

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA BAZI
MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ezgi HALATLI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ezgi HALATLI tarafından hazırlanan “**Sendromsuz Dudak Damak Yarıklı Türk Hastalarda Bazı Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 02/11/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Osman KETENOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Doç. Dr. Hakkı Taştan
Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Doç. Dr. Nursel GÜL
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA BAZI MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Ezgi HALATLI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman KETENOĞLU

Dudak ve/veya damak yarıkları doğuştan meydana gelen, en yaygın doğum kusurlarından biri olarak, insanlarda dünya genelinde 1-500/1000, Türk bireylerde 0.95/1000 oranında gözlenmektedir. Hastalık, genetik ve çevresel faktörlerin dahil olduğu çok faktörlü etiyolojiye sahiptir. Dudak damak yarıklarının, yaklaşık olarak %70'inde sendromsuz; %30'unun da sendromik olgudan birinin bulunduğu saptanmıştır. Sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklarının oluşmasına neden olan çok sayıda aday gen bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda sendromsuz D/DY yarıklı vakalarda, başka populasyonlarda saptanan aday genler olan MSX1 ve IRF6 genlerinde meydana gelen bazı polimorfizmlerin tanımlanarak, Türk populasyonunda sıklığının araştırılmasıdır. Çalışmamızda, akraba olmayan 71 sendromsuz DDY vakası ile 89 kontrol bireyi genotipik olarak karşılaştırılarak vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Sırasıyla, MSX1 ve IRF6 genlerinde meydana gelen -8796A>G ve 820 G>A polimorfizmleri PCR-RFLP tekniği ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, IRF6 820 G>A (p=1) değişiminin aksine Türk sendromsuz D/DY'lı vakalarda, yarık oluşumu için MSX1 -8796A>G polimorfizmi (p=0.008849) yaygın bir neden olarak saptanmıştır.

Kasım 2010, 59 sayfa

Anahtar Kelimeler: Dudak yarığı, damak yarığı, sendromsuz dudak yarığı ve/veya damak yarığı, Türkiye

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF SOME MUTATION TYPES IN TURKISH PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP AND/OR PALATE

Ezgi HALATLI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Professor Dr. Osman KETENOĞLU

Cleft lip and/or cleft palate is one of the most common congenital malformation in humans that prevalence is a 1-500/1000 worldwide and 0.95/1000 in Turkish individuals. The etiology of disease is multifactorial, which is combined of genetic and environmental factors. Nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate has a higher prevalence, approximately 70% higher than the syndromic type. Numerous candidate genes determined as a cause of nonsyndromic CL/P. The aim of the present study is to define some polymorphisms of mutations in IRF6 and MSX1 genes and to investigate the prevalence in the Turkish nonsyndromic cleft lip and palate population. In our research, we compare 71 unrelated nonsyndromic CL/P cases and 89 unrelated control individuals in case-control study. -8796A>G ve 820 G>A polymorphisms in MSX1 and IRF6 genes were analyzed by PCR-PFLP technique, respectively. -8796A>G polymorphism ($p=0.008849$) of the MSX1 gene is a common cause for cleft occurrence in Turkish nonsyndromic CL/P patient unlike IRF6 820G→A polymorphism($p=1$).

November 2010, 59 pages

Key Words: Cleft lip, cleft palate, nonsyndromic cleft lip and/or palate, mutation, Turkish

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca paylaştığı bilgi ve deneyimleriyle, gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmam boyunca destek olan değerli hocam Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN'a, değerli danışman hocam Osman KETENOĞLU'na, klinik örneklerin toplanmasındaki büyük katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Marmara Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Erhan ÖZDİLER'e, istatistiksel analizlerimde yardımlarını aldığım İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı'ndan Bio. Dr. Nuray Gürel POLAT'a, yüksek öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olup, benim için çok önemli olan manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili dostlarım Bio. Ceren TİLGEN, Uzm. Bio. Özlem ŞEKER'e, yaşamım boyunca sonsuz sevgi ve destekleriyle bana yardımcı olarak her zaman yanımda olan aileme ve yakınlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü tarafından 2009-K-12-0490 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Ezgi HALATLI

Ankara, Kasım 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Dudak ve Damak	3
2.2 Dudak ve Damağın Embriyolojik Gelişimi.....	4
2.3 Dudak ve Damak Yarıkları Sınıflandırılması	7
2.4 Dudak Damak Yarıklarının Etiyolojisi.....	10
2.5 Dudak Damak Yarıklarının Görülme Sıklığı.....	10
2.6 Sendromsuz Dudak Damak Yarıklarında Genlerin Rolü.....	12
2.6.1 IRF6 geni.....	14
2.6.1.1 IRF6 geninin yapısı	14
2.6.1.2 IRF6 gen ifadesi.....	15
2.6.1.3 IRF6 geni ve dudak damak yarıkları	16
2.6.2 MSX1 geni.....	18
2.6.2.1 MSX1 geninin yapısı	18
2.6.2.2 MSX1 gen ifadesi.....	19
2.6.2.3 MSX1 geni ve dudak damak yarıkları	20
2.7 Dudak Damak Yarıklarının Oluşmasında İlaç Kullanımının Etkileri ve Çevresel Faktörler.....	22
2.8 Dudak ve Damak Yarıklarının Tanısı ve Yaşam Boyu Etkileri	25
2.9 Dudak Damak Yarığı Hastalarındaki Mutasyonların Saptanması İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler	25
2.9.1 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	25
2.9.2 Restriksiyon enzimleri	27
2.9.3 Restriksiyon fragmentinin uzunluk polimorfizmi	27

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1 Materyal.....	29
3.1.1 Çalışma grubu	29
3.1.2 Kimyasal malzemeler.....	29
3.1.3 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler	30
3.1.4 Solüsyonlar	31
3.1.4.1 Periferel kandan DNA izolasyon çalışmaları	31
3.1.4.2 Agaroz jel elektroforez solüsyonları.....	32
3.2 Yöntem	33
3.2.1 Periferel kandan fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu	33
3.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu ile IRF6 ve MSX1 genlerindeki mutasyonların analizi	34
3.2.2.1 Çoğaltmada kullanılacak primerlerin seçimi	34
3.2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	35
3.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi.....	36
3.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu/ Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi işlemleri.....	37
3.2.4.1 PZR/RPUP (PCR/RFLP) ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi	37
3.2.5 İstatistiksel Yöntemler	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 IRF6 ve MSX1 Genlerinin Amplifikasyon Sonuçları.....	39
4.2 IRF6 ve MSX1 Genlerinin RFLP Sonuçları.....	39
4.3 IRF6 ve MSX1 Genlerinde Elde Edilen Genotip Sonuçları.....	40
4.4 Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması ve Allel ve Genotip Frekanslarının Hesaplanması	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER DİZİNİ

χ^2	Ki-kare
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
BBF	Blue Bromo Fenol
BMP	Kemik morfogenetik protein
CLO	Cleft lip only
CLP	Cleft Lip and palate
CPO	Cleft palate only
DDY	Dudak Damak Yarığı
df	Degrees of freedom
Dk	dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	deoksiribonükleotidtrifosfat
DLX5	Distal Less Homeobox 5
DY	Damak Yarığı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
gr	Gram
GSTT1	Maternal glutation s-transferaz θ -1
IRF6	Interferon Regüle-edici Faktörü
M	Molarite
MES	Medial edge epithelium
Mg	Magnezyum
mg	miligram
ml	mililitre
MIM	Mendelian inheritance in man
mM	miliMolar
MSX1	Mouse Segment Homolog Proteini
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat Redüktaz
OMIM	Online Mendelian inheritance in man
OR	Odds ratio
PAX3	Paired Box 3
PHT	Fenitoin terotejeni
PVRL1	Polivirüs Reseptör Benzeri Protein 1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	Restriksiyon enzimi
RFLP	Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri
rpm	Rounds per minute
SMIR	Smad-interferon düzenleyici faktör-bağlanma domaini
sn	Saniye
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
ssh	Sonic hedgehog
TGFA	Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
TGFB3	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 3
u	ünite
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Damağın yapısı	3
Şekil 2.2	Dudak ve damağın yapısı.....	4
Şekil 2.3	Hamileliğin 4. haftasında yüzün gelişimi	5
Şekil 2.4	Embriyo gelişiminde 6. , 7. ve 8. haftalar	5
Şekil 2.5	Embriyonik gelişim 9. haftada damak gelişimi	6
Şekil 2.6	Kernahan ve Stark'ın sadece primer damak sınıflandırması	8
Şekil 2.7	Kernahan ve Stark'ın Sadece Sekonder damak yarığı.....	8
Şekil 2.8	Kernahan ve Stark'ın Primer-Sekonder damak yarıkları.....	9
Şekil 2.9	Sendromik dudak damak yarıkları	10
Şekil 2.10	IRF6'nın kromozom 1 üzerindeki yeri	14
Şekil 2.11	IRF6 geninin yapısı.....	14
Şekil 2.12	İntermaksilar segment 9-10. haftalarda üst dudağın (UL) filtrumuna (Ph) ve primer damağa(PP) dönüşmekte, damak rafları üst ve alt tarafa doğru nazal septumla birlikte kaynaşmakta, damak orta kenar epitelinde IRF6 ekspresyonu görülmekte	15
Şekil 2.13	Van der Woude Sendromlu hasta	17
Şekil 2.14	Popliteal Pterygium Sendromlu hasta.....	17
Şekil 2.15	Kromozom 4 üzerinde MSX1 geni	19
Şekil 2.16	MSX1 geninin yapısı	19
Şekil 2.17	İnsanda embriyonik dönemde A) 7. hafta da, B) 8. haftada MSX1.....	20
Şekil 2.18	Witkop sendromunda tırnak ve diş formasyon bozuklukları.....	21
Şekil 2.19	Wolf Hirschhorn Sendromlu hastada dudak yarığı.....	22
Şekil 2.20	Şematik olarak polimeraz zincir reaksiyonu gösterimi.....	26
Şekil 2.21	Restriksiyon endonükleaz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılan ürünün kesilip agaroz jelde görüntülenmesinin şematik olarak gösterimi.....	28
Şekil 4.1	IRF6 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntülenmesi	39
Şekil 4.2	MSX1 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntülenmesi.....	39
Şekil 4.3	IRF6 geni <i>MboI</i> restriksiyon endonükleaz enzim kesimi agaroz jel Görüntüsü.....	40
Şekil 4.4	MSX1 geni <i>Bsp119</i> restriksiyon endonükleaz enzim kesimi agaroz jel Görüntüsü.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Dudak yarığı, damak yarığı ve dudak damak yarığının etnik kimlik ve cinsiyete göre prevalansı	11
Çizelge 2.2	Sendromsuz dudak damak yarıklarındaki bazı aday genler, çevresel etkileşimleri, neden olduğu sendromlar ve gen fonksiyonları	13
Çizelge 2.3	Van der Woude Sendromu ve Popliteal Pterygium Sendromu'nun IRF6 ile ilişkisi	16
Çizelge 2.4	Witkop Sendromu ve Wolf Hirschhorn Sendromuyla MSX1'in ilişkisi ...	20
Çizelge 2.5	Bazı Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve dizileri	27
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	29
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan gereç ve cihazlar	30
Çizelge 3.3	IRF6 geni amplifikasyonunda kullanılan primerler	34
Çizelge 3.4	MSX1 geni amplifikasyonunda kullanılan primerler	35
Çizelge 3.5	Amplifikasyonda kullanılan polimeraz zincir reaksiyon karışımları	35
Çizelge 3.6	IRF6 geninin amplifikasyonunda kullanılan döngü basamakları	36
Çizelge 3.7	MSX1 geninin amplifikasyonunda kullanılan döngü basamakları	36
Çizelge 3.8	IRF6 geni ve MSX1 geni restriksiyon endonükleaz enzimi reaksiyon Karışımları	37
Çizelge 4.1	IRF6 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler	41
Çizelge 4.2	MSX1 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler	41
Çizelge 4.3	IRF6 geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri	42
Çizelge 4.4	MSX1 geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri	43

1. GİRİŞ

Sendromsuz dudak ve damak yarıkları konjenital (doğuştan) bozuklukların en yaygın sınıflarından birini temsil etmektedir. Dünya genelinde bu bozukluk coğrafi etkenlere, etnik kökene bağlı olarak her 500–1000 doğumda 1 bireye etki ettiği saptanmış olan genel bir sağlık problemidir (Murray ve Schutte 2004).

Bireylerde dudakta ve damakta yarıklık oluşumunun nedeni karmaşıktır. Hastalığın patogenezi hem genetik hem de çevresel etkiler rol oynamaktadır (Jugessur ve Murray 2005).

Orofasiyal yarıklar (baş ve yüzle ilgili olan yarıklar) diğer konjenital anomalilerin varlığına dayandırılarak sendromik veya sendromsuz olarak sınıflandırılırlar. Dudak damak yarıklarının, yaklaşık olarak %70’inde sendromsuz; kendiliğinden oluşan bozukluklar izlenirken, %30’unun da 400’den fazla tanımlanmış olan sendromik olgudan birinin bulunduğu saptanmıştır. Aday genlerin tanımlanmasında öncülük eden bu sendromlar genellikle basit Mendelyan kalıtımına sahiptir (Sözen vd. 2009).

Sendromsuz yarıklar “sadece dudak yarığı” (CLO-cleft lip only MIM 119530)”, “sadece damak yarığı”(CPO, cleft palate only-MIM 119540), “dudak damak yarığı” (CLP, cleft lip ve palate –MIM 119530) olarak fenotiplere ayrılabilir. “Sadece dudak yarığı ve “dudak damak yarığı”, genelde “damak yarıklı ve/veya yarıksız dudak yarığı” olarak “sadece damak yarığı”ndan ayrılmaktadır (Morküniené vd. 2006). Orofasiyal yapıların oluşmasında görev alan Msh homeobox 1 (MSX1) gibi transkripsiyon faktörleri, dönüştürücü büyüme faktör β (TGF- β) süper ailesinin üyeleri, kemik morfogenetik proteinleri, sonik hedgehog (Shh) gibi sinyal yolları, fibroblast büyüme faktörlerini (FGFs) gibi büyüme faktörleri ve reseptörlerini içeren genlerin sıralamasının sıkı bir kontrolü altındadır (Stanier ve Moore 2004).

Bugüne kadar Asya, Avrupa, Güney ve Kuzey Amerika’daki sendromsuz dudak damak

yarıklı bireylerde aday genlerin saptanması ve haritalanması konusunda birçok araştırma yapılmış ve IRF6 ve MSX1 genlerindeki mutasyonlar haritalanmış ve sıklıkları hesaplanmıştır (Lidral vd. 1998, Beaty vd. 2001, Blanco vd. 2004, Fallin vd. 2003, Jezewski vd. 2003, Jugessur vd. 2003, Vieira vd. 2003, Moreno vd. 2004, Vieira vd. 2005, Modesto vd. 2006, Tongkobpetch vd. 2006, Park vd. 2007).

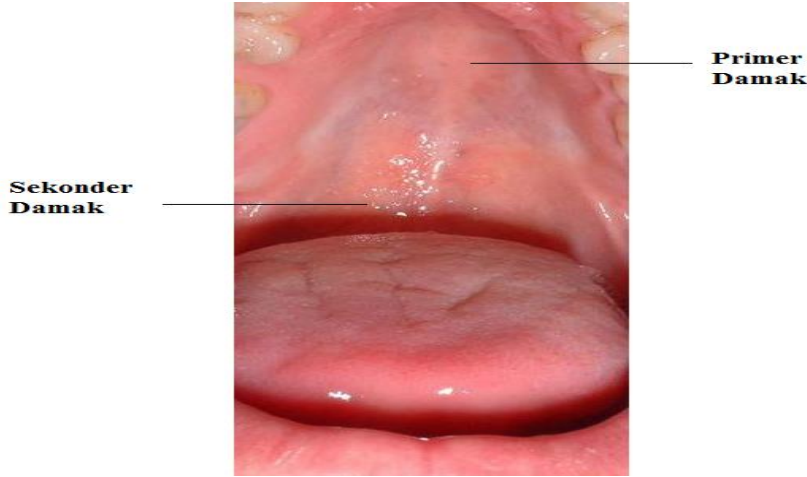
Bu çalışma da Türk toplumunda, başka populasyonlarda sendromsuz dudak damak yarıklı vakalarda saptanan aday genler olan IRF6 ve MSX1'deki mutasyonların tanımlanması ve bu aday genlerin Türk populasyonundaki sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Dudak ve Damak

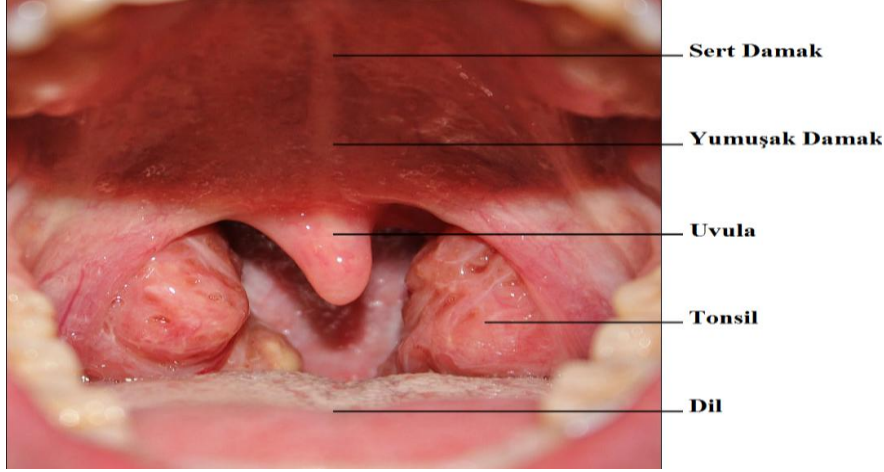
Baş ve yüz gelişimi, embriyonik süreç içerisinde meydana gelen en karmaşık olaylardan biridir. Oluşumlarında hücre polaritesinin hücre-hücre etkileşimlerini yöneten proteinler ile transkripsiyon faktörler ve sinyal molekülleri gibi düzenleyici mekanizmalar görev yapmaktadır (Jugessur ve Murray 2005).

Damak, primer ve sekonder damaktan meydana gelir. Baş ve yüz gelişimine dahil olan dudak ve damak gelişimi, insanda embriyonik süreçte hamileliğin 4. ve 9. haftaları arasında meydana gelmektedir.



Şekil 2.1 Damağın yapısı (<http://i.pbase.com/u20/stella97king/large/20524457.TWODA-YS.jpg>)

Embriyonik gelişim sonucunda insanda gelişmiş dudak damak yapısında, primer damak; dişler, üst dudak, sert dudak ve alveolusun ön kısmından, sekonder damak ise sert damak ve yumuşak damak, alveolusun bir kısmı, uvula ve tonsilden meydana gelmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Dudak ve damağın yapısı (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Throat_with_Tonsils_0011J.jpeg)

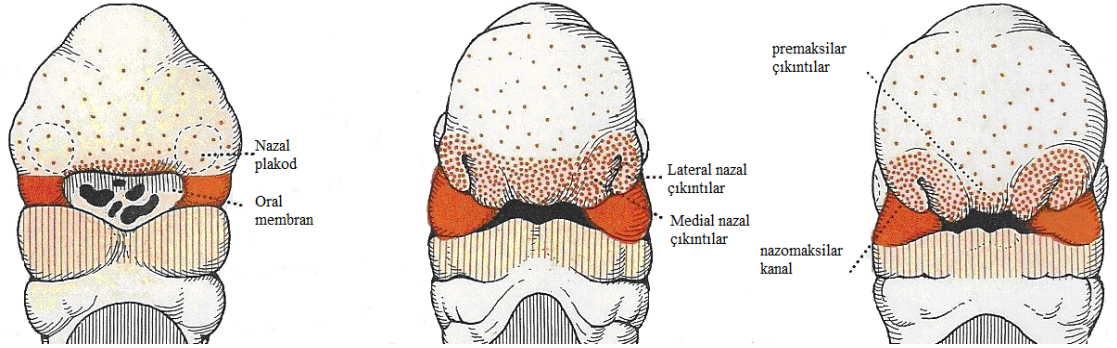
2.2 Dudak ve Damağın Embriyolojik Gelişimi

Embriyolojik gelişimin ilk haftalarında, fasiyal primordiyayı meydana getirmek için, mezenşim hücreleri ile ön tarafta bulunan (anterior) ve nöral tüpün arka kısmından(dorsal) köken alan nöral krest hücreleri birleşir. Fasiyal primordia oluşum safhasında, ön tarafta (anterior) nöropodun kapanmasından önce oral plaka çevresinde takip eden yapılar yer almaya başlar: Başın orta noktası, stomedium kapanırken, oral membrana rostral ve notokordal plakanın eklendiği bölgedir. Göz veziküllerinin çukurlar belirgindir. Yanlardaki göz kadehleri, olfaktori hücreleri stomedium çevresine doğru, prosensefalonun ön bölgesinden göç eder ve oral membran tarafına kapatılır (Jirásek 2004).

Erken embriyonik safhada anterior nöropod kapatılır, oral membran kaybolur ve olfaktori (koku alma ile ilgili) plakodlar belirgin değildir. Pentagonal stomedium göz kadehleriyle ve maksilar ve mandibular merkezler ilk farengial arklarla ektodermle kaplı ön beyin şekillenir (Jirásek 2004).

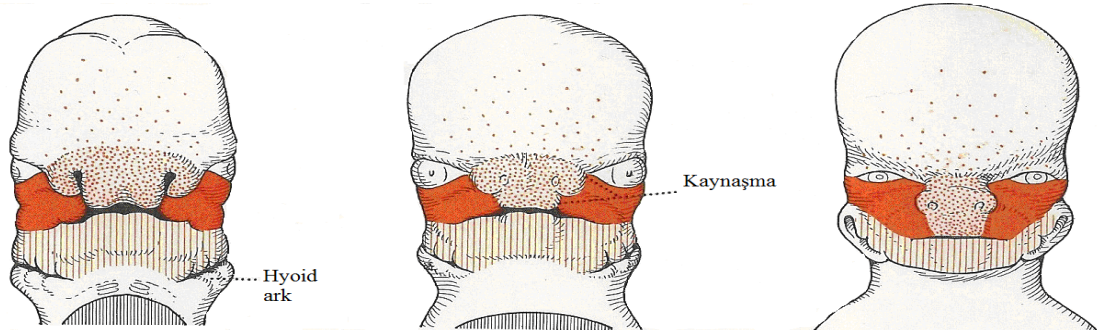
Hamileliğin 4. haftasında, embriyonik safhada nazal çukurlar ve çıkıntılar belirginleşir. Olfaktori (gözle ilgili) plakodlarla ilişkili serebral yarım küre belirginleşir. Okulonazal

(burun ve gözle ilgili olan) mezenşim premaksilar, orta-nazal ve yan-nazal kısımlarla nazal çıkıntı meydana gelir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Hamileliğin 4. ve 5. haftasında yüzün gelişimi, modifiye edilerek (Smith vd. 1984)

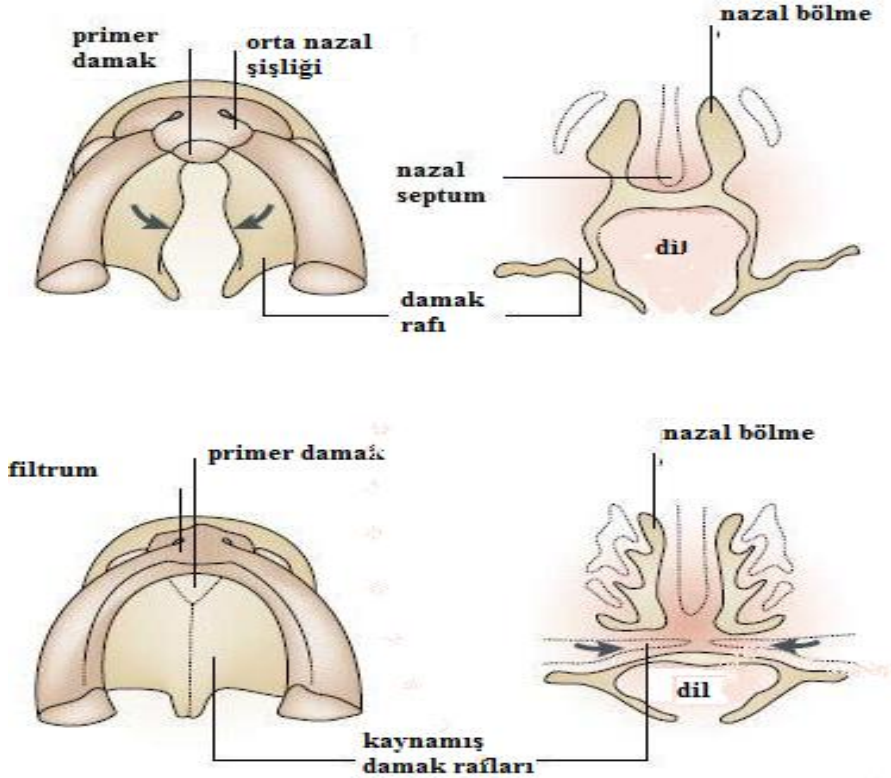
Geç embriyonik safhada primer damak kapandıktan sonra, hamileliğin 6- 7. haftaları boyunca nazal çukurun premaksilar ve lateral kısımları burun deliklerine anterior olarak (ön kısma doğru) kaynaşır ve nazal çıkıntılarının ve maksilar primordianının, premaksilar kısımları primer damağın her bir kısmında kaynaşır. Sağ ve sol premaksilar kısımlar arasındaki çentik nazal kapsülün septal mezenşimiyle doldurulur. Nazal kapsül burunun dorsum (arka) ve uç noktasına katılır. Göz yarıkları göz kapaklarının kaynaşmasıyla kapanmıştır (Wong ve Hagg 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Embriyo gelişiminde 6. ve 7. ve 8. haftalar, modifiye edilerek (Smith vd. 1984)

9. haftada (farelerde 14–15. embriyonik gün) yani fetal safhada, bilateral (çift taraflı) damak rafı, dil etrafında hareket ederek, birbirleriyle ve nazal bölmeyle kaynaşarak hızlı horizontal (yatay) biçim değiştirme gösterir. Bu işlem Orta Hat Epiteli (MES: Medial

edge epitelium) tamamen kaybolduğunda sona ermektedir (Wong ve Hagg 2004) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Embriyonik gelişimde 9. haftada damak gelişimi (William ve Lawrance 2001)

Damak nazal epiteli silli yalancı tabakalı epitele, oral kısımdaki hücreler keratinleşmemiş çok katlı yassı epitele farklılaşır. Bu arada yumuşak damak gelişir ve sonrasında kemikleşmeyle birlikte sert damak meydana gelir (Meng vd. 2009).

Embriyolojik gelişimin 11 ve 12. haftalarında lateral ve mediyal nazal çıkıntıları orta kısma doğru ilerlemesini sağlayan maksillar çıkıntılarda ortaya doğru ilerleyerek üst dudağı oluştururken, mandibular çıkıntılarda alt dudağı oluşturur (Stainer vd. 2004). Fasiyal primordianın normal gelişimini sinyal etkileşimleri kontrol etmektedir. Yapılan fare mutant modellemeleri ve insan çalışmaları da büyüme faktörleri, hücre dışı matrix proteinleri, hücre adezyon molekülleri gibi gen ürünlerinden oluşan faktörlerin sıkı kontrol altındaki damak gelişiminde, bölgesel düzenlemelerde görev yaptıklarını ortaya koymaktadır (Meng vd. 2009). Bu faktörler gen ekspresyonunun gelişimsel olarak

anlamli oluşuyla sonunçlanan, hücre içi ve hücreler arası olaylarda etkileşime girmektedirler. Burada sözü edilen genlerin yapılarında meydana gelebilecek bozukluklar ve hatalar dudak damak yarıklarına neden olmaktadır.

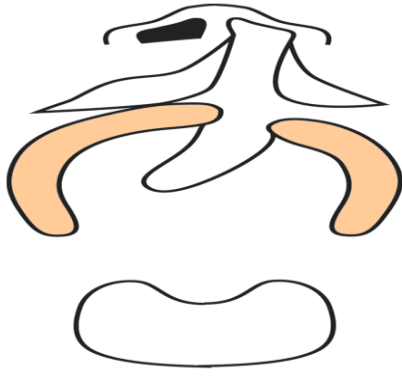
Özellikle gebeliğın 30–37. günleri arasında maxilar (çene kemiğine ait) ve lateral nazal çıkıntıların, orta nazal çıkıntı ile meydana gelen füzyonunun duraklaması dudak yarıklarının meydana gelmesine yol açar. Gebeliğın 50–60. günleri arasında damak rafların orta hatta ve yatay düzlemde oluşan füzyonunun duraklaması ise damak yarıklarının meydana gelmesine neden olur (Wong ve Hägg 2004).

2.3 Dudak Damak Yarıkları Sınıflandırması

Dudak damak yarıklarının sınıflandırılmasının gerekliliğı onların tanımlanması, nedenlerinin araştırılması ve yönetim sonuçlarının karşılaştırılmasıyla ortaya konulmaktadır. Yarıkların oluşumları tarihte birçok şekilde sınıflandırılmıştır (Davis ve Ritchie 1922, Fogh ve Veersen 1942). Ancak bu sınıflandırma tipleri tüm yarıkların tiplerini içermemişi ya da alt sınıflandırmalara değınmediğı için başarısız bulunmuştur.

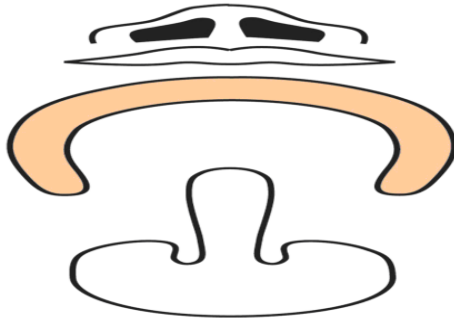
Orofasiyal yarıkların sınıflandırmalarından embriyolojik temele dayandırılmış olarak oluşturulan sınıflandırma günümüzde halen yaygın biçimde kullanılmaktadır (Kernahan ve Stark 1958). Bu sınıflandırma tipine göre yarıkların tipleri;

- Sadece Primer Damak Yarıkları: Damağın ön kısmı olan, primer damakta dolayısıyla dudak kısmında da mezenşim hücrelerinin kaynaşamamasından dolayı meydana gelen yarıkların tipidir (Şekil 2.6).



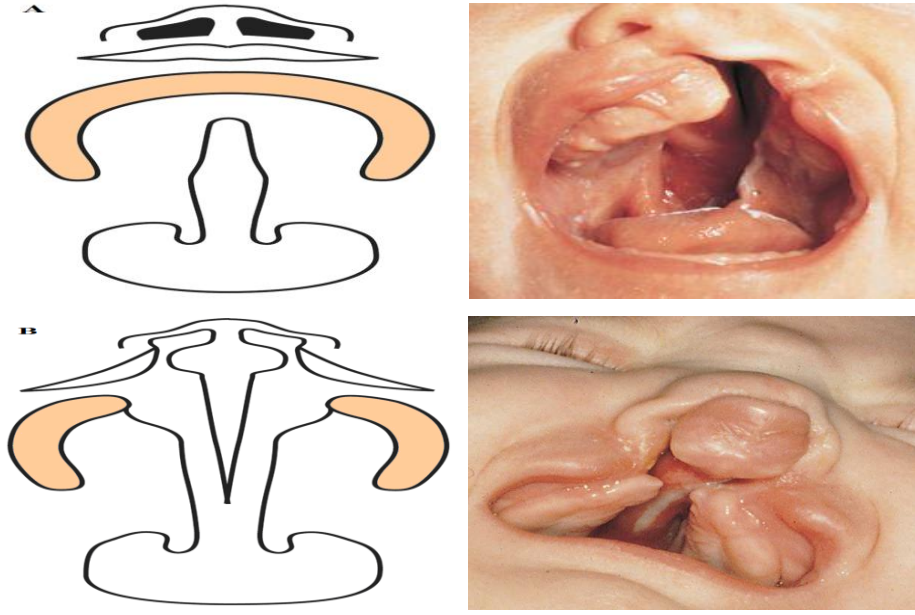
Şekil 2.6 Kernahan ve Stark'ın sadece primer damak sınıflandırması (<http://emedicine.medscape.com/article/837347-media>, <http://interplast.blogs.com/.a/6a00d8341c8ede53ef01156fc42096970b-800wi>)

- Sadece Sekonder Damak Yarıkları: Damağın arka kısmı olan, sekonder damaktaki mezenşim hücrelerinin kendi aralarında ve nazal septumdaki mezenşim hücreleri ile kaynaşamamasından dolayı meydana gelen damak yarığı tipidir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Kernahan ve Stark'ın Sadece Sekonder damak yarığı (<http://emedicine.medscape.com/article/837347-media>, Silva Filho vd. 2007)

- Primer - Sekonder Damak Yarıkları: Damağın hem primer hem de sekonder kısmında, dudağı da içine alarak nazal septim hücreleri ile kaynaşamamasından dolayı meydana gelen yarık tipidir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Kernahan ve Stark'ın Primer-Sekonder damak yarıkları (a:<http://emedicine.medscape.com/article/837347media>,<http://www.mdconsult.com/das/pdxmd/media/0417/7041717/large.jpg>, b: <http://emedicine.medscape.com/article/837347-media>, <http://img.tfd.com/mosby/thumbs/500051fx16.jpg>)

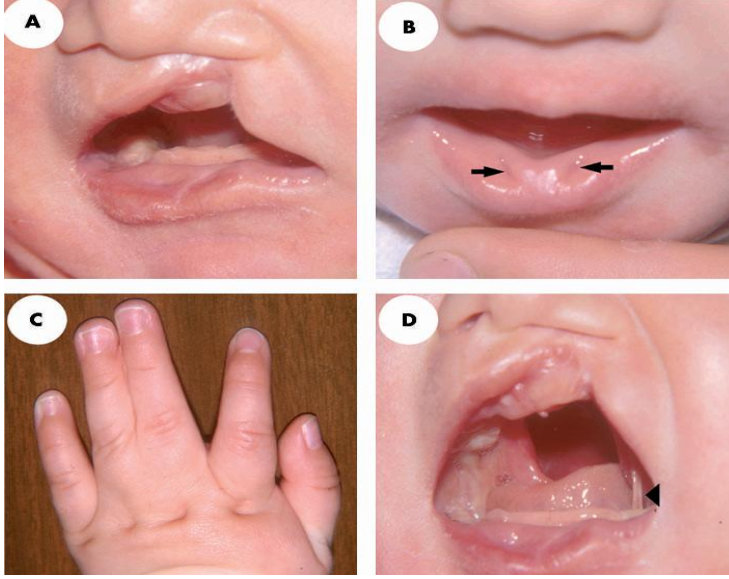
a:Unilateral, b: Bilateral

Başka bir sınıflandırma da klinik olarak, doğuştan meydana gelen anomalilerin varlığı baz alınarak yapılmaktadır. Dudak damak yarıkları;

a) Sendromsuz (nonsendromik, izole) dudak damak yarıkları

b) Sendromik dudak damak yarıkları olarak da sınıflandırılabilir (Şekil 2.9).

Dudak damak yarıkları fark edilebilen modellerde ki diğer bozukluklarla (genellikle 2 veya daha fazla) meydana geldiğinde, sendromik dudak damak yarığı olarak sınıflandırılır. Sendromsuz ifadesi ise, dudak ve/veya damak yarıklarından etkilenmiş bireylerin fiziksel ve gelişimsel olarak başka bir anomaliye sahip olmamasıyla ifade edilmektedir (Scutte ve Murray 1999).



Şekil 2.9 Van der Woude Sendromlu hastada Sendromik dudak damak yarıkları (Ghasib be vd. 2004)

(A:Dudak yarığı B: Dudak Oyuğu C: Sindaktili D: Buccal Sineşi)

2.4 Dudak Damak Yarıklarının Etiyolojisi

Fasiyal yarıkların etiyolojisi karmaşıktır ve henüz tam anlamıyla aydınlatılabilmemiş olmasa da genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle meydana geldiği bilinmektedir. Yarıkların oluşumu, dudak ve damak gelişiminde görev alan genlerde meydana gelen mutasyonların, annenin hamilelik boyunca sigara veya alkol kullanması, hamileliği boyunca geçirdiği ateşli hastalıklar, folik asit kullanımı, radyasyona maruz kalması ve hamilelik boyunca antikoagülan, steroid gibi ilaçları kullanması gibi çevresel etkiler ve cinsiyet farklılıklarıyla meydana getirdiği kombinasyonlar sonucu oluştuğu düşünülen doğumsal anomalilerden biridir (Jugessur ve Murray 2005).

2.5 Dudak Damak Yarıklarının Görülme Sıklığı

Dudak yarığı, damak yarığı ya da ikisinin bir arada görülme riskinin sıklığı, coğrafik kökene ve ırksal geçmişe ve cinsiyete göre değişmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Dudak yarığı, damak yarığı ve dudak damak yarığının etnik kimlik ve cinsiyete göre prevalansı

Karakteristik	Damak Yarığı	Dudak Yarığı	Dudak damak yarığı
İrk/Etnik kimlik			
Beyaz	0.62	0.38	0.75
Siyah	0.46	0.26	0.42
Cinsiyet			
Erkek	0.51	0.35	0.75
Kadın	0.59	0.32	0.50
Toplamda Prevalansı	0.6/1000	1/1000	1/1000

Bu doğum kusurunun sıklığına göre, Amerikan Yerlileri'nde en yüksek risk, Asya, Beyaz ırk, Afrikalı'larda da en düşük risk gözlenmektedir (Wyszynski 2002, Mossey ve Little 2002).

Doğumsal bir bozukluk olan, dudak damak yarığının dünya genelinde meydana gelme sıklığı 0.2–4.3 arasında değişmektedir. Yapılan araştırmalara göre bu oran, Türkiye'de 0.95'tir (Tunçbilek 1996,1999).

Ayrıca dudak damak yarıklarını, sendromsuz ve sendromik dudak damak yarıkları olarak 2 gruba ayırdığımızda, sendromsuz dudak damak yarıklarının görülme sıklığı yaklaşık olarak %70 iken, kromozomal anomalilerin, 300 den fazla farklı Mendelyan sendromu, terotejenler ve kategorize edilemeyen sendromlar gibi alt gruplara ayrılabilen sendromik dudak damak yarıklarının %30'luk oranı oluşturduğu ifade edilmektedir (Sözen vd. 2009) .

2.6 Sendromsuz Dudak Damak Yarıklarında Genlerin Rolü

Dudak ve/veya damak yarıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda hastalığın genetik olarak ortaya konması için saptanmış olan çok sayıda gen vardır. Bu genlerden bazıları hem sendromik hem de sendromsuz dudak damak yarığı oluşumunun genetiğiyle ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.2).

Yarık oluşumuna yatkınlığı olan genler, bağlantı ve ilişki çalışmaları, Mendelyan modelleri, hayvan modelleri ve insan ve fare ifade çalışmalarını içeren çeşitli stratejilerle tanımlanmıştır (Stevenson ve Hall 2006). Bir genin güçlü bir yarık aday geni olabilmesi için, transgende yarık oluşumu fenotipiyle sonuç vermesi ve kritik bir zamanda ve dudak damak yarığı gelişimiyle ilgili doku da ifade olması gerekmektedir. Bu durumla ilgili en iyi 2 örnek, gen ekspresyonları kraniofasiyal gelişimde bir rolü destekleyen ve knockoutları yarık olarak sonuç veren *Msx1* ve *Tgfb3*'tür. *MSX1* için, 2 bağımsız knockout çalışması %100 damak yarığıyla sonuçlanmışken (Satokata ve Maas 1994, Houzelstein vd. 1997), damağı içeren kraniofasiyal yapıların gelişmesinde ifade olmuştur. *Tgfb3* vakası ise, 2 bağımsız knockout damak yarığı fenotipiyle sonuçlanmıştır (Schutte ve Murray 1999).

En çok ilgi gösterilen diğer 4 gen, *PVRL1*, *FGFR1* ve *IRF6*'dır. Hastalıkla ilişkili bu genlerden *PVRL1*, *IRF6* genleri Mendelyan fenotipin kopyasıyla tanımlanmış yani sendromik dudak damak yarıklarıyla ilişkilendirilmiş genlerken, *FGFR1* geni farklı fenotiplerde haritalanan bağlantı ve kromozomal anormallikler ile tanımlanmıştır (Stevenson ve Hall 2006). Aşağıdaki çizelgede sendromsuz dudak damak yarıklarıyla ilgili olduğu düşünülen genler, bunların lokasyonları ve ilişkili olduğu sendromlar ve olgular verilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Sendromsuz dudak damak yarıklarındaki bazı aday genler, çevresel etkileşimleri, neden olduğu sendromlar ve gen fonksiyonları

Lokasyon	Gen	Çevre-Gen ilişkisi	Sendrom	Gen Fonksiyonu
2p13	TGF- α	Maternal sigara kullanımı (Shaw vd. 1996., Beaty vd. 1997)	Orofasiyal yarıklı veya yarıksız otozomal domi-nant hipodonti	Büyüme faktörü
4q16	MSX1	Maternal alkol kullanımı (Martinelli vd. 2004)	Wolf-Hirschhorn sendromu (Nieminen vd. 2003, Jezewski vd. 2003, Slayton vd. 2003), Witkop Sendromu (Jumlongras vd. 2001)	Transkripsiyon Faktörü
1q32.2	IRF6		Van der Woude Sendromu, Popliteal Pterygium Sendromu (Kondo vd. 2002)	Transkripsiyon Faktörü
11q23.3	PVRL1		Margarita Adası Ektodermal displazi, Zlotogora-Ogur Sendromu ve dudak/damak yarıklı ektodermal displazi (Suzuki vd. 2000)	Hücre adezyon molekülü
14q24	TGF- β 3	Alkol kullanımı (Romitti vd. 1999)		Büyüme Faktörü
8p11	FGFR1		Kallmann Sendromu (Dode vd. 2003)	Büyüme faktörü reseptörü
1p36.3	MTHFR	Folik asit eksikliği (Shotelersuk vd. 2003)		Hücre sinyali

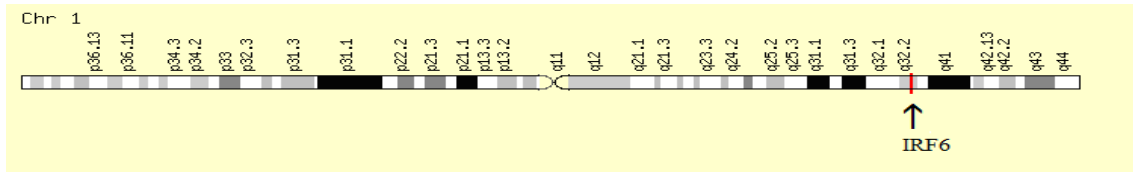
Sendromsuz dudak damak yarıklarıyla ilgili yapılan bu çalışmada ise, hastalıkta genetik düzeyde dudak ve damak gelişimde önemli roller oynayan, transkripsiyon faktörlerine dâhil olan IRF6 ve MSX1 geninin Türk hastalarda, sendromsuz dudak ve damak

yarıkları ile ne derecede ilgili olduğu araştırılacak ve böylece, gen düzeyinde bir polimorfizmin varlığı tespit edilecektir.

2.6.1 IRF6 geni

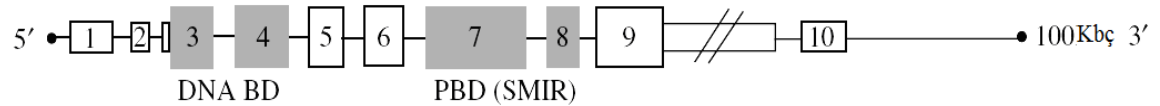
2.6.1.1 IRF6 geninin yapısı

Kromozomal lokusu 1q32.3-q41 olan İnterferon düzenleyici faktör 6, yüksek derecede korunmuş olan N-terminal sarmal-dönüş-sarmal DNA bağlanma domaini (amino asit 13-113) ve daha az korunmuş olan SMIR interferon düzenleyici faktör protein bağlanma domainninden oluşan, 9 üyeli transkripsiyon faktör ailesindedir (Şekil 2.10) (Eroshkin ve Mushegian 1999, Taniguchi vd. 2001).



Şekil 2.10 IRF6'nın kromozom 1 üzerindeki yeri (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF6&search=IRF6>)

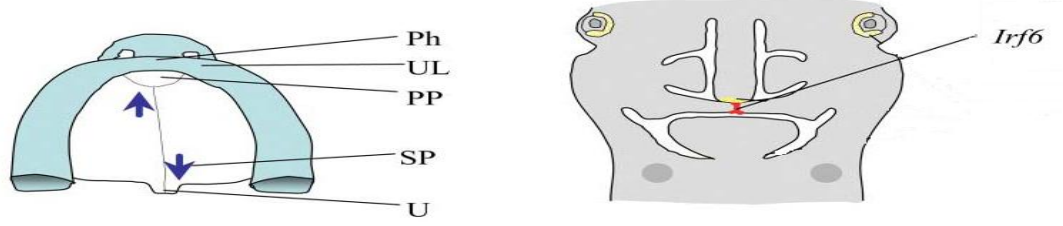
IRF6 (MIM 607199) geni, 18,217 baz çiftinden oluşmuştur. Kodlanan bölge 9 ekzonluktur ve ürünü 297 amino asitlik IRF6 proteindir (Morkünienė vd. 2006) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 IRF6 geninin yapısı (Ghasibbe vd. 2005)
(DNA BD: DNA Bağlanma Domainsi, PBD: Protein Bağlanma Domainsi)

2.5.1.2 IRF6 gen ifadesi

IRF6 transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösterir. Primer damağın gelişimi boyunca ve damak rafının orta (medial) kenarın oluşumunda yüksek miktarda ifade olmaktadır (Ben vd. 2005) (Şekil 2.12). Bu gen aynı zamanda keratinosit proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Richardson vd. 2006).



Şekil 2.12 9-10. haftalarda intermaksilar segment (Stainer vd. 2004)
(UL= Üst dudak, Ph=Filtrum, PP=Primer damak, SP= Yumuşak damak, U=Uvula)

Farelerde yapılan çalışmalara bakıldığında IRF6'nın null (sessiz) olduğu farelerde, anormal deri, iskelet ve kraniofasiyal (yüze ve kafatasına ait) gelişimi gözlenmiştir (Kondo vd. 2002). Bu fareler embriyonik olarak letal olabilirler (Ingraham vd. 2006, Paun ve Pitha 2007) .

İnsanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında ise, örneğin Van der Woude Sendromu nedeniyle aralarında uyumsuzluk bulunan monozigotik ikizlerden birinde, IRF6'nın 4. ekzonunda nonsense mutasyon bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise Van der Woude Sendrom'lu 45 akraba olmayan ailede ve Popliteal Pterygium'dan etkilenmiş olan 13 ailede, her iki fenotipe de yol açan mutasyonlar bulunmuştur (Kondo vd. 2002). Böylece IRF6 geninde meydana gelen bazı mutasyonların, sonuç olarak Van der Woude Sendromu ve Poplital Pterygium Sendromu gibi genetik bozuklukların ortaya çıkmasında etkili bir rol oynadığı gösterilmiştir (Çizelge 2.3).

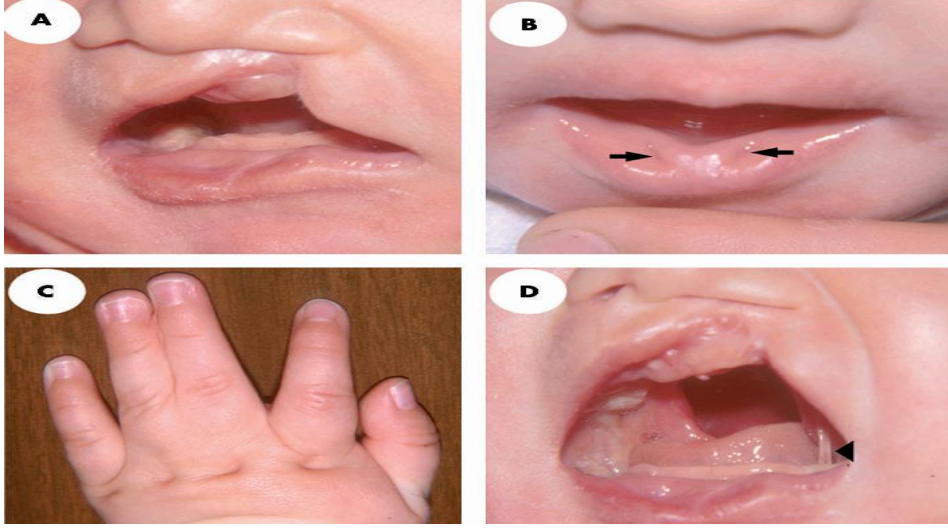
Çizelge 2.3 Van der Woude Sendromu ve Popliteal Pterygium Sendromu'nun IRF6 ile ilişkisi

GEN	Sendrom	OMIM	Özellikler	Mutasyon
IRF6	VWS	119300	DDY, alt dudak oyuğu, hipodonti, normal zeka	Ekzon 3-4-7-9 missense mutasyonları
IRF6	PPS	119500	DDY, popliteal pterygia, sindaktili, anormal dış genital bölge	Ekzon 4 missense mutasyonları

2.5.1.3 IRF6 geni ve dudak damak yarıkları

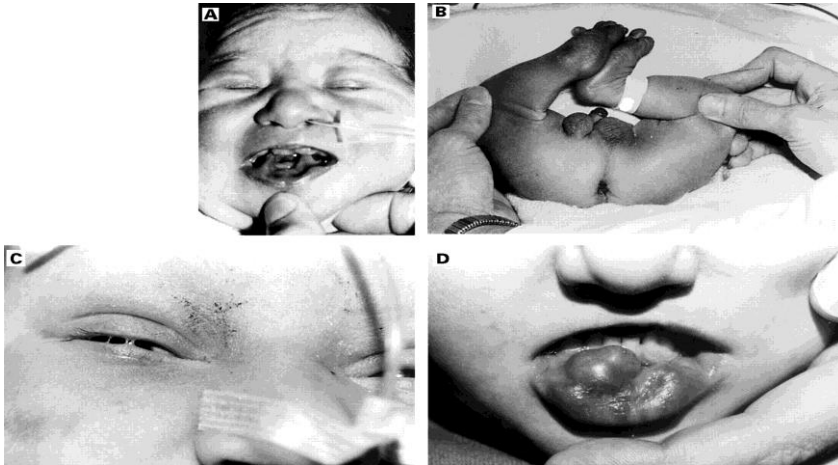
IRF6 geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle oluşan iki sendroma değinecek olursak; bunlardan Van der Woude Sendromu (OMIM 119300) kromozom 1q32-q41 gibi kritik bir bölgede lokalize olan, en yaygın sendromik formda ki, dudak veya damak yarığının görüldüğü gelişimsel hastalıktır. IRF6 genindeki DNA bağlanma domaininde (ekzon 3-4) ve protein bağlanma domaininde (ekzon 7-8-9) meydana gelen missense mutasyonların neden olduğu otozomal dominant bozukluktur (Kondo vd. 2002).

Sendromik dudak ve damak yarığının yanı sıra sadece damak yarığından (izole damak yarığı) ayrı tutulmasına neden olan, alt dudak oyuğu (%85) ve hipodonti (%25) gibi bozukluklarla birlikte, normal zekâ ile karakterize olan bir sendromdur (Van der Woude 1954, Koillinen vd. 2001) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Van der Woude Sendromlu hasta A: Dudak yarığı B: Dudak Oyuğu C: Sindaktili C: Buccal Sineşi (2 organ arası anormal yapışıklık) (Ghasibbe vd. 2004)

IRF6 geninde mutasyonların meydana gelmesiyle oluşan başka bir sendrom ise Popliteal Pterygium Sendromudur. Bu bozukluk (OMIM 119500), Van der Woude Sendromunun karakteristik özelliklerine ek olarak, popliteal pterygia, sindaktili, anormal dış genital bölge gibi deri ve genital bölge anomalilerine sahiptir (Little vd. 2009) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Popliteal Pterygium Sendromlu hasta (Lees vd. 1999)

Popliteal Pterygium Sendromu'na neden olan missense mutasyonları, IRF6'nın DNA bağlanma domaininde ekzon 4 üzerinde bulunur (Kondo vd. 2002). Otozomal dominant

bozukluktur, tek gen hastalığıdır. Prevalansı yaklaşık olarak 300.000 de 1 olarak, nadir görülen bir sendromdur (Bjork vd. 2006)

Gende meydana gelen mutasyonların neden olduğu sendromlardan özellikle VWS için tanımlanan IRF6 geni üzerinde yapılan birçok araştırmada diğer populasyonlarda (İtalya, Belçika, ABD, Tayland/Singapur/Kore, Güney Amerika, Norveç) Sendromsuz Dudak ve/veya damak yarıkları ile IRF6 geni adına anlamlı ilişkiler gösterilmiştir ve bu ilişkiler % 12–18 arasında bir değerle ifade edilmiştir (Kondo vd. 2002, Zuccherro vd. 2004, Martinelli vd. 2005, Ghassibe vd. 2005, Blanton vd. 2005, Srichomthong vd. 2005, Park vd. 2007, Vieira vd. 2007, Jugessur vd. 2008).

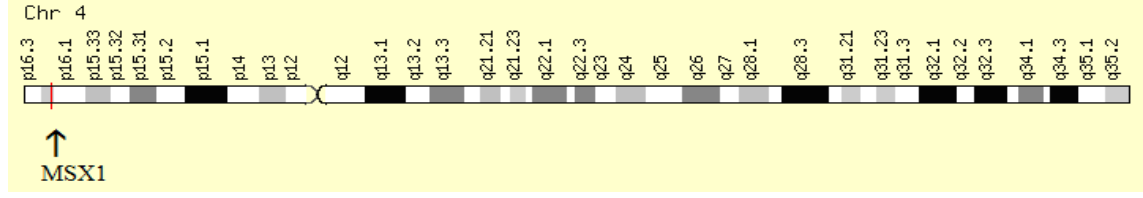
İtalyan populasyonunda tek bir allel için p değeri 0.002 değerinde bulunmuştur. Bu sonuç, sendromsuz dudak damak yarığında hastalık sebebi olarak IRF6'nın katılımını kabul eden ve Avrupa soyundan populasyonlarda bu genin dudak damak yarığı meydana gelmesinde rol oynadığını güçlü olarak desteklemektedir (Martinelli vd. 2005). Aynı şekilde Belçika populasyonunda yapılan araştırmada 195 ebeveyn-vaka üçlüsünde IRF6 için p değeri 0.02 verilmiştir (Ghassibe vd. 2005). Sonrasında yapılan bir araştırmada 43 beyaz, 7 İspanyol ırkından, 1 Afrikalı ve Amerikalı'dan oluşan vaka setinde $p=0.05$ lik bir oran saptanmıştır (Blanton vd. 2005). Tayland populasyonunda 192 dudak damak yarıklı Taylandlı hasta, 177 anne, 73 baba ve 278 kontrol arasında yapılan araştırmada IRF6 geninde meydana gelen 820 G→A değişimi dudak damak yarığına % 1.67 oranında genetik katkıdan sorumlu bulunmuştur (Srichomthong vd. 2005).

2.6.2 MSX1 geni

2.6.2.1 MSX1 geni yapısı

Kromozomal lokusu 4p16.3-p16.1 olan, MSX1 (OMIM 142983) Drosophila msh'ına (muscle segment homeobox) homolog olan, homeobox içeren genlerin ailesine dâhil olan transkripsiyon faktörüdür (Şekil 2.15). 2 ekzonu, 1 intronu bulunan MSX1'in

uzunluğu 4.052 baz çiftidir. Bu genin ürünü ise 297 aminoasitlik Msh homeobox 1-like protein MSX1'dir (Morkünienė vd. 2006) (Şekil 2.16).



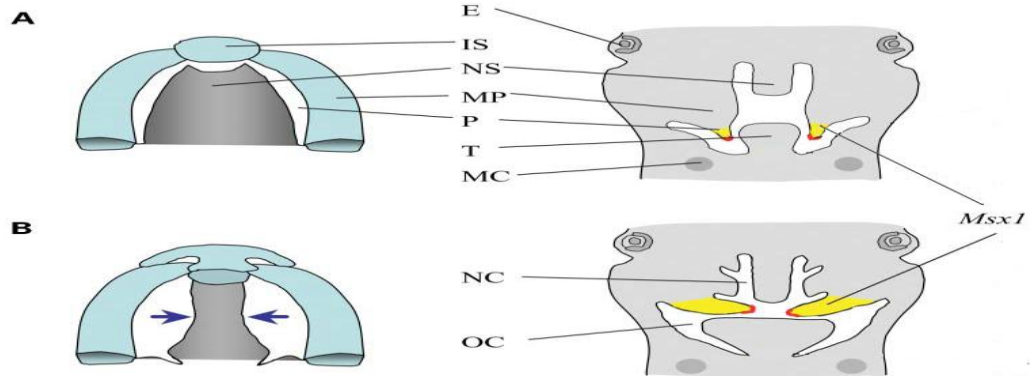
Şekil 2.15 Kromozom 4 üzerinde MSX1 geni (http://www.genecards.org/cgi-bin/card_disp.pl?gene=MSX1&search=MSX1)



Şekil 2.16 MSX1 geninin yapısı (Lace vd. 2006)

2.6.2.2 MSX1 geni ifadesi

Yüksek miktarda korunmuş olan MSX1 geni, kraniofasial (yüze ve kafaya ait) bölgelerin gelişiminde birçok organda ifade edilerek (Lidral vd. 1998), hücrede sinyal transdüksiyon gidiş yollarını aktifleştirerek ya da baskılayarak gen ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyonal repressör /baskılayıcı olarak; (Catron vd. 1995, 1996), hücre farklılaşması ve baskılanması aktivitesinde (Bendall ve Abate-Shen 2000), PAX3 (Paired Box 3), DLX5 (Distal Less Homeobox 5) gibi proteinlerle dimer oluşturup onların transkripsiyonal aktivitelerinin düzenlenmesinde, dental mezenşimde olduğu kadar damak mezenşiminin ön kısmında ifade olan epitelyal mezenşim etkileşimi için (Alappat vd. 2003), yani fasiyal primordia da damak mezenşiminde Bmp2 Bmp4 proteinlerinin ve orta hat epitelindeki Shh'in ekspresyonu görev alır (Zhang vd. 2002) (Şekil 2.17) .



Şekil 2.17 İnsanda embriyonik dönemde A) 7. haftada, B) 8. haftada MSX1 (Stainer vd. 2004)

(E=Göz, IS=Intermaksilar segment, NS=Nazal septum, MP= maksilar çıkıntı, P=damak rafı, T=dil, MC= Meckel kıkırdağı, NC=Nazal boşluk, OC=Oral boşluk)

2.6.2.3 MSX1 geni ve dudak damak yarıkları

Sendromsuz yarık oluşumu, Vietnam populasyonunda 175 ebeveyn-çocuk üçlüsünde yapılan araştırmada, MSX1 geninde tespit edilen missense mutasyonlar vakalarda %2 oranında saptanmıştır (Suzuki vd. 2004). Sonrasında yapılan bir çalışmada da MSX1 geninde meydana gelen mutasyonların %2 oranında sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda etkili olduğu tespit edilmiştir (Tongkobpetch vd. 2006). Sendromsuz dudak ve damak yarıklarıyla ilişkilendirilen MSX1 geninde meydana gelen bazı mutasyonlar, Witkop Sendromu ve Wolf Hirschhorn Sendromu gibi genetik bozuklukların ortaya çıkmasında etkili bir rol oynamaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Witkop Sendromu ve Wolf Hirschhorn Sendromuyla MSX1'in ilişkisi

GEN	Sendrom	OMIM	Özellikler	Mutasyon
MSX1	WS	189500	Diş, tırnak, saç ve salgı bezi gibi yapıların yokluğu veya fonksiyonlarının bozukluğu	MSX1 homeodomaninde saptanan S202X nonsense mutasyonu
MSX1	WHS	194190	Prenatal ve post natal gelişim geriliği, zeka geriliği, uzuv, kraniofasial (baş ve yüze ait)anomaliler ve kardiyak ve renal anomalileri	4. kromozomun kısa kolunda meydana gelen delesyon

MSX1 genindeki mutasyonların neden olduğu sendromlardan diş ve tırnak sendromu olarak bilinen (Tooth and Nails Syndrome [MIM 189500]) nadir bir otozomal dominant hastalık olan Witkop Sendromu (WS), ektodermal displazinin hafif bir formudur. Bu sendrom ektodermden köken alan diş, tırnak, saç ve salgı bezi gibi yapıların yokluğu veya fonksiyonlarının bozukluğuyla karakterize olmaktadır ve prevalansı 1-2/10000'dir. Yapılan çalışmalarda MSX1 homeodomaninde saptanan S202X nonsense mutasyonunun Witkop Sendromuna neden olduğu belirlenmiştir. Gende meydana gelen mutasyon MSX1 proteinin fonksiyonunu engelleyerek erken gelişim evresinde diş ve tırnakların formasyonunda bozukluklara yol açmaktadır (Jumlongras vd. 2001) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Witkop sendromunda tırnak ve diş formasyon bozuklukları (Zabawski ve Cohen 1999)

MSX1 geninde mutasyonların meydana gelmesiyle oluşan başka bir sendrom ise Wolf Hirschhorn Sendromudur. 4. kromozomun kısa kolunda meydana gelen delesyon sonucu oluşan, prenatal ve post natal gelişim geriliği, zeka geriliği, uzuv, kraniofasiyal (başa ve yüze ait) anomaliler ve kardiyak ve renal anomalileriyle karakterize olan bu sendrom nadir bir kromozomal anomali sendromudur (OMIM 194190) (Bergemann vd. 2005) (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Wolf Hirschhorn Sendromlu hastada dudak yarığı (Taylor, 1968)

MSX1 geninin, fenotipin bir parçası olarak oligodontiye sahip bazı Wolf Hirschhorn Sendrom'lu (WHS) vakalarda genin delesyona uğradığına dair kanıtlar in situ hibridizasyon analiziyle saptanmıştır. Aynı zamanda bu vakalarda, MSX1 in fonksiyonunu kaybetmesiyle, oluşan delesyona bağlı olarak dudak ve/veya damak yarığı da gözlenmektedir. (Nieminen vd. 2003) (Çizelge 2.6).

MSX1 geni Sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı vakalarına dair birçok çalışmada analiz edilerek, yarık oluşumu için güçlü bir aday olarak belirlenmiştir. Beyaz ırk popülasyonlarında (Lidral vd. 1998, Blanco vd. 2001, Beaty vd. 2002), Vietnam, (Suzuki vd. 2004), Filipin (Schultz vd. 2004), Şili (Suazo vd. 2004), Güney Amerika (Vieira vd. 2003) popülasyonlarında incelenen bu olguyla MSX1 geni arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Ancak bazı araştırmacılar bu lokus adına anlamlı sonuçlar bulmada başarısız sonuçlar elde etmişlerdir (Lidral vd. 1997, Morkūnienė vd. 2006).

2.7 Dudak Damak Yarıklarının Oluşmasında İlaç Kullanımının Etkileri Ve Çevresel Faktörler

Dudak damak yarıkları gibi hamilelik sırasında meydana gelen konjenital bozuklukların oluşmasında, genetik bozukluklar kadar çevresel etkiler ve ilaç kullanımında yer almaktadır. Bu konjenital bozuklukların oluşumu, birçok epidemiyolojik çalışma, hayvan modelleri, insan genetik araştırmalarından elde edilen verilerle açıklanabilmektedir.

Dudak damak yarıklarının oluşmasında etkileri olan ilaçlardan steroidler, kadınlarda hamilelik dönemlerinde meydana gelen birçok durumun tedavisi için ilk safhada kullanılan ilaçlardır. Hayvanlar üzerinde yapılan birçok araştırmada steroidlerin kullanımını sonucu döllerde meydana gelen yarıklık oluşumuna dair bilgiler net bir şekilde rapor edilmiştir (Martinelli vd. 2004). Yapılan deneylerde fare damaklarının gelişiminde özellikle ekzojen glikokortikoidlerin hücre içerisindeki varlığında ve yokluğunda, glukokortikoide duyarlı, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 ve EGF-R genlerinin gelişimsel olarak ifadesi analiz edilmiştir (Jaskoll vd. 1996). Bu moleküller hücre üremesini engellediği bilinen damak TGF-beta 2 transkriptinde “down regulation”ı geciktirmektedir.

İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda sendromsuz dudak damak yarığına neden olan etmenler arasında steroidlerin yüksek bir orana sahip olduğu saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan araştırmada steroidlere maruz kalma olasılık oranları, sırasıyla dudak damak yarığı ve damak yarığı riski için 1.7 (güven aralığı 1.1–2.6) ve 0.5 (95% güven aralığı, 0.2–1.3) bulunmuştur (Carmichael ve Shaw 2007). Avustralya’da yapılan bir vaka kontrol çalışmasında ise, araştırmacılar hamileliğin ilk üç ayı boyunca maternal kortikoide maruz kalma ile sendromsuz dudak damak yarıkları arasında 13.154 olasılık oranıyla ilişki kurmuşlardır (Edwards vd. 2003).

Antikonvulsanlar ise epilepsi tedavisinde kullanılan ilaç grubudur. Başlıca antikonvülsan grupları arasında barbitüratlar ve türevleri (fenobarbiton ve primidon), hidantoin'ler (fenitoin), oksazolidin-dion'lar (troksidon) ve süksinimid'ler (etosüksimid) vardır. Bu ilaç grubu dudak damak yarıkları gibi konjenital kusurların oluşumunda açıkça kanıtlanmış olan yüksek riskli olguyla ilişkilidir (Gorlin vd. 1990). Yapılan araştırmalarda epilepsi hastalığı olan kadınlarda çocuklarında dudak damak yarığı oluşması riski çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (Durner vd. 1992). Ayrıca fenitoin terotejeni (PHT)’nin mekanizmasında analiz edilerek gebelik boyunca fenitoin terotejeni PHT uygulanan farelerde maternal folat seviyesinde düşüş ve damak yarığının oluşum sıklığının yükseldiğini bulunmuştur (Hansen vd. [1985, 1988], Martinelli vd. 2004.).

Antikoagulanlar kanın pıhtılaşmasını önleyen ilaçlardır. Bunlardan aspirinin tüketiminin, dudak damak yarığı oluşumun etiyojijisinde hamileliğin ilk 3 ay boyunca etkili olduğı önerilmiştir (Martinelli vd. 2004). Ancak hayvan ve insan deneylerinin epidemiyolojik veriler, hamile kadın ve gelişen fetusta ters etkinin direkt kesin kanıtını sağlamamıştır (Corby 1978).

Araştırmacılar hamileliğin ilk zamanlarında folik asit kullanılması ve multivitaminlerin hiç kullanılmamasının dudak damak yarığı oluşumunda 3 kat daha fazla oluşturabileceğı saptanmıştır (Shaw vd. 1996). Ayrıca yapılan araştırmalarda, TGFA Taq 1 C2 genotipiyle birlikte folik asit eksikliğinin ayrıca dudak damak yarığı oluşumu riskini artırabileceğı bulunmuştur. Bununla beraber düşük miktardaki folik asit alımının ise bu bozukluğun oluşmasını önleyemeyeceğı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Dudak damak yarıklarının folik asit kullanımına bağılı olarak önlenmesi amacıyla annenin hamilelik periyodu boyunca, araştırmalarda saptanan % 65 lik oran göz önünde bulundurularak 1günlük 10 mg folik asit ilavesine ihtiyaç duyulmaktadır (Wong ve Hägg 2004).

Dudak damak yarıklarının oluşmasında etkili olan çevresel faktörlere bakıldığında maternal alkol ve maternal sigara kullanımının oynadığı rolün çok güçlü olduğı yapılan araştırmalarlagösterilmiştir (Wyszynski vd. 1996). Hamilelik boyunca annenin yüksek miktarda alkol kullanımı, foetal alkol sendromu dışında dudak damak yarığı oluşma riskini de artırmaktadır. Son 10 yıl boyunca yapılan birçok epidemiyolojik araştırmada alkolün rolü tespit edilmiştir. Ayrıca TGFA, TGFB3 ve MSX1 genlerinin allelik varyantlarının alkol kullanımıyla ilişkisi saptanmıştır (Romitti vd. 1998). Maternal sigara kullanımının, günde 20'den fazla sigara içen annelerde sadece damak yarığı ve izole dudak damak yarığı için riskin en yüksekte olduğı bulunmuştur. Çeşitli çalışmalar 1.3'ten 1.5'e yükselen bir risk aralığı saptamıştır. Maternal glutathione s-transferaz θ-1 (GSTT1) genotipinin sigara kullanımında 4.9'luk olasılık oranıyla etki ettiğı saptanmıştır. Ayrıca MSX1 genotipleri ve maternal sigara kullanımı dudak damak yarıklarının oluşumunda 7.16 kat daha fazla risk oluşturduğı saptanmıştır (Wong ve Hägg 2004).

2.8 Dudak Ve Damak Yarıklarının Tanısı Ve Yaşam Boyu Etkileri

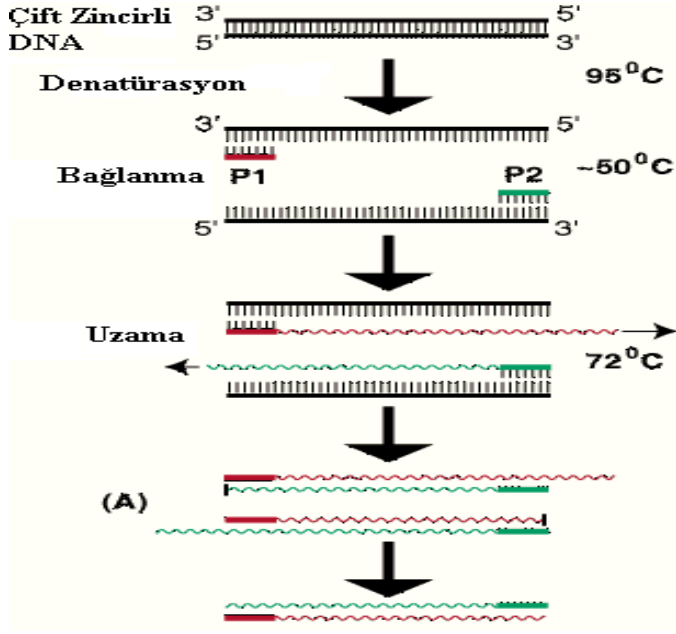
Baş ve yüzde meydana gelen doğumsal anomalilerin tanısına ilk olarak doğumdan sonra anamnez formunun doldurulmasıyla başlanır. Sonrasında fiziki muayene, radyolojik inceleme, genetik inceleme, laboratuvar incelemeleri, başın, uzunluğu, çevresi ve boyunun ölçüldüğü sefalometri, fotoğraflama gibi yöntemlerde kullanılır. Dudak damak yarığı tedavisinde plastik cerrah, çocuk hastalıkları uzmanı, ortodontist, kulak burun boğaz uzmanı, genetik uzmanı, konuşma terapisti, sosyal çalışma uzmanı, psikologtan oluşun bir ekip görev almaktadır. Dudak damak yarıklı bebeklerde, hastalığın sonucu olarak konuşma bozukluğu, beslenme problemi, gaz yutma, burundan gıda gelmesi, gelişme geriliği, başka anomaliler gibi bazı problemler gözlenebilmektedir (Anonim 2010).

2.9 Dudak Damak Yarığı Hastalarında Mutasyonların Saptanması İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.9.1 Polimeraz zincir reaksiyonu

Bir çeşit in vitro klonlama olan, basit olarak, tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasını esas alan PZR, 1985 yılından beri, ilk kez Saiki ve arkadaşları tarafından olmak üzere, araştırmalarda ve klinik laboratuvarlarda sıkça kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli, genomik DNA üzerinde çoğaltılmak istenen hedef bölgenin iki ucuna özgü, ortalama 18–20 baz uzunluğunda, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift oligonükleotid primer kullanılarak, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimiyle birlikte, sınırlandırılmış hedef bölge olan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PZR’da hedef bölgenin çoğaltılmasında, 3 temel aşama mevcuttur. Bunlar sırasıyla: Denatürasyon, Bağlanma (Annealing) ve Uzama (Extension) aşamalarıdır (Şekil 2.20).



Şekil 2.20 Şematik olarak polimeraz zincir reaksiyonu gösterimi (<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>)

1. Denatürasyon: Çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılarak tek zincirli hale getirildiği basamaktır. Genomik DNA, 94–98 °C'de 5 dakika kadar, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz, 1 çift sentetik oligonükleotid primer, 4 adet dNTP'den (Adenin, Timin, Sitozin, Guanin), ve uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan (Mg^{+2}) tampondan meydana gelen reaksiyon karışımı ısıtılarak denatüre edilir.
2. Bağlanma (Annealing-Hibridizasyon): Denatürasyon sonucu 2 zincire ayrılan hedef DNA'ya sentetik oligonükleotid primerlerin 37-65 °C arasında bir sıcaklıkla bağlandığı basamaktır.
3. Uzama (Extension-Polimerizasyon): Isıya dayanıklı DNA Polimeraz enzimi tarafından 72 °C'de tek zincirli DNA'ya bağlanan primerlerin uzadığı basamaktır.

PZR tekniği kalıtsal hastalıklarda hasta ve taşıyıcının tanısı, prenatal tanı, adli tıp, geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılması gibi değişik amaçlara uygun olarak kullanılmaktadır ve Nested, Multiplex, Asimetrik gibi çok farklı uygulama protokolleri vardır (Akar 1999).

2.9.2 Restriksiyon enzimleri

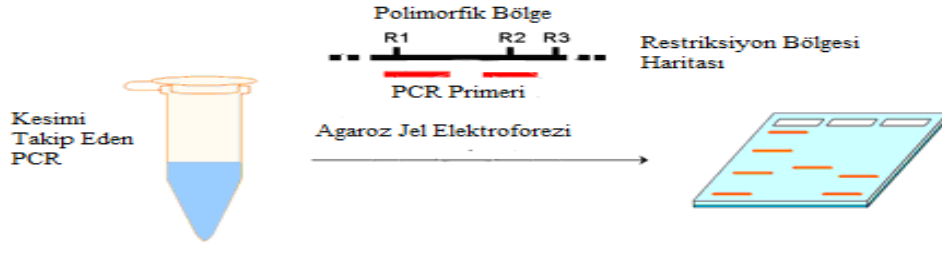
Restriksiyon endonükleazlar özgün bir bölgeyi tanıyarak, nükleik asitlere etki eden enzimlerdir. Bu enzimler, çok uzun DNA moleküllerini spesifik parçalara keserek, bu şekilde DNA'yı manipülasyona uygun kılan, 4 veya 6 baz çiftinden oluşan tanıma bölgelerine sahiptirler. Bu enzimler, palindromik sekansa sahip bölgeyi tanıyarak, çift zincirli DNA'da ki fosfodiester bağımlı keserek DNA'yı 2 parçaya ayırırlar (Akar 1999). Günümüzde değişik mikroorganizmalardan 1000'e yakın RE enzimi elde edilmiştir. Bunlardan bazıları aşağıdaki çizelgede verilmektedir (Nussbaum 2005), (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Bazı Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve dizileri (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)

Mikroorganizma	Enzim	Dizi
<i>Methanobacterium wolfeii</i>	<i>MwoI</i>	5'-G C N N N N N [^] N N G C-3' 3'-C G N N [^] N N N N N C G-5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5'-C [^] T N A G-3' 3'-G A N T [^] C-5'
<i>Bacillus species</i>	<i>BseLI</i>	5'-C C N N N N N [^] N N G G-3' 3'-G G N N [^] N N N N N C C-5'
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	<i>DpnII</i>	5'- [^] GATC-3' 3'-CTAG [^] -5'

2.9.3 Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Bir popülasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. Genomik DNA'da oluşan polimorfizmler, hastalık sebebi olmayan sessiz nükleotid değişimleridir. Ancak bunlar, RE'lerinin kesim bölgesinin yok olmasına ve palindromik bölgenin bozulmasına ya da yeniden oluşmasına neden olabilirler. RFLP yöntemiyle, DNA örneğinde özgül RE ile yapılan kesimlerde farklı uzunlukta DNA parçaları oluşur ve agaroz jelde yapılan görüntülemeyle sonuçlanan analizde, kesim ürünleri değişik pozisyonlarda görülürler.



Şekil 2.21 Restriksiyon endonükleaz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılan ürünün kesilip agaroz jelde görüntülenmesi (<http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/f2.gif>)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışma grubu

Bu tez çalışmasında, çalışma grubu olarak Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Ana Bilim Dalı'na başvuran toplam 77 sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı olan hasta birey ve 89 kontrol birey seçilmiştir. Bu bireylerden alınan toplam 98 adet 9 ml'lik EDTA'lı tüpteki periferik kan örneğinden, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Genetik laboratuvarında DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışma grubunu oluşturan bireylerden (hasta/kontrol) gönüllü onam formu alınmıştır.

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Adı	Marka
Amonyum klorid (NH ₃ Cl)	Riedel de haen
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Sodyum Etilen-diaminetetra-aceticacide (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Tris (H ₂ NC (CH ₂ OH) ₃)	Merck
Hidroklorik Asit (HCL)	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Applichem
Proteinaz K	Applichem
Fenol (CH ₃ OH)	Merck
Kloroform (CHCl ₃)	Merck
Sodyum Asetat (C ₂ H ₃ NAO ₂)	

Kimyasal Adı	Marka
Etil Alkol (C ₂ H ₅ OH)	Merck
Borik asit (H ₃ BO ₃)	Merck
Ethidium Bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Applichem
Bromophenol blue (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Applichem
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	
Oligonucleotide primer	
Agaroz	Prona
Restriksiyon enzimi	
Enjeksiyon Su	Eczacıbaşı-Baxter
İzoamilalkol	Merck

3.1.3 Çalışmada kullanılan gereçler ve cihazlar

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan gereç ve cihazlar

Adı	Marka	Ülke
10 mL EDTA'lı tüp	Vacutest	İtalya
Ependorf tüpler	Sealrite	ABD
Otomatik pipet seti	Thermo	Malezya
Otomatik pipet uçları	Thermo	Malezya
Buzdolabı	Altus	Türkiye
Hassas terazi	Scaltech	Kanada
Manyetik karıştırıcı	Stuart	İngiltere
pH metre	WTW	Almanya
Etüv	Heraeus	Almanya
Vortex	Velp	Avrupa
Yüksek devirli soğutmalı santrifüj	Heraeus	Almanya
Derin Dondurucu (-25 °C)	Indesit	Türkiye
Termocycler	Techgene	İngiltere
Yatay elektroforez düzeneği	Thermo	Malezya
Doğru akım güç kaynağı (400 volt)	Consort E455	Belçika

Adı	Marka	Ülke
Ultraviole transillüminatör	Vilberlourmat	Fransa
Su banyosu	Grand	İngiltere

3.1.4 Solüsyonlar

3.1.4.1 Periferel kandan DNA izolasyon tamponları

Kırmızı Kan Hücreleri Lizis çözeltisi (RBC Lizis çözeltisi):

- 12 gr. amonyum klorür (NH_4Cl)
- 1.2 gr sodyum karbonat (NaCO_3),
- 200 µl etilendiamid tetra asetik asit (EDTA) (ph=8), 500 ml. distile suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlanır. +4°C'de saklandı.

Sodyum Tris EDTA (STE):

- 2,336 gr. 0,1 M Sodyum klorür (NaCl)
- 4 ml. 10 mM Tris Hidroklorik asit (ph=8)
- 0,8 ml. 1 mM EDTA (ph=8) 'ya 400 ml. distile su eklendi.

%10'luk Sodyum Dodosilsülfat (SDS):

- 100 mg SDS
- 900 ml distile suda 68 °C su banyosuna konarak eritildi. Toplam hacim 1 lt'ye tamamlanarak pH=7,2'ye ayarlandı.

Proteinaz K:

- Liyofilize haldeki proteinaz K (20 mg/ ml 100 mg) üzerine 5 ml. distile su eklenerek eritildi. Eppendorflarda -20°C'de saklandı.

Fenol:

- 25 ml Fenol (65°C su banyosun da eritildi.)
- 24 ml Kloroform
- 1 ml izoamilalkol

- 1:1 oranında 100mM Tris HCL(ph=8) karıştırılır. +4°C'de 1 gece bekletilip kullanıldı.

Kloroform

- 24 ml kloroform
- 1 ml izoamilalkol karıştırdı.

3M Sodyum Asetat

- 408,1 gr Sodyum Asetat
- 800 ml. distile suda eritilir ve ph 7'e ayarlanır ve 1000 ml'ye tamamlandı.

%95'lik etanol

- %99.9'luk etanolden 95 ml. ölçülerek 5 ml. distile su ilave edilir.

Tris HCl EDTA

- 1 ml Tris Hidroklorik asit (1 M, ph=8)
- 0,2 ml EDTA (0,5 M, ph=8) distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.,

%70'lik Etanol

- %99.9'luk etanolden 70 ml ölçülerek 30 ml distile su ilave edildi.

3.1.4.2 Agaroz jel elektroforez solüsyonları

Trisma Base EDTA 5X (TBE 5X)

- 54 gr. Trisma Base (Tris)
- 27,5 gr. Borik Asit
- 20 ml. EDTA (0.5 M,, ph=8) 800 ml distile su içinde çözüldükten sonra 1000 ml.'ye tamamlanır.

Trisma Base EDTA 1X (TBE 1X)

- Trisma Base 5X, 1/5 oranında distile su ile sulandırılarak elde edilir.

Ethidium Bromide

- 1 gr Ethidium Bromide
- 100 ml. distile suda manyetik karıştırıcıda boya çözülene dek karıştırılır

3.2 Yöntem

3.2.1 Periferel kandan fenol kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu

Hastaların periferel kan lökositlerinden, genomik DNA standart işlemler modifiye edilerek kullanılarak izole edildi (Sambrook vd. 2009) 1 ml. 0.5 M EDTA bulunan tüpe alınan 9 ml periferel kan örneği 50 ml. santrifüj tüpüne boşaltıldı. Hacminin 2,5 katı kadar RBC (Red Blood Cell) Lysis solüsyonu ilave edildi ve çalkalandıktan sonra 20 dakika buz içerisinde bekletildi. +4°C’de yüksek devirli soğutmalı santrifüj 4000 rpm hızda 20 dakika santrifüj edildi. Dipte lökosit tabakası oluşana kadar işlem tekrarlandı. Kırmızı kan hücreleri parçalanıp lökosit tabakası elde edilince üstteki sıvı kısım döküldü ve RBC Lysis solüsyonuyla 1-2 kez yıkama yapıldı. Sonrasında 1000 µl RBC Lysis solüsyonu ilave edilerek, vorteksle homojen hale getirildi. Hacmin 1/5’i ile işleme devam edildi. 500 µl STE, 30 µl SDS (%10’luk) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildikten sonra, 56°C sıcaklıkta su banyosunda bir gece bekletildi.

Daha sonra, örneğe 1:1 oranında fenol ilave edilerek, 10 dakika çalkalandıktan sonra, 20 dakika buzda bekletildi. . 4°C’de yüksek devirli soğutmalı santrifüj 4000 rpm hızda 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant başka bir eppendorfa alındı ve üzerine 1:1 oranında kloroform ilave edilerek işlem tekrarlandı. Son hacmin 1/10’u kadar 2M sodyum asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar %95’lik etanol ilave edildi. Tüp hafifçe alt üst edilerek DNA’nın presipite olması sağlandı ve -20°C’de bir gece bekletildi.

Ertesi gün -20°C'den alınan eppendorf tüpü +4°C'de yüksek devirli soğutmalı santrifüjde 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım atıldı. Tüpteki DNA yoğunluğuna bakılarak, eklenecek olan TE (Tris-EDTA) miktarı belirlendi. %70'lik etanol ilave edilerek 4°C'de yüksek devirli soğutmalı santrifüj 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. %70'lik alkol dikkatlice dökülerek alkolün uzaklaşması amacıyla kurumaya bırakıldı. Daha önceden belirtilen miktarda Tris EDTA ilave edilerek 37°C su banyosunda bir gece bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı ve +4°C'de saklandı.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile IRF6 ve MSX1 genlerindeki mutasyonların analizi

Sendromsuz dudak damak yarıklı hastalardan elde edilen DNA'larda IRF6 ve MSX1 genlerindeki mutasyonların araştırılmasında ilgili genlere ait belirli ekzon bölgelerinin PZR'ları yapılmıştır.

3.2.2.1 Çoğaltmada kullanılacak primerlerin seçimi

Türk Sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklı hastaların DNA'larında görülen IRF6 ve MSX1 genlerindeki mutasyonların saptanmasında kullanılan primerlerin saptanması, kaynak taraması yapılarak belirlenmiştir. IRF6 geni için Srichomthong vd.'nin (2005) makalesindeki primerler kullanıldı (Çizelge 3.3). MSX1 geni için ise Tongkobetch vd. (2006) makalesindeki primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3 IRF6 geni amplifikasyonunda kullanılan primerler

Gen	Primer	Uzunluk (bp)	Referans
IRF6	F:5' AGTGGCCTTCCTGAATGCTG 3'	647	Srichomthong vd. 2005
	R:5' CTTGACCTCCTCCAGACTAA3'		

Çizelge 3.4 MSX1 geni amplifikasyonunda kullanılan primerler

Gen	Primer	Uzunluk (bç)	Referans
MSX1	F 5' TAGGGCTTCTCAGGGAATCA3' R 5' TTGCGTGGTTTCCCGTATAC 3'	230	Tongkobetch vd. 2006

3.2.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşulları

İlgili gen bölgeleri çizelge 3.3-3.4'te verilen primerler kullanılarak aşağıda belirtilen çizelgedeki şartlar doğrultusunda karışımlar, aşağıda içeriğinin verildiği miktarlarda hazırlanarak uygun şartlarda PZR ile çoğaltıldı (Çizelge 3.6-3.7).

Çizelge 3.5 Amplifikasyonda kullanılan polimeraz zincir reaksiyon karışımları

İçerik	Konsantrasyon	IRF6	MSX1
		1x µl	1x µl
10X PZR Tampon	500u	5	5
MgCl ₂	25 mM	1.5	1.5
dNTP	10mM	2	2
Forward primeri		1.5	1.5
Reverse primeri		1.5	1.5
Taq polimeraz		0.2	0.2
DNA		3	3
dH ₂ O		35.3	35.3
Toplam		50	50

Çizelge 3.6 IRF6 geninin amplifikasyonunda kullanılan döngü basamakları

Enzim aktivasyonu	94	5 dk.	
Denatürasyon	94	1 dk.	
Primer Bağlanması	56	30 sn.	35 döngü
Primer Uzama	72	1 dk.	
Son Uzama	72	10 dk.	

Çizelge 3.7 MSX1 geninin amplifikasyonunda kullanılan döngü basamakları

Enzim aktivasyonu	94	4 dk.	
Denatürasyon	94	1 dk.	
Primer Bağlanması	56	1 dk.	35 döngü
Primer Uzama	72	2 dk	
Son Uzama	72	5 dk	

3.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi

Amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin kontrol edilmesinde % 2 'lik agaroz jel kullanılmıştır. 1 gr tartılan agaroz, 50 mL 1x Tris-Brote-EDTA tamponu ilave edilerek hazırlanan karışım mikrodalga fırın içerisinde homojen bir şekilde çözüldü ve 4 µL ethidium bromide eklenip karıştırılarak elektroforez aparatlarından biri olan jel tablasının içerisine dökülmüştür. Hazırlanan agaroz jel, jel tablasına dökülmeden önce, yükleme kuyucukları elde etmek için jel tablasının içine uygun bir şekilde taraklar yerleştirilmiştir. Sonrasında çözelti polimerleşme sağlanana dek oda ısısında bekletildi. Daha sonra, elde edilen agaroz jel elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir.

Thermo marka elektroforez tankına 1XTBE tamponundan eklendi ve agaroz jelden tarak çıkartıldı. PZR sonucu elde edilen ürünlerin, yüklenme tamponu BBF ile karıştırılarak, 9. µL'sinin yüklenmesi için jel, elektroforez tankına yerleştirildi. 84 V'da

45 dakika yürütüldü ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi için, transillüminatörde ultraviyole ışık altında jelin fotoğrafı çekildi.

3.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu / Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi işlemleri (PZR/RFLP)

MSX1 geni için elde edilen PZR ürününe *Bsp911* restriksiyon enzimi, IRF6 geni için elde edilen PZR ürününe *MboI* enzimi ile muamele edildi. Bu işlem için eppendorf tüpünde hazırlanan karışımda, 17 µL distile su, 2 µL 10X Fermentas Fast Digest enzim buffer, 10 µL PZR ürünü, 1 µL Fermentas Fast Digest enzim bulunmaktadır. Sonrasında hazırlanan karışıma minifüj yapıldı. Sonrasında 37 °C su banyosunda minimum 5 dakika inkübe edildi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 IRF6 geni ve MSX1 geni restriksiyon endonükleaz enzimi reaksiyon karışımları

Deiyonize Su	17 µL
Enzim	1 µL
Buffer	2 µL
PZR ürünü	20 µL

3.2.4.1 PZR/RFLP ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PZR ürünlerinin kontrolünde ethidium bromide eklenmiş % 3'lük agaroz jelde kullanıldı. Thermo marka elektroforez tankında elde edilen ürünün 20 µL'si BBF ile karıştırılarak mutasyon analizi için, jele yüklendi. 100 V'da 20 dakika yürütüldü. Daha sonra kesim ürünleri "Vilber Lourmat" marka transillüminatörde ultraviyole ışık altında jel görüntülendi (Şekil 3.1- 3.2).

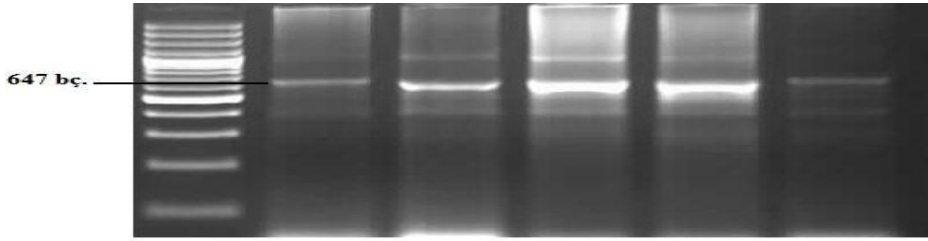
3.2.5 İstatistiksel yöntemler

Çalışmada sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve kontrol grupları arasında IRF6 ve MSX1 geninde saptanan polimorfizmlerin varlığı bakımından fark olup olmadığını, genotip ve allel dağılımını araştırmak için χ^2 istatistiği kullanılmıştır. Olasılık oranları (odds ratio) ve % 95 güven aralığı SPSS 15.0 programı ile hesaplanmıştır. Anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak belirlenmiştir.

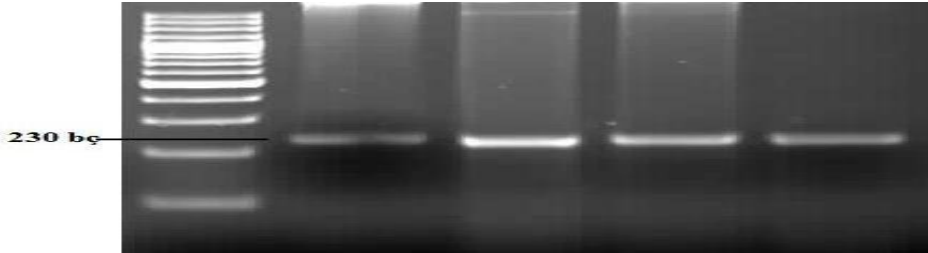
4. BULGULAR

4.1 IRF6 ve MSX1 genlerinin amplifikasyon sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarından DNA izolasyonu ile elde edilen DNA moleküllerinde, IRF6 geni üzerinde 647 ve MSX1 geni üzerinde 230 baz çiftlik bölge, PZR yöntemiyle amplifiye edilerek, hazırlanan %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edildi (Şekil 4.1- 4.2).



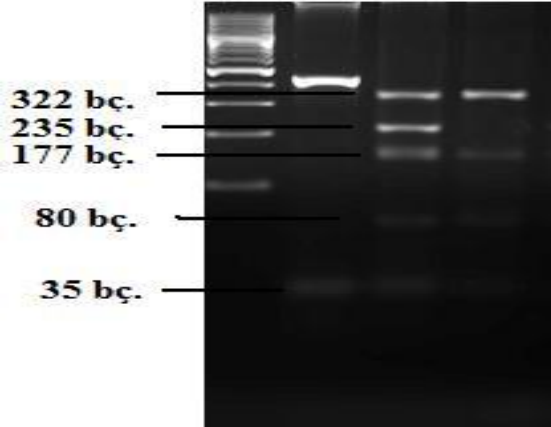
Şekil 4.1 IRF6 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntülenmesi



Şekil 4.2 MSX1 geni amplifikasyonu agaroz jel görüntülenmesi

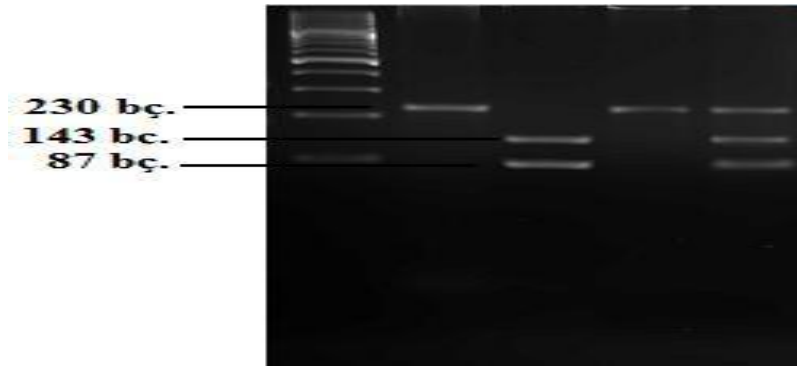
4.2 IRF6 ve MSX1 genlerinin RFLP sonuçları

PZR ile amplifikasyonu yapılmış ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi ve kesme sonrası jel analizi, 3.2.4'te anlatıldığı üzere yapılmıştır. Kesme enziminin sekansı ve enzimin tanıdığı gen bölgesinde meydana gelen mutasyon Şekil 3.3'te gösterilmiştir. IRF6 daki polimorfizmin saptanması için kullanılan *MboI* enzimi için kesim bölgesi içeren GG homozigot bireylerde 322, 80, 35, ve 33 bazçiftlik 4 bant gözlenmiştir. GA heterozigot bireylerde ise A varyantının 322 baz çiftlik kısmı 235 ve 87 baz çiftlik 2 küçük fragmente kesmesiyle 5 bant gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 IRF6 geni *MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü kesimi agaroz jel görüntüsü

MSX1 geninin amplifiye edilen 230 baz çiftlik bölgesinin *BspII9* restriksiyon endonükleaz enzimi için, kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde 143 ve 87 baz çiftlik 2 bant gözlenmiştir. Heterozigot bireylerde ise 230, 143 ve 87 baz çiftlik 3 bant gözlenmiştir. *BspII9* enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde ise sadece 230 baz çifti uzunluğunda tek bant gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 MSX1 geni *BspII9* restriksiyon endonükleaz enzimi ile PZR ürünü kesimi agaroz jel görüntüsü

4.3 IRF6 ve MSX1 Genlerinde Elde Edilen Genotip Sonuçları

IRF6 geninde PZR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütülerek elde edilen görüntüler yorumlanarak, 70 hasta ve 89 kontrol grubunda

GG ve GA genotiplerine ait sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 IRF6 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen ve beklenen genotipler

	Hasta Grubu (n = 70)	Kontrol Grubu (n = 89)
Genotipler	Gözlenen (Beklenen)	Gözlenen (Beklenen)
GG	70 (70.009)	89
GA	1 (0.9878)	0
AA	0 (0.003479)	0

Aynı şekilde MSX1 geninde PZR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütülerek elde edilen görüntüler yorumlanarak, 67 hasta ve 89 kontrol grubunda GG, GA ve AA genotiplerine ait sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 MSX1 geni hasta ve kontrol gruplarında gözlenen genotipler

	Hasta Grubu (n = 67)	Kontrol Grubu (n = 89)
Genotipler	Gözlenen (Beklenen)	Gözlenen (Beklenen)
AA	33 (28.1278)	84 (84.0565)
AG	21 (30.7444)	5 (4.8870)
GG	13 (8.1278)	0 (0.565)

4.4 Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması ve Allel ve Genotip Frekansları Hesaplanması

İki allelli diploid bir populasyonda, Hardy-Weinberg dengesini kontrol etmek için öncelikle IRF6 için GG, GA ve AA genotipindeki bireylerin populasyondaki gözlenen sayıları (N_{GG} , N_{GA} ve N_{AA}) bulunur. Daha sonra gözlenen toplam birey sayısı ile ilgili genotiplerin frekans değerleri çarpılarak her bir genotip için beklenen değerler hesaplanır. Çalışmamızda Hardy-Weinberg dengesine uygunluk hipotezlerinin istatistik olarak karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanılmıştır. Bu işlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.11-3.12'te gösterilmiştir. IRF6 geninde, hasta gruplarında GG(70),

GA(1), AA(0) ve kontrol gruplarında GG(89), GA(0), AA(0) olarak gözlenen genotip değerleri için allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 IRF6 geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri

Genotip	Hasta (n=71)	Kontrol (n=89)
GG	70 (98.6)	89 (100)
GA	1 (1.4)	0 (0)
AA	0 (0)	0 (0)
$\chi^2=0.000$ df =1 p=1, (p>0.05)		
Allel		
G	141 (99,3)	178 (100)
A	1 (0.7)	0 (0)
$\chi^2=0.000$ df =1 p=1, (p>0.05)		

Benzer şekilde MSX1 geninde, hasta gruplarında AA(33), AG(21), GG(13) ve kontrol gruplarında GG(84), GA(5), AA(0) olarak gözlenen genotip değerleri için allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4 MSX1 geni için hasta ve kontrol grupları için hesaplanan allel ve genotip frekans değerleri

Genotip	Hasta (n=67)	Kontrol (n=89)
AA	33 (49.3)	84 (94.4)
AG	21 (31.3)	5 (5.6)
GG	13 (19.4)	0 (0)
$\chi^2=42,826$ df =2 p= 0.00 (p<0.05)		
Allel		
A	87 (64.9)	173 (97.2)
G	47 (35.1)	5 (2.8)
$\chi^2=57,304$ df =1 p= 0.00 (p<0.05)		
Hasta ve kontrollerin karşılaştırması (AA vs. AG /GG)		
Olasılık oranı	17,309 %95 CI	6,232–48,072

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Etiyolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin önemli bir rol oynadığı düşünülen dudak ve damak yarıkları, dünya genelinde 1/500–1000 değerleri arasında sıklık gösteren, oluşumuna genetik ve çevresel faktörlerin bir arada katıldığı doğuştan gelen bir bozukluktur (Murray ve Schutte 2004, Jugessur ve Murray 2005). Dudak damak yarıklarına neden olduğu düşünülen genetik faktörler üzerine yapılan çalışmalar, bir aday gen yelpazesi oluşturmuş olsa da, henüz dudak damak yarıklarının embriyolojik gelişimi aydınlatılmadığı için kesinlik kazanmamıştır. Ancak, genetik faktörler ele alınırken, çevresel faktörlerinde yapılan araştırmalar sayesinde kabul edilebilir bir etkisi olduğu açıkça görülmektedir. Annenin hamilelik boyunca sigara ve alkol kullanımı, radyasyona maruz kalması, ilaç kullanması, kullandığı folik asit miktarı gibi durumların, yeni doğan da dudak damak yarıklarının oluşmasına zemin hazırladığı saptanmıştır. Bu aday genlerden IRF6 ve MSX1'in saptanması da, fare modelleri, dudak damak yarıklı bireylerden oluşturulan vaka-kontrol, vaka-ebeveyn 3'lü; bağlantı analizi, SNP analizleri ve yüze ait yarıkların gözlemlendiği sendromların genetik temelini anlaşılması için gerçekleştirilen çalışmalar ile mevcuttur.

Dudak ve damağın oluşumunda görev aldığı düşünülen IRF6 geninde meydana gelen birçok polimorfizmin, birçok populasyonda dudak damak yarıklarına neden olduğu gerekçesiyle incelenmesine devam edilmektedir (Zuccherro vd. 2004, Blanton vd. 2005, Srichomthong vd. 2005, Scapoli vd. 2005, Pegelow 2008). IRF6 820 G→A değişimi, SMIR diye adlandırılan Smad interferon düzenleyici protein bağlanma domaininde 274. kodonda evrimsel olarak zıt olan; Valinin yerine İzolösin yer alır. IRF6 'nın kesin fonksiyonları hala bilinmemesine rağmen önceki veriler, dönüştürücü büyüme Faktörü beta (TGF-β) sinyalizasyon yolunda bir rol oynadığını ileri sürülmüştür. IRF6 mutant fareler, ayrıca, IRF6'nın keratinosit-proliferasyon–farklılaşması değişiminin etkin olan anahtarı olduğunu öneren, yumuşak doku kaynaşmasıyla sonuçlanan, terminal farklılaşma göstermede başarısız olan hiper-proliferatif epidermis sergilediği saptanmıştır (Pegelow 2008). İnsanlara özel olan, koruyucu allel olarak bilinen A allelinin insan evrimi için seçildiği iddia edilmiştir (Srichomthong vd. 2005). IRF6

geninde bu bölgede bulunan Valinin türler arasında korunduğuna dair verilere ulaşıldığından beri, bu gen değişimin gen fonksiyonuna etki edebileceği ve dudak damak yarıklarına katkı sağlayabileceği olgusu araştırılmaktadır. İnsan popülasyonunda G alleli yaygınlığa sahip olmak, IRF6'daki genetik farklılaşmalarla bu doğum kusuru için bilinen en yaygın nedendir. Sırasıyla İtalyan (p=0.005), Beyaz ırk, İspanyol, Afrikalı popülasyonlarda, IRF6 geni üzerinde yapılan çalışmalarının bir kısmında da ortalama % 2 oranında birçok varyasyon tipine rastlanılmıştır (Scapoli vd. 2005, Srichomthong vd. 2005, Blanton vd. 2005). Özellikle Asya, Avrupa ve Güney Amerika kökenli 10 popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada yaygın bir varyant olarak bilinen, IRF6 Val274Ile (G820A) değişimi p değeri $<10^{-9}$ olarak saptanmış ve bu değişim Sendromsuz dudak damak yarıkları ile yüksek derecede ilişkili olduğu bulunmuştur (Zuccherro vd. 2004). Suazo vd. (2008), Şili popülasyonunda gerçekleştirdiği çalışmanın sonucunda V274Ile allel frekansını, beyaz ırka ait bulgulardan düşük ve Asya popülasyonundakinden yüksek; % 74 olarak bulmuşlardır. Grundman ve Hering (2005), gerçekleştirdiği çalışmada ise, p.274V varyantı; 193 sağlıklı bireyden 192'sinde (% 97.7) homozigot ve 1 heterozigot olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmaların, IRF6 geninde meydana gelen Val274Ile polimorfizmi ile sendromsuz dudak damak yarıkları arasındaki zayıf ilişki, Alman ve Şili popülasyonlarında yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Çalışmaya göre V274I varyantının kendi başına hastalığa neden olmadığı, ancak diğer mutasyonlarla birlikte dudak damak yarıkları için risk oluşturabilecek özel bir faktörü olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışma grubumuzda ise, G820A varyantı % 0.7 oranında bulunmuştur. Özellikle 820G allel frekansı Afrikalılar'da % 100 ve Avrupa'da % 90–100 olarak saptanmıştır (Zuccherro vd. 2004). Scapoli vd. (2005) Güney Avrupa'da yaptıkları bir çalışma ile Zuccherro vd. (2004)'nin sonuçlandırdığı haplotipe dayalı bu analiz ile onaylanmıştır. 820G allel frekansı Paranaiba vd.'nin 2010'da Brezilya'da yaptıkları çalışmada % 94.4 olarak saptanmıştır. Türk popülasyonunda yapılan çalışmamızda 820G allel frekansı % 99.3 olarak saptanmıştır. Aynı şekilde kontrol grubumuzda 820G alleli frekansı, 2004 yılında Zuccherro vd.'nin yaptığı çalışmada Çin, Japonya'da ve Kamboçya'da % 58-66, Srichomthong vd.'nin 2005 yılında yaptığı çalışmada % 61 ve Tang vd.'nin 2009 yılında yaptığı çalışmada % 61.46 oranından farklı olarak, % 100 olarak saptanmıştır.

Sendromsuz dudak damak yarıklı hastalarda IRF6 GG genotipi Tayland popülasyonunda OR=1.67 (%95 Güven Aralığı 1.13–2.47), Çin popülasyonunda OR=1.04 (%95 Güven Aralığı 0.44–1.64), Tayvan popülasyonunda OR=2.75 (%95 Güven Aralığı 1.37–5.52) olarak hesaplanmıştır (Srichomthong vd. 2005, Park vd. 2007, Tang vd. 2009). Türk popülasyonunda IRF6'da 820 G→A varyasyonunun araştırılmasına dair yapılan çalışmamızda herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır. Çalışmaya katılan hastalar kontrol varyantları karşılaştırıldığında probandlar arasında, genetik danışma bakımından genotip frekans dağılımında önemli bir fark saptanamamıştır (p=0,444). Araştırma grubumuzdaki Türk hastalarda GG genotipi %99,375 oranında, kontrol grubumuzda ise %100 olarak saptanmıştır, bu sonuç Avrupa popülasyonunda % 90-100 (Kondo vd. 2002, Zuccherro vd. 2004), Afrika popülasyonu %100 (Zuccherro vd. 2004), Brezilya popülasyonunda ki % 94.9'lük oranla karşılaştırılabilir. IRF6 geninin, Türk popülasyonunda sendromsuz DDY'nun daha gözlenebilmesi ile, daha geniş hasta gruplarını ve IRF6'yı çevreleyen SNP'lerin incelendiği kapsamlı haplotip analizi çalışmaları, hem G820A polimorfizminin hem de IRF6 geninin önemini daha etkin bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır.

MSX1 genindeki varyasyonların belirlenmesi amacıyla yapılan; dizi analizi, çok sayıda popülasyonlar üzerinde çalışılan SNP analizleri ve bağlantı analizleri gibi birçok çalışma bulunmaktadır (Lidral vd. 1997, Jezewski vd. 2003, Jugessur vd. 2003, Vieira vd. 2003, Suzuki vd. 2004, Tongkobpetch vd. 2006). MSX1 lokusu temelde, damak yarığı ve diğer yüz yarıklarının gözleendiği bir knockout fare çalışmasında ortaya çıkarılmıştır (Satokata and Maas 1994). MSX1 geninin sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda görev aldığını belirleyen farklı popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiş birçok çalışma vardır (Lidral vd. 1998, Blanco vd. 2001, Beaty vd. 2001, Jugessur vd. 2003). Vietnam ve Tayland popülasyonlarında yapılan çalışmalarda sendromsuz dudak damak yarığı oluşumuna MSX1 geninin katkısı %2 oranında saptanmıştır (Suzuki vd. 2004, Tongkobpetch vd. 2006). MSX1 geni ve sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumu ile ilgili olarak; Kolombiya popülasyonunda OR= 9,476923 (%95 GA= 1,371927–404.782, Tayland popülasyonunda OR= 0.56,(95% GA= 0.18–1.78), Kore popülasyonunda OR=0.26 (%95 GA= 0.10–0.99) istatistiksel sonuçlar hesaplanmıştır (Tongkobpetch vd. 2006, Otero vd. 2007, Lee vd. 2008). Türk

populasyonuna ait hasta ve kontrol grubumuzda yaptığımız saptamalarımıza göre, AG+GG genotiplerini AA genotipi ile karşılaştırdığımız zaman, olasılık oranı 17,309, %95 güven aralığını 6,232–48,072 arasında hesaplanmıştır. Kolombiya ve Türk populasyonunda MSX1 geni ile Sendromsuz DDY arasında ilişki kurulabilirken, Tayland ve Kore populasyonlarında MSX1 geni ve bu kusur arasında bir ilişki kurulamamıştır. Ancak bazı çalışmalarda MSX1’in sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda etken olmadığı sonuçları elde edilmiştir (Lidral vd. 1998, Jezewski vd. 2003, Viera A. R. 2005). Örneğin Iowa populasyonunda ve (p=0.35, p>0.05) Filipinli populasyonunda MSX1 (p=0.26, p>0.05) ve Beaty vd. (2001) tarafından Maryland populasyonunda (p=2.42, p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Tongkobetch vd.’nin (2008), Tayland populasyonu üzerinde gerçekleştirdiği 440 C>A polimorfizmini inceledikleri çalışma sonucunda 143 (0.953) sendromsuz dudak damak yarıklı hastada 2 normal allel olan CC genotipi gözlemlendiği belirtilmiş, 7 (0.047) hastada ise 1 normal ve 1’de mutant allel olan CA genotipine rastlanmış ve hiç 2 mutanat allel olan AA genotipi saptanamamıştır. 440C>A polimorfizmi için hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, önemli bir fark saptanamamıştır. CC genotipi ile karşılaştırılan CA genotipi ile aralarında bir ilişki saptanamamıştır (OR= 0.56, %95 GA=0.18–1.78). Norveç populasyon çalışmasında ise, MSX1-CA polimorfizmi ile sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı arasında güçlü bir ilişki saptanamamıştır (Jugessur vd. 2003). Tongkobetch vd.’nin (2008) ve Jugessur vd.’nin (2003) polimorfizim çalışmalarında sendromsuz dudak damak yarıkları ile ilişki kurulamamasına rağmen, bizim çalışmamızda MSX1 genindeki -8796A>G polimorfizminin, Türk popülasyonunda hasta ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırmamızda probandlar arasındaki genotip (p=0.000, df=2) frekansı dağılımı ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Bu durum genetik danışma açısından anlamlı kabul edilmiştir. Kontrol ile hasta grubu karşılaştırıldığında, hastalarda GG genotipinin %8 oranında daha yüksek gözlemlendiği belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu verilerle, Türk popülasyonunda MSX1 geninde meydana gelen bu değişimin sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumuna katkı sağladığını saptamış olsakda; bu genin Türk popülasyonu için öneminin net şekilde anlaşılabilmesi için, MSX1 geninde meydana gelen diğer polimorfizmlerinde daha geniş hasta grupları oluşturularak incelenmesi gerekmektedir.

Sendromsuz dudak damak yarıklı hastaların gen analizleri Türk popülasyonun da IRF6 ve MSXI genlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu gen değişimleri farklı popülasyonlar ve farklı coğrafik alanlarda değerlendirilmiş olup sonuçlarımızı destekleyen ve onaylayan paralel sonuçlar bulunduğu görülmüştür. Ancak genetik bir hastalık olan, dudak damak yarıklarının ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülen farklı aday genlerde mevcuttur. Bu yönüyle çalışmamızın, literatüre katkı sağladığı düşünülmeyle birlikte, dudak damak yarığının genetiksel temelinde farklı gen bölgelerinde, farklı değişimlerin olduğu bilinmektedir. Konu bu yönüyle genişletilmelidir ve bu oluşumda Türk popülasyonundaki diğer etkili olabilecek major gen değişimleri de araştırma kapsamına alınmasının uygun olduğu kanaatine varmış bulunmaktayız.

KAYNAKLAR

- Akar, N. 1999. "Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş". Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An-Tıp A.S. Yayınları, Ankara, 154-205.
- Alappat, S., Zhang, Z.Y. and Chen, P.Y. 2003. Msx homeobox gene family and cranio-facial development. *Cell Research*, 13, 429–442.
- Albuisson, J., Pêcheux, C., Carel, J.C., Lacombe, D., Leheup, B., Lapuzina, P., Bouc-hard, P., Legius, E., Matthijs, G., Wasniewska M., Delpech, M., Young J., Hardelin, J.P., and Dodé, C. 2005. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Human Mutation*, 25, 1; 98-9.
- Anonymous.2009.Web Sitesi: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Troat_with_Tonsils_0011J.jpeg – modifiye edilerek, Erişim Tarihi: 08.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://emedicine.medscape.com/article/837347-media>, modifiye edilerek, Erişim Tarihi: 01.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://interplast.blogs.com/.a/6a00d8341c8ede53ef01156fc42096970b-800wi>, modifiye edilerek, Erişim Tarihi 11.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://www.mdconsult.com/das/pdxmd/media/0417/7041717/large.jpg>, Erişim Tarihi: 11.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://img.tfd.com/mosby/thumbs/500051-fx16.jpg>, Erişim Tarihi: 01.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF6&search=IRF6>-Erişim Tarihi: 01.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSX1&search=MSX1>, Erişim Tarihi: 11.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html> Erişim Tarihi: 01.11.2009
- Anonymous.2009.Web Sitesi: <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/f2.gif>, modifiye edilerek, Erişim Tarihi: 17.08.2009
- Anonymous.2010.Web Sitesi: <http://i.pbase.com/u20/stella97king/large/20524457.TWODAYS.jpg>-modifiye edilerek, Erişim Tarihi: 18.04.2010
- Beaty, T.H., Maestri, N.E., Hetmanski, J.B., Wyszynski, D.F., Vanderkolk, C.A., Simpson, J.C., McIntosh, I. Smith, E.A., Zeiger, J.S., Raymond, G.V., Panny, S. R., Tiff, C.J., Lewanda, A.F., Cristion, C.A. and Wulfsberg, E.A. 1996. Testing for interaction between maternal smoking and TGFA genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992–1996. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 34, 5, 447–454.

- Beaty, T.H., Wang, H., Hetmanski, J.B., Fan, Y.T., Zeiger, J.S., Liang, K.Y., Chiu, Y. F., Vanderkolk, C.A., Seifert, K.C., Wulfsberg, E.A., Raymond, G., Panny, S.R., and McIntosh, I. 2001. Case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Annals of Epidemiology*, Volume 11, Issue 6, 434-442.
- Beaty, T.H., Hetmanski, J.B., Zeiger, J.S., Fan, Y.T., Liang, K.Y., VanderKolk, C.A. and McIntosh, I. 2002. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genetic Epidemiology*, 22, 1; 1-11.
- Ben, J., Jabs, E.W. and Chong, S.S. 2005. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expression Patterns*, 5, 629–638.
- Bendall, A.J. and Abate-Shen, C. 2000. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*, 247:17–31.
- Bergemann, A.D., Cole, F. and Hirschhorn, K. 2005. The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Trends Genet.*, 21: 188–95.
- Bjork, B.C., Krahn K.N., Schutte, B.C. and Murray, J.C. IRF6-Related Disorders, 2006 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=vws> Erişim Tarihi:25.08.2009.
- Blanco, R., Chakraborty, R., Barton, S.A., Carreno, H., Paredes, M., Jara, L., Palomino, H. and Schull, W.J. 2001. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Human Biology*, 73, 1, 81-89.
- Blanco, R., Suazo, J., Santos, J.L., Paredes, M., Sung, H., Carren~O, H. and Jara, L. 2004. Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate–Craniofacial Journal*, Vol. 41, 2.
- Blanton, S.H., Cortez, A., Stal, S., Mulliken, J.B., Finnell, R.H., Hecht, J.T. 2005. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am. J. Med. Genet. A.*, 137, 259–262.
- Carmichael, S.L. and Shaw, G.M. 1999. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *Am. J. Med. Genet.*, 86, 242–244.
- Catron, K.M., Zhang, H., Marshall, S.C., Inostroza, J.A., Wilson, J.M., and Abate, C. 1995. Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2., 861-871.
- Catron, K.M., Wang, H., Hu, G., Shen, M.M. and Abate-Shen, C. 1996. Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech. Dev.*, May; 56, 1–2; 223.

- Corby, D.G. 1978. Aspirin in pregnancy: maternal and fetal effects. *Pediatrics*, 62, 5, 930-7.
- Davis, J.S. and Ritchie, H.P. 1922. Classification of congenital clefts of lip and palate. *J Am. Med. Assoc.*, 79 :1323.
- Dodé, C., Levilliers, J., Dupont, J.M., Paepe A., Dû, N.L., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R.S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Bavere, F., Pêcheux, C., Le Tessier, D., Cruaud, C., Delpech, M., Speleman, F., Vermeulen, S., Amalfitano, A., Bachelot, Y., Bouchard, P., Sylvie, C., Carel, J.C., Delemarre-van de Waal, H., Goulet-Salmon, B., Kottler, M.-L., Odile Richard, O., Sanchez-Franco, F., Saura, R., Young, J., Petit, C. and Hardelin, J.P., 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat. Genet.*, Apr; 33, 4: 463-5.
- Durner, M., Greenberg, D.A., Delgado-Escueta A.V. 1992. Is there a genetic relationship between epilepsy and birth defects? *Neurology*, Apr;42: 63-7.
- Edwards, M.J., Agho, K., Attia, J., Diaz, P., Hayes, T., Illingworth, A. and Roddick, L. G. 2003. Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy. *Am. J. Med. Genet.*, 120A: 459-63.
- Eroshkin, A. and Mushegian, A. 1999. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J. Mol. Med.*, 77: 403-405.
- Fallin, M.D., Hetmanski, J.B., Park, J., Scott, A.F., Ingersoll, R., Fuernkranz, H.A., McIntosh, I. and Beaty, T.H. 2003. Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts. *Genetic Epidemiology*, 25: 168–175.
- Fogh-Andersen, P. 1942. Inheritance of harelip and cleft palate. *Nyt Copenhagen: Nordisk Forlag, Arnold Busck.*
- Ghassibe', M., Revencu, N., Bayet, B., Gillerot, Y., Vanwijck, R., Verellen-Dumoulin, C. and Vikkula, M. 2004. Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *J. Med. Genet.*, 41, e15.
- Ghassibe, M., Bayet, B., Revencu, N., Verellen-Dumoulin, C., Gillerot, Y., Vanwijck, R. and Vikkula, M. 2005. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *European Journal of Human Genetics*, 13, 1239–1242.
- Gorlin, R., Cohen, M. and Levin, S. 1990. *Syndromes of the head and neck.* Oxford University Press, Oxford.
- Hansen, D.K. and Billings, R.E. 1985. Phenytoin teratogenicity and effects on embryonic and maternal folate metabolism. *Teratology*, 31, 363–371.

- Houzelstein, D., Arlette Cohen, A., Buckingham, M.E. and Benoit Robert, B. 1997. In
sertional mutation of the mouse *Msx1* homeobox gene by an *nlacZ* reporter gene.
Mechanisms of Development, 65, 123-133.
- Ingraham, C.R., Kinoshita, A., Kondo, S., Yang, B., Sajan, S., Trout, K.J., Malik, M.I.,
Dunnwald, M., Goudy, S.L., Lovett, M., Murray, J.C. and Schutte, B.C. 2006.
Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for
interferon regulatory factor 6. *Nature Genetics*, 38, 1335 – 1340.
- Jaskoll, T., Choy, H.A., Chen, H. Melnick, M. 1996. Developmental expression and
CORT-regulation of TGF-P and EGF receptor mRNA during mouse palatal
morphogenesis: correlation between CORT-induced cleft palate and TGF-P2
mRNA expression. *Teratology* 54:34-44.
- Jezewski, P., Vieira, A.R., Nishimura, C., Ludwig, B., Johnson, M., O'Brien, S.E., Daa-
ck-Hirsch, S., Schultz, R.E., Weber, A., Nepomucena, B., Romitti, P.A.,
Christensen, K., Orioli, I.M., Castilla, E.E., Machida, J., Natsume N. and
Murray J.C. 2003. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-
syndromic cleft lip and palate *J. Med. Genet.*, 40, 399-407.
- Jirásek, J. E., 2004. An atlas of human prenatal developmental mechanics anatomy and
staging 1st edition. Taylor and Francis Group, 7-18, London.
- Jugessur, A., Lie, R.T., Wilcox, A.J., Murray, J.C., Taylor, J.A., Saugstad, O.D., Vinde-
nes, H.A. and Abyholm, F. 2003. Variants of developmental genes (*TGFA*,
TGFB3, and *MSX1*) and their associations with orofacial clefts: A case-parent
triad analysis. *Genetic Epidemiology*, 24: 230–239.
- Jugessur, A. and Murray, J.C. 2005. Orofacial clefting: recent insights into a complex
trait. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 270–278.
- Jugessur, A., Rahimov, F., Lie, R.T., Wilcox A.J., Gjessing, H.K., Nilsen, R.M., Nyug-
en, T.T. and Murray, J.C. 2008. Genetic variants in *IRF6* and the risk of facial
clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-
control study of facial clefts in Norway. *Genet. Epidemiol.*, 32, 413– 424.
- Jumlongras, D., Bei, M., Stimson, J.M., Wang, W.F., DePalma, S.R., Seidman, C.E.,
Felbor, U., Maas, R., Seidman, J.G. and Olsen, B.R. 2001. A nonsense mutation
in *MSX1* causes Witkop syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 67–74.
- Kernahan, D.A., and Stark, R.B. 1958. A new classification for cleft, lip and cleft
palate. *Plastic Reconstructive Surgery*. 22, 435.
- Klug, W. and M. Cummings (2000). *Genetik kavramlar*.

- Koillinen, H., Wong, F.K., Ollikainen V., Karsten, A., Larson, O., Teh, B.T., Huggare, J., Lahermo, P., Larsson, C., Kere, J. 2001. Mapping of the second locus for the Van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (10) :747-52.
- Kondo, S., Schutte, B.C., Richardson, R.J., Bjork, B.C., Knight, A.S., Watanabe, Y., et al., Watanabe Y., Howard, E., Ferreira de Lima, R.L.L., Daack-Hirsch, S., Sander A., McDonald-McGinn D.M, Zackai E. H., Lammer E.J., Aylsworth A.S., Ardinger H.H., Lidral, A.C., Pober, B.R., Moreno, L., Arcos-Burgos, M., Valencia C., Houdayer, C., Bahuau M., Moretti-Ferreira D., Richieri-Costa, A., Dixon, M.J. and Murray, J.C. 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat. Genet.*, 32, 285–289.
- Lace, B., Vasiljeva I., Dundure I., Barkane B., Akota I., and Krumina A. 2006. Mutation analysis of the MSX1 gene exons and intron in patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 8:21-4.
- Lee, H.K., Kim, S.S. and Son, W.S. 2008 Characteristics of MSX1 gene in Korean non-syndromic cleft lip and palate individuals. *Korean J. Orthod.*, 38, (2):133-43.
- Lees, M.M., Winter, R.M., Malcolm, S., and Saal, H.M, Chitty, L. 1999. Popliteal Pterygium syndrome: a clinical study of three families and report of linkage to the Van der Woude syndrome locus on 1q32. *J. Med. Genet.*, Dec; 36(12):888-92.
- Lidral, A.C., Murray, J.C., Buetow, K.H., Basart, A.M., Scheerer, H., Shiang, R., Naval, A., Layda, E., Magee, K. and Magee, W. 1997. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofacial. Journal*, Jan; 34 (1) : 1-6.
- Lidral, A.C., Romitti, P.A., Basart, A.M., Doetschman, T., Leysens, N.J., Daack-Hirsch, S., Semina, E.V., Johnson, L.R., Machida, J., Burds, A., Parnell, T. J., Rubenstein, J. L.R. and Murray, J.C., 1998. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am. J. Hum. Genet.*, 63 :557–568.
- Little, H.J., Rorick, N. K., Su, L.I., Baldock, C., Malhotra, S., Jowitt, T., Gakhar, L., Subramanian, R., Schutte, B.C., Dixon, M. J. and Shore, P. 2009. Missense mutations that cause Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome affect the DNA-binding and transcriptional activation functions of IRF6. *Human Molecular Genetics*, 18 (3):535–545.
- Martinelli, M., Carinci F., Scapoli, L., Pezzetti, F., Marchesini, J., Palmieri, A., Caramegli, E. Baciliero, U., Padula, E., Gombos, F., Rulo, R., Carls, F., Becchetti, A., Tognon, M. and Carinci, P. 2004. Drugs, environmental factors, loci and genes involved in nonsyndromic orofacial cleft. *Current Pharmacogenomics*, Volume 2, Number 3, September , 277-286.

- Meng, L., Bian, Z., Torensma R. and. Von den Hoff J.W. 2009. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J. Dent. Res.*, 88, 22.
- Modesto, A., Moreno, L.M., Krahn, K., King S. and Lidral A.C. 2006. MSX1 and oro-facial clefting with and without tooth agenesis. *J. Dent. Res.*, 6, 85, 542.
- Moreno, L.M., Arcos-Burgos, M., Marazita, M.L., Krahn, K., Maher, B.S., Cooper, M.E., Valencia-Ramirez C.R. and Lidral A.C. 2004. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. *Am. J. Med. Genet. A*, 125,135-144.
- Morkūnienė, A., Steponavičiūtė, D., Kasnauskienė, J. and Kučinskas, V. 2006. Nucleotide sequence changes in the MSX1 and IRF6 genes in Lithuanian patients with nonsyndromic orofacial clefting. *Acta Medica Lituanica*. Volume 13 No. 4. P. 219–225.
- Mossey, P.A. and Little, J. 2002. Epidemiology of oral clefts: an international Perspective. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford, England: Oxford University Pres, 127-58.
- Murray, J.C. and Schutte, B.C. 2004. Cleft palate players, pathways, and pursuits. *The Journal of Clinical Investigation*, 113:1676–1678.
- Nieminen, P., Kotilainen, J., Aalto, Y., Knuutila, S., Pirinen, S. and Thesleff, I. 2003. MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J. Dent. Res.* 82, 1013-1017.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., and Boerkoel, III C.F. 2005. *Tıbbi Genetik Günes Kitabevi*, 44, 33-37.
- Otero, L., Gutie´rrez, S., Cha´ves, M., Vargas, C. and Bermudez, L. 2007. Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 44, 6.
- Park, J.W., McIntosh, I., Hetmanski, J. B., Jabs, E.W., Vander Kolk, C. A., Wu-Chou, Y.H., Chen, P.K., Chong, S.S., Yeow, V., Jee, S.H., Park, B.Y., Fallin, M.D., Ingersoll, R., Scott, A.F. and Beaty, T.H. 2007. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genetics In Medicine*, April, 9,4.
- Paun, A. and Pitha, P.M. 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie*, 89, 744-753.
- Pegelow, M., Peyrard-Janvid, M., Zucchelli, M., Fransson, I., Larson, O., Kere, J., Larsson, C. and Karsten, A. 2008. Familial non-syndromic cleft lip and palate - analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *European Journal of Orthodontics*, 30, 169–175.

- Richardson, R.J., Dixon, J., Malhotra, S., Hardman, M.J., Knowles, L., Boot-Handford, R.P., Shore, P., Whitmarsh, A. and Dixon, M.J. 2006. *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat. Genet.*, 38(11):1329-34
- Romitti, P., Lidral, A.C., Munger, R.G., Daack-Hirsch, S., Burns, T. L. and Murray, J. C. 1999. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*, 59, 1, 39-50.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 20, 230, 1350–135.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual on the web.* <http://www.molecularcloning.com/> Cold Spring Harbor, NY:545-553 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Erişim 03.04.2009
- Satokata, I. and Maas, R. 1994. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genetics*, 6, 348 - 356. In: Jugessur, A. and Murray, J.C. 2005. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15:270–278.
- Saxen, I. 1975b. Prolonged in vitro closure of the mouse secondary palate by salicylates. *Scand. J. Dent. Res.*, 83, 202-208.
- Scapoli, L., Palmieri, A., Martinelli, M., Pezzetti, F., Carinci, P., Tognon, M. and Carinci, F. 2005. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am. J. Hum. Genet.*, 76, 180–183.
- Schultz, R.E., Cooper, M.E., Daack-Hirsch, S., Shi, M., Nepomucena, B., Graf, K.A., O'Brien, E.K., O'Brien, S.E., Marazita, M.L. and Murray, J.C. 2004. Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. *Am. J. Med. Genet.*, 125A, 17-22
- Schutte, B.C. and Murray, J.C. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum. Mol. Genet.*, 8(10):1853-9.
- Shaw, G.M., Wasserman, C. R., Lammer, E. J., O'Malley, C.D., Murray, J.C., Basart, A. M. and Tolarova, M.M. 1996. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am. J. Hum. Genet.* 58:551-561.

- Shotelersuk, V., Ittiwut, C., Siriwan, P. and Angspatt, A. 2003. Maternal 677CT/1298A Cgenotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J. Med. Genet.*, 40(5):e64.
- Silva Filho, O.G., Rosa, L.A.A. and Lauris, R.C.M.C. 2007. Influence of isolated cleft palate and palatoplasty on the face. *J. Appl. Oral. Sci.*, 15(3), 199-208.
- Slayton, R.L., Williams, L., Murray, J., Wheeler, J.J., Lidral, A.C. and Nishimura, C.J. 2003. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 4, 274-9.
- Smith, C. P. W., Williams, P.L. and Treadgold, S. 1984. *Basic Human Embryology* 3rd edition. Pitman Publishing Limited, 68, London.
- Sözen, M.A., Tolarova, M.M. and Richard A.S. 2009. Bir CLTMP geni polimorfizmi ile Guetamala'daki non-sendromik yarık dudak ve/veya damak arasında ilişkilendirme çabası. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 7, (1), 7-11.
- Spritz, R.A. 2001. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Curr. Opin. Pediatr.* 13:556–560. In: Stevenson, R.E. and Hall, J.G. 2006. *Human malformations and related anomalies*. Oxford University Pres. p:395.
- Srichomthong, C., Siriwan, P. and Shotelersuk, V. 2005. Significant association between IRF6 820G→A and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J. Med. Genet.*, 42:e46.
- Stainer, P. and Moore, G. E. 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13, Review Issue 1, 73-81.
- Stevenson, R.E. and Hall, J.G. 2006. *Human malformations and related anomalies*. Oxford University Pres. p:395
- Suazo, J., Santos, J.L., Carreno, H., Jara, L. and Blanco, R. 2004. Linkage Disequilibrium between MSX1 and non-syndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *J. Dent. Res.*, Oct, 83, (10), 782-5.
- Suzuki, K., Hu, D., Bustos, T., Zlotogora, J., Richieri-Costa, A., Helms, J.A. and Spritz, R.A. 2000. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.*, 25, 427–430.
- Suzuki, Y., Jezewski, P.A., Machida, J., Watanabe, Y., Shi, M., Cooper, M.E., Vietle, T., Nguyen, T.D., Hai, H., Natsume, N., Shimozato, K., Marazita, M.L. and Murray, J.C. 2004. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet. Med.*, 6, 117–25.

- Tang, W., Du, X., Feng, F., Long, J., Lin, Y., Li, P., Liu, L., Tian W. 2009. Association Analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate–Craniofacial Journal*, 46, 1, 89-92.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 623–55.
- Taylor, A.J. 1968. Autosomal trisomy 13 (Patau’s syndrome): a detailed 27 cases of Edward’s syndrome and 27 cases of Patau’s syndrome. *J. Med. Genet.*, 5, 227-52.
- Tongkobpetch, S., Siriwan, P. and Shotelersuk V. 2006. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J. Hum. Genet.*, 51:671–676.
- Tunçbilek, E. 1996. Türkiye’de malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yeni doğanın andropometrik değerlendirilmesi. *Tübitak Matbaası, Ankara.*, s. 94,
- Tunçbilek, G . 1999. Dudak Damak Yarıklarında Kalıtım ve Epidemiyoloji. *Dudak ve Damak yarıkları*. Ed. Erk, Y., Özgür, F. İşkur Matbaacılık Ltd.Sti., Ankara. s:7 16.
- Tunçbilek, G., Özgür, F. ve Balcı, S. 2004. 1229 yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47, 172-176.
- Van der Woude, A. 1954 *Fistula Labii Inferioris Congenita and its association with cleft lip and palate*. *Am J Hum Genet* 6:244.
- Van Rooij, I.A.L.M., Wegerif, M.J.M.; Roelofs, H.M.J., Peters, W.H.M., Kuijpers-Jagtman, A.M., Zielhuis, G.A., Merkus, H.M.W.M., Steegers-Theunissen, R.P.M. 2001. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*, 12, 502-7.
- Vieira, A.R., Orioli, I.M., Castilla. E.E., Cooper, M.E., Marazita, M.L. and Murray J.C. 2003. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J. Dent. Res.*, 82(4):289-292.
- Vieira, A.R., Romitti, P.A., Orioli, I.M. and Castilla, E.E. 2003. Complex segregation analysis of 1,792 cleft lip and palate families in South America: 1967-1997. *Pesqui Odontol Bras.*, 17(2), 161-5.

- Vieira, A.R., Avila, J.R., Daack-Hirsch S., Dragan, E., Félix, T.M., Rahimov, F., Harrington, J., Schultz, R.R., Watanabe, Y., Johnson, M., Fang, J., O'Brien, S. E., Orioli, I. M., Castilla, E. E., FitzPatrick, D. R., Jiang, R., Marazita, M. L. and Murray J. C. 2005 Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.*, 1(6): e64.
- Vieira, A.R., Cooper, M.E., Marazita, M.L. Orioli, I.M. and Castilla, E.E. 2007. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am. J. Med. Genet. A*, 143A: 2075–2078.
- William, J.L. and Lawrance, S. S., 2001. *Human embryology* 3rd. Edition, Churchill Livingstone, Pennsylvania p: 370.
- Wong, F.K. and Hägg, U. 2004. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med. J.*, 10:331-6.
- Wyszynski, D.F., Duffy, D.L and Beaty, T.H. 1997. Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Palate Craniofac. J.*, 34, 206–210.
- Wyszynski, D.F. and Wu, T. 2002. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 39, 188-92.
- Zabawski, Jr. E. J. and Cohen, J. B. 1999. Hereditary hypodontia and onychorrhexis of the fingernails and toenail koilonychia: Witkop's tooth-and nail syndrome. *Dermatology Online Journal*, 5(1): 3.
- Zhang, Z., Song, Y., Zhao X., Zhang, X., Cesar Fermin, C. and Chen, Y.P. 2002. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*, 129, 4135-4146.
- Zuccherro, T.M., Cooper, M.E., Maher, B.S., Daack-Hirsch, S., Nepomuceno, B., Ribeiro, L., Caprau, D., Christensen, K., Suzuki, Y., Machida, J., Natsume, N., Yoshiura, K.-I., Vieira, A,R, Orioli, I.M., Castilla, E.E., Moreno, L., Arcos-Burgos, M., Lidral, A.C., Field, L. L., Liu, Y., Ray, A., Goldstein, T.H.; Schultz R.E., Shi, M., Johnson, M.K., Kondo, S., Schutte, B.C, Marazita, M.L. and Murray, J. C. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *The New England Journal of Medicine*, 351(8):769-80.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: EZGİ HALATLI

Doğum Yeri: BURSA

Doğum Tarihi: 15.03.1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Osmangazi Gazi Anadolu Lisesi
(2002)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2007)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
(Eylül 2007 – Kasım 2010)

Katıldığı Seminerler

- Kalıtsal Hastalıkların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler, 2008.