

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

(UZMANLIK TEZİ)

**NON SENDROMİK MENTAL RETARDASYONLU
HASTALARIN SUBTELOMERİK MLPA İLE
İNCELENMESİ**

DR. SARENUR BAŞARAN YILMAZ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. MEHMET SEVEN

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL- 2011

BEYAN

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

Dr. Sarenur Başaran Yılmaz

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14947

İTİHAF

En büyük şansım Şime,

Beni merhamet, hayat ve kendimle tanıştıran oğluma,

Girdiğim her yolda yanıbaşımda yer alan anneme,

Gösterdiği hedeflerle ufkumu genişleten babama,

Hayatımın eğlenceli sayfalarını paylaştığım kardeşlerime,

Ve kendime...

TEŞEKKÜRLER

Tez danışmanlığımı üstlenen ve her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Sn Doç. Dr. Mehmet SEVEN'e,

Uzmanlık eğitimimde kendisiyle birlikte çalışmış olmayı şans olarak gördüğüm çok sevdiğim hocam Sn. Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ'e,

Uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan Sn. Prof. Dr. Adnan YÜKSEL, Sn.Yrd. Doç. Dr. Gülgün S. GÜVEN, Sn. Doç. Dr. Hakan ULUCAN, Sn Doç. Dr. Ayhan DEVİREN, Sn Prof. Dr. Uğur ÖZBEK'e, birlikte çalıştığımız Uz. Dr. Elif YOSUNKAYA'ya

Uzmanlık eğitimimin ilk günlerinde tecrübelerinden faydalandığım Sn. Uzm. Dr. Müjde ARAPOĞLU'na,

Güzel ve sıkıntılı günleri birlikte paylaştığımız asistan arkadaşlarım Dr. Elif GÜLEÇ, Dr. Gözde YEŞİL, Dr. Ender KARACA, Dr. Hatip AYDIN, Dr. Alper GEZDİRİCİ, Dr. Asuman-Erkan KOPARIR'a,

En karmaşık işleri kolaylıkla düzene koyan, varlığı bize rahat nefes aldırان hemşiremiz Aysun AYAZ SARI'ya,

Laboratuvar arkadaşlarım Bülent BAĞLAMA, Zeliha ÖZCAN, İbrahim BAYRAK, Elif ÖZDAMAR, Emir KERESTECİLER, Bahadır BATAR, Seda SALMAN, Asiye K. DEMİRTAŞ, İlknur SÜER, Esra GÜZEL, Ayşe EMEK, Ali GÖKGÖZ, Abdullah ÇELEBİ, Özlem Y. DEMİREL, Aslı TATLILIK ve bölümümüz çalışanları Sibel KOÇ, Şaban ÇÖRKUŞ, Şenay SAYIN'a,

Anabilimdalımızın olanaklarını geliştirmek için her türlü imkanını bizimle paylaşan Anabilimdalı Başkanımız Sn. Doç. Dr. Mustafa ÖZEN'e

Ve hep yanımda olan kocaman aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Zeka	5
2.2. Mental Retardasyon	5
2.2.1. Mental Retardasyon Sınıflaması	6
2.2.1.1. Hafif Mental Retardasyon	6
2.2.1.2. Orta Mental Retardasyon	6
2.2.1.3. Ağır Mental Retardasyon	6
2.2.1.4. Çok Ağır Mental Retardasyon	6
2.2.2. Mental Retardasyon Etyolojisi	7
2.2.2.1. Çevresel Nedenler	8
2.2.2.1.1. Prenatal Nedenler	8
2.2.2.1.2. Perinatal ve Postnatal Nedenler	8
2.2.2.2. Genetik Nedenler	9
2.2.2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri	9
2.2.2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri	9
2.2.2.2.3. Tek Gen Mutasyonları ile İlişkili Mental Retardasyonlar	10
2.2.2.2.3.1. Otozomal Kalıtımla Geçen Mental Retardasyonlar	10
2.2.2.2.3.2. X'e Bağlı Geçiş Gösteren Mental Retardasyonlar	11

2.2.3. Mental Retardasyonlu Hastanın Değerlendirilmesi	16
2.2.3.1. Klinik Genetik İnceleme	16
2.2.3.2. Nörolojik inceleme	18
2.2.3.3. Laboratuvar İncelemeleri	18
2.3. Subtelomerik Bölgeler	21
2.3.1. Subtelomeric Florasan In Situ Hybridisation (FISH)	23
2.3.2. Array-Comperative Genomic Hybridisation (array-CGH)	23
2.3.3. Subtelomeric Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)	23
2.3.4. Subtelomerik Yeniden Düzenlenmelerin Araştırılmasında MLPA Yönteminin Uygulanması	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Gereç (Hastalar)	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	35
3.2.2. DNA izolasyonu	36
3.2.3. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	37
3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P070 Prob Miks İle Hibridizasyonu	37
3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu	37
3.2.3.3. PZR	37
3.2.3.4. PZR ürünlerinin ABI 310 Genetic Analyzer Cihazına Yüklenmesi ve Analizi	38
3.2.3.5. Değerlendirme	38

4. BULGULAR	40
4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuvar Bulguları	41
4.2. MLPA Bulguları	46
5. TARTIŞMA	52
5.1. Subtelomerik Değişikliklerin Sebep Olduğu Mental Retardasyonun Tanısında MLPA Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları	53
5.2. FBXO25 Prob Bölgesinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri	56
5.3. PPAP2C Prob Bölgesinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri	61
5.4. Nonsendromik Mental Retardasyon ve Subtelomerik Bölgeler	64
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	68

TABLolar:

Tablo 1: Bazı mental retardasyon sendromlarında ipucu olabilecek önemli davranış fenotipleri	17
Tablo 2: MLPA SALSA P070 subtelomerik Kiti Prob Bölgeleri	29
Tablo 3: Hastaların yaş, cinsiyet ve ailede akraba evliliği durumu	43
Tablo 4: Hastaların karyotip, beyin MR görüntülemesi ve metabolik testlerinin sonuçları ile MR hikayesi	44
Tablo 5: Hastaların prenatal ve postnatal hikayesi ile fizik muayene bulguları	45
Tablo 6: MLPA ile ksd saptanan hastalar, prob bölgeleri ve hibridize oldukları lokalizasyonlar	46
Tablo 7: DECIPHER v5.1 veri tabanında <i>Fbxo25</i> 'i de içeren bölgelerde meydana gelen KSD bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikleri	59
Tablo 8: DECIPHER v5.1 veri tabanında <i>Ppap2c</i> 'yi de içeren bölgelerde meydana gelen KSD bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikleri	62

ŞEKİL ve RESİMLER:

Şekil 1: Mental retardasyon etyolojik dağılımı ve sıklıkları	7
Şekil 2: X kromozomunda tanımlanan MR ile ilişkilendirilmiş genler	15
Şekil 3: Telomer bölgesinin kromozomal yerleşiminin şematik gösterimi	22
Şekil 4: MLPA yönteminin temel işleyiş algoritması	24
Şekil 5: Çoğaltılan MLPA problemlerinin kapiller elektroforezde yürütülmesi ile elde edilen pikler ve büyüklükleri	25
Şekil 6: Sentromer, telomerik ve subtelomerik bölgelerin şematik görünümü	32
Şekil 7: M-11 numaralı hasta ve kontrol örneğine ait karşılaştırmalı MLPA analiz sonuçları	48
Şekil 8: M-16 numaralı hasta ve kontrol örneğine ait karşılaştırmalı MLPA analiz sonuçları	49
Şekil 9: M-21 numaralı hasta ve kontrol örneğine ait karşılaştırmalı MLPA analiz sonuçları	50
Şekil 10: <i>Ppap2c</i> 'nin 19. Kromozom lokalizasyonunun şematik gösterimi	51
Şekil 11: <i>Fbxo25</i> 'in 8. Kromozom lokalizasyonunun şematik gösterimi	51
Şekil 12: DECIPHER veri tabanında <i>Fbxo25</i> 'in de yer aldığı 8p23.3 bölgesindeki kopya sayısı değişiklikleri	60
Şekil 13: DECIPHER veri tabanında <i>Ppap2c</i> 'nin de yer aldığı 19p13.3 bölgesindeki kopya sayısı değişiklikleri	63
Şekil 14: Mental Reatransyon ile ilgili DECIPHER veri tabanında bildirilmiş kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlar üstünde gösterimi	66
Resim 1: Frajil X kromozomunun ışık mikroskobu ile ve elektron mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri	13

SEMBOLLER VE KISALTMALAR:

aCGHArray- Comparative Genomic Hybridisation
ASDAtrial Septal Defekt
BçBaz çifti
BTBilgisayarlı Tomografi
CDC34Cell Division Cycle 34 geni
CGHComparative Genomic Hybridisation
DDDNA Denaturation
DNADeoksiribo Nukleik Asit
DQDNA Quantity
DSM IVDiagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
FASFetal Alkol Sendromu
FBX025F-Box Only Protein 25 geni
FISHFloresan In Situ Hybridisation
GGGelişme Geriliği
HİEHipoksik İskemik Ensefalopati
HRBHigh Resolution Banding
IQIntelligence Quotient
KbKilobaz
KsdKopya Sayısı Değişikliği
MAPHMultiplex Amplifiable Probe Hybridisation
MbMegabaz

MKA	Multipl Konjenital Anomali
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
MR	Mental Retardasyon
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
ng	Nanogram
NSMR	Nonsendromik Mental Retardasyon
nt	Nükleotid
PAR	Pseudo Autosomal Region
POY	Prematur Overyan Yetersizlik
PPAP2C	Phosphatidic acid phosphatase type 2c
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rcf	Relative Santifruge Force
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
USG	Ultrasonografi
µl	Mikrolitre
ZK	Zeka Katsayısı

ÖZET

Yılmaz SB. Nonsendromik Mental Retardasyonlu Hastaların Subtelomerik MLPA ile Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2011.

Toplumun yaklaşık % 1-3'ünü etkileyen Mental retardasyon (MR), değişik etyolojilere bağlı olarak birçok sendromda ve farklı klinik ekspresyonlarda ortaya çıkabilir. Nöron hücreleri bir akson ile çok sayıda dendritik uzantıdan oluşur ve birbirleriyle yaptıkları sinaptik bileşkeler aracılığıyla nöronal ağı meydana getirirler. Zekanın bu nöron ağındaki plastisite ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tüm bu yapıların işleyişi ve yapılanmasında gerekli faktörlerin ekspresyonundan sorumlu genlerde meydana gelebilecek genetik hatalar mental retardasyona neden olabilir.

Subtelomerik bölgeler gen içeriği açısından oldukça zengin bölgeler olup, kromozomal eşleşmenin bu bölgelerden başlaması nedeniyle anomali gelişimine daha açıktır. Patolojik kromozomal yeniden düzenlenmeler, diğer kromozom kısımlarına nazaran buralarda sıklıkla meydana gelir. Bu sebeple nonsendromik ve sendromik mental retardasyon olgularında subtelomerik bölgelere yönelik ileri inceleme yöntemleri geliştirilmiştir.

Subtelomerik bölge değişiklikleri daha önce çoklu konjenital anomali ve/veya mental retardasyonlu hastalarda çalışılmış ve değişik hasta gruplarında yaklaşık % 4-10 arasında mental retardasyon ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Gen içeriği zengin subtelomerik bölgeler nöronal morfogenezin ve zekanın normal embriyonik gelişiminden sorumlu genlerin de yoğun olarak yer aldığı bölgeler olarak düşünülmektedir. Bu çalışmayı düzenlememizin amacı, patolojik değişikliklerin nisbeten

sıklıkla saptandığı subtelomerik bölgelerin toplum için önemli bir hastalık olan nonsendromik mental retardasyonlu hastalarda değerlendirilmesidir. Bu düşünceyle nonsendromik mental retardasyon hastalarında olası subtelomerik yeniden düzenlenmelerin saptanması hedeflenmiştir. Diğer yandan nonsendromik mental retardasyon hastalarında saptanacak subtelomerik değişikliklerin olduğu bölgelerin haritalanması yeni aday genlerin belirlenmesine de önemli katkılar sağlayabilecektir.

Kromozom analizleri yapılmış ve sayısal-yapısal herhangi bir anomali saptanmamış 3-23 yaş aralığındaki nonsendromik mental retardasyonlu 29 hastadan elde edilen DNA'ların subtelomerik bölgeleri, MLPA insan telomer test kitleri aracılığı ile kopya sayısı değişiklikleri açısından değerlendirildi. Hastalarımızdan 5'inin MLPA sonuçları uygun olmadığından değerlendirme dışında bırakıldı. Hastalarımızın 3 tanesinde kopya sayısı değişikliği belirlendi. Bu değişiklikler 2 hastamızda *Fbxo25* prob bölgesinde azalma, 1 hastamızda *Ppap2c* prob bölgesinde artma şeklindeydi. Nonsendromik mental retardasyonlu hastalarımızda subtelomerik değişiklik oranı % 12.5 (3/24) olarak belirlendi.

Sonuç olarak nonsendromik mental retardasyonlu hastalarda Anabilim Dalımızda ilk kez uygulanan MLPA yöntemiyle subtelomerik kopya sayısı değişiklikleri belirlenmesinin duyarlı, ucuz, hızlı ve güvenilir olması nedeniyle klinikte daha fazla kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nonsendromik mental retardasyon, Subtelomerik bölgeler, MLPA

ABSTRACT

Yılmaz SB. Subtelomeric MLPA Analysis of the Patients with Nonsyndromic Mental Retardation. Istanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Medical Genetics. Istanbul. Specialization in Medicine Thesis. 2011.

Mental retardation, affecting 1-3 % of the population, may be present in many syndromes and variable clinical expression through different etiological reasons. Neuronal cells are composed of an axonal body and many dendritic branches. The neurons come together to constitute the neuronal network. Mentality is thought to be closely associated with neuronal plasticity. The genetic abnormalities of structure and processing of all these mechanisms may result in mental retardation.

Subtelomeric regions are wealthy for gene content. Also chromosomal coupling takes start on subtelomeric region. Thus these regions are more susceptible to abnormalities giving rise to mental retardation and subtelomeric analyses are being more important day to day in patients with syndromic or nonsyndromic mental retardation.

The copy number changes of subtelomeric regions had been searched in multiple congenital anomaly and/or mental retardation groups before and the detection ratio of subtelomeric anomalies is changing between 4-10 % in different study groups.

Subtelomeric regions are wealthy for genes that account for normal neuronal morphogenesis and normal embryologic development of mentality. We aimed to search an association between nonsyndromic mental retardation and subtelomeric rearrangements. Also

mapping the subtelomeric rearrangements in nonsyndromic mental retardation patients may contribute identifying the candidate genes.

29 patients aging from 3-23 year-old with normal karyotype were included to study. MLPA analyses were performed with DNA samples to assay the subtelomeric regions.

We found copy number alteration in 3 of our patients, 2 of them were decrease of *Fbxo25* probe array region and 1 of them was an increase of *Ppap2c* probe array region. The results of 5 patients were not suitable for assessment. As a result we detected the ratio of subtelomeric copy number alteration in nonsyndromic patients as 12.5 % (3/24). Also we searched the literature for a possible association between copy number alterations of FBXO25 and PPAP2C probe array regions and mental retardation.

As a result this was the first MLPA method application in NSMR patients of our unit to detect subtelomeric copy number changes. It is thought MLPA is a sensitive and rapid method so that it can be used for the other patient groups, too.

Keywords: Nonsyndromic mental retardation, Subtelomeric regions, MLPA

GİRİŞ VE AMAÇ

Mental retardasyon (MR) değişik etyolojilere bağlı olarak birçok sendromda ve farklı klinik ekspresyonlarda görülebilir. Toplumun yaklaşık % 1-3'n etkilediği düşünülmektedir. DSM-IV kriterlerine göre mental retardasyon tanısı için 3 kriter gereklidir. Bu kriterler mental retardasyonun 18 yaşından önce tespit edilmiş olması, zeka katsayısının (ZK) 70'in altında olması, bilişsel becerilerden (iletişim, öz bakım, ev hayatı, toplumun sağladığı olanakları kullanma, bağımsız iş yapabilme, sağlık ve güvenliği ile ilgili konularda farkındalık duyma) en az ikisinde yetersiz kalma şeklinde belirlenmiştir (1).

Nöron hücreleri bir akson ve çok sayıda dendritik uzantıdan oluşup, birbirleriyle yaptıkları sinaptik bileşkeler aracılığıyla nöronal ağı meydana getirirler. Zekanın bu nöron ağındaki plastisite ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (2). Tüm bu yapıların işleyişi ve yapılanmasında gerekli faktörlerin ekspresyonundan sorumlu genlerde meydana gelebilecek genetik hatalar mental retardasyona neden olabilir (3).

Bugüne kadar çok sayıda kromozomal yeniden düzenlenme ve tek gen anomalilerinin mental retardasyon hastalarında tespit edildiği bildirilmiştir (4-7). Zeka ile yakından ilişkili nöronal ağın doğru gelişmesi için gerekli olan yolda çok sayıda genin görevli olması MR'daki genetik heterojeniteyi açıklamaktadır. Nöronal gelişim sürecinde görevli genetik mekanizmalarda meydana gelebilecek hatalar mental retardasyonun yanı sıra merkezi sinir sisteminde yapısal malformasyonlar ve hatta diğer sistemleri de ilgilendirebilecek malformasyonlara da sebep olabilir (8).

Subtelomerik bölgeler gen içeriği açısından oldukça zengin bölgeler olmasının yanında kromozomal eşleşme de bu bölgelerden başladığı için anomali gelişimine daha açık bölgelerdir. Bu nedenle mental retardasyon olgularında subtelomerik bölgelere yönelik ileri inceleme yöntemleri son zamanlarda önem kazanmaktadır (9,10).

Subtelomerik yeniden düzenlenmelerin klasik sitogenetik yöntemlerle yakalanması oldukça zordur. Bazı sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler (fluorescent in situ hybridization (FISH), multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) ve array comparative genomic hybridization (aCGH)) subtelomerik değişiklikleri saptamak amacıyla kullanılabilir.

Bahsedilen yöntemler kullanılarak bugüne kadar sendromik mental retardasyonlu (SMR) ve multipl konjenital anomalili (MKA) hastalarda subtelomerik yeniden düzenlenmeler araştırılmış ve subtelomerik değişiklik oranının bu hasta gruplarıyla yapılan farklı çalışmalarda ortalama değerlerinin % 3-5 arasında değiştiği görülmüştür (11-18). Bu yöntemlerle subtelomerik değişiklikler saptanmış fakat sorumlu genler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple tespit edilen kritik bölgelerde aday gen araştırmaları birçok grup tarafından sürdürülmektedir (19, 20).

Birden çok hastanın aynı anda değerlendirmesine olanak veren nispeten hızlı, kolay ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle çalışmamızda MLPA yöntemini tercih ettik. Günümüze kadar MR'li hastalardan oluşan farklı çalışma gruplarında MLPA yöntemiyle subtelomerik değişiklikler incelenmiş ve % 2.9- % 13 arasında değişen oranlarda subtelomerik değişiklik tespit edilmiştir (21-22). Fakat literatürde sadece NSMR'li hastalarda subtelomerik değişiklikleri inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Çalışmamız NSMR'li hasta grubunda MLPA yöntemiyle subtelomerik değişikliği araştıran ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Nöronal morfogenez ve zekanın normal embriyonik gelişiminden sorumlu genlerin genomdaki dağılımı oldukça yaygın olmakla birlikte gen içeriği zengin subtelomerik bölgelerde bu genlerin daha yoğun olduğunu düşünmekteyiz. Bu düşünceyle NSMR hastalarında olası subtelomerik yeniden düzenlenmelerin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Diğer yandan NSMR hastalarında gen içeriği bakımından zengin olan subtelomerik değişikliklerin haritalanmasının yeni aday genlerin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacağına inanıyoruz.

GENEL BİLGİLER

2.1. Zeka :

Uyaranlar ve bireysel algılar aracılığıyla soyut ya da somut nesnelere arasındaki ilişkiyi kavrayabilme, karşılaştırabilme ve bu bilişsel işlevleri problem çözme gibi bir amaca yönelik olarak kullanabilme yetenekleri zeka olarak adlandırılmaktadır. Zekanın pek çok farklı tanımları olmakla birlikte biyolojik temelleri olan geliştirilebilecek bir kapasite ya da potansiyel olduğu ortak noktasına varılmıştır. Bu durumda zeka, bireyin doğuştan sahip olduğu, kalıtımla diğer nesillere aktardığı tecrübe etme, öğrenme ve problem çözme yetisi ile karakterizedir.

Prenatal, perinatal, postnatal ve çevresel etmenlerin yanısıra embriyolojik dönemde beyin gelişiminde rol alan genetik mekanizmalar da zekayı belirleyen faktörler arasındadır. Nöronal oluşum, gelişim ve düzenlenme bir dizi genetik ve epigenetik sistem tarafından kontrol edilen fizyolojik bir süreçtir. Sözkonusu süreç yaşamın ilk birkaç yılında aktif olarak devam ederken sonraki yıllarda nöron çoğalması durur. Bu dönemde zeka iç ve dış uyaranların metabolik düzenlenmeler aracılığıyla yeni sinaps oluşturmasıyla düzenlenir.

2.2. Mental Retardasyon:

Mental retardasyon toplumun % 1-3'ünü etkiler ve erkeklerde kızlara oranla 1.5 kat daha fazla görülür (23-26). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV)'e göre bireyde 18 yaşından önce IQ (Intelligence Quotient) değerinin 70'in altında saptanması ve adaptif fonksiyonlarda belirgin eksiklik olması olarak tanımlanmaktadır. DSM IV'te adaptif fonksiyonlar; iletişim, özbakım, ev hayatı, toplumun sağladığı olanakları kullanma, bağımsız iş yapabilme, okulla ilgili beceriler kazanma, sağlık ve güvenliği ile ilgili konularda farkındalık duyma olarak belirtilmektedir (25, 27, 28).

Son zamanlarda MR yerine 'Intellectual Disability (ID)' tanımlamasının kullanımı yaygınlaşmaktadır. Fakat ID, MR'yi de kapsayan daha geniş bir grubu ifade etmektedir.

MR bireyde ek problemler olmaksızın tek başına bulunduğu 'nonsendromik mental retardasyon', eşlik eden nörolojik bulgu veya majör fiziksel anomali varlığında ise 'sendromik mental retardasyon' olarak adlandırılır (29).

2.2.1. Mental Retardasyon Sınıflaması:

Mental durum, her toplum için standardize edilmiş zeka katsayısı ($ZK=IQ$) ile belirlenmektedir. ZK'nı hesaplamak için (ölçülebilir zeka yaşı/ gerçek yaş) x 100 formülü kullanılır (30). ZK skorlamasına göre 4 alt grup bulunur (25):

2.2.1.1. Hafif MR:

(IQ: 50-70) MR'lu olguların % 80-85'i bu grupta yer alır. Duyusal ve motor kayıpların çok daha hafif olduğu bu grupta konuşma becerisi okul öncesi dönemde kazanılabilir, özbakım ve bağımsız yaşayabilme yetilerine daha erken yaşlarda sahip olunabilir. Sosyal iletişim, akademik özellikler yaşlarına göre geri kalsa da uygun ve zamanında başlanılan eğitim ile normale yakın bir yaşantı sürdürebilirler.

2.2.1.2. Orta MR:

(IQ: 35-49) Bu gruptaki hastalar tüm MR'lu hastaların % 10'unu oluşturur. Genellikle konuşma becerisini geç de olsa edinirler, basit işlerde çalışabilir ve özbakımları konusunda sıkıntı çekmezler. Orta MR düzeyindeki çoğu çocuk konuşma becerisini gecikmeyle de olsa kazanabilir. Sosyal ilişkileri hafif MR'lu hastalara göre daha zayıftır, çünkü toplumsal kural ve gelenekleri öğrenmede güçlük çekerler.

2.2.1.3. Ağır MR:

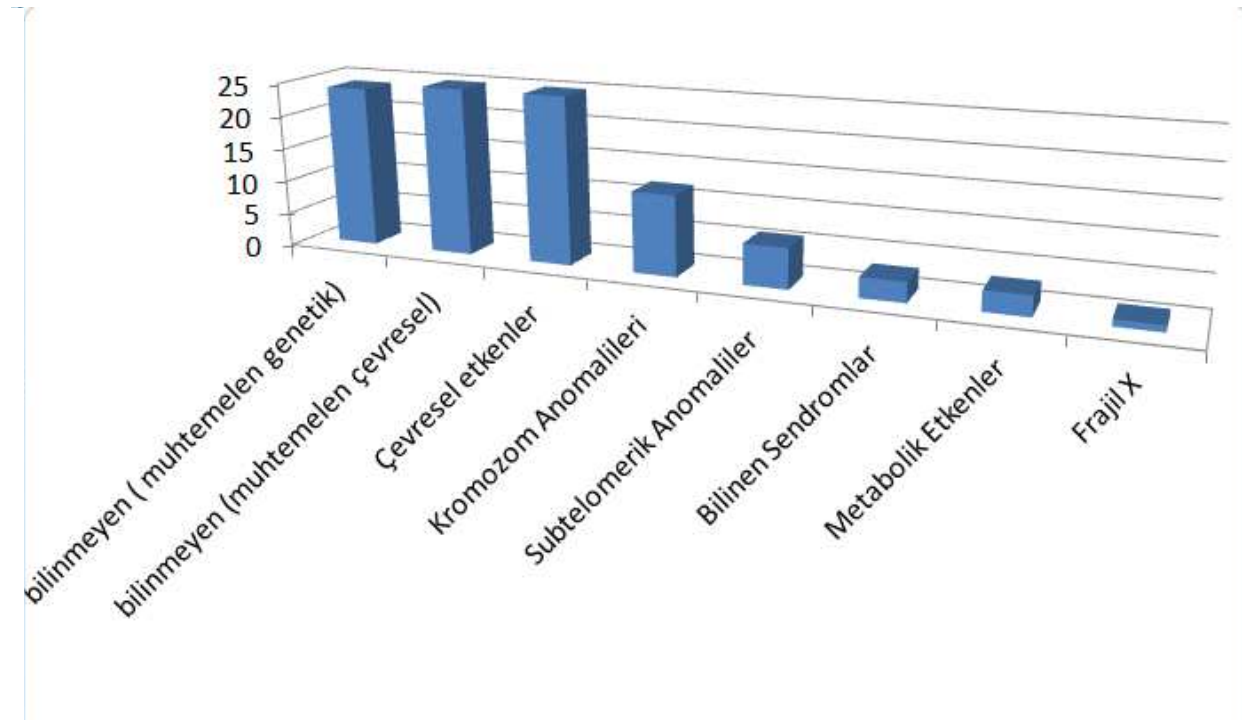
(IQ: 20-34) MR'lu hastaların sadece % 4'ü ağır MR'ludur. Konuşma becerisi ya çok geç kazanılır ya da kazanılmaz. Motor fonksiyonlarda da gecikmeler görülebilir. Özbakım konularında eğitimleri güç de olsa mümkündür.

2.2.1.4. Çok Ağır MR:

(IQ: <20) Tüm alanlarda gerilik ile seyreden bu grup hastalarında (% 1-2) genellikle eşlik eden doğumsal anomaliler, nörolojik problemler de vardır. Tüm adaptif fonksiyonlarda tam gerilik mevcut olduğundan her alanda başkalarına ihtiyaç duyarlar.

2.2.2.Mental Retardasyon Etiyolojisi:

Mental retardasyonun etiolojisini birbirinden keskin hatlarla ayırmak çok mümkün olmamakla birlikte çevresel etkenler ve genetik etkenler olarak 2 büyük grup altında incelenebilir.



Şekil 1: Mental retardasyonun etiyojik dağılımı ve sıklıkları, Winnepenninckx (31)'den değiştirilerek düzenlenmiştir.

2.2.2.1. Çevresel Nedenler:

2.2.2.1.1. Prenatal:

Prenatal dönemde maruz kalınan maternal enfeksiyonlar, bağımlılık yapan maddeler, sigara, alkol, toksik maddeler ve radyasyon fetal beyin gelişimini olumsuz yönde etkileyerek MR'a neden olabilir. Annenin sistemik hastalıkları (diyabet, fenilketonüri, vb.), maternal enfeksiyonlar özellikle Konjenital Sitomegalovirüs, Rubella ve Toksoplazmozis intrakranial kalsifikasyon, hidrosefali, mikrosefali gibi merkezi sinir sistemi patolojilerine neden olarak zeka üzerine olumsuz etkide bulunabilmektedir. Toksik maddeler ise kimyasal ajanlar, ağır metaller ve tedavi amacıyla kullanılan bazı ilaçlar şeklinde sıralanabilir. Örneğin, terapotik amaçlı kullanılan Retinoik asit türevleri dismorfik yüz bulguları, konjenital kalp hastalığı ve beyin anomalileri ile seyreden Retinoik asit embriyopatisine neden olabilir. Hamilelik döneminde maternal alkol kullanımı Fetal Alkol Sendromu (FAS) olarak iyi bilinen çoklu anomali ve mental retardasyonla karakterize bir tabloya sebep olabilir. Hamilelik toksemisi, plasenta yerleşim anomalisi gibi plasental yetersizliğe yol açabilecek her türlü sorun da intrauterin büyüme geriliği ve prematüriteye yol açarak MR ile neticelenebilir (31).

2.2.2.1.2. Perinatal ve Postnatal:

Prematürite, mekonyum aspirasyonu, zor-uzamış doğum eylemi hipoksik iskemik ensefalopati (HİE)'ye neden olabilir. Fetal hayatta akciğer gelişimini olumsuz yönde etkileyecek oligohidramniyoz, prematürite, toraks anomalileri, diyafragma hernileri postnatal dönemde asfiksiye neden olabilir. İntrakranial kanamalar da beyin parankiminde kalıcı hasar yaparak mental retardasyona sebep olabilir. K vitamini eksikliği, Hemofili gibi hastalıklarda gözlenebilecek intraventriküler kanamalar, menenjit tablosuyla sonuçlanan enfeksiyonlar, ak maddede bilirübin birikimi yapabilecek hiperbilirübinemiler, özellikle diabetik anne çocuklarında görülebilecek neonatal hipoglisemi, hipokalsemi postnatal dönemde konvülsiyonlar yaparak mental retardasyon ile neticelenebilir. Yaşamın ileri yıllarında uyaran eksikliği, sosyokültürel çevrenin yapısı, bazı metabolik, nörolojik ve endokrinolojik hastalıklar ve merkezi sinir sistemi travmaları da mental retardasyonun önemli sebepleri arasındadır (32-34).

2.2.2.2. Genetik Nedenler:

Mental retardasyonun en sık genetik nedeni kromozom anomalileridir. Görülme sıklığı çalışmalarda % 4-34 arasında değişiklik göstermektedir (6, 35). Oranlar arasındaki bu farklılığın çalışmalardaki hasta seçim kriterlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kromozom anomalileri yapısal ve sayısal anomaliler olmak üzere 2 ana grupta incelenir.

2.2.2.2.1. Sayısal Kromozom Anomalileri:

Sayısal kromozom anomalisine sahip bireylerin çoğu fetal hayatta kaybedilirler. Bu sebeple sayısal anomaliler spontan abortus materyallerinde daha sık gözlenir. Canlı doğumlarda sık görülen sayısal anomaliler Trizomi 21, Trizomi 18, Trizomi 13, Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu ile diğer kromozomların mozaik trizomi ve mozaik monozomileridir. Down sendromu 1/ 600-700 insidansla mental retardasyonun en sık genetik nedenidir (7). Fenotip çok belirgin olduğundan genellikle doğumdan hemen sonra tanı alırlar. Trizomi 18 ve Trizomi 13 sendromları ağır mental ve motor retardasyonun yanı sıra eşlik eden diğer sistem malformasyonları nedeniyle çok erken dönemlerde kaybedilirler (36). Turner sendromlu hastaların % 99'u intrauterin dönemde abortus ile sonuçlanır, geri kalan % 1'lik kısım ise genellikle okul çağında boy kısalığı problemiyle hastaneye başvurarak tanı alırlar. Turner Sendromunda mental retardasyon özellikle beklenen bir bulgu değildir (23, 37).

2.2.2.2.2. Yapısal Kromozom Anomalileri:

Kromozom sayısında bir değişiklik olmaksızın bazı bölgelerin artması (duplikasyon), azalması (delesyon) ya da yer değiştirmesi (inversiyon, translokasyon) şeklinde oluşan anomaliler yapısal kromozom anomalileridir. Genetik bilgide herhangi bir değişiklikle sonuçlanmayan değişiklikler 'dengeli kromozom anomalileri', genetik bilgide değişikliğe yol açanlar ise 'dengesiz kromozom anomalileri' olarak adlandırılır. Sık görülen yapısal anomaliler inversiyon ve translokasyonlardır. 3 Mb ve daha büyük değişimler klasik karyotipleme yöntemleriyle görüntülenebilir.

Bu grup içinde yer alan mikrodelyasyon sendromlarının en sık karşılaşılanları Di-George (22q11), Williams (7q11), Prader Willi (15q11-13), Angelman (15q11-13), Miller Dieker (17p13-3) sendromudur. Her bir sendromun belirli fenotipik bulguları olsa da hastalar arasında klinik farklılıklar mevcuttur. Bunun sebebi deleyasyonun büyüklüğüyle ve içerdiği bölgenin gen içeriğiyle ilişkilendirilebilir. Özgün klinik bulguların varlığında ön tanıya dayanan FISH incelemesi, tanıya yönelik çok önemli bir testtir.

Kromozomların subtelomerik bölgeleri gen içeriğinden oldukça zengin olmakla birlikte tekrar dizileri de bu bölgelerde çok sık olduğundan yeniden düzenlenmelere çok açık bölgelerdir (38). Değişik hasta gruplarında yapılan birçok çalışmada birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Orta ve ağır MR hastalarının % 7.4'ü ve hafif MR'lu hastaların % 0.5'inde neden subtelomerik yeniden düzenlenmeler (deleyasyon/duplikasyon) olarak tespit edilmiştir (18). Klasik karyotipleme yöntemi bu değişimleri göstermekte yetersiz kaldığından FISH, CGH, MLPA gibi moleküler ve moleküler sitogenetik yöntemlere ihtiyaç duyulur. Hollanda'da 466 mental retardasyonlu hastada yapılmış bir çalışmada konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle % 8.3 oranında anomali tespit edilirken, MLPA kullanıldığında bu oranın % 12'ye çıktığı bildirilmiştir (39). Mental retardasyon hasta grubunda subtelomerik bölgelere yönelik ileri incelemelerin gerekliliğini bu çalışma ortaya koymaktadır.

2.2.2.2.3. Tek Gen Mutasyonları ile İlişkili Mental Retardasyonlar

Klinik bulguların oluşmasında tek bir gende meydana gelecek patolojilerin sebep olduğu hastalıklar tek gen hastalıkları olarak adlandırılır. Otozomal resesif, otozomal dominant, X'e bağlı dominant, X'e bağlı resesif ve mitokondriyal kalıtım özelliği gösterebilir ya da sporadik olabilirler. Bu gruplar arasında en iyi tanımlanan X'e bağlı geçiş gösteren mental retardasyon grubudur.

2.2.2.2.3.1. Otozomal Kalıtımla Geçen Mental Retardasyonlar:

Tek gen mutasyonlarının sebep olduğu sendromlarda mental retardasyon sıklıkla gözlenir, bu durumda sendromik mental retardasyondan bahsedilir. Nonsendromik mental retardasyonlu bireylerde ise % 25 oranında otozomal resesif kalıtım paterni gözlenir. Eşlik eden bulguların olmaması ve genetik heterojenite nonsendromik MR genlerinin

tanımlanmasını güçleştirmektedir. Otozomal resesif MR'lu olgularda yaklaşık 12 gen bölgesi haritalanmış, bunlardan 5'inde genler de tanımlanmıştır (40).

2.2.2.2.3.2. X'e Bağlı Mental Retardasyon:

Erkeklerde 1/600 oranında gözlenir ve hem klinik, hem de genetik heterojenitesi oldukça yüksektir. X'e bağlı mental retardasyon da sendromik veya non-sendromik olabilir. Eğer X'e bağlı geçiş gösteren mental retardasyona eşlik eden başka bir fizik muayene, görüntüleme, laboratuvar inceleme bulgusu varsa hasta sendromik olarak kabul edilir. Olguların 2/3'si nonsendromik grupta yer alır (41).

Frajl X:

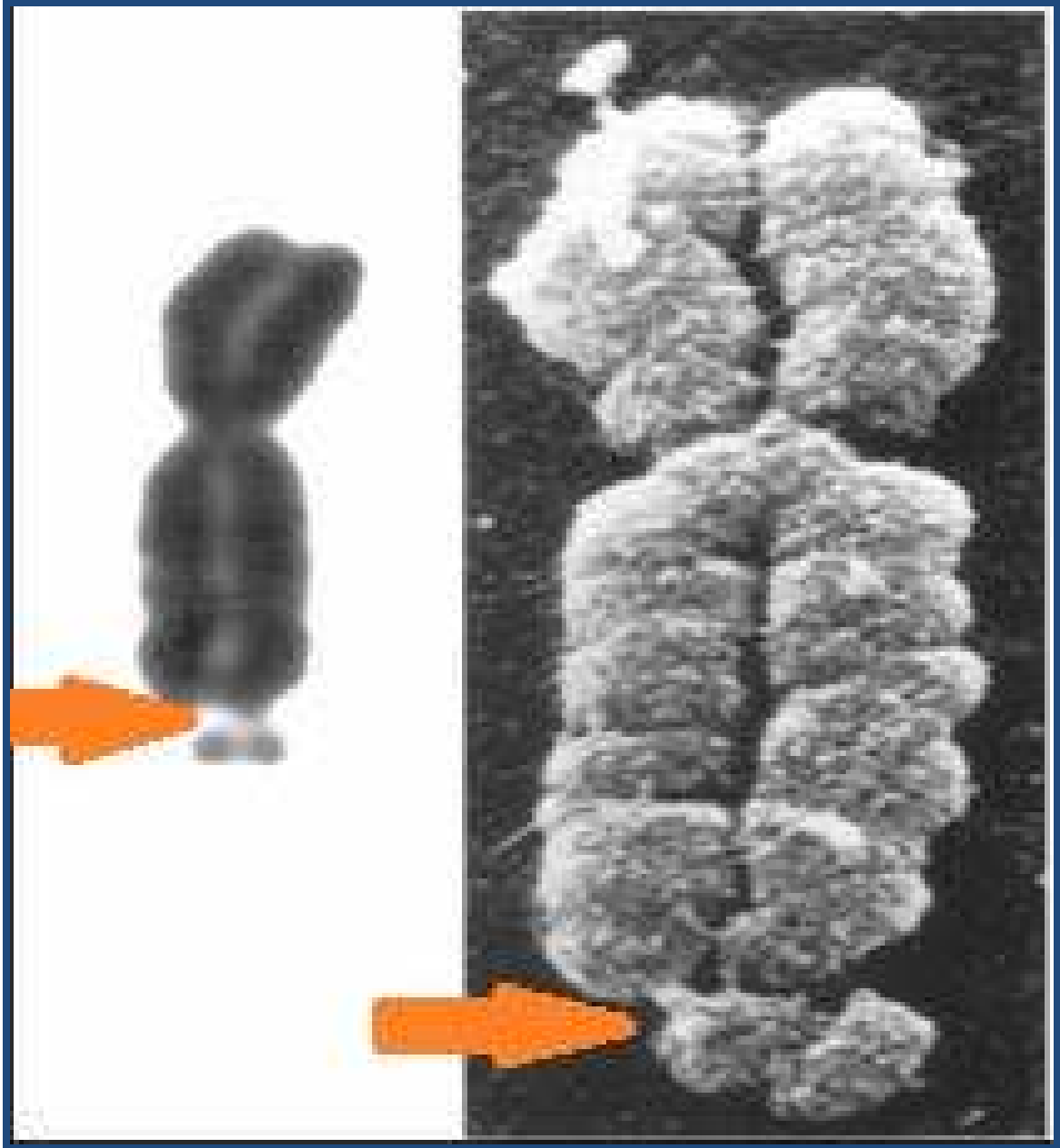
Mental retardasyonun en sık kalıtsal nedeni olan Frajl X Sendromu da bu grupta yer alır. X'e bağlı geçiş gösteren mental retardasyon hastalıklarının % 40'ından sorumludur (35). Down Sendromundan sonra mental retardasyonun en sık genetik nedeni, tüm mental retardasyonların ise en sık kalıtsal nedenidir.

Frajl X Sendromu *FMRI* (Frajl X Mental Retardasyon) geninin translasyona uğramayan 5' bölgesindeki -CGG- üçlü tekrar dizilerinin artışı ile ortaya çıkan dinamik mutasyonların sebep olduğu klinik durumdur. -CGG tekrar sayısı her normal bireyde değişkenlik göstermekle birlikte 6-50 arasında yer alır. 50-200 arasındaki tekrar sayısına sahip bireyler premutasyonlu olarak tanımlanabilir. Premutasyonlu bireylerde mental retardasyon gözlenmezken ileri yaşlarda premature overyan yetersizlik (POY) ve Frajl-X-tremor-ataksi sendromu görülebilir. 200 ve daha çok tekrar sayısı olan bireylerde *FMRI* geninin CpG

adacıkları metillenerek gen inaktive edilir. Bu durumda frajil X mental retardasyon proteini (FMRP) üretilmez ve Frajil X sendromu klinik bulguları ortaya çıkar (42, 43).

FMR1 geni Xq27.3 bölgesinde yer alır ve 17 ekzondan oluşur, 632 aminoasit içeren FMR proteinini kodlar (resim1) (44). Deneysel hayvan çalışmalarında FMRP'nin beyin, testis, ovum, timus, göz ve dalak dokusunda yüksek oranda; kolon, uterus, tiroid bezi ve karaciğerde ise daha az oranda eksprese olurken kalp, aort ve kas dokusunda eksprese olmadığı gösterilmiştir (43, 45).

Frajil X hastalarında ve *FMR1 knock out* farelerin beyinlerinde yapılan çalışmalarda dendritlerin morfolojilerinin bozuk, normalden daha uzun ve ince oldukları görülmüştür. Bu bulgudan hareketle FMRP'nin sinaptik plastisitede önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (46).



Resim 1: Frajil X kromozomunun ışık mikroskobu ile (solda) ve elektron mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü (sağda). Frajil bölgeler ok ile gösterilmiştir. Raffa (48)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Rett Sendromu:

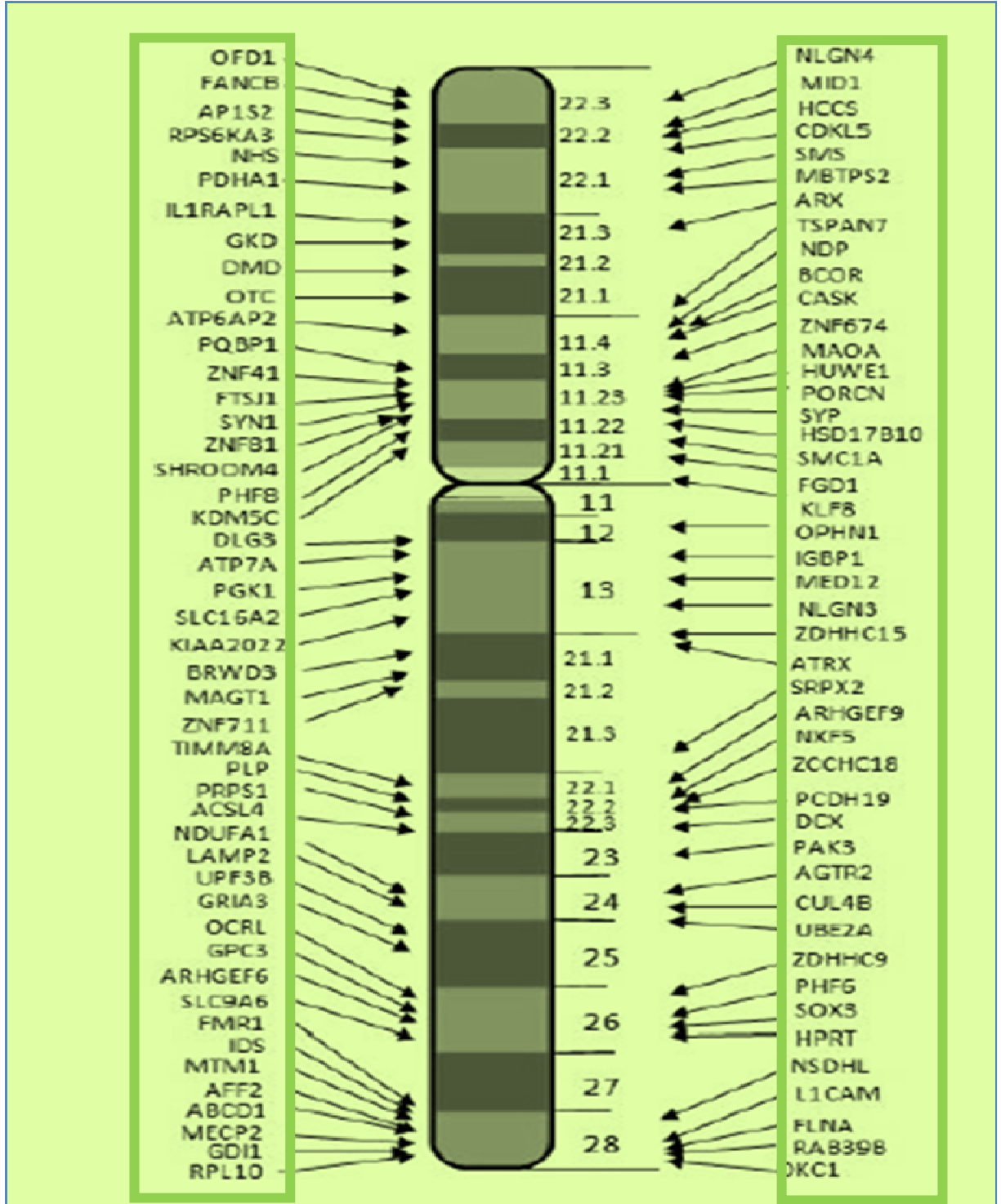
X'e bağlı geçiş gösteren mental retardasyon ile ilişkili diğer bir hastalıktır. *MECP2* (metil-CpG bağlayıcı protein 2) genindeki nokta mutasyonların sebep olduğu Rett Sendromu erkeklerde letal seyretmektedir.

X kromozomu'nun MR ile sıklıkla ilişkilendirilmesi araştırmacıları içerdiği ilişkili genleri aydınlatmaya itmiştir (şekil 2). Bu genler 4 ana başlık altında gruplandırılmaktadır (49):

- (1) Rho GTPaz siklusu ve dentritik regülasyon,
- (2) RabGTPazlar ve sinaptik vesikül transportu,
- (3) Gen ekspresyonunun regülasyonu,
- (4) Orphan mekanizması

X kromozomu içeriğindeki 17 genin hem sendromik hem de nonsendromik mental retardasyonlu hastalarda tespit edilmesi, sendromik ve nonsendromik mental retardasyonun birbirinden keskin hatlarla ayıramayacağını düşündürmektedir (50).

Günümüze kadar X kromozomunda yer alan 87 adet bölge nonsendromik mental retardasyonla ilişkili bulunmuş, bunlardan 35'inde sorumlu genler de tespit edilmiştir. Klonlanan genlerin 18'i nonsendromik MR ile, 17'si ise hem sendromik hem nonsendromik MR ile ilişkilendirilmiştir. Sendromik mental retardasyonlu bireylerde 106 bölge tespit edilmiş ve 92 tanesinde genler de klonlanmıştır (51).



Şekil 2: X kromozomunda tanımlanan MR ile ilişkilendirilmiş genler. http://www.ggc.org/images/XLID_92-gene_brochure.pdf adresinden değiştirilerek alınmıştır. erişim tarihi: 26/08/2011 (52)

2.2.3. Mental Retardasyonlu Hastanın Değerlendirilmesi

Mental retardasyonlu bireylerin ilk aşamada detaylı bir anamnezle antenatal hikayeleri alınmalı ve ardından detaylı fizik muayeneleri yapılmalıdır. Aileden olgunun prenatal, perinatal ve postnatal izlemi, mental- motor gelişimi (süt çocuğu döneminde motor gelişim daha önemlidir), büyüme-gelişme eğrileri, geçirdiği hastalıklar ve aldığı tedaviler, okul durumu, sosyal ilişkileri, çevresine ilgisi ve genel davranışları, akrabalık ve ailede benzer olgu varlığı ile ailesel hastalıklar hakkında bilgi edinilmelidir. Genel fizik muayeneyi dismorfik, klinik genetik ve nörolojik değerlendirme takip etmelidir. Bulgular doğrultusunda uygun laboratuvar incelemeler planlanmalıdır.

2.2.3.1. Klinik Genetik İnceleme:

Dismorfik bulgular, deri ve deri ekleri olan cilt, saç, tırnak özellikleri, kas-iskelet sistemi anomalileri, diğer sistem anomalileri ayrıntılı bir şekilde incelenmeli ve mental retardasyona eşlik eden başka bir anomali olup olmadığı belirlenmelidir. Aile öyküsü, benzer olgu veya diğer ailesel hastalıklar hakkında alınacak bilgi detaylı bir aile ağacı çizimi için önemlidir.

Bazı bulgular ve davranış özellikleri ile spesifik hastalıkların tanısı konulabilir (tablo 1):

Davranış şekli	Sendromlar
Otistik özellikler	Angelman, Rett, Frajil-X, Tuberoskleroz, Kabuki, tedavisiz FKU, Adenilosuksinat liyaz eksikliği
Anksiyete	Rett, Williams
Kendine zarar verme	Lesch-Nyhan, Smith Magenis, tedavisiz FKU
Hiperaktivite	Williams, Smith Magenis, MPS tip III
Hiperfaji	Prader-Willi
Streotipik hareketler	Rett, Smith Magenis, CDG-IIa
Uyku bozukluğu	Williams, Smith Magenis, MPS tip III
Psikoz	Di George
Kokteyl davranış kişiliği	Williams

Tablo 1: Bazı mental retardasyon sendromlarında ipucu olabilecek önemli davranış fenotipleri, Poplawski (53)'den değiştirilerek alınmıştır. (PKU: Fenilketonüri, MPS: Mukopolisakkaridozis, CDG: Karbonhidratı eksik glikoprotein sendromu)

2.2.3.2.Nörolojik İnceleme:

Nörolojik sistem muayenesi mental retardasyonlu hastalarda daha da önem arz etmektedir. Hastanın oryantasyon, kooperasyon, iletişim, algılama, konuşması değerlendirilmelidir. Ardından kas gücü, kortikal ve serebellar sistem, kraniyal sinir sistemi muayenesi, fizyolojik ve patolojik reflekslerin değerlendirilmesi yapılmalıdır.

IQ belirlenmesi mutlaka gerekir. IQ'yu değerlendirmek için toplumsal standartlara ve yaş gruplarına göre standartize edilmiş testler kullanılır. Bu testlerden yaygın olarak kullanılanlar Denver Developmental Screening Test-II, Stanford-Binet, WISC-R ve Wechsler Intelligence Scale for Children-III'tür (54-56).

2.2.3.3.Laboratuvar İncelemeleri:

Mental retardasyonlu hastalarda laboratuvar incelemeler tespit edilen anormal bulgulara yönelik planlanmalıdır. MR etiyojisinin çok geniş olması ve yapılabilecek laboratuvar testlerinin çok çeşitli olması nedeniyle, MR olgularında tanıya giderken zaman kazanmak ve gereksiz testlerin yapılmasını önlemek için algoritmalar oluşturulmuştur. Genel bir yaklaşım tarzı şu incelemeleri içermelidir (30):

Biyokimyasal Testler:

İdrar ve kan aminoasit düzeyleri, tiroid fonksiyon testleri, idrar organik asit incelemesi, idrar mukopolisakkarit analizi, kanda lizozomal enzim analizi, serum ürik asit seviyesi

Serolojik-Viral Testler:

Kanda TORCH antikor düzeyleri ile intrauterin dönemde maruz kalınan, zekayı olumsuz yönde etkileyebilecek enfeksiyon hastalıklarının tanısı konulabilir.

Psikometrik Testler:

WISC-R, Stanford Binet, Brunet-Lezine-R ve Denver Gelişim Skalası gibi testlerle MR derecesi aydınlatılır.

Göz Muayenesi ve Görme Testleri:

Lens-Fundus Muayenesi, Flaş VEP, ERG ile MR'a eşlik edebilecek göz ve görme anomalileri saptanabilir.

İşitme Muayenesi ve İşitme Testleri:

BERA, Odiyometri ile MR'a eşlik edebilecek işitme problemleri saptanabilir.

Elektroensefalografi (EEG):

Epileptik nöbetleri saptamak için kullanılır.

Merkezi Sinir Sistemi Görüntülemesi:

Kranial MR, BT ya da USG ile yapısal anomaliler, yer kaplayan lezyonlar, kanamalar, kraniyosinostozisler, metabolik birikimler, vs. tespit etmek mümkündür.

X-Ray:

İskelet sistemi görüntülemesi ile iskelet displazileri, kraniyosinostozisler, bazı metabolik hastalıklar, vertebra ve kosta anomalileriyle seyreden bazı tek gen hastalıkları saptanabilir.

Sitogenetik Testler:

Karyotipleme ve High Resolution Banding (HRB) ile yapısal, sayısal kromozom anomalileri, FISH ile delesyon ve duplikasyonlar tespit edilebilir.

Moleküler Testler:

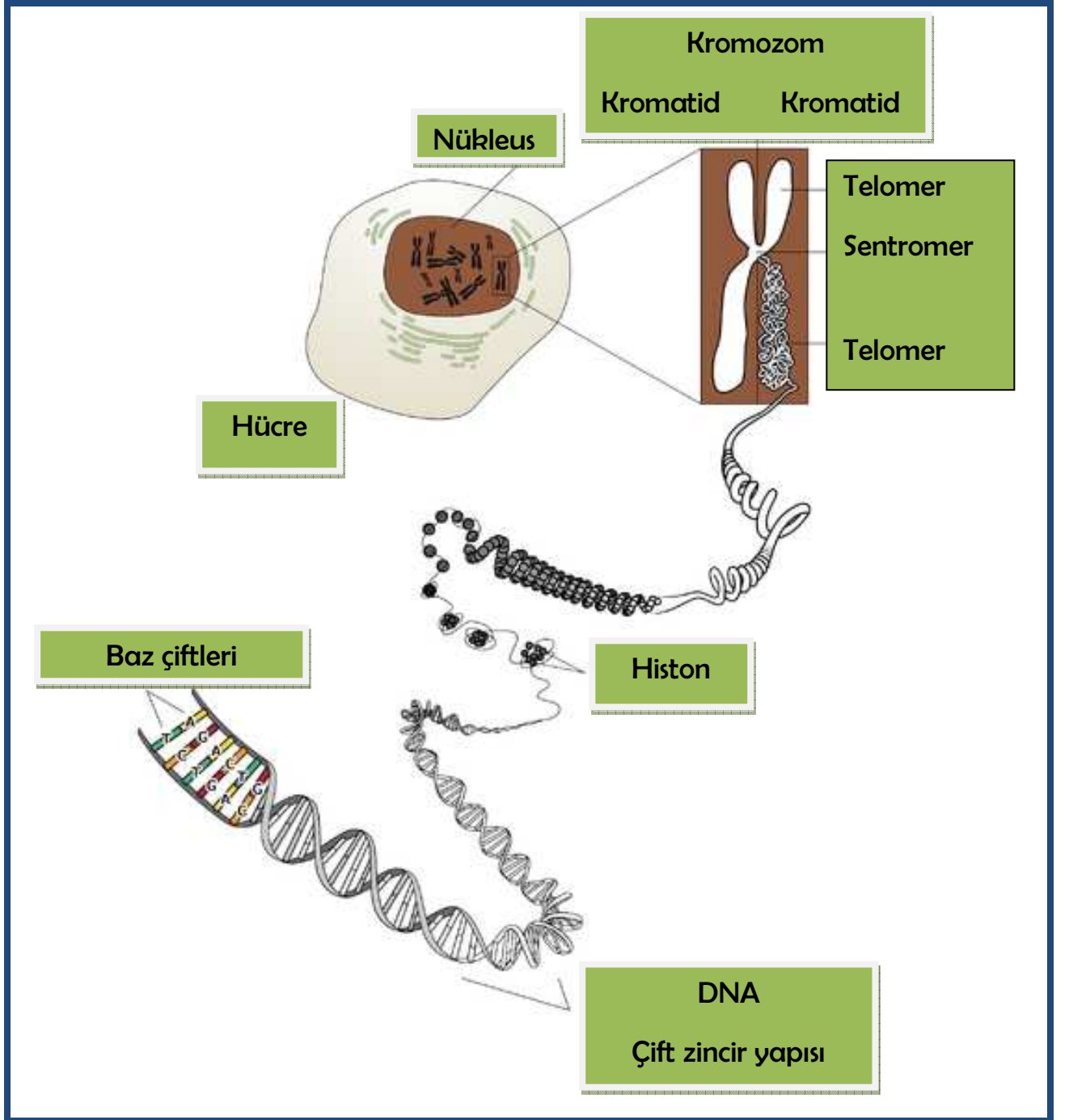
Subtelomerik İncelemeler (FISH, MLPA, MAPH), Mutasyon Analizi, Array İncelemeleri

2.3. Subtelomerik Bölgeler:

Kromozomların telomerik bölgeleri, hücre bölünmesi esnasında kromozomları rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi dış etkilere karşı korurken kromozomun bütünlüğünü ve nükleus zarına tutunarak uygun bir pozisyon almasını da sağlayan her iki uçtaki tekrar dizilerinden ve bu tekrar dizilerinin stabilitesini sağlayan kement benzeri halka yapıdan oluşur. Gen kodlamayan bu bölgeler 10 kb uzunluğunca birkaç bin kez tekrar eden TTAGGG dizilerini içerirler (57- 60). Her hücre bölünmesinde telomerler kısalır ve belli bir boyuta ulaştığında hücre bölünmesi durur ve hücrede yaşlanma başlar (61).

Telomerik DNA bölgelerinin tekrarlayan hücre bölünmesi siklusları nedeniyle azalmaları yaşlanma veya somatik hücrelerin yaşlanması ile ilişkilendirilmiştir. Bunun aksine gonadal (germline) hücreler telomerleri degradasyondan koruyup azalmalarını sağlayan telomeraz enzimi sayesinde uzun ömürlü olurlar (62) (Şekil 3).

Subtelomerik bölgelerin 5' ucundan 3' ucuna doğru 30- 45 kb'lık kısmı TTGGGG ve TGAGGG tekrarlarından oluşur ve proksimal subtelomerik dizi olarak adlandırılır ve az sayıda kromozomda ortak yapıdadır (şekil 6). Kalan 10-15 kb'lık kısım ise distal subtelomerik bölgedir ve çoğu kromozomda ortak yapıdadır (18, 63).



Şekil 3: Telomer bölgesinin kromozomal yerleşiminin şematik gösterimi. San Jose (64)'den değiştirilerek alınmıştır.

Subtelomerik bölgeler mental retardasyon etyolojisinden sıklıkla sorumlu tutulmaktadır. Bunun nedeni translokasyonların çoğunlukla telomer bölgeleri de içermesi, bu bölgelere yakın subtelomerik bölgelerin gen içeriğinin çok zengin olması, kromozomların eşleşmesinin subtelomerik bölgelerden başlaması nedeniyle mayozun erken döneminde meydana gelebilecek hatalı eşleşmelere açık olmasıdır (65- 69).

Subtelomerik değişiklikleri saptamak için kullanılan yöntemlerin en yaygın olanları Subtelomerik FISH, array-CGH ve MLPA'dır.

2.3.1. Subtelomerik FISH:

Metafaz evresinde denatüre edilen DNA'nın oligonükleotid problarla işaretlenmesi ve ardından sentetik telomere spesifik FITC (floresin isothiocyanate) işaretli oligonükleotid problarla hibridize edilerek 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) veya propidium iodine (PI) ile boyanıp floresan mikroskop veya dijital görüntüleme sistemi ile değerlendirmesi esasına dayanır (70).

2.3.2.Array-CGH:

Test ve referans hücrelerden elde edilen genomik DNA'ların farklı renkte florokromlarla işaretlenmesi, tekrar bölgelerini kapatmak için Human Cot-1 DNA ile muamele ve hibridizasyon sonrası florokromlardan kaynaklanan renk farklılıklarına göre kromozmal kayıp veya kazançların belirlenmesi esasına dayanır (71).

2.3.3.Subtelomerik MLPA:

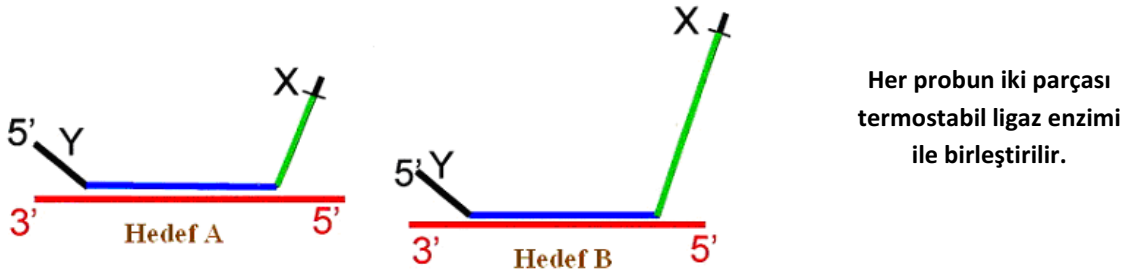
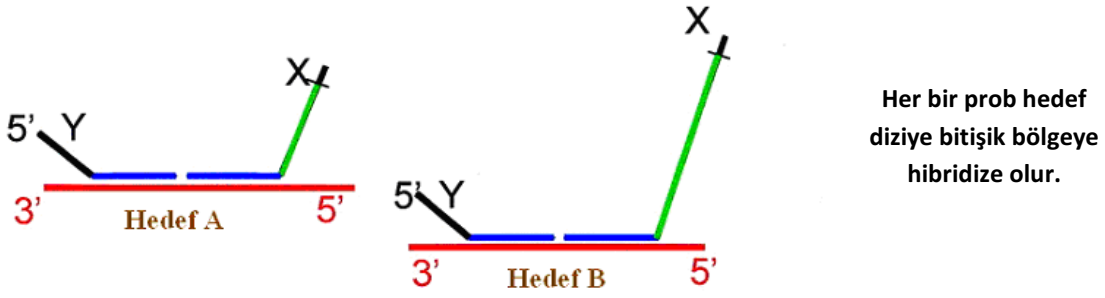
Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ilk olarak 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (72). Yaklaşık 45 spesifik dizinin, multipleks PZR sonrası eş zamanlı değerlendirilmesine olanak verdiği yeni bir metottur (Şekil 4). Amplifikasyon ürünleri kapiller elektroforez cihazı ile ayrıştırılır. Oluşan 130-490 uzunluğundaki fragmentler jel paternine uygundur. Sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılmasıyla delesyon ya da duplikasyon taşıyan diziler tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmaktadır. Tekniği uygulamak için gerekli diğer araçlar her laboratuarda kolaylıkla bulunduğu ve diğer tekniklere göre daha ucuz ve hızlı olduğundan MLPA sıklıkla tercih edilmektedir. Teknik ilk ortaya çıkışından sonra ihtiyaçlar doğrultusunda birçok değişikliğe uğratılmıştır (73).

MLPA

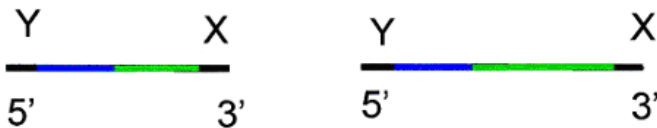
Çalışma Prensibi

-DNA denatüre edilerek problarla hibridize edilir.

- Her bir probun biri sentetik, diğeri ise M13 kaynaklıdır.

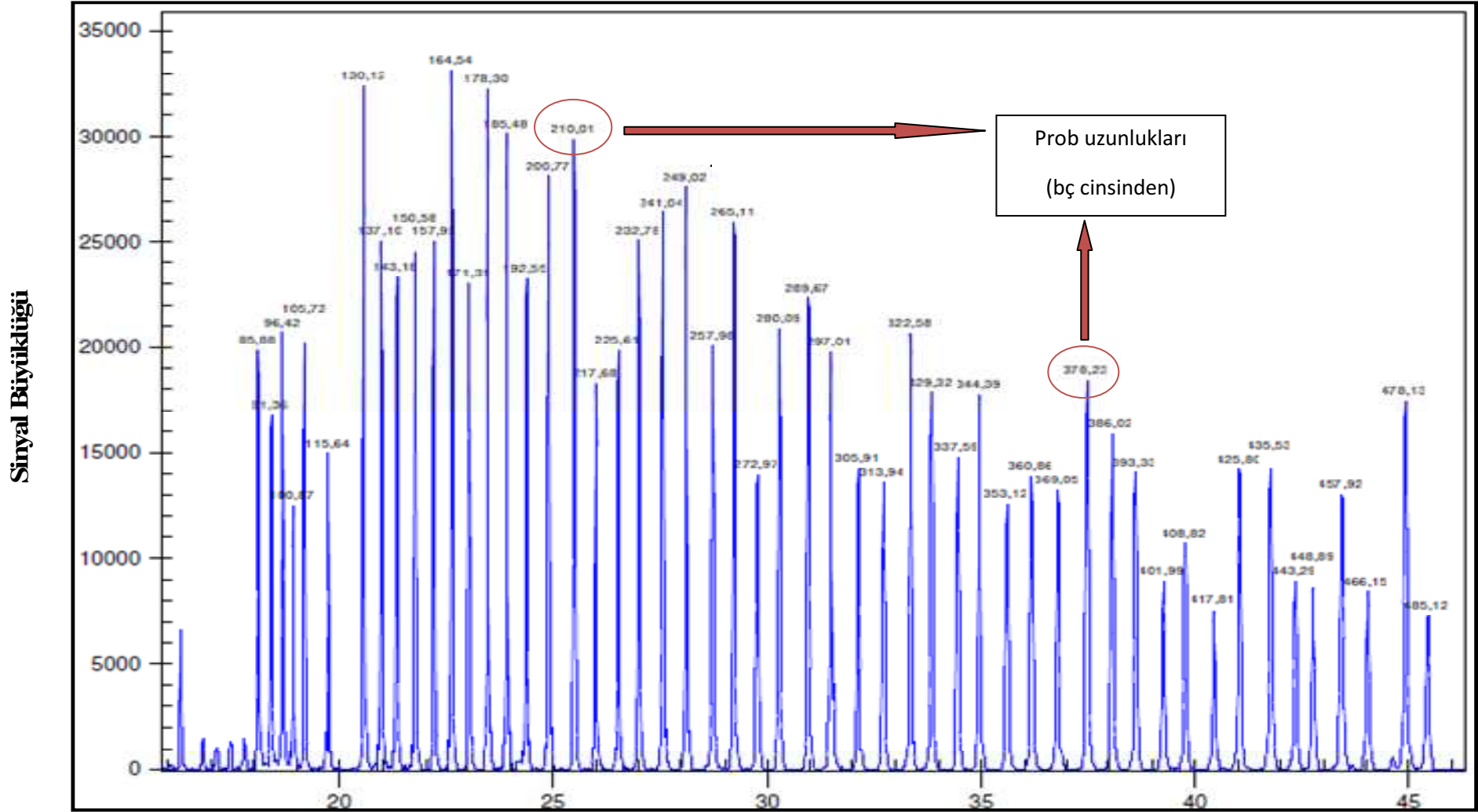


Ligasyon sonrasında tek parça halindeki problemler tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılır.



Ürünler kapiller elektroforez ile yürütülür ve değerlendirme yapılır.

Şekil 4: MLPA yönteminin temel işleyiş algoritması. Schouten ve ark., 2002'den (72) değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 5: Çoğaltılan MLPA problemlerinin kapiller elektroforezde yürütülmesi ile elde edilen pikler ve büyüklükleri.

(Schouten ve ark., 2002'den (72) değiştirilerek alınmıştır)

MLPA problemleri 5' ve 3' uçlarında PZR ile tek primer çifti kullanarak aynı anda çoğalmaları için tanımlayıcı diziler içerirler. Her bir prob, hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Prob ürünleri 130 ve 490 baz çifti arasında değişebilen uzunluklardadır (şekil 5). Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PZR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PZR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur (72).

Günümüzde ticari olarak mevcut oligonükleotidler 80-440 nükleotid uzunluğunda olmakla birlikte MLPA kalitesini karşılayacak yapıda olmadıklarından MLPA yönteminde kullanılacak oligonükleotidler kimyasal olarak üretilirler. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı kullanılmıştır. M13 DNA'sı tamamlayıcı (komplementer) oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA'yı kendi tanıma bölgesinde, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' uçundan kesmektedir.

MLPA yöntemi seçilecek çalışma grubuna göre farklı kitlerle uygulanır. 35-42 prob içeren kitler problemler arasında 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilirler ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodubleks yapı geliştirmesini önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerecek şekilde ayarlanır. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye özgün sentetik oligonükleotitler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler.

M13 kullanılarak sentezlenen oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları farklı uzunlukta amplifikasyon ürünlerinin oluşturulmasında rol oynar. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye kompetitif (yarışmalı) bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (73).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PZR ile amplifikasyonda bütün problemler için bir tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (74). Genomik DNA'da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir (75).

2.3.4. Subtelomerik Yeniden Düzenlenmelerin Araştırılmasında MLPA Yönteminin Uygulanması:

Çalışmamızda kullanılan MLPA SALSA P070 Human Telomere-5 kitinde her bir subtelomerik bölge için ayrı prob bulunmaktadır. Problemler telomer komşuluğundaki iyi belirlenmiş genlerle hibridize olacak şekilde dizayn edilmiştir. Diğer kromozomlardan farklı olarak 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar hemen hemen tüm p kolunu kapsayan 10 Mb veya daha fazla büyüklükte tekrar dizileri içerdiğinden bu kromozomlar için p telomer bölgesi yerine q kollarında sentromere yakın bölgeye göre prob dizisi tasarlanmıştır. Benzer amaçlar için kullanılan P069 kitinde ise 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar için tasarlanan bu 5 sentromerik prob bulunmamaktadır. P070 kitindeki problemlerden tamamen farklı dizilerdeki problemlerden oluşan P036 kiti yine subtelomerik bölgeler için üretilmiş olup P070 kitinin sonuçlarını doğrulamak için oldukça önem göstermektedir.

X ve Y kromozomlarının p-telomerik uçlarında yer alan yaklaşık 2500 Kb uzunluğundaki DNA dizisi her 2 seks kromozomunda da özdeştir. Bu bölge psödotozomal bölge (PAR1) olarak adlandırılır. X ve Y kromozomları benzer şekilde q kollarında da 800 Kb uzunluğunda özdeş bölge içerirler ve bu bölge de PAR2 olarak adlandırılır. Söz konusu PAR bölgelerindeki genler çoğu erkek ve dişide özdeş kopya sayısına sahip olduğundan otozomal kalıtılan genler gibi davranırlar. P070 kiti telomerik olmayan Y kromozomuna özgü 2 küçük sentetik MLPA probu yanında her 2 X/Y PAR bölgesi için birer adet prob içerir.

Sonuç olarak P070 kiti toplam 46 adet prob içermektedir.

Kullandığımız P070 kiti bir veya daha fazla kromozomun telomer uçlarındaki genlerde meydana gelen delesyon ya da duplikasyonları tespit etmek üzere düzenlenmiştir. Heterozigot delesyonlar sorumlu bölgenin pikinde % 35-50 oranında bir düşüş olarak kendini gösterecektir. Herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm de bağlanma bölgesinde yer almamasına rağmen ilgili bölgenin pikinde azalmaya yol açabileceğinden ve bazı prob sinyalleri ürünün saflığına ya da deneysel koşullardaki küçük değişikliklere daha duyarlı olduğundan MLPA ile tespit edilen bulguların diğer tanı yöntemleriyle desteklenmesi önerilmektedir (76, 77).

Subtelomerik MLPA günümüze kadar mental retardasyonlar, çoklu konjenital anomaliler, spontan düşüklüklerde etyolojiyi aydınlatmak amaçlı kullanılmıştır ve hala kullanılmaktadır (78, 79).

P070 kitindeki problarla elde edilen ürünler 132-484 nt uzunluğundadır. Buna ek olarak 120 nt'ten daha küçük 10 kontrol bölgesi ürünü de vardır. Bunların 64-70-76 ve 82 nt uzunluğunda olanları DNA kalitesini değerlendirmeye imkan tanır ve 'Q-fragmentleri' olarak adlandırılır. D-Fragmentleri ise 88-92 ve 96 nt uzunluğundadır ve DNA denaturasyonunu kontrol etmeyi sağlarlar. Diğer bir X kromozomuna özgü fragment 100 nt uzunluğundadır, Y kromozomuna özgü 2 fragment ise 105 ve 118 nt uzunluğundadır.

MLPA yönteminde kullanılacak DNA örneklerinin hepsi aynı ayırıştırma metoduyla elde edilmiş olmalıdır.

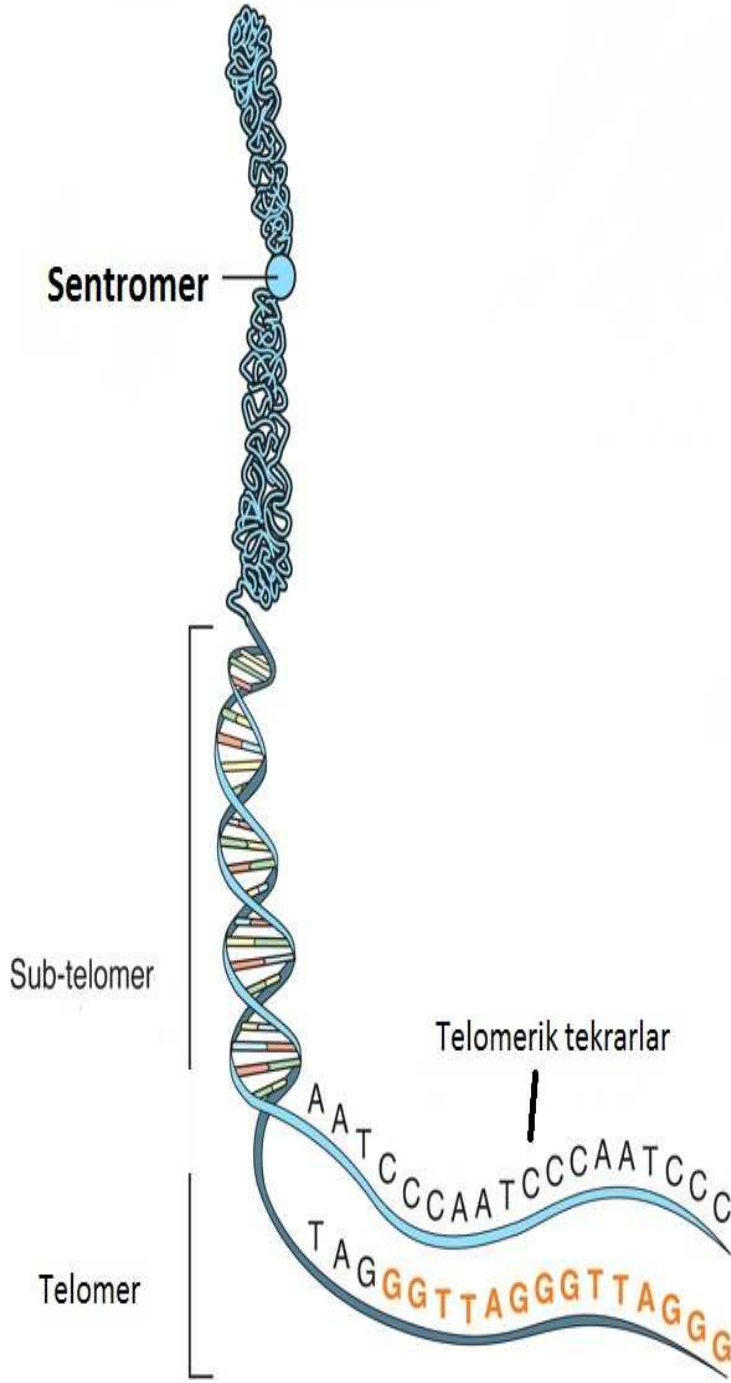
Tablo 2: MLPA SALSA P070 subtelomerik Kiti Prob Bölgeleri.

(Renklendirilmiş satırlar kopya sayısı değişikliği saptanılan prob bölgelerini göstermektedir)

Kromozom Lokalizasyonu	Uzunluk (nt)	Hibridize olunan genler	Telomere olan mesafe (bç)	Genin yer aldığı ekson
	64-70-76-82	Q- fragmentleri		
	88-92-96	D- fragmentleri		
	100	X-fragmentleri (AMOT geni)		
	105	Y fragmentleri (UTY geni)		
Yq11.21	118	Y fragmentleri (DDX3Y)		18
01q44	132	SH3BP5L	206,527	3
02q37.3	139	ATG4B	499,642	7
03q29	145	KIAA0226	1,668,619	22a
04q35.2	152	FRG1	163,922	1
05q35.3	160	GNB2L1	235,982	2
06q27	166	TBP	411,721	2
07q36.3	172	VIPR2	193,433	2
08q24.3	179	RECQL4	566,131	17
09q34.3	186	EHMT1	496,218	10
10q26.3	193	ECHS1	348,315	8
11q25	202	IGSF9B	1,560,425	20
12q24.33	211	ZNF10	209,690	5
13q34	218	CDC16	100,461	8

14q32.3	226	MTA1	1,368,896	7
15q26.3	233	TM2D3	331,045	3
16q24.3	241	GAS8	184,569	11b
17q25.3	250	SECTM1	2,878,463	4
18q23	258	CTDP1	541,302	8
19q13.43	265	CHMP2A	962,954	3
20q13.33	274	UCKL1	389,526	6
21q22.3	281	S100B	97,594	2
22q13.33	290	ARSA	178,105	1d
Xq28/Yq (PAR2)	298	VAMP7	87,986	8
01p36.33	306	TNFRSF18	1,179,540	4b
02p25.3	315	ACP1	267,173	5
03p26.3	323	CHL1	336,454	3
04p16.3	329	PIGG	321,690	7
05p15.33	337	CCDC127	258,985	3
06p25.3	346	IRF4	339,971	3
07p22	355	UNC84A	651,757	3
08p23.3	362	FBXO25	398,466	8
09p24.3	370	DOCK8	376,404	23
10p15.3	379	ZMYND11	216,058	2a
11p15.5	387	BET1L	195,520	3b
12p13.33	393	JARID1A	287,064	23
13q11	402	PSPC1	19,244,620	1
14q11.2	409	PARP2	20,811,773	16
15q11.2	418	NDN	23,930,562	1
16p13.3	427	DECR2	402,289	9
17p13.3	436	RPH3AL	177,326	2

18p11.32	444	THOC1	204,801	21
<i>19p13.3</i>	<i>450</i>	<i>PPAP2C</i>	<i>232,498</i>	<i>7</i>
20p13	459	ZCCHC3	218,304	1
21q11.2	466	HSPA13	15,743,439	2
22q11.1	478	IL17RA	16,601,309	4
Xp22.33/Yp (PAR1)	484	SHOX	571,796	5



Şekil 6: Sentromerik, telomerik ve subtelomerik bölgelerin şematik görünümü. (Morissette ve Flamand 2010'dan (80) değiştirilerek alınmıştır)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Gereç (Hastalar):

Çalışma grubumuz 2002-2011 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Polikliniğinde mental retardasyon tanısı konularak izlenen hastalar arasından seçilerek oluşturuldu.

“Nonsendromik mental retardasyon”, bireyde ek problemler olmaksızın sadece MR bulunması olarak kabul edilmektedir (29). Çalışmamıza bu tanıma uygun hastalar dahil edildi.

Detaylı anamnez ile travma, enfeksiyon ve hipoksi sekeli olmayan, pre ve perinatal-postnatal öyküleri normal olan hastalar belirlendi.

Bu hastalar arasından dismorfik yüz bulgusu, vücudunda anatomik veya fonksiyonel engeli olan hastalar çalışmanın dışında bırakıldı.

Hastalar MR etyolojilerini açıklayabilecek sitogenetik anomaliler açısından karyotipleme ile değerlendirildi ve sonucunda herhangi bir kromozomal anomali saptanan hastalar çalışmadan çıkartıldı.

Yapısal merkezi sinir sistemi malformasyonları MR'ye sebep olabileceğinden tüm hastalar beyin MR görüntülemesi ile değerlendirildi ve anormal bulgusu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Erkek hastalar Frajil X yönünden Frajil X skorlamasına tabi tutuldu, 15 ve üzerinde puan alanlar çalışmaya dahil edilmedi

Bazı doğumsal metabolik hastalıklarda MR görülebileceğinden hastalar idrarda organik asit ve kanda aminoasit analizi ile metabolik hastalıklar açısından incelendi. Sonuçları normal olan hastalar belirlendi.

Değerlendirmeler sonucunda 15'i kız, 14'ü erkek olmak üzere toplam 29 hasta çalışmaya dahil edildi.

Tüm hastaların ailelerinden bilgilendirilmiş olur formu alındı. Hastalardan örnek alınımı ve analiz çalışmalarına Etik Değerlendirme Kurul onayı alındıktan sonra başlandı.

2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

- Buzdolabı (Vestel)
- Derin Dondurucu (-20°C)
- Nanodrop spektrofometre (Thermo Scientific-ND 2000c)
- Laminar air-flow (Heal Force)
- Mikropipet (Thermo Scientific)
- Mini Santrifüj (Thermo Scientific)
- Santrifüj (Hettich Retina 420R)
- Etüv (Shel Lab)
- Termal döngü cihazı (PZR) (T-TC 5000)
- Vortex (Wise Mix-VM10)
- Genetik Analiz Sistemi (ABI 310-Genetic Analyzer)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche DNA Isolation Kit For Mammalian Blood)
- MLPA SALSA P070 Subtelomerik Prob Kiti (MRC-Holland)
- Moleküler Genetik uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeleri

3.2.2. DNA İzolasyonu:

DNA izolasyonları yarı manuel DNA izolasyon kiti (katolog no:11667327001, Roche DNA Isolation Kit For Mammalian Blood, Manheim, Germany) yardımıyla aşağıda belirtilen protokole uygun olarak EDTA'lı kanlardan gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak her örneğe ait en az 2 µg DNA elde edilmiştir.

- 2cc kan örneği 15ml'lik falkon tüplere alındı
- Her bir falkon tüpe 6ml Red Blood Lysis Buffer (RBLB) eklendi
- Kan ve RBLB karışımı içeren tüpler 10 dakika (dk) boyunca karıştırıldı.
- 900 rcf'te 10 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi beklendi.
- Santrifüj sonrası, tüpün üstündeki sıvı kısım atılıp üstüne 1ml White Cell Lysis Buffer eklendi.
- Karışım iyice özdeş olana kadar pipetaj yapıldı ve 37 °C'de 15 dakika bekletildi.
- Her bir tüpe 500 ul Protein Precipitation Buffer eklendi ve 30 saniye vorteks uygulandı.
- Örnekler 1.5ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- 12000 rcf'te 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Sıvı şeffaf kısım 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve üzerine iki katı kadar soğuk % 100 etil alkol eklendi.
- DNA'lar görülünceye kadar yavaşça çalkalandı.
- Görünür hale gelen DNA yeni 1.5 ml'lik tüplere alındı.
- DNA üzerindeki sıvı kısım atılarak yerine 1 ml soğuk % 70 etanol eklendi ve 875 rcf'te 5 dakika santrifüj edildi.
- Dibe çöken DNA'ya dokunmaksızın üstteki sıvı kısım atıldı.
- Kurutma işlemi için ağzı açık haldeki tüpler 37°C'de bekletildi ve tam kuruma elde edilinceye kadar aralıklarla kontrol edildi.
- Kurutma işleminin hemen ardından DNA'lar 100 mikrolitre DNaz'sız su ile çözüldürüldü.

3.2.3. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi:

3.2.3.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P070 Prob Miks İle Hibridizasyonu:

- DNA örneklerinden 5 µl (50-100 ng/ µl DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PZR strip tüplerine aktarıldı.
- 98⁰C de 5 dk bekletilerek DNA'lar denatüre edildi.
- Örnekler 25⁰C'ye soğutulduktan sonra her bir tüpe 1.5 µl SALSA Probe Mix (P070) ve 1.5 µl MLPA Buffer eklenilerek pipetaj yardımıyla homojenize edildi.
- Örnekler 95⁰C'de 1 dk. inkübe edildikten sonra 16 saat süresince 60⁰C'de bekletilerek hibridizasyon sağlandı.

3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu:

- Ligaz karışımı (her bir örnek için 3 µl Ligase-65 buffer A + 3 µl Ligase-65 buffer B + 25 µl su ve 1 µl Ligase-65 enzimi olacak şekilde) hazırlandı ve örnekler 54⁰C'ye soğutularak her bir tüpe 32 µl karışımdan eklendi.
- Örnekler aynı sıcaklıkta 15 dk, hemen ardından 98⁰C'de 5 dk kadar bekletildi (Ligaz inaktivasyonunu sağlamak amacıyla).

3.2.3.3. PZR:

- Her biri 4 µl SALSA PZR Buffer + 26 µl distile su içeren yeni PZR strip tüpler hazırlanarak ligasyon ürünlerinden 10'ar µl alınarak yeni hazırlanmış bu tüplere eklendi. Bu aşamada pipetaj yardımıyla homojenize edildi.
- Bir sonraki aşama için gerekli olan polimeraz karışımı (her bir tüp için 2 µl SALSA PCR-primer + 2 µl SALSA Enzyme Dilution Buffer + 5.5 µl su ve 0.5 µl SALSA Polymerase enzimi olacak şekilde) hazırlandı.
- Yeni hazırlanan tüplerin sıcaklığı 60⁰C'ye geldiğinde hazırlanan polimeraz karışımdan 10'ar µl eklendi.
- PZR ureaksiyonu 35 döngü (95⁰C'de 30 sn denatürasyon, 60⁰C'de 30 sn bağlanma, 72⁰C'de 60 sn uzama olarak) ve en son uzama 72 °C'de 20 dk. olacak şekilde düzenlendi.

3.2.3.4. PZR ürünlerinin ABI 310 Genetic Analyzer Cihazına Yüklenmesi ve Analizi

- Her bir tüp için 20 µl deiyonize formamid ve 0.3 µl Liz Size Standart içeren karışım hazırlanarak 20'şer µl ABI 310 yükleme tüplerine dağıtıldı.
- PZR ürünlerinden de 1.5 µl alınarak yükleme tüplerine eklendi.
- Hazırlanan yükleme tüpleri 2 dk süresince 95°C'de bekletilerek denatüre olmaları sağlandı.
- ABI 310 cihazında; çalışma şartlarında injeksiyon zamanı 15 kV'de 10 saniye, yürütme zamanı 15 kV de 35 dk, çalışma sıcaklığı 60°C ve filitre C olacak şekilde düzenlemeler yapıldı.
- Örnekler ABI 310 cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programı çalıştırıldı.
- Her hasta ve referans örneğine ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

3.2.3.5. Değerlendirme:

MLPA fragmentlerinin büyüklükleri arasındaki farklılık kapiller elektroforezden geçiş sırasını belirlemektedir. Fragmentlerin uzunlukları (size) ve piklerinin alanları GeneMapper programı ile değerlendirilerek Excel dosyası formatında kaydedildi. Bu aşamadan sonra değerlendirmenin doğru bir şekilde yapılabilmesi için spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin piklerinin kaldırılması gerekmektedir. Bu amaçla MLPA SALSA P070 prob miksinde bulunan standart prob pikleri değerlendirmeye alındı, diğer pikler kaldırıldı.

DNA'nın miktarı ve denatürasyonun sağlıklı bir şekilde yapıp yapılmadığını değerlendirmek için DD (DNA Denaturasyon) ve DQ (DNA Quantity) fragmentlerinin incelemesi gerekmektedir. Bu amaçla DQ fragmentleri ile DNA miktar düzeyi analiz edilebilirken DNA denaturasyon düzeyi DD fragmentleri ile incelenebilmektedir. 64, 70, 76, 82 bp uzunluktaki 4 pik DQ kontrol piklerine, 88, 92, 96 bp uzunluktaki 3 pik ise DD kontrol piklerine aittir.

Kontrol ve hasta pikleri Coffalyser 4.0 programına aktararak değerlendirildi. Hasta örneklerin tüm pik alanları için, her bir pik alanı o bölgedeki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesi yoluyla birbirlerine göre oranlamaları yapıldı.

Bu oranlar, herhangi bir kromozomal yeniden düzenlenme taşımadığı bilinen, hasta örnekleri ile aynı aşamalara tabi tutulmuş 3 sağlıklı kontrol DNA örneğinden elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslanarak doz belirlemesi yapıldı. Elde edilen değer 0.7'nin altında ise delesyon yönünde, 1.3'ün üstünde ise duplikasyon yönünde değerlendirildi.

BULGULAR

4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuvar Bulguları:

Çalışmaya, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Polikliniğinde, 2002- 2011 yılları arasında takip ve tedavileri yapılmış nonsendromik mental retardasyonlu hastalar alındı.

Hasta grubumuz, 15'i kız, 14'ü erkek olmak üzere toplam 29 kişiden oluşmaktaydı. Kız hastaların yaş ortalaması $11^{1/12}$ yaş, erkek hastaların yaş ortalaması $11^{11/12}$ yaş, tüm hastaların yaş ortalaması ise $11^{5/12}$ yaş olarak hesaplandı. Hastaların en küçüğü $2^{9/12}$ yaşında, en büyüğü ise 23 yaşındaydı (tablo 3). Hastaların 18'inde ebeveynler arasında akraba evliliği mevcuttu (tablo 3).

İki hastamızda 1qh artışı (M-04 ve M-05), 1 hastamızda 1qh ve 16 qh artışı (M-15), 1 hastamızda ise 9. kromozomda inversiyon tespit edildi. Bu sonuçlar polimorfizm olup herhangi bir klinik bulguya yol açmadıkları bilinmektedir (tablo 4).

Beyin MR görüntülemesi ile 2 hastamızda korpus kallosumda incelmeye (M-03 ve M-27), 1 hastamızda araknoid granülasyon (M-25) ve 1 hastamızda da araknoid kist (M-15) saptandı. Bu bulgular varyasyon olup herhangi bir klinik bulgu ve sendrom ile ilişkilendirilemedi.

Hastalarda bir/iki minör doğumsal anomali dışında belirgin dismorfik bulgular bulunmamaktaydı. M-01 hastamızda küçük kulaklar ve pektus ekskavatus deformitesi, M-02'de Reynaud fenomeni, M-03'te her iki el 5. parmak metakarplarında kısalık, M-04 ve M-05'te eklemelerde hiperekstansibilite, M-06'da ince parmakların yanında pes planus deformitesi, M-07'de aksesuar meme başı ve mikrognati, M-08'de hafif üçgen yüz görünümü, M-13'te düşük kulak, M-14 hastamızda persiste fetal finger padler, M-15'te hipertelorizm ve bilateral epikantal katlantı, M-16'da her iki elin 5. parmaklarında klinodaktili, M-19'da telekantus ve yüksek damak, M-22'de mikrognati ve solda ezotropia, M-23'te telekantus ve düzensiz dişler, M-24'te telekantus, M-25'te yüksek burun kökü ve bilateral klinodaktili, M-

26'da bilateral epikantal katlantı ve ince alt dudak, M-27'de hipertelorizm ve bilateral klinodaktili, M28'de solda epikantal katlantı ile yapışık pinna tespit edildi. Hastalarımızdaki bu minör anomaliler herhangi bir anatomik veya fonksiyonel bozukluğa yol açmadığı gibi herhangi bir sendromla da ilişkili bulunmamıştır (tablo 5).

Tüm hastalarımızın idrar organik asit ve kan aminoasit analizleri normal neticelendi (tablo 5).

Mental retardasyonları psikometrik testlerle de doğrulanan hastalarımız, herhangi bir sendromla ilişkilendirilemeyen nonsendromik mental retardasyon olarak belirlendi. Ayrıca, erkek hastalar Frajil X skorlamasına tabi tutuldu, 15 ve üzerinde puan alanlar çalışmanın dışında bırakıldı.

Prenatal ve postnatal hikaye tüm hastalarımızda doğaldı (tablo 5).

Hastalar	Yaş	Cinsiyet	Ebeveyn Akrabalık Derecesi
M-01	16	E	1 ⁰ kuzen
M-02	17	E	1 ⁰ kuzen
M-03	23	K	2 ⁰ kuzen
M-04	11	E	Yok
M-05	14 ^{9/12}	K	Yok
M-06	13 ^{11/12}	E	1 ⁰ kuzen
M-07	9	E	1 ⁰ kuzen
M-08	16 ^{2/12}	E	Yok
M-09	18 ^{4/12}	E	Yok
M-10	8	K	Yok
M-11	15	E	2 ⁰ kuzen
M-12	14	K	2 ⁰ kuzen
M-13	6	E	2 ⁰ kuzen
M-14	11	K	2 ⁰ kuzen
M-15	9 ^{11/12}	K	Yok
M-16	8 ^{3/12}	K	2 ⁰ kuzen
M-17	13 ^{4/12}	K	Yok
M-18	15 ^{10/12}	K	Yok
M-19	12 ^{4/12}	E	Yok
M-20	11 ^{7/12}	E	2 ⁰ kuzen
M-21	8 ^{11/12}	K	1 ⁰ kuzen
M-22	3 ^{5/12}	K	1 ⁰ kuzen
M-23	11	K	1 ⁰ kuzen
M-24	16	K	1 ⁰ kuzen
M-25	6	E	1 ⁰ kuzen
M-26	5 ^{9/12}	K	2 ⁰ kuzen
M-27	2 ^{9/12}	K	1 ⁰ kuzen
M-28	8 ^{3/12}	E	Yok
M-29	6 ^{2/12}	E	Yok

Tablo 3: Hastaların ebeveynleri arasında akraba evliliği olup olmadığı, yaş ve cinsiyetleri özetlenmiştir.

Hastalar	Karyotip	Kranial MR	Metabolik Testler	MR
M-01	46,XY	N	N	+
M-02	46,XY	N	N	+
M-03	46,XX	KK anterior gövde kısmında hafif incelme	N	+
M-04	46,XY,1qh+	N	N	+
M-05	46,XX,1qh+	N	N	+
M-06	46,XY	N	N	+
M-07	46,XY	N	N	+
M-08	46,XY	N	N	+
M-09	46,XY	N	N	+
M-10	46,XX	N	N	+
M-11	46,XY	N	N	+
M-12	46,XX	N	N	+
M-13	46,XY	N	N	+
M-14	46,XX	N	N	+
M-15	46,XX,1qh+,16qh+	Araknoid kist	N	+
M-16	46,XX	N	N	+
M-17	46,XX	N	N	+
M-18	46,XX	N	N	+
M-19	46,XY	N	N	+
M-20	46,XY	N	N	+
M-21	46,XX	N	N	+
M-22	46,XX	N	N	+
M-23	46,XX	N	N	+
M-24	46,XX	N	N	+
M-25	46,XY	Araknoid granülasyon	N	+
M-26	46,XX	N	N	+
M-27	46,XX	KK ince	N	+
M-28	46,XY,inv(9)(p11q13)	N	N	+
M-29	46,XY	N	N	+

Tablo 4: Hastaların karyotip, beyin MR görüntülemesi ve metabolik testlerinin sonuçları özetlenmiştir.

(KK: korpus kallosum, MR: mental retardasyon)

Hastalar	Prenatal Hikaye	Postnatal Hikaye	Fizik Muayene
M-01	N	N	kulaklar hafif küçük, pektus ekskavatus
M-02	N	N	Reynaud fenomeni
M-03	N	N	bilateral 5. parmak metakarpında kısalık
M-04	N	N	eklemlerde hiperekstansibilite
M-05	N	N	eklemlerde hiperekstansibilite
M-06	N	N	pes planus, ince parmaklar
M-07	N	N	mikrognati, aksesuar meme başı
M-08	N	N	üçgen yüz
M-09	N	N	N
M-10	N	N	N
M-11	N	N	N
M-12	N	N	N
M-13	N	N	düşük kulaklar
M-14	N	N	persiste fetal finger padler
M-15	N	N	hipertelorizm, bilateral epikantus
M-16	N	N	her 2 el 5. parmaklarında klinodaktili
M-17	N	N	N
M-18	N	N	N
M-19	N	N	telekantus, yüksek damak
M-20	N	N	N
M-21	N	N	N
M-22	N	N	mikroretrognati, sol ezotropia
M-23	N	N	telekantus, düzensiz dişler
M-24	N	N	telekantus
M-25	N	N	yüksek burun kökü, bilateral klinodaktili
M-26	N	N	bilateral epikantus, ince alt dudak
M-27	N	N	hipertelorizm, bilateral klinodaktili
M-28	N	N	sol epikantus, yapışık pinna
M-29	N	N	N

Tablo 5: Hastaların prenatal ve postnatal hikayesi ile fizik muayene bulguları özetlenmiştir.

4.2. MLPA Bulguları:

Toplam 29 NSMR hastasında yaptığımız MLPA analizinde 5 hastadan elde edilen sonuçlar DD ve DQ piklerinin normalin dışında saptanması nedeniyle değerlendirme dışında bırakıldı. 24 hastadan 1'inde (M-21) artma, 2'sinde (M-11 ve M-16) azalma olmak üzere toplam 3 hastada subtelomerik kopya sayısı değişikliği saptandı (3/24) (Tablo 6).

Hasta	Prob Bölgesi	KSD/MLPA'da saptanan oranlar	Probun Hibridize Olduğu Kromozom
M-11	FBX025	Azalma/0.60	8p23.3
M-16	FBX025	Azalma/0.62	8p23.3
M-21	PPAP2C	Artma/1.43	19p13.3

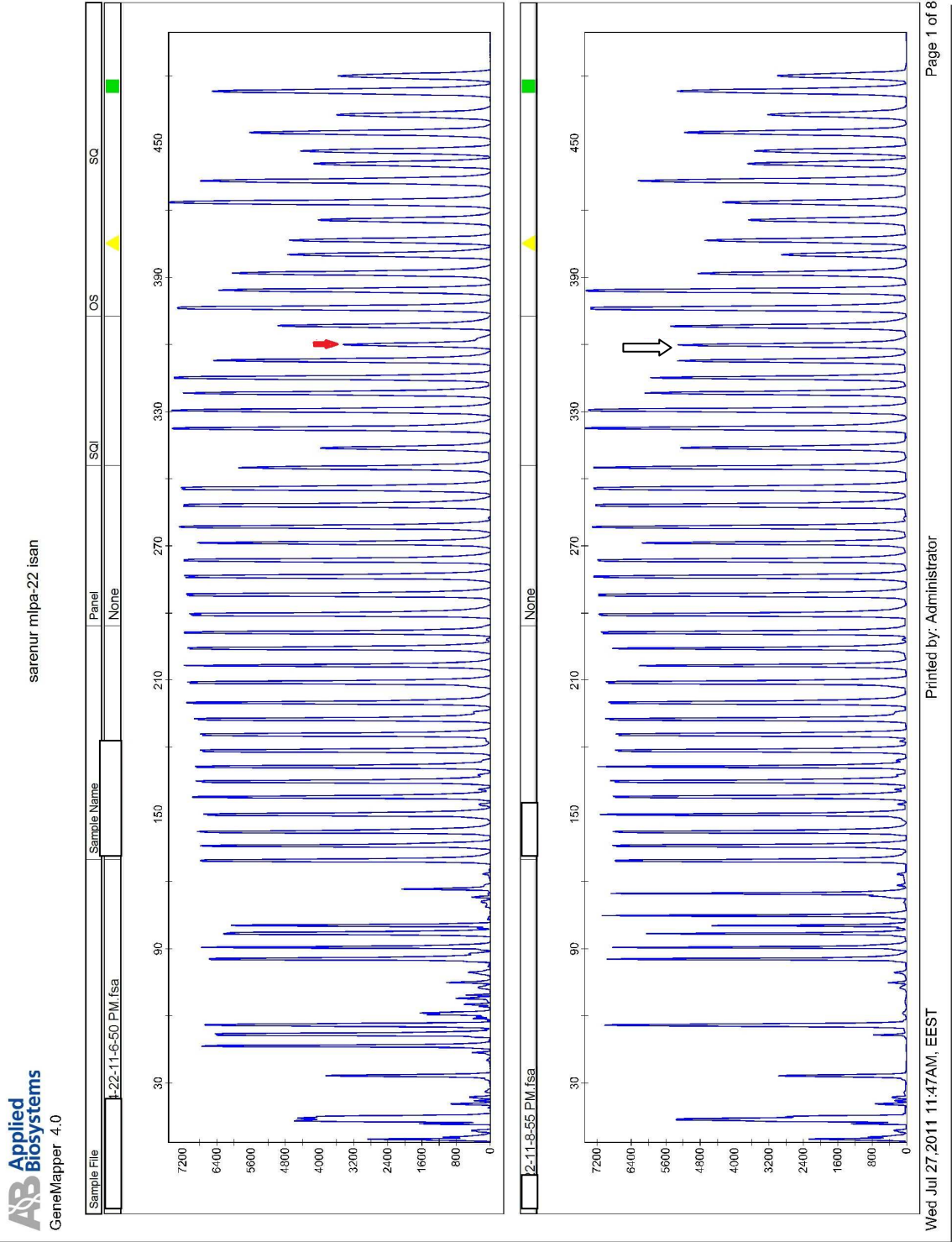
Tablo 6: MLPA ile KSD saptanan hastalar, prob bölgeleri ve hibridize oldukları lokalizasyonlar özetlenmiştir.

Coffalayser programı kullanılarak hasta ve kontrol pikleri normalizasyon sonrasında değerlendirildi.

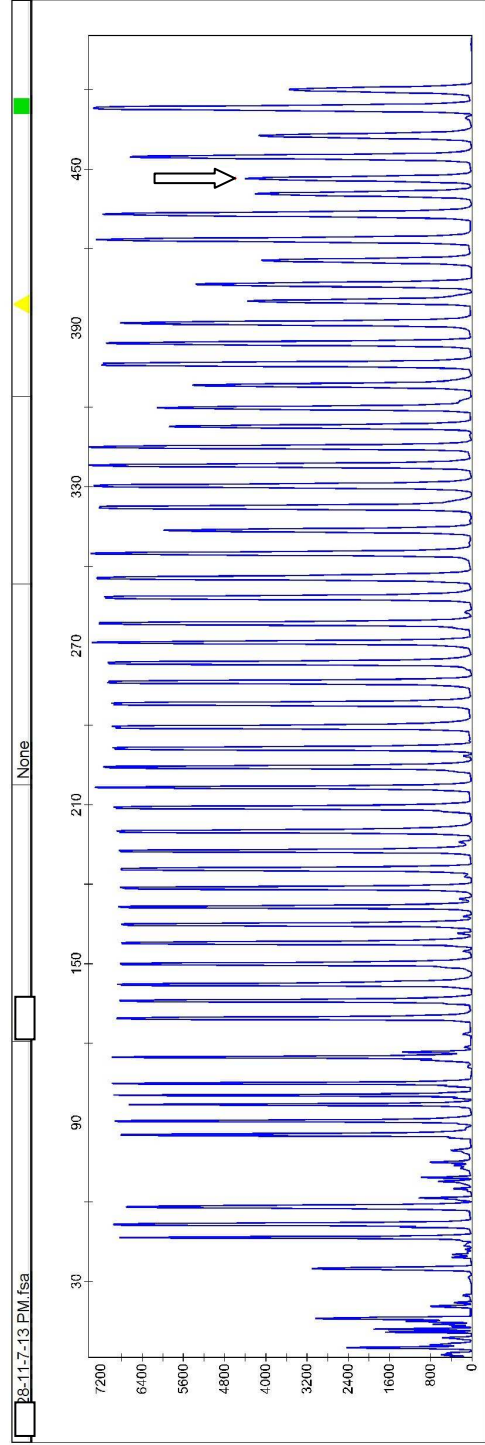
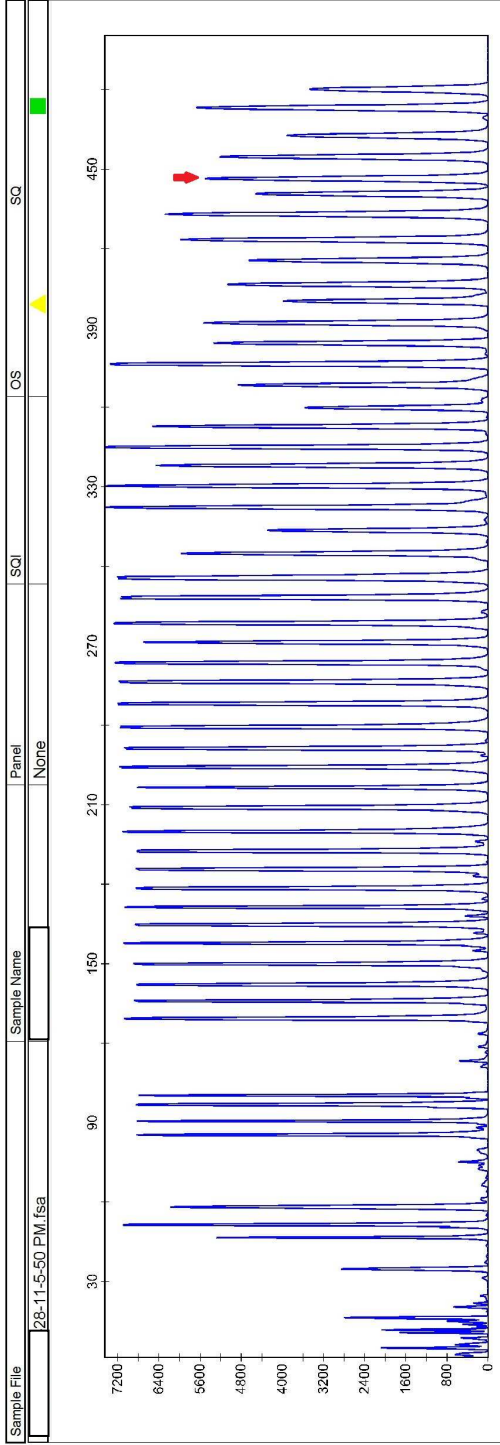
Fbxo25 probuna ait M-11 hastamızın pik yüksekliği 2577, kontrol örneğinin pik yüksekliği ise 5321'di. Coffalayser programı kullanılarak yapılan değerlendirmede hasta ve kontrol piklerinin birbirine oranlaması neticesinde 0.60 değeri elde edildi (Şekil: 7). Bu değer 0.7'den küçük olduğu için hastamızın *Fbxo25* prob pikindeki azalma, delesyon yönünde değerlendirildi.

Fbxo25 probuna ait M-16 hastamızın pik yüksekliği 3454, kontrol örneğinin pik yüksekliği ise 5321'di. Coffalayser programı kullanılarak yapılan değerlendirmede hasta ve kontrol piklerinin birbirine oranlaması neticesinde 0.62 değeri elde edildi (Şekil: 8). Bu değer 0.7'den küçük olduğu için hastamızın *Fbxo25* prob pikindeki azalma, delesyon yönünde değerlendirildi.

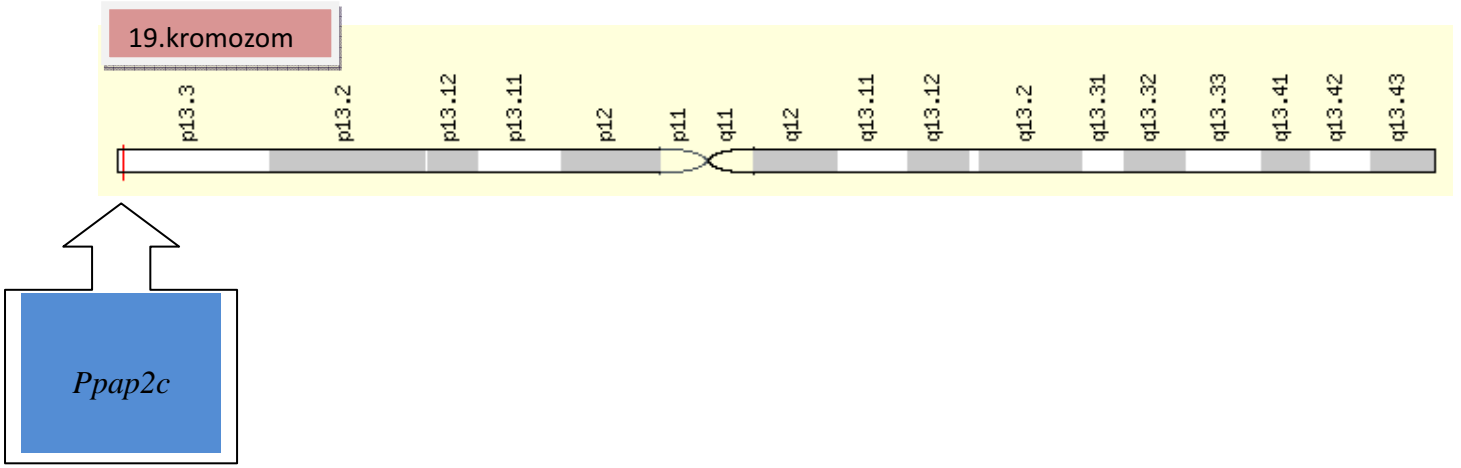
Ppap2c probuna ait M-21 hastamızın pik yüksekliği 5504, kontrol örneğinin pik yüksekliği ise 4401'di. Coffalayser programı kullanılarak yapılan değerlendirmede hasta ve kontrol piklerinin birbirine oranlaması neticesinde 1.43 değeri elde edildi (Şekil: 9). Bu değer 1.3'ten büyük olduğu için hastamızın *Ppap2c* prob pikindeki artma, duplikasyon yönünde değerlendirildi.



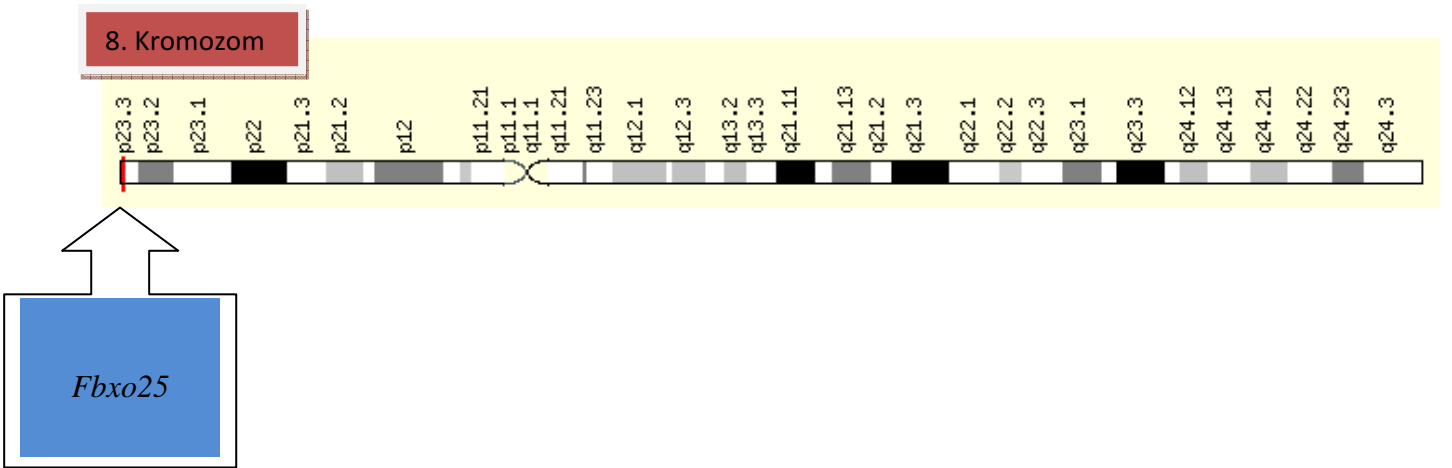
Şekil 8: M-16 numaralı hasta (üstte) ve kontrol örneğine (altta) ait karşılaştırmalı MLPA analiz sonuçları. Kırmızı ok *Fbxo25* probuna ait azalmış piki, beyaz ok kontrol örneğinin pikini göstermektedir.



Şekil 9: M-21 numaralı hasta (üstte) ve kontrol örneğine (altta) ait karşılaştırmalı MLPA analiz sonuçları. Kırmızı ok *Ppap2c* probuna ait artmış piki, beyaz ok kontrol örneğinin pikini göstermektedir.



Şekil 10: *Ppap2c*'nin 19. Kromozom lokalizasyonunun şematik gösterimi. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPAP2C&search=ppap2c> adresinden (81) değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 11: *Fbxo25* 'in 8. Kromozom lokalizasyonunun şematik gösterimi. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FBXO25&search=fbxo25> adresinden (82) değiştirilerek alınmıştır.

TARTIŞMA

5.1. Subtelomerik Değişikliklerin Sebep Olduğu Mental Retardasyonun Tanısında MLPA Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları:

Nüfusun yaklaşık % 1-3'ünü etkileyen mental retardasyonun etyolojisini aydınlatmak oldukça önem arz etmektedir. Fakat tüm uğraşlara rağmen MR hastalarının yaklaşık %50'sinde sebep belirlenmemektedir. MR'nin önemli bir kısmı bazı genlerin ürün dozajının değişimi ile sonuçlanan kromozomal yeniden düzenlenmelerden kaynaklanır. Kromozomların distal uçlarında yer alan subtelomerik bölgeler kromozomal yeniden düzenlenmelerin sıklıkla gerçekleştiği yer olduklarından, MR etyolojisinden özellikle sorumlu tutulmaktadır.

Klasik karyotiplemede ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde kromozom uçlarının beyaz, bant almamış alanlar olarak görülmesi ve ışık mikroskobuyla 5 Mb'dan küçük değişikliklerin saptanamaması bu bölgelere yönelik farklı tekniklere ihtiyaç doğurmuştur. a-CGH, SNP-array gibi tek işlemde birden çok bölgeyi değerlendirmeye olanak sağlayan array bazlı yaklaşımlar bu amaçla kullanılabilmeyle birlikte oldukça masraflı olması, gerekli laboratuvar ekipmanının henüz yaygın bir şekilde bulunmaması kullanımlarını kısıtlamaktadır. Subtelomerik FISH ise çoğu sitogenetik laboratuvarında subtelomerik bölgeleri incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmakla birlikte pahalı ve uğraştırıcı bir yöntemdir. Ayrıca FISH problemleri distal uçlara MLPA problemleri kadar yakın dizayn edilemediğinden küçük duplikasyonlar tespit edilememektedir (83). Subtelomerik FISH ve MLPA yöntemini karşılaştırmak amacıyla 30 MR hastasında bir çalışma yapılmış, 1 hasta dışında subtelomerik FISH ve MLPA sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuş, 1 hastada ise FISH ile sonuçlar normal bulunurken, MLPA SALSA P036 prob karışımıyla 4q duplikasyonu tespit edilmiştir (83). 95

MR olgusu ile yapılmış diğerk bir çalışmada 34 olguya hem MLPA hem subtelomerik FISH yontemi uygulanmış, MLPA ile 9 hastada dozaj değişikliği saptanmasına rağmen, FISH ile bu hastalarda herhangi bir değişiklik saptanamamıştır (38). Ek olarak, FISH problemleri 100-300 kb'lık diziye ozgu tasarlanabilirken MLPA problemleri 94-124 b ile hibridize olabilecek şekilde tasarlanabilmektedir. Bu sebeple kucuk duplikasyon ve delesyonların saptanmasında FISH, MLPA kadar duyarlı gorulmemektedir (37, 39).

MLPA, tek bir reaksiyonda birden çok hastanın aynı anda değerlendirmesine olanak veren nispeten hızlı (reaksiyon suresi yaklaşık 24 saattir), kolay ve ucuz bir yontemdir. MLPA yontemini uygulayabilmek için termal dongu cihazı ve kapiller elektroforez yeterli olmaktadır. Ayrıca, varolan kromozomal değişiklikleri saptayabilme oranı, diğerk subtelomerik inceleme yontemlerine gore daha yuksektir. Subtelomerik FISH yontemi ise pahalı olmasının yanında, her bir hasta için daha fazla zaman gerektirir ve uygulaması esnasında çok daha fazla laboratuvar emeği gereklidir. Stegmann ve ark. MKA-MR'li 466 kişilik bir hasta grubunda MLPA yonteminin duyarlılığını araştırmak için bir kohort çalışması duzenlemiş ve MLPA yontemiyle (P036 ve P070 kitleri kullanılarak) 57 kromozomal anomali tespit ettiğini bildirmiştir (% 12.2). Aynı alışmada MLPA yontemi kullanılmadığında subtelomerik FISH ile 57 kromozomal anomaliden sadece 39'u saptanmıştı (% 8.3). Stegmann ve ark. Laboratuvarlarındaki anomali saptama oranının MLPA sayesinde % 47'lik bir artış yakaladığını rapor etmişlerdir (39).

Bu sonuçlar MLPA yonteminin MR hastalarında subtelomerik değişikliği araştırmak amacıyla kullanımının etkin olacağını gostermektedir. Nitekim farklı çalışma gruplarının MR'li hastalarda yapmış olduğu çalışmalarda değişiklik saptama oranları %2.9- %13 arasında değişmektedir (23-24). Sonuçlar arasındaki farklılıklar buyuk oranda hasta seğimi kriterlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı duşunulmektedir. Hasta seğiminde mental retardasyona eşlik eden bir dismorfik bulgu varlığında anomali oranı artmaktadır. Mandal ve ark. 23'üne dismorfik bulguların eşlik ettiği toplam 65 MR hastası ile yapmış olduğu bir MLPA çalışmasında 3 hastada subtelomerik değişiklik olduğunu ve bu hastaların dismorfik bulguları olan hastalar olduğunu bildirmiştir. MR'ye fasiyal dismorfizmin eşlik ettiği hasta grubunda subtelomerik değişiklik saptama oranı % 13 iken, grubun tamamında bu oran % 4.6 olarak tespit edilmiştir (84).

Bir çalışmada dengeli translokasyon taşıyıcısı t(3;5)(p25;q31.1) MR'li bir hastada MLPA yöntemiyle 3p lokalizasyonlu subtelomerik delesyon saptanmış ve bu noktadan hareketle dengeli translokasyon taşıyan fakat mental retardasyon gibi anormal klinik bulguları olan bireylerde potansiyel küçük delesyon/amplifikasyonları gösterebilmek için MLPA'nın kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır (15).

Toplum için önemli bir hastalık olan MR etyolojisini tanımlayabilmek amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında subtelomerik FISH ve array tabanlı yöntemler pahalı ve fazla ekipman gerektirmektedir. Bununla birlikte Subtelomerik FISH incelemesinde her bir hasta için MLPA'ya göre daha fazla süre ve laboratuvar emeği gerekmektedir. Ayrıca küçük kopya sayısı değişikliklerini saptamada subtelomerik FISH yetersiz kalmaktadır. Tüm bu sonuçlar araştırmacıları daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem arayışına itmiştir. Tek reaksiyonda 1'den fazla hastada 46 bölgeyi gösterebilen MLPA'nın ayrıca çok küçük kopya sayısı değişikliklerini saptaması, kolay, maliyeti düşük ve hızlı olması, subtelomerik FISH ve array tabanlı araştırmalara göre, avantajlı yönünü oluşturmaktadır.

Yukarıda belirtilen avantajlarının yanında MLPA kullanımının bazı dezavantajları da vardır. Bunlar arasında, baz değişimlerini ve dengeli translokasyonları direkt olarak gösterememesi, çok küçük genomik değişiklikleri de saptayabildiğinden klinik önemi olmayan polimorfik varyantları da saptayabilmesi bulunmaktadır. Polimorfik varyasyonlardan kaynaklanacak yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldıracak doğru bir değerlendirme için diğer bir prob karışımıyla da sonuçların desteklenmesi önerilmektedir. Polimorfik varyantları patolojik değişikliklerden ayırmak için izlenebilecek diğer bir yol, ailenin diğer bireylerinde de çalışmanın tekrarlanmasıdır (38).

5.2. *Fbxo25* Prob Bölgesinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri:

46 probtan oluşan P070 prob karışımı ile 29 NSMR hastasında yapılan MLPA analizi neticesinde M-11 ve M-16 protokol numaralı hastalarımızda *Fbxo25* probuna ait sinyallerde azalma tespit edildi. Bu sinyaller normal kontrol örneklerinin pikleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bulundu.

2 hastamızda kopya sayısında azalma tespit ettiğimiz *Fbxo25* probunun hibridize olduğu dizi 8p23.3 yerleşimli *Fbxo25*'e aittir (şekil 11). *Fbxo25*'in ürünü olan F-box proteinleri sinaptik proteinlerin düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu bilinen SCF (Skp1/Cul1/FBP) tipindeki ubiquitin ligaz komplekslerine substrat spesifitesini sağlamakla yükümlüdür (88, 89). Ubiquitin aracılıklı proteolitik yolak 3 enzim kompleksinin aktivitesini gerektirir. Bu 3 enzim ubiquitin aktive eden enzim (E1), ubiquitin konjuge eden enzim (E2) ve sonuncu olarak ligaz (E3)'dır (90). SCF (Skp1/Cul1/FBP) kompleksleri E3'ün alt grubunda yer alır ve 5 proteinden oluşur: Cullin1 (Cul1), Roc1, Cdc34, Skp1 ve son olarak F-box proteini. Birçok F-box proteini tanımlanmıştır fakat deneysel olarak çok azı gösterilebilmiştir.

Ayrıca literatürde, *Fbxo25* ile alakalı, mental retardasyon ve epilepsi nedeniyle tetkik edilen, 46,X,t(X;8)(p11.2;p22.3) karyotipine sahip bir olguda yapılan ileri incelemelerde, 8p23.3 kırık noktasındaki *Fbxo25* 'te hasar olduğu ve söz konusu hasarın epilepsi ve mental retardasyon ile ilişkili olabileceğini öne süren bir çalışma bulunmaktadır (88). Aynı çalışmada *Fbxo25* ekspresyonunun embriyonik nöronal dokularda olduğu gibi erişkin beyinde de oldukça fazla olduğu gösterilmiştir.

Fbxo25 probuna ait piklerde azalma saptanılan 2 hastada NSMR olması, *Fbxo25*'in geninin, beynin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde önemli bir yolakta yer almış olabileceğini ve mental retardasyon ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir.

DECIPHER veri tabanında bildirilen *Fbxo25*'teki kopya sayısı değişiklikleri incelendiğinde *Fbxo25* 'i de içeren 8p23.3 bölgesinde 12 hastada kopya sayısında azalma olduğu, bunlardan 5'inde mental retardasyonun klinik tabloya eşlik ettiği dikkat çekmektedir. 5 hastada (DECIPHER kodları: 251426, 253194, 253195, 254627 ve 254962) fenotip ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamakla birlikte kalan 2 hastada (DECIPHER kodları: 2764 ve 249297) bildirilen fenotipe MR eşlik etmemektedir (Tablo 7).

DECIPHER veritabanında 8p23.3 bölgesinde KSD saptanan hastalardan birinde (DECIPHER kodu: 4088) MR'nin yanı sıra konuşma geriliği, kraniyosinostozis, dolikosefali, hidronefroz, ve küçük kulak, küçük ağız gibi minör dismorfik özellikler bulunduğu bildirilmiştir. Hastada hem 8p23.3'te 5.53 Mb'lık bir kayıp ve hem de 7p21.3'te 11.68 Mb'lık bir artış birlikte bulunmaktadır.

İkinci hastada (DECIPHER kodu: 251470) 8p23.3'te 2.11 Mb'lık kayıp ve 8p21'deki 14.15 Mb'lık artış birlikteliği ve belirgin alın, küçük burun, öne bakan burun delikleri, mikrognati, beslenme problemleri, hipotonisite, MR ve GG, konuşma geriliği gibi fenotipik özellikler olduğu rapor edilmiştir.

Üçüncü hastanın klinik bulguları mongoloid göz aksı, telekantus, hipertelorizm, belirgin kirpikler, basık burun kökü, geniş burun ucu, uzun filtrum, ince üst dudak, MR, GG ve otizm olarak tanımlanmıştır. Bu hastada (DECIPHER kodu: 256909) ise 4p16'da 9.71 Mb'lık artış ve 8p23.3'te 6.81 Mb'lık azalış görülmüştür.

Dördüncü hastada 8p23.3-23.2'de 6.69 Mb'lık kayıp, 8p23.1-11.21'de ise 31.59 Mb'lık geniş bir artış saptandığı belirtilmiştir (DECIPHER kodu: 254177). Fakat bu hastanın klinik bulguları diğer hastalarinkinden farklı olarak yapısal merkezi sinir sistemi anomalisi olarak değerlendirilen korpus kallozum agenezisi, doğumsal kalp defektleri arasında çocukluk çağında sıklıkla gözlemlenen ASD, sensorinöral sağırılık, MR, GG, strabismus gibi çoklu sistem anomalileri şeklindedir.

Son olarak beşinci hastada 8p23.3-24.3'te 32.40 Mb büyüklüğünde artış ve 8p23.3'te 3.05 M büyüklüğünde azalışın birlikte tespit edildiği (DECIPHER kodu: 251369), bu hastada mental retardasyon ve gelişme geriliği dışında herhangi bir klinik bulgu saptanmadığı bildirilmiştir.

DECIPHER veri tabanında klinik özellikleri ve KSD'leri ayrıntılı olarak izah edilen 5 hastanın fenotipik özelliklerinin arasındaki bu belirgin farklılık 8p23.3'teki KS azalmasının yanında başka KSD'nin de mevcut olmasına bağlı olabilir. 1'den fazla KSD olması durumunda hangi fenotipik özelliğin hangi KSD'ne bağlı olduğunu tespit etmek güçleşmektedir. Bu konuda ilgili veri tabanında herhangi bir yorum yapılmamıştır. Fakat 5 hastada da ortak olan tek bulgunun mental retardasyon olması mental retardasyon'un 8p23.3 lokalizasyonlu genler ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Tablo 7). Bununla birlikte beyin ve nöronal gelişim ile alakalı genlerin genomda oldukça yaygın yerleşimli olması nedeniyle bu hastalardaki farklı bölgelerin KSD'lerinin de mental retardasyon ile alakalı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

DECIPHER kodu	KSD'leri	8p23.3'teki KSD'nin başlangıç- bitiş(i)(bç)	Klinik Bulgular
2764	8p23.3'te kayıp	330897-421945	Hipotoni, nöbet, sivri parmaklar
4088	8p23.2-8p23.3'te kayıp 7p21.3-22.3'te artış	194617-5721428	Kraniyosinostozis, dolikosefali, hidronefroz, MR, küçük kulak, küçük ağız, konuşma geriliği
249297	8p23.2-8p23.3'te kayıp	190567-4776715	El anomalileri, büyük ayaklar, dil anomalisi
251369	8p23.2-8p23.3'te kayıp 8p23.3-24.3'te artış	176452-3223490	MR, GG
251426	8p23.3-8p23.1'de kayıp 8p22'de kayıp 1p36.33'de artış	73810-7752527	
251470	8p23.3'te kayıp 8p21.2-p11.2'de artış	91530-6914076	Öne bakan burun delikleri beslenme problemleri, hipotonisite, MR, GG, belirgin alın, mikrognati, küçük burun, konuşma geriliği
253194	8p23.3-8p23.1'de kayıp 8p23.1-21.2'de artış	191530-6914076	
253195	8p23.3-8p23.1'de kayıp 8p22-21.3'te artış	191530-6914076	
254177	8p23.2-8p23.3'te kayıp 8p23.1-p11.21'de artış	191560-6880334	KK agenezisi, ASD, sensorinöral sağırılık, MR, GG, strabismus
254627	8p23.3-8p23.1'de kayıp 8p22-21.2'de artış	10001-8079861	
254962	8p23.3-8p23.1'de kayıp 8p22-11.21'de artış	191530-6914076	
256909	8p23.3-23.1'de kayıp 4p 16.3-16.1'de artış	190568-6999220	Mongoloid göz aksı, telekantus, hipertelorizm, belirgin kirpikler, basık burun kökü, geniş burun ucu, uzun filtrum, ince üst dudak, MR,GG, otizm
M-11	<i>Fbxo25</i> prob bölgesinde azalma		MR
M-16	<i>Fbxo25</i> prob bölgesinde azalma		MR

Tablo 7: Çalışmamızda *Fbxo25* prob pikinde azalma tespit edilen hastaların ve DECIPHER v5.1 veri tabanında *FBXO25*'i de içeren bölgelerde meydana gelen KSD bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikler.

<https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=fbxo25&x=0&y=0> (e.t.: 25.08.2011) (91)

(MR: mental retardasyon, GG: gelişme geriliği, ASD: atriyal septal defekt, KK: korpus kallosum)

5.3. *Ppap2c* Prob Bölgesinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri:

Subtelomerik değişiklikler nedeniyle incelenilen M-21 protokollü hastamızın *Ppap2c* prob pikinde anlamlı artış saptandı. Hastada mental retardasyon dışında herhangi bir sendromla ilişkilendirilebilecek bir klinik özellik bulunmamaktaydı.

Ppap2c, 19p13.3 yerleşimli bir gen olup lipid fosfatlarının düzenlenmesinden sorumlu fosfatidik asit fosfataz ailesinin bir üyesidir (93) (şekil 10). Akciğer, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda ekspresyonu gözlenirken beyin ve kalp dokusunda ekspresyonunun düşük olduğu gösterilmiştir (94). Bu nedenle hastamızdaki mental retardasyonu *Ppap2c*'deki disfonksiyon ile açıklamak çok mümkün görünmemektedir.

Ppap2c probunun hibridize olduğu 19p13.3 bölgesiyle ilişkili olarak DECIPHER veritabanında 5 hasta bildirilmiş, bunların 2'sinde herhangi bir klinik bilgi verilmezken, 2' sinde MR'nin de eşlik ettiği klinik özellikler sıralanmıştır (Tablo 8). İlk hastada 19p13.3'te kayıp, 16q24.2-24.3'te artış ile birlikte MR, gelişme geriliği ve ASD tarif edilmektedir.

İkinci hastada ise MR ve gelişme geriliği kliniği olduğu, 19p13.3'te artış ve 17q25.3'te kayıp tespit edildiği belirtilmektedir.

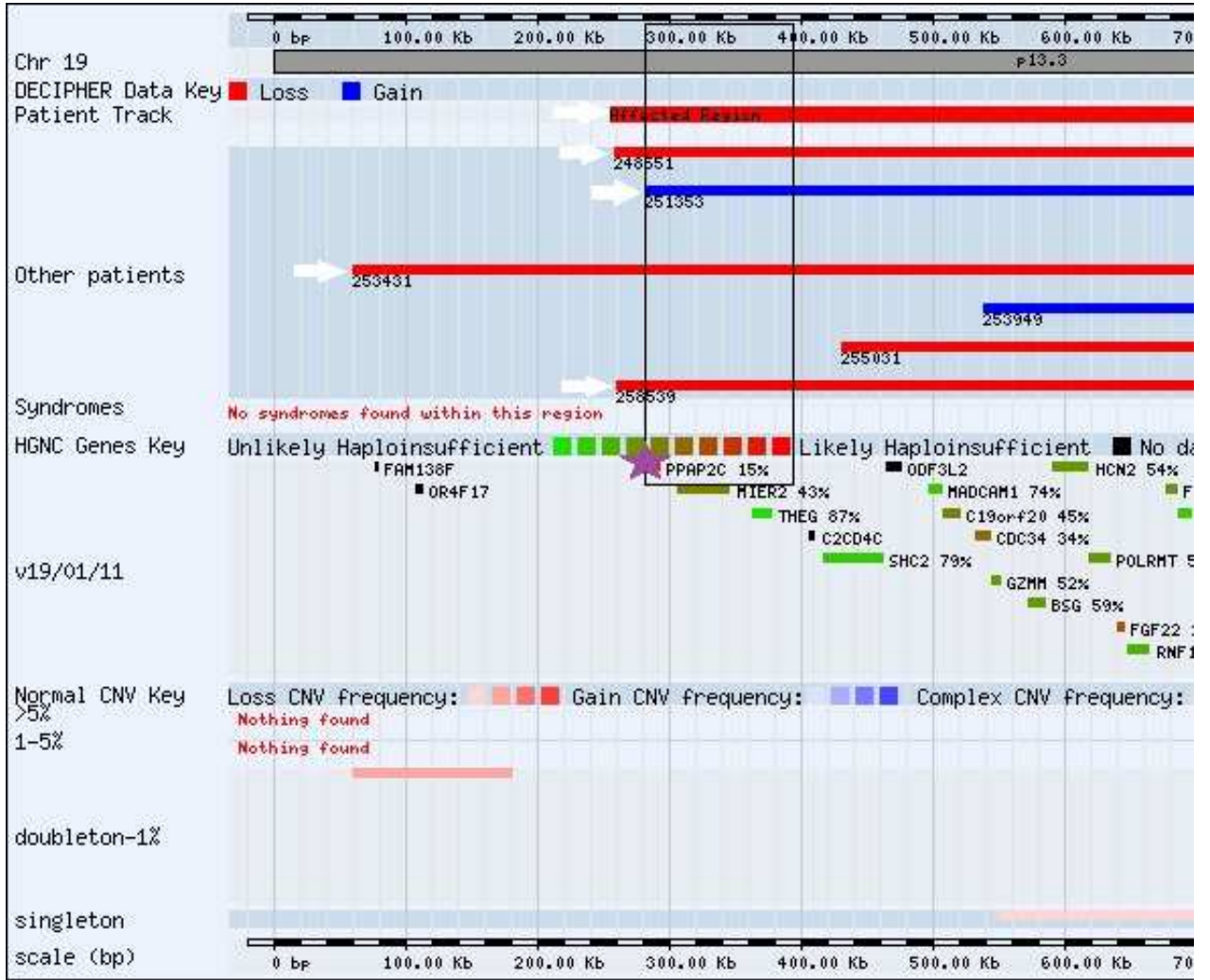
Ppap2c geninin komşuluğunda yer alan *Cdc34* incelendiğinde, bunun *Fbxo25*'in bulunduğu ubiquitin kompleksinin yolağında yer aldığı görülür. *Cdc34* ile yapılmış çalışmalarda mental retardasyon tablosuyla ilişkilendirilmiş olmasa da ubiquitin yolağının beyinde oldukça önemli görevler üstlenmesinden dolayı, yolaktaki herhangi bir problemin epilepsi, mental retardasyon gibi nörolojik bulgulara yol açabileceğinden hareketle *Cdc34*'ün de ortaya çıkabilecek nörolojik bulgular ile araştırılmaya değer bir gen olduğu ifade edilmektedir (95).

Nolan ve ark. aralarında akraba evliliği olan NSMR'li bir ailenin bireylerinde bağlantı analizi yapmış ve 19p13 lokalizasyonunda 3.6 Mb'lık kritik bir yoğunlaşma tespit etmişlerdir (96). Bu bölgenin *Ppap2c* probunun hibridize olduğu bölge olması 19p13 bölgesinin NSMR ile ilişkisini desteklemektedir.

Ppap2c komşuluğundaki *Cdc34*'te olası bir KSD, hastamızın mental retardasyon bulgusu ile ilişkili olabilir.

DECIPHER kodu	KSD'leri	19p13.3'teki KSD'nin başlangıç-bitişi(bç)	Klinik Bulgular
2212	19p13.3'te kayıp 16q24.2-24.3'te artış	255422-836619	ASD,MR,GG
248551	19p13.3'te kayıp	258319-1144485	
251353	19p13.3'te artış 17q25.3'te kayıp	281080-859907	MR, GG
253431	19p13.3'te kayıp	60001-1018631	
258539	19p13.3'te kayıp	259395-1144343	Seyrek saçlar, belirgin metopik sütün, bifrontal darlık, mongoloid göz aksı, epikantal katlantılar, sinorfiri, kısa burun, koanal atrezi, ince üst dudak, düşük ve arkada yerleşimli kulaklar, yüksek damak, klinodaktili, ASD, PDA, sık enfeksiyon geçirme
M-21	<i>Ppap2c</i> prob bölgesinde artış		MR

Tablo 8: Çalışmamızda *Ppap2c* prob pikinde artma tespit edilen hastanın ve DECIPHER v5.1 veri tabanında *Ppap2c*'i de içeren bölgelerde meydana gelen ksd bölgelerinin büyüklükleri ve neden oldukları fenotipik özellikler. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=ppap2c&x=0&y=0> (e.t.: 25.08.2011) (97) MR:mental retardasyon, GG: gelişme geriliği, ASD: atriyal septal defekt, PDA: Patent duktus arteriozus)



Şekil 13: DECIPHER veri tabanında *Ppap2c* 'in de yer aldığı 19p13.3 bölgesindeki kopya sayısı değişiklikleri. *Ppap2c* yıldız ile, DECIPHER veri tabanında 19p13.3'te delesyonu olduğu bildirilen hastalar ise beyaz oklarla gösterilmiştir. Mavi renk KS artışını, kırmızı renk KS azalışını göstermektedir.

<https://decipher.sanger.ac.uk/patient/2212> internet adresinden değiştirilerek alınmıştır.

e.t: 25/08/2011 (98)

5.4. Nonsendromik Mental Retardasyon ve Subtelomerik Bölgeler

Mental retardasyon ile ilgili günümüze değin birçok çalışma yapılmış, ilişkili birçok gen tanımlanmıştır (şekil 14). MR bireyde ek problemler olmaksızın tek başına bulunduğu “Nonsendromik Mental Retardasyon”, eşlik eden nörolojik bulgu veya majör fiziksel anomali varlığında ise “Sendromik Mental Retardasyon” olarak adlandırılır (29).

Online Mendelian Inheritance in Man veri tabanında yapılan ayrıntılı incelemelerde günümüze kadar MR ile ilişkili metabolik, nörolojik veya sendromik hastalıklarla ilişkilendirilmiş yaklaşık 300 gen tanımlanmıştır (şekil 14).

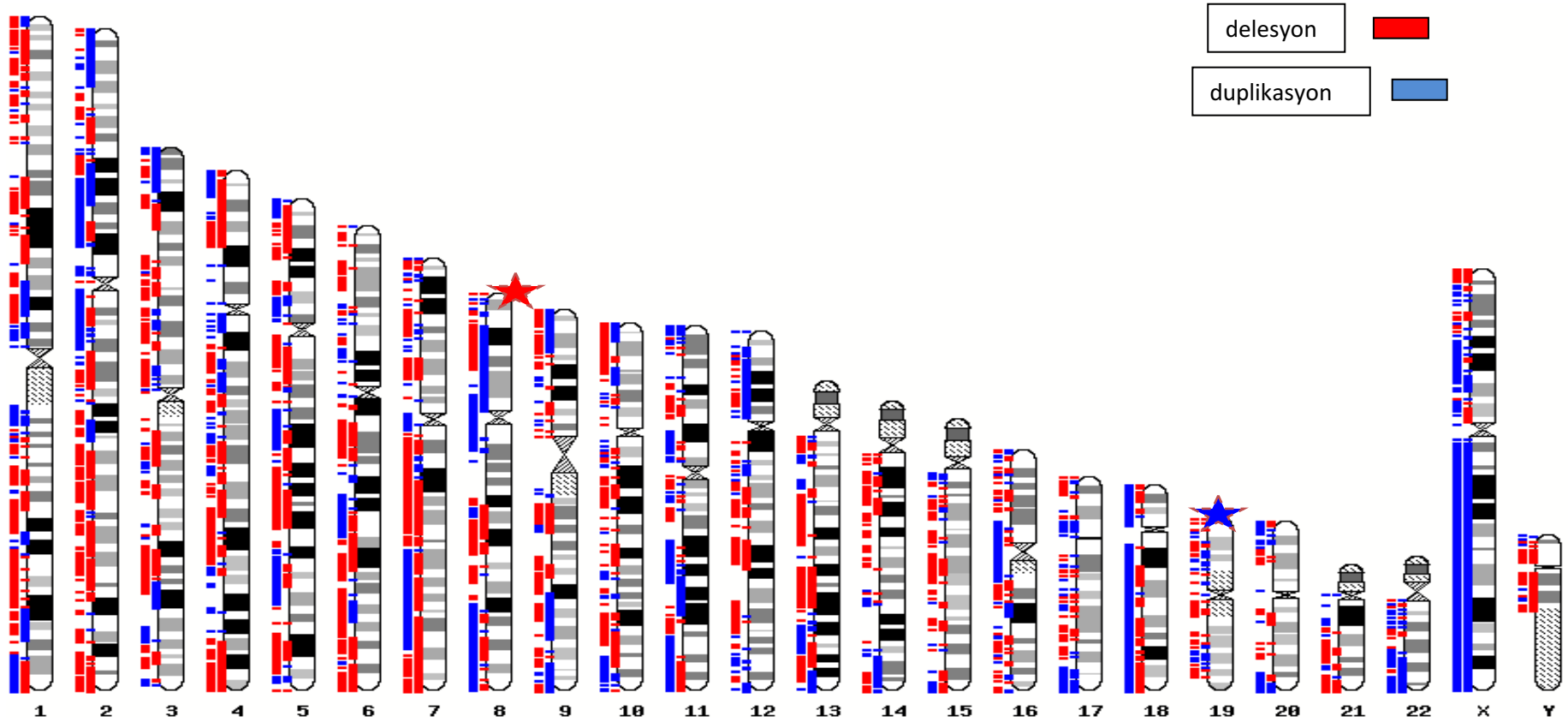
Tanımlanan genler doğrultusunda MR’ye sebep olan genetik mekanizmalar incelendiğinde sinaptogenezis veya sinaptik plastisitenin oluşumundan sorumlu genlerin ekspresyonundaki aksaklıklar, epigenetik faktörler ve kromatin yapısını düzenleyici mekanizmalar olarak ortaya çıkmaktadır (99- 101). Son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda MR etyolojisinde subtelomerik kopya sayısı değişiklikleri daha da önem kazanmıştır .

Nonsendromik MR’li hastalar, eşlik eden dikkat çekici fiziksel anomali olmaması nedeniyle genellikle çocuk psikiyatrisi ve nöroloji polikliniklerinden takip edilirler ve genetik polikliniklerine nispeten daha az başvururlar. Günümüze kadar NSMR’li hastalarda etyolojiye yönelik araştırmalar da yine bu sebeple çok yeterli değildir. Bağlantı analizi yöntemiyle günümüze değin 29 X-geçişli, 5 tane otozomal resesif geçişli gen tanımlanmıştır, bu iki grup NSMR olgularının sadece %10’unu oluşturmaktadır (102).

Subtelomerik değişikliklerin incelendiği çalışmalara baktığımızda sadece NSMR hastalarında yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığı dikkat çekmektedir. Subtelomerik değişiklikleri MLPA, a-CGH ya da subtelomerik FISH yöntemleriyle araştıran bazı çalışmalarda, MKA/MR’li hasta gruplarına nadir sayıda NSMR’li hastalar da dahil edilmiştir (103, 104).

Yapılan alışmalarda MR derecesinin subtelomerik değişiklik saptama oranlarına paralel olarak ağır ve orta düzeyde MR olgularından oluştuğu belirtilmektedir (104). Çalışma grubumuza alınan hastalardaki bulgular, literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.

Literatürde sadece NSMR hastalarında subtelomerik değişikliği araştıran bir çalışma bulunamaması bizim çalışmamızı daha da önemli hale getirmektedir.



Şekil 14: Mental Reartadsyon ile ilgili DECIPHER veri tabanında bildirilmiş kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlar üstünde gösterimi. Çalışmamızda KSD azalması tespit ettiğimiz FBXO25 gen bölgesi kırmızı yıldız ile, artma tespit ettiğimiz PPAP2C gen bölgesi mavi yıldız ile gösterilmiştir.

<https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=mental+retardation&x=8&y=11> adresinden değiştirilerek alınmıştır. (e.t:24.08.2011) (105)

5.5. Sonuç:

- Çalışmamız NSMR'li hasta grubunda subtelomerik değişiklikleri MLPA yöntemi ile inceleyen ilk çalışmadır.
- İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD polikliniğindeki sınırlı sayıda NSMR'li hasta grubunda MLPA yöntemiyle belirlenen subtelomerik değişiklik oranı % 12.5 dir.
- Değişik hasta gruplarında subtelomerik değişiklikleri incelemek amacıyla son zamanlarda kullanımı hızla artan hızlı, ucuz ve güvenilir bir yöntem olan MLPA, NSMR'li hasta gruplarında da başarıyla kullanılabilir.
- NSMR'li hastalarımızın 2'sinde 8p23.3 yerleşimli *Fbxo25* probu ile kopya sayısında azalma tespit edildi. Bu değişiklikler *Fbxo25* probu ile ilişkili olup, bu probun hibridize olduğu *Fbxo25*'teki aberrasyonlar DECIPHER veri tabanında bildirilen hastalarda da MR ile ilişkili bulunmuştur.
- NSMR'li 1 hastamızda 19p13.3 yerleşimli *Ppap2c* probuna ait kopya sayısında artma tespit edildi. *Ppap2c* probunun hibridize olduğu bölge DECIPHER veritabanında bildirilen hastalarda da MR ile ilişkili bulunmuştur. *Ppap2c* yakınında yerleşim gösteren CDC34 geni de bu bölgedeki potansiyel mental retardasyon ilişkili genlerden biri olabilir.
- Aileler ve hastalar için büyük bir sorun oluşturan MR'nin genetik tanısının konulması, planlanacak gebelikler için de prenatal tanı imkanı sağlayabilecektir. MLPA verileri başka bir yöntemle doğrulandıktan sonra prenatal tanı için kullanılabilir. MLPA yönteminin, array-CGH ve subtelomerik FISH kadar pahalı olmaması, hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle, NSMR hasta gruplarında da kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lesca G, Bernard V, Bozon M, Touraine R, Ge´rard D, Edery P, Calender A. Mutation screening of the MECP2 gene in a large cohort of 613 fragile-X negative patients with mental retardation. *Eur J Med Genet*; 2007 (50): 200-208.
2. Stornetta RL, Zhu JJ. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist*; 2011 (17):54-78.
3. Checlacz M, Gleeson JG. Is Mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatr Neurol*; 2003 (29):11-17.
4. Moog U. The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. *Am J Med Genet*; 2005 (137A): 228-231.
5. Kodama Y. Cytogenetic and dermatographic studies on severely handicapped patients in an institution. *Acta Medica Okayama*; 1982 (36): 383-398.
6. Felix TM, Leite JC, Maluf SW, Coelho JC. A genetic diagnostic survey in a population of 202 mentally retarded institutionalized patients in the south of Brazil. *Clin Genet*; 1998 (54): 219-223.
7. Hou JW, Wang TR, Chuang SM. An epidemiological and aetiological study of children with intellectual disability in Taiwan. *J Intellect Disabil Res*; 1998 (42): 137–143.
8. Bedeschi MF, Bonaglia MC, Grasso R, Pellegrini A, Garghentino RR, Battaglia MA, et al. Agenesis of the Corpus Callosum: Clinical and Genetic Study in 63 Young Patients. *Pediatr Neurol*; 2006 (34):186-193.
9. Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1992 (89): 4913-4917.
10. Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L: Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med*; 2001(7): 497-501.
11. Xu J, Chen Z: Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*; 2003 (117C): 15-24.
12. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM: Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with

- developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*; 2007 (143A): 1431-1441.
13. Edelman L, Hirschhorn K: Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*; 2009 (1151): 157-166.
 14. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR ve ark. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A*; 2008 (146A): 2242-2251.
 15. Rooms L, Reyniers E, Van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, ve ark. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat*; 2004 (23): 17-21.
 16. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, McGhie JD, Coffa J, Schouten J, ve ark. Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Hum Mutat*; 2005 (26): 477-486.
 17. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A, ve ark. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet*; 2005 (48): 388-396.
 18. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, ve ark. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*; 1999 (354): 1676-1681.
 19. Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci*; 2007 (8): 287-299.
 20. Kleefstra T, Smidt M, Banning MJ, Oudakker AR, Van Esch H, de Brouwer AP ve ark. Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *J Med Genet*; 2005 (42): 299-306.
 21. Hila L, Tébourbi H, Abaied L, Rejeb I, Ben Jemaa L, Chaabouni H. MLPA subtelomere analysis in Tunisian mentally retarded patients. *Biochem Genet*; 2009 (47): 727-733.

22. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S ve ark. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet*; 2006 (69): 58-64.
23. Ropers H. X linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev*; 2006 (16): 260-269.
24. Aicardi J. Diseases of the Nervous System in Childhood, 2nd edition. Cambridge University Press, Suffolk, 1998.
25. American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed, Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994. xxvii 886p.
26. Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decoufle P, Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol*; 1997 (39): 142-149
27. Daily DK, Ardinger HH, and Holmes GE. Identification and Evaluation of Mental Retardation (15.02.2000). University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas
28. Moeschler JB, Shevell M. The Committee on Genetics Clinical Genetic Evaluation of the Child With Mental Retardation or Developmental Delays. *Pediatrics*; 2006 (117): 2304-2316.
29. Rehman S, Baig SM, Eiberg H, Rehman S, Ahmad I, Malik NA ve ark. Autozygosity mapping of a large consanguineous Pakistani family reveals a novel non-syndromic autosomal recessive mental retardation locus on 11p15-tel. *Neurogenetics*; 2011 (12): 247-251.
30. Okan M, Özdemir Ö. Çocuklarda Mental Retardasyon. *Güncel Pediatri*; 2005 (3): 62-66.
31. Winpenninckx B, Rooms L, Kooy RF. Mental Retardation: a Review of The Genetic Causes. *The British Journal of Developmental Disabilities*; 2003 (49): 29-44
32. Shevell IM, Swaiman FK. Global developmental delay and mental retardation. In Swaiman F K, Ashwal S ed. Pediatric Neurology. Third edition. Philadelphia: Mosby 1999: 551-60.

33. Evans BO. Mental Retardation. In: Evans BO Ed. Manual of Child Neurology. Edinburg, 1987; 149-57.
34. Yalaz K. Çocuk hekimi ve mental motor retardasyon. *Hacettepe Üniversitesi Çocuk Nöroloji Bölümü ve Çocuk Nöroloji Derneği, Mezuniyet sonrası sürekli eğitim semineri kitabı*. 1997; 1-78.
35. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S ve ark. Evaluation of Mental Retardation: Recommendations of a Consensus Conference. *Am J Med Genet*; 1997 (72): 468-477.
36. Tucker ME, Garringer HJ, Weaver DD. Phenotypic spectrum of mosaic trisomy18: two new patients, a literature review, and counseling issues. *Am J Med Genet A*; 2007 (143): 505-517.
37. Davenport ML. Approach to the patient with Turner syndrome. University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599-27039.
38. Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med*; 2006 (147): 295-300.
39. Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet*; 2008 (51): 93-105.
40. Basel-Vanagaite L. Genetics of autosomal recessive non-syndromic mental retardation: recent advances. *Clin Genet*; 2007 (72): 167-174.
41. Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*; 2005 (6): 46-57.
42. Chonchaiya W, Schneider A, Hagerman RJ. Fragile X: a family of disorders. *Adv Pediatr*; 2009 (56): 165-186.
43. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*; 2000 (9): 901-908.
44. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*; 1993 (8): 1147-1153.

45. Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moine H. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell*; 2003 (95): 221-228.
46. Willemsen R, Oostra BA, Bassell GJ, Dichtenberg J. The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*; 2004 (10): 60-67.
47. Godde JS, Kass SU, Hirst MC, Wolffe AP. Nucleosome assembly on methylated CGG triplet repeats in the fragile X mental retardation gene 1 promoter. *J Biol Chem*; 1996 (271): 24325-24328.
48. Raffa B. *Journal of Young Investigators*; 2007. Volume 17.
49. Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol*; 2005 (204): 8-20.
50. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; 2010 (22): 161-187.
51. Greenwood Genetic Center handout. www.ggc.org/xlmr.html- March 2010 updated.
52. http://www.ggc.org/images/XLID_92-gene_brochure.pdf (erişim tarihi: 26/08/2011)
53. Poplawski NK. Investigating intellectual disability: a genetic perspective. *J Paediatr Child Health*; 2003 (39): 492-506.
54. Wechsler Memory Scale—Fourth Edition (WMS—IV). 2008: Pearson
55. Terman LM and Merrill MA. Stanford-Binet intelligence scale; manual for the third revision form L-M. Houghton Mifflin Company tests. 1960, Boston, Houghton Mifflin. 363 p.
56. Durmazlar N, Ozturk C, Ural B, Karaagaoglu E, Anlar B. Turkish children's performance on Denver II: effect of sex and mother's education. *Dev Med Child Neurol*; 1998 (40): 411-416.
57. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, ve ark. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1988 (85): 6622-6626.

58. Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet*; 2003 (9388): 983-988.
59. Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*; 2004 (11): 407-421.
60. Bayne S, Liu JP. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 2005 (240): 11-22.
61. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA ve ark. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immuno*; 1995 (155): 3711-3715.
62. Rodier F, Kim SH, Nijjar T, Yaswen P, Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 2005 (37): 977-990.
63. Basaran A. (Ed.) *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı. Günes & Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa, 2002; s. 199-210.*
64. <http://www.genome.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/chromosome.shtml> und User: PhroodAutor: San Jose, 23.11.2005.
65. Barlow AL, Hulten MA. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis 1 human spermatocytes. *Chromosome Res*; 1996 (4): 562-573.
66. Wilkie AO, Higgs DR, Rack KA, et al. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell*; 1991 (64): 595-606.
67. Brown WR, MacKinnon PJ, Villasante A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell*; 1990 (63): 119-132.
68. Blouin JL, Christie DH, Gos A, Lynn A, Morris MA, Ledbetter DH, Chakravarti A, Antonarakis SE. A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Hum Genet*; 1995 (57): 388-394.
69. Laurie DA, Hulten MA. Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet*; 1985 (49): 203-214.

70. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK ve ark. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*; 1996 (5): 685-691.
71. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*; 2008 (13): 760. doi:10.1016/j.drudis. 2008.06.007
72. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*; 2002 (30): e57.
73. Eijk-Van Os PG, Schouten JP. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol*; 2011 (688): 97-126.
74. Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. *Anal Chem*; 2008 (80): 9363-9368.
75. Ohnesorg T, Turbitt E, White SJ. The many faces of MLPA. *Methods Mol Biol*; 2011 (687): 193-205.
76. Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A*; 2005 (139): 231-233.
77. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A ve ark. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics*; 2007 (8): 9.
78. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*; 2007 (17): 182-192.
79. Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and balanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn*; 2007 (8): 765-771.

80. Morissette G, Flamand L. Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol*; 2010 (84): 12100-12109.
81. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPAP2C&search=ppap2c>.
82. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FBXO25&search=fbxo25>.
83. Hila L, Tébourbi H, Abeid L, Rejeb I, Chaabouni H. Subtelomeric microduplications in three sisters with moderate mental retardation. *Biochem Genet*; 2010 (48): 909-914.
84. Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke SR. Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr*; 2009 (76): 1027-10231.
85. Hagberg B, Hagberg G, Lewwerth A, Lindberg U. Mild mental retardation in Swedish school children. *Acta Paediatr Scand*; 1981 (70): 445-452.
86. Bradley Schaefer G, Bodensteiner JB. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin North Am*; 1992 (39): 929-943.
87. Raynham H, Gibbons R, Flint J, Higgs D. The genetic basis for mental retardation. *Q J Med*; 1996 (89): 169-175.
88. Hagens O, Minina E, Schweiger S, Ropers HH, Kalscheuer V. Characterization of FBX25, encoding a novel brain-expressed F-box protein. *Biochim Biophys Acta*; 2006 (1760): 110-118.
89. Speese SD, Trotta N, Rodesch CK, Aravamudan B, Broadie K. The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr Biol*; 2003 (13): 899-910.
90. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*; 2002 (82): 373-428.
91. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=fbxo25&x=0&y=0>.
92. https://decipher.sanger.ac.uk/patient/253198#t_features.
93. Flanagan JM, Funes JM, Henderson S, Wild L, Carey N, Boshoff C. Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets. *Mol Cancer Ther*. 2009 (1): 249-260.
94. Zhang N, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Gridley T. Cloning, expression, and chromosomal localization of a mouse gene homologous to the germ cell migration

- regulatorwunen and to type 2 phosphatidic acid phosphatases. *Genomics*. 2000 (63): 142-144.
95. Sadowski M, Mawson A, Baker R, Sarcevic B. Cdc34 C-terminal tail phosphorylation regulates Skp1/cullin/F-box (SCF)-mediated ubiquitination and cell cycle progression. *Biochem J*. 2007 (405): 569-581.
96. Nolan DK, Chen P, Das S, Ober C, Waggoner D. Fine mapping of a locus for nonsyndromic mental retardation on chromosome 19p13. *Am J Med Genet A*; 2008 (146A): 1414-1422.
97. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=ppap2c&x=0&y=0> (erişim tarihi: 25.08.2011).
98. <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/2212>.
99. Harel S, Jenna S. Curing mental retardation: searching for balance. *Med Sci*; 2011 (27): 70-76.
100. Iwase S, Shi Y. Histone and DNA modifications in mental retardation. *Prog Drug Res*; 2011 (67): 147-173.
101. Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P. "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital J Pediatr*; 2010 (36): 17.
102. Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D, Noreau A, Yang Y, Pellerin S, ve ark. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med*; 2009 (360): 599-605.
103. Utine GE, Celik T, Alanay Y, Alikasıfoğlu M, Boduroğlu K, Tunçbilek E, Aktaş D. Subtelomeric rearrangements in mental retardation: Hacettepe University experience in 130 patients. *Turk J Pediatr*; 2009 (51): 199-206.
104. Anderlid BM, Schoumans J, Annerén G, Sahlén S, Kyllerman M, Vujic M, ve ark. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet*; 2002 (107): 275-284.
105. <https://decipher.sanger.ac.uk/search?q=mental+retardation&x=8&y=11>.