rastlananları 21. kromozomun fazlalığı sonucu oluşan Down sendromu ve cinsiyet kromozomlarından birinin eksikliği sonucu oluşan Turner sendromudur (5).

Turner sendromu yaklaşık 3000 canlı doğumda görülen bir sendromdur. Bu sendromda boy kısalığı ve adet görememe dışında doğuştan kalp anomalileri (biküspit aorta, aort koarktasyonu), yele boyun, düşük ense saç çizigisi, el ve ayak ödemi bulunur (5). Turner sendromunda boy kısalığının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte kemik gelişiminde rol aldığı düşünülen SHOX geni gibi genlerin eksikliği veya büyüme hormonu salgılanmasında bozukluk veya östrojen eksikliğinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Turner sendromunda SHOX geni vakalardaki boy kısalığını yaklaşık %75 oranında açıkladığı dolayısıyla X üzerinde başka genlerin eksikliğinin de boy kısalığında rol aynadığı belirtilmekle beraber en önemli sebebin SHOX geni eksikliği olduğu belirtilmektedir. Turner sendromunda ortalama final boyları 142-147 cm arasındadır (5, 7).

Down sendromu yine kromozomal anomali sonucu oluşan ve boy kısalığına yol açan başka bir sendromdur. Yaklaşık 600 canlı doğumda bir görülür. Hastalarda boy kısalığı dışında atipik yüz görünümü, çeşitli doğumsal

anomaliler, endokrin ve beslenme bozuklukları ve ilerleyen yaşlarda kilo alımına yatkınlık görülür. Ortalama final boyları 140-160 cm arasında değişir (5).

Russell–Silver sendromu 7. kromozomun maternal uniparental dizomisi ve 15p15.5 lokalizasyonundaki telomerik imprinting kontrol bölgesinin hipometilasyonu sonucu oluşur ve prenatal başlangıçlı kısa yapı, kol ve bacaklarda asimetri, üçgen yüz görünümü, başın göreceli olarak büyük olması ve 5. parmak klinodaktilisi ile karakterize bir sendromdur. Boy kısalığı ileri derecededir (5).

Cornelia de Lange sendromu 5p13 bölgesindeki NIPPED-B-LIKE (NIPBL) genindeki mutasyonlarla oluşan ve büyüme geriliği, zeka geriliği, küçük kafa yapısı, yüzde ve tüm vücutta tüylenme artışı, sinofris, aşağı dönük ağız köşeleri, küçük el ve ayaklar ile karakterize olan bir sendromdur. Hastalarda boy kısalığı ileri derecededir (5).

Bloom sendromu orta derecede boy kısalığı, baş küçüklüğü (mikrosefali), orta yüz hipoplazisi, yüzde telenjektaziler ile karakterize bir sendromdur. Zeka geriliği ve bağışıklık sistemi bozuklukları görülebilir. Hastalar genellikle malignite nedeniyle kaybedilirler (5).

Johanson–Blizzard sendromu 15q15.2 bölgesindeki UBR1 genindeki mutasyonlar sonucu oluşan değişik derecelerde zeka geriliği, kısa yapı, burun kanatlarının dar oluşu, tipik saç yapısı ve diş anomalileri, hiptroidizm ve sağırılık ile karakterize bir sendromdur. İnmemiş testis, penis küçüklüğü, hipotroidi ve pankreas yetmezliği görülebilmektedir (5).

Seckel sendromu ileri derecede mikrosefali, zeka geriliği, merkezi sinir sistemi anomalileri, belirgin burun yapısı, radius başı çıkığı ve kalça çıkığı ile karakterize bir sendromdur. Baş yapısına göre oldukça büyük görünen burun ve çene yapıları tipiktir (5).

2.5.8. Metabolik Hastalıklar

Mukopolisakkaridozlar, mukolipidozlar ve gangliozidozlar orantısız boy kısalığı tespit edilen hastalarda göz önünde bulundurulması gereken metabolik hastalıklardır (5).

2.5.9. Psikososyal Boy Kısalığı

Çocuğun sağlıklı büyümesi için çevresel ortamın da uygun olması gerekir. Bunun en iyi örneği anneden ayrılmaya bağlı olarak hastanede uzun süre yatırılan çocuklarda görülen büyüme duraklamasıdır. Evde anne ve babadan birinin gerçek anne veya baba olmaması veya ev içi ilişkilerin sağlıklı olmaması sonucu bir çocukta büyüme yavaşlaması görülebilir. Özellikle bakımevi çocukları gibi ağır psikolojik sorunları olan çocuklarda psikososyal boy kısalığı görülür.

Psikososyal boy kısalığı 2 ila 15 yaş arasındaki çocuklarda duygusal baskı ya da stress nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Semptomları aşırı kısa boy, kemik

yaşında gerilik ve boy ile orantısız ağırlık şeklinde özetlenebilir. Temel mekanizma büyüme hormonu seviyesinde düşmedir. Bu durum muhtemelen büyüme hormonu baskılayıcı faktör ya da büyüme hormonu salgılatıcı faktör salınımındaki dengesizlikler sonucu oluşmaktadır. Bu hastalar duygusal baskı veya stresten uzaklaştırıldığında büyüme normale döner (52).

2.5.10. İlaça Bağlı Boy Kısalığı

Glukokortikoid tedavisi çeşitli mekanizmalarla boy kısalığına sebep olabilmektedir. Protein yıkımı, kollajen sentezinin baskılanması, IGF 1'in etkisinin baskılanması, hipotalamik aksı etkileyerek vücutta üretilen büyüme hormonu sekresyonunun baskılanması glukokortikoidlerin etkilerindendir. Bu etkiler büyüme hormonu ile hafifleyebilmektedir. Bu nedenle bu hastalar büyüme hormonu tedavisi için adaydırlar (5).

2.6. İdiyopatik Boy Kısallığı

Eğer boy kısallığını açıklayacak bir sebep bulunamaz ise bu durum idiyopatik boy kısallığı olarak tanımlanır. İdiyopatik boy kısallığı daha önceleri büyüme hormonu testi normal olanları ifade eden “normal varyantlı boy kısallığı” isimlendirmesinin alternatifi olarak da kullanılmaktadır (5). Dolayısıyla idiyopatik boy kısallığı tanısı koyabilmek için büyüme hormonu uyarı testleri normal olmalıdır. Bunlara ek olarak;

-Organik hastalık olmamalıdır (çölyak, renal tübüler asidoz vs)

-Karyotip normal olmalıdır

-El-bilek grafisi normal olmalıdır

-Vücut oranları normal olmalıdır (iskelet displazisi düşündürecek bulgu olmamalıdır) (3).

2.6.1. İdiyopatik Boy Kısallığına Sebep Olan Genler

İdiyopatik boy kısallığı pek çok gendeki mutasyon ile ilişkilendirilmektedir. Bu mutasyonların önemli bir kısmı büyüme hormonu aksı ile ilgili genlerdedir (Tablo 2). Bu mutasyonlardan bazıları GH1 genindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlar büyüme hormonunun tersiyer yapısını bozmakta ve hücre içi disülfid bağlarından sorumlu sistein molekülünün serine değişimine

neden olmaktadır. Bunun sonucunda inaktif büyüme hormonu sentezi ortaya çıkmaktadır. GH1 genindeki mutasyonlar ayrıca ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz) aktivasyonunun azalmasına da neden olabilmektedir. BH reseptörü (GHR) geninde meydana gelen mutasyonlar idiyopatik boy kısalığının nedenlerinden birisi olabilir. STAT5b, IGF-I ve ALS geni gibi reseptörle ilişkili olmayan genlerdeki mutasyonlar IGF-I eksikliği olan hastalarda tanımlanmıştır. İBK olan olguların %30-50'sinde IGF-I düşüktür. IGF-IR geninde oluşan heterozigot nokta mutasyonlarının IGF-IR fonksiyonunda düşüş ve proreseptör oluşumunda hata ile sonuçlandığı bilinmektedir (53).

Son dönemde idiyopatik boy kısalığı olan hastalarda SHOX geni üzerinde de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yapılan araştırmalarda, SHOX geninde meydana gelen mutasyonların da idiyopatik boy kısalığına sebep olabileceği gösterilmiştir. SHOX genindeki mutasyonların İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda, görülme sıklığı % 2-14 arasında değişmektedir (54). Homeobox ailesinden olan SHOX genindeki mutasyonların İBK dışında, Leri-Weill Diskondrosteozu (LWD) ve Langer mezomelik displazi (LMD) gibi boy kısalığının eşlik ettiği sendromlara da neden olduğu gösterilmiştir (55). Turner sendromunda, X kromozomunun tek kopya olarak bulunması nedeniyle SHOX geni de tek kopya olarak bulunmaktadır. Bu durum boy kısalığından sorumlu tutulmaktadır. Bu genle ilgili mutasyonlar sadece boy kısalığına neden olmayıp ayrıca Turner sendromu benzeri iskelet anormallikleri (kısa ön kol, kısa tibia, madelung deformitesi, kubit valgus, genu valgum) ve LWD'na da neden olmaktadır. LWD, SHOX geninin tek doz yetersizliği (haploid yetersizliği) ile

sonuçlanan bir iskelet gelişim bozukluğudur. Bu olguların yaklaşık % 65’inde heterozigot SHOX geni mutasyonu tespit edilmiştir. Geriye kalan olgularda ise nedeni henüz açıklanamayan moleküler bir defekt olduğu tahmin edilmektedir. LMD’nin ise SHOX geninin ya da protein fonksiyonunun tamamen kaybolması sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Bu nedenle LMD, LWD’nin homozigot formu olarak düşünülmektedir (56, 57).

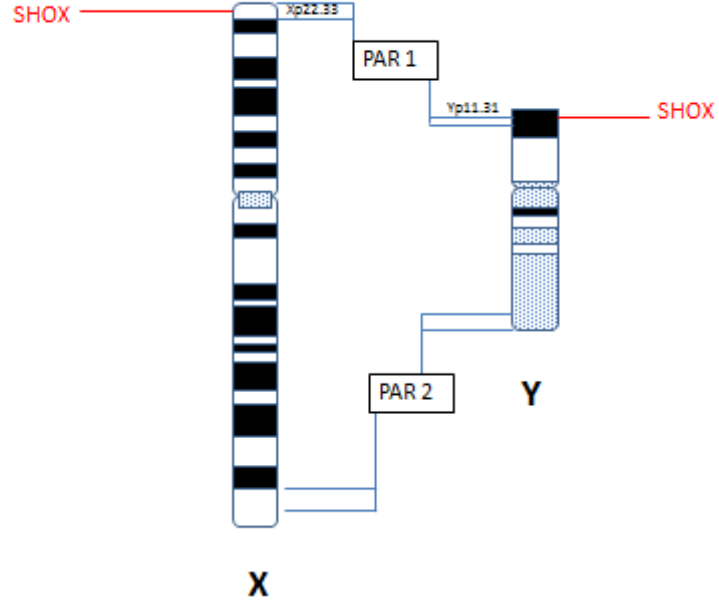
Tablo 2. İBK olan olgularda tanımlanan genler ve mutasyonlar(5).

Gen	Mutasyon	Kalıtım	Fonksiyonel etki
GH1	Arg77Cys	Heterozigot	İnaktif BH
GH1	Asp112Gly	Heterozigot	İnaktif BH
GH1	Ile179Met	Heterozigot	ERK aktivasyonunda azalma
GH1	C53S	Heterozigot	İnaktif BH
GHR	Glu44Lys,R161C	Birleşik	Zayıf BH bağlanması
		Heterozigot	
GHR	C122X	Heterozigot	BH reseptör sayısında azalma
GHR	Glu244Asp	Heterozigot	Subselüler lokalizasyonda değişme
GHR	R211H	Heterozigot	
GHR	Arg161Cys	Heterozigot	
GHR	A478T	Heterozigot	
GHR	V144I	Heterozigot	
GHR	Psödoekzon	Heterozigot	
STAT5b	Ala630Pro	Heterozigot	Anormal IGF-I/IGFBP3 transkripsiyonu
IGF-1	Exon 4ve5 delesyonu	Heterozigot	IGF-1 kaybı
IGF-1	Met44Va		Biyoinaktif
IGFALS	1338delG		ALS kaybı
IGFALS	D440N		ALS kaybı
IGF-1R	Arg108Gln,Lys115Asn		IGF-1R fonksiyonunda azalma
IGF-1R	R709Q	Heterozigot	Proreseptör sürecinin bozulması
SHOX	R59X	Haploid yetersizlik	IGF-I Rs sayısında azalma
SHOX	R195X	Haploid yetersizlik	
NPR2		Heterozigot	

GH, Büyüme Hormonu; GHR, Büyüme Hormonu Reseptörü; STAT, Transkripsiyon Sinyal Aktivatör; IGF-I, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I; IGFBP-3, IGF Bağlı Protein-3; ALS, Asid-Labil Subünit; IGFALS, ALS geni; IGF-1R, IGF-I Reseptör; SHOX, Short Stature Homeobox; NPR2, NP Reseptör Natriüretik Peptid Reseptor-B (NPR-B)

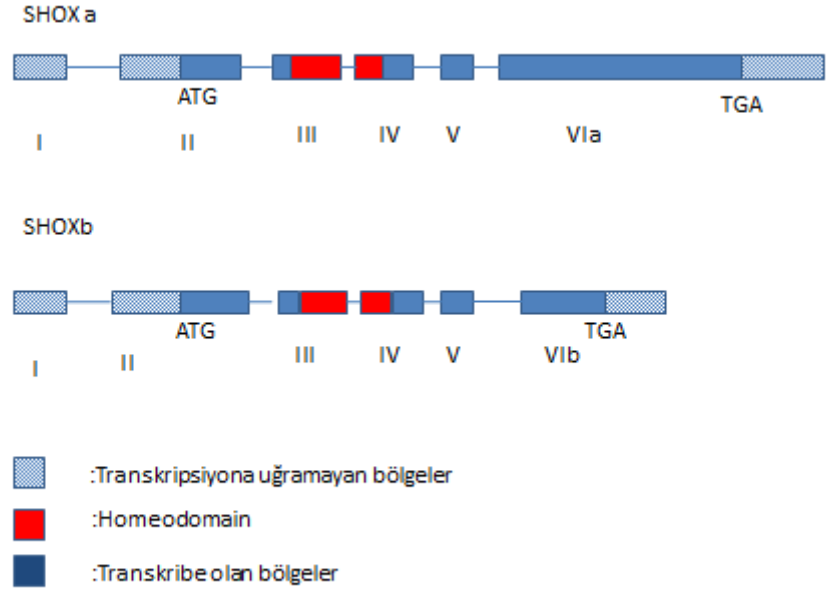
2.7. SHOX Geni (Short Stature Homeobox Containing Gene)

Genetik faktörler büyümenin düzenlenmesi ve final boyun belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle X ve Y kromozomlarının p kolunda (kısa kol) meydana gelen delesyonların boy kısalığı ile ilişkili olduğunun gösterilmesi, bu kromozomlar üzerinde lokalize olan önemli bir aday genin büyümede rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda bu aday genin, X ve Y kromozomlarının p kolundaki psödootozomal bölgenin (PAR1) 700 kb distalinde yer aldığı gösterilmiştir (58, 59). Rao ve arkadaşları (1997) boy kısalığı olan 36 hastada PAR1'deki 170 kb'lık daha küçük bir bölgenin delete olduğunu ve bu bölgenin de Xp22 veya Yp11.3'ye lokalize olduğunu tanımlamışlardır. Burada boy kısalığından sorumlu olduğu düşünülen gen de **Short Stature Homeobox Containing Gene** (SHOX) olarak isimlendirilmiştir (7). Ellison ve ark. aynı geni PHOG (Pseudoautosomal Homeobox-containing Osteogenic Gene) olarak adlandırmışlar ve bu genin büyümenin düzenlenmesinde aday bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir (Şekil 5) (60).



Şekil 5. SHOX geninin X ve Y kromozomu üzerindeki yerleşimi

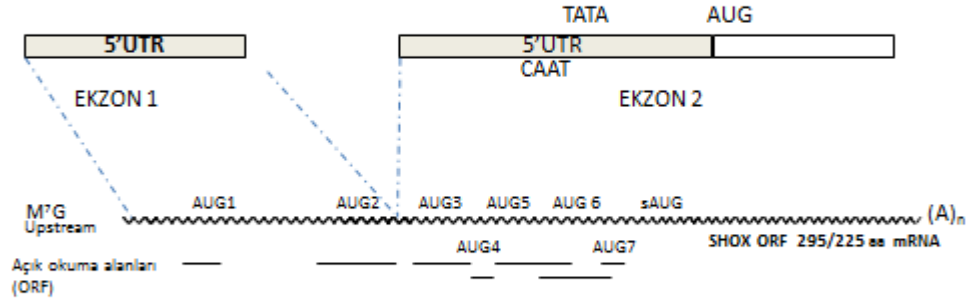
SHOX geni, yaklaşık 40 kb büyüklüğündedir ve 6 ekzondan oluşmaktadır. SHOXa ve SHOXb olarak adlandırılan ve alternatif splicing ile oluşturulan iki ayrı transkripti mevcuttur. Bu transkriptler sırasıyla 292 ve 225 aminoasitten oluşan proteinleri kodlamaktadırlar (Şekil 6). SHOX proteini, homeodomain protein denilen bir grup protein ailesine dahildir. Homeodomain proteinler transkripsiyon faktörü olarak hücre farklılaşması ile organ oluşumunda rol oynayan proteinler olarak işlev görürler (61).



Şekil 6. SHOX geninin yapısı

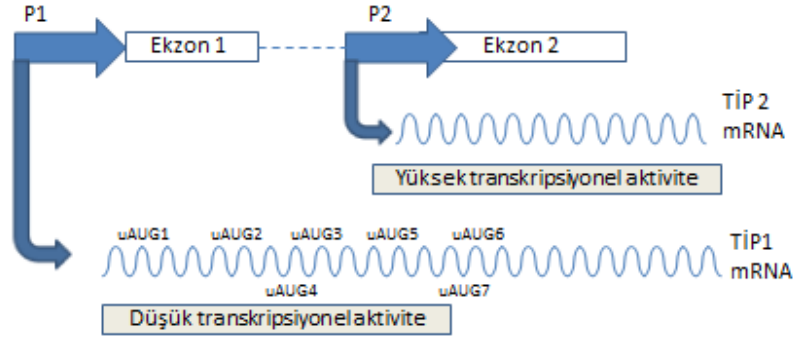
Rao ve ark. SHOX geninin X inaktivasyonundan kaçan genlerden biri olduğunu ve böylece hem aktif hem de inaktif X kromozomu ile Y kromozomunda eksprese olduğunu göstermişlerdir (7). Ekspresyon çalışmalarında da SHOXa ve SHOXb transkriptlerinin farklı ekspresyon paternine sahip olduğu gösterilmiştir. SHOXa birçok dokuda yaygın olarak eksprese olurken SHOXb izoformu daha çok kemik iliği fibroblastlarında bulunur. Bu da, SHOX geninin lineer büyümede rolü olduğunu gösteren bir başka kanıttır. SHOXb, SHOXa' nın transkripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev görür. İnsanlarda embriyo gelişimi sırasında yapılan SHOX geni ekspresyon çalışmaları, genin esas olarak ekstremiteler ve faringeal yarıklar olmak üzere iki büyük bölgede daha fazla eksprese olduğunu göstermiştir. Bu da SHOX geninin hem kısa boy fenotipi, hem de tipik iskelet anomalileri (Turner Sendromu, LWD, LMD gibi) ile ilişkisini

göstermesi açısından anlamlıdır. SHOX geni, ekstremitelerde ilk olarak farklılaşmamış mezenşimal dokuda ekprese olmakta, mezenşim yoğunlaştığında ve kıkırdaklaşma gerçekleştiğinde bu ekspresyon perikondriyal tabakaya doğru kaymaktadır. Ekstremitelerin orta bölümünde özellikle dirsek ve dizde SHOX ekspresyonu daha güçlü olmaktadır (62). Bununla birlikte aksiyal iskelet veya gelişen kafatasında ekspresyon tespit edilmemiştir. Bu nedenle büyüme ile kemik gelişimi sırasında SHOX geninin kesin rolünün ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. SHOX geni mRNA'sının 5' translasyona uğramayan bölgesi (Untranslated Region: UTR) 694 nükleotidden oluşur ve büyüklüğü 6-87 nükleotid arasında değişen yukarı akış yönünde (upstream) 7 adet açık okuma alanı (Open Reading Frame: ORF) içerir (Şekil 7). SHOX geninin 2. ekzonu içinde alternatif bir intragenik promotor bulunmaktadır. Bu bölge sırasıyla -137 ve -257 pozisyonlarında TATA kutusu ve CAAT kutusu içermektedir (Şekil 7) (63).



Şekil 7. SHOX geni 5' UTR'sinin şematik gösterimi

SHOX geninin ekspresyonu, translasyon etkinliği farklı olan ancak benzer kodlama kapasitelerine sahip alternatif promotorlar (P1 ve P2) tarafından düzenlenmektedir (Şekil 8). Bu promotorlar farklı translasyon aktivitelere sahip tip 1 ve tip 2 transkriptleri oluşturmaktadır. P2 yüksek oranda SHOX proteinine ihtiyaç duyulması esnasında kullanılırken, P1'in muhtemelen hücrel stres durumlarıyla ilişkili olan translasyonel kontrol mekanizmaları aracılığıyla protein seviyesini düzenleyen transkriptlerin oluşumuna izin verdiği düşünülmektedir (63).



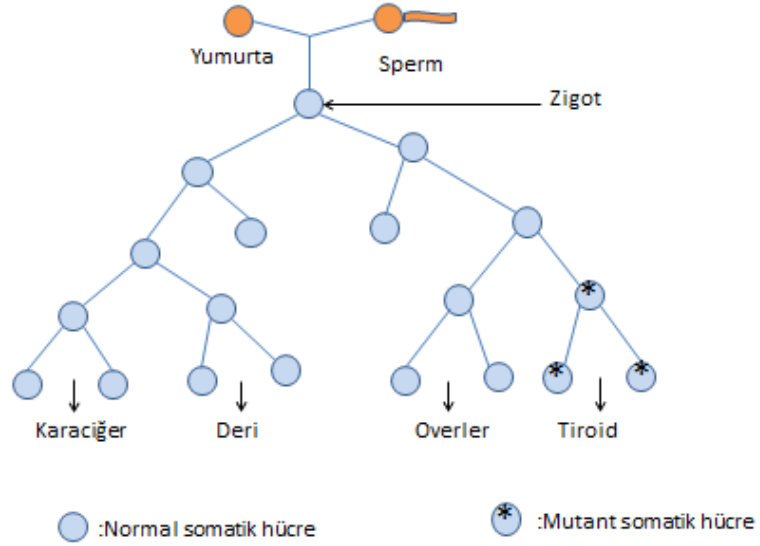
Şekil 8. SHOX geni regülasyon modeli

2.8. Mutasyon

Mutasyon, DNA'nın nükleotid dizilerinde veya nükleotidin metilasyon gibi epigenetik mekanizmalar aracılığıyla meydana gelen spontan veya indüklenebilir değişiklikler şeklinde tanımlanır. Mutasyona neden olan fiziksel ve kimyasal ajanlara mutajen denir (64).

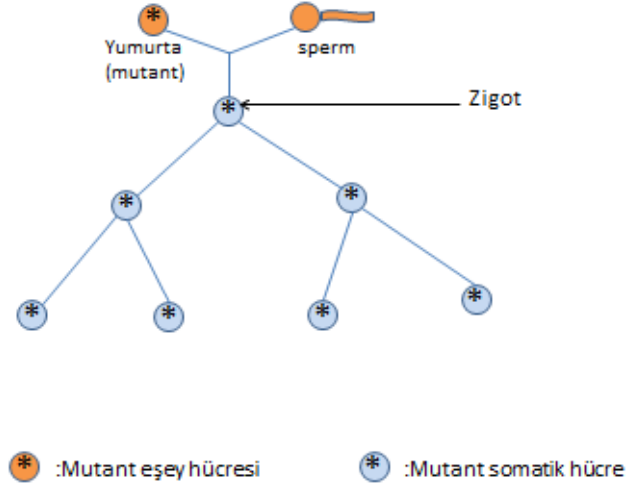
Mutasyonların etkileri değerlendirilirken, değişikliğin somatik hücrelerde mi yoksa germ hücrelerinde mi olduğunun ayrımı önemlidir. Postzigotik olduğunda sadece kendinden türeyen hücrelerde oluşur. Somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar gelecek kuşaklara aktarılmamaktadır. Somatik hücre mutasyonu Şekil 9'da şematik olarak gösterilmiştir. Somatik hücrelerde resesif

(çekinik) alleller oluşturan mutasyonlar organizma için nadiren önemlidir. Bu tür mutasyonlar genellikle dominant (baskın) allel tarafından gizlendiği için ifade fenotipe yansımayacaktır. Somatik mutasyonlar eğer dominant veya X'e bağlı ise büyük olasılıkla hemen ifade edildikleri için daha büyük bir etkiye sahip olacaklardır (65).



Şekil 9. Somatik hücre mutasyonu

Gametler ve gamet oluşturan hücrelerdeki mutasyonlara ise germ hücre mutasyonları denir. Bu mutasyonlar gelecek kuşaklara aktarıldıkları için oldukça önemlidir (66). Germ hücre mutasyonu Şekil 10'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Germ hücre mutasyonunun kalıtımı

2.8.1. Mutasyon çeşitleri

DNA'nın yapısında meydana gelen değişiklikler; gen mutasyonları, kromozom mutasyonları ve genom mutasyonları olmak üzere 3 grupta toplanır (65).

Gen mutasyonları

DNA'nın yapısındaki nükleotid çiftlerinin yer değiştirmesi, bir veya birkaç nükleotidin DNA'nın yapısına katılması (insersiyon) veya bir veya birkaç nükleotidin DNA'nın yapısından çıkması (delesyon) sonucu bir genin nükleotid

dizisinde meydana gelen değişimlere gen mutasyonları denir. Bu mutasyonlar DNA replikasyonu sırasında meydana gelebildiği gibi hasarlı DNA'nın tamirinin yapılamamasından da kaynaklanabilir (65).

DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hataların büyük bir çoğunluğu bir takım DNA tamir mekanizmaları ile onarılır. Burada rol oynayan enzimler ilk olarak yeni sentezlenmiş çift iplikteki yanlış bazı taşıyan ipliği tanır ve daha sonra bu iplikteki bazı doğru olan komplementer baz ile değiştirir. Bu olay “hata okuma mekanizması” (proofreading) olarak adlandırılır.

Bir gen, ultraviyole (UV) ya da iyonize ışınlarla maruz kalırsa ve çevrede bulunan kimyasal mutajenler ile reaksiyona girerse ilgili genin yapısında mutasyonlar meydana gelir. Bu tür mutasyonlar genellikle kalıcı mutasyonlardır (65).

Kromozom mutasyonları

Bu mutasyonlar, kromozomların yapısında; inversiyon, translokasyon, duplikasyon ve delesyon şeklinde oluşan yapısal değişikliklerdir.

- Inversiyon: Bir kromozomda iki kırık oluşması ve kırıkların arasında kalan kısmın ters dönerek yeniden yerleşmesine inversiyon denir. İki kırık arasında kalan kısım sentromeri içeriyorsa *perisentrik inversiyon*, sentromeri içermiyorsa *parasentrik inversiyon* olarak adlandırılır.

▪ Translokasyon: Homolog olmayan iki kromozom arasında meydana gelen parça değişimine translokasyon denir. Translokasyonlar resiprokal translokasyon, Robertsonian translokasyon ve insersiyon tipi olmak üzere 3 gruba ayrılır. Homolog olmayan iki kromozomun distalinde kırık oluşup kırılan parçaların karşılıklı olarak yer değiştirmesine *resiprokal translokasyon* denir. İki akrosentrik kromozom arasında meydana gelen ve sentromere yakın bölgede oluşan kırık sonucu kromozomların kısa kollarının kaybı ile bu bölgeden yeniden birleşmesine *Robertsonian translokasyon* denir. Bir kromozoma ait bir segmentin, oluşan kırıklar sonucu yerinden ayrılarak başka bir kromozoma yerleşmesine ise *insersiyon* tipi denir.

▪ Duplikasyon: Bir kromozom segmentinin fazlalığı şeklinde tanımlanır. Eşit olmayan crossing-over, translokasyon veya inversiyon taşıyıcısında mayoz bölünmede anormal segregasyon nedeniyle oluşabilir.

▪ Delesyon: Bir kromozom segmentinin kaybı demektir. Delesyon taşıyıcısı bir birey normal homolog kromozomuna karşılık gelen bölgedeki genetik bilgi açısından monozomiktir. Delesyonlar kromozomun kırılması ve sentromer içermeyen segmentin kaybı ile oluşabilir. Ayrıca duplikasyonda olduğu gibi eşit olmayan crossing-over veya dengeli bir translokasyon veya inversiyon kaynaklı anormal segregasyon nedeniyle oluşabilir (65).

Genom mutasyonları

Mayoz veya mitoz bölünme sırasında homolog kromozomların hatalı ayrılması ile oluşan kromozom sayılarının değişimidir. Genom mutasyonları her 25-50 mayotik hücre bölünmesinde bir görülür. Kromozom sayısında meydana gelen değişikliklerin bazıları ayrılmama (nondisjunction) veya anafaz safhasında geri kalma (anafaz lagging) mekanizmaları ile oluşur (61).

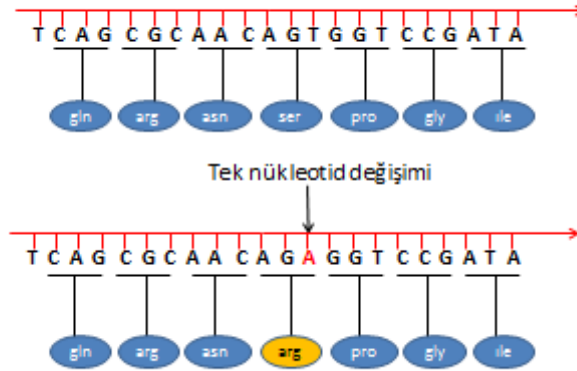
2.8.2 Sonuçlarına Göre Mutasyon

Mutasyonların sonuçları ilgili genine, DNA'daki konumuna ve büyüklüğüne göre değişebilir. Dolayısıyla mutasyonların fenotipe yansımaları, genin ifade kontrol bölgelerinde, intronların içinde, intron-ekzon kesim bölgelerinde veya polipeptidi kodlayan ekzon bölgelerinde meydana gelmesine göre değişebilir. Genetik şifredeki kodon dejenerasyonu olgusu ve protein sentezini sonlandıran “DUR” kodonlarının varlığı mutasyonların sonuçlarını etkileyen diğer faktörler arasında gösterilebilir (67).

Yanlış Anlamlı (Missense) Mutasyonlar:

Bir DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişimi gen ürününde aminoasit değişikliğine neden olur. Bu tip mutasyonlara yanlış anlamlı mutasyonlar denir. Şekil 11’de yanlış anlamlı mutasyon şematik olarak gösterilmektedir.

Yanlış anlamlı mutasyonların fenotipe yansımaları kodon veya nükleotid tipine göre değişebilir. Örneğin, polipeptitte meydana gelen değişiklik benzer kimyasal özelliğe sahip bir aminoasit olarak gerçekleşmişse etkisi daha az (polar-polar), kimyasal özelliği farklı bir aminoasit olarak gerçekleşmişse etkisi daha fazla olabilir (asidik-bazık) (68).

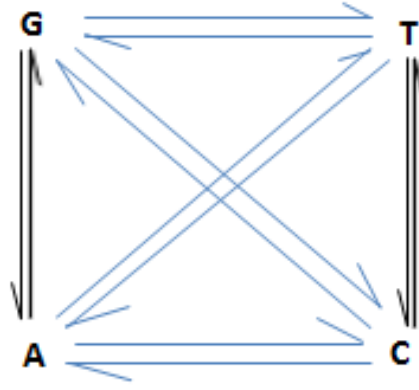


Şekil 11. Yanlış anlamlı mutasyonun şematik gösterimi

Tek nükleotid değişimleri olaya katılan bazların türüne göre iki şekilde adlandırılır. DNA’nın yapısındaki nükleotidlerden bir pürin bazı yerine diğer pürin bazının (A-G) veya bir pirimidin bazı yerine diğer pirimidin bazının (T-C) gelmesi şeklindeki değişikliklere transisyon denir. Bir pürin yerine bir pirimidin

veya bir primidin yerine bir pürin gelmesi şeklindeki değişikliklere ise transversiyon denir (64).

Bir baz, başka bir bazla yer değiştirdiğinde transversiyon için her zaman iki olası seçenek varken transisyon için bir seçenek vardır (Şekil 12).

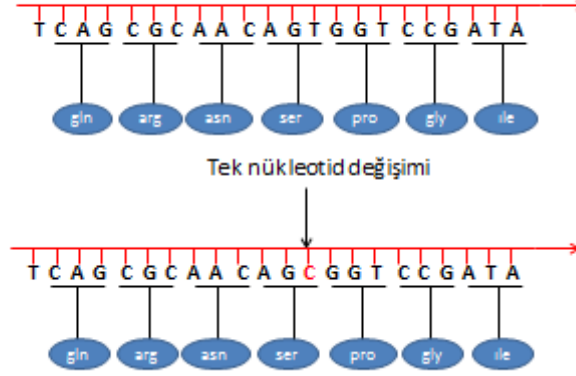


Şekil 12. Transisyon ve transversiyonda baz değişimleri (Siyah oklar: Transisyon, Mavi oklar: Transversiyon)

Sessiz (Silent) Mutasyonlar

DNA'daki üçlü kodonun tek bazı değişikliğe uğramasına rağmen bu kodondan sentezlenen aminoasit değişmez. Çünkü DNA'dan mRNA'ya yansıyan değişiklik yine aynı aminoasiti kodlayan bir başka kodona dönüşmüştür. Örneğin CAT ve CAC kodonlarının her ikisi de mRNA'da histidin aminoasidini kodlamaktadır. Bu nedenle üçüncü bazda T yerine C'nin geçmesi değişikliğe

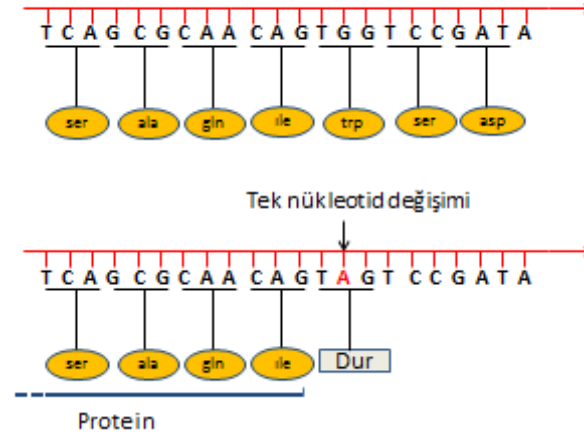
neden olmaz. Buna sessiz mutasyon denir (64). Sessiz mutasyon Şekil 13’de şematik olarak gösterilmiştir



Şekil 13. Sessiz mutasyonun şematik gösterimi

Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar

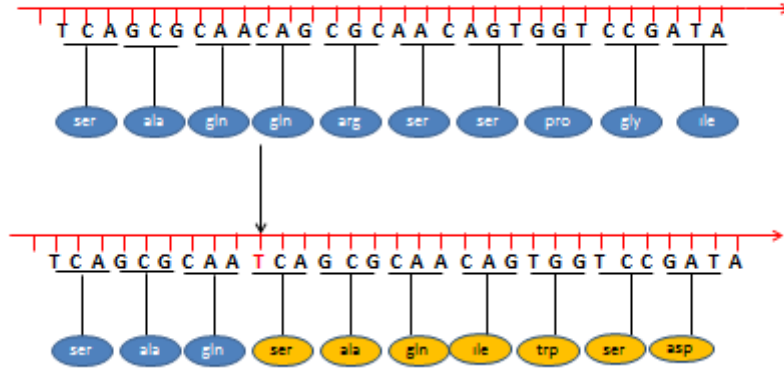
Aminoasit dizisininde karşılığı olmayan UAA, UAG ve UGA kodonları mRNA da protein sentezini sonlandıran kodonlardır. Bu kodonlara stop kodonları denir. Mutasyon sonucunda oluşan baz değişikliği, aminoasit kodlayan kodondan, stop kodonlarından birine dönüşür ise protein sentezi durur (Şekil 14). Bu durumda polipeptit zincirin erken sonlanmasıyla olması gerekenden daha kısa ve işlevsiz bir ürün meydana gelir. Anlamsız mutasyonun etkileri, proteinin ne kadar kısaltılmış olduğuna ve fonksiyon için ne kadar proteine gereksinim olduğuna göre değişir (67).



Şekil 14. Anlamsız mutasyonun DNA üzerinde şematik gösterimi

Çerçeve Kayması (Frame-Shift) Mutasyonları

Çerçeve kayması mutasyonları genin kodlanan bölgelerinde üçün katları olmayan baz eklenmesi (insersiyon) ya da baz çıkarılması (delesyon) nedeniyle oluşan mutasyonlardır. Bu değişiklik, mRNA da kendinden sonra gelen tüm aminoasit sırasının değişimiyle sonuçlanır ve mRNA da çerçeve kaymasının değiştiği yere göre klinik farklı olabilir. Bunun sonucunda ilgili protein tamamen ortadan kalkabilir ya da işlevsel olarak yetersiz protein üretimi ile sonuçlanabilir. (64). Çerçeve kayması mutasyonu Şekil 15’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 15. Çerçeve kayması mutasyonunun şematik gösterimi

2.9. Kromozom analizi

1988'de ilk olarak Waldeyer yunanca renk ve cisim kelimelerini birleştirerek 'kromozom' kelimesini ortaya çıkarmıştır ve pek çok bilim adamı tarafından kalıtımın kromozomlar üzerinde taşındığı kabul edilmiştir (69). Daha sonraları 19. yüzyıl ve 20. yüzyılın başlarında optik lens teknolojisinin gelişmesiyle birlikte kromozom sayısının belirlenmesiyle ilgili çalışmalar başlamıştır. İlk olarak 1912'de Winiwater, insanda erkek bireylerde 47 kromozom (46 otozom+ X) ve dişi bireylerde 48 kromozom (46 otozom +XX) olarak saptamıştır (70). Painter 1923'de her iki cinste XX ve XY eşey kromozomları dahil 48 kromozom olduğunu ileri sürmüştü ve 1956'ya kadar böylece kabul edilmiştir (71). Daha sonra kültür denemelerinin artması, tuz solüsyonları kullanarak yayma preparatlarının hazırlanması ile sayının gerçekte 48 değil 46

olduğu görülmüştür. Erkek bireylerde 44 AA+XY, dişilerde ise 44 AA+XX karyotipinde olduğu ileri sürülmüştür (72). Haploid setteki (n sayıdaki kromozom) 22 kromozom boylarına ve sentromer konumlarına göre sınıflandırılmış ilk defa 1960 yılında ABD Denver'da yapılan toplantıda 7 gruba ayrılmıştır. Daha sonraki bir dizi toplantıda Denver sistemi geliştirilmiş ve insan kromozomları bir standardizasyona sokularak ortak bir adlandırma sistemi kabul edilmiştir (73, 74).

Paris'te 1971 yılında düzenlenen “İnsan Sitogenetiğinde Standardizasyon” konferansında kabul edilen şekle göre karyotip belirlenmesinde toplam kromozom sayısı, eşey kromozomları ve fazla veya eksik kromozomları (+), (-) gösterimi sağlanır. Buna göre örneğin, 47,XX,+21 ifadesi canlının genomunda 47 kromozom bulunduğunu ve 21. kromozomun trizomik (üç tane) olduğunu belirtmektedir. Ayrıca kol uzunluklarındaki artış ve eksilme durumu belirtilmesi 46,XY,1q+ şeklinde gösterilmektedir. Bu, genomda 1. kromozomun uzun kolunun fazladan bulunduğunu ya da normalden daha uzun olduğunu ifade etmektedir. Fakat 47,XY,+14p+ ifadesinde toplam 47 kromozomlu genomda 14. kromozomun trizomisi ve uzun kol fazlalığı gösterilmiştir. Yapısal mutasyonlarda ise del (delesyon), dup (duplikasyon), r (ring), inv (inversiyon), ve t (translokasyon) sembolleri kullanılmaktadır.

1971 yılında ilk defa bir bantlama tekniğiyle her bir kromozomun kendine has bant yapısı olduğu gösterilmiştir (75, 76). Bir yıl sonra günümüzde de yaygın olarak kullanılan ve teknik olarak uygulanması daha kolay olan Giemsa ile bantlama yöntemi geliştirilmiştir (77).

Kromozom karyotiplemesinde günümüzde beş özellik incelenmektedir.

1. Uzunluk; ayrı ayrı veya toplam kol uzunlukları,
2. Sentromer konumu; buna göre telomerler ve kromozom şekli belirlenir.
3. Sekonder boğumun bulunup bulunmaması ve varsa konumu,
4. Kromozomların bant özellikleri; Giemsa ve floresan boyalarla aynı gruptaki kromozomların tayininde kullanılır.
5. Otoradyografik özellikler; radyoizotop maddelerle işaretlenmiş ve nukleotidlerin kalıtımı ve DNA içi tekrarları belirlenebilir.

İşte bu karakterlerin esas alınarak ayrılan kromozomların belli bir sisteme göre sınıflandırılmasına karyotip, karyotipin şekil halinde gösterilmesine idiogram denir. En büyükten başlayarak insan genomunu oluşturan otozomlar 1'den 22'ye kadar numaralandırılır ve A'dan G'ye kadar gruplara ayrılır (Tablo 3) (78).

Tablo 3. Kromozomların gruplandırılması

Grup	Çiftler	Sentromer Konumu
I-A	1-3	Metasentrik
II-B	4, 5	Submetasentrik
III-C	6-12	Submetasentrik
IV-D	13-15	Akrosentrik
V-E	16-18	Submetasentrik
VI-F	19, 20	Metasentrik
VII-G	21, 22	Akrosentik

2.10. Floresan *in situ* Hibridizasyon Yöntemi

In situ hibridizasyon yöntemleri 1960'lı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. İlk yıllarda floresan probalar değil, radyoizotop probalar kullanılmıştır (79). Rigby ve ark.'nın 1977 yılında geliştirdiği klonlama yöntemleriyle elde edilen problemlerin, radyoaktif ve nonradyoaktif moleküllerle işaretlenmesini sağlayan "Nick Translasyon" yöntemi, in situ hibridizasyon çalışmalarının dönüm noktasını oluşturmuştur (80). Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) yöntemi bu eski yöntemlere alternatif olarak doğmuştur. İlk olarak 1980 yılında Bauman ve ark., özgül hedef DNA dizisini floresan probalar kullanarak FISH yöntemi ile belirlemiştir (81). Pinkel ve ark. (1986) bu yöntemin prensibini, kromozom üzerindeki özgül bir hedef DNA dizisine yönelik floresan probalar kullanılarak, hedef dizinin varlığını ya da yokluğunu tespit etme işlemi olarak tanımlamışlardır (82). FISH tekniğinin kullanımı ile ilgili standardize edilmiş terimlerin kuralları 1995 yılında International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995) tarafından yayınlanmış ve 2013 yılında güncellenmiştir (ISCN 2013) (83) ve American College of Medical Genetics (ACMG) tarafından da FISH yönteminin klinik kullanımı ile ilgili klavuz hazırlanmıştır (84).

FISH yöntemi klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Problar yüksek duyarlılığa sahiptirler ve bu sayede kolaylıkla hedef DNA dizisine bağlanırlar. Problemlerin tespiti bir haptin (biyotin ya da digoksinin) bir floresan bağlı özgül prob inkübasyonu ile ya da floresan-5-tiyosiyonat (FITC) veya rodamin gibi ışık yayan florokrom-Ultraviyole (UV) ile sağlanır. Floresan mikroskoplar kullanılarak da analiz edilir (85). Klinik uygulamaya yönelik problemler

genellikle ticari olarak piyasada bulunmaktadır. Genel olarak problemler üç kategoridedir: tekrar dizisine yönelik problemler, tüm (whole) kromozom problemleri (library) ve özgül dizilere yönelik problemler. Tekrar dizisine yönelik problemler içerisinde daha yaygın olarak kullanılan problemler α satellit tekrar dizileri hedefleyen problemlerdir. α satellit tekrar dizileri insan kromozomların sentromerinde bulunur ve bu dizilere özgü problemler özellikle metafaz veya interfaz hücrelerinde sayısal kromozomal anomalilerin tespitinde kullanılır. Diğer tekrar dizisi problemleri β satellit tekrar dizilerini hedefleyen problemler (akrosentrik kromozomların kısa kollarında bulunur), klasik tekrar dizisi problemleri (heterokromatin bölgeleri denen bölgelerde bulunur) ve telomerik tekrar dizisi (TTAGGG) problemleri olarak sayılabilir. İkinci tip problem olan tüm kromozom problemleri her kromozomda kendine has ve tekrar eden dizilere yönelik hazırlanan problemlerdir ve yapısal değişikliklerin tespitinde kullanılır. Üçüncü tip problemler olan özgül dizilere yönelik problemler ise 1 kilobaz (10^3) ile 1 megabaz (10^6) arasında değişen uzunluklarda olup mikrodelsiyon sendromlarında olduğu gibi belli bir kromozomal bölgenin tespitinde kullanılır (85).

Günümüzde FISH uygulamaları, doğum öncesi (prenatal) tanı, kanser sitogenetiği, mikrodelsiyon sendromlarının tanısı gibi farklı alanlarda oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. FISH çalışmalarında sıklıkla yüksek spesifik aktiviteye sahip olan sentetik oligonukleotid problemler (10-50 nükleotid'lik) kullanılmaktadır (85).

Pek çok ileri FISH yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte en sık kullanılan yöntemde: örnekler lam üzerine fikse edilir, hedef DNA'dan, RNA ve proteinler

uzaklaştırılır, isaretli prob ve hedef DNA bir araya getirilerek, organik solvent varlığında hedef DNA, ısı ile denature edilir; hibridizasyondan sonra yıkama işlemleri ile hibridize olmayan proplar ortamdan uzaklaştırılır, yüzey boyası ile boyanan preparatlarda ortaya çıkan DNA-prob hibrid molekülleri floresan mikroskop altında incelenir (86).

2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (PZR)

PZR, Mullis tarafından geliştirilen *in vitro* ya da *in vivo* (*in situ* PZR) koşullarda genomik DNA'nın seçilen bölgesine özgü primerler kullanılarak DNA polimeraz enzimi yardımıyla defalarca kopyalanarak moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir (87). Bu yöntemle ilk defa β -globulin geninin 1. ekzonuna ait 110 baz çiftlik (bç) bölge çoğaltılmıştır (88). Ortamda tek bir DNA kopyası varlığında bile 10^7 - 10^9 kez kopyanın çoğaltılması mümkündür (89, 90). PZR için; kalıp DNA, 17-65 nükleotid uzunluğunda bir çift primer, deoksiribozidtrifosfatlar (dNTP), $MgCl_2$ ve enzim olarak da *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen Tag DNA polimeraz gereklidir (91, 92). İlk orjinal çalışmada enzim olarak *Escherichia coli* DNA polimeraz 1'in "Klenow" fragmanı kullanılmış ve ısıya dayanıksız olduğu için, her defasında yeniden eklenmiştir (89, 93). Daha sonra ısıya dayanıklı termofilik bakteri olan '*Thermus aquaticus* (Tag)'dan elde edilen Tag DNA polimeraz kullanılmaya başlanmıştır.

95 C°'ye dayanıklı olan bu enzim halen günümüzde de kullanılmaktadır (93).

Polimeraz, zincir reaksiyonu (PZR), 3 ana basamakta gerçekleşir:

1) Denatürasyon: Bu aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısının yüksek sıcaklık yardımıyla birbirinden ayrılarak tek zincirli hale gelmesi sağlanır.

2) Bağlanma (Annealing): Denatürasyonu takiben sıcaklık azaltılarak tek zincirli hale gelmiş DNA molekülünde primerlerin özgül bölgelere bağlanması sağlanır. Bağlanma derecesini, primer dizilerinin uzunluğu ve içerdiği GC bazlarının oranı belirler.

3) Uzama (Elongasyon): Bu aşamada DNA polimeraz enziminin çalışabilmesi için gerekli ısı olan 72 °C'ye kadar artırılarak DNA zincirini uzatması sağlanır. Hedef DNA'nın uzunluğuna göre değişmekle birlikte her bir kilobaz için 1 dakika yeterlidir (88).

PZR'nin bu üç basamağının sonunda DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Başlangıçta koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlı olarak oluşan ürün miktarı değişir. Genelde insana ait gen kalıplarının çoğaltılmasında 20-35 döngü yeterlidir (94).

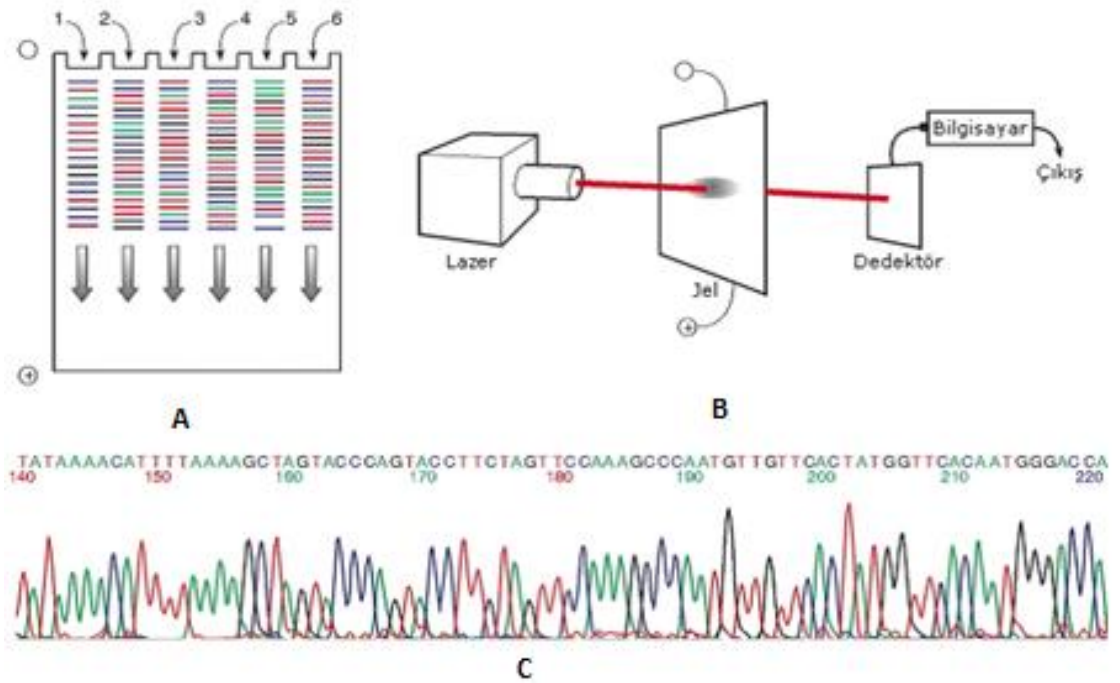
2.12. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki nükleotid baz dizilerinin sırasını doğru ve eksiksiz bir şekilde ortaya çıkarmak için kullanılan bir yöntemdir. Allan

Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilmiş “kimyasal degradasyon (yıkım) yöntemi” ve Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan “dideoksienzimatik yöntemi” nükleotid baz dizilerinin belirlenmesi için geliştirilen iki temel tekniktir. Bu iki yöntemden Sanger ve arkadaşlarının yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki yöntem de 3 aşamalıdır. Bunlar; dizi analizi yapılacak DNA’nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezidir.

Sanger ve ark. tarafından geliştirilen enzimatik sentez yönteminin gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanması ile otomatik DNA dizi analizi yöntemi geliştirilmiştir. Uygulanan yöntemde, ilk olarak dizisi okunacak bölge PZR ile çoğaltılır ve genellikle floresan boyalar kullanılarak işaretlenmiş nükleotidler ve deoksिनükleotidler içeren karışımda reaksiyon başlatılmış olur. Bu iş için genellikle flörofor denilen kimyasallar kullanılır. Bu kimyasallar ile işaretlenmiş floresan boyalar kolaylıkla DNA zincirinin tespit edilmesini sağlar. Deoksिनükleotidler aynı zamanda DNA sentezini inhibe eden moleküllerdir. Bu nedenle sentez esnasında dideoksिनükleotid eklenen kısımda sentezlenen DNA zincirinde uzama durur. Böylece değişken uzunluklarda floresan boylarla işaretlenmiş DNA sentez ürünleri oluşur. Örnekler bir kapillerden geçirilirken elektroforez uygulanır. Farklı uzunluktaki DNA örneklerinin farklı yerlere yerleşmesi sağlanır. Floresan işaretli boyları uyarmak için bir lazer, boyların yaydığı ışığı toplamak için de bir kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından DNA’ların farklı renkteki flörofor reaksiyonları sayesinde yaydığı farklı dalga boylarındaki ışımlar otomatik dizi analizi cihazı tarafından okunur, analiz

edilir. Her bir dalga boyu (renk) bir bazı (Adenin, Guanin, Timin, Sitozin) temsil eder. Veriler bilgisayar aracılığıyla çeşitli yazılımlar kullanılarak görüntülenir. Böylece dizi belirlenmiş olur (Şekil 16). Dizi analiz cihazları ile 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (95).



Şekil 16. Otomatik DNA dizi analizi. A-Örneklerin kapiller elektroforezden geçirilmesi. B-Lazer ışığı yardımıyla örneklerin dalga boyunun (renk) kamera aracılığıyla tespit edilmesi. C-Bilgisayar yardımıyla elde edilen verilerin görüntülenmesi (95).

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na refere edilen/başvuran; boyu, yaş ve cinsiyetine göre hesaplanan ortalama boyu, değerinden -2 SDS (Standart Deviyasyon Skoru) daha aşağıda olan (veya boy persentil eğrilerinde boyu 3. persentilin altında olan), herhangi bir dismorfik, sistemik, endokrinolojik, nutrisyonel eksiklik ve kromozomal anomalisi olmaksızın, normal seviyede büyüme hormonuna sahip olan ve bu nedenle idiopatik boy kısalığı tanısı alan 33 tanesi kız, 4 tanesi erkek olmak üzere toplam 37 olgu dahil edilmiştir. Çalışmaya katılanlar “Gönüllü Olur Formunu” nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Gönüllü olur formu örneği EK.1’ de verilmiştir. Çalışmanın etik kurul izni “Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” nun 13 temmuz 2011 tarihinde yapmış olduğu toplantının “7521” sayılı kararı ile alınmıştır. Ekonomik desteği ise 01/2012-26 kodlu proje kapsamında “Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi” tarafından sağlanmıştır. Çalışmanın Etik kurul kararı Ek.2’de, Proje’ ye ait sözleşme protokolü Ek.3’ de verilmiştir.

Hastaların çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri Tablo 4’de sunulmaktadır. Tüm olgulara, çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul ettiklerine dair “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Genetik Materyal)” imzalatılmıştır. Her bir hastadan yüksek rezolusyonlu bantlama (HRB) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) teknikleri için heparinli tüpe 10 ml kan alınmıştır ve hücre kültürü hazırlanmıştır. HRB ve FISH analizlerini takiben, sonuçları normal olan,

ulaşılabilen ve proje bütçesinin el verdiği 24 hastadan SHOX geninin moleküler olarak araştırılabilmesi için etilen diamintetra asetik asitli (EDTA'lı) tüpe 10 ml periferik venöz kan alınmıştır ve bu kanlardan spin kolonla DNA izolasyonu yapıp, sekans analizi uygulamasına kadar DNA'ları -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 4. Çalışmaya katılan olguların İBK açısından değerlendirilme kriterleri

Dahil Olma Kriterleri	Dışlama Kriterleri
-Boy Standart Sapma Skoru (SDS) -2'nin veya boy pesentil değeri 3'ün altında olanlar	-Boy SDS değeri -2'nin veya boy persentili 3'ün üstünde olanlar
-Herhangi bir organik hastalığı bulunmayanlar	-Organik bir hastalık tespit edilmiş olan hastalar
-İskelet sistemi bulguları normal olanlar	-İskelet sisteminde anormal bulgu tespit edilmiş olanlar
-Dismorfik bulgu/sendromik boy kısalığı olmayanlar	-Sendrom olarak değerlendirilen veya dismorfik bulguları olanlar
-Boy kısalığını nedeniyle yapılan Rutin tetkiklerinde kronik sistemik hastalık bulgusu saptanmamış olanlar	-Rutin tetkiklerinde boy kısalığını açıklayacak kronik sistemik hastalık bulgusu saptanmış olanlar
-Nutrisyonel bozukluk olmayanlar	-Nutrisyonel nedenlere bağlı boy kısalığı olanlar
-Ötroid iken yapılan farmakolojik büyüme hormonu uyarı testlerine normal yanıt vermiş olanlar	-Büyüme hormonu uyarı testlerine büyüme hormonu eksikliği tespit edilen hastalar
-Karyotipi normal olanlar	-Kromozom anomalisi olanlar
-Bilgilendirilmiş onam formunu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul edenler	-Çalışmaya katılmayı reddeden hastalar

3.2. Kromozom Eldesi için Kısa Dönem GTG Doku Kültürü

- Heparinli kan örneği içinde 2-3 ml RPMI 1640 medyumunu bulanan 10ml'lik steril santrifüj tüpü içine alınıp 1200 rpm de 10dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra altta kalan pelletten, steril pipetajı takiben 2 ayrı doku kültürü hazırlanmıştır.
- Doku kültürü için 3 adet steril polistren 10 ml'lik tüplere 5'er ml RPMI medyumundan bölünmüş ve her bir tüpe yaklaşık 0.5 ml kan örneğinden konulmuştur. Medyum içinde; %20 fetal dana (calf) serumu, %1.5 fitohemagglutinin, %1 200 mM L-glutamin, 100 µg/ml penisilin/streptomisin bulunmaktadır.
- Tüpler 37 °C'lık etüv ortamında 72 saat inkübasyona bırakılmış ve 72. saatte kromozomları metafazda durdurabilmek için, her bir tüpe 0.1µg/ml kolşisin ilave edilmiştir.
- İki saatlik inkübasyonu takiben tüpler 1200 rpm'de 10dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine vorteks ile yavaş yavaş karıştırma yapılırken 0.075 M KCl solusyonu ilave edilmiş ve yaklaşık 15-20 dakika 37 °C'lık etüvde hipotonik ile muamelesi sağlanmıştır.
- Tekrar tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine, vorteks ile yavaş yavaş karıştırma yapılırken 3:1 oranında hazırlanmış metanol/asetik asit solüsyonu ile fiksasyon işlemi yapılmıştır. Bu aşama alttaki pellet yeteri kadar yıkanana kadar, yaklaşık üç, beş kez tekrarlanmıştır.

- Süpernatant atılıp, alttaki pelletten daha önce temizlenmiş ve yıkanmış lamalar üzerine metafaz yaymaları yapılmış ve preparatlar FISH tekniği uygulanıncaya kadar -20°C’de saklanmışlardır.

3.3. Kromozom Eldesi İçin Kısa Dönem HRB Doku Kültürü

İlk 2 aşama GTG doku kültürü ile ortaktır.

- İnkübasyonun 48. saatinde kültür tüpüne metotreksat (Mtx, 10^{-6} M) 0.5 ml eklenmiş ve 37 °C’de bekletilmiştir.
- 17 saat sonra tüpler 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılıp, pelletin üzerine 5 ml taze medyum eklenerek, üzerine 50µl 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrDU, 10^{-3}) koyulup, tekrar 37 °C’de inkübasyona devam edilmiştir.
- 5,5 saat sonra kromozomları prometafazda durdurabilmek için, her bir tüpe 0.1µg/ml kolşisin ilave edilmiştir.
- Bu aşamadan itibaren preparasyona kadar GTG ile ortak devam etmiştir. Hazırlanan preparatlar aşağıda hazırlanışı verilen GTG bantlama tekniği ile boyanıp, mikroskop altında analiz edilmiştir.

3.4. GTG Boyama ve Bantlama Tekniği

Giemsa bantlama 3 şale hazırlanarak yapılmıştır.

1. şale 0,04 gr tripsin
80 ml PBS
2. şale 80 ml PBS
3. şale boya hazırlanarak konulmuştur. Boya için,
53 ml A Solüsyonu
47 ml B Solüsyonu
5-10 ml Giemsa boyası

Boyayı süzmek için 41 numaralı filtre kağıdı kullanılmıştır.

3.5. Solüsyonların Hazırlanışı

PBS 8 gr NaCl

0,2 gr KCl

0,92 gr Na₂HPO₄ (12H₂O)

0,2 gr KH₂PO₄

1 lt H₂O

TRİPSİN Gibco 1/250

40 mg Pouden

A Solüsyonu $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ 6.90 gr

Distile su 500 ml

B Solüsyonu $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$ 6.90 gr

Distile su 500 ml

3.6. FISH Tekniğinin Uygulanması

Yukarıdaki periferik kan hücre kültüründen elde edilen kromozomlara, aynı gün preparasyon yapılarak aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır.

3.6.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

1. Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla % 100-70-50-30'luk alkol serisinden geçirilerek dehidre edilmiştir.

2. Dehidre edilen preparatlar 1 dakika oda ısısındaki 0.1XSSC solüsyonundan geçirilmiştir.

3. Ardından preparatlar 70 °C'deki 2XSSC solüsyonuna alınarak 30 dakika bekletilmiştir.
4. Süre sonunda 2XSSC solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi beklenmiştir.
5. Preparatlar 1 dk oda ısısındaki 0.07 M'lık NaOH solüsyonunda denatüre edilmiştir.
6. Denatürasyonu takiben preparatlar sırasıyla 1 dk +4 °C'de 0.1XSSC ve +4 °C'de 2XSSC de bekletilmiştir.
7. Preparatlar % 30-50-70-100'lük alkol serisinden geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Ön yıkama ve denatürasyon solüsyonları tablo 5 ve 6' da verilmiştir.

Tablo 5. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

20XSSC Solüsyonu

NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml

0,1XSSC Solüsyonu

20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 'a ayarlanmıştır.

Tablo 6. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

0,07 M NaOH

1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

3.6.2. Prob Denatürasyonu

Kullanılacak prob su banyosunda 5 dakika 70 °C'de bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.6.3. Hibridizasyon

1. Her bir preparata uygulanacak probun bulunduğu ependorf tüpleri santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.

2. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen 2 alana prob eklenip her iki alan üzerine 20 mm'lik kare lamel kapatılmıştır.
3. Lamel çevresi su girmemesi için yalıtılmıştır.
4. Preparatlar 37 °C'de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.6.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

1. Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.
2. Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe çalkalanarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.
3. Preparatlar 74 °C deki 1XSSC solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir.
4. Sonrasında oda ısısındaki 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dk bekletilmiştir. Yıkama solüsyonlarının içeriği Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

1XSSC Solüsyonu

20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml

2XSSC Solüsyonu

20XSSC	20 ml
--------	-------

Distile su	180 ml
------------	--------

2XSSC/Tween-20 Solüsyonu

20XSSC	20 ml
--------	-------

Tween 20	100 µl
----------	--------

Distile su	180 ml
------------	--------

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0'a ayarlanmıştır.

3.6.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi

1. Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dk bekletilmiştir.

2. Süre sonunda preparatlardaki alanlara 15 µl antifade eklenerek lamel ile kapatılmıştır.

3. Preparatlar inceleme aşamasına kadar –20°C’de ve karanlıkta bekletilmiştir. Görüntüleme solüsyonlarının içeriği Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

DAPI/Antifade Solüsyonu

2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

3.6.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Floresan mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelendi. Her olgu için prob başına en az 5'i metafaz plağı olmak üzere 30 hücre değerlendirildi. X kromozomuna ait sentromer bölgesi yeşil (FITCH) ile X veya Y kromozomunun kısa kolundaki SHOX genine ait bölge ise kırmızı (RED) floresan boya ile boyanarak incelemeye alındı.

3.7. Spin Kolon Yöntemi İle Periferik kandan DNA izolasyonu

1. 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne 500 µl buffer AP1 konuldu
2. Üzerine 200-250 µl kan örneği eklendi. Mikrofüj tüpünün kapağı kapatıldı ve maksimum hızda 10 sn vortekslendi.
3. Üzerine 100 µl buffer AP2 ilave edildi ve maksimum hızda 10 saniye daha vortekslendi. Spin kolonlara (Axygen Scientific, ABD) aktarıldı.

4. 12000 rpm’de 10 dakika ortam sıcaklığında santrifüj edilerek hücresel artıkların pellet oluşturması sağlandı.

5. 2 ml mikrofüj tüpü içerisine miniprep kolon yerleştirildi. 4. adımdaki işlemde sonra belirginleşen supernatant miniprep kolonlara aktarıldı. 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

6. 2 ml mikrofüj tüpünün altındaki süzölmüş sıvı boşaltıldı. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirildi. Önceden etanol eklenmiş 700 µl W1A miniprep kolonların üzerine eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldı. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirildi. 800 µl buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklendi ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldı. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirildi. 500 µl buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklendi ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Böylece buffer W2 ile iki kez yıkayarak tuzların daha iyi uzaklaştırılması sağlandı ve enzimatik reaksiyonlar sırasında bu nedenle oluşabilecek problemler elimine edildi.

9. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldı. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirildi ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

10. Miniprep kolon 1.5 ml’lik mikrofüj tüpüne yerleştirildi. Önceden 65 °C ye ısıtılmış 80-200 µl buffer TE eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA elde edildi.

3.8. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA izolasyonu yapılan örnekler ait konsantrasyon, spektrofotometre (Nanodrop ND-1000, ABD) cihazı ile ölçüldü. Ölçülen DNA'ların iyi olma kriteri 260/280 değerine (1,6-1,9) ve optik dansitesine göre (30-70 ng/μl) değerlendirildi.

3.9. SHOX Genini Dizileme İşlemi İçin PZR İle Örneklerin Çoğaltılması

3.9.1. SHOX Geninin Tüm Dizisine Erişilmesi

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.ensembl.org/> adreslerinden SHOX geninin tüm dizisine ulaşıldı.

3.9.2. SHOX Genini Dizileme İşlemi İçin Primer Tasarlanması

Dizi analizinde iyi kalitede sonuç elde edebilmek için, geni 4 bölge içinde çoğaltacak şekilde, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> adresindeki program ile 4 primer çifti tasarlandı ve primerler sentezletildi (Alfa DNA).

Şekil 17-20'de SHOX geninin 2., 3., 4., 5. ve 6. ekzonları için seçilen primerlerin gen üzerindeki yerleri ve DNA dizi analizine ait datalar

değerlendirilirken kullanılan referans diziler gösterilmiştir. Seçilen primer dizileri ve PZR ürün bilgileri Tablo 9’da verilmiştir.

```
GAAAACTGGAGTTTGCTTTTCTCCGGCCACGGAGAGAACGCGGGTAACCTGTGT  
GGGGGGCTCGGGCGCCTGCGCCCCCTCCTGCGCGCGCGCTCTCCCTTCCAAAA  
TGGGATCTTTCCCCCTTCGCACCAAGGTGTACGGACGCCAAACAGTGATGAAATG  
AGAAGAAAGCCAATTGCCGGCCTGGGGGGTGGGGGAGACACAGCGTCTCTGCGTG  
CGTCCGCCCGCGAGCCCCGGAGACCAGTAATTGCACCAGACAGGCAGCGCATGGGG  
GGCTGGGC GAGGTCGCGCGCTATAAATAG TGAGATTTCCAATGAAAGGCGTAAA  
TAACAGCGCTGGTGATCCACCCGCGCGCACGGGCCGTCTCTCCGCGCGGGGAGA  
CGCGCGCATCCACCAGCCCCGGCTGCTCGCCAGCCCCGGCCCCAGCC ATGGAAGA  
GCTCACGGCTTTTGTATCCAAGTCTTTTGACCAGAAAAGCAAGGACGGTAACGGC  
GGAGGCGGAGGCGGCGGAGGTAAGAAGGATTCCATTACGTACCGGGAAGTTTGG  
AGAGCGGACTGGCGCGCTCCCGGGAGCTGGGGACGTCCGATTCCAGCCTCCAGGA  
CATCACGGAGGGCGGCGGCCACTGCCCGGTGCATTTGTTCAAGGACCACGTAGAC  
AATGACAAGGAGAACTGAAAGAATTCCGGCACC GCGAGAGTGGCAGAAG GTAAGT  
TCCTTTGCGCTCCGGCTCCAGGGGGGCCCTCCTGGGGTTCGGCGCCTCCTCGCCA  
CGGAGTCGGCCCCGCGCGCCCCTCGCTGTGC ACATTTGCAGCTCCCGTCTC GCCA  
GGGTAAGGCCCGGGC
```

Şekil 17. Ekzon 2 Bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi; primer çifti; **yeşil**, 5' UTR bölgesi **gri**, İntron bölgeleri **mor** boyanmıştır. Boyanmayan bölge kodlayıcı ekzon bölgesini göstermektedir. İlk aminoasit olan metiyonini kodlayana **ATG** kodunu sarı renkle gösterilmiştir.

```
AGCAGCGAGTATCCTCCTCGGCTTTTGCCTTATGGACCCACGCAGTTTTTGC GT  
CAAAGCGCATTTGGTTTTC GAGGGCCCCCTTTCCACCGCGGGATGCACGAAGGGGT  
TCGCCACGTTGCGCAAAACCTCCCCGGCCTCAGCCCTGTGCCCTCCGCTCCCCAC  
GCAG GGATTTATGAATGCAAAGAGAAGCGCGAGGACGTGAAGTCGGAGGACGAGG  
ACGGGCAGACCAAGCTGAAACAGAGGCGCAGCCGCACCAACTTCACGCTGGAGCA  
GCTGAACGAGCTCGAGCGACTCTTCGACGAGACCCATTACCCCGACGCCTTCATG  
CGCGAGGAGCTCAGCCAGCGCCTGGGGCTCTCCGAGGCGCGCGTGCAG GTAGGAA  
CCCGGGGGCGGGGGCGGGGGGCCCGGAGCCATCGCCTGGTCCTCGGGAGCGCACA  
GCACGCGTACAGCCACCTGCGCCCCGGGCCCGCCGCGTCCCCTTCCCGGAGCGCGG  
GGAGGTTGGGTGAGGGACGGGCTGGG GTTCTGGACTTTTGGAGACG CCTGAGGC  
CTGTAGGATGGGTTCAATTGCGTTTGTTTTTCACCAACAGCAAAC
```

Şekil 18. Ekzon 3 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi; primer çifti; **yeşil**, 5' UTR bölgesi **gri**, İntron bölgeleri **mor** boyanmıştır. Boyanmayan bölge kodlayıcı ekzon bölgesini göstermektedir.

CTTGATTTTCAGAACCACCACCACCACAACAAAACAAAACAAAAATCCAAAAAA
 CCCCATTTCAGTACTAGGTAGTCAGTGATGCAGGGCTGGAGACAGAGGGGCGG
 TAAGTGTCTGGGCGCCACCATCAGTCACCTCCCAGCTCCCAGAGGTGCAAAGTG
 CTTGGTTTCAGCCTCATGGGAAGGATGCTCCCTGGGGAGGCTGGGCTGGGTTTACA
 GGGCTCTTCACATCTCTCTCTGCTTCTCCCAAGGTTTGGTTCCAGAACCGGAGA
 GCCAAGTGCCGCAAACAAGAGAATCAGATGCATAAAGGTGGGTGTCTGGGACTGGG
 GGGACCTGAAGCTGGGGGATCCTGCTCCAGGAGGGATGGGGTCGACGAGGTGCTG
 GCTACACCCAGGACCACCACACTGACACCTGCTCCCTTTGGACACAGGCGTCATC
 TTGGGCACAGCCAACCACCTAGACGCTGCCGAGTGGCACCCTACGTCAACATGG
 GAGCCTTACGGATGCCTTTCCAACAGGTAGCTCACTTTTTCTTCCTCTGAAGATC
 CCTAGGGACCTGCTGCTCCCTTCCCTTATTTGCTGCCGCATCC

Şekil 19. Ekzon 4 ve 5 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi; primer çifti; **yeşil**, 5' UTR bölgesi **gri**, İntron bölgeleri mor boyanmıştır. Boyanmayan bölgeler kodlayıcı ekzon bölgelerini göstermektedir.

GTGTGGGGTGGTCTCCACGGCTGGAGAAGGGGCGACGCTCCCTAGGGGAGAAGAG
 GCACGTTGGAGGTTCCGGGGGCGCGGGGCGGAGCAGGCCCCCAGTCCCCATCC
 TGCGCCCTCACCCCGCCGGGTCCGCTCCCGCAGGTCCAGGCTCAGCTGCAGCTGG
 AAGGCGTGGCCACGCGCACCCGCACCTGCACCCGCACCTGGCGGCGCACGCGCC
 CTACCTGATGTTCCCCCGCCGCCCTTCGGGCTGCCATCGCGTCGCTGGCCGAG
 TCCGCCCTCGGCCGCCGCGTGGTGCGCCGCCGCCAAAAGCAACAGCAAGAATT
 CCAGCATCGCCGACCTGCGGCTCAAGGCGCGGAAGCACGCGGAGGCCCTGGGGCT
 CTGACCCGCGCGCAGCCCCCGCGCGCCGGACTCCCGGGCTCCGCGCACCCCG
 CCTGCACCGCGCGTCTTCACTCAACCCCGCCTGGAGCTCCTTCCGCGGCCACCG
 TGCTCCGGGCACCCCGGGAGCTCCTTGCAAGAGGCCTGAGGAGGGAGGCTCCCGGG
 ACCGTCCACGCACGACCCAGCCAGACCCTCGCGGAGATGGTGCAGAAGGCGGAGC
 GGGTGAGCGGCCGTGCGTCCAGCCCGGGCCTCTCCAAGGCTGCCCGTGCCTCCTG
 GGACCCTGGAGAAGGGTAAACCCCGCCTGGCTGCGTCTTCTCTGCTATAACCT
 ATGCATGCGGTTAACTACACACGTTTGGGAAGATCCTTAGAGTCTATTGAACTGC
 AAAGATCCCGGAGCTGGTCTCCGATGAAAATGCCATTTCTTCGTTGCCAACGATT
 TTCTTTACTACCATGCTCCTTCCCTTCATCCCGAGAGGCTGCGGAACGGGTGTGGA
 TTTGAATGTGGACTTCGGAATCCCAGGAGGCAGGG

Şekil 20. Ekzon 6 bölgesinin sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi; primer çifti; **yeşil**, 3' UTR bölgesi **gri**, İntron bölgeleri **mor** boyanmıştır. Boyanmayan bölge kodlayıcı ekzon bölgesini göstermektedir.

Tablo 9. SHOX geni çoğaltılmasında kullanılan primerler

<u>Ekzon</u>	<u>Primer Dizisi</u>	<u>PZR Ürünü (bp)</u>
2	F5'-GAGGTCGCCGCGTATAAATAG-3'	538
	R5'-GAGACGGGAGCTGCAAATGT-3'	
3	F5'-GTCAAAGCGCATTGGTTTTTC-3'	489
	R5'-CGTCTCCAAAAGTCCAGGAAC-3'	
4 -5	F5'-ATTTCCAGTACTAGGTAGTCAGTGATG-3'	529
	R5'- CAAATAGGGGAAAGGGGAAGG-3'	
6	F5'- AGAAGAGGCACGTTGGAGGTTTC-3'	488
	R5'-TCCTCAGGCCTCTTGCAGGA-3'	
F: İleri dizi (Forward) primer, R: Geri dizi (Reverse) primer, bp: Baz çifti		

3.9.3. DNA Dizi Analizi Primerlerinin Blast Sonuçları

Seçilen primer dizileri www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool adresindeki program kullanılarak BLAST'lanıp (Basic Local Alignment Search Tool) homoloji sonuçları yorumlanarak özgünlükleri belirlendi.

3.9.4. PZR örneğinin hazırlanması

Her bir örnek için 0,2 ml' lik PZR tüpleri içine, steril distile su, 10 pmol forward/reverse primer, 0.3 µl Tag DNA Polimeraz enzimi ve 10X tampon solüsyonu, 10 mmol dNTP, 75 mmol MgCl₂, 10X tampon solüsyonu ve üzerine genomik DNA (150 ng) konuldu.

3.9.5. PZR aşamaları

Ekzon 2, 3, 4 ve 5 ve 6'ya ait PZR aşamaları Tablo 10-13'de gösterilmiştir. Elde edilen tüm PZR amplifikasyon ürünleri agaroz jelde kontrol edildi.

Tablo 10. Ekzon 2'ye özgü primerler için kullanılan PZR programı

95 °C (5 dk)	HotStartTaq aktivasyonu	35 Döngü
94 °C (30 sn)	Ayrılma (Denatürasyon)	
61 °C (30 sn)	Primerlerin bağlanması (Annealing)	
72 °C (30 sn)	Uzama (Extension)	
72 °C (5 dk)	Final	

Tablo 11. Ekzon 3'e özgü primerler için kullanılan PZR programı

95 °C (5dk)	HotStartTaq aktivasyonu	
94 °C (30 sn)	Ayrılma (Denatürasyon)	35 Döngü
60 °C (30 sn)	Primerlerin bağlanması (Annealing)	
72 °C (30sn)	Uzama (Extension)	
72 °C (5 dk)	Final	

Tablo 12. Ekzon 4 ve 5'e özgü primerler için kullanılan PZR programı

95 °C (5dk)	HotStartTaq aktivasyonu	
94 °C (30 sn)	Ayrılma (Denatürasyon)	35 Döngü
63 °C (30 sn)	Primerlerin bağlanması (Annealing)	
72 °C (30sn)	Uzama (Extension)	
72 °C (5 dk)	Final	

Tablo 13. Ekzon 6'ya özgü primerler için kullanılan PZR programı

95 °C (5dk)	HotStartTaq aktivasyonu	
94 °C (30 sn)	Ayrılma (Denatürasyon)	35 Döngü
63 °C (30 sn)	Primerlerin bağlanması (Annealing)	
72 °C (30sn)	Uzama (Extension)	
72 °C (5 dk)	Final	

3.9.6. PZR Ürününün Görüntülenmesi

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için önce hassas terazide 2 gram toz agaroz tartılarak cam erlenmayere aktarıldı ve üzerine 100 ml 1×TBE (tris-borik asit EDTA) eklendi. Hazırlanan karışım ısıtmalı manyetik karıştırıcıda agaroz tamamen çözünüp şeffaf hale gelinceye kadar karıştırıldı. Agaroz jeldeki PZR ürününü görünür hale getirmek amacıyla son aşamada çözeltiye 10µl etidyum bromür (EtBr) ilave edildi. EtBr, DNA molekülünün bağlarının arasına bağlanır ve UV ışığı altında floresan etki göstererek DNA'nın jelde görünür hale gelmesini sağlar. Katılaşmayacak kadar soğutulan agaroz çözeltisi tarak ihtiva eden jel tablasına dökülerek jelin polimerleşmesi beklendi. Jel katılaştıktan sonra içerisinde 1×TBE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi ve tarak dikkatlice çıkarıldı. PZR ürününün büyüklüğünü belirlemek için jelin ilk kuyucuğuna ekzon 2, 3, 4 ve 5 için 50 bp'lik, ekzon 6 için 100 bp'lik DNA molekül ağırlığı belirteci yüklendi. Daha sonraki kuyucuklara her ekzon için önce PZR ürünü içeren karışım (2 µl yükleme tamponu –3µl PZR ürünü) sonra negatif kontrol için DNA içermeyen karışım (2 µl yükleme tamponu–3 µl negatif kontrol) gelecek şekilde yükleme yapıldı. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve jel 120 Volt akım uygulanarak 40 dakika süre ile yürütüldü. PZR reaksiyonu sonucu elde edilen PZR ürünlerinin görüntüleme işlemi “Syngene In Gene BioImaging” UV görüntüleme cihazı ile yapıldı ve görüntüsü alınarak kaydedildi.

3.9.7. PZR Ürününün Temizlenmesi ve DNA Dizi Analizi

SHOX genine ait sekans primerleri ile çoğaltılmış PZR ürünlerinin temizlenmesi ve DNA dizi analizi için hizmet alımı yapıldı (Dr. Zeydanlı firması aracılığı ile MacroGen firmasında yaptırıldı). Firma tarafından gönderilen ham datalar AB SequenceScanner Software 2 v2.0 programı ile çift yönlü (Forward veya 5'-3'yönünde, reverse veya 3'-5' yönünde) ve karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

4. BULGULAR

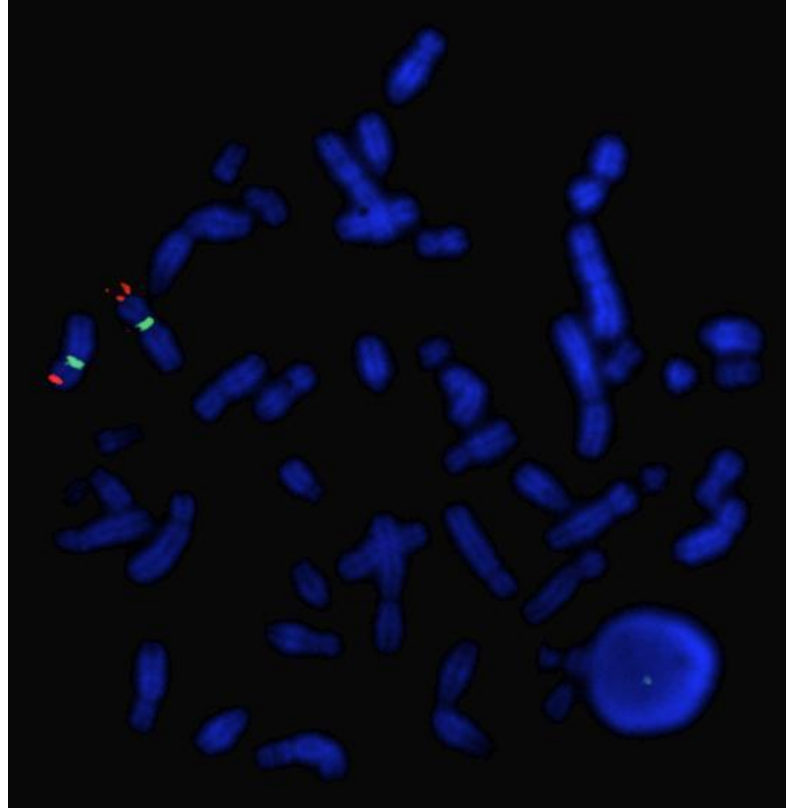
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve tüm tetkikleri yapılarak idiyopatik boy kısalığı tanısı alan 4 tanesi erkek (olgu 1, 14, 21 ve 34), 33 tanesi kız olmak üzere toplam 37 çocuk hasta çalışmaya alınmıştır. İncelemeye alınan olguların yaş aralığı 5 ile 18 arasında bulunmuş olup yaş ortalaması 10.86 olarak tespit edilmiştir. Olgu 22 ve olgu 23 kardeşlerdir. Olgu 1 ve 37 postpubertal dönemdeki, diğer olgular prepubertal dönemdeki olgulardır. Hastaların boy uzunlukları 102 cm ile 147 cm arasındadır. Tüm hastaların boyları normal populasyona göre -2 SSD'nin altında saptanmıştır. Ortalama boy SDS değeri -2.44 olarak hesaplanmıştır. Boyları -3 SSD'nin altında olan 4 olgu (3, 4, 14, 15 ve 17) tespit edilmiştir. En düşük SDS değerleri -3,5 ve 3.51 ile olgu 3 ve 14'e aittir.

Çalışmaya katılan idiyopatik boy kısalığı olgularının boy uzunlukları ve boy SDS değerleri Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Çalışma grubunun boy uzunluğu ve boy SDS değerleri

Olgu No	Yaş	Boy uzunluğu (cm)	Boy SDS değeri
1	15	147	-2.98
2	5,5	103	-2.11
3	11,5	126	-3.50
4	9	113,5	-3.15
5	12	136	-2.48
6	10	124	-2.26
7	12,5	140	-2.11
8	14	142	-2.10
9	12,5	138	-2.36
10	13	140	-2.17
11	12	137,5	-2.26
12	13,5	142	-2.01
13	12	135	-2.62
14	12,5	133	-3.51
15	11,5	126	-3.45
16	11,5	132	-2.55
17	12	130	-3.35
18	13	136	-2.64
19	13	142	-2.20
20	10,5	117	-2.98
21	6	102	-2.70
22	7	108,5	-2.42
23	6	103,5	-2.23
24	6,5	108	-2.20
25	12	136,5	-2.41
26	11	130	-2.44
27	8,5	116	-2.14
28	11	131	-2.22
29	11	128	-2.70
30	13	138	-3.05
31	5	98	-2.10
32	8	108	-2.96
33	8,5	120	-2.10
34	12	132	-3.04
35	12	128	-2.78
36	11	124,7	-2.79
37	18	145	-2.54

Her bir olgunun yüksek çözünürlüklü bantlama yöntemi ile sitogenetik analizleri yapılmış ve tamamında normal karyotip belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 37 hastanın tamamına FISH yöntemiyle SHOX geninde delesyon olup olmadığı araştırılmış ve bütün olgular normal olarak değerlendirilmiştir. Olgu 25'e ait örnek FISH görüntüsü Resim 1'de verilmiştir.



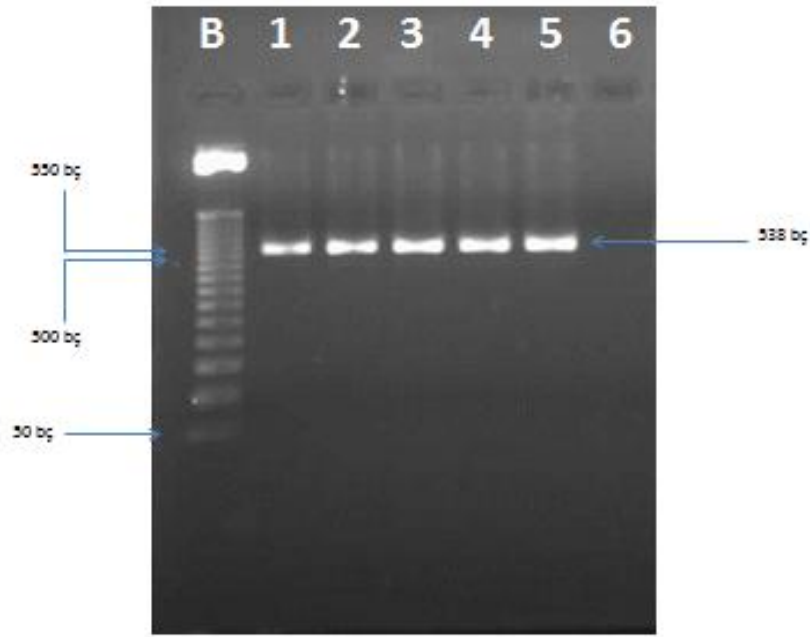
Resim 1. SHOX geninin FISH tekniği ile çalışılması (Olgu 25). Kırmızı siyaller Xp22'de bulunan SHOX gen bölgelerini, yeşil sinyaller X kromozomunun sentromer bölgelerini (DXZ1 sentromerik bölge, kontrol probu) işaretlemektedir.

FISH tekniği sonrası sonuçları normal olan, ulaşılabilen ve proje bütçesinin el verdiği 24 hastadan EDTA'lı tüple kan alınıp dizi analizi için DNA izolasyonu yapılp edilen her bir DNA'nın yeterli kalitede olup olmadığının belirlenmesi açısından ölçüm yapılmıştır (Tablo 15). DNA miktarı (ng/μl) 26,5 ve 69,6 arasında bulunup ortalama değer 41.3 olarak belirlenmiştir. DNA kirlilik miktarı ($260/280 A^{\circ}$) 1.6 ile 1.91 arasında olup ortalama 1.74 olarak hesaplanmıştır.

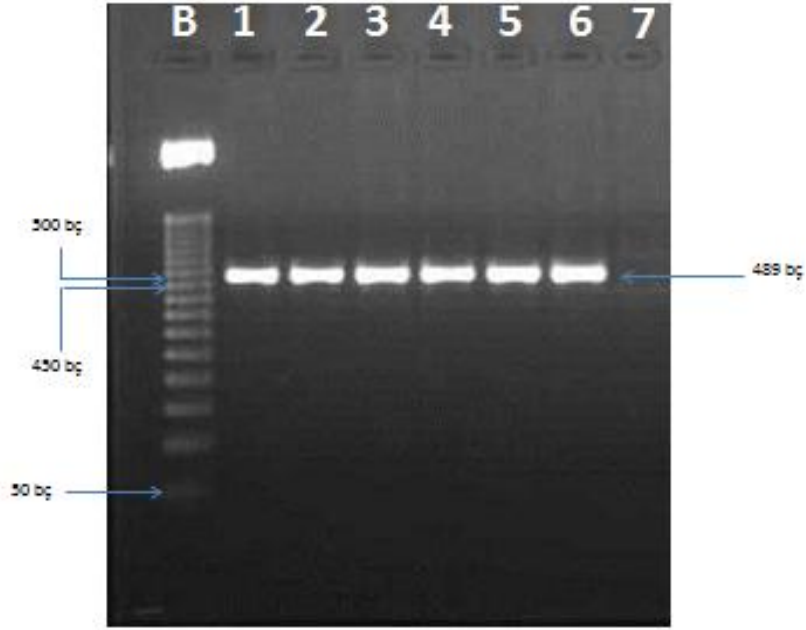
Tablo 15. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Örnekler	ng/μl	$260/280 A^{\circ}$
1	41,9	1,87
3	32,6	1,74
4	37,8	1,84
5	46,6	1,78
6	39,9	1,90
7	30,6	1,78
8	40,7	1,75
9	53,5	1,87
10	59,7	1,88
11	31,8	1,60
12	26,5	1,76
13	49,5	1,64
15	69,4	1,89
16	69,6	1,86
17	38,7	1,88
18	40,7	1,90
19	30,2	1,84
20	41,7	1,86
22	39,8	1,85
23	41,9	1,85
24	37,2	1,91
25	41,8	1,86
26	49,6	1,72

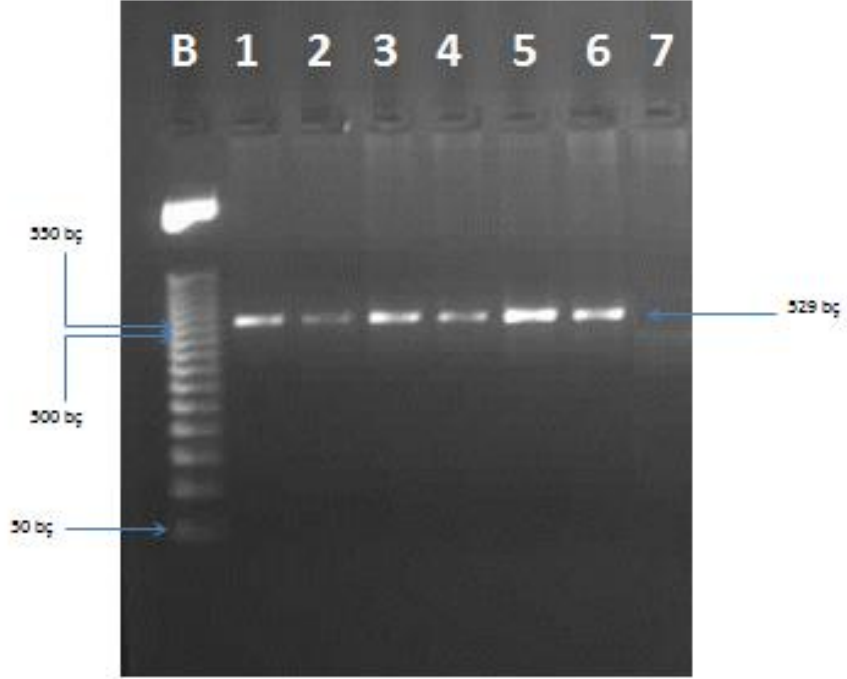
DNA eldesi sonrası dizi analizi için ilk önce proje bütçesi dahilinde DNA dizi analizi yapılacak 24 hastanın her biri için PZR (Ekzon 4ve5 için aynı reaksiyon koşulları kullanılmıştır) yöntemi uygulanmıştır. PZR işlemi sonrası PZR ürünlerinin istenilen bölgede olup olmadığını ve PZR ürününün dizi analizi için istenilen kalitede olup olmadığının kontrol etmek amacıyla her bir PZR ürünü DNA molekül ağırlığı belirteçleri ile birlikte jelde görüntülenmiştir. PZR ürünlerine ait örnek jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Resim 2-5).



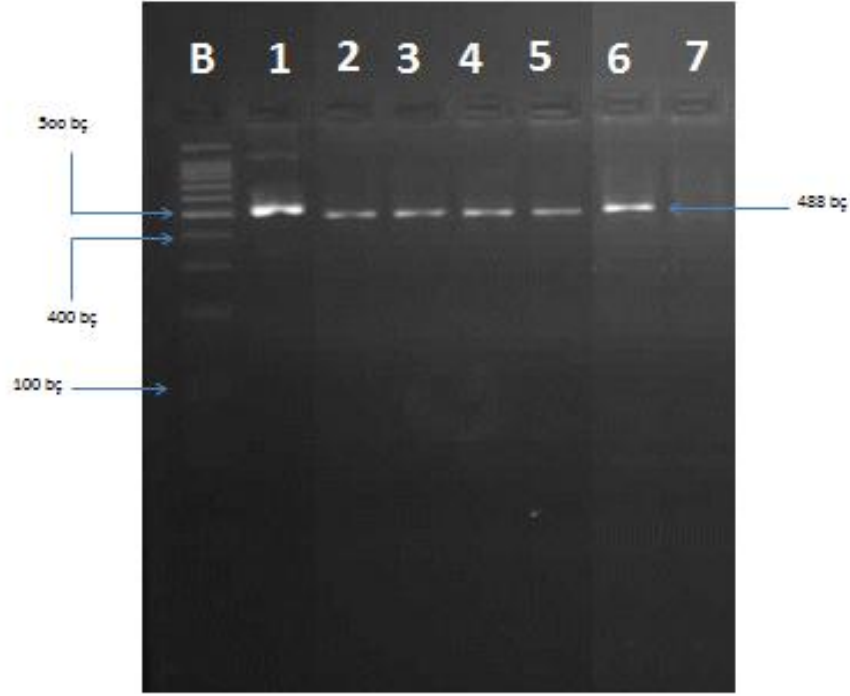
Resim 2. Ekzon 2 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü. B. kuyusunda 50 bç'lik DNA molekül ağırlığı belirteci izlenmektedir. Bunu izleyen 5 kuyuda sırasıyla 1. ve 3.- 6. numaralı hastaların 538 bç'lik PZR ürünü izlenmektedir. 6. Kuyuda negatif kontrol görülmektedir.



Resim 3. Ekzon 3 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü. B kuyusunda 50 bç'lik DNA molekül ağırlığı belirteci izlenmektedir. Bunu izleyen 6 kuyuda sırasıyla 1. ve 3.- 7. numaralı hastaların 489 bç'lik PZR ürünü izlenmektedir. 7. Kuyuda negatif kontrol görülmektedir.

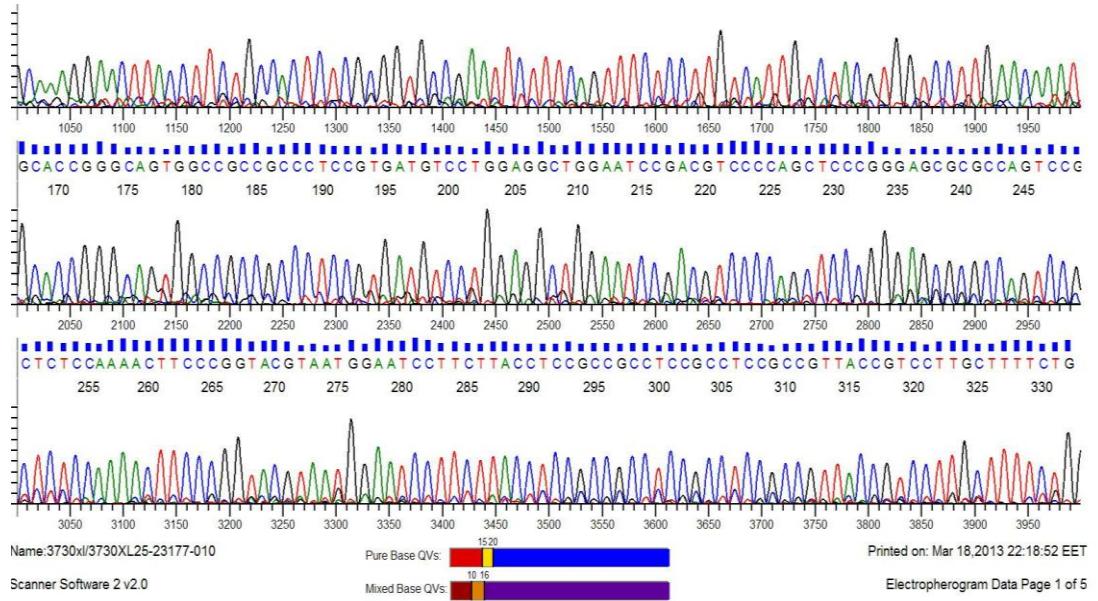


Resim 4. Ekzon 4 ve 5 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü. B kuyusunda 50 bç'lik DNA molekül ağırlığı belirteci izlenmektedir. Bunu izleyen 6 kuyuda sırasıyla 1. ve 3.-7. numaralı hastaların 529 bç'lik PZR ürünü izlenmektedir. 7. Kuyuda negatif kontrol görülmektedir.

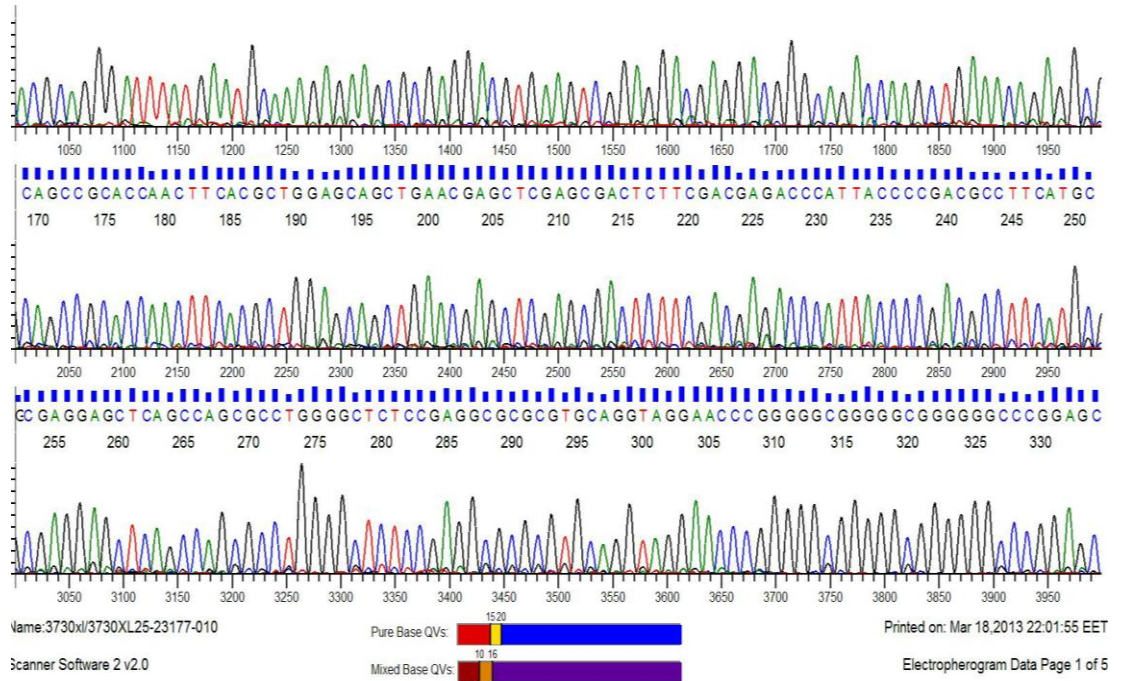


Resim 5. Ekzon 6 bölgesine ait PZR ürününün jeldeki görüntüsü. B kuyusunda 100 bç'lik DNA molekül ağırlığı belirteci izlenmektedir. Bunu izleyen 6 kuyuda sırasıyla 1. ve 3.- 7. numaralı hastaların 488 bç'lik PZR ürünü izlenmektedir. 7. Kuyuda negatif kontrol görülmektedir.

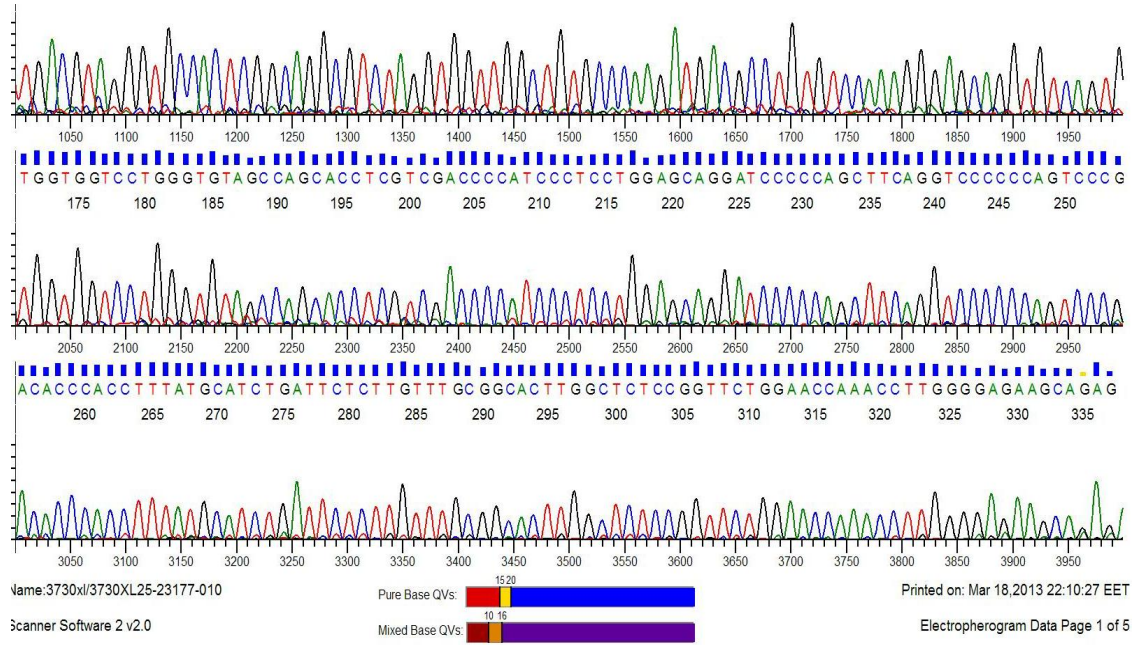
Amplifiye edilen ürünlerden SHOX geninin 2, 3, 4 ve 5, 6. ekzonlarının çift yönlü dizi analizi yapılmıştır. Analiz esnasında forward (5'-3') ve reverse (3'-5') dizilere ait veriler eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Hastaların hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır. Her bir ekzonun dizi analizinin birer örneği Resim 6 – 9'da gösterilmiştir. Ekzon 4 ve 5 için ortak dizi analizi yapıldığı için tek resimde görülmektedir (Resim 8).



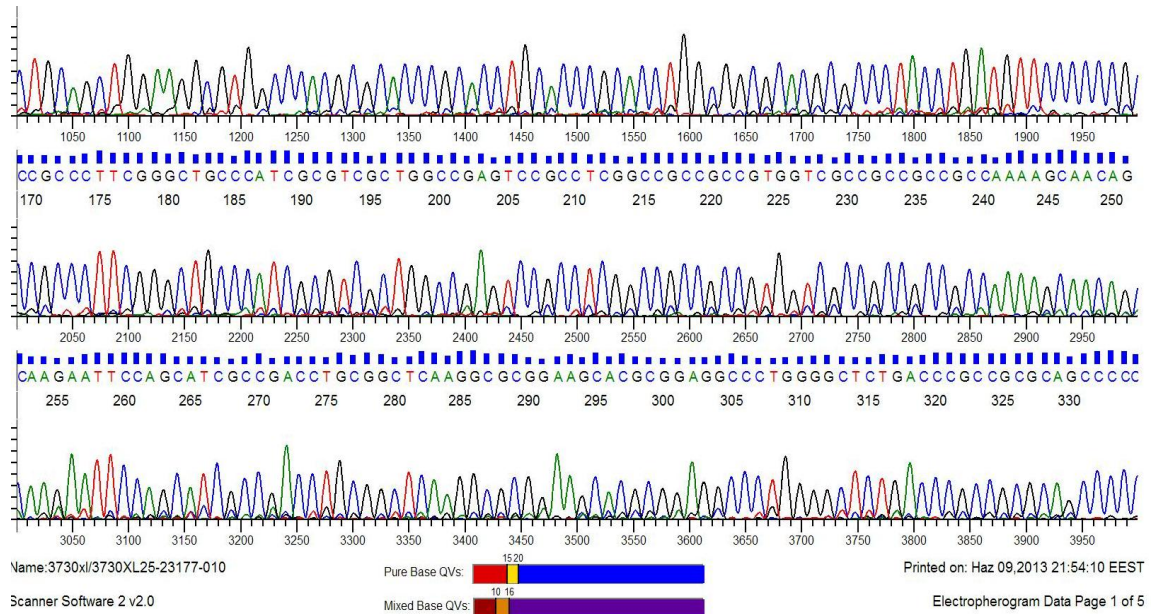
Resim 6. Ekzon 2'ye ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 14).



Resim 7. Ekzon 3'e ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 6).



Resim 8. Ekzon 4 ve 5'e ait örnek DNA dizi analizi sonucu (olgu 11).



Resim 9. Ekzon 6'ya ait örnek DNA dizi analizi görüntüsü (olgu 24).

5. TARTIŞMA

Boy uzaması, içinde genetik nedenler de olmak üzere birden çok faktörün etkisi altında olan bir durumdur (1-7,53-63, 96-110). Genetik faktörlerle ilişkili olarak pek çok genin/aday genin etkili olduğu bildirilmekle birlikte, kısa boylu olguların küçük bir grubunda, bu genlere ait mutasyonlar tanımlanabilmiştir (1, 3, 5, 96, 97). Bu genlerden biri de genotip-fenotip korelasyonu bakımından boy kısalığı ile ilgili olduğu düşünülen SHOX genidir (1-7, 55, 60, 61, 96-109). Daha çok idiyopatik boy kısalığı ile ilişkilendirilen bu genin mutasyonlarının vakaların 1/40-1/150'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (98-101). İdiyopatik boy kısalığından başka, SHOX geninin daha şiddetli klinik bulgularla seyreden Langer mesomelik displazi (LMD) ile de bağlantısı üzerinde çalışılmaktadır (1, 3, 5, 6,55, 62, 98). Her iki hastalıkta da aynı gen mutasyonu bulunmakla beraber klinik bulguları arasında farklılık olması, mutasyonun heterozigot veya homozigot olması ile, ve/veya modifiye edici genler gibi başka genetik etkenlerin bu iki klinik durum üzerindeki farklı etkilerinin olması ile açıklanmaya çalışılmaktadır (3, 5, 6,55, 62, 96, 98, 99). SHOX geni mutasyonlarının kısa boylu ilişkilendirilmesinin yanı sıra fazla ifadenmesinin de, Klinefelter sendromunda (47,XXY) olduğu gibi uzun ekstremiteye neden olabileceği düşünülmektedir (1, 96, 98, 105). Sonuç olarak SHOX geni ile boy uzaması arasında anlamlı bir ilişki olduğu, yapılan pek çok çalışma ile desteklenmektedir (1-7, 55, 60-62, 96-109).

SHOX gen mutasyonu olan hastaların büyük kısmı büyüme hormonu tedavisine cevap vermektedir (96, 98, 102). Yapılan çalışmalarda SHOX geni mutasyonuna bağlı İBK tanısı alan ve GH uyarı testleri normal olan (GH eksikliği

olmayan) olgularda puberte öncesi GH tedavisi ile iki yıl sonunda tedavi verilmeyen hasta grubuna oranla ortalama 6.2 cm boy kazanımı bildirilmiştir. Ancak LWS tanısı alan hastalarda önemli bir fark bulunamamıştır (102). O nedenle idiyopatik boy kısalığı olan hastalarda bu genin mutasyonunun araştırılması ve ilgili gende delesyon/mutasyon bulunduğu takdirde tedaviye başlanması bu hastaların prognozu açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu mutasyonların belirlenmesinde seçilen analiz yöntemi, hasta seçimindeki çalışmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri gibi farklı parametreler bu mutasyonun sıklığını oldukça değiştirmektedir (1-4, 62, 96, 99, 103, 107-109). Bu nedenle bu genin çalışmasında doğru algoritmaların izlenmesinin önemi büyüktür. SHOX geni mutasyonu araştırılmasında ilk aşama doğru hasta grubunun seçilmesidir. Bu amaçla çalışmalarda bazı farklı kriterler kullanılmakla beraber, hasta seçiminde sıklıkla kullanılan ortak kriterlerin olduğu göze çarpmaktadır (1-4, 96, 99, 103, 104, 107, 108). Bu kriterler, boyun -2 SDS'nin ya da 3 persentilin altında olması, iskelet sistemine ait bir bozukluk bulunmaması, rutin tetkiklerde ve muayenede başka organik ve kronik rahatsızlıklar tespit edilmemiş olması, görüntüleme yöntemleriyle kemik yaşı geriliği veya iskelet anomalileri tespit edilmemiş olması, büyüme hormonu ve tiroid hormonları gibi büyüme üzerine etkili hormonların normal olması, beslenme bozukluğu olmaması, karyotipin normal olması ve genetik sendrom olmamasıdır. Bu çalışmada ise doğru algoritmanın kullanılması amacıyla öncelikle iyi bir klinik muayene/değerlendirme ile bu kriterler titizlikle uygulanmıştır. Rappold ve ark. 2002 yılında yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızda da kullanılan (Tablo 4)

genel kriterlerin yanısıra, hastalarda gonadal disgenezi bulunmaması kriterini de eklemişlerdir (96). Aynı araştırmacıların 2007 yılında yaptıkları diğer bir çalışma da ise boyun kronolojik yaşının 3 persentilin altında olması ya da boyun 10 persentilin altında olması ile birlikte boy uzama hızının 25 persentilin altında olması ve erkeklerde kemik yaşının 10, kızarda 8'in altında olmasını işleme kriterlerine dahil etmişlerdir (1). Bizim çalışmamızda, Rappold ve ark. gibi kemik yaşı geriliği dışlanma kriteri olarak seçilmemekle beraber kontrol muayenesinde boy persentili normal aralıklara ulaşan hastalar çalışmadan çıkarılmıştır (1).

SHOX geni mutasyonlarının araştırılması ile ilgili tarama yöntemi olarak kesin bir başlangıç testi olmamakla birlikte ilk olarak konvansiyonel sitogenetik analizin yapılması önerilmektedir (3, 98). O nedenle karyotip analizi bizim çalışmamızda olduğu gibi pekçok çalışmada öncelikli dışlama ya da işleme kriteridir (2, 3, 96, 98, 103, 108). SHOX genine ait delesyonlar nokta mutasyonlarından daha sık olduğu için, sitogenetik analizi takiben karyotipi normal olan hastaların delesyon açısından değerlendirilmesi öncelikli bir durumdur (1-4, 96, 98, 99, 103, 107, 108). Bunun için kullanılan yöntemlerden biri, bu çalışmada da olduğu gibi FISH analizidir (1-3, 96, 98, 99, 103, 107). FISH analizi yerine, delesyonun gösterilmesi amacıyla farklı yöntemleri öneren çalışmalar da mevcuttur. Funari ve ark. Leri-Weil Diskondrosteozu (LWD) olan 8 olguda ve 36 orantısız idiyopatik boy kısalığı olan olguda Multipl Ligasyon Prob Amplifikasyonu (MLPA), FISH ve Mikrosatellit Marker (MSM) analizlerini karşılaştırmışlardır (104). Çalışmalarında MLPA ve MSM analiziyle delesyon tespit edilen bir olgunun FISH analizinin normal olduğunu, yine farklı bir hastada

da delesyonun sadece MLPA yöntemiyle tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu durumun FISH problemlerinin bazı içeriklerinin uzun olması nedeniyle küçük delesyonları tespit etmede yetersiz kalması sonucu olduğunu iddia etmişlerdir. FISH tekniğinin diğer dezavantajları olarak teknik çalışmanın uzun sürmesi, tecrübe gerektirmesi, uygulanabilirlik anlamında bazı zorluklarının olduğunu belirtmişlerdir. MSM analizinin en yaygın kullanılan metod olduğunu ancak bu yöntem ile SHOX geni gibi büyük genleri analiz edebilmek için çok sayıda belirteç kullanılmasının gerektiğini ve bunun da maliyeti artırdığını belirtmişlerdir. Diğer dezavantajları olarak küçük delesyonların analizinde yetersiz olması, bazı durumlarda belirteçlerin yeterince bilgi verici (informatif) olmaması ve nokta mutasyonları varlığında yanlış pozitif sonuç vermesi olarak saymışlardır. Bu yöntemlerle kıyaslandığında MLPA yönteminde belirlenen delesyonun MSM veya FISH yöntemiyle teyidi gerekse bile, daha az zaman alıcı ve küçük delesyonları tespit etmede daha duyarlı olduğu için SHOX gen analizi için başlangıç testi olarak MLPA yöntemini önermişlerdir (104). D'haene ve ark. yaptıkları çalışmada MLPA yöntemindeki yanlış pozitif durumlardan dolayı kontrol için ikinci bir test yapılmasının gerekliliğine vurgu yapmış ve alternatif bir test olarak güvenilir, kesin, maliyeti az bir test olarak kantitatif PZR yönteminin kullanılması önerilmişlerdir (105). Shanske ve ark. ise 2006 yılında yaptıkları çalışmada daha farklı bir yöntem olarak denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi (DHPLC) tekniğini kullanmışlardır (106). Alternatif teknikler var olmasına karşın pekçok çalışmada FISH yöntemi konvansiyonel sitogenetik analizi takiben delesyonların araştırılmasında en önemli tekniktir (1-3, 96, 103,

104, 107, 109). Bu çalışmada da laboratuvar koşullarımız ve analizdeki deneyimler gözönüne alınarak FISH tekniği delesyonların incelenmesi için tercih edilen uygulama olmuştur. Literatürde FISH tekniğinin SHOX gen delesyonunu saptama yüzdesi ile ilgili pekçok farklı rakam mevcuttur (2, 98, 103, 107, 108). Moirizio ve ark. bu çalışmadakine benzer işleme ve dışlama kriterleri uygulayarak ve sadece SHOX genine özgü prob kullanarak FISH yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada İBK tanısı alan, ortalama yaşları 12.2 olan 33 kız ve 23 erkek olmak üzere 56 olguyu incelemişlerdir. Bu 56 olgunun 3'ü kız olmak üzere 4'ünde (%7.1) SHOX geninin bir kopyasının delesyona uğradığını tespit edilmişlerdir. Bu çalışmada delesyon oranı diğer çalışmalara oranla yüksek bir orandır ve araştırmacılar bunun gerekçesini araştırmalarında sunmamışlardır (2, 98, 103, 107, 108). Musebeck ve ark.'nın 2001 yılında yaptıkları çalışmada ise İBK tanısı koydukları 35 hastada FISH analizi yapmış ve hiçbirinde delesyon saptayamamışlardır (107). Bizim çalışmamızda da Musebeck ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki hasta sayısına yakın bir sayıda hasta çalışılmıştır ve aynı şekilde delesyon saptanamamıştır. Binder ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada İBK tanısı alan olgularda SHOX mutasyonları tahmini sıklığının % 1-2 civarında olduğunu ve bunların yaklaşık % 80'inin komplet gen delesyonu olduğunu belirtmişlerdir (108). Çalışmamızın işleme ve dışlama kriterlerine uygun hasta sayısının az olması ve bütçesini sınırlı olmasından dolayı delesyonların tespiti için yeterli sayıda hasta çalışılması mümkün olamamıştır. Bu nedenle daha fazla sayıda hastada yapılacak çalışmaların sonuçlarının, daha bilgi verici olacağı düşünülmektedir.

SHOX geninde delesyon saptanamayan hastalarda izlenmesi gereken son basamak mutasyonların tesbitine yönelik olmalıdır (1, 3, 4, 96, 99, 103, 104, 108-110). SHOX geni mutasyonları tüm gen boyunca dağılım gösterdiği için, genin bilinen mutasyonların çalışılması yerine tüm nokta mutasyonların araştırılması ve bunun için de dizi analizinin yapılması daha bilgi verici olmaktadır (1, 3, 4, 103, 104, 109). Dizi analizinin yanı sıra SSCP (tek zincir yapısal polimorfizm) gibi alternatif bazı yöntemler kullanılmakla beraber tekniklerin duyarlılık yüzdelere bağlı olarak (SSCP yönteminin duyarlılığı % 65-80) mutasyonların tesbit yüzdeleri değişebilmektedir (3, 96, 103). O nedenle çalışmamızda proje bütçesine paralel olarak hastalara, nokta mutasyonu taraması için literatürdeki bu bilgiler göz önünde bulundurularak dizi analizi tekniğinin uygulanması tercih edilmiştir. Bu amaçla SHOX genini kodlayıcı ekzonları (2., 3., 4., 5., ve 6. ekzonlar) ve ekzon-intron birleşim yerlerindeki kesim bölgeleri PZR yöntemiyle çoğaltılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer metodoloji izleyen ve boy kısalığı tanısı almış olgularda SHOX geni ile ilgili yapılan en geniş kapsamlı çalışma, Rappold ve ark.'nın 2007 yılında 1608 olguyu MSM, FISH, DHPLC ve dizi analizi yöntemleriyle incelediği araştırmadır. Bu çalışmada, araştırmacılar olguların tamamını puberte öncesi çağda olan 14 farklı ülkeden seçmişlerdir. Yapılan araştırmada 1608 hastanın 16'sında nokta mutasyonu olmak üzere 68 (% 4.2) hastada SHOX geni mutasyonu tespit etmişlerdir. Araştırmalarındaki bu yüksek oranın SHOX geni mutasyonlarının çok daha yüksek yüzdeyle görüldüğü LWD'li olguların da çalışmada yer almasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. LWD'li olgular hariç tutulduğunda İBK olarak tanımlanabilecek hastalarda,

mutasyon yüzdesini % 2.2 olarak belirtmişlerdir. Bu yüzdenin benzer yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu, ancak farklı metodları kullanan çalışmalara göre bir miktar düşük bir yüzde olduğunu ifade etmişlerdir. Bu düşük yüzdenin nedeni olarak çalışmalarında SHOX genine ait sadece ekzonlardaki mutasyonların araştırıldığını, enhansır ve düzenleyici mutasyonlar ile intronlara ait kesim bölgesi mutasyonlarının çalışılmamasından dolayı bazı mutasyonları tespit edememiş olabileceklerini ifade etmişlerdir (1). Bizim çalışmamızda da araştırmaya dahil olma ve dışlanma kriterleri son derece detaylı olarak seçilmesine rağmen, hem hasta sayısının az olmasından dolayı hem de sınırlı bütçe kullanıldığı için bu araştırmadaki gibi kodlanan kısımların dizi analizi yapılabilmiş ama herhangi bir mutasyon tesbit edilememiştir. Bizim çalışmamızda Rappold ve arkadaşlarının geniş kapsamlı araştırmasından farklı olarak intronlara ait kesim bölgesi mutasyonları da araştırılmış ama bu bölgelerde de hastalardaki boy kısalığını açıklayabilecek herhangi bir mutasyon tesbit edilememiştir.

Türkiye’de yapılan bir araştırmada ise İBK tanısı almış 61 olgu incelenmiştir (109). Olguların tamamı Elazığ ili içerisinde yaşayan hastalardır ve İBK tanısı almış 61 hastanın yanısıra kontrol grubu ile beraber 100 toplam birey çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma grubunun 12’sini monozigotik, 6’sını dizigotik kardeşler ve 44’ünü kardeş çifti oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil etme kriterleri olarak monozigot kardeşler için; aralarında en az 5 cm boy farkı bulunan ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy ortalamasının altında kalmasını, dizigot kardeşler ve kardeş çiftleri için; cinsiyetlerinin aynı olmasını, aralarında en az 5 cm boy farkı bulunmasını ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy

ortalamasının altında kalmasını esas almışlardır. Çalışmaya tek başına alınan bireyler için, aynı cinsiyette kardeşleri olmamasını, boylarının aile ortalamaları ve bölge ortalamasının altında kalmasını esas almışlardır. Bu olgulardan sadece en kısa boya sahip olan 8 tanesini seçerek FISH tekniği ile SHOX genine ait delesyonları araştırmışlar ve normal bulmuşlardır. Olguların tamamında SHOX genine ait 2. ekzon PZR tekniği ile çoğaltılmış ve Rsa I ve Alu I enzimleri kullanılarak Y35X ile A337G mutasyonları araştırılmıştır. Yaptıkları analizler sonucunda bu çalışma da olduğu gibi olguların hiçbirisinde mutasyon tespit etmemişlerdir. SHOX genindeki mutasyonlar tüm gen boyunca dağılım gösterdiği için İKB olan hastalarda SHOX gen mutasyonları değerlendirilirken, bu gene ait tüm ekzonların incelenmesinin daha doğru sonuçlar vereceğini belirtmişlerdir. Ayrıca İKB olan hastalarda, SHOX geninin mutasyon sıklığının % 1 olmasından dolayı aynı bizim çalışmamız da olduğu gibi sınırlı sayıda hasta yerine daha fazla sayıda hasta incelemenin daha bilgi verici olacağını belirtmişlerdir (109). Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda hasta seçim kriterlerinde daha detaylı klinik değerlendirme yapılmış ve SHOX genine ait sadece 2. ekzon değil kodlanan tüm ekzonların dizi analizi yapılmış ve ayrıca ekzon-intron birleşim yerlerindeki olası mutasyonlar da araştırılmıştır.

Büyük delesyonların dahil edilmediği güncel SHOX geni mutasyonu veri tabanında 126'sı farklı allelik varyant olmak üzere toplam 199 intragenik mutasyon gösterilmiştir (6). Kontrol grubunda da gösterilen değişiklikler dışlandığında SHOX geni ile ilişkili hastalığa yol açan 185 mutasyon rapor edilmektedir. Bu mutasyonlara detaylı olarak bakıldığında 159'unun tek nükleotid

değişimi, 19'unun delesyon ve 7'sinin duplikasyon olduğu görülmektedir. Tek nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğunu (104; % 65.4) yanlış anlamlı, 33'ününü (%20.8) anlamsız mutasyonlar oluşturmaktadır (6). Tüm mutasyonlar göz önüne alındığında mutasyonların gen boyunca dağıldığı bu nedenle tüm genin dizileme yöntemiyle taranması gerektiği vurgulanmıştır (109). Bu nedenle çalışmamızda bütçe kısıtlamaları nedeniyle daha fazla hastada bir veya en fazla birkaç ekzonda tarama yapmak yerine, daha az hastada tüm ekzonların dizi analizinin yapılması daha uygun bulunmuştur. Bu nedenle 24 hastada nokta mutasyonlarının dışlanması için dizi analizi yapılmış ve SHOX genine ait ekzon bölgeleri ve intron-ekzon birleşim yerindeki kesim bölgelerini içeren bölgeler değerlendirilmiştir. Proje bütçesi ve teknik kısıtlamalar nedeniyle SHOX genine ait, uzunluk olarak ekzon dizilerinden çok daha büyük olan intron dizileri değerlendirilememiştir. Bu tip uzun dizileme gerektiren araştırmalar için yüksek maliyetli projelere ve çok daha gelişmiş dizileme yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızdaki otomatik dizileme analizi ile enhansır dizisi mutasyonları, düzenleyici mutasyonlar ve intron bölgesindeki mutasyonların değerlendirilmesi mümkün olamamıştır. Benzer sorunları Rappold ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir (1).

Çalışmamızda, ulaşılabilen ve proje bütçesinin el verdiği 24 hastanın dizi analizi yapıp herhangi bir delesyon/mutasyon tespit edilememiş olsa bile, İBK tanısı alan hastalarda SHOX geninin mutasyonunun sıklığını tespit etmek için daha geniş çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmada

herhangi bir mutasyon tespit edilmemesi İBK tanısı alan bireylerde SHOX mutasyon araştırılması gerekliliğini ortadan kaldırmamaktadır.

6.SONUÇ

Boy kısalığı toplumdaki her yüz çocuktan üçünü ilgilendiren, psikolojik ve sosyal sorunlara da neden olan bir durumdur. Bu nedenle, sebeplerinin tespit edilmesi ve bu çocukların boy kısalığı açısından izlenmesi gerekmektedir. Boy kısalığı açısından herhangi bir sebep bulunamayan ve bunun sonucunda İBK tanısı almış hastalarda % 2-14 arasında altta yatan neden olarak SHOX geni mutasyonları bildirilmektedir. Bu oranlar SHOX geni mutasyonlarının nadir olmadığının bir göstergesidir. SHOX geni mutasyonları sonucu oluşan boy kısalıklarının büyüme hormonundan fayda gördüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle İBK tanısı alan hastalarda SHOX geni mutasyonu araştırılması boy kısalığının tanı, tedavi ve prognozu açısından önemlidir.

Bu çalışmada İBK tanısı almış hastalarda SHOX geninin delesyonları ve bunu takiben de dizi analizi ile mutasyonları araştırılmıştır ve hiçbirisinde mutasyon tespit edilmemiştir. Bunun hasta seçim kriterleri ve seçilen metodların farklı olmasına bağlı bir durumdan kaynaklanıyor olması mümkündür. Bu nedenle elde ettiğimiz bu sonuç İBK tanısı alan hastalarda SHOX geni araştırılması gerekliliğini ortadan kaldırmamaktadır. İBK olgularında, SHOX geninde görülen mutasyonların görülme sıklığının % 2 -14 arasında değiştiği dikkate alındığında, daha fazla sayıda olgu incelenmesinin daha bilgi verici olacağı açıktır.

7. KAYNAKLAR

1. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007; 44: 306–313.
2. Morizio E, Stuppia L, Gatta V, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Verrotti A, Chiarelli F, Calabrese G, Palka G. Deletion of the SHOX gene in patients with short stature of unknown cause. *Am J Med Genet A* 2003; 119: 293–296.
3. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA et al. SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clinical Endocrinology* 2007; 66, 130–135
4. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 2006; 43: 735–739.
5. F. Lifshitz. *Pediatric Endocrinology* 5th ed. [Vol 2] - Informa Healthcare (USA); 2007.
6. Niesler B, Röth R, Wilke S, Fujimura F, Fischer C, Rappold GA. The Novel Human SHOX Allelic Variant Database. *Hum Mutat* 2007; 28(10):933
7. 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.

8. American Academy of Pediatrics Policy Statement-Committee on Practice and Ambulatory Medicine. Recommendations for preventive pediatric health care. *Pediatrics* 2000; 105: 645.
9. Hamilton WJ, Mossman HW. *Human Embryology; Prenatal Development of Form and Function*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1972: 1–646.
10. Sparks JW. Intrauterine growth and nutrition. In: Polin RA, Fox WN, eds. *Fetal and Neonatal Physiology*. 2nd. Philadelphia: WB Saunders, 1998: 267–289.
11. Underwood LE, VanWyk JJ. Normal and abnormal growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th ed. Philadelphia, 1992: 1079–1138.
12. Diamond FB. Fetal growth programs future health: causes and consequences of intrauterine growth retardation. In: Barnes LA, ed. *Adv Pediatr*. 2001; 48: 245–272.
13. Tanner JM. Normal growth and techniques of growth assessment. *Clin Endocrinol Metab NA* 1986; 15: 411–451.
14. Gluckman PD. Endocrine and nutritional regulation of prenatal growth. *Acta Pediatr Suppl* 1997; 423:153–157.
15. Guidice LC, de Zehger F, Gargosky SE, et al. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonates with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1548–1555.

16. Phillip M, Lazar L. The regulatory effect of hormones and growth factors on the pubertal growth spurt. *Endocrinologist* 2003; 13: 465–469.
17. Tanner JM, Goldstein H, Whitehouse RH. Standards for children's height at ages 2–9 years allowing for heights of parents. *Arch Dis Child* 1970; 45: 755–762.
18. Luo ZC, Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Target height as predicted by parental heights in a population-based study. *Pediatr Res* 1998; 44: 563–571.
19. Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G, Darendeliler F, Baş, F. (2008) Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51: 1-14.
20. Malkoç İ. Boy kısalıkları. *Van Tıp Dergisi*. 2006; 13 (2): 67-70.
21. Trowbridge FL, Marks JS, Lopez de Romana G, et al. Body composition of Peruvian children with short stature and high weight-for-height: implications for the interpretation of weight-for-height as an indicator of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 411–418.
22. Ogata T, Matsuo N, Nishimura G. SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *J Med Genet* 2001; 38: 1–6.
23. Beresma D. The National Foundation March Of Dimes. In: *Birth defects compendium*. 2nd ed. New York: Alan R. Liss, 1982:151–152.
24. Hall B, Spranger J. Hypochondroplasia: clinical and radiological aspects in 39 cases. *Radiology* 1979; 133: 95–100.

25. Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN, Palmert MR. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5581–5586.
26. Horner JM, Thorsson AV, Hinz RI. Growth deceleration patterns in children with constitutional short stature: an aid to diagnosis. *Pediatr* 1978; 62: 529–534.
27. Grimberg A, Kutikov JK, Cucchiara A. Sex differences in patients referred for evaluation of poor growth. *J Pediatr* 2005; 146: 212–216.
28. Vaquero-Solans C, Lifshitz F. Body weight progression and nutritional status of patients with familial short stature with and without constitutional delay in growth. *Am J Dis Child* 1991; 146:296–302.
29. Nandy S, Irving M, Gordon D, Subramanian SV, Smith GD. Poverty, child undernutrition and morbidity: new evidence from India. *Bull World Health Organ* 2005; 83: 210–216.
30. Bonamico M, Scire G, Mariani P, et al. Short stature as the primary manifestation of monosymptomatic celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 12–16.
31. Kanof ME, Lake AM, Bayless TM. Decreased height velocity in children and adolescents before the diagnosis of crohn's disease. *Gastroenterology* 1988; 95: 1523–1527.
32. Arpadi SM. Growth failure in children with HIV infection. *J AIDS* 2000; 25 (suppl 1):S37–S42.

33. Grimberg A, De Leon D. Disorders of growth. In: Moshang T Jr, ed. *Pediatr Endocrinol: The requisites in Pediatrics*. Philadelphia: Elsevier, Inc. 2005: 127–167.
34. MTA Cooperative Group. National Institute of Mental Health Multi-modal treatment study of ADHD followups: changes in effectiveness and growth after the end of treatment. *Pediatrics* 2004; 113:762–769.
35. Lifshitz F, Tarim O, Smith MM. Nutritional growth retardation. In: Lifshitz F, ed. *Pediatric Endocrinology*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996:103–120.
36. Lifshitz F, Tarim O. Nutritional dwarfing. *Curr Prob Pediatr* 1993; 23: 322–326.
37. Baschat AA. Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59:617–627.
38. Hadi H, Stoltzfus RJ, Dibley MJ, et al. Vitamin A supplementation selectively improves the linear growth of Indonesian preschool children: results from a randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 507–513.
39. Lifshitz F, Moses N. Nutritional dwarfing—growth, dieting and fear of obesity. *J Am Col Nutr* 1988; 7: 367–376.
40. Darendeliler, F. (2010) Boy kısalıkları, *Temel Pediatri*, Hasanoğlu, E, Düşünsel, R, Bideci, A. (editörler), Güneş Tıp Kitabevleri, Ayrıntı Basımevi, Ankara, s1214-1218.

41. Pernasetti F, Milner RD, al Ashwal AA, et al. Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven Middle Eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(6):2079–2083.
42. Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, et al. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 1998; 18(2):147–149.
43. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 1998; 19(2):125–133.
44. Bhangoo AP, Hunter CS, Savage JJ, et al. Novel LHX3 mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 4:4.
45. Godfrey K, Robinson S, Barker DJP, et al. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Br Med J* 1996; 312:410–414.
46. Luke S, Gillespie B, Min S-J, et al. Critical periods of maternal weight gain: effect on twin birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:1055–1062.
47. Stegmann BJ, Carey JC. TORCH infections, toxoplasmosis, other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), rubella, cytomegalovirus (CMV), and herpes infections. *Curr Womens Health Rep* 2002; 2:253–258.
48. Hediger MI, Overpeck MD, Maurer KR, et al. Growth of infants and young children born small or large for gestational age: findings from the third

- national health and nutrition examination survey. Arch Pediatr Adolesc Med 1998; 152:1225–1231.
49. Peralta-Carcelen M, Jackson DS, Goran MI, et al. Growth of adolescents who were born at extremely low birth weight without major disability. J Pediatr 2000; 136: 633–640.
50. Rimoin DL, Lachman RS. Genetic disorders of the osseous skeleton. In: Beighton P, ed. McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue. St. Louis: C.V. Mosby, 1992:557.
51. International Skeletal Dysplasia Society website :www.isds.ch.
52. Gohlke BC, Khadilkar VV, Skuse D, Stanhope R. Recognition of children with psychosocial short stature: a spectrum of presentation - Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. Volume 11, Issue 4, Pages 509–518.
53. Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, et al. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short stature child born with intrauterine growth retardation. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(8):4679–4687
54. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, et al. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. Growth Horm IGF Res, 2008;18: 89.
55. Rappold GA, Ross JL, Blaschke RJ, Blum WF. Understanding SHOX deficiency and its role in growth disorders. A reference guide. TMG Healthcare Communications Ltd, Oxfordshire, UK. 2002

56. Daire VC, Huber C, Munnich A. Allelic and nonallelic heterogeneity in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Am J Med Genet*, 2001;106: 272-274.
57. Ross JL, Bellus G, Scott CI, Abboudi J, Grigelioniene G, Zinn AR. Mesomelic and rhizomelic short stature: the phenotype of combined Leri-Weill Dyschondrosteosis and achondroplasia or hypochondroplasia. *Am J Med Genet*, 2003; 116A(1): 61-5.).
58. Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N. Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J. Med. Genet*, 1992;29, 455–459.
59. Ogata T, Yoshizawa A, Muroya K, Matsuo N, Fukushima Y, Yokaya S. Short stature in a girl with partial monosomy of the pseudoautosomal region distal to DXYS15: further evidence for the assignment of the critical region for a pseudoautosomal growth gene(s). *J Med Genet*, 1995;32: 831-834.
60. Ellison JW, Wardak Z, Young MF, et al. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet*. 1997;(8):1341–1347.
61. Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, et al. Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat*, 2005;26:44–52
62. Jones MC, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA The short stature

- homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*, 2000; 9(5): 695-702
63. Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JWG, Rappold GA Transcriptional and translational regulation of the Léri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*, 2003;278:47820-47826.
64. Doç. Dr. H.Ümit Lüleyap. Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi. 2008
65. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. ThompsonveThompson Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi, Ankara, 2005;445s.
66. Cancer, Genes and Inherited Predisposition Overview Cancer Genetics 1. Available from:URL:<http://www.genetics.com.au/factsheet/fs47.asp>
67. Debeleç-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006;35(2):149-170.
68. Strachan T, Read AP Human Molecular Genetics 2. John Wiley ve Sons Inc, New York, 1999;576s.
69. Waldeyer, W. Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch. Mikr. Anat.* 1888;32, 1.
70. Von Winiwarter H. Études sur la spermatogenèse humaine. I. Cellule de Sertoli. II. Hétérochromosome et mitoses de l'épithelium seminal. *Arch. Biol. (Liege)* 1912; 27, 91–189.

71. Painter TS Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. J. Exp. Zool. 1923;37, 291–336.
72. Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man. Hereditas 1956;42, 1–6.
73. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. Lancet I, 1960;790–793.
74. Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Cross VM, Wolff OH A new trisomic syndrome. LancetI, 1960;711–713.
75. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp. Cell Res. 1970;60, 315–319.
76. Caspersson T, Lomakka G, Zech L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes—distinguishing characters and variability. Hereditas 1971;67, 89–102.
77. Drets ME, Shaw MW Specific banding patterns in human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971;68,2073–2077.
78. http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom_analizi.
79. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A 1969;64:600-4.
80. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 1977;15;113:237- 51.
81. Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ

- hybridization of fluorochrome labelled RNA. *Exp. Cell Res.* 1980;128, 485-490.
82. Pinkel D, Gray J, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986;51, 151–157.
83. Mitelman F. (ed.) (1995) *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger, Basel.
84. American College of Medical Genetics website www.acmg.net.
85. *The Principles of Clinical Cytogenetics Second Edition* Edited by Steven L. Gersen, PhD AmeriPath Inc. And Martha B. Keagle, MEd University of Connecticut, Storrs, CT 2005.
86. Basaran N. FISH: Terorik ve Pratik Floresan *In Situ* Hibridizasyon. *Eskisehir: Gentam*;1996.
87. Mullis KB: The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Sci. Am.* 1990; 56-65.
88. Mullis KB, Faloona FA: Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction, *Methods. Enzymol.* 1987; 155, 335-350.
89. XU LZ, Larzul D: The polymerase Chain Reaction: Basic Methodology and Applications, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1991; 14 (3), 209-221.

90. Eisenstein BI: The Polymerase Chain Reaction, A New Method of Using Molecular Genetics of Medical Diagnosis, N. Engl. J. Med. 1990; 322(3), 178-183.
91. Taylor RG: Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automation in 'PCR, A Practical Approach ', (Mc Pherson MJ, Quirke P, Taylor, GR, ed) 1-14, IRL Press, Oxford, 1993.
92. Charleton SM: The Polymerase Chain Reaction: Application in Genomic Analysis, in 'Human Chromosomes, Principles and Techniques', (Verma RS, Babu A. 2nd ed.) Chap.11, 312-337, McGraw-Hill Press, USA, 1995.
93. Saiki RK, Gelfand DH, Stofel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GL, Mullis KB, Erlich HA: Primer – Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, Science, 1988;239, 487-491.
94. Gibbs RA: DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction, Anal. Chem. 62,1202-1214,1990.
95. Tom Strachan and Andrew P Read. Human Molecular Genetics, 2nd edition, New York: Wiley-Liss; 1999.
96. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, et al. Deletions of the Homeobox Gene SHOX (Short Stature Homeobox) Are an Important Cause of Growth Failure in Children with Short Stature. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1402–1406.
97. Binder G, Schwarze CP, Ranke MB. Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant humangrowth hormone. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:245–249.

98. Oliveira CS, Alves C. The role of the SHOX gene in the pathophysiology of Turner syndrome. *Endocrinol Nutr*, 2011;58, 433-442.
99. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. 1998. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19:67–69.
100. Leka SK, Kitsiou-Tzeli S, Kalpini-Mavrou A, Kanavakis E. Short stature and dysmorphology associated with defects in the SHOX gene. *Hormones (Athens)*, 2006;5, 107-118.
101. Marchini A, Rappold G, Schneider KU. SHOX at a glance: From gene to protein. *Arch Physiol Biochem*, 2007; 113, 116-123.
102. Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, Jung H, Cao D, Ross JL, et al. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007;92, 219-228.
103. Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, et al. SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet* 2003; 40:E11.
104. Funari MF, Jorge AA, Souza SC, Billerbeck AE, Arnhold IJ, et al. Usefulness of MLPA in the detection of SHOX deletions. *Eur J Med Genet*, 2010;53, 234-238.
105. D'haene B, Hellemans J, Craen M, De Schepper J, Devriendt K, Fryns JP, et al. Improved molecular diagnostics of idiopathic short stature and allied

disorders: Quantitative polymerase chain reaction-based copy number profiling of SHOX and pseudoautosomal region 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95, 3010-3018.

106. Shanske AL, Puri M, Marshall B, Saenger P. Unique deletion in exon 5 of SHOX gene in a patient with idiopathic short stature. *Horm Res*, 2006;67: 61-6.

107. Musebeck J, Mohnike K, Beye P, Tonnies H, Neitzel H, Schnabel D, et al. Stumm M. Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr*, 2001;160:561–565.

108. Binder G, Ranke MB, Martin DD. Auxology Is a Valuable Instrument for the Clinical Diagnosis of SHOX Haploinsufficiency in School-Age Children with Unexplained Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(10): 4891 - 4896.

109. Etem E, Kalkan S, Yüce H. (2008) Kısa Boyluluğu Etkileyen Genetik Faktörlerin İncelenmesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 22 (4).

8. ÖZET

İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan *in situ* Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri ile SHOX geninin araştırılması.

Boy uzamasını çevresel ve genetik faktörler birlikte etkilemektedir ve boy kısalığı bir bireyin boy uzunluğunun kendi yaş grubu içerisinde 3 persentilin altında olması ya da -2 SDS (Standart Deviasyon Skoru) değerinin altında olması olarak tanımlanır. Bu durumu açıklayacak herhangi bir genetik sendrom, eşlik eden major anomali, kronik veya sistemik hastalık, beslenme bozukluğu, psikososyal nedenler tespit edilmediği takdirde **idiyopatik boy kısalığı**ndan bahsedilir. İdiyopatik boy kısalığı olan bireylerde boy kısalığı ile ilişkili pek çok gen mutasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan birisi de son dönemde üzerinde daha fazla yoğunlaşılan X ve Y kromozomu üzerinde bulunan psödootozomal region (PAR1) olarak adlandırılan bölge üzerinde bulunan Short Stature Homeobox Gene (SHOX) genidir. Bu gen ile ilgili mutasyonların idiyopatik boy kısalığı olan hastaların %2 ila 14'ünün nedeni olduğu vurgulanmaktadır.

Bu proje ile ilk aşamada idiyopatik boy kısalığı olan 37 hastanın sitogenetik analizi yapılarak kromozomal anomaliler dışlanmış ve bunların tamamında FISH tekniği ile SHOX geninde delesyon olup olmadığı araştırılmıştır. FISH analizi normal olan ve DNA eldesi yapılabilen 24 hastada SHOX geninin 2., 3., 4., 5. ve 6. olmak üzere tüm ekzonlarının dizi analizi yapılmış ve normal olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak idiyopatik boy kısalığı olan hastalarda doğru algoritma izlenerek, FISH ve moleküler teknikler kullanılarak (dizi analizi) SHOX genine ait delesyon/mutasyon çalışmasının yapılması gerçekleştirilmiştir.

9. ABSTRACT

SHOX gene analysis with Fluoresant in situ Hybridization and sequence methods in idiopathic short stature patients

Height increase is affected by both genetic and enviromental factors and short stature is defined as height below 3 percantille or under -2 SD (Standart deviation skore) in the same age group. Short stature can be named as “idiopathic” if there are no accompanying major abnormalities or genetic syndromes, endocrine problems, chronic or systemic enfections, nutritional problems and psychosocial factors. There are many known gene mutations associated with idiopathic short stature. Short Stature Homeobox Gene (SHOX) located on X and Y chromosomes’ pseudootosomal regions (PAR 1) is one of the short stature genes which has been frequently mentioned recently and the mutations of SHOX gene are responsible for % 2-14 of idiopatic short stature cases.

In this project, firstly cytogenetic analyses of the 37 idiopathic short stature patients were performed and were revealed as normal karyotypes. SHOX gene deletion was screened by FISH technique and none of them had deletion. Finally the DNA isolations (24 of the 37 patients) and sequencing of the all coding exons (2nd to 6th) of the SHOX gene were performed and no mutation was detected. As a result in this study by using accurate algorithm, deletion/mutation of the SHOX gene was studied by FISH and DNA sequencing.

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: ABDULLATİF

Soyadı: BAKIR

Dogum Yeri ve Tarihi: Pasinler, 20.10.1985

Eğitimi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'de Araş. Gör. Dr.

2002 - 2008	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
1999 - 2002	Erzurum Fen Lisesi
1995- 1999	Erzurum Anadolu Lisesi
1994-1995	Palandöken İlköğretim Okulu
1990-1994	Karavelet Köyü İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluslar: Tıbbi Genetik Derneği

Katıldığı Kongre-Sempozyum-Seminerler:

1. Ayka Affymetrix microarray klinik uygulamalar semineri, Haziran, 2013
2. Nörometabolik Dismorfoloji Sempozyumu, Mart, 2013
3. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Aralık, 2010

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. A case of del(13)(q22) with chiari type III malformation, syndactyly and heart abnormalities.
2. Türk toplumunda JAK2 V617F mutasyonunun hematolojik hastalıklarla olan ilişkisinin araştırılması.

Katıldığı Kurslar:

1. I. Ulusal Fötal Prenatal ve Postmortem Tanı Kursu, Nisan, 2010, Ankara
2. Preimplantasyon genetik tanıda klinik ve laboratuvar yöntemler kursu, 9.Tıbbi Genetik Kongresi, Aralık, 2010, İstanbul

11.EKLER

EK-1:BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMLARI

ÇOCUK HASTALARDA “GENETİK MATERYALDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR” İÇİN “EBEVEYN” BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Değerli anne ve babalar;

Çocuğunuzun, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezimizde yapılması planlanan **“İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan *in situ* Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleriyle SHOX geninin araştırılması”** isimli bir çalışmada yer alabilmesi için sizden izin istiyoruz. Çocuğunuzun bu çalışmaya davet edilmesinin nedeni **boy kısalığının** mevcut olmasıdır. Bu çalışma, araştırma projesi olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Bu araştırmada çocuğunuza ait bazı bilgiler elde etmek istediğimiz için, izninizi almak amacı ile bu form hazırlanmıştır. Çocuğunuza ait bu bilgilerin, kimliği açıklanmamak kaydı ile bilimsel amaçla kullanımını onaylar iseniz bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi verilecek ve ondan da bu çalışmaya katılması için izin alınacaktır.

Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, çocuğumdan başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu çalışmanın amacı, çocuğunuzda saptanan **boy kısalığının** detaylı genetik araştırmasını yapmaktır ve ardından doğru bir genetik danışmanlık verebilmektir. Bu çalışma ile çocuğunuzdaki boy kısalığı ile ilgili olarak **gen** (göz rengi, ten rengi gibi tüm kalıtsal özelliklerimizi belirlemektedir) düzeyinde detaylı bilgi verme şansımız olabilecektir. Çalışmaya 100 hastanın katılması planlanmıştır.

Çocuğum bu çalışmaya katılırsa ne yapması gerekiyor?

Bu araştırma kapsamında çocuğunuza, tedavisi için yapılan rutin işlemlerin dışında herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Çalışma yalnızca, tedavisi sırasında zaten ondan alınacak olan kanda yürütülecektir. Çocuğunuzun bu çalışmada kalma süresi 2 yıl olarak düşünülmüştür.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

Çalışmanın, kan alma işlemine bağlı riskler haricinde herhangi bir riski bulunmamaktadır. Kan almaya bağlı riskler enfeksiyon ve tromboflebittir. Araştırmadan dolayı çocuğunuzun göreceği olası bir zararda bunun giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini taahhüt ederiz.

Muhtemel zarar durumunda bilgi için Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Araştırma Görevlisi Dr. Abdullatif Bakır ile görüşebilirsiniz.

Çocuğumun bu çalışmada yer almasının yararları nelerdir?

Boy kısalığının çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Bu çalışma ile çocuğunuzda, incelenmesi planlanan gen düzeyinde boy kısalığını açıklayabilecek bir değişikliğin olup olmadığını öğrenmiş olacaksınız. Bu durumun sonucuna göre de genetik danışmanlık alabileceksiniz.

Çocuğumun bu çalışmaya katılmasının maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çocuğumun kişisel bilgileri nasıl kullanılacak?

Çocuğunuz ile ilgili kişisel bilgiler, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanılacaktır ve çalışma sonuçları tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak çocuğunuzun kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, çocuğunuz ile ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır.

Çocuğumdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilecek mi?

Çocuğunuzdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar çocuğun ismi (kimlik bilgileri) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden çocuğunuz için uygun olduğunu düşündüğünüz bir tanesini işaretleyiniz.

1- ☐ Çocuğumdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2- ☐ Çocuğumdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

3- ☐ Çocuğumdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- ☐ Çocuğumdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Çocuğunuzdan alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve çocuğun kimlik bilgilerine yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece çocuğun kimlik bilgileri gizli tutulmuş olur.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

Adı-Soyadı: **Abdullatif Bakır**

Görevi : Araştırma Görevlisi Doktor

Telefon : 0 312 2024636

(Katılımcı çocuğun ebeveyninin beyanı)

GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim dalında, Dr. Abdullatif Bakır tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Çocuğumun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer çocuğumun çalışmaya katılmasını reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Çalışmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden çocuğumu araştırmadan çekebilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımızda; herhangi bir saatte, Dr.Abdullatif Bakır'ı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Beşevler, Ankara adresinden ve 0 312 2024636 telefon numarasından arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla, çocuğumun söz konusu klinik araştırmaya katılmasını gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının Adı-Soyadı, Ünvanı: **Arş. Gör. Dr. Abdullatif Bakır**

İmza:

**“GENETİK MATERYALDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR” DA YER
ALACAK “ÇOCUKLAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR
FORMU ÖRNEĞİ**

Sevgili

Adım **Dr. Abdullatif Bakır**, senin buradaki doktorun benim. Sen çok sevimli bir çocuksun, annenle baban senin boyunu bizlere danışmak için seni hastaneye getirmişler. Ben ve bazı başka doktorlar boy ile ilgili bir çalışma yapıyoruz. Eğer istersen sen de bu çalışmaya katılabilirsin. Biliyorsun, canını çok acıtmadan bazen senden hastanemizde kan almaları gerekiyor. Zaten çok az canın yansa da hemen geçiyor sanırım. Böyle kan alındığı bir günde senden bize de az miktarda kan getirmeni istiyoruz.

Getirdiğin kanda, boy ile ilgili çok güzel ve sana yararı olacak bir araştırma yapmayı planlıyoruz. Araştırmada bulduğumuz sonuçları başka doktorlarla senin yararın için konuşabiliriz ama merak etme senin adını ve bu sonuçları başka kimseye söylemeyeceğiz.

Bu araştırma konusunda annen ile babana da bilgi verip, onlardan da izin alacağız ama senin izin vermen de çok önemli! Bu konuyu onlarla konuşup öyle karar vermen daha kolay olabilir. Eğer bu çalışmaya katılmak istemezsen sakın endişe duyma, hiç kimse sana kızmaz veya küsmez. Buradaki doktorların yine sana aynı şekilde iyi davranıp, tedavini sürdüreceğinden emin olabilirsin.

Belki aklına bazı sorular takılabilir, şimdi veya daha sonra. O zaman aşağıda yazan telefondan lütfen beni arayıp kafana takılanları sor olur mu?

Yukarıda yazılanları okuduktan sonra, sen de bu araştırmanın içinde olmak istiyorsan lütfen aşağıya adını ve soyadını yazarak imzanı at olur mu? Bu kağıttan bir tane sen de alıp, istersen saklayabilirsin. Sana şimdiden çok teşekkür ediyorum.

Çocuğun adı- soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırma doktorun: Arş. Gör. Dr Abdullatif Bakır

İmza:

EK-2:ETİK KURUL RAPORU



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI



Sayı : B.30.2.GÜN.0.20 7521
Konu :

06.09/2011

Sayın Doç.Dr. Meral Y. Karaoguz
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13 Temmuz 2011 tarihinde yapmış
olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Aysun BİDECİ
Dekan Yardımcısı



GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurulu@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleriyle SHOX geninin araştırılması			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Meral YİRMİBEŞ KARAOĞUZ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐		
		DİĞER ☐	(Uzmanlık Tezi)		
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	☒	☒	İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL: (B.3) Genetik materyalle yapılacak araştırmalar	
			☐	İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	SIGORTA	☐			

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 285	Toplantı tarihi:13.07.2011
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Doç.Dr.Meral Yirmibeş Karaoguz'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Uzmanlık Tezi ve Genetik çalışma olan klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F.Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Alerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Katılmadı

Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E	H	E	H		
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI UYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F. Anest.ve Rea. A.D	K	E	H	E	H		
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ UYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F. Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E	H	E	H		
Prof.Dr.Seyhan ERSAN UYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F. (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya	K	E	H	E	H		Katılmadı
Prof.Dr.Sefer AYCAN UYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D	E	E	H	E	H		
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU UYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya A.D	E	E	H	E	H		
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA UYE	Radyoloji	G.Ü.T.F. Radyoloji A.D	K	E	H	E	H		
Prof.Dr.Galip GÜZ UYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D	E	E	H	E	H		
Prof.Dr.Aylar POYRAZ UYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Patoloji A.D	K	E	H	E	H		Katılmadı
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU UYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F. Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E	H	E	H		Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL UYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F. Adli Tıp A.D.	E	E	H	E	H		
Doç.Dr.Metin YILMAZ UYE	Kulak-Burun-Bogaz Hast.	Kulak-Burun-Bogaz Hast. A.D	E	E	H	E	H		
Huk.Müş.Adem GELİR UYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E	H	E	H		
Emine ŞEKER UYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E	H	E	H		

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

EK-3:BAP FORMU

Form-3

GAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ PROTOKOLU

Proje Kod No : 01/2012-26
Proje Yöneticisi : PROF.DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞU
Proje Adı : İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan in situ Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri ile SHOX geninin araştırılması

TARAFLAR

1. Resmi Gazete'nin 10.04.2002 tarih ve 24722 sayılı nüshasında yayınlanan 2547 sayılı Kanun'un 4684 sayılı Kanun'la değişik 58. maddesi gereğince kurulan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) İta Amiri **Prof. Dr. Hayri DUMAN** ile yukarıda Adı ve Soyadı yazılı Proje Yöneticisi **PROF.DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞU** arasında aşağıdaki şartlarla bir araştırma projesi protokolü yapılmıştır.

SÖZLEŞMENİN KONUSU

2. Bu sözleşmenin konusu, ekli araştırma projesi başvuru formunda ayrıntıları verilmiş olan projenin Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmesidir.

PROJE YÖNETİCİSİNİN GÖREVLERİ

3. Projenin Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hazırlama ve Değerlendirme Yönergesi'nde belirtilen esaslara bağlı kalarak protokole ekli araştırma projesi başvuru formunda belirtilen program içinde, protokoldeki süre, amaç ve şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

Desteklenmesi kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program, araştırmacılar ve bütçesinde Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.

Proje Yöneticisinin emekli olması veya Üniversiteden herhangi bir sebeple ayrılması halinde, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu proje yöneticilik görevini ilgili birimin (Bölüm, Yüksekokul veya Fakülte) önerisiyle proje personelinin birine veya bir başka öğretim üyesine verir.

ARAÇ, GEREÇ VE DONANIM

4. Yurt içinden veya yurt dışından temin edilerek projeye tahsis edilen sarf malzemesi dışındaki, demirbaş niteliğindeki her türlü teçhizat Gazi Üniversitesi'nin malı olup ayniyat kaydına müteakip ilgili birimin ayniyat mutemedine zimmetlenir.

RAPORLAR

5. Proje Yöneticisi projenin yürürlükte olduğu yılların **30 Haziran ve 31 Aralık** tarihlerine kadar proje çalışmalarının gidişi ve proje harcama durumlarıyla ilgili altı aylık dönemlerde birer gelişme raporunu ve ayrıca istenildiğinde projeye ilişkin ayrıntılı bilgileri ilgili birimin Uzmanlar Grubuna vermekle yükümlüdür.

6. BAP Komisyonunun gerekli görmesi halinde, BAP Komisyonu Başkanı projeye ilgili çalışmaları yerinde inceleyebilir veya inceletebilir. Bu durumlarda proje yöneticisi projeye ilgili her türlü teknik, idari ve mali bilgileri ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla yükümlüdür.

7. Proje yöneticisi projenin sona ermesini izleyen **4 ay içerisinde** Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hazırlama ve Değerlendirme Yönergesi'nin 13. maddesinde belirtilen esaslar dahilinde hazırlanacak, tüm araştırma sonuçlarını içeren Kesin Raporu, ayrıca araştırma devam ederken bilimsel toplantılara sunulan bildiri metinleri ile varsa ara yayınların birer örneğini de ilgili birimin Uzmanlar Grubuna vermekle yükümlüdür

Proje kapsamında yapılacak yayınlarda çalışmanın Gazi Üniversitesi tarafından desteklendiğinin açık bir şekilde belirtilmesi zorunludur.

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

8. Proje yöneticisi, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından gerekli her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından ve etik kurallarının uygulanmasından sorumludur.

Klinik veya canlı hayvan türleri üzerinde uygulanacak deneysel çalışmalarda ilgili Etik Kurul(lar)dan onay alınması zorunludur. Bu konuda tüm sorumluluk proje yöneticisine aittir.

GİZLİLİK

9. Proje yöneticisi, projeye ilgili olarak elde edilecek bilgilerin gizliliğinin korunması bakımından Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na karşı sorumludur. Ulusal güvenlik, milli ekonomi ve ülke çıkarları aleyhine kullanılabilecek proje sonuçları üzerinde proje yöneticisi ve yardımcı araştırmacılar tarafından haber ya da beyanat verilemez ve yayın yapılamaz.

MUTEMET ELİ İLE HARCAMALAR

10. Harcamalar ilgili birimlerin (Fakülte/Y.Okul) avans ve kredi işlemleri için görevlendirilen mutemetler tarafından alınacak avanstaki kanıtlayıcı evrak karşılığı yapılır. Verilen bu avansın usulüne uygun olarak mahsubu yapılmadan yeniden avans verilmez.

PATENT HAKLARI

11. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmek suretiyle ele alınan bir projenin sonucunda 17.07.1963 tarih ve 278 sayılı Kanun'un 2/a maddesine göre bir iktisadî meydana gelmesi halinde, bu iktisadî Kanun'un 21. maddesi uyarınca Gazi Üniversitesi'ne ait olacaktır. Ancak Gazi Üniversitesi bu iktisadî dolaylı usulüne uygun olarak istihsal edineceği patenti satma yahut kiralama yolu ile elde edeceği bedel veya kiranın %30'unu iktisadî yapana veya yapanlara verecektir.

Bilgisayarlarla ilgili araştırmalarda yazılan programlar CD veya disketleri ile teslim edilir.

DESTEK MİKTARI

12. Projeye, ayrıntıları protokolda ekli, araştırma projesi öneri formunda belirtilen ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen toplam **10.971 TL** destek sağlanacak olup, bu destek bütçenin serbest bırakıldığı oranda kullanılabilecektir.

ÖDEMENİN KESİLMESİ, HARCAMALARIN GERİ ALINMASI VE TAZMİNAT

13. Protokol gereğince yapılan ödemelerin, protokol şartlarına uygun olarak kullanılmadığının gelişme raporlarındaki ayrıntılı bilgilerden veya yapılan incelemelerden anlaşılması, proje gelişme raporlarının öngörülen tarihlere verilmemesi veya proje yöneticisinin Gazi Üniversitesinden ayrılması hallerinde başkaca bir uyarıya gerek kalmadan

protokol gereğince yapılan ödemeler her zaman durdurulabilir. Başka talepler saklı kalmak üzere verilmiş araç, gereç ve donanım derhal geri alınır ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından gerekli görüldüğü takdirde, proje başka bir araştırmacıya veya araştırma grubuna verilebilir. Projenin bu yolla sonuçlanması ile sağlanacak yararlardan proje ile ilişkisi kesilenler hiçbir hak talep edemezler.

Projenin durdurulması veya yönetmelik ve yasal gereklerin yerine getirilmeden bırakılması halinde, proje yöneticisi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından proje kapsamında yapılan yolluk, hizmet alımı ve tüketim malzemesi harcamalarını, uygulamada bulunan yasal faizi ile birlikte Bilimsel Araştırma Projelerine geri ödemekle yükümlüdür. Bu durumda desteklenen proje iptal edilmiş ve protokol feshedilmiş sayılacaktır.

YÜRÜRLÜK SÜRESİ

14. Bu protokol 21.06.2012 tarihinden 20.06.2013 tarihine kadar yürürlüktedir.

PROTOKOL SÜRESİNİN UZATILMASI

15. Protokol süresinin uzatılması; proje yöneticisi tarafından protokol süresinin bitimi tarihinden en az 1 (bir) ay önce ilgili Uzmanlar Grubu'na teklif edilmesi ve Uzmanlar Grubu'ndan alınacak olumlu görüşün Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nca uygun görülmesine bağlıdır.

Ek süre 1 (bir) yılı, ek ödenek ise proje toplamı bütçesinin % 50'sini geçemez.

YETKİLİ MERCİ

16. Anlaşmazlık halinde yetkili merci, Ankara Mahkemeleri ve İcra Daireleridir.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Adına

Prof. Dr. Hayri DUMAN
Rektör Yardımcısı

PROJE YÖNETİCİSİ

PROF.DR. MERA KIRIMBEŞ KARAOĞU

EK-4:TEZ SINAV TUTANAĞI



T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

Tıp Fakültesi Dekanlığı

Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı : 40329292/137

04/09/2013

Konu :

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Anabilim Dalımızın 06/08/2013 tarih ve 130 sayılı akademik kurul kararı ile daha önce tarafınıza bildirildiği yer ve tarihte Uzmanlık öğrencisi Dr.Abdullatif Bakır' ın tez savunma sınavının 3 üyeden oluşan tez jürisi kurulmuş ve tez sınav tutanağı ekte sunulmuştur.

Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Başkanı

EK1-Tez sınav tutanağı

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

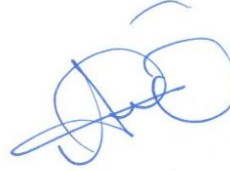
04/09/2013

Adı ve Soyadı	Abdullatif Bakır
Baba Adı	Muhammet Dursun
Doğum Yeri/Tarihi	Erzurum/Pasinler / 20.10.1985
Diploma Tarihi/Diploma No	31.07.2008 / 3794
Mezun Olduğu Fakülte	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay: 10
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "İdiyopatik boy kısalığı olan hastalarda Floresan İn Situ Hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri ile SHOX geninin araştırılması"

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:



BAŞKAN

Prof. Dr. E. Ferda Perçin

ÜYE

Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz

ÜYE

Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün